

· 基础研究 ·

# 前 B 细胞克隆增强因子在体外循环术后肺血管内皮通透性增加中的机制研究\*

曾 源, 杨 威, 张小强, 李 斌, 董 啸<sup>△</sup>

(南昌大学医学院第二附属医院心胸外科, 江西南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨前 B 细胞克隆增强因子(PBEF)在体外循环(CPB)术后肺血管内皮通透性增加中的机制,为提出更好的 CPB 期间肺保护措施提供依据。方法 建立动物模型并进行分组,A 组:大鼠行慢病毒 AD-PBEFshRNA 转染;B 组:大鼠进行 30 min 深低温停循环;C 组:大鼠行慢病毒 AD-PBEFshRNA 转染后,再进行 30 min 深低温停循环;对照组:大鼠只进行麻醉、CPB 插管,不行 CPB 转流;应用 Western blotting 和酶联免疫吸附法检测各组大鼠肺组织 PBEF 的表达情况。结果 C 组的 PBEF、磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达与 A、B 组、对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );C 组 VEGF、MMP2、MMP9、W/D 与 A、B 组、对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。病理结果显示,对照组大鼠肺组织正常,C 组肺组织病理损害严重,A、B 组较 C 组有不同程度的减轻。结论 PBEF 通过 MAPK/PI3K-Akt/VEGF 信号转导通路来增加 CPB 术后肺血管内皮通透性。

**关键词:**前 B 细胞克隆增强因子;体外循环;肺血管内皮;通透性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)28-3388-02

## Research of the mechanism of pre-B-cell colony-enhancing factor in pulmonary vascular endothelial permeability increasing after CPB\*

Zeng Yuan, Yang Wei, Zhang Xiaoqiang, Li Bin, Dong Xiao<sup>△</sup>

(Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of PBEF in pulmonary vascular endothelial permeability increasing after cardiopulmonary bypass, in order to provide the basis for a better lung protective measures during cardiopulmonary bypass. **Methods** Animal models were established, group A: the rats were transfected with the lentiviral AD-PBEFshRNA; group B: the rats were took 30 min deep hypothermic circulatory arrest; group C: the rats were took 30 min deep hypothermic circulatory arrest, then transfected with the lentiviral AD-PBEFshRNA; control group: the rats were anesthetized and established CPB tube, without CPB bypass. Lung tissue was detected with Western blotting and ELISA. **Results** PBEF, phosphorylation of P38MAPK, ERK, MLC, VE-cadherin, FAK in group C had significant difference with group A, B and the control group ( $P < 0.05$ ). VEGF, MMP2, MMP9, W/D in group C had significant difference with group A, B and the control group ( $P < 0.05$ ). The pathological results showed that rat lung tissue of the control group was normal, while in group C, it had severe pathological damage, the pathological damage degree in group A, B reduced compared to group C. **Conclusion** PBEF can through MAPK/PI3K-Akt/VEGF signaling pathway, increase pulmonary vascular endothelial permeability.

**Key words:** PBEF; cardiopulmonary bypass; pulmonary vascular endothelial; permeability

前 B 细胞克隆增强因子(PBEF)是一种具有调控炎症、脂质代谢、氧化应激和细胞凋亡等多种作用的分子,并参与内皮血管形成、心脏保护效应、炎症和免疫应答等<sup>[1-2]</sup>。PBEF 通过抑制中性粒细胞凋亡、介导炎症因子产生、调控肺血管上皮细胞和内皮细胞的通透性等途径在急性肺损伤中起到非常重要的作用<sup>[3-4]</sup>。本研究建立大鼠模型以分析 PBEF 在体外循环(CPB)术后肺血管内皮通透性增加中的机制,现报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 动物模型和分组** 动物模型由南昌大学心血管病研究所提供,成熟雄性昆明种小鼠,体质量 250~300 g。进行动物分组,每组 10 组,对照组:大鼠只进行麻醉、CPB 插管,不行 CPB 转流;A 组:大鼠行慢病毒 AD-PBEFshRNA 转染;B 组:大鼠进行 30 min 深低温停循环;C 组:大鼠行慢病毒 AD-PBEF-

shRNA 转染后,再进行 30 min 深低温停循环。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织标本采集** 大鼠处死后取右肺前叶用于肺组织湿干重比的测定,右肺中后叶固定于 4% 甲醛溶液中,乙醇脱水,石蜡包埋,切片成 4  $\mu\text{m}$  厚。组织脱蜡后,用苏木精和伊红染色供病理观察。取左肺等分置于两个冻存管中,放入 -80℃ 液氮中急冻保存,留待 Western blotting 和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测。

**1.2.2 Western blotting 和 ELISA 检测** Western blotting 检测:取出 -80℃ 保存左肺组织,提取细胞总蛋白,电泳转膜,进行一抗和二抗结合反应,避光室温振荡孵育 1 h,洗膜,荧光系统扫描,以  $\beta$ -actin 作为内参照,计算机记录每个条带的灰度积分值,以样品积分值/内参照积分值比值进行统计学分析。检

表 1 PBEF、P38MAPK、ERK、MLC、VE-cadherin 和 FAK 表达结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	PBEF	P38MAPK	ERK	MLC	VE-cadherin	FAK
对照组	1.11±0.08	1.13±0.05	1.08±0.03	1.12±0.06	1.09±0.03	1.12±0.05
A 组	2.32±0.68 <sup>ab</sup>	2.83±0.72 <sup>ab</sup>	3.05±0.66 <sup>ab</sup>	2.61±0.63 <sup>ab</sup>	2.32±0.71 <sup>ab</sup>	2.91±0.69 <sup>ab</sup>
B 组	2.13±0.83 <sup>ab</sup>	2.51±0.81 <sup>ab</sup>	2.86±0.73 <sup>ab</sup>	2.33±0.91 <sup>ab</sup>	2.11±0.69 <sup>ab</sup>	2.65±0.75 <sup>ab</sup>
C 组	4.15±0.92 <sup>a</sup>	4.35±0.95 <sup>a</sup>	4.51±0.88 <sup>a</sup>	3.92±0.83 <sup>a</sup>	4.03±0.86 <sup>a</sup>	4.62±0.84 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 C 组比较。

测包括 PBEF 表达, 磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达。ELISA 检测: 取大鼠外周血标本 5 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液储于一 80 ℃ 冰箱保存。取出血清并稀释, 再用浓缩洗涤液稀释, 加入底物显示液, 在酶标板上与单抗结合, 在相应的波长处测各孔吸光度(A)值, 求平均值。检测包括 MMP2/9 和 VEGF 表达水平。

**1.2.3 肺组织湿干重比(W/D)** 右肺前叶肺组织称湿重后, 置入 70 ℃ 烤箱内, 烘烤 24 h 至恒重, 称干重, 计算 W/D 比值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 PBEF、P38MAPK、ERK、MLC、VE-cadherin 和 FAK 表达结果** A、B 组的 PBEF、磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达与对照组和 C 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C 组的 PBEF、磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 VEGF、MMP2、MMP9 和 W/D 表达结果** A、B 组的 MMP2、MMP9 与对照组和 C 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组的 VEGF、W/D 与对照组和 C 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); B 组的 VEGF、W/D 与 C 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 VEGF、MMP2、MMP9 和 W/D 表达结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	VEGF(pg/mL)	MMP2(ng/mL)	MMP9(ng/mL)	W/D
对照组	71.03±3.51	5.12±0.13	2.88±0.08	3.21±0.42
A 组	92.51±5.83 <sup>ab</sup>	6.49±0.11 <sup>ab</sup>	3.87±0.11 <sup>ab</sup>	4.62±0.41 <sup>ab</sup>
B 组	88.79±5.61 <sup>b</sup>	6.28±0.23 <sup>ab</sup>	4.01±0.09 <sup>ab</sup>	4.13±0.36 <sup>b</sup>
C 组	110.37±10.52 <sup>a</sup>	7.36±0.28 <sup>a</sup>	4.96±0.16 <sup>a</sup>	5.95±0.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 C 组比较。

**2.3 病理结构改变** 病理结果显示, 光镜下对照组大鼠肺组织结构清晰, 无中性粒细胞浸润, 肺泡壁薄。C 组可见严重肺组织病理损害, 肺损伤程度重, 肺间质高度充血, 大量中性粒细胞浸润, 小支气管和小静脉上皮细胞脱落, 大部分肺泡间显著增宽, 肺泡腔部分萎缩, 部分融合成肺大泡, 腔内有红细胞, 形成微血栓, 而且会随着时间的延长逐渐加重。A、B 组较 C 组有不同程度的减轻, A 组的程度是最低的。

## 3 讨 论

CPB 技术是开展心脏外科心内直视手术的必备条件, 但是 CPB 带来的 CPB 术后肺功能障碍是人们不得不面对的一个难题<sup>[5-7]</sup>。肺缺血再灌注损伤的发生以及全身炎症反应是目前公认的主要的 CPB 术后肺损伤发生机制。研究 CPB 术后肺损伤的分子机制有利于开发新的治疗策略和新的防治药物, 减少

CPB 术后肺功能障碍的发生。

PBEF 是 B 细胞早期分化的一种生长因子, 具有促进前 B 细胞向 B 细胞转化的能力。研究表明炎症细胞因子会促进细胞内 PBEF 的表达, 应用 RNAi 技术抑制 PBEF 表达能够完全消除炎症细胞因子对中性粒细胞的抗凋亡作用<sup>[8-9]</sup>。报道指出在急性肺损伤动物模型的血清、肺组织及支气管肺泡灌洗液中 PBEF 的基因表达明显增加<sup>[10]</sup>。通过降低 PBEF 蛋白表达可以减少内皮细胞的跨膜电阻, 减少肌球蛋白轻链磷酸化和形成肌动蛋白, 减少钙离子的流动, 从而改善凝血酶刺激造成的内皮细胞屏障功能障碍, 减少急性肺功能损伤的发病率。PBEF 过表达会延长炎症反应时间, 增加肺泡上皮细胞核肺血管内皮细胞的通透性, 释放炎症因子引发肺损伤。李洁<sup>[11]</sup>研究发现重症急性胰腺炎发生相关肺损伤时, PBEF 过表达而启动白细胞介素(IL)-8、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 等炎症细胞因子大量表达, 在急性肺损伤中发挥重要作用。本研究制备模型大鼠并分组检测, 发现 C 组的 PBEF、磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达与 A、B 组和对对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 可见 PBEF 高表达影响了磷酸化 P38MAPK、磷酸化 ERK、磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达。P38MAPK、ERK 是增殖信号通路中的关键分子, PBEF 可能通过这些分子诱导 VEGF 和 MMP2/9 的表达。本研究中 C 组 VEGF、MMP2、MMP9 与 A、B 组和对对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。有研究<sup>[12-15]</sup>报道 VEGF 在肾综合征出血热发病中的作用发现患者血管通透性增高可能与休克期 VEGF 高表达有关。本研究病理结果显示, C 组肺组织病理损害严重, A、B 组较 C 组有不同程度的减轻。

综上所述, PBEF 通过 P38MAPK、ERK 等途径调控磷酸化 MLC、磷酸化 VE-cadherin、磷酸化 FAK 表达, 而且依赖 MAPK/PI3K-Akt/VEGF 信号转导通路来诱导 VEGF 和 MMP2/9 的表达, 增加 CPB 术后肺血管内皮通透性。

## 参 考 文 献:

- [1] 李斌, 董啸. PBEF 基因的分子生物学特征及其在急性肺损伤中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(3): 111-112.
- [2] 路强, 崔巍, 高伟, 等. PBEF 及 CD31 在增殖性糖尿病视网膜病变视网膜前膜中的表达[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(12): 1409-1411.
- [3] Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, et al. Endothelial progenitor dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits [J]. EPMA J, 2010, 1(1): 88-100.
- [4] 彭倩宜, 艾宇航, 张丽娜. 前 B 细胞集落增强因子在炎症相关性疾病中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(4): 335-342.

别为 0.962 1、0.958 8 和 0.958 9, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 5。

### 3 讨 论

传统获得人 CRP 的方法主要是从患者血清或腹水中直接分离纯化得到。由于人血清或腹水成分复杂, 故纯化时难度大、操作复杂, 而且材料来源困难, 产量低<sup>[4-5]</sup>。随着生命科学的不断发展, 通过基因重组技术生产医用蛋白是当今生物及医学研究的热点。目前, 国内外利用基因工程的方法获得重组人 CRP 的研究已有报道<sup>[6-9]</sup>, 但都存在一定的弊端, 本实验在前人研究的基础之上, 进一步探究更经济、更高效的制备 rhCRP 的途径。

本研究选用了近年来发展非常迅速的一个真核表达系统—甲醇酵母表达系统, 其表达外源蛋白具有众多优势<sup>[10]</sup>。酵母为简单的单细胞真核生物, 既具有原核细胞的生长快, 可进行细胞高密度培养的特点, 又具有类似真核细胞的翻译后加工修饰功能<sup>[11]</sup>; 既避免了大肠杆菌细胞<sup>[8]</sup>表达 rhCRP 时易形成包涵体、纯化复杂等问题, 又比哺乳动物细胞<sup>[7]</sup>和昆虫细胞<sup>[6]</sup>生产 rhCRP 的成本低; 而且该系统可分泌表达目的蛋白, 易于目的蛋白的分离纯化<sup>[10-11]</sup>。

本研究利用真核甲醇酵母表达系统, 成功构建了 rhCRP 的毕赤甲醇酵母表达菌株, 在强启动子 AOX1 的调控下, 成功分泌表达了 rhCRP; 经一步分离纯化即分离出纯度较高的 rhCRP, 并经间接 ELISA 检测证实其具有良好的免疫反应性和稳定性, 为下一步 rhCRP 的优化表达研究、抗人 CRP 抗体制备以及人 CRP 检测试剂的自主研发, 提供了重要的实验基础。

### 参考文献:

- [1] Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function[J]. *Mol Immunol*, 2001, 38(2/3):189-197.
- [2] Martinez VB, Gonzalez-Juanatey JR. Markers of inflammation and cardiovascular disease; clinical applications of C-reactive protein determination[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2009, 9(Suppl 1):S3-7.
- [3] Manace LC, Babyatsky MW. Putting genome analysis to

good use; lessons from C-reactive protein and cardiovascular disease[J]. *Cleve Clin J Med*, 2012, 79(3):182-191.

- [4] 刘平果, 李国强, 陈毅歆, 等. 一种定量检测人血清高敏 C 反应蛋白的化学发光免疫方法[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(8):1150-1156.
- [5] 黄国团, 王丽兰, 蔡豪斌, 等. 人 C-反应蛋白的分离纯化及初步应用[J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(15):11, 14.
- [6] Marnell L, Mold C, Volzer MA, et al. Expression and Radiolabeling of Human C-Reactive Protein in Baculovirus-Infected Cell Lines and Trichoplusia ni Larvae[J]. *Protein Expr Purif*, 1995, 6(4):439-446.
- [7] Agrawal A, Simpson M, Black S. A C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal C-polysaccharide[J]. *J Immunol*, 2002, 169(6):3217-3222.
- [8] Dortay H, Schmockel SM, Fettke J, et al. Expression of human c-reactive protein in different systems and its purification from *Leishmania tarentolae*[J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 78(1):55-60.
- [9] Kilpatrick EL, Liao WL, Camara JE, et al. Expression and characterization of 15N-labeled human C-reactive protein in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for use in isotope dilution mass spectrometry[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 85(1):94-99.
- [10] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11, 22.
- [11] Lei J, Guan B, Li B, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin(rhIL-2-HSA) fusion protein in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 84(1):154-160.

(收稿日期:2013-05-14 修回日期:2013-06-06)

(上接第 3389 页)

- [5] Park JW, Kim WH, Shin SH, et al. Visfatin exerts angiogenic effects on human umbilical vein endothelial cells through the mTOR signaling pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5):763-771.
- [6] 明广峰. PBEF 在重症急性胰腺炎并发急性肺损伤中的作用机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2012.
- [7] 毕静. 梓醇和前 B 细胞克隆增强因子的神经保护作用[D]. 大连:大连理工大学, 2011.
- [8] 李斌, 董啸, 徐建军, 等. 无血预充大鼠深低温停循环模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(1):129.
- [9] 郑伟浩, 赵英萍, 莫红缨, 等. 辛伐他汀对脂多糖诱导肺损伤大鼠的肺血管通透性的影响[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(21):6451-6453.
- [10] Eyileten T, Sonmez A, Saglam M, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system(RAAS) blockade on visfatin levels in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology(Carlton)*, 2010, 15(2):225-229.
- [11] 李洁. 前 B 细胞克隆增强因子(PBEF)在急性胰腺炎肺损

伤大鼠肺组织中的表达与功能及清胰汤干预的实验研究[D]. 大连:大连医科大学, 2010.

- [12] 李戩. VEGF 介导的血管内皮通透性增高的分子机制及其在肾综合征出血热发病中的作用[D]. 西安:第四军医大学, 2011.
- [13] Kincer JF, Uittenbogaard A, Dressman J, et al. Retraction; hypercholesterolemia promotes a CD36-dependent and endothelial nitric-oxide synthase-mediated vascular dysfunction[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9):6584.
- [14] Wang A, Li C, Liao J, et al. Ceramide mediates inhibition of the Akt/eNOS pathway by high levels of glucose in human vascular endothelial cells[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 26(1/2):31-38.
- [15] Hagberg C, Mehlem A, Falkevall A, et al. Endothelial fatty acid transport; role of vascular endothelial growth factor B[J]. *Physiology(Bethesda)*, 2013, 28(2):125-134.

(收稿日期:2013-05-17 修回日期:2013-06-29)