论著

文章编号:1000-5404(2007)20-1968-04

大鼠急性肺栓塞后 hnRNP-E1 的表达及胶原代谢的变化

李圣青,欧阳海峰,刘阿茹,简 文,逯新宇,任新玲,赵 峰 (第四军医大学西京医院呼吸内科,西安 710033)

提 要:目的 研究大鼠急性肺栓塞模型肺组织中异源性核糖核蛋白 E1(heterogeneous nuclear ribonucleoprote E1, hnRNP-E1)的表达变化及其对胶原代谢的影响。**方法** 建立大鼠急性肺栓塞模型,分别在急性肺栓塞后 1、2、7 和 21 d 开胸取出肺组织,然后提取肺组织的总 RNA 和总蛋白,以正常大鼠为对照组,采取半定量 RT-PCR 的方法研究 hnRNP-E1 在 mRNA 水平表达的变化;采用 Western blot 方法进一步验证 hnRNP-E1 在蛋白水平表达的变化。采用 Northern blot 法分析大鼠肺组织中 Collagen α1(Ⅰ)(COL1A1)和 Collagen α1(Ⅲ)(COL3A1)在肺栓塞后 mRNA 水平的表达变化;采用羟脯氨酸(HYP)和 Masson 染色观察急性肺栓塞 3 周后肺组织内的胶原沉积状况。**结果** 在大鼠急性肺栓塞后的不同时间点,hnRNP-E1 的 mRNA 水平和蛋白水平的表达均有显著升高。大鼠急性肺栓塞后肺组织中 COL1A1 的 mRNA 表达水平有明显升高,但是 COL3A1 的 mRNA 表达水平无显著变化。HYP 分析和 Masson 染色均显示急性肺栓塞 3 周后肺组织内的胶原沉积明显增加。**结论** 大鼠急性肺栓塞后肺组织内 hnRNP-E1 的表达升高,可能促进了 COL1A1 的蛋白表达和胶原在肺部的沉积。

关键词:肺栓塞;急性;蛋白印迹;半定量逆转录-多聚酶链式反应;hnRNP-E1

中图法分类号:R-332;R446;R563.502 **文献标识码**:A

Up-regulated hnRNP-E1 enhances collagen metabolism in lung tissues after acute pulmonary embolism

LI Sheng-qing, OUYANG Hai-feng, LIU A-ru, JIAN Wen, TI Xin-yu, REN Xin-ling, ZHAO Feng (Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To study the expression changes of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 (hnRNP-E1) in the lung tissues after acute pulmonary embolism (PE) in rats and its effects on the metabolism of collagen. **Methods** The Wistar rat model of acute PE was established by injecting 3 – 4 emboli into the left jugular vein. The lung tissue samples were collected at day 1, 2, 7 and 21 after acute PE, then the total RNA and total proteins were obtained. The normal rats were used as control. The mRNA level changes of hnRNP-E1 were identified by semi-quantitative RT-PCR, and its protein level changes were validated by Western blot. The relative amounts of steady state Collagen α1(Ⅰ) (COL1A1) and Collagen α1(Ⅲ)(COL3A1) mRNA in the lung tissues after acute PE were analyzed by Northern blot. Hydroxyproline (HYP) determination and Masson dyeing were employed to observe the deposition of collagen in the lung tissues 3 weeks after acute PE. **Results** At different time points, the mRNA levels and the protein levels of hnRNP-E1 increased gradually in the rat lung tissues after acute PE. The mRNA levels of COL1A1 increased steadily after acute PE, but those of COL3A1 had no changes. The deposition of collagen in the lung tissues increased obviously 3 weeks after acute PE. **Conclusion** The expression of hnRNP-E1 is up-regulated after acute PE. It might facilitate the deposition of collagen in the lung tissues.

Key words: pulmonary embolism, acute; Western blot; semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1

肺栓塞(pulmonary embolism, PE)是血栓性或者其他性质的栓子(如气体、羊水、脂肪),顺着血流方向堵塞肺动脉的结果。由于栓子直接阻塞肺动脉或因神

作者简介:李圣青(1970 –),女,安徽省芜湖市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事急性肺栓塞发病机制和诊断方面的研究。E-mail: shengqingli@gmail.com

收稿日期:2007-03-06;修回日期:2007-05-09

经体液因素导致血管痉挛，可引起肺动脉高压，严重的可导致右心功能不全，甚至休克、死亡[1]。我们实验室采用比较蛋白质组学的方法研究发现，大鼠急性肺栓塞后出现了一系列的蛋白表达变化，其中 mRNA 结合蛋白 hnRNP-E1 在急性肺栓塞后出现了明显的表达上调[2]。Thiele 等[3]在心肌成纤维细胞的研究中发现，hnRNP-E1 能够与胶原蛋白 mRNA 的 3′非翻译区（3′-UTRs）相结合，通过加强 mRNA 的稳定性参与胶原蛋白的转录后水平的调节。本研究在上述发现的基础上进一步验证了急性肺栓塞后 hnRNP-E1 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达变化，同时研究了急性肺栓塞后肺组织内的胶原沉积变化。

1　材料与方法

1.1　材料

Trizol Reagent 和 SuperScript Ⅲ均购自 Invitrogen 公司。*rTaq* 酶购自 TaKaRa 公司。hnRNP-E1 羊多抗购自 Santa Cruz 公司。HYP 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。α-^{32}PdCTP 购自北京亚辉公司。随机引物 DNA 标记试剂盒购自 TaKaRa 公司。紫外分光光度计 UV330 购自英国 Unicam 公司，PE 9700 PCR 仪和 Image Master TotalLab v1.11 软件均购自 Amersham Pharmacia 公司。40 只雄性 Wistar 大鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.2　方法

1.2.1　大鼠急性 PE 模型的建立　　在 Clozel[4] 模型基础上做如下改进：首先制备体外血栓，取 Wistar 大鼠 1 只，心脏穿刺取血，注入医用输液器的前段塑料管（内径约 2 mm）。每毫升全血中加入 2 U 凝血酶，室温下静置过夜，制备直径 2 mm、长 10 mm的自体血栓。取 40 只雄性 Wistar 大鼠，体质量 200 ~ 250 g，随机分 5 组，每组 8 只。将大鼠用 10 g/L 戊巴比妥 1.2 ml 麻醉，经大鼠颈总静脉插管注入栓子，3 个/只。以正常大鼠作为对照组。分别在 1、2、7 和 21 d 开胸取肺组织。

1.2.2　半定量 RT-PCR　　采用 Trizol 试剂提取大鼠肺组织总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 的质量，采用紫外分光光度计进行 RNA 定量。采用 SuperScript Ⅲ合成 cDNA 第一链，总反应体系达 20μl，反应物 -20 ℃保存或直接用于 RCR。采用 Primer Premier 5.0 PCR 引物设计软件分别设计 hnRNP-E1 和 β-actin 的引物。同时采用 Sequencher 序列比对软件对 hnRNP-E1 和内参 β-actin 的引物序列进行特异性验证。hnRNP-E1 引物序列：上游 5′- CAG AGG TGA AAG GCT ATT GG -3′，下游 5′- AGC GGA TGA TAA AGT GTA GAA A -3′，扩增长度 405 bp。内参 β-actin 引物序列：上游 5′-GAT GAC CCA GAT CAT GTT TG-3′，下游 5′-TAG GAG CCA GGG CAG TAA-3′，扩增长度 614 bp。采用 PE 9700 PCR 仪，反应体系 25 μl。PCR 反应条件：94 ℃变性 2 min，94 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，72 ℃延伸 7 min，4 ℃保存。分别在 20、30 和 35 个循环取样，用 12 g/L Agorase 进行琼脂糖电泳。采用 Image Master TotalLab v1.11 软件作图像分析。首先确定条带，消除背景，然后以 Marker 条带为标准计算待测条带的 volume 值，最后计算目的条带与对应内参条带的比值。

1.2.3　Western blot　　先用三氯醋酸/丙酮沉淀法沉淀肺组织蛋白，然后在沉淀中加入裂解液（pH 8.0 的 50 mmol/L Tris · HCl，10 g/L SDS，10 g/L DTT，1 mmol/L PMSF，1 mmol/L EDTA，0.7 mg/L 抑肽素，0.5 mg/L 亮肽素）。15 ℃，40 000 × *g* 离心1 h，取上清。用 Bradford 法对上清进行蛋白定量，分装后 -80 ℃保存。SDS-PAGE 电泳的蛋白上样量为 40 μg，经过转膜和封闭处理后，按顺序加一抗和二抗，最后用 A、B 液显色。采用 ImageMaster3.0 软件扫描测定每个蛋白条带的 volume 值。

1.2.4　Northern blot 分析[5]　　RNA 探针的制备和纯化参照《分子克隆》介绍的方法。首先将肺组织总 RNA 各取 20 μg 做琼脂糖凝胶电泳。然后用毛细管抽提原理，将 RNA 从琼脂糖凝胶转移至尼龙膜上，室温下晾干，80 ℃烤膜 2 h 后，预杂交 3 h，用 α-^{32}PdCTP 标记的 COL1A1 和 COL3A1 探针杂交 68 ℃过夜。常规洗膜，-70 ℃放射自显影过夜。以 18S RNA 为内参照。

1.2.5　HYP 测定　　取 1 g 肺组织加入 9 ml 8.6 g/L 的冰生理盐水中，制备肺组织匀浆，离心取上清，按照试剂盒所附的操作步骤进行 HYP 的统一测定。

1.2.6　肺组织 Masson 染色　　先将肺组织石蜡切片行苏木精染色，使核染成蓝色；再用猩红液染 5 min，使细胞质、肌肉和红细胞变成红色；最后用苯胺蓝液然 5 min，使胶原呈现蓝色。

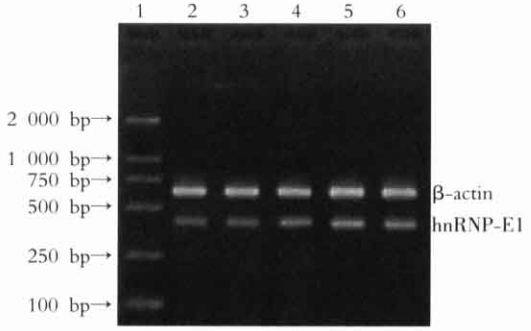
1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用重复测量方差分析法。

2　结果

2.1　半定量 RT-PCR 结果

大鼠急性肺栓塞后 1 d，肺组织中 hnRNP-E1 的 mRNA 表达水平无显著变化，2 d 后开始上调，7 d 和 21 d 维持在较高水平（图 1，表 1）。



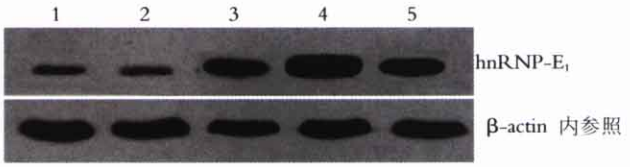
1：DL-2000 标准；2：对照组；3：1 d；4：2 d；5：7 d；6：21 d

图 1　不同时间点肺组织 hnRNP-E1 的半定量 RT-PCR 结果

2.2　Western blot 结果

大鼠急性肺栓塞后 1 d，肺组织中 hnRNP-E1 的蛋白表达水

平无显著变化,2 d后开始上调,7 d后达最高水平,21 d后略有下降,但仍维持在较高水平(图2,表1)。



1:对照组;2:1 d;3:2 d;4:7 d;5:21 d

图2 不同时间点肺组织 hnRNP-E1 的 Western blot 结果

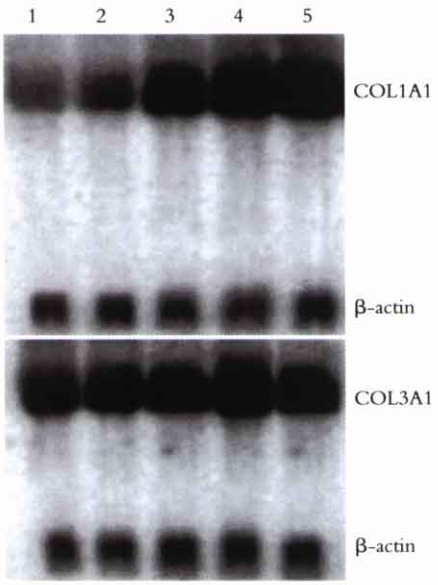
表1 急性肺栓塞后 hnRNP-E1 和 HYP 的表达变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

时间(d)	hnRNP-E1 (mRNA)	hnRNP-E1	HYP (mg/g)
0(对照组)	0.34 ±0.11	295 746 ±3 244	1.15 ±0.12
1	0.28 ±0.09	217 465 ±2 974	1.08 ±0.09
2	0.84 ±0.31[a]	793 836 ±4 827[a]	1.12 ±0.13
7	0.96 ±0.33[a]	1 298 457 ±6 374[b]	2.12 ±0.23[a]
21	0.81 ±0.22[a]	813 475 ±4 956[a]	2.57 ±0.41[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

2.3 Northern blot 结果

COL1A1 的 mRNA 水平在急性肺栓塞后 1 d 无明显变化,2 d后开始逐步升高,第7天和第21天一直维持在一个较高水平。COL3A1 的 mRNA 水平在急性肺栓塞后无显著变化,从而导致 COL1A1 与 COL3A1 的比例升高(图3)。



1:对照组;2:1 d;3:2 d;4:7 d;5:21 d

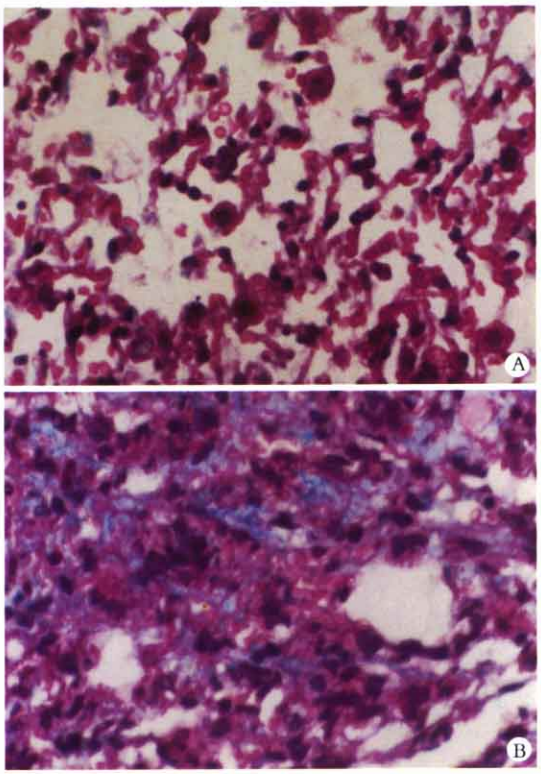
图3 不同时间点肺组织内 COL1A1 和 COL3A1 表达的 Northern blot 结果

2.4 HYP 分析

肺组织匀浆的 HYP 水平在对照组为(1.15 ±0.12) g/g,在急性肺栓塞后1 d和2 d无明显变化,于急性肺栓塞后7 d开始上升至(2.12 ±0.23) mg/g($P<0.05$),21 d后 HYP 水平上升至(2.57 ±0.41) mg/g($P<0.01$)(表1)。

2.5 Masson 染色结果

急性肺栓塞3周后,肺泡Ⅰ型上皮细胞变性坏死,Ⅱ型上皮细胞增生,局部有透明血栓形成。炎症细胞浸润以肺泡巨噬细胞为主,淋巴细胞相对较少。肺泡间隔增厚,肺泡壁出现成纤维细胞增生,并可见蓝色胶原沉积(图4)。



A:对照组;B:急性肺栓塞组

图4 急性肺栓塞3周后肺组织病理变化 (Masson ×400)

3 讨论

hnRNP 家族蛋白通过与 mRNA 的结合,参与多种蛋白的转录后调节。并且 hnRNP 蛋白之间可以通过相互作用形成复合物,共同参与蛋白的转录后水平的调节[6]。对心肌纤维化的研究表明患者心肌组织中 hnRNP-E1 的表达较正常人显著升高。进一步的研究表明 hnRNP-E1 能够与 COL1A1 的 mRNA 的 3′-UTRs 相结合,通过加强 mRNA 的稳定性来促进 COL1A1 的表达。但是 hnRNP-E1 对 COL3A1 的 mRNA 的稳定性却无显著影响[5]。由于 COL1A1 和 COL3A1 的蛋白表达主要依赖于 mRNA 水平的转录后调节,因此 hnRNP-E1 的表达水平升高有利于 COL1A1 的 mRNA 的稳定性和蛋白表达。本研究表明在大鼠急性肺栓塞后2 d,hnRNP-E1 的 mRNA 水平和蛋白水平的表达均有显著升高。Northern blot 分析显示肺组织中 COL1A1 的 mRNA 表达水平也是2 d后就有明显升高,与 hnRNP-E1 的表达变化非常同步,但是 COL3A1 的 mRNA 表达

水平无显著变化。表明 hnRNP-E1 蛋白对 COL3A1 的 mRNA 的稳定性无明显作用。这样会导致 COL1A1 与 COL3A1 的比例升高，而 COL1A1 与 COL3A1 的比例升高正是肺纤维化的标志。HYP 分析显示急性肺栓塞后 7 d 在肺组织中才出现较显著的胶原沉积现象，而肺组织的 Masson 染色也显示了同样的病理变化。由此，我们认为大鼠急性肺栓塞后肺组织内 hnRNP-E1 的表达升高，可能促进了 COL1A1 的蛋白表达和胶原在肺部的沉积。

参考文献：

[1] Girard P, Sanchez O, Leroyer C, *et al*. Deep venous thrombosis in patients with acute pulmonary embolism: prevalence, risk factors, and clinical significance[J]. Chest, 2005, 128(3): 1593 - 1600.

[2] 李圣青，赵　峰，戚好文，等. 肺组织灌注前后的双向电泳的比较[J]. 西安交通大学学报：医学版，2006，27(2)：203 - 206.

[3] Thiele B J, Doller A, Kahne T, *et al*. RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis[J]. Circ Res, 2004, 95(11): 1058 - 1066.

[4] Clozel J P, Holvoet P, Tschopp T. Experimental pulmonary embolus in the rat: a new *in vivo* model to test thrombolytic drugs[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1988, 12(5): 520 - 525.

[5] 李圣青，赵　峰，张　艰，等. 博来霉素 $A_2 + B_2$ 致小鼠肺纤维化作用的研究[J]. 现代肿瘤医学，2006，14(2)：132 - 135.

[6] Kosturko L D, Maggipinto M J, Korza G, *et al*. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(8): 3521 - 3533.

（编辑　郭建秀）

（上接 1967 页）

3　讨论

3.1　乳腺癌患者心理问题与影响因素

对患者来说，乳房切除不仅是一个手术过程，而且将产生深远的心理压力[2]，在接受乳房切除术后，可明显影响患者的身体形象和社会意识，由于乳房的残缺和形体的改变及脱发引起患者的自尊心受损、受歧视感和自卑感、无助感、自我价值降低，认为自己失去女性的魅力，性的吸引力和性功能降低，由于对自己的身体感到羞愧而回避社会交往。对家庭来说也是沉重的打击，尤其是对丈夫心理的影响更大，乳腺癌术后夫妻关系冷淡，甚至离婚，加重了乳腺癌患者自卑、忧郁、恐惧感。本组患者着重调查出院后性生活情况，结果有改变者占 59.30%，主要由丈夫的原因引起。

另一方面乳腺癌不同于一般癌肿，其治疗周期较长，一旦诊断明确，术前术后均需一定疗程的化疗，部分患者在术后化疗中还穿插放疗，还有一部分患者出院后还需继续强化治疗，因此，乳腺癌患者的治疗花费是一笔不小的数目。如果缺乏经济保障，生活质量的一般行为能力就会受到影响，在问卷调查“影响患者出院后继续康复的因素”中，经济因素占了 43.27%，其次是心态，工作和情感也在一定程度上影响着患者的继续康复。

3.2　乳腺癌病友联谊会的作用

联谊会构建了一种以患者为中心的关注健康、关爱生命的平台[3]，该平台通过患者之间的相互交流而得到情感支持，通过与医护人员的交流而解除对疾病的疑虑与担忧，患者及家属也从联谊会中获得了很多知识和信息，从而增强了战胜疾病的信心和勇气。从表 2 看出乳腺癌病友联谊会深受患者欢迎的原因主要是：使患者坚定了战胜疾病的信心，占 72.12%；使患者及家属从联谊会中获取了知识，也占 72.12%；同时获得了疾病治疗、康复进展的相关信息；联谊会也集娱乐性、趣味性为一体，使患者开心、快乐。

联谊会还能帮助患者建立一种积极、乐观、平和的心态，如请乳腺癌术后已生存 5、10 年甚至 15 年乃至更长时间的病友进行现身说法，增强了患者战胜疾病的信心，帮助患者恢复自信和自尊，提高生活质量。

联谊会鼓励患者转换角色，从患者转换成社会人，从工作、学习中找回自尊、自信，积极参加社会活动，分散注意力、淡忘不良认知。同时呼吁家庭、社会关心、支持乳腺癌患者。家属尤其丈夫要在精神上鼓励、支持患者；生活上关心、体贴患者；有利于患者康复和提高生活质量。

3.3　乳腺癌病友联谊会既是医院服务延伸，又是一种社会支持

乳腺癌病友联谊会是一项将服务模式从院内延伸到院外去关爱患者、关注健康的有益活动，也是一项促进乳腺癌患者身心健康，提高乳腺癌患者生活质量的公益活动，它构建了患者与医护人员、患者与患者、家属与家属交流的平台。关注乳腺癌患者身心健康，提高乳腺癌患者生活质量，既要从肿瘤治疗及无瘤生存的角度去考虑，还要通过各种途径和方式矫正乳腺癌患者及家属的不良认知，使乳腺癌患者拥有良好的心态对待疾病。乳腺癌患者需要家庭、亲人的关爱和支持，同样需要社会支持。作为社会支持形式之一的乳腺癌病友联谊会使患者感到被尊重、理解，有助于增进正性情感，缓解抑郁情绪。对提高乳腺癌患者的生活质量起到了良好的促进作用。

关键词：乳腺癌；病友联谊会；生活质量

中图法分类号：R471　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 姜　军. 早期乳腺癌临床研究进展[J]. 第三军医大学学报，2003，25(23)：2063 - 2065.

[2] 左文述，徐忠法，刘　奇. 现代乳腺肿瘤学[M]. 济南：山东科学技术出版社，1995：25 - 28.

[3] 陈显春，曾小华，邓亨梅，等. 举办乳腺癌病友联谊会的做法与体会[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：1058 - 1059.

（编辑　陈聪连）