

高氧致慢性肺疾病新生大鼠肺组织中 ERK1/2 变化的研究

胡瑜 刘雪雁 富建华 薛辛东

(中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 在高氧致慢性肺疾病(CLD)新生大鼠肺组织中的表达及作用。方法 将48只新生Wistar大鼠随机分为高氧组 and 对照组, 每组24只。高氧组生后即置于氧箱中, 维持氧浓度为0.90, 诱导CLD; 对照组生后置于空气中。于生后3 d、7 d 和14 d 采集肺组织标本, 应用免疫组化、Western blot 及 Real-time PCR 方法检测 ERK1/2 蛋白及 mRNA 表达, 同时测定肺组织纤维化评分。结果 免疫组化及 Western blot 结果显示7 d、14 d 时高氧组肺组织 p-ERK1/2 蛋白的表达均明显高于同时时间点对照组($P < 0.01$)。Western blot 结果同时显示各组间 ERK1/2 总蛋白的表达差异无统计学意义。Real-time PCR 结果表明各组间 ERK1、ERK2 mRNA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 新生大鼠持续吸入高氧后, ERK1/2 蛋白磷酸化活化, 参与了高氧致 CLD 肺纤维化的形成过程。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(7):581-585]

[关键词] 高氧; 慢性肺疾病; 细胞外信号调节激酶; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)07-0581-05

Expression of ERK1/2 protein in lung tissues of newborn rats with hyperoxia-induced chronic lung disease

HU Yu, LIU Xue-Yan, FU Jian-Hua, XUE Xin-Dong. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Xue X-D, Email: xdxue@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of extracellular signal regulated protein kinase (ERK) 1/2 in lung tissues of newborn rats with chronic lung disease (CLD) caused by hyperoxia. **Methods** Forty-eight full-term newborn rats were randomly divided into two groups: hyperoxia and control. The two groups were exposed to a hyperoxic gas mixture (0.90 O₂) for an induction of CLD and room air within 12 hrs after birth, respectively. The levels of ERK1/2 protein and mRNA in lung tissues were measured using immunohistochemistry, Western blot and real-time PCR methods on postnatal days 3, 7 and 14. The severity of pulmonary fibrosis was evaluated. **Results** The expression of p-ERK protein in lung tissues in the hyperoxia group was significantly higher than that in the control group on postnatal days 7 and 14 ($P < 0.01$). There were no significant differences in the levels of total ERK1/2 protein and ERK1/2 mRNA. **Conclusions** The activation of phosphorylated ERK1/2 may lead to lung fibrosis caused by hyperoxia in newborn rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (7):581-585]

Key words: Hyperoxia; Chronic lung disease; Extracellular signal regulated protein kinase; Newborn rats

随着围产医学的发展,早产儿,尤其是极低出生体重儿的存活率有了明显提高,但随之而来的因长时间吸入高浓度氧所导致的早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)却成为威胁生命和健康的首要疾病。因其发病机制尚不十分清楚,目前仍无有效的防治手段,使约10%~15%的患儿因严重的肺纤维化于生后1年内死于呼吸衰竭,存活者也因肺功能障碍需长期依赖氧气甚至是机械通气^[1]。

尽管 CLD 的发病机制目前尚未完全清楚,但其最终病理结局为肺泡发育障碍及肺间质纤维化^[2]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族成员之一, ERK 的持续活化是 G1 期进入 S 期必需的,与细胞增殖、转化和分化密切相关。ERK 主要有 ERK1 和 ERK2 两种亚型,具有 83% 序列同源性^[3]。目前在

[收稿日期]2010-11-25; [修回日期]2011-02-20
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30801245);辽宁省教育厅项目(2008833)。
[作者简介]胡瑜,女,博士,主治医师。
[通信作者]薛辛东,教授。

早产儿 CLD 发生的过程中是否也存在着 ERK1/2 蛋白信号传导通路的调节异常尚罕见报道,因此本研究通过对高氧肺损伤新生大鼠不同发展阶段肺组织 ERK 蛋白及 mRNA 的表达水平进行研究,探讨其在 CLD 发生发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

足月新生 Wistar 大鼠 48 只(由中国医科大学盛京医院实验动物中心提供)。主要试剂:兔抗大鼠 ERK1/2 及磷酸化 ERK(p-ERK)1/2 蛋白单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司);SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司);RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 大连宝生物工程有限公司);引物由 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 高氧模型制作参考 Jeon 等^[4]的文献。将新生 Wistar 大鼠随机分为实验组和对照组,每组 24 只,雌雄不限。实验组生后即置于氧箱中,持续输入氧气,维持氧浓度为 0.90(美国 OM-25ME 型测氧仪检测),CO₂ 浓度 < 0.5%(Dapex 气体分析仪),温度 22~25℃,湿度 50%~70%。每天定时开箱 0.5 h,添加水、饲料及更换垫料,并与对照组交换代母鼠,以避免因氧气中毒致喂养能力下降。对照组置于空气中。

1.2.2 标本的收集 于实验后 3、7、14 d 分别从两组中随机抽取动物 8 只,10% 的水合氯醛麻醉后打开胸腔,分离肺组织。将左肺置于 4% 多聚甲醛中固定。右肺用冷生理盐水洗净残血,吸干水分,置于无 Rnase 的 Eppendorf 管中,-80℃ 保存。

1.2.3 肺组织纤维化评分 按 Ashcroft 等^[5]的方法于 10 倍光镜下进行双盲纤维化评分。评分标准:正常肺组织为 0 分;肺泡或细支气管壁少许纤维化为 1 分;中度纤维化而肺泡结构无改变为 2~3 分;有明确的肺泡结构改变(肺泡壁明显增厚)、纤维束或纤维小结形成为 4~5 分;有严重肺泡结构改变和大片纤维化为 6~7 分;完全纤维化为 8 分。

1.2.4 免疫组织化学技术检测 p-ERK1/2 蛋白表达 按免疫组化试剂盒步骤操作,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,常规制备 4 μm 厚的组织切片。一抗为兔抗大鼠 p-ERK1/2 抗原单克隆 IgG 抗体(1:100),DAB 显色。以细胞质或细胞核有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。每组 8 只动物随

机抽取切片各 1 张,于光镜下(×400)随机选取 5 个视野,固定窗口面积,利用美国 Universal Imaging Porporation 图像分析系统,应用 Meta Morph 软件,测定平均光密度值(OD 值)后取均值。

1.2.5 Western blot 方法检测 ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达 取右肺组织标本,RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白。取 50 μL 蛋白质上样,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜,经 5% 脱脂奶粉封闭后,与 ERK1/2 或 p-ERK1/2 多克隆抗体(1:1000)4℃ 振摇孵育过夜,再加入 HRP 标记的二抗(1:2000),化学发光法检测,MF-ChemiBIS 3.2 电泳凝胶成像系统分析各个蛋白条带的校对积分光密度,实验重复 5 次。

1.2.6 Real-time PCR 方法检测 ERK1/2 mRNA 表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,参照 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司试剂说明书,采用 SYBR Green I 荧光染料嵌合法,应用 LightCycle 2.0 Real-time PCR 仪进行扩增,引物由 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司设计合成。ERK1-F:5'-GGT AGACGGT-TCTGGAATGGAAGG-3'; ERK1-R: 5'-GTCAGG-GAAAATGGGGTGGG-3'; ERK2-F: 5'-TGTTTCCCAAACGCTGACTCCA-3'; ERK2-R: 5'-AGTCGTC-CAGCTCCATGTCAAAC-3'; GAPDH-F: 5'-GCAC-CGTCAAGGCTGAGAAC-3'; GAPDH-R: 5'-ATGGTG-GTGAAGACGCCAGT-3'。根据标准曲线,荧光定量 PCR 仪自动分析并计算结果,实时 PCR 的结果以 Ct 值表示。相对定量采用比较 Ct 法。实验重复 5 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠肺组织病理改变

对照组 3 d 的肺组织表现为肺泡样结构不规则,呈囊泡样,肺泡间隔较厚;7、14 d 时肺泡结构逐渐规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄。实验组吸入高氧 3 d 时肺泡腔内有少许红细胞渗出及肺泡间隔有炎性细胞浸润,而 7 d 时肺泡减少,间隔增厚;14 d 时肺泡腔大小不等,少数肺泡融合,肺泡表面积减小,肺分隔明显增厚,肺成纤维细胞增生,肺纤维化形成。见图 1。

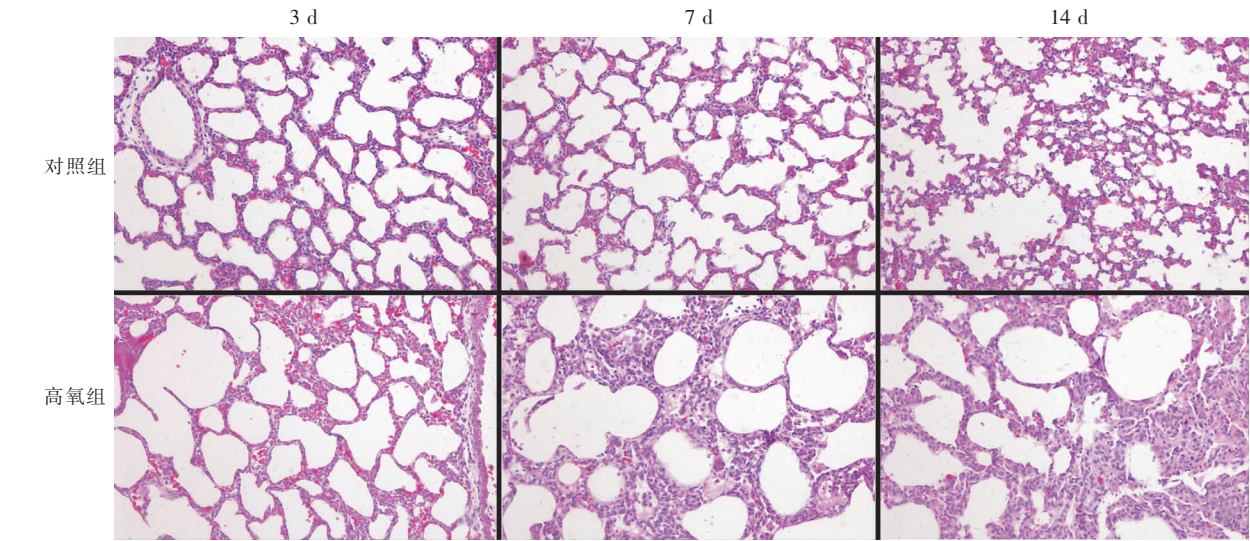


图1 肺组织病理学改变(苏木精-伊红染色,×400) 对照组3 d肺组织囊泡样,7 d肺泡分隔逐渐变薄,14 d肺泡化形成;高氧组3 d可见红细胞浸润,7 d肺泡减少,间隔增厚,14 d肺大泡及纤维化形成。

2.2 各组新生大鼠肺组织纤维化评分比较

高氧组3 d与对照组3 d相比,肺组织纤维化评分差异无统计学意义($t=0.61, P>0.05$);高氧组7 d肺组织纤维化评分较同时间对照组明显增加($t=12.55, P<0.01$),出现肺泡壁增厚、纤维束或纤维小结形成;高氧组14 d肺组织纤维化评分较同时间对照组亦明显增加($t=20.38, P<0.01$),有严重肺泡结构改变和大片纤维化的形成。见图2。

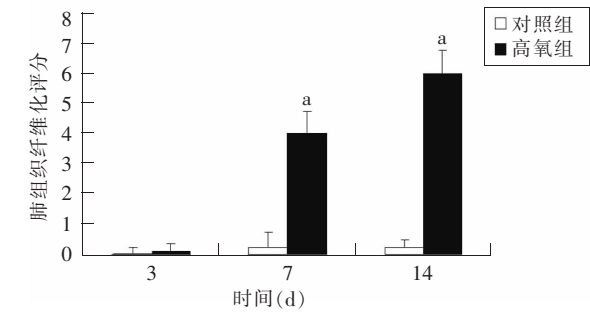


图2 各组肺组织纤维化评分($n=8$) a:与同时间点对照组比较, $P<0.01$

2.3 各组新生大鼠肺组织 p-ERK1/2 蛋白的表达

肺泡上皮细胞及间质细胞中均可见 p-ERK1/2 蛋白表达。高氧组3 d与对照组3 d相比,肺组织 p-ERK1/2 蛋白的表达差异无统计学意义($t=1.86, P>0.05$),高氧组7 d和14 d时 p-ERK1/2 蛋白的表达量较同时间对照组明显增加(t 分别为13.22和14.01,均 $P<0.01$)。见图3。

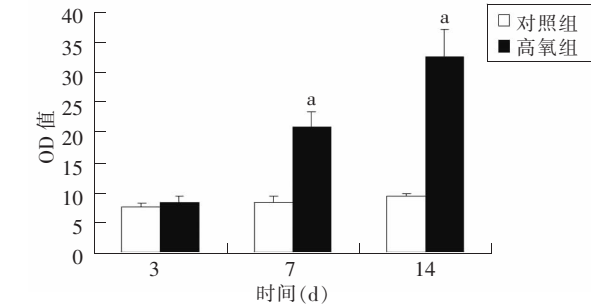


图3 各组肺组织 p-ERK 蛋白表达的光密度值($n=8$) a:与同时间点对照组比较, $P<0.01$

2.4 各组新生大鼠肺组织 ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达

Western blot 电泳图上可见 42 kDa 的 ERK1 (p-ERK1)及 44 kDa 的 ERK2(p-ERK2)两条泳带。高氧组3 d时肺组织 p-ERK1/2 蛋白的表达与同时间点对对照组相比,差异无统计学意义($t=1.71, P>0.05$),而高氧组7 d和14 d时 p-ERK1/2 蛋白的表达量较同时间点对对照组明显增多(t 分别为10.15和28.39,均 $P<0.01$)。而各组间 ERK1/2 蛋白的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4,5。

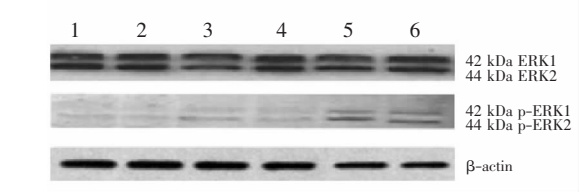


图4 Western blot 检测肺组织 ERK 及 p-ERK 蛋白的表达 1. 对照组3 d; 2. 对照组7 d; 3. 对照组14 d; 4. 高氧组3 d; 5. 高氧组7 d; 6. 高氧组14 d

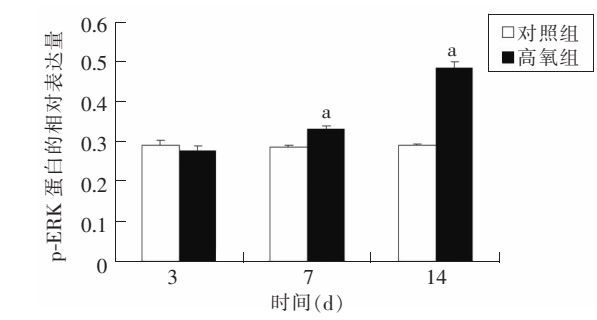


图5 Western blot 检测肺组织 p-ERK 蛋白的相对表达量($n=5$) a: 与同时间点对照组比较, $P<0.01$

2.5 各组新生大鼠肺组织 ERK1/2 mRNA 表达

荧光实时定量 PCR 结果表明对照组及高氧组肺组织在各个时段均有 ERK1 及 ERK2 的 mRNA 表达。但不同时间点各组肺组织 ERK1 及 ERK2 的 mRNA 表达量差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 6, 7。

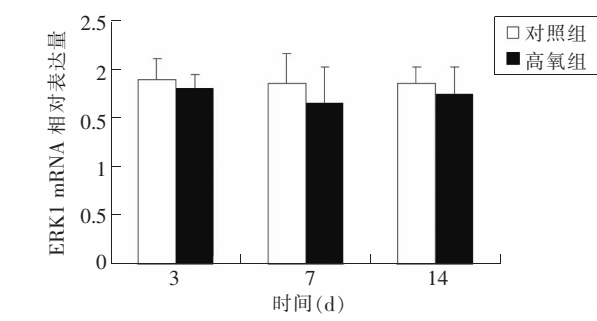


图6 肺组织 ERK1 mRNA 相对表达量($n=5$)

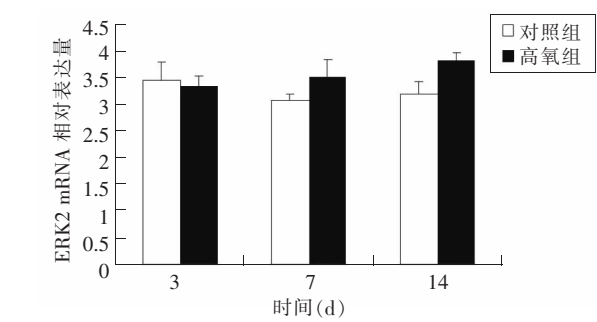


图7 肺组织 ERK2 mRNA 相对表达量($n=5$)

3 讨论

有资料表明早产儿 CLD 晚期最主要的病理变化是肺泡发育障碍及肺间质纤维化^[2]。现已明确, 无论肺间质纤维化的病因如何, 其结局均为肺成纤维细胞的大量聚集和胶原等细胞外基质的过多沉

积。本研究发现新生鼠吸入高氧 3 d 时发生肺部炎症反应, 并于 7 d 后逐渐出现肺泡腔数量及表面积减小, 间质增厚, 成纤维细胞增生, 最终形成纤维化, 这一病理改变符合早产儿 CLD 的发生、发展特点。

MAPK 是细胞外多种刺激传向胞内的信号转导通路的交汇点, 参与调节细胞增殖、分化、生存和凋亡等多种生物学行为。哺乳动物 MAPK 家族成员可分为 6 大类至少 11 个成员, ERK1/2 通路是其中之一。ERK 活化后进入细胞核, 引起底物基因表达水平的改变, 从而影响细胞生长和增殖, 因此与许多纤维化疾病的发生密切相关。有研究表明, 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠气管内注射博来霉素 5 d 后, 给予高潮气量机械通气可导致肺纤维化, 同时发现 p-ERK1/2 蛋白活性增强, 总 ERK1/2 蛋白水平不变; 预防性应用 PD98059 可通过抑制 ERK1/2 上游激酶的磷酸化活化, 减轻肺纤维化的程度^[6]。Ko 等^[7]也发现, 将人肺上皮细胞 A549 细胞系暴露于 95% 高氧中 24 h, p-ERK1/2 蛋白表达量呈线性升高, 高氧持续 48~72 h 时, p-ERK1/2 蛋白表达却反而出现下降, 整个过程总 ERK2 蛋白表达量则无变化。本研究证实: 持续暴露于 90% 高氧环境中 7、14 d 的肺组织 p-ERK1/2 蛋白表达量较对照组均明显增高, 且与 CLD 肺纤维化的病理改变相一致; 总 ERK1/2 蛋白, ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达水平均与正常对照组无明显差异。这表明 ERK 的活化是发生在转录后水平。磷酸化活化的 ERK1/2 蛋白与 CLD 的发生密切相关, 在 CLD 肺纤维化的过程中发挥了重要的调控作用。

已有研究证实, 降解细胞外基质的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 及转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的过度表达与纤维化的发生密切相关, 在 CLD 肺纤维化发生中的作用也越来越受到人们的重视^[8-9]。有研究表明, MMP-2 和 MMP-9 的表达依赖 ERK1/2 通路, 抑制 ERK 的磷酸化后, 纤维肉瘤细胞 HT1080 中 MMP-2、MMP-9 的表达亦减少^[10]。而 TGF- β 可诱导 p-ERK1/2 的活化^[11]。从海藻中提取的硫酸化低聚糖 MS80, 可以通过抑制 ERK 信号转导通路的活化, 减轻 TGF- β 所诱导的人胚肺成纤维细胞增殖, 胶原沉积及 MMP-9 的合成; 并有效减少胶原沉积, 减轻博来霉素诱导的肺纤维化^[12]。上述研究表明 MMPs、TGF- β 的促纤维化作用与 ERK1/2 的活化密切相关。在哺乳动物中, MMPs 的基因启动子区具有相对保守性, 多种 MMPs 的基因启动子上游携带有 ERK1/2 蛋白下游转录调节因子 AP-1 结合位点, 故

多种 MMPs 的表达受 MAPK/ERK 的调控^[13]。因此,ERK1/2 在肺纤维化发生中的作用受到越来越多的重视。目前,已有人应用体外实验研究发现,硫化氢及罗格列酮两种药物可通过抑制 ERK 的活性,从而在肺间质纤维化的治疗中发挥重要作用^[14-15]。因此,ERK1/2 蛋白有望成为今后预防和治疗早产儿 CLD 肺纤维化的重要靶点。

[参 考 文 献]

[1] Hayes D Jr, Feola DJ, Murphy BS, Shook LA, Ballard HO. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Respiration*, 2010, 79(5):425-436.

[2] Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Semin Perinatol*, 2006, 30(4):179-184.

[3] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4):396-405.

[4] Jeon GW, Sung DK, Jung YJ, Koo SH, Choi SH, Chang YS, et al. Granulocyte colony stimulating factor attenuates hyperoxia-induced lung injury by down-modulating inflammatory responses in neonatal rats[J]. *Yonsei Med J*, 2011, 52(1):65-73.

[5] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4):467-470.

[6] Li LF, Liao SK, Huang CC, Hung MJ, Quinn DA. Serine/threonine kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase regulate ventilator-induced pulmonary fibrosis after bleomycin-induced acute lung injury: a prospective, controlled animal experiment[J]. *Crit Care*, 2008, 12(4):R103.

[7] Ko JC, Wang YT, Yang JL. Dual and opposing roles of ERK in regulating G(1) and S-G(2)/M delays in A549 cells caused by hyperoxia[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(2):472-483.

[8] Davies PL, Spiller OB, Beeton ML, Maxwell NC, Remold-O'Donnell E, Kotecha S. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity[J]. *Thorax*, 2010, 65(3):246-251.

[9] Dasgupta C, Sakurai R, Wang Y, Guo P, Ambalavanan N, Torday JS, et al. Hyperoxia-induced neonatal rat lung injury involves activation of TGF-beta and Wnt signaling and is protected by rosiglitazone[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(6):L1031-L1041.

[10] Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, et al. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(7):1858-1863.

[11] Asano K, Shikama Y, Shoji N, Hirano K, Suzaki H, Nakajima H. Tiotropium bromide inhibits TGF-beta-induced MMP production from lung fibroblasts by interfering with Smad and MAPK pathways in vitro[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2010, 5:277-286.

[12] Jiang HD, Guan HS. MS80, a novel sulfated oligosaccharide, inhibites pulmonary fibrosis by targeting TGF-beta1 both in vitro and in vivo[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7):973-979.

[13] Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, et al. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H2O2-dependent ERK1/2 activation[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17):14264-14270.

[14] Fang LP, Lin Q, Tang CS, Liu XM. Hydrogen sulfide suppresses migration, proliferation and myofibroblast transdifferentiation of human lung fibroblasts[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(6):554-561.

[15] Lin Q, Fang LP, Zhou WW, Liu XM. Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts[J]. *Exp Lung Res*, 2010, 36(2):120-128.

(本文编辑:王庆红)