

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.23.006

前列腺素 E1 减轻大鼠肺撞击伤后肺泡细胞凋亡*

刘富春,黄一,李学成,罗艳梅,高军,张浩
(中国人民解放军第三二四医院药剂科,重庆 404100)

[摘要] 目的 探讨前列腺素 E1(PGE1)对肺撞击伤后肺泡细胞凋亡的影响。方法 雄性 SD 大鼠分为正常对照组、伤后对照组和伤后 PGE1 处理组。致伤后 24 h 检测动脉氧分压、肺系数, TUNEL 染色检测肺泡细胞凋亡的整体情况。以蛋白免疫印迹试验(Western blot)检测自噬相关蛋白及自噬调节蛋白 NIX 的表达情况。结果 伤后 24 h 肺组织可见明显结构破坏及肺水肿。与正常对照组相比,伤后对照组动脉氧分压降低($P<0.05$),肺泡细胞凋亡指数增加($P<0.05$),同时肺组织自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 及自噬调节蛋白 NIX 表达增加($P<0.05$)。伤后 PGE1 处理组动脉氧分压低于正常对照组($P<0.05$),但较伤后对照组显著改善($P<0.05$);肺泡细胞凋亡指数高于正常对照组,但显著低于伤后对照组($P<0.05$);肺组织自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 及自噬调节蛋白 NIX 的表达虽然较正常对照组增加($P<0.05$),但显著低于伤后对照组($P<0.05$)。结论 PGE1 减轻大鼠肺撞击伤后肺泡细胞凋亡,此作用可能是通过抑制 NIX 介导的细胞自噬,以及肺泡细胞自噬性凋亡实现。

[关键词] 前列腺素;细胞凋亡;自噬;肺泡细胞;NIX;

[中图分类号] R642

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)23-3187-03

PGE1 alleviated alveolar cells apoptosis in rat lung impact injury model[†]

Liu Fuchun, Huang Yi, Li Xuecheng, Luo Yanmei, Gao Jun, Zhang Hao

(Department of Pharmacy, NO. 324 Central Hospital of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 404100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of prostaglandin E1 (PGE1) on alveolar cells apoptosis in rat lung impact injury model. **Methods** SD rats were divided into 3 groups (normal control group, lung injury control group and PGE1 treated group). PaO₂ and pulmonary coefficient were detected after 24 h of impact. TUNEL labeling was used to evaluate apoptosis and Western blot was used to estimate protein expression levels of beclin-1, LC3 II/LC3 I and NIX. **Results** After 24 h of impacting, there were obvious structural damage and pneumonedema in rat lung. Compared to normal control group, the PaO₂ of lung injury control group decreased and the apoptosis of alveolar cells increased significantly ($P<0.05$). Furthermore, the expression levels of Beclin-1, LC3 II/LC3 I and NIX in the impacting control group were increased ($P<0.05$). In the PGE1 treated group, the PaO₂ were decreased compared to normal control group ($P<0.05$), but these expression levels were higher significantly than lung injury control group ($P<0.05$). The expression levels of apoptosis, Beclin-1, LC3 II/LC3 I and NIX in the PGE1 treated group were increased compared to normal control group ($P<0.05$), but these expression levels were lower significantly than lung injury control group ($P<0.05$). **Conclusion** PGE1 could alleviate alveolar cells apoptosis after lung impacting injury, and which effect may ascribe to PGE1 inhibiting NIX-mediated autophagy and autophagic apoptosis of alveolar cells.

Key words: prostaglandins; apoptosis; autophagy; alveolar cells; NIX

肺撞击伤主要是因为钝性暴力直接作用于胸部造成的闭合性损伤,常由于肺部和(或)其他脏器炎性反应严重失调而导致肺泡上皮细胞和血管内皮细胞屏障损伤^[1-2]。肺泡细胞特别是肺泡 II 型上皮细胞被认为是修复肺泡细胞损伤的种子细胞^[3],但肺撞击伤时常伴随肺泡上皮细胞凋亡,因此有效抑制肺泡细胞凋亡有助于减轻肺撞击伤进展。另外,既往的研究证实,细胞自噬过度上调导致的自噬性凋亡增加是急性肺损伤引起的肺泡细胞凋亡的机制之一。既往研究证实前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1) 能够减轻急性肺损伤的进展^[4],但具体作用机制仍未明晰。同时,鉴于前列腺素具有抑制细胞凋亡的作用^[5-6],本研究假设 PGE1 可能通过调节肺泡细胞自噬性凋亡而减轻肺撞击后肺泡细胞凋亡,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(245±10)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。将实验动物分为正常对照组、伤后对照组和伤后 PGE1 处理组各 20 只。利用第三军医大学野战外科研究所研制的 BIM-III 水平式小型生物撞击机进行致伤。致伤前腹腔注射 2% 戊巴比妥(0.3 mL/100 g)麻醉,麻醉成功后将大鼠固定于特制动物夹板,前胸部正对撞击口,撞击用圆柱状金属弹头质量 22 g,直径 1.1 cm,距离鼠板水平距离 18.0 cm,以 220 kPa 驱动压驱动弹头撞击致伤。正常对照组麻醉后不予以撞击,参考既往文献,伤后 1 h 内 PGE1 处理组由尾静脉注射 Lipo-PGE1(10 μg/kg,北京泰德制药),伤后对照组由尾静脉注射等量生理盐水。致伤后 24 h 将动物麻醉后断颈处死,取左下肺组织,部分

* 基金项目:重庆市卫生局医学科科研项目(2013-2-302)。 作者简介:刘富春(1976—),主管药师,硕士,主要从事临床药学研究。

肺组织冰冻切片后以 4% 多聚甲醛固定,其余组织 -80°C 保存。

1.2 方法

1.2.1 血气分析 各组大鼠(每组 6 只)处死前股动脉取血,肝素抗凝后以罗氏 Compact 血气分析仪测定动脉血氧分压(PaO_2)。

1.2.2 肺系数 各组大鼠处死后直接取全肺称质量,计算肺系数。计算公式:肺系数=全肺质量/体质量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 TUNEL 检测细胞凋亡 采用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天,中国)检测肺组织细胞的凋亡。所有操作按说明书进行。每张切片在高倍视野下($\times 200$)取 5 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞及总细胞数。计算凋亡指数=TUNEL 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。每组切片分别来源于 3 只不同大鼠。

1.2.4 蛋白免疫印迹试验(Western blot)检测凋亡、自噬相关蛋白表达 取肺组织 20 mg 匀浆,RIPA 裂解液[按 1:100 添加苯甲基磺酰氟(PMSF)]裂解提取总蛋白,离心后取上清液,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,中国),按使用说明测定蛋白浓度。添加十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液后 95°C 变

性 5 min。每个样本取 20 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%牛血清清蛋白(BSA)室温封闭 1 h,孵育特异性抗体 Beclin-1(1:200,Santa)、LC3 II(1:200,Santa)、NIX(1:500,Santa)、 β -actin(1:1000,碧云天)于 4°C 过夜,再与辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白 G(IgG)抗体 37°C 孵育 1 h,以 ECL 试剂盒行放射自显影,Quantity One 软件分析条带吸光度值。

1.3 统计学处理 利用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和单因素分析;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,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 胸部撞击后肺组织损伤 在正常对照组,大鼠肺组织未见明显病变;伤后对照组和伤后 PGE1 处理组肺组织可见局限性水肿、肺挫裂伤、肺门血管破裂等。光镜下可见肺组织结构破坏,肺内广泛出血及水肿,肺泡内大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润,细支气管内部分纤维蛋白渗出。伤后 PGE1 处理组其肺组织损伤程度光镜下与伤后对照组未见明显差别,见图 1。

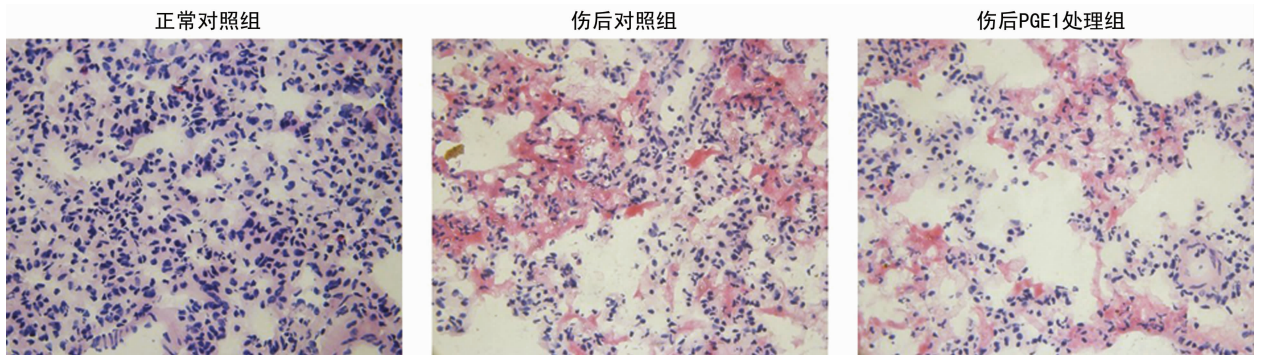


图 1 肺组织 HE 染色($\times 400$)

2.2 PGE1 处理改善 PaO_2 ,减轻肺水肿 与正常对照组相比,伤后对照组大鼠 PaO_2 显著降低($P<0.05$)。伤后 PGE1 处理组 PaO_2 虽然低于正常对照组($P<0.05$),但较伤后对照组显著改善($P<0.05$)。肺系数用于评价肺水肿程度,结果显示,与正常对照组比较,伤后对照组肺系数显著增加($P<0.05$),与 PaO_2 变化趋势相似,伤后 PGE1 处理组的肺系数虽较正常对照组高($P<0.05$),但是显著低于伤后对照组($P<0.05$),见表 1。

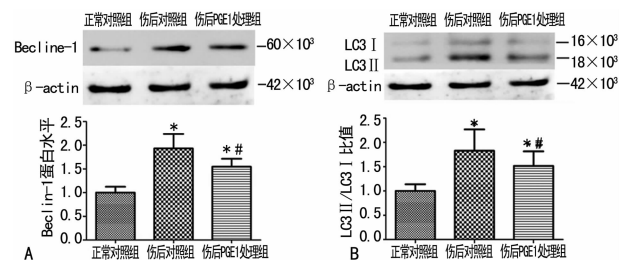
表 1 不同组别大鼠 PaO_2 和肺系数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PaO_2 (mm Hg)	肺系数(%)
正常对照组	6	96.00 ± 2.36	0.72 ± 0.18
伤后对照组	6	74.00 ± 3.56^a	1.24 ± 0.24^a
伤后 PGE1 处理组	6	83.00 ± 4.64^{ab}	0.92 ± 0.36^{ab}

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与伤后对照组比较。

2.3 PGE1 减轻肺泡细胞凋亡 正常肺组织未见明显凋亡。致伤 24 h 后,与正常对照组相比,伤后对照组肺泡细胞凋亡指数较高[(0.90 ± 0.14)% vs. (12.34 ± 2.42)%, $P<0.05$]。伤后 PGE1 处理组肺组织凋亡虽然高于正常对照组[($0.90\pm$

0.14)% vs. (7.58 ± 1.88)%, $P<0.05$],但显著低于伤后对照组($P<0.05$)。



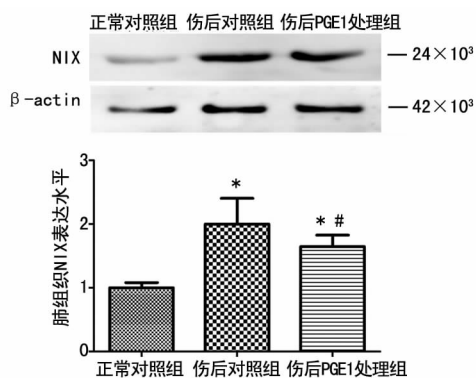
A: Western blot 检测不同组间肺组织内 Beclin-1 蛋白表达情况; B: Western blot 检测不同组间肺组织内 LC3 II/LC3 I 比值。*: $P<0.05$,与正常对照组比较,#: $P<0.05$,与伤后对照组比较。

图 2 PGE1 抑制肺组织自噬水平

2.4 PGE1 抑制肺组织自噬水平 以 Western blot 检测不同组之间肺组织自噬相关蛋白表达,结果显示,伤后对照组肺组织自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达和 LC3 II/LC3 I 的比值较正常对照组显著升高(分别增加 93.1%、82.8%, $P<0.05$),而伤后 PGE1 处理组肺组织 Beclin-1 的表达和 LC3 II/LC3 I 的比值虽然较正常对照组增加(分别增加 54.7%、51.5%, $P<$

0.05),但是显著低于伤后对照组($P<0.05$),见图 2。

2.5 PGE1 抑制肺组织 NIX 表达 与自噬变化相一致,伤后对照组肺组织 NIX 表达显著高于正常对照组($P<0.05$),而伤后 PGE1 处理组肺组织 NIX 蛋白表达水平虽然较正常对照组增加($P<0.05$),但是显著低于伤后对照组($P<0.05$),见图 3。



*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与伤后对照组比较。

图 3 PGE1 抑制肺组织 NIX 表达。

3 讨论

肺撞伤属于急性肺损伤范畴,肺泡细胞细胞凋亡是导致其难治愈的机制之一。既往报道 PGE1 对缓解急性肺损伤有显著作用,但其内在机制仍不清楚。本研究观察 PGE1 在肺撞伤后对肺泡细胞自噬性凋亡的影响。结果显示, PGE1 处理能够减轻肺撞伤后 PaO_2 、减轻肺水肿,同时也能抑制肺泡细胞凋亡; PGE1 可以抑制伤后肺组织自噬过度增加并抑制自噬调节蛋白 NIX 的表达。结果提示, PGE1 对肺撞伤具有一定的保护作用,此作用可能是通过下调 NIX 蛋白的表达及其介导的细胞自噬,从而减少肺泡细胞自噬性凋亡实现。

传统观念认为急性肺损伤是全身炎症反应综合征在肺部的表现,然而无论是传统的抗炎药物还是针对促炎因子的药物对急性肺损伤的抗炎治疗均未取得良好效果。随后众多学者把注意力转向细胞凋亡学说并证实肺泡上皮细胞凋亡是急性肺损伤的主要病理机制之一^[7]。尽管已经认识到肺泡上皮细胞凋亡在急性肺损伤中的重要作用,但目前对如何改善或抑制凋亡仍无有效的治疗措施。

PGE1 是目前临床上广泛使用的一种血管扩张剂,而既往研究发现 PGE1 静脉或者吸入给药能够改善脂多糖、油酸等引起的急性肺损伤^[8-9]。本研究也发现,肺撞伤后,静脉给予 PGE1 虽然未显著改善伤后肺组织病理改变特征,但是在肺功能方面能够改善 PaO_2 、减轻肺水肿,说明 PGE1 在治疗肺撞伤中具有一定的作用。既往关于 PGE1 改善急性肺损伤的机制研究发现 PGE1 除了能减轻肺血管阻力外,还可以抑制中性粒细胞聚焦及 NF- κ B 介导的炎症反应等^[10]。另外,近期研究发现, PGE1 还具有抗细胞凋亡的作用^[6],因此,推测 PGE1 可能参与调节肺撞伤后肺泡细胞凋亡。结果证实,经静脉给予 PGE1 后,肺泡组织的凋亡虽比正常对照组增加,但显著低于伤后对照组,说明 PGE1 具有拮抗肺撞伤后肺泡细胞凋亡的作

用。接下来本研究探讨了 PGE1 抑制肺泡上皮细胞凋亡的相关机制。既往有关急性肺损伤后肺泡上皮细胞凋亡的机制报道可分为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)介导凋亡,以及非 Caspase 介导的凋亡,而后者可能与 NIX 介导的细胞自噬性凋亡有关。NIX 蛋白是一种线粒体外膜蛋白,也称 BNP3L(Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3-like),是 Bcl-2 基因家族成员。它可以引起线粒膜通透性转换孔开放,膜电位降低,活性氧增加,诱发自噬过度增加从而促进细胞自噬性凋亡增加^[11-13]。本研究发现,肺撞伤后,肺泡细胞的凋亡增加,另外肺泡组织的自噬水平及 NIX 蛋白表达显著上调。结合既往研究结果,提示 NIX 蛋白介导的自噬性凋亡增加可能是肺撞伤后肺泡组织凋亡的机制之一。而 PGE1 能够显著抑制肺泡细胞 NIX 蛋白表达及自噬水平,并降低肺泡细胞凋亡。这些结果提示 PGE1 可能是通过抑制 NIX 蛋白的表达从而抑制肺组织的自噬及自噬性凋亡。需要注意的是, PGE1 对肺泡细胞的凋亡的影响还可能通过影响 Caspase 介导的凋亡途径,这需要在以后的研究中进一步探讨。

综上所述,本研究观察到静脉给予 PGE1 能够改善肺撞伤后 PaO_2 、减轻肺水肿,其作用机制可能与 PGE1 拮抗肺泡细胞凋亡相关,而 PGE1 抑制肺泡细胞凋亡的机制可能是通过抑制 NIX 蛋白从而抑制过度的细胞自噬及自噬性凋亡相关。这些结果为临床应用 PGE1 治疗肺撞伤提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Tanaka S, Hayashi S, Fukushima S, et al. Investigation of a relationship between external force to shoulder and chest injury of WorldSID and THUMS in 32 km/h oblique pole side impact[J]. Traffic Inj Prev, 2013, 14(Suppl):S64-76.
- [2] Dannevig I, Solevåg AL, Saugstad OD, et al. Lung injury in asphyxiated newborn pigs resuscitated from cardiac arrest—the impact of supplementary Oxygen, longer ventilation intervals and chest compressions at different Compression-to-Ventilation ratios[J]. Open Respir Med J, 2012, 6:89-96.
- [3] Chen Y, Legan SK, Mahan A, et al. Endothelial-monocyte activating polypeptide II disrupts alveolar epithelial type II to type I cell transdifferentiation[J]. Respir Res, 2012, 13:1-4.
- [4] Sio SW, Ang SF, Lu J, et al. Substance P upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite by activating ERK1/2 and NF-kappaB in a mouse model of burn-induced remote acute lung injury[J]. J Immunol, 2010, 185(10):6265-6276.
- [5] Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E2's new trick: "decider" of differential alveolar cell Life and death[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(1):2-3.
- [6] Muntane J, Montero JL, Lozano JM, et al. TNF-alpha but not IL-1alpha is correlated with PGE1-dependent protection against acute D-galactosamine-induced(下转第 3194 页)

- growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development[J]. Hum Reprod, 2012, 27(7): 2146-2159.
- [9] Qiao J, Feng HL. Extra-and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence[J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(1): 17-33.
- [10] Dominguez MA, Cho N, Zhang BJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor expression in granulosa lutein cells[J]. Reprod Biomed Online, 2011, 22(1): 17-24.
- [11] Linher-Melville K, Li JL. The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation[J]. Reproduction, 2013, 145(2): R43-54.
- [12] Buyuk E, Seifer DB. Follicular-fluid neurotrophin levels in women undergoing assisted reproductive technology for different etiologies of infertility[J]. Fertil Steril, 2008, 90(5): 1611-1615.
- [13] Johnstone EB, Shelly WB, Mellon S, et al. Brain-derived neurotrophic factor is elevated in follicular fluid of women with PCOS[J]. Fertil Steril, 2008, 90 Suppl 1: S256.
- [14] Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman ZA, et al. Loss of Ntrk2/kiss1r signaling in oocytes causes premature ovarian failure [J]. Endocrinology, 2014, 155(8): 3098-3111.
- [15] Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Ojeda SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development[J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(1): 24-31.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-16)

(上接第 3189 页)

- liver injury[J]. Can J Gastroenterol, 2000, 14(3): 175-180.
- [7] Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, et al. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury[J]. Respirology, 2006, 11: S28-31.
- [8] Xiao J, Zhong R, Shi SY, et al. An investigation of the protective effect of prostaglandin E1 liposome on acute lung injury in pig[J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2008, 20(6): 345-348.
- [9] 王德明, 龙宏杰, 徐经大, 等. 前列腺素 E1 治疗犬油酸型急性肺损伤的实验观察[J]. 南华大学学报: 医学版, 2003, 31(3): 278-280, 311.
- [10] 李湘灵, 姜远旭. 前列腺素 E1 脂微球制剂对大鼠急性肺损伤的影响[J]. 数理医药学杂志, 2009, 22(1): 24-26.
- [11] Dorn GW. Mitochondrial pruning by Nix and BNip3: an essential function for cardiac-expressed death factors[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2010, 3(4): 374-383.
- [12] Diwan A, Wansapura J, Syed FM, et al. Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation [J]. Circulation, 2008, 117(3): 396-404.
- [13] Schwarten M, Mohrlüder J, Ma P, et al. Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy[J]. Autophagy, 2009, 5(5): 690-698.

(收稿日期: 2015-02-08 修回日期: 2015-07-15)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号: 按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计: 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究), 实验设计(应告知具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等), 临床试验设计(应告知属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等); 主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明, 尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 M(QR) 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的, 选用合适的统计学分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散点图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析; 对于具有重复实验数据检验回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达: 应写明采用统计学方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体质(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等); 在用不等式表示 P 值的情况下, 一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 三种表达方式, 无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时, 再给出显著性检验结果的同时, 应再给出 95% 可信区间(CI)。