

p38 丝裂素活化蛋白激酶在幼鼠高氧肺损伤模型中的表达及作用

李静,许峰,胡兰,谭利平,符跃强,方芳,匡凤梧,卢仲毅

(重庆医科大学附属儿童医院重症监护室,重庆 400014)

[摘要] 目的 近年来的研究证实 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)在多种因素诱导的肺损伤中发挥着重要的调控作用,但其在高氧肺损伤中的表达和作用尚不明了。该文通过建立幼鼠高氧肺损伤模型来研究 p38MAPK 在该模型中的表达及作用。方法 90% 氧气暴露建立幼年 Wistar 大鼠高氧肺损伤模型,用免疫组化和蛋白质免疫印迹法观察 p38MAPK 在肺组织中的分布和表达,用 TUNEL 法观察肺组织的细胞凋亡指数,并同时观察 p38MAPK 抑制剂 SB203580 对肺组织细胞凋亡的影响。结果 高氧暴露后肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白表达明显增强,主要分布于肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、血管内皮细胞、浸润炎症细胞。同时肺凋亡指数明显增加。使用 SB203580 抑制了 p38MAPK 活性的上升,同时降低了肺凋亡指数。结论 高氧诱导的急性肺损伤模型中,磷酸化的 p38MAPK 表达增加,并表达于肺内多种细胞,可能起促凋亡作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(5):389-392]

[关键词] p38 丝裂素活化蛋白激酶;高氧症;肺损伤;幼鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)05-0389-04

Expression and role of p38 mitogen-activated protein kinase in hyperoxia-induced lung injury juvenile rat model

LI Jing, XU Feng, HU Lan, TAN Li-Ping, FU Yue-Qiang, FANG Fang, KUANG Feng-Wu, LU Zhong-Yi. Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Xu F, Email: lijingwangyi@126.com)

Abstract: Objective Some research has shown that p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) plays important roles in lung injuries induced by various factors. Its expression and role in hyperoxia-induced lung injury remains unknown. This study investigated the expression and role of p38MAPK in hyperoxia-induced lung injury juvenile rat model. **Methods** Hyperoxia-induced lung injury rat model was prepared by 90% O₂ exposure. The location and expression of p38MAPK in lung tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot respectively. Apoptosis index of lung was evaluated by TUNEL technique. The effect of SB203580, a p38MAPK inhibitor, on the apoptosis index of lung was observed. **Results** The expression of phospho-p38MAPK increased obviously after hyperoxia. Positive phospho-p38MAPK cells were mainly distributed in the alveolar, airway epithelial cells, pulmonary vascular endothelium cells and infiltrative inflammatory cells. The apoptosis index of lung also significantly elevated. SB203580 inhibited the activation of p38MAPK, and reduced the apoptosis index of lung. **Conclusions** The phospho-p38MAPK increased and was expressed in many kinds of lung cells in lung injury rat model. It may play a role in the induction of apoptosis in hyperoxia-induced lung injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (5):389-392]

Key words: p38 mitogen-activated protein kinase; Hyperoxia; Lung injury; Juvenile rats

氧疗是临床上抢救儿童呼吸衰竭危重症的方法之一,然而持续高浓度用氧带来的氧化应激性肺损伤即高氧肺损伤,将引起肺间质增生及肺纤维化,最终导致慢性肺部疾病(chronic lung disease, CLD)^[1~3]。目前高氧肺损伤的具体机制尚不明确。p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)通路是近年来备受关注的蛋白激酶通路。已有实验证实, p38MAPK 在多种因素诱导的肺损伤中具有重要作用,但其在高氧肺损伤中的表达和作用尚不明了。本研究探讨了急性高氧肺损伤后肺组织 p38MAPK 的定位和表达,以及 p38MAPK 的激活在高氧诱导的肺细胞凋亡中的作用,并以 p38MAPK 的抑制剂 SB203580 处理幼鼠高氧肺损伤模型,观察其对肺组织细胞凋亡的影响,以期研究 p38MAPK 在高氧肺

[收稿日期]2008-08-13;[修回日期]2008-10-24
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(编号:30370618)
[作者简介]李静,女,硕士研究生,主治医师。主攻方向:儿童重症监护。
[通讯作者]许峰,男,主任医师,重庆医科大学附属儿童医院重症监护室,邮编:400014。

损伤中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及标本收集

3 周龄 Wistar 大鼠, 体质量 40 ~ 50 g, 雌雄不限, 由重庆医科大学实验动物中心提供。取 32 只以数字随机法分为空气对照组和高氧暴露 1, 2, 3 d 组 (每组各 8 只)。高氧组置于有机玻璃氧仓中, 持续输入氧气 (2 L/min), 连续行氧和 CO₂ 浓度监测, 保证氧浓度 ≥ 90%、CO₂ 浓度 ≤ 5%。空气对照组置于同一室内空气中, 两组环境温度控制在 21 ~ 25℃, 湿度 60% ~ 70%。于各对应时间点将各组动物腹腔内注射 3.3% 水合氯醛麻醉后开胸, 结扎右肺中叶, 右心室头皮针插管并剪开左心耳, 以无菌生理盐水进行肺循环灌注至双肺呈苍白色。整体取出心肺和气管, 剥离肺, 生理盐水漂洗干净, 吸水纸拭干。剪出结扎的右肺中叶, 4% 甲醛固定, 24 h 后石蜡包埋, 行肺组织免疫组化。剩余肺置于 -70℃ 冰箱保存待作免疫印迹法检测。

另取 24 只以数字随机法分为空气对照组、高氧暴露 3 d 组和 p38MAPK 干预组 (每组各 8 只)。空气对照组置于室内空气中; 高氧组置于有机玻璃氧仓中, 高氧暴露方法同上。p38MAPK 干预组经尾静脉注射 SB203580 (0.5 mg/kg) 一次, 于药物注射 2 h 后将大鼠置于高氧仓中。3 d 后同上方法处理各组动物。用右肺中叶行细胞凋亡检测, 剩余肺作免疫印迹法检测, 由于实验动物的损伤最后得出的数据为每组 6 只。

1.2 检测方法

1.2.1 二步法免疫组化检测磷酸化 p38MAPK 蛋白的分布 石蜡切片常规脱蜡, 脱水; 3% H₂O₂ 去离子水孵育 5 ~ 10 min; 浸入枸缘酸盐缓冲液微波加热 1 ~ 2 次, 正常山羊血清封闭液封闭 20 min。磷酸化 p38 多克隆抗体 (比例为 1: 500, 购自美国 Sigma 公司) 4℃ 过夜。辣根过氧化物标记羊抗兔 IgG

(1: 1 000), 37℃ 孵育 20 min。DAB 显色, 苏木素复染, 封片。胞核和/或胞浆呈现棕黄色为阳性细胞。

1.2.2 免疫印迹法检测肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白含量 采用改良 RIPA 缓冲液规提取各组织中蛋白质, BCA 比色法测定所提取蛋白的浓度。各组蛋白取样 100 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜。以封闭缓冲液室温封闭 1 h, 磷酸化 p38 (1: 1 000) 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1: 2 500) 孵育 1 h, ECL 显色。用 Quantity One ChemiDocXRS 图像采集系统及分析软件 (美国 Bio-Rad 公司) 对蛋白条带进行分析处理, 蛋白含量用目的条带校正容积 (Adjvolume)/GAPDH 校正容积 (Adjvolume) 表示。

1.2.3 TUNEL 法检测肺组织的细胞凋亡 TUNEL 分析试剂盒购自德国 Roche 公司。将甲醛固定的肺组织切片脱蜡、水化后, 用蛋白酶 K 工作液 (购自美国 Sigma 公司) 室温下消化 20 min, 随后滴加 TUNEL 反应混合液, 于 37℃ 反应 1 h 后, 滴加转化物 POD, 37℃ 反应 30 min, 用二甲基联苯胺 (DAB) 染色。苏木精复染, 封片, 拍照。细胞核棕黄色染色为阳性细胞。在 400 倍光镜下以随机数字表法随机观察 5 个视野, 记数每个视野的凋亡指数 (阳性细胞数/总细胞数 × 100%)。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 多样本均数比较用单因素方差分析, 组间差别比较采用最小显著差 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 磷酸化 p38MAPK 蛋白在肺组织的分布

免疫组化结果显示: 空气对照组有少量磷酸化 p38MAPK 阳性表达, 主要见于肺泡上皮细胞及气道上皮细胞, 高氧暴露组则阳性细胞明显增多, 广泛分布肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、血管内皮细胞、浸润炎症细胞, 胞浆和胞核均有表达 (图 1)。

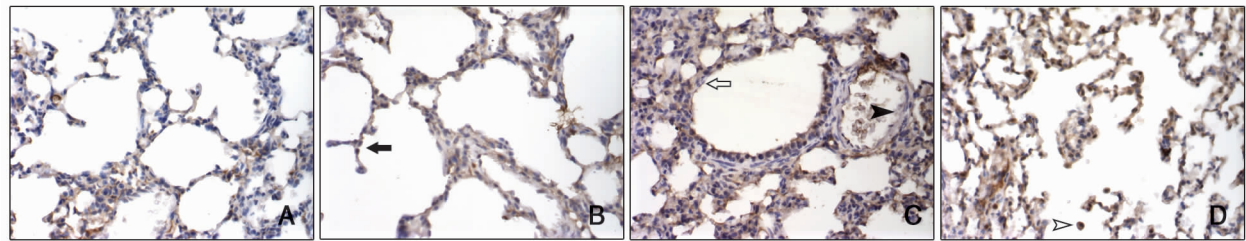


图1 高氧暴露不同时间后磷酸化 p38MAPK 蛋白在肺组织的分布 (×400) A: 空气对照组有少量磷酸化 p38MAPK 阳性表达, 主要见于肺泡上皮细胞及气道上皮细胞。B、C、D 分别为高氧暴露 1、2、3 d 组, 磷酸化 p38MAPK 阳性细胞明显增多, 广泛分布于肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、血管内皮细胞、浸润炎症细胞, 胞浆和胞核均有表达。↓: 肺泡上皮细胞; ↑: 支气管上皮细胞; ⇨: 血管内皮细胞; ∇: 巨噬细胞

2.2 免疫印迹法检测肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达情况

幼鼠暴露于高氧不同时间后,磷酸化 p38MAPK 免疫印迹法的检测结果中可见空气对照组有浅淡的磷酸化 p38MAPK 蛋白条带表达,高氧暴露 1 d,磷酸化 p38 蛋白表达即明显增强,和空气对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。高氧暴露 2 d 蛋白表达达高峰,高氧暴露 3 d 蛋白表达有所下降,但仍强于空气对照组(图 2,表 1)。

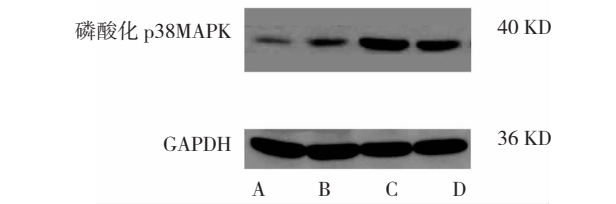


图 2 肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达 A:空气对照组;B:高氧暴露 1 d 组;C:高氧暴露 2 d 组;D:高氧暴露 3 d 组

表 1 肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	磷酸化 p38MAPK
空气对照组	6	0.10 $\pm$ 0.04
高氧暴露 1 d 组	6	0.21 $\pm$ 0.04 ^a
高氧暴露 2 d 组	6	0.59 $\pm$ 0.06 ^a
高氧暴露 3 d 组	6	0.38 $\pm$ 0.05 ^a

a:与空气对照组比较, $P < 0.05$

不同处理组幼鼠磷酸化 p38MAPK 表达的免疫印迹法检测中空气对照组可见浅淡的磷酸化 p38MAPK 蛋白条带表达,高氧暴露 3 d,磷酸化 p38MAPK 蛋白表达明显增加。而 SB203580 干预组磷酸化 p38 蛋白表达较高氧暴露 3 d 组明显降低(图 3,表 2)。

2.3 肺组织细胞凋亡的变化

由表 2 可见,高氧暴露 3 d 组肺组织细胞凋亡指数明显高于空气暴露组,两者比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。SB203580 干预后,肺细胞凋亡指数较高氧暴露 3 d 组明显降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

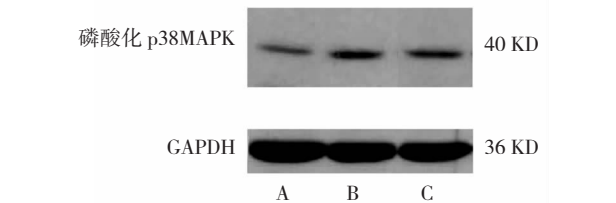


图 3 不同处理组肺组织磷酸化 p38MAPK 的表达 A:空气对照组;B:高氧暴露 3 d 组;C:SB203580 干预组

表 2 不同处理组肺组织磷酸化 p38MAPK 表达及细胞凋亡指数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	磷酸化 p38MAPK	细胞凋亡指数(%)
空气对照组	6	0.11 $\pm$ 0.03	8.94 $\pm$ 2.10
高氧暴露组	6	0.41 $\pm$ 0.05 ^a	50.26 $\pm$ 6.70 ^a
p38MAPK 干预组	6	0.26 $\pm$ 0.03 ^b	34.01 $\pm$ 7.35 ^b

a:与空气对照组比较, $P < 0.05$; b:与高氧暴露组比较, $P < 0.05$

3 讨论

p38MAPK 蛋白是丝裂原活化蛋白激酶家族的一个重要成员,是 Han 等^[4]于 1993 年发现的,由 360 个氨基酸组成的分子量为 38 kD 的蛋白。各种细胞外信号(活性氧、细菌内毒素脂多糖、紫外线、高渗、炎症介质等)均能激活 p38MAPK 通路。激活的 p38MAPK 由细胞浆转移至细胞核内,通过调节效应基因的表达,介导细胞分化、存活、死亡、炎症反应等多种细胞生物学反应^[5]。体外实验表明 p38MAPK 通路参与了高氧刺激诱导的多种细胞多种生物学行为的调控^[6~8],而 p38MAPK 在高氧诱导的肺损伤过程中的在体水平研究少见报道,在大体组织中涉及的细胞类型和发生阶段还不十分明确。故本实验通过建立高氧肺损伤模型,应用免疫组化和免疫印迹技术,从蛋白定位及蛋白表达水平两个方面观察了 p38MAPK 信号蛋白在肺组织中的在体表达水平。我们发现,高氧暴露 1 d,肺组织的 p38MAPK 活性迅速升高,于第 2 天达到高峰,第 3 天活性有所下降,但仍高于基础值。活化的 p38MAPK 蛋白广泛分布于肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、血管内皮细胞及浸润炎症细胞,提示高氧可以刺激 p38MAPK 信号活化,且 p38MAPK 的激活发生于肺内多种细胞,各种不同细胞来源的 p38MAPK 信号的活化共同参与了幼鼠高氧肺损伤的发生。

细胞凋亡是生物体细胞普遍存在的生理性死亡过程,它在调节生物细胞群数量上起着和有丝分裂互补的作用。近年来许多研究表明,肺组织细胞凋亡与高氧肺损伤密切相关^[9~12]。目前认为高氧暴露后的肺细胞凋亡可能是机体对高氧刺激的一种应激反应,主要用于清除肺损伤后过多的肺上皮干细胞和受损的肺泡上皮细胞,以维持机体内环境稳定,限制炎症反应^[13],使肺结构恢复正常。但过度的凋亡将不利于肺组织的重塑和炎症的清除,另外,还可能引起肺纤维化^[14,15]。高氧诱导的肺细胞凋亡可能包括内源性通路和外源性通路两类,多种信号分子参与细胞凋亡过程及其调控,p38MAPK 信号蛋白

是其中重要的一种信号分子。目前在体外实验,氧化刺激诱导的细胞凋亡中 p38MAPK 通路所发挥的作用尚不明确。一些学者认为是诱导凋亡^[6],而另外一些学者则认为是拮抗凋亡^[16]。以上相互矛盾的结果可能和氧化刺激的浓度、作用时间、作用频率有关,也可能和被刺激细胞的 ATP 水平、细胞类型有关。本实验发现,高氧 3 d 组的肺凋亡指数较空气对照组明显增加。表明高氧可以诱导幼鼠肺组织的细胞凋亡。而应用 p38MAPK 的抑制剂 SB203580 干预后发现,SB203580 对高氧暴露后 p38MAPK 的表达有抑制作用,且 SB203580 干预组的肺凋亡指数明显降低。这一结果表明 p38MAPK 信号的激活可以调控高氧诱导的肺组织细胞凋亡,可能起促凋亡作用。

[参 考 文 献]

[1] 侯伟,刘海燕,李丹,周戡平,陈玺. 新生大鼠高氧肺损伤血管内皮生长因子蛋白及其 mRNA 表达变化研究[J]. 中国当代儿科杂志,2008,10(4):504-508.

[2] 刘博,刘雪燕,李娟,王伟,魏克伦. 持续高氧暴露降低新生大鼠肺组织血管内皮生长因子的表达[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(5):447-450.

[3] 钱莉玲,常立文,张谦慎,容志惠. 85% 高浓度氧长期暴露诱发早产大鼠肺损伤[J]. 中国当代儿科杂志,2003,5(2):95-99.

[4] Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14[J]. J Biol Chem, 1993, 268(33):25009-25014.

[5] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. Cell Res, 2005, 15(1):11-18.

[6] Romashko J 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, et al. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(8):978-993.

[7] Lag M, Refsnes M, Lilleaas EM. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells[J]. Toxicology, 2005, 211(3):253-264.

[8] Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL. p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages[J]. Toxicology, 2006, 225(1):36-47.

[9] May M, Strobel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer CP. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants[J]. Eur Respir J, 2004, 23(1):113-121.

[10] 富建华,薛辛东. 高氧致 CLD 早产鼠肺上皮细胞凋亡及相关基因表达的动态研究[J]. 中国医科大学学报, 2005,34(2):100-103.

[11] McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(2):150-155.

[12] Husari AW, Dbaibo GS, Bitar H, Khayat A, Panjarian S, Nasser M, et al. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia[J]. Respir Res, 2006, 7(1):100.

[13] Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair[J]. Chest, 2002, 122(6):293-298.

[14] Young LR, Pasula R, Gulleman PM, Deutsch GH, McCormack FX. Susceptibility of Hermansky-Pudlak mice to bleomycin-induced type II cell apoptosis and fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(1):67-74.

[15] Machino T, Hashimoto S, Maruoka S, Gon Y, Hayashi S, Mizumura K, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells[J]. Crit Care Med, 2003, 31(12):2776-2781.

[16] Carvalho H, Evelson P, Sigaud S, Gonzalez-Flecha B. Mitogen-activated protein kinases modulate H₂O₂-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells[J]. J Cell Biochem, 2004, 92(3):502-513.

(本文编辑:邓芳明)