

## 动力相关蛋白和视神经萎缩症蛋白在高氧诱导早产鼠肺损伤中的作用\*

余莉<sup>1,2</sup>,董文斌<sup>1△</sup>

(1. 泸州医学院附属医院新生儿科,四川泸州 646000;2. 重庆市永川区人民医院儿科 402160)

**摘要:**目的 研究动力相关蛋白(DRP1)和视神经萎缩症蛋白(OPA1)在高氧诱导早产大鼠肺损伤时细胞凋亡中的作用。方法 随机将早产 Wistar 大鼠 48 只分为高氧组(吸入 95%的氧)和对照组(吸入 21%氧)。1、3、7 d 分批离断早产鼠处死后取肺组织做石蜡切片。观察早产鼠肺组织的病理学变化及线粒体形态变化相关的蛋白;评价各组早产大鼠肺组织细胞凋亡情况。结果 DRP1 和 OPA1 表达于肺组织细胞的胞质,与对照组相比,高氧组 DRP1/OPA1 的表达呈时间依赖性,1 d 时开始增加,7 d 时表达最高;高氧组 1 d 时 OPA1 表达有所减少,7 d 最少;高氧组 1 d 时 DRP1 表达开始增加,7 d 时表达显著升高。高氧组可见大量末端转移酶标记技术(TUNEL)阳性细胞,随着高氧暴露时间延长,凋亡指数呈逐渐增高趋势。7 d 时凋亡细胞数达高峰。在高氧组,DRP1/OPA1 比值表达与细胞凋亡指数相比,呈显著正相关( $r=0.725, P<0.01$ )。结论 高氧暴露可致早产鼠肺组织产生时间依赖急性肺损伤改变。

**关键词:**高氧;肺损伤;动力相关蛋白;视神经萎缩症蛋白;细胞凋亡;早产鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.029

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)01-0083-03

## Role of DRP1 and OPA1 in hyperoxia induced lung injury of premature rats

Yu Li<sup>1,2</sup>, Dong Wenbin<sup>1△</sup>

(1. Department of Neonatology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Chongqing Yongchuan, Chongqing 402160, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of DRP1 and OPA1 in the process of apoptotic in hyperoxia induced lung injury of premature rats. **Methods** 48 premature Wistar rats were divided into control group in which rats were exposed to  $tO_2$  10 ml. L 1 oxygen, and hyperoxia group in which Rats were exposed to 95%  $tO_2$  10 ml. L 1 oxygen. The lung tissues of 2 groups were gained on the first day, the second day and the seventh day with which that all mice were killed by cutting neck. Section of lungs were stained with hematoxylin eosin to observe the pathological changes, the protein expression in the lung cells which were linked with the change of plastosome, then the premature rat lung tissue apoptosis in each group were evaluated. **Results** Compared with the control group, the expression level of OPA1 in the hyperoxia group began to decrease on the first day and apparently decreased to the bottom line on the seventh day. On the other hand, DRP1 in hyperoxia group began to increase on the first day, while reached the summit on the seventh day. A few of TUNEL positive cells began to increase with time dependence. A lot of TUNEL positive cells could be found in hyperoxia group, and the apoptotic index reached the peak on the 7 d. There is a significantly positive correlation between the cell apoptosis and the ratio change of DRP1 and OPA1 in high oxygen group ( $r=0.725, P<0.01$ ). **Conclusion** The classical pathologic characters of lung injury were found out in hyperoxia group, and it changed obviously with time.

**Key words:** hyperoxia; lung injury; dynamin related protein 1; optic atrophy 1; cell apoptosis; rat premature

高氧肺损伤是抢救危重新生儿的主要并发症之一,存活早产儿甚至出现肺发育障碍<sup>[1]</sup>,如病死率很高的支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia BPD)是造成早产儿致残和死亡的重要原因之一(30%~40%)。高氧是BPD形成的主要因素,高氧肺损伤时调控细胞凋亡的调节因子可能改善早产儿高氧肺损伤。大量研究证实,动力相关蛋白(dynamin related protein 1, DRP1)和视神经萎缩症蛋白(optic atrophy 1, OPA1)在肺损伤中具有重要的意义,DRP1是介导线粒体分裂的因子,DRP1表达增强致线粒体持续分裂引起细胞凋亡<sup>[2]</sup>。OPA1是介导线粒体内膜融合及稳定线粒体的分子。本研究在前期建立早产大鼠高氧肺损伤模型的基础上,研究 DRP1/

OPA1 在早产大鼠高氧肺损伤发病中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 早产 Wistar 大鼠 48 只随机分为对照组(吸入氧体积分数为 21%)和高氧组(吸入氧体积分数为 95%)。

**1.2 模型制备** 参照本课题前期建立高氧肺损伤动物模型的方法<sup>[3]</sup>。高氧组置于 95% 氧箱中,对照组置于同一室内 21% 氧的空气中。两组相同喂养 1、3、7d 时分批断颈放血处死后取肺组织,固定包埋,切片作苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织的病理变化,免疫组织化学观察 DRP1/OPA1 在肺组织的表达与分布,末端转移酶标记技术(TUNEL)法检测细胞凋亡。

\* 基金项目:四川省教育厅科研基金资助项目(09107);四川省杰出青年学科带头人培养基金资助项目(04ZQ026-033);四川省科技厅应用基础项目(2008JY0015);中华儿科杂志第一届双鹤珂立苏科研基金。作者简介:余莉(1975-),硕士,副主任医师,主要从事早产儿肺损伤的研究。△ 通讯作者, Tel:13518389718; E-mail: dongwenbin2000@163.com。

**1.3 实验材料与仪器** 实验材料:DRP1 多克隆抗体(兔抗鼠)购自 abcam 公司;OPA1 多克隆抗体(兔抗鼠)购自 R&D 公司;原位凋亡检测试剂盒:瑞士罗氏公司;SP 法免疫组化试剂盒:中国北京中杉金桥生物技术有限公司。主要实验仪器:微量加样枪、超低温冰箱、倒置相差显微镜、电热恒温鼓风干燥箱、压力蒸气灭菌器、低温高速离心机、激光共聚焦显微镜、数字智能测氧仪。

#### 1.4 指标检测

**1.4.1 肺组织病理形态学观察** 肺组织切片 HE 染色观察比较肺组织病理变化。

**1.4.2 免疫组化 SP 法检测 DrP1/OPA1 在肺组织的表达** SP 法严格按照试剂盒说明书操作,阳性反应为胞质染成棕黄色或黄褐色。结果判定:Image-pro 6.0 图像分析软件分析图像,每张切片在 400 倍视野下随机选取 6 个非重叠视野,测定其平均光密度值(Average optical density, AOD),算出平均值进行统计分析。

**1.4.3 TUNEL 法检测细胞凋亡** 严格按照试剂盒说明书操作,阳性反应为细胞核染成黄色或棕黄色。结果判定:每张切片在 400 倍视野下随机选 6 个非重叠视野,计数的方式得出每个视野凋亡细胞数及总细胞数,算出凋亡指数,最后求平均值。凋亡指数(Apoptotic index, AI) = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS16 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法检验,指标间的关系

采用直线相关分析进行处理。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

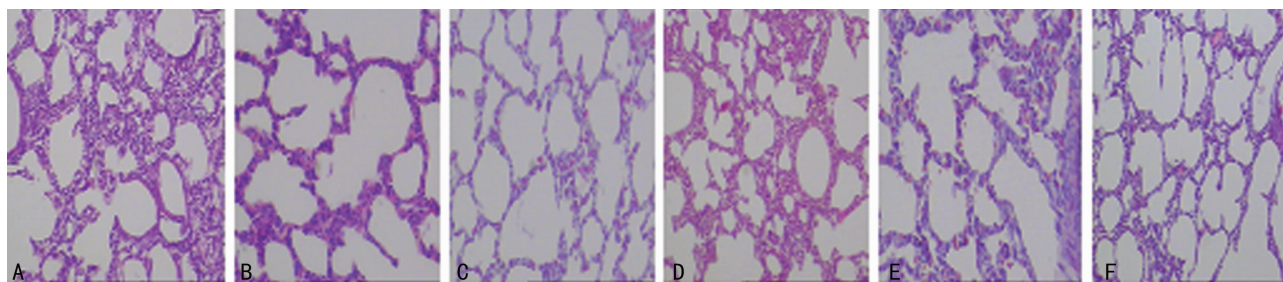
## 2 结果

**2.1 在光镜下观察,对照组大鼠肺组织细胞紧密排列,呈铺鹅卵石样改变,透明度好,分裂相明显,囊泡壁厚,胞质中颗粒稀少有粗大的嵴突。高氧组大鼠肺组织细胞数量随时间(1、3、7 d)较对照组显著减少,细胞形态改变不规则,肺泡结构破坏明显,胞质中出现较多空泡、炎性细胞、颗粒物聚集,细胞间隙变大,细胞碎片大量填充其间,上皮细胞肿胀间隔增粗肺泡腔变小,见图 1。**

**2.2 DRP1 和 OPA1 在肺组织的表达与分布** 免疫组化 SP 检测,各实验组肺组织细胞胞质均有表达。与对照组相比,高氧暴露时间越长,高氧组 DRP1 的表达(OD 值)明显增加,OPA1 的表达(OD 值)明显降低,DRP1/OPA1 比值明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1~3。

**2.3 TUNEL 检测凋亡结果** 对照组在各时间点仍然可见少量被染成黄色或棕黄色的 TUNEL 阳性细胞,高氧组则随着高氧暴露时间延长,AI 呈逐渐增高趋势,可见大量 TUNEL 阳性细胞出现在支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞中,与对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 4。

**2.4 细胞凋亡与 DRP1/OPA1 蛋白表达比值的相关分析** 早产鼠肺组织细胞凋亡分别与 DRP1/OPA1 蛋白表达的直线相关,细胞 AI 和 DRP1/OPA1 比较, $r = 0.725$ , $P < 0.01$ ,提示呈显著正相关。



A: 对照 1 d; B: 对照 3 d; C: 对照 7 d; D: 高氧 1 d; E: 高氧 3 d; F: 高氧 7 d。

图 1 肺组织病理学形态改变( $\times 100$ )

表 1 早产鼠肺组织 DRP1 的表达( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	1 d	3 d	7 d	F	P
对照组	789.86 ± 58.95	772.31 ± 42.82	770.39 ± 67.84	0.139	0.872
高氧组	1 634.57 ± 108.85 <sup>a</sup>	8 008.14 ± 530.26 <sup>ab</sup>	13 132.32 ± 594.57 <sup>abc</sup>	615.826	0.000
t	4.324	12.152	26.444		
P	0.005	0.000	0.000		

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时时间点对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 d 比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 3 d 比较。

表 2 早产鼠肺组织 OPA1 的表达( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	1 d	3 d	7 d	F	P
对照组	3 935.42 ± 263.99	3 764.15 ± 281.53	3 907.80 ± 231.34	0.501	0.622
高氧组	3 126.91 ± 264.91 <sup>a</sup>	1 399.81 ± 268.62 <sup>ab</sup>	579.76 ± 99.20 <sup>abc</sup>	133.31	0.000
t	13.648	27.203	41.315		
P	0.000	0.000	0.000		

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与同时时间点对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 1 d 比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与同组 3 d 比较。

表 3 线粒体分裂蛋白 DRP1 和融合蛋白 OPA1 比值变化 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	1 d	3 d	7 d	F	P
对照组	0.200±0.01	0.205±0.01	0.197±0.01	3.303	0.084
高氧组	0.52±0.01 <sup>a</sup>	5.72±0.05 <sup>ab</sup>	22.68±0.07 <sup>abc</sup>	169.400	0.000
t	63.737	212.235	541.772		
P	0.000	0.000	0.000		

<sup>a</sup>: P<0.05, 与同时时间点对对照组比较; <sup>b</sup>: P<0.05, 与同组 1 d 比较; <sup>c</sup>: P<0.05, 与同组 3 d 比较。

表 4 各组早产鼠肺组织细胞凋亡指数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	1 d	3 d	7 d	F	P
对照组	14.54±1.88	14.68±2.01	14.45±1.75	0.036	0.943
高氧组	26.39±1.25 <sup>a</sup>	43.87±1.62 <sup>ab</sup>	56.34±1.56 <sup>abc</sup>	517.700	0.000
t	261.25	724.87	1958.56		
P	<0.01	<0.01	<0.01		

<sup>a</sup>: P<0.05, 与同时时间点对对照组比较; <sup>b</sup>: P<0.05, 与同组 1 d 比较; <sup>c</sup>: P<0.05, 与同组 3 d 比较。

### 3 讨 论

长时间吸入高氧可引起多器官功能衰竭,肺是高氧后最常受累的器官之一。细胞凋亡是高体积分数氧导致肺损伤的一个十分明显的组织学特点,细胞凋亡在高氧肺损伤发病机制中扮演重要角色,细胞凋亡与肺损伤的程度呈正相关。线粒体分裂是细胞凋亡的早期事件,研究表明 DRP1 和 OPA1 蛋白分别是调节线粒体分裂融合的关键蛋白,通过持续对立的融合分离来维持动态平衡<sup>[3-4]</sup>。

**3.1 线粒体形态和细胞凋亡** 细胞凋亡的主要途径是线粒体途径。细胞凋亡的早期,线粒体融合和分裂失衡网状线粒体崩溃成为点泡状,线粒体片段化改变,线粒体膜间隙释放促凋亡蛋白造成线粒体数量增加,线粒体碎裂明显。研究证实,在细胞凋亡的早期,线粒体分离,形态变化;抑制线粒体的分离,促进线粒体融合可能抑制细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>,说明线粒体分离和融合平衡导致线粒体形态变化,和细胞凋亡有关。线粒体形态改变:线粒体膜改变,线粒体通透性转变孔(mitochondrial permeability transition pore mtPTP)开放,死亡促进因子(death-promoting factor DPF)和膜间隙蛋白(intermembrane space IMS)经 mtPTP 释放,IMS 活化 Caspase,促进凋亡;线粒体释放多种凋亡诱导因子到细胞质中,线粒体释放细胞色素 C,激活凋亡的半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 Caspase(cysteine aspartate specific protease)酶通路,黄素蛋白 AIF 核片段化又改变线粒体膜通透性,促凋亡因子同样激活 Caspase,凋亡诱导因子能促进细胞色素 C 释放;机体处于高氧状态时活性氧在线粒体中大量产生,活性氧族作为信号转导因子诱发凋亡信号传导途径,活化核转录因子和细胞凋亡相关基因导致细胞凋亡。本实验随着高氧暴露时间的延长,高氧组细胞形态改变不规则,肺泡结构破坏明显;高氧组可见大量黄色或棕黄色的 TUNEL 阳性细胞出现。暴露高氧时间越长,TUNEL 阳性细胞越多,细胞凋亡指数增高,差异有明显统计学意义,提示吸入高浓度氧可以诱导早产鼠肺组织发生细胞凋亡。

#### 3.2 DRP1/OPA1 与线粒体形态变化

**3.2.1 DRP1 与线粒体分离** DRP1 在线粒体外膜潜在分裂点聚集使线粒体分散,产生片段化的线粒体,线粒体数量增加,诱导膜间隙释放促凋亡蛋白。超表达 DRP1 分子加速线粒体分裂<sup>[7]</sup>,促进细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>,抑制 DRP1 表达可以降低凋亡,降低

线粒体分裂<sup>[10-12]</sup>。本研究显示高氧组 DRP1 表达较对照组显著增加,证实高氧诱导细胞凋亡中,DRP1 表达上调促进线粒体分离导致细胞凋亡。

**3.2.2 OPA1 与线粒体融合** OPA1 以寡聚体稳定线粒体的嵴结构,减轻细胞凋亡起到重要作用<sup>[13]</sup>。抑制 OPA1 表达融合能力的降低,线粒体片段化改变,线粒体嵴减少,细胞出现凋亡<sup>[14-15]</sup>。相反,高表达 OPA1,诱导线粒体形态发生网络化<sup>[16]</sup>,缩小线粒体嵴膜连接,抑制膜间蛋白的释放,抑制细胞色素 C 的释放,抑制细胞凋亡。本研究组 OPA1 表达较对照组显著减少,从而证实高氧导致肺损伤细胞凋亡过程中,抑制线粒体融合蛋白 OPA1 表达导致线粒体融合减少促进细胞凋亡。

**3.3 DRP1/OPA1 比值变化致线粒体形态改变与细胞凋亡** 线粒体分裂增强,线粒体融合抑制或者两者共同作用线粒体片段化改变,线粒体碎裂增强,形态改变导致线粒体功能异常促进细胞凋亡。发现线粒体碎裂增强,TUNEL 阳性细胞数表达增多,提示线粒体形态变化与细胞凋亡关系密切。凋亡诱导物在增强线粒体分裂蛋白 DRP1 表达同时抑制线粒体融合蛋白 OPA1 表达,导致线粒体融合和分裂失衡,促进细胞凋亡。

总之,本研究证实了高氧导致早产大鼠肺组织肺损伤,发现高氧后涉及上调 DRP1 的表达水平,促进线粒体分离;下调 OPA1 的表达水平,抑制线粒体融合导致细胞凋亡。提示 DRP1/OPA1 在肺损伤时发挥重要作用,可以抑制 DRP1,激活 OPA1 来改善高氧致肺损伤,降低细胞凋亡,其机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Gordo-Vidal F, Calvo-Herranz E, Abella-Alvarez A, et al. Hyperoxia-induced pulmonary toxicity[J]. Neonatology, 2012, 102(1): 1-8.

[2] Sue FN, Kristi LN, Richard JY. Mitochondrial dynamics and apoptosis[J]. Genes Dev, 2008, 22 (6): 1577-1590.

[3] 党嘉文, 孙鸿燕, 董文斌, 等. 小窝蛋白-1 在早产鼠高氧肺损伤中的表达及其意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26 (12): 959-961.

[4] Arnold YS, Joseph AM, Debapriya D, et (下转第 89 页)

## 参考文献:

- [1] Tassinari D, Santelmo C, Tombesi P, et al. Thalidomide in the treatment of cancer cachexia[J]. *J Palliat Care*, 2008, 24(3):187-189.
- [2] Donk NW, Wittebol S, Minnema MC, et al. Lenalidomide (Revlimid) combined with continuous oral cyclophosphamide (endoxan) and prednisone (REP) is effective in lenalidomide/dexamethasone-refractory myeloma[J]. *Br J Haematol*, 2010, 148(3):35-37.
- [3] 吴春明, 曹家麟, 朱小区, 等. 二草清肝汤治疗免疫性肝损伤大鼠的作用机制[J]. *山东医药*, 2008, 48(27):38-40.
- [4] Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury[J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(6):537-544.
- [5] Yajima T, Nishimura H, Saito K, et al. Overexpression of Interleukin-15 increases susceptibility to lipopolysaccharide-induced liver injury in mice primed with mycobacterium bovis bacillus Calmette-guerin [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(7):3855-3862.
- [6] 杜艳秋, 赵敏. 葛根素对大鼠急性乙醇中毒性肝损伤的保护作用[J]. *中国工业医学杂志*, 2011, 24(1):9-11.
- [7] Wu JJ, Huang DB, Pang KR, et al. Thalidomide dermatological indications mechanism of action and side effects

[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153(2):254-273.

- [8] Kivivuori SM, Anttila P. Thalidomide in oncological and hematological diseases [J]. *Duodecim*, 2010, 126(12):1413-1419.
- [9] 秦华珍, 李彬, 时博, 等. 广西桂郁金对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. *李时珍国医国药*, 2009, 20(11):2671-2672.
- [10] 胡德坤, 沈业寿. 天麻多糖 GEP-2 对 BCG + LPS 致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(10):912-914.
- [11] Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide /ranitidine-induced inflammatory liver injury[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 100(1):2-7.
- [12] Noman AS, Koide N, Hassan F, et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production via down-regulation of MyD88 expression[J]. *Innate Immunity*, 2009, 1(5):33-41.
- [13] Galustian C, Meyer B, Labarthe MC, et al. The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy CII*, 2009, 58(10):33-45.

(收稿日期:2013-08-08 修回日期:2013-10-22)

(上接第 85 页)

- al. New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(9):2533-2542.
- [5] Claudia Figueroa-Romero, Jorge A, Ifiiguez-Lluhi, et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp 1 occurs at multiple nonconsensus sites, within the B domain and is linked to its activity cycle [J]. *FASEB J*, 2009, 23(11):3917-3927.
- [6] Verstreken P, Ly CV, Venken, et al. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*, 2005, 4(7):365-378.
- [7] Aurblien Olichon, Laurent Baricault, Nicole Gas, et al. Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome C Release and Apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(2):7743-7746.
- [8] Sung GC, Du QS, Shuang H, et al. Drp-1 dephosphorylation in ATP depletion-induced mitochondrial injury and tubular cell apoptosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(6):199-206.
- [9] Craig B, Sung GC, Wang CY, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp-1 during apoptosis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(3):447-455.

- [10] Hidenori O, Katsuyoshi M. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics [J]. *J Biochem*, 2011, 149(3):241-251.
- [11] Wang HM, Precious JL, Mariusz K, et al. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(4):737-752.
- [12] Claudia FR, Jorge AL, Julia S, et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple non-consensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle[J]. *FASEB J*, 2009, 23(11):3917-392.
- [13] Frezza C, Cipolat S, Brito OMd, et al. OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion[J]. *Cell* 2006, 15(8):177-189.
- [14] Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(56):15927-15932.
- [15] Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, et al. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(79):18792-18798.
- [16] Waterham HR, Koster J, van Roerm and CW, et al. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission[J]. *N Engl J med*, 2007, 356(13):1736-1741.

(收稿日期:2013-08-18 修回日期:2013-09-23)