

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.007

不规则趋化因子在急性肺栓塞后的表达及机制研究*

谢小娜¹, 蔡学定^{2△}

(1. 浙江中医药大学附属温州中医院呼吸内科, 浙江温州 325000; 2. 温州医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 浙江温州 325000)

[摘要] **目的** 探讨不规则趋化因子(FKN)在大鼠急性肺栓塞(APE)后的表达及其作用机制。**方法** 采用自体血栓回输法复制 Sprague-Dawley 大鼠 APE 模型;将 72 只大鼠分为对照组、溶剂组、APE 组,每组 24 只,观察 1、4、8 h 3 个时间点各组大鼠肺组织中磷酸化 p38、FKN mRNA 及蛋白表达情况。**结果** 免疫组织化学检测显示,FKN、p38 在 APE 组大鼠肺实质、肺动脉血管壁上均有明显表达;Western blot 检测显示,APE 组各时间点大鼠肺组织中磷酸化 p38 表达水平较对照组、溶剂组各时间点明显升高($P < 0.05$);RT-PCR 检测结果显示,APE 组各时间点大鼠肺组织中 FKN mRNA 表达水平较对照组、溶剂组各时间点升高($P < 0.05$)。**结论** APE 后大鼠肺组织内 FKN、p38 的表达明显升高,可能 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路在 APE 后 FKN 的表达中发挥调控作用。

[关键词] 急性肺栓塞;p38 丝裂原活化蛋白激酶;不规则趋化因子**[中图分类号]** R543.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4112-03

Study on expression and mechanism of fractalkine in acute pulmonary embolism*

XIE Xiaona¹, CAI Xueding^{2△}

(1. Department of Respiratory, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated Zhejiang Chinese Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression and mechanism of fractalkine (FKN) in acute pulmonary embolism (APE) rats. **Methods** The APE model of Sprague-Dawley rats was replicated by autologous thrombus transfer. A total of 72 rats were divided into the control group, the solvent group and the APE group, with 24 rats in each group. Observed the expression of phosphorylated p38 and FKN mRNA and protein in lung tissues of rats in the time points 1, 4, 8 h. **Results** Immunohistochemistry showed that FKN and p38 were significantly expressed in the lung parenchyma and pulmonary artery wall in the APE group. Western blot showed that the expression level of phosphorylated p38 in the APE group was higher than that in the control group and the solvent group at any time point ($P < 0.05$); RT-PCR showed that the expression of FKN mRNA in the APE group was higher than that in the control group and the solvent group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of FKN and p38 in lung tissue of rats significantly increased after APE. The p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) signaling pathway may play a regulatory role in the expression of FKN after APE.

[Key words] acute pulmonary embolism; p38 mitogen-activated protein kinases; fractalkine

急性肺栓塞(acute pulmonary embolism, APE)后引起严重的肺损伤和急性肺动脉高压(pulmonary hypertension, PAH)是导致死亡的直接原因。有报道发现,APE 后形成的 PAH 与肺动脉的机械阻塞作用密切相关^[1],甚至认为肺栓塞后血栓的机械阻塞是导致 PAH 的直接原因。近年来随着研究的深入还发现,肺动脉机械阻塞严重程度与肺动脉压力的增高有

时不成正相关,当机械性阻塞基本解除后,仍发现肺动脉压力持续升高的现象。此外,有研究结果显示,APE 时大量炎症细胞聚集浸润在栓塞血管的周围,这些聚集稍微炎症细胞释放的细胞因子进一步加重肺血管内皮损伤,因此,这些细胞因子在 APE 性 PAH 的形成中扮演重要的角色^[2]。其中,不规则趋化因子(fractalkine, FKN)又名趋化因子 CX3CL1,是趋化因

* 基金项目:浙江省温州市科技局项目(Y20130238)。 作者简介:谢小娜(1988—),住院医师,硕士研究生,主要从事肺血管疾病及气道疾病研究。 △ 通信作者,E-mail:xueding514@126.com。

子 CX3C 亚族的独有成员,具有可溶和膜结合两种形式,既有趋化性蛋白的功能也有细胞黏附分子的功能,还具有促进平滑肌细胞增殖的生长因子作用^[3]。PERROS 等^[4]在 PAH 模型中发现,肺动脉病变周围的炎症细胞中 FKN 表达增加且在血管平滑肌细胞中的表达也明显增加。本文研究大鼠 APE 后 FKN 的表达变化及其机制,从而探讨肺栓塞后炎症反应的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:SPF 级健康雄性 SD 大鼠 72 只,体质量 300~350 g,由温州医科大学动物实验中心生产提供,实验动物合格证为 SCXK(浙)2005-0019。动物置于相同环境和条件饲养。(2)试剂与仪器:BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司;DAB 显色试剂盒购自福建迈新生物技术开发有限公司(MXB Biotechnologies);兔抗大鼠磷酸化 p38 抗体、兔抗大鼠总 P38 抗体和山羊抗兔 HRP 二抗购自美国 CST(Cell Signaling Technology)公司;兔抗大鼠 FKN 抗体购自美国 Biolegend 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 按照完全随机的方法将 72 只 SD 大鼠分为对照组、溶剂组、APE 组,每组 24 只;再将每组分为处理后 1、4、8 h 3 个亚组,每组 8 只。

1.2.2 APE 大鼠模型建立 (1)自体血栓制备:取聚维酮碘棉球对大鼠颈部进行消毒,内径 1.1 mm 头皮针(19G)置入左颈动脉取血并静置 10 min 凝血,再将血块置于 37 °C 水中 20 min,切成统一规格 1.1 mm×3.0 mm 的栓子,并用无菌生理盐水轻柔冲洗 3 遍,放入对应试管内,加无菌生理盐水 2 mL,4 °C 冷藏备用,所有操作均为无菌操作。(2)APE 模型的建立:使用 5%水合氯醛(3 mg/kg)经腹腔注射麻醉大鼠,暴露颈正中中线并行纵行切口,分离大鼠颈外静脉并剪一小口,插入 19G 聚乙烯导管,通过导管注入之前准备的栓子约 50 个(不致大鼠死亡),附以无菌生理盐水 0.6 mL(0.1 mL/min),血栓伴随循环血液汇聚并嵌顿于肺动脉,行核素扫描检测发现栓塞部位核素摄取量明显减少,证明 APE 大鼠模型建立成功。对照组不作任何处理;溶剂组大鼠除注入等量的生理盐水外,余操作同 APE 组。在成功建立 APE 模型后,分别于 1、4、8 h 3 个时间点处死大鼠,经胸腔取大鼠肺组织。

1.2.3 免疫组织化学(IHC)检测 摘取大鼠左肺上叶组织,固定于 4%多聚甲醛液 24 h,经漂洗、脱水、透明、浸蜡、和包埋后再行切片,通过 IHC 检测 FKN、p38 蛋白的表达。组织切片经脱蜡、水化、封闭及微波修复后,滴加抗 FKN 抗体(1:50)或抗 p38 抗体(1:50)于 4 °C 过夜后,加入山羊抗兔二抗(1:50),DAB 显色终止后行苏木素复染,最终脱水、透明中性树脂封片。置于显微镜下观察 p38、FKN 在肺组织中的表达。

1.2.4 Western blot 检测 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)表达 称取各组大鼠等量新鲜肺组织加入细胞裂解液后充分研磨,再经超声细胞粉碎仪充分破碎,于低温超速离心机 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取上清液加入等体积 2×上样缓冲液及相应体积 PBS 充分震荡混匀并分装至 PCR 管经 PCR 仪维持 99 °C 运行 5 min,多余蛋白于 -70 °C 冰箱保存备用。进行 10 mol/L SDS-PAGE(电压浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)蛋白电泳,电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜(转膜电流 300 mA,30 min)后用 5 g/L 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h,分别加入 5%牛血清清蛋白(BSA)稀释的磷酸化 p38 单克隆抗体(1:1 000,兔抗大鼠)和总 p38 单克隆抗体(1:1 000,兔抗大鼠)4 °C 冰箱孵育过夜后,用 TBST 充分洗涤条带 3 min 后,室温下孵育标记辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗兔二抗(1:2 000)1 h,再次用 TBST 充分洗涤 3 min,使用 ECL 试剂显色及暗室内胶片曝光。使用图像分析系统对所得条带进行扫描保存及灰度分析。

1.2.5 RT-PCR 检测 FKN mRNA 表达 使用 Trizol 试剂盒提取肺组织总 RNA 并测出 A 值, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0。用日本 TakaRa 公司 RT-PCR 试剂盒进行逆转录扩增,逆转录扩增条件:65 °C 1 min,30 °C 5 min,65 °C 15 min,98 °C 5 min,5 °C 5 min,转录成 cDNA 后,各组取 5 μL 加入 PCR 反应体系,PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 1 min,56.2 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次。各组 PCR 产物等量注入 2%琼脂糖凝胶孔中行水平电泳并在紫外凝胶成像系统下观察、摄像,随后进行吸光度值(OD)分析。各样本的基因表达量计算方法为产物胶上条带 OD 与 β -action 基因条带 OD 的比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布的采用 LSD 法检验;方差不齐者两两比较采用 Student-Newman-Keuls,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APE 大鼠 FKN 的表达部位 IHC 检测结果显示,FKN 在 APE 大鼠的肺实质、肺动脉血管壁上均有不同程度的表达;p38 在 APE 大鼠的肺实质、肺动脉血管壁细胞核内均有表达。

表 1 各组大鼠各时间点磷酸化 P38 蛋白 OD 比值比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	处理后 1 h	处理后 4 h	处理后 8 h
对照组	0.20±0.07 ^a	0.21±0.07 ^a	0.24±0.07 ^a
溶剂组	0.23±0.09 ^a	0.22±0.07 ^a	0.25±0.08 ^a
APE 组	0.36±0.09	0.52±0.08	0.66±0.06

^a: $P<0.05$,与 APE 组比较

2.2 各组大鼠各时间点肺组织磷酸化 p38 OD 比值比较 APE 组各时间点大鼠肺组织磷酸化 p38 OD 比值高于对照组和溶剂组 ($P < 0.05$), 见表 1、图 1。

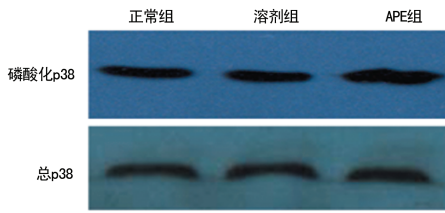


图 1 各组大鼠处理后 8 h 磷酸化 p38 的表达水平

2.3 各组大鼠各时间点肺组织 FKN mRNA OD 比值比较 APE 组各时间点大鼠肺组织 FKN mRNA OD 比值明显高于对照组和溶剂组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠各时间点 FKN mRNA 的 OD 比值比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	处理后 1 h	处理后 4 h	处理后 8 h
对照组	0.25 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.02 ^a
溶剂组	0.25 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.05 ^a	0.26 ± 0.04 ^a
APE 组	0.34 ± 0.05	0.44 ± 0.06	0.63 ± 0.05

^a: $P < 0.05$, 与 APE 组比较

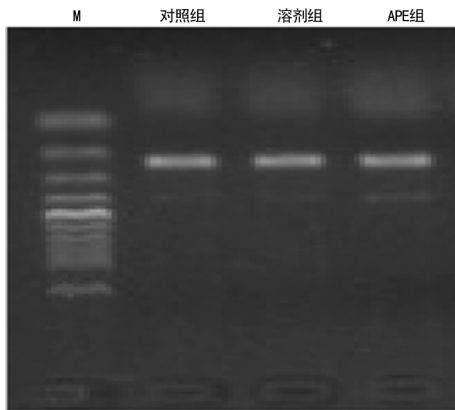


图 2 各组大鼠处理后 8 h 肺组织 FKN mRNA 的表达水平

3 讨论

3.1 FKN 在 APE 后的表达及其作用 FKN 是 1997 年由 BAZAN 等^[5]在用趋化因子的基因探针检索表达序列标签数据库时发现的, 是目前 CX3C-类趋化因子中惟一成员, 它是含有多个结构域的大分子蛋白, 人的 FKN 基因定位在染色体 16q13^[6]。膜结合型 Fractalkine 存在于活化的细胞表面, 主要起着黏附作用; 分泌型 Fractalkine 主要是对单核、NK 细胞等具有强有力的趋化作用^[7-8]。近年来有报道指出, 炎症反应时, FKN 在单核细胞和 T 细胞募集到血管壁的过程中起重要作用, 而且 FKN 还具有类似于生长因子促肺动脉平滑肌细胞增殖的作用^[3]。在 APE 后, 对 FKN 的研究较少报道。

本研究结果显示, APE 后 FKN、p38 在肺血管内皮、肺泡上皮、支气管内皮上有明显表达 ($P < 0.05$)。

本研究结果显示, APE 组各时间点大鼠肺组织 FKN mRNA 的表达量明显高于对照组和溶剂组 ($P < 0.05$)。目前研究认为, APE 后 PAH 的形成可能与栓塞后血管周围大量炎症细胞浸润及其释放的细胞因子进一步损伤肺动脉内皮有关^[9], 而表达增多的 FKN 对炎症细胞的聚集起到促进作用。

3.2 p38MAPK 通路在 APE 后被激活从而上调 FKN 的表达 1993 年科学家研究发现 p38MAPK 信号转导通路, 该通路一旦被激活, 细胞质中的非磷酸化 p38MAPK 转化为磷酸化 p38MAPK, 再移位到细胞核内^[10]。本研究中采用 Western blot 检测肺组织磷酸化 p38 的表达, 结果显示随时间延长磷酸化 p38 的表达有明显增高趋势 ($P < 0.05$), 提示在大鼠 APE 后, p38MAPK 通路被激活。因此本课题组推测, APE 后 p38MAPK 通路被激活, 上调了 FKN 的表达, 使得 FKN 在 APE 后明显升高。

此外, 有研究报道 FKN 在 PAH 的发生、发展中起到重要作用, 值得注意的是损伤的内皮细胞可过度表达 FKN^[11-12], 其是否在 APE 后 PAH 的形成中起作用有待进一步研究。也有研究显示 FKN 所引起的趋化白细胞、纤维化、凋亡等均可能是心力衰竭的诱因^[13-15]。右心功能不全也是 APE 后 PAH 的形成的原因之一。

综上所述, 本研究结果显示在 APE 后 8 h 内, 大鼠肺组织中 FKN 的表达即明显升高, 作为炎症趋化因子, FKN 对 APE 后肺部炎症反应有明显促进作用, 从而加重了 APE 后炎症反应及 PAH 的形成。

参考文献

- [1] SMULDERS Y M. Pathophysiology and treatment of haemodynamic instability in acute pulmonary embolism; the pivotal role of pulmonary vasoconstriction[J]. Cardiovasc Res, 2000, 48(1): 23-33.
- [2] KIMURA H, OKADA O, TANABE N, et al. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 and pulmonary vascular resistance in chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(2): 319-324.
- [3] BOAG S, DAS R, SHMELEVA E V, et al. T lymphocytes and fractalkine contribute to cardiac ischemia/reperfusion injury in patients[J]. J Clin Invest, 2015, 125(8): 3063-3076.
- [4] PERROS F, DORFMULLER P, SOUZA R, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension[J]. Eur Respir J, 2007, 29(5): 937-943.
- [5] BAZAN J F, BACON K B, HARDIMAN G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640-644.
- [6] NOMIYAMA H, IMAI T, KUSUDA J, et al. Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome (下转第 4118 页)

- uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation[J]. *Cell Rep*,2014,9(1):349-365.
- [4] LEE J W,RYU Y K,JI Y H, et al. Hypoxia/reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1-and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (12):9820-9833.
- [5] WANG P,ZENG Y,LIU T, et al. Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway[J]. *World J Gastroenterol*,2014,20(8):2071-2078.
- [6] FORSTER J C,HARRISS-PHILLIPS W M,DOUGLASS M J, et al. A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment [J]. *Hypoxia(Auckl)*,2017(5):21-32.
- [7] LEE S L,RYU H,SON A R, et al. TGF- β and Hypoxia/reoxygenation promote radioresistance of A549 lung cancer cells through activation of Nrf2 and EGFR[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2016,2016(6):6823471.
- [8] LI L,ZHOU Y,LI Y, et al. Aqueous extract of cortex dictamnii protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis by PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017 (89):233-244.
- [9] CHOWDHURY S R,RAY U,CHATTERJEE B P, et al. Targeted apoptosis in ovarian cancer cells through mitochondrial dysfunction in response to Sambucus nigra agglutinin[J]. *Cell Death Dis*,2017,8(5):e2762.
- [10] GÁO X,SCHÖTTKER B. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development;a systematic review of literature reviews [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (31): 51888-51906.
- [11] WANG P,ZHANG C,YU P, et al. Regulation of colon cancer cell migration and invasion by CLIC1-mediated RVD[J]. *Mol Cell Biochem*,2012,365(1/2):313-321.
- [12] SUBASH-BABU P,ALSHAMMARI G M,IGNACIMUTHU S, et al. Epoxy clerodane diterpene inhibits MCF-7 human breast cancer cell growth by regulating the expression of the functional apoptotic genes Cdkn2A,Rb1,mdm2 and p53[J]. *Biomed Pharmacother*,2017(87):388-396.
- [13] CAO L,LIU J,ZHANG L, et al. Curcumin inhibits H₂O₂-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- κ B pathway [J]. *Oncol Rep*,2016,36(4):2245-2251.
- [14] XU Q,CAO X,PAN J, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) remodels the extracellular matrix through enhancing matrix metalloproteinases (MMPs) and inhibiting tissue inhibitors of MMPs expression in HPV-positive cervical cancer cells [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*,2015,36(5):539-545.
- [15] MA Y S,HSIAO Y P,LIN J H, et al. Crude extract of *Rheum palmatum* L inhibits migration and invasion of LS1034 human colon cancer cells acts through the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 by MAPK signaling [J]. *Environ Toxicol*,2015,30(7):852-863.

(收稿日期:2018-02-26 修回日期:2018-06-26)

(上接第 4114 页)

- 16q13[J]. *Cytogenet Cell Genet*,1998,81(1):10-11.
- [7] FAURE S,MEYER L,COSTAGLIOLA D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1[J]. *Science*,2000,287(5461):2274-2277.
- [8] KERFOOT S M,LORD S E,BELL R B. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment[J]. *Eur J Immunol*,2003,33(3):729-739.
- [9] LANGER F,SCHRAMM R,BAUER M, et al. Cytokine response to pulmonary thromboendarterectomy[J]. *Chest*,2004,126(1):135-141.
- [10] GREEN S R,HAN K H,CHEN Y, et al. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK[J]. *J Immunol*,2006,176(12):7412-7420.
- [11] ZHANG Y,ZHENG J,ZHOU Z, et al. Fractalkine promotes chemotaxis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards ischemic brain lesions through Jak2 signaling and cytoskeletal reorganization [J]. *FEBS J*,2015,282(5):891-903.
- [12] MCDERMOTT D H,HALCOX J P,SCHENKE W H, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Circ Res*,2001,89(5):401-407.
- [13] GU X,XU J,YANG X P, et al. Fractalkine neutralization improves cardiac function after myocardial infarction[J]. *Exp Physiol*,2015,100(7):805-817.
- [14] RUCHAYA P J,ANTUNES V R,PATON J, et al. The cardiovascular actions of fractalkine/CX3CL1 in the hypothalamic paraventricular nucleus are attenuated in rats with heart failure[J]. *Exp Physiol*,2014,99(1):111-122.
- [15] XUAN W,LIAO Y,CHEN B, et al. Detrimental effect of fractalkine on myocardial ischaemia and heart failure [J]. *Cardiovasc Res*,2011,92(3):385-393.

(收稿日期:2018-04-01 修回日期:2018-06-26)