

# 新生大鼠高氧肺损伤 P38 活化和 MMP-2 mRNA 表达的研究

潘涛 肖志辉

(苏州大学附属儿童医院新生儿科,江苏 苏州 215003)

**[摘要]** **目的** 观察高氧肺损伤新生大鼠肺组织中 P38-丝裂原活化蛋白激酶(P38)的活化与基质金属蛋白酶-2(MMP-2)mRNA 表达水平的变化,并探讨 P38 的活化对 MMP-2 mRNA 表达的影响。**方法** 将 36 只新生 Sprague-Dawley 大鼠随机分为空气组、高氧组和 SB203580 干预组,每组 12 只。建立高氧肺损伤动物模型,处理组给予相应的干预。各组分别于第 3 天和第 7 天处死大鼠,常规苏木精-伊红染色,观察肺组织病理学变化;Western blot 检测肺组织 P38 蛋白的活化水平,RT-PCR 检测肺组织 MMP-2 mRNA 表达的变化。**结果** 高氧组大鼠肺组织 P38 的活化和 MMP-2 mRNA 表达水平较空气组和干预组明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** P38 在新生大鼠高氧肺损伤中活化增强,可能参与 MMP-2 mRNA 表达的调控。  
**[中国当代儿科杂志,2013,15(5):383-386]**

**[关键词]** P38 丝裂原活化蛋白激酶;基质金属蛋白酶 2;高氧;肺损伤;新生大鼠

## Expression of P38 MAPK and MMP-2 mRNA in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury

PAN Tao, XIAO Zhi-Hui. Department of Neonatology, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215003, China (Xiao Z-H, Email: xzh195678@sina.com)

**Abstract: Objective** To observe P38 mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA expression level changes in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury, and to investigate the influence of P38 MAPK activation on MMP-2 mRNA expression. **Methods** Thirty-six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: air control, hyperoxia and SB203580-treated hyperoxia ( $n = 12$ ). The rats were sacrificed on the 3rd and 7th days and the lungs were removed. Hematoxylin-eosine staining was used to observe the pathological changes in lung tissues. **Results** Compared with the air and SB203580-treated groups, levels of P38 MAPK and MMP-2 mRNA significantly increased in the hyperoxia group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Expression of P38 MAPK increases in neonatal rats with hyperoxia-induced acute lung injury and this may play a role in control of the expression of MMP-2 mRNA.  
**[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(5):383-386]**

**Key words:** P38 mitogen-activated protein kinase; Matrix metalloproteinase-2; Hyperoxia; Lung injury; Neonatal rats

支气管肺发育不良(BPD)严重影响新生儿尤其是早产儿的生存质量,成为 NICU 工作中最为棘手的问题之一,其详细发病机制尚未完全阐明。P38-丝裂原活化蛋白激酶(P38)是 MAPK 家族的一个重要成员,因其在炎症、组织纤维化等过程的调控作用成为近年来肺损伤的研究热点。国外学者 Carvalho 等<sup>[1]</sup>用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 持续刺激肺泡 II 型上皮细胞(AEC-II),发现 P38 的活化。Yumoto 等<sup>[2]</sup>发现 P38 可调控中性粒细胞的移行、渗出等炎性反应过程。Tudhope 等<sup>[3]</sup>发现,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)等细胞因子的释放有赖于

P38 的磷酸化。Elkington 等<sup>[4]</sup>在研究肺结核的实验中发现 P38 的磷酸化,能促进 TNF- $\alpha$  和 G 蛋白联合受体信号通路的协同作用,从而促进基质金属蛋白酶-1(MMP-1)上调和基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)下调,说明 P38 是调节肺基质降解的关键位点。本实验通过建立新生 Sprague-Dawley(SD)大鼠高氧肺损伤模型并检测肺组织 P38 的活化以及 MMP-2 mRNA 的表达,探讨 P38 是否参与 MMP-2 mRNA 的表达的调控,从而为临床治疗支气管肺发育不良探寻新的靶点。

[收稿日期]2012-09-24;[修回日期]2012-11-24

[作者简介]潘涛,男,硕士,主治医师。

[通信作者]肖志辉,主任医师。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

3~5 d 新生 SD 大鼠 36 只,体重 9~10 g,雌雄不限,由上海斯莱克实验动物公司提供。实验试剂包括 P38 兔抗鼠多抗(美国 SANTA CRUZ 公司), GAPDH、羊抗兔 IgG(上海联科生物技术有限公司), TRIzol(Reagent Invitrogen 公司), M-MLV 逆转录酶(Fermentas 公司), RNase(Inhibitor Invitrogen 公司), SB203580(Sigma 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 实验分组 新生 SD 大鼠 36 只,随机分为空气组、高氧组(高氧+生理盐水)和干预组(高氧+SB203580),每组 12 只。将高氧组和干预组实验动物放于氧箱中,保持箱内氧气浓度为 90%~95%,每日更换垫料和食物,每 12 h 将母鼠置于空气中 1 h,减轻高氧对母鼠的影响,防止其护理能力的下降<sup>[5]</sup>;空气组置于空气中。干预组每日同一时间点尾静脉注射 SB203580(特异性 P38 磷酸化抑制剂,0.5 mg/kg),高氧组注射等量的生理盐水。各组分别在实验第 3 天和第 7 天处死 6 只动物,观测相应的实验指标。

1.2.2 标本制备 取 3、7 d 实验鼠,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉放血处死。取鼠右肺,-80℃冻存,用于 P38 和 MMP-2 的检测。左肺 4%多聚甲醛中固定,24 h 后石蜡包埋,5 μm 切片,用于常规苏木精-伊红染色,观察肺组织病理学变化,拍照存档。

1.2.3 Western blot 检测肺组织中 P38 的活化 裂解肺组织提取蛋白,按每泳道加总蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,半干式电转移至硝酸纤维素滤膜上,室温封闭 2 h 后,加入相应的兔抗磷酸化 P38(1:1000) 4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000),ECL 增强化学发光显色系统显色 5 s~5 min。以 GAPDH 表达水平对上样量一致性进行评估。应用 GDS-8000 型凝胶成像分析系统进行扫描并进行半定量分析。

1.2.4 RT-PCR 检测肺组织中 MMP-2 mRNA 含量

(1) 按总 RNA 提取试剂说明书操作。TRIzol 提取总 RNA。(2) 逆转录合成互补 DNA(cDNA) 第一链。(3) PCR 扩增。MMP-2(250 bp):上游:5'-GGAAGCATCAAATCGGACTG-3',下游:5'-GGGCGG-GAGAAAGTA-GCA-3'; GAPDH(595 bp):上游 5'-CAGTGGCAGCCTCGTCTCAT-3' 下游 5'-AGGGG-CATCCACAGTCTTC-3'。扩增条件:94℃预变性 3 min; 94℃变性 45 s,60.5℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 28 个循环;最后 72℃再延伸 7 min。(4) 产物分析:扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用 Kodak 1D 型凝胶成像系统及分析系统进行电泳条带分析。目标产物 mRNA 表达水平以其与 GAPDH 的相对表达量来计算。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 各组肺组织病理变化

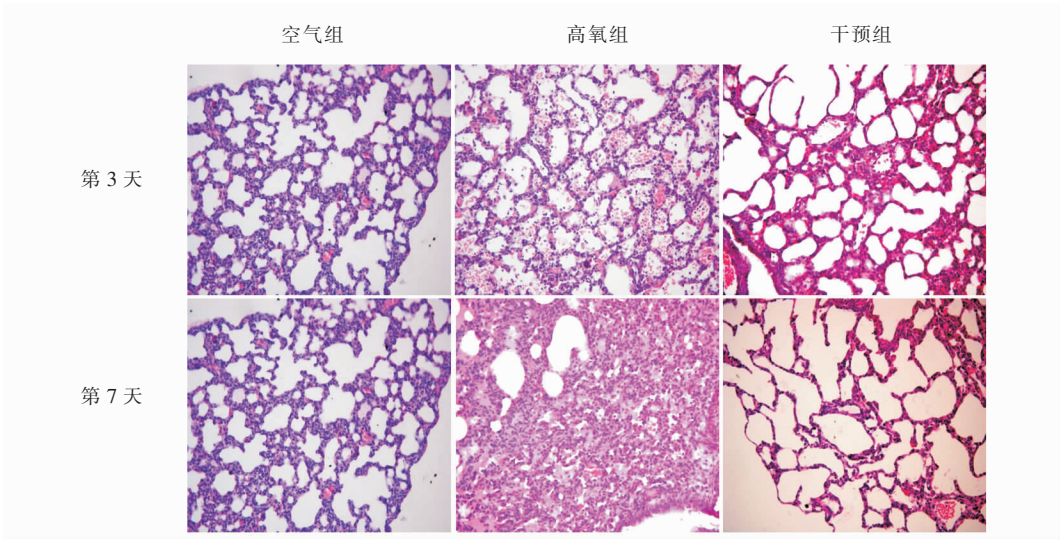
空气组肺组织结构完整,较少炎症细胞浸润,各时间点无明显差异。高氧组暴露 3 d,光镜下可见肺毛细血管扩张、充血,炎症细胞浸润,部分肺泡腔可见粉色渗出液,肺间隔断裂,肺泡腔扩大;高氧组暴露 7 d,炎性渗出、肺水肿、肺出血较前更加明显,部分肺间隔增宽变形。给予 SB203580 处理后,炎症病理变化明显减轻。见图 1。

## 2.2 肺组织 P38 的活化

三组比较,肺组织 P38 的表达在第 3 天和第 7 天差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。其中高氧组 P38 的活化较空气组和干预组均升高( $P < 0.01$ )。见表 1、图 2。

## 2.3 肺组织 MMP-2 mRNA 的表达

三组比较,肺组织 MMP-2 mRNA 的表达在第 3 天和第 7 天差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。其中高氧组 MMP-2 mRNA 的表达较空气组和干预组均升高( $P < 0.01$ )。见表 2、图 3。



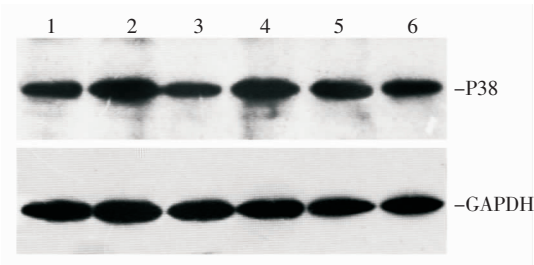
**图 1 各组肺组织病理变化**(苏木精 - 伊红染色, ×100) 空气组肺组织结构完整,较少炎症细胞浸润。高氧 3 d 组肺毛细血管扩张、充血,炎症细胞浸润,部分肺泡腔可见粉色渗出液,肺间隔断裂,肺泡腔扩大;高氧 7 d 组炎性渗出、肺水肿、肺出血较高氧 3 d 组更加明显,部分肺间隔增宽变形。相同时间点干预组炎症病理变化较高氧组明显减轻。

| 表 1 肺组织中 P38 的活化 ( $\bar{x} \pm s$ ) |    |                            |                            |
|--------------------------------------|----|----------------------------|----------------------------|
| 组别                                   | 例数 | 第 3 天                      | 第 7 天                      |
| 空气组                                  | 6  | 0.630 ± 0.020              | 0.660 ± 0.030              |
| 高氧组                                  | 6  | 1.510 ± 0.160 <sup>a</sup> | 2.000 ± 0.180 <sup>a</sup> |
| 干预组                                  | 6  | 0.940 ± 0.050 <sup>b</sup> | 1.320 ± 0.080 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> 值                           |    | 123.835                    | 205.407                    |
| <i>P</i> 值                           |    | <0.001                     | <0.001                     |

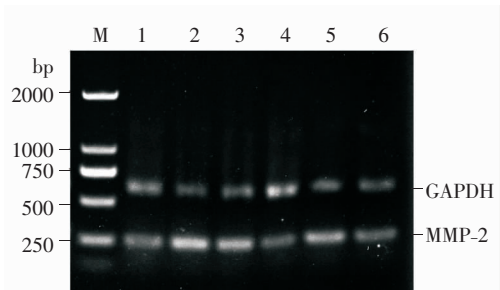
| 表 2 肺组织 MMP-2 mRNA 的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ) |    |                            |                            |
|--------------------------------------------|----|----------------------------|----------------------------|
| 组别                                         | 例数 | 第 3 天                      | 第 7 天                      |
| 空气组                                        | 6  | 1.680 ± 0.090              | 0.490 ± 0.030              |
| 高氧组                                        | 6  | 3.430 ± 0.320 <sup>a</sup> | 1.150 ± 0.130 <sup>a</sup> |
| 干预组                                        | 6  | 2.100 ± 0.090 <sup>b</sup> | 0.620 ± 0.030 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> 值                                 |    | 127.353                    | 117.127                    |
| <i>P</i> 值                                 |    | <0.001                     | <0.001                     |

a: 与空气组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与高氧组比较,  $P < 0.01$

a: 与空气组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与干预组比较,  $P < 0.01$



**图 2 Western blot 检测肺组织 P38 的活化**( $n = 6$ )  
1:空气 3 d 组;2:高氧 3 d 组;3:空气 7 d 组;4:高氧 7 d 组;5:干预 3 d 组;6:干预 7 d 组。



**图 3 RT-PCR 检测肺组织 MMP-2 mRNA 的表达**( $n = 6$ ) M:Marker;1:空气 3 d 组;2:高氧 3 d 组;3:干预 3 d 组;4:空气 7 d 组;5:高氧 7 d 组;6:干预 7 d 组。

3 讨论

P38 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它存在于大多数细胞内,是真核细胞转导细胞外信号到细胞内,引起细胞内反应的一类重要信号系统<sup>[6]</sup>。肺组织在长时间高氧暴露下,氧化/抗氧化系统易出现失衡,导致活性氧(ROS)在细胞内大量累积,ROS 可作为第二信使通过改变细胞内氧化还原状态激活 P38 MAPK 信号转导通路<sup>[1]</sup>。Romashko 等<sup>[7]</sup>用 250 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 MLE-12 细胞株,可见 P38 的磷酸化,并能被特异性的 P38 抑制剂 SB203580 抑制。Sigaud 等<sup>[8]</sup>用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以 1 ~ 10 mmol/h 的速度持续刺激 ATII 细胞,使细胞内 ROS 水平增加 2 ~ 3 倍,也发现 P38 的活化。Kuo 等<sup>[9]</sup>也在吸烟诱导肺损伤的实验中发现,吸烟诱导 ROS 的产生,活化 P38 MAPK-Jun-FasL 通路,诱导肺组织的炎症和凋亡。本实验中新生大鼠持续高氧吸入,病理结果符合 BPD 改变<sup>[10]</sup>,实验结果显示高氧组新生大鼠肺组织 P38 的活化明显增强,干预组 P38 的活化水平较高氧组降低,说明

高氧暴露可激活肺组织 P38 MAPK 通路,此过程可被 P38 磷酸化抑制剂 SB203580 部分抑制。

近年来的研究表明,基质金属蛋白酶(MMPs)的过度表达及与基质金属蛋白酶特异性组织抑制剂(TIMPs)表达之间的失衡等在高氧肺损伤的发展及转归中发挥重要的作用:在肺泡化早期,需要 MMPs 较高水平表达,促使细胞外基质(ECM)成分适当降解,以利于基底膜的变薄,同时通过促进肺泡Ⅱ型上皮细胞的迁移以及向肺泡Ⅰ型上皮细胞分化并覆盖新形成的肺泡间隔,扩大呼吸膜内表面积。而在肺泡化后期,随着肺泡分隔形成的结束,适当下调 MMPs 的表达,上调 TIMPs 的表达,则有益于肺泡结构和功能的维持与稳定<sup>[11]</sup>。而 P38 MAPK 信号通路在以上的病理过程中可能发挥了重要的调控作用。Elkington 等<sup>[4]</sup>在研究肺结核空洞形成机制的实验中发现,感染结核杆菌的单核细胞条件培养基(CoMTb)可上调肺泡上皮细胞上 MMP-1 启动子的所活性,促进其基因表达及蛋白分泌,同时可以抑制 TIMP-1 的分泌,促进基质降解,推测其机制是 CoMTb 诱导 P38 的磷酸化,而 P38 的活化可促进 TNF- $\alpha$  和 G 蛋白联合受体信号通路的协同作用,从而促进 MMP-1 上调和 TIMP-1 下调,说明 P38 是调节肺基质降解的关键位点。Pillinger 等<sup>[12]</sup>也证实胃上皮细胞上 MMP-13 的合成有 P38 的参与调控。Park 等<sup>[13]</sup>观察了体外实验中聚丙烯酸甲酯(PMA)刺激 D54 人成胶质细胞瘤细胞系后,MMPs/TIMPs 的表达与肿瘤扩散的情况,结果显示 PMA 是通过激活 P38 MAPK 信号通路,使 D54 细胞中 MMPs/TIMPs 的表达失衡,造成 ECM 重建失败,肿瘤扩散。Nee 等<sup>[14]</sup>在体外实验中,观察了 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  对肾近曲小管细胞中 MMP-9 和 TIMP-1 的调控作用,发现 TNF- $\alpha$  能诱导剂量依赖性 MMP-9 的表达上调,而 IL-1 $\beta$  对这种 MMP-9 的上调有抑制作用,并通过对 MAPKs 的免疫印迹分析提示 P38 MAPK 信号通路参与上述调节作用。本实验中高氧组 MMP-2 mRNA 的表达水平明显升高,而干预组 MMP-2 mRNA 表达水平较高氧组降低,说明 P38 的磷酸化被部分抑制后,MMP-2 mRNA 的表达水平降低,提示 P38 可能参与了 MMP-2 mRNA 表达的调控。P38 调控 MMPs/TIMPs 的表达不是单一的生物学行为,而是一个复杂的调控网络,其结果具有细胞类型依赖型、P38 活化时间及强度依赖性等,其调控的详细机制、对肺损伤的保护作用目前尚未完全清楚,有待进一步的研究。

## [参 考 文 献]

- [1] Carvalho H, Evelson P, Sigaud S, Kwara A. Mitogen-activated protein kinases modulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells[J]. J Cell Biochem, 2004, 92 (3): 502-513.
- [2] Yumoto H, Yamada M, Shinohara C, Schiro R, Cowan LS. Soluble products from eike nella corrodens induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22 (1): 36-45.
- [3] Tudhope SJ, Finney-Hayward TK, Nicholson AG. Different mitogen-activated protein kinase-dependent cytokine responses in cells of the monocyte lineage[J]. J Pharm acol Exp Ther, 2008, 324 (1): 306-312.
- [4] Elkington PT, Emerson JE, Lopez-Pascua LD, Hunter PR. Mycobacterium tuberculosis up-regulates matrix metalloproteinase-1 secretion from human airway epithelial cells via p38 MAPK switch[J]. J Immunol, 2005, 175 (8): 5333-5340.
- [5] 胡良冈, 钱燕, 龚永生. SPF 级新生大鼠高氧肺损伤模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(6): 441-443.
- [6] Obat T, Brown GE, Yaffe MB, Gaston MA. MAPkinase pathway activated by stress the p38 MAPK pathway[J]. Critical Care Med, 2000, 28(4): 67-77.
- [7] Romashko J, Horowitz S, Franek WR. MAPK pathways mediate peroxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35 (8): 978-993.
- [8] Sigaud S, Evelson P, Gonzalez-Flecha B, Alland D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7 (1-2): 6-13.
- [9] Kuo WH, Chen JH, Lin HH. Induction of apoptosis in the lung tissue from rats exposed to cigarette smoke involves p38/JNK MAPK pathway[J]. Chem Biol Interact, 2005, 155 (1-2): 31-42.
- [10] Wang W, Wei W, Ning Q. Effect of intra-amniotic endotoxin priming plus hyperoxia exposure on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in lungs of preterm newborn rats[J]. Chin J Pediatr, 2007, 45 (7): 533-538.
- [11] 李文斌, 常立文, 容志惠. 高氧、维甲酸对早产鼠肺组织基质金属蛋白酶-2、-9 及特异性组织抑制物-1、-2 表达的影响[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(6): 497-503.
- [12] Pillinger MH, Marjanouic N, Kim SY, Fine PE. Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by Eprostaglandins and MAPKs[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (11): 9973-9979.
- [13] Park MJ, Park IC, Hur JH, Kalkut GE. Modulation of phorbol ester-induced regulation of matrix-metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Neurosurg, 2002, 97 (1): 112-118.
- [14] Nee LE, McMorro T, Campbell E. TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells[J]. Kidney Int, 2004, 66 (4): 1376-1386.

(本文编辑:刘伟)