

论著·实验研究

高氧对胎鼠肺成纤维细胞 p53 和增殖细胞核抗原表达的影响

蔡小芳¹ 孙继民¹ 李文斌²

(1. 武汉市儿童医院重症医学科, 湖北 武汉 430016;
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] **目的** 探讨高氧对胎鼠肺成纤维细胞(LFs) p53和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。**方法** 原代培养胎鼠肺LFs,待生长至亚汇合状态时,随机分为:空气组和高氧组(95% O₂/5% CO₂)。于培养12h和24h时,采用噻唑蓝(MTT)实验测定细胞增殖状况,半定量RT-PCR方法检测p53 mRNA表达,Western blot技术检测p53和PCNA蛋白的表达。**结果** (1)与空气组比较,高氧组12h和24h的LFs生长抑制率分别为8%和23%;(2)高氧组在12h和24h时p53 mRNA表达明显高于空气组($P<0.01$);(3)高氧组在12h和24h时p53蛋白表达明显高于空气组($P<0.01$),而PCNA蛋白表达水平在24h明显低于空气组($P<0.01$)。**结论** 高氧暴露抑制PCNA表达、促进p53表达,从而抑制LFs增殖和DNA复制,是导致肺发育异常的重要因素。
[中国当代儿科杂志, 2014, 16(9): 922-926]

[关键词] 高氧;肺成纤维细胞;p53;增殖细胞核抗原;大鼠

Effect of hyperoxia on p53 and PCNA expression in fetal rat lung fibroblasts

CAI Xiao-Fang, SUN Ji-Min, LI Wen-Bin. Department of Emergency Medicine, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Li W-B, Email: lwb717299@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of hyperoxia exposure on the expression of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in fetal rat lung fibroblasts (LFs). **Methods** Primary rat embryonic LFs were cultured *in vitro*. LFs grew to subconfluence and then were randomly divided into air and hyperoxia exposure (95% O₂, 5% CO₂) groups. After LFs were cultured for 12 and 24 hours, the proliferation was analyzed by MTT. p53 mRNA level was detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). p53 and PCNA protein levels were determined by Western blot. **Results** After 12 and 24 hours of culture the growth inhibition rate of LFs was 8% and 23% respectively in the hyperoxia exposure group. p53 mRNA and protein levels increased significantly ($P<0.01$) in the hyperoxia exposure group after 12 and 24 hours of culture compared with the air exposure group. Hyperoxia exposure decreased PCNA expression after 24 hours of culture ($P<0.01$). **Conclusions** Hyperoxia exposure increases p53 level and decreases PCNA expression, resulting in inhibitions of LFs proliferation and DNA repair.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(9): 922-926]

Key words: Hyperoxia; Lung fibroblast; p53; Proliferating cell nuclear antigen; Rats

随着现代诊疗技术的进步,极低和超低出生体重早产儿存活率明显提高,与之相关的并发症如支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的发生率也愈来愈高。长时间高浓度供氧是

导致早产儿BPD发生的重要原因,因此,高氧暴露细胞和动物模型成为了研究BPD发病机制的经典模型^[1-4]。肺泡化受阻和肺泡微血管发育障碍是BPD的主要病理特征,肺组织多种细胞的异常增

[收稿日期] 2014-02-11; [接受日期] 2014-03-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81370099);湖北省自然科学基金资助项目(2008CDB139、2013CFB087);华中科技大学自主创新研究基金(国际科技合作专项2014XJGH008)。

[作者简介] 蔡小芳,女,硕士,主任医师。

[通信作者] 李文斌,男,副主任医师。

殖、分化和凋亡参与了此病理过程的发生和发展^[2]。与肺泡上皮细胞以及血管内皮细胞一样,肺成纤维细胞(lung fibroblasts, LFs)也是高氧暴露肺组织损伤后参与应答反应的主要效应细胞之一^[1]。高氧时,需要间质 LFs 产生多种生物活性物质,促进 II 型肺泡上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AEC II)增殖、移行并分化为 I 型肺泡上皮细胞(type I alveolar epithelial cell, AEC I)以修复受损的肺泡结构^[1-2,4]。p53 基因在调节细胞周期和细胞增殖过程中发挥重要作用,高氧可通过依赖 p53 和非依赖 p53 的途径促进 AEC II 凋亡、抑制 LFs 增殖并影响其生物学功能,从而导致肺泡发育受阻^[2-4]。本实验在前期研究基础上,通过观察延长高氧暴露时间后胎鼠 LFs p53 及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达变化,进一步探讨高氧改变 LFs 增殖及生存状况的可能机制,为 BPD 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 胎鼠 LFs 原代培养

参照李文斌等^[5]方法进行:无菌条件下取孕 19 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠胎鼠肺组织,剪碎, D-Hanks 液漂洗, 0.1% 胰蛋白酶(含 0.02% Dnase, 按每肺 0.5 mL)室温下消化 15 min, 用等量含 10% 胎牛血清(FCS, 浙江三利生物制品有限公司)的 MEM (GIBCO 公司)终止消化, 过 100 目、200 目筛网各 1 次, 4℃ 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清, 沉淀重悬, 调整细胞浓度接种于 96 孔板或 50 mL 玻璃培养瓶(部分培养瓶中放有细胞爬片), 置 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养 40 min 至 1 h, 换液, 贴壁细胞即为原代胎鼠 LFs。

1.2 细胞鉴定及 LFs 纯度计算

Vimentin 是 LFs 胞浆中特征性蛋白。细胞爬片经 4℃ 丙酮固定 10 min, 晾干, 粘片。采用免疫细胞化学 SP 法鉴定(SP Kit 和 DAB Kit, 北京中山生物技术有限公司), 操作步骤严格按试剂盒说明书进行。小鼠抗大鼠 Vimentin (Santa Cruz 公司)工作液浓度为 1:100。在显微镜下(×60 倍)随机选取同一细胞爬片 3 个视野, 计算 Vimentin 阳性细胞占整个视野的百分率, 即为 LFs 纯度。

1.3 实验分组

经鉴定后, 待 LFs 生长至亚汇合状态时, 将培养瓶中培养液换成含 2% FCS 的 MEM, 并随机分为空气组($n=6$)和高氧组($n=6$)。空气组置于 5% CO₂ 培养箱中; 高氧组通 95% O₂/5% CO₂ 高纯混合气(2 L/min) 10 min 后密封, 置培养箱中培养 12 h 和 24 h。其中高氧组在培养结束时均用测氧仪检测培养瓶中氧浓度, 氧浓度低于 90% 的样本弃去。

1.4 噻唑蓝(MTT)实验检测 LFs 细胞抑制率

待 96 孔板中原代胎鼠 LFs 生长至铺满板底约 70% 时, 分设空白对照组、空气对照组和 90% 高氧组, 每组设 6 复孔, 分别培养 12 h 和 24 h, 弃去培养液, 每孔加入 5 g/L MTT (华美公司) 10 μL, 继续孵育 4 h, 每孔加入 100 μL 二甲亚砜(DMSO)终止, 振荡 15 min, 450 型 ELISA-Reader 酶标仪(Bio-Red 公司) 570 nm 波长检测吸光度。以空气对照组细胞活力为 100%, 按公式: 细胞抑制率 = $1 - (\text{高氧组吸光度} - \text{空白对照组吸光度}) / (\text{空气对照组吸光度} - \text{空白对照组吸光度}) \times 100\%$, 计算高氧状态下细胞生长抑制率。

1.5 RT-PCR 检测 p53 mRNA 表达

按 Trizol 试剂(上海华舜生物工程有限公司)一步法提取细胞 RNA。经紫外分光光度法定量后, 取 2 μg RNA 用 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)进行逆转录反应合成 cDNA。以 β-actin 为内参照, 分别取 1 μL 模板进行 PCR 反应, 相应引物(均由北京赛百盛基因技术有限公司合成)序列分别为: β-actin (280 bp): 上游 5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTC-3', 下游 5'-ATCCGTAAAAGCCTCTATGC-3'; p53 (551 bp): 上游 5'-CTACAAGCAGTCACAGCACATGAC-3', 下游 5'-TCATTCAGCTCTCGGAACATCTCG-3'。反应条件为预变性 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察并拍照, 每组实验至少重复 3 次, 条带用 GDS-8000 型凝胶成像分析系统进行分析, 比较 p53 与 β-actin 扩增条带灰度比值(A p53/A β-actin)。实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 p53 和 PCNA 蛋白表达

裂解细胞提取蛋白, 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, 加入相应的小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (1:500, Neomarks)、兔抗大鼠 p53 多克隆抗体 (1:500, abcam) 或小鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体 (1:300, Santa Cruz), 4℃ 孵育过夜, 洗膜后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。每组实验至少重复 3 次, 用 GDS-8000 型凝胶成像分析系统进行扫描, 以 p53 或 PCNA 与 β -actin 条带面积灰度比值进行比较和半定量分析。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析、 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定

经鉴定, 细胞爬片上 LFs 纯度为 $(95 \pm 1) \%$ ($n=6$) 表明所获细胞适合研究使用 (图 1)。

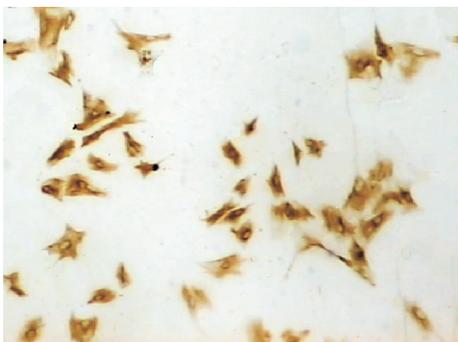


图 1 胎鼠 LFs 细胞浆中 Vimentin 表达 (SP 法, $\times 60$)

2.2 高氧对胎鼠 LFs 细胞形态、活力及增殖的影响

充氧前倒置相差显微镜下观察, 绝大多数细胞胞体明亮, 紧贴瓶底, 无悬浮细胞, 呈良好生长状态。随时间延长, 高氧组镜下观察可见细胞胞体折光率降低, 细胞生长状态欠佳, 悬浮细胞增多, 但大多数细胞仍具有活力。空气组细胞则无明显改变。MTT 结果显示, 高氧 12 h 和 24 h 时, LFs 生长抑制率分别为 8% 和 23%。

2.3 高氧对胎鼠 LFs p53 mRNA 表达的影响

与同时间空气组比较, 高氧 12 h 时, p53 mRNA 表达即显著升高 (1.57 ± 0.13 vs 0.85 ± 0.08 , $t=8.1763$, $P < 0.01$); 高氧 24 h 时其表达升高更为显著 (5.16 ± 0.13 vs 2.52 ± 0.16 , $t=21.3975$, $P < 0.01$)。在空气组, 24 h p53 mRNA 表达明显高于 12 h (2.52 ± 0.16 vs 0.85 ± 0.08 , $t=15.8859$, $P < 0.01$)。在高氧组, 24 h p53 mRNA 表达也明显高于 12 h (5.16 ± 0.13 vs 1.57 ± 0.13 , $t=33.1861$, $P < 0.01$) (图 2、3)。

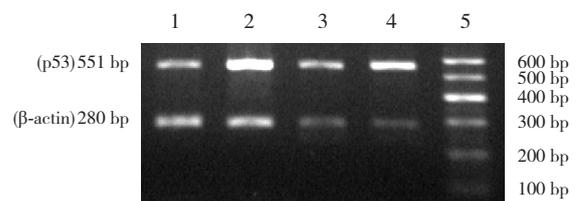


图 2 各组胎鼠 LFs p53 mRNA 表达 ($n=6$)

注: 1. 空气 12 h; 2. 高氧 12 h; 3. 空气 24 h; 4. 高氧 24 h; 5. DNA Marker。

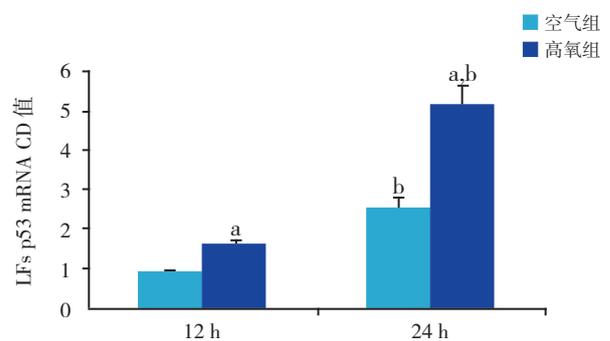


图 3 各组胎鼠 LFs p53 mRNA 表达 ($n=6$)

注: a 示与同时间空气组比较, $P < 0.01$; b 示与同组 12 h 比较, $P < 0.01$ 。

2.4 高氧对胎鼠 LFs p53 和 PCNA 蛋白表达的影响

与同时间空气组比较, 高氧组 12 h 和 24 h 时的 p53 蛋白表达显著升高 (分别 0.86 ± 0.05 vs 0.54 ± 0.06 , $t=7.494$, $P < 0.01$; 0.98 ± 0.05 vs 0.25 ± 0.02 , $t=23.8476$, $P < 0.01$)。在空气组, 12 h p53 蛋白表达明显高于 24 h (0.54 ± 0.06 vs 0.25 ± 0.02 , $t=8.5369$, $P < 0.01$); 在高氧组, 12 h p53 蛋白表达明显低于 24 h (0.86 ± 0.05 vs 0.98 ± 0.05 , $t=3.0630$, $P < 0.05$)。见图 4、5。

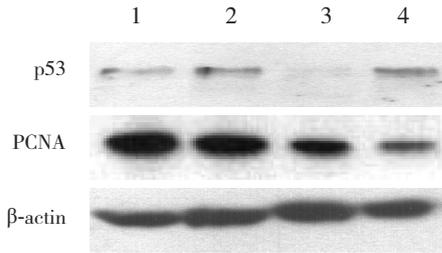


图4 各组胎鼠 LFs p53 和 PCNA 蛋白表达 (n=6)
注: 1. 空气 12 h; 2. 高氧 12 h; 3. 空气 24 h; 4. 高氧 24 h。

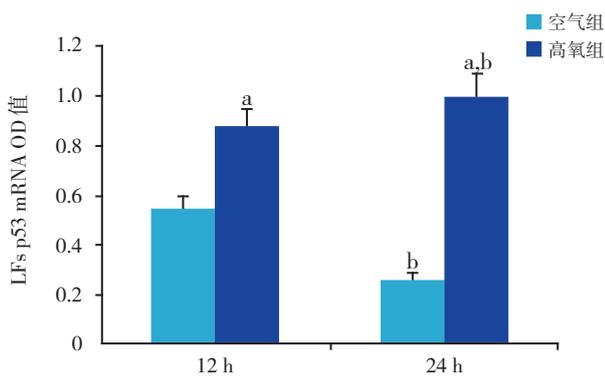


图5 各组胎鼠 LFs p53 表达 (n=6) 注: a 示与同时间空气组比较, $P<0.01$; b 示与同组 12 h 比较, $P<0.01$ 。

12 h 时 2 组 PCNA 蛋白表达无明显差异 (0.86 ± 0.07 vs 0.79 ± 0.04 , $t=1.5284$, $P>0.05$) ; 但高氧组 24 h 时 PCNA 蛋白表达明显低于空气组 (0.20 ± 0.01 vs 0.53 ± 0.05 , $t=10.3727$, $P<0.01$) 。 2 组 24 h PCNA 表达均明显低于 12 h (空气组: 0.53 ± 0.05 vs 0.86 ± 0.07 , $t=6.7878$, $P<0.01$; 高氧组: 0.20 ± 0.01 vs 0.79 ± 0.04 , $t=27.1402$, $P<0.01$) (图 4、6)。

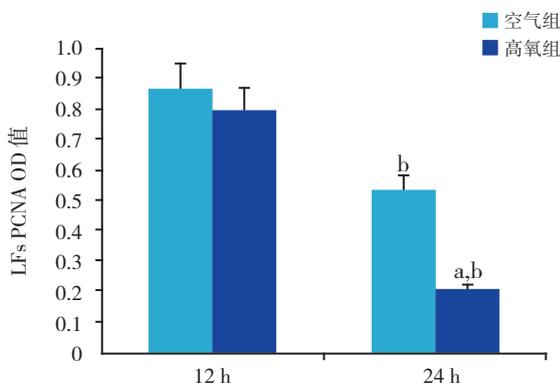


图6 各组胎鼠 PCNA 蛋白表达的影响 (n=6)
注: a 示与同时间空气组比较, $P<0.01$; b 示与同组 12 h 比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

氧疗是治疗新生儿疾病的常用手段, 但长时间高氧暴露可导致大量活性氧 (ROS) 的产生, 由于新生儿尤其是早产儿自身抗氧化防御能力不足, 这些具有高度活性的 ROS 可广泛地攻击靶细胞结构成分, 导致 DNA 等大分子物质破坏, 是造成早产儿 BPD 发生的重要分子机制^[2,6-7]。同时, DNA 分子损害可启动细胞内一系列信号转导级联反应, 抑制细胞增殖, 并诱导细胞发生坏死、凋亡。

PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的一种辅助蛋白, 作为 S 期细胞的一个标志物, 用于检测细胞的增殖能力, 是判定细胞增殖状态的有效指标之一, 并与高氧肺损伤时细胞增殖状况有很好相关性^[1,8]。本课题组前期研究显示, 高氧暴露 12 h 可导致胎鼠 AECII 大量坏死、凋亡, 其 PCNA 蛋白表达下降, 增殖受到抑制; 但 LFs 所受影响较小, 且其 PCNA 蛋白表达水平也没有明显变化, 2 种细胞对高氧暴露的差异性表现可能是导致未成熟肺组织异常重构的重要原因^[9]。本研究进一步延长高氧暴露至 24 h, 发现胎鼠 LFs PCNA 蛋白表达水平亦开始明显降低, 提示高氧暴露持续时间延长也可进一步抑制 LFs 的增殖。这种高氧所致细胞增殖抑制可导致肺间隔形成受阻和肺泡化程度降低^[9]。

肿瘤抑制基因 p53 的表达产物 p53 是细胞周期的重要检测点蛋白 (checkpoint protein)。多种形式的氧应激可激活 p53, 使其磷酸化, 后者作为转录因子可调控多种基因的表达, 并介导细胞周期抑制, 促进 DNA 修复或诱导细胞凋亡^[6-7]。本研究结果显示, 95% 高氧暴露 12 h 和 24 h 时胎鼠 LFs p53 mRNA 及其蛋白表达水平均明显增高, 提示 p53 参与了高氧暴露后 LFs 的细胞周期调控。p53 调控的一个主要靶基因是细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 p21, 后者是 G1/S 期检测点蛋白。p21 氨基端可与 G1/S 期细胞周期蛋白及其依赖性蛋白激酶复合物 (cyclins-CDK) 结合使细胞周期阻滞于 G1/S 期, 羧基端可与 PCNA 结合抑制 DNA 复制, 促进修复, 一旦修复不成功, 则诱导细胞发生凋亡^[3,10-12]。本研究结果提示, 95% 高氧暴露后, 尤其是 24 h 时, LFs 生长抑制率达 23%, 同时 PCNA 的表达明显降低、p53 表达升高, 表明高氧暴露抑制 LFs 增殖同时, 也抑制了其 DNA 复制。

动物研究表明, 80% 高氧暴露可通过降低组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 的表达及活化促进 p21 的转录, 从而抑制细胞增殖, 并进一步导致新生小鼠肺组织发育障碍, 但并没有发生肺细胞凋亡^[2]。也就是说, p21 的表达也可通过非依赖 p53 (如 HDAC) 的途径调控肺细胞的增殖和凋亡, 从而对高氧肺损伤的结局产生影响。那么, 高氧暴露下, LFs 是否通过 HDAC 信号途径在抑制其增殖同时, 避免了凋亡发生? p53 与 HDAC 信号通路之间是否存在联系? 目前尚不清楚。

综上, 随高氧暴露时间延长, 不仅 AECII 发生增殖抑制, LFs 的增殖也受到影响, 但 LFs 并不象 AECII 一样发生坏死或凋亡, 其具体机制尚有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Giordani VM, DeBenedictis CM, Wang Y, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) contributes to fetal lung fibroblast injury induced by mechanical stretch[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2014, 34(1): 58-63.
- [2] Londhe VA, Sundar IK, Lopez B, et al. Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and up-regulation of p21 in neonatal mouse lung[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(5 Pt 1): 371-377.
- [3] Jean JC, George E, Kaestner KH, et al. Transcription factor Klf4, induced in the lung by oxygen at birth, regulates perinatal fibroblast and myofibroblast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54806.
- [4] Wright CJ, Dennery PA. Manipulation of gene expression by oxygen: a primer from bedside to bench[J]. *Pediatr Res*, 2009, 66(1): 3-10.
- [5] 李文斌, 常立文, 祝华平, 等. 高氧、维甲酸对胎鼠肺成纤维细胞 c-Jun、c-Fos 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2003, 32(2): 216-219.
- [6] Klimova TA, Bell EL, Shroff EH, et al. Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS[J]. *FASEB J*, 2009, 23(3): 783-794.
- [7] Maniscalco WM, Watkins RH, Roper JM, et al. Hyperoxic ventilated premature baboons have increased p53, oxidant DNA damage and decreased VEGF expression[J]. *Pediatr Res*, 2005, 58(3): 549-556.
- [8] Albertine KH, Dahl MJ, Gonzales LW, et al. Chronic lung disease in preterm lambs: effect of daily vitamin A treatment on alveolarization[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(1): L59-L72.
- [9] 李文斌, 常立文, 容志惠, 等. 维甲酸对高氧暴露下原代培养的胎鼠肺泡 II 型上皮细胞和成纤维细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(1): 115-121.
- [10] McGrath-Morrow SA, Lauer T, Collaco JM, et al. Transcriptional responses of neonatal mouse lung to hyperoxia by Nrf2 status[J]. *Cytokine*, 2014, 65(1): 4-9.
- [11] Das KC, Ravi D, Holland W. Increased apoptosis and expression of p21 and p53 in premature infant baboon model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(1): 109-116.
- [12] 祝华平, 常立文, 李文斌. CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在大鼠肺发育过程中的动态表达 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(5): 396-400.

(本文编辑: 王庆红)