

· 基础研究 ·

内毒素性急性肺损伤小鼠肺组织中 P38 MAPK 的表达

秦开秀¹, 王 勇², 简华刚¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院急救部 400010; 2. 重庆市公共卫生医疗救治中心 400036)

摘要:目的 探讨内毒素性急性肺损伤(ALI)过程中 P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 MAPK)的表达。方法 腹腔注射脂多糖(LPS)20 mg/kg 建立小鼠 ALI 模型。心脏穿刺查血气分析,并获取肺脏标本,观察肺组织形态学改变。采用免疫组织化学法和 Western blot 技术检测小鼠肺组织中磷酸化 P38 MAPK 的表达。结果 与对照组比较,ALI 组各时相点小鼠肺组织中磷酸化 P38 MAPK 阳性表达明显增加,且在 2 h 达到峰值,主要分布于浸润的炎症细胞、上皮细胞、血管内皮细胞。结论 内毒素性 ALI 过程中启动了 P38 MAPK 信号传导通路。

关键词:急性肺损伤;脂多糖;P38 丝裂原活化蛋白激酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1362-03

Expression of P38 MAPK in lung tissue of mice with endotoxin-induced acute lung injury

Qin Kaixiu¹, Wang Yong², Jian Huagang¹

(1. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

2. Chongqing Infectious Disease Medical Center, Chongqing 400036, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of P38 MAPK in endotoxin-induced acute lung injury(ALI). **Methods** The ALI model was set up by intraperitoneal injection of 20 mg/kg lipopolysaccharide(LPS). Blood samples were collected for blood gas analysis, lung samples were for histomorphology changes. The expressions of phosphated p38 MAPK in lung tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The positive expressions of phosphated P38 MAPK distribute mainly in infiltrative inflammatory cells, epithelial cells and endothelial cells. And the levels of expression of phosphated P38 MAPK in ALI group were higher obviously than those in control group, peaking at two hour. **Conclusion** P38 MAPK signal transduction pathway was activated in endotoxin-induced ALI.

Key words: acute lung injury; lipopolysaccharide; P38 mitogen-activated protein kinase

炎症反应是引起急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的根本原因,已证实信号转导途径中的 P38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)与炎症反应的调控密切相关^[1-2]。本研究通过复制小鼠 ALI 模型,探讨 P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 MAPK)在小鼠肺组织中的表达,以期揭示 P38 在 ALI 的发生、发展中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 昆明种小鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 18~22 g,清洁级。

1.2 方 法

1.2.1 药物与试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、兔抗鼠磷酸化 P38 MAPK 多克隆抗体采购于美国 Sigma 公司,羊抗兔二抗、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术有限公司,免疫组化试剂盒采购于深圳晶美工程有限公司。

1.2.2 动物模型与分组 小鼠腹腔内注射 LPS 20 mg/kg 复制 ALI 模型^[2]。随机分为生理盐水对照组(5 只)和 ALI 组(20 只)。观察时间为腹腔注射生理盐水后即刻(T₀)和注射 LPS 后 0.5 h(T_{0.5})、2 h(T₂)、4 h(T₄)、8 h(T₈),每个时相点 5 只小鼠。

1.2.3 动物标本制备 各组动物用 10 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉,剖开胸腔,经左心室穿刺,用肝素化抗凝空针采血 0.5 mL,保持气密,用 1620 型血气分析仪检测 PaO₂,放血处死动物收集肺组织标本。剥离右肺,用电子天平测量肺组织重量后迅速放入 -70 ℃ 冰箱备用。左肺放入 10%

的甲醛溶液中固定、脱水后,将标本制成厚 5 μm 的石蜡切片,用于免疫组化,并行 HE 染色,观察组织学改变。

1.2.4 肺组织匀浆的制备 取称质量后的肺组织按照 100 mg 组织加蛋白裂解液 1 mL 进行冰浴匀浆,充分匀浆后转移到预冷的 4 ℃ EP 管中。以 4 ℃ 10 000 r/min 进行低温离心 20 min,取上清液,弃沉渣。将上清液转入新的离心管内, -70 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 免疫组化 采用 SP 法行免疫组化染色,严格按试剂盒说明书进行操作。采用光镜观察,细胞内出现棕黄色颗粒作为 P38 MAPK 阳性表达细胞。光镜 10×40 视野下,每张切片随机取 5 个视野,分别计数视野中阳性细胞数。采取双人计数,得出平均值,取 5 个视野计数之和的平均值为每个样本阳性表达的相对含量。

1.2.6 蛋白印迹(Western blot) 取冻存的肺组织匀浆,室温下用考马斯亮兰法测定蛋白浓度后,加入等体积 2×十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液,沸水中煮沸 3~5 min,于事先配制好的 10% SDS-PAGE 样品孔依次加入 100 μg 总蛋白样品,行蛋白电泳。电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, PVDF 膜经封闭液封闭后,与磷酸化的 P38 MAPK-抗体(1:800)反应,再置入 1:250 羊抗兔二抗稀释液中反应,然后将 PVDF 膜放入 100 mL 新鲜配置的 DAB 溶液中,37 ℃ 显色,待蛋白条带清晰后自来水冲洗,吹干,用 Gel Doc 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-RAD 公司)进行灰度值测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。资料采用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PaO₂ 的变化 生理盐水对照组 PaO₂ 为 (92.45 ± 8.10) mm Hg, 注射 LPS 后小鼠 PaO₂ 从 0.5 h 开始迅速下降到 (70.95 ± 9.52) mm Hg, 4 h 达峰值 (58.65 ± 7.42) mm Hg, 8 h 有所上升, 为 (60.88 ± 5.18) mm Hg, 但仍显著低于基础值, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 肺组织形态学检查结果 对照组小鼠 T₀ 时相点肺组织结构清晰, 肺泡腔干净, 肺泡壁无增厚, 支气管黏膜上皮完整; 注射 LPS 后可见肺组织充血明显, 肺泡壁增宽, 肺间质弥漫性

出血, 肺泡腔内大量炎性细胞浸润及红细胞渗出; 并随时间的演变, 肺组织病理改变逐渐加重, 见图 1~3。

2.3 免疫组化 免疫组化结果显示磷酸化 P38 MAPK 蛋白阳性表达表现为胞核染色。对照组肺组织中偶见 P38 MAPK 免疫反应阳性细胞, 为阴性反应; ALI 组在注射 LPS 后 P38 MAPK 阳性细胞数迅速增加, 主要分布于浸润的炎性细胞、肺泡上皮细胞及血管内皮细胞的胞核内, 见图 4~6、表 1。

2.4 Western blot ALI 组在注射 LPS 后 0.5 h 磷酸化 P38 MAPK 表达量开始上升, T₂ 时相点达峰值, 而后逐渐回落。ALI 组各时相点与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

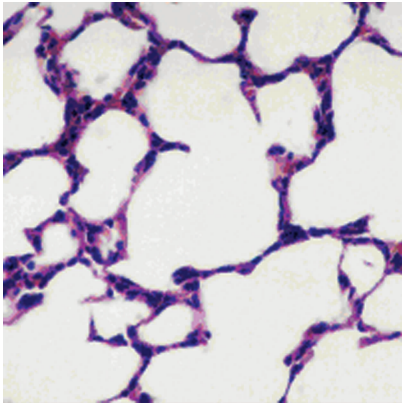


图 1 对照组小鼠 T₀ 时相点肺的组织学特点 (×400)

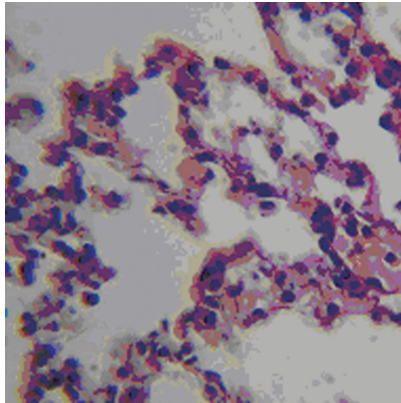


图 2 ALI 组小鼠 T₂ 时相点肺的组织学特点 (×400)

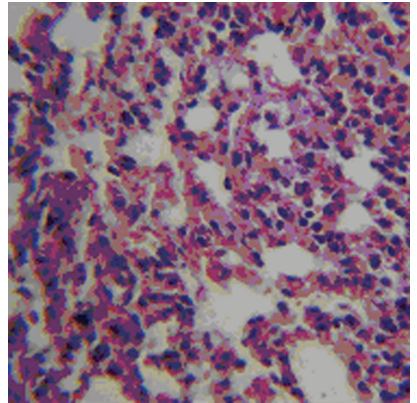


图 3 ALI 组小鼠 T₈ 时相点肺的组织学特点 (×400)

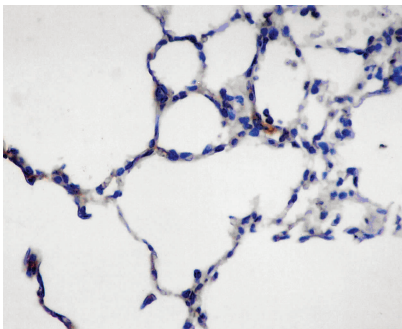


图 4 磷酸化 P38 在对照组小鼠 T₀ 时相点肺组织中的表达 (×400)

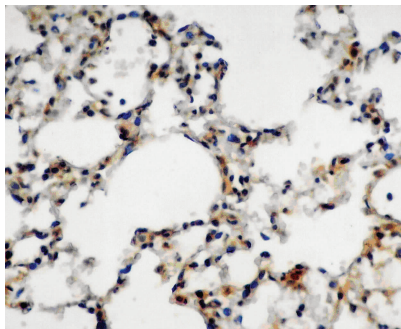


图 5 磷酸化 P38 在 ALI 组小鼠 T₂ 时相点肺组织中的表达 (×400)

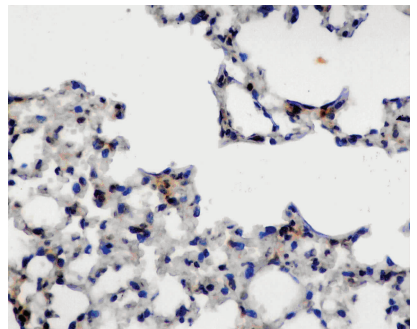


图 6 磷酸化 P38 在 ALI 组小鼠 T₈ 时相点肺组织中的表达 (×400)

表 1 两组小鼠肺组织中磷酸化 P38 MAPK 的表达

组别	n	时相	P38 MAPK 灰度值(×10 ⁶)	P38 MAPK 阳性细胞率
对照组	5	T ₀	51.13 ± 0.77	—
ALI 组	20	T _{0.5}	84.90 ± 1.63 ^a	+
		T ₂	183.25 ± 3.52 ^a	+++
		T ₄	102.73 ± 4.54 ^a	++
		T ₈	92.52 ± 3.04 ^a	+

^a: $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。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, 并引起细胞反应的四大信号系统之一^[3]。其中的 P38 MAPK 信号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程, 并与炎症、应激反应的调控密切相关, 被认为是细胞信息传

递的交汇点和共同通路^[4-5]。P38 MAPK 通路可被紫外线照射、促炎因子、应激刺激及 LPS 和 G⁺ 细菌细胞壁成分所激活^[6-7]。其中, 内毒素是 P38 MAPK 的一个主要激活剂之一, 大量研究表明, LPS 通过激活巨噬细胞、多形核白细胞 (PMN)、内皮细胞 P38 MAPK 通路, 调控炎症因子的表达, 参与急性炎症^[8-10]。在静息状态下, P38 MAPK 以非活化的形式存在于细胞质中, 一旦受到外界有效刺激, P38 即被磷酸化而活化, 活化的 P38 由细胞质进入细胞核, 磷酸化转录因子, 调节靶向基因的表达, 故蛋白提取物中磷酸化 P38 的相对含量可反映 P38 的活化程度^[6]。

ALI 最主要的临床特征是顽固性的低氧血症, 血气分析指标中 PaO₂ 的变化最能反映 ALI 时肺功能的变化。本实验通过向小鼠腹腔内注射 LPS 复制内毒素性 ALI 模型, 发现在注射 LPS 后, PaO₂ 显著下降, 同时光镜下见肺间质弥漫性出血, 肺泡壁增宽, 肺泡腔内大量炎性细胞浸润及红细胞渗出, 这说明 ALI 模型制作成功。

目前,有关 P38 MAPK 参与炎症反应的研究多限于体外实验,其在 ALI 的在体研究少见报道^[11-12]。曾有文献报道,用 LPS 刺激小鼠肺血管内皮细胞,5 min 后就可见到细胞内 P38 MAPK 蛋白磷酸化水平升高,10~45 min 内最为明显,而后逐渐减弱,2 h 基本恢复正常^[13]。而本实验通过免疫组化和 Western blot 检测发现,在腹腔注射 LPS 后 0.5 h 肺组织中磷酸化 P38 MAPK 的表达开始增加,2 h 达到峰值,然后逐渐下降,8 h 仍高于对照组。与肺组织的病理改变程度基本一致。提示 LPS 诱导了肺组织 P38 蛋白激酶的活化,其活化可能与 ALI 的发生和发展密切相关。但 P38 MAPK 参与 ALI 的具体作用机制以及如何通过调节 P38 活性达到防治 ALI 的目的还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ono K, Han JH. The P38 signal transduction pathway activation and function[J]. Cell signal, 2000, 12(1): 1.
- [2] 董静, 施毅, 宋勇, 等. 特异性 P38 蛋白激酶抑制剂 SB 203580 对小鼠感染肺炎衣原体后细胞因子变化的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29(20): 1225-1228.
- [3] Herdaar E, Brown Z. P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease [J]. Mol Med Today, 1999, 5(10): 439-447.
- [4] Zhan J, Liu Y, Zhang Z, et al. Effect of penehyclidine hydrochloride on expressions of MAPK in mice with CLP-induced acute lung injury[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(3): 1909-1914.
- [5] 张诗彤, 白文元, 马俊骥, 等. P38 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路在诱导 Barrett 食管发生中的作用[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(8): 539-542.
- [6] Clark AR, Dean JL, Saklatvala J. Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase P38 [J]. FEBS Lett, 2003, 546(1): 37-44.

- [7] Xu A, Shi G, Liu F, et al. Caenorhabditis elegans mom-4 is required for the activation of the P38 MAPK signaling pathway in the response to Pseudomonas aeruginosa infection[J]. Protein Cell, 2013, 4(1): 53-61.
- [8] Garcia-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, et al. Protein kinases, TNF-alpha, and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis *in vivo* [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): 155-164.
- [9] Zhang X, Liu F, Liu H, et al. Urinary trypsin inhibitor attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by blocking the activation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Inflamm Res, 2011, 60(6): 569-575.
- [10] Dong YJ, Ding CH, Gu WW, et al. Inhibitory effects of melatonin on the expression of phosphorylation p38 mitogen-activated protein kinase during acute lung injury in rats[J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2010, 22(7): 418-421.
- [11] 黄翠萍, 张珍祥, 徐永健. p38 蛋白激酶对大鼠肺泡巨噬细胞活化机制的调控[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 661-663.
- [12] Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, et al. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase P38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst [J]. Infect Immun, 2002, 70(8): 4068-4074.
- [13] 臧传波, 吴荣谦, 李荣, 等. 内毒素对小鼠血管内皮细胞 P38-MAPK 蛋白磷酸化的影响[J]. 中华实用医学, 2004, 6(1): 1-3.

(收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2013-03-15)

(上接第 1361 页)

细胞群的变化,与 SLE、RA 疾病活动性、病情进展及转归密切相关,其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 梅杨, 葛锐, 潘发明, 等. 调节性 T 细胞与常见自身免疫性疾病[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 249-251.
- [2] 徐巍, 沈波, 陈葆国, 等. RA 患者外周血 CD8⁺CD28⁻和 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达及疾病活动性指标相关性分析[J]. 放射免疫学志, 2010, 23(1): 69-72.
- [3] 沈敏宁, 苏定雷, 季晓辉. 系统性红斑狼疮患者 CD8⁺T 细胞亚群 Fas-FasL 的表达及凋亡的关系研究[J]. 现代免疫学, 2009, 29(6): 501-504.
- [4] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 8(7): 508-513.
- [5] Muller-Ladner U, Pap T. Pathogenesis of RA: more than just immune cells[J]. J Rheumatol, 2005, 64(6): 396-401.
- [6] Najafian N, Chitnis T, Salama AD, et al. Regulatory functions of CD28⁺CD28⁻T cells in an autoimmune disease model [J]. Clin Invest, 2003, 112(7): 1037-1048.
- [7] Cassis L, Aiello S, Noris M. Natural versus adaptive regu-

- latory T cells [J]. Contrib Nephrol, 2005, 146: 121-131.
- [8] 杨中萌. CD8⁺调节性 T 细胞的生物学特性及功能[J]. 现代免疫学, 2009, 29(5): 438-440.
- [9] 杨炳华, 樊一算, 许志荣, 等. 活动期类风湿性关节炎患者外周血 CD4⁺T 细胞的表型分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(6): 447-448.
- [10] 陈洁晶, 眭维国, 张岳, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血调节性 T 细胞的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(5): 662-664.
- [11] 周红霞. 系统性红斑狼疮患者外周血 B 淋巴细胞中 TLR9 的表达及其临床意义[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1560-1562.
- [12] 沈敏宁, 孙可一, 季晓辉, 等. CD8⁺调节性 T 细胞亚群在系统性红斑狼疮患者外周血中分布的初步研究[J]. 南京医科大学学报, 2006, 26(9): 745-748.
- [13] 李毓阳, 戴永江, 邓斌, 等. 复方甘草酸苷对系统性红斑狼疮患者 CD4⁺CD25⁺T 细胞的表达及损伤指数的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(7): 1285-1286.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)