论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1598-03

高氧对幼鼠肺组织细胞凋亡及 p38 MAPK 丝裂原活化蛋白激酶的影响

李 静,许 峰,胡 兰,谭利平,符跃强,方 芳,匡凤梧,卢仲毅 (重庆医科大学附属儿童医院 ICU,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨高氧对幼鼠肺组织细胞凋亡及 p38 MAPK 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响。方法 幼年 Wistar 大鼠 90% 氧气暴露建立高氧肺损伤模型,行肺组织病理学检查,应用 TUNEL 法检测肺组织的细胞凋亡,Western blot 法检测 p38 MAPK 表达。结果 高氧暴露 3 d 可见肺组织水肿、出血、炎症细胞浸润等急性肺损伤改变。高氧 3 d 组的肺凋亡指数较空气对照组明显增加,凋亡发生的主要部位为肺泡、支气管上皮及血管内皮细胞。Western blot 结果显示高氧暴露 1 d,肺组织的 p38MAPK 活性迅速升高,于第 2 天达到高峰,第 3 天活性有所下降,但仍高于空气对照组。结论 高氧暴露可以诱导肺组织发生细胞凋亡;高氧可以激活 p38MAPK 通路,参与高氧性肺损伤的调控;活化的 p38MAPK 可能参与了高氧诱导的肺组织细胞凋亡的调控。

关键词:高氧;细胞凋亡;p38 MAPK 丝裂原活化蛋白激酶
中图法分类号:R322.35;R329.28;R339.5 文献标识码:A

Effect of hyperoxia on p38MAPK expression and apoptosis in the lungs of juvenile rats

LI Jing, XU Feng, HU Lan, TAN Li-ping, FU Yue-qiang, FANG Fang, KUANG Feng-wu, LU Zhong-yi (Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hyperoxia on p38MAPK expression and apoptosis in the lungs of juvenile rats. Methods Thirty-two Wistar rats aged 3 weeks were divided into air exposure group and 1-day, 2-day and 3-day hyperoxia exposure groups, with 8 rats in each group. The hyperoxia exposure rats were exposed to 90% O_2. The resected lungs were histopathologically examined. The apoptosis and p38MAPK expressions in the resected lungs were detected by TUNEL and Western blot respectively. Results After 3-day hyperoxia exposure, the pathological changes of acute lung injury occurred, such as edema, hemorrhage and inflammatory cell infiltration. The apoptosis index in the lungs of 3-day hyperoxia exposure group was significantly higher than that of air exposure group ($P<0.05$), and TUNEL showed the apoptotic cells were mainly distributed in the alveoli, airway epithelial cells and pulmonary vascular endothelial cells. Western blot results showed that p-p38 MAPK increased at the 1st day after hyperoxia, peaked at the 2nd day and decreased at the 3rd day. Conclusion In the course of hyperoxia-induced lung injury, high oxygen concentration can induce cell apoptosis and activiate the p38 MAPK signal pathway. The activiated p38MAPK signaling pathway may play a role in the regulation of apoptosis induced by hyperoxia.

Key words: hyperoxia; cell apoptosis; p38 mitogen-activated protein kinase

氧疗是临床上抢救儿童呼吸衰竭危重症的方法之一,然而持续高浓度用氧带来的氧化应激性肺损伤(即高氧肺损伤)将引起肺间质增生及肺纤维化,最终导致慢性肺部疾病(chronic lung disease, CLD)。目前高氧肺损伤的具体机制尚不明确。有研究认为细胞凋亡在 CLD 发病过程中具有重要作用[1],细胞凋亡机制的研究可能为高氧肺损伤的防治提供新的方向,而 p38MAPK 是调节细胞凋亡的重要信号蛋白。本研究动态观察了高氧对幼鼠肺细胞凋亡及 p38 MAPK 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响,旨在探寻两者在高氧肺

基金项目:国家自然科学基金(30370618)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370618)
作者简介:李 静,女,四川省峨眉山市人,硕士研究生,主治医师,主要从事小儿危重病方面的研究。E-mail:lijingwangyi@126.com
通信作者:许 峰,电话:(023)63622664
收稿日期:2007-09-07;修回日期:2008-01-03

损伤发病机制中的重要作用。

1　材料与方法

1.1　动物模型制备

取 3 周幼年 Wistar 大鼠 32 只(重庆医科大学实验动物中心),体质量 40 ~ 50 g,雌雄不限,数字随机法分为空气对照组和高氧暴露 1、2、3 d 组(每组各 8 只)。高氧组置于有机玻璃氧仓中,持续输入氧气(2 L/min),连续行氧和 CO_2 浓度监测,保证氧浓度≥90%、CO_2 浓度≤5%。空气对照组置于同一室内空气中,两组环境温度控制在 21 ~ 25 ℃,湿度 60% ~ 70%。

1.2　标本收集

各组动物腹腔内注射 3.3% 水合氯醛麻醉后开胸,结扎右肺中叶,右心室头皮针插管并剪开左心耳,以无菌生理盐水进行肺循环灌注至双肺呈苍白色。整体取出心肺和气管,剥离肺,生理盐水漂洗干净,吸水纸拭干。剪出结扎的右肺中叶,4% 甲醛固定,24 h 后石蜡包埋,行肺组织 HE 染色形态学观察、细胞凋亡检测。剩余肺置于 -70 ℃冰箱保存待作 Western blot。

1.3　检测方法

1.3.1　TUNEL 检测肺组织的细胞凋亡　　TUNEL 分析试剂盒购自德国 Roche 公司。将甲醛固定的肺组织切片脱蜡、水化后,用蛋白酶 K 工作液(购自美国 Sigma 公司)室温下消化 20 min,随后滴加 TUNEL 反应混合液,于 37℃反应 1 h 后,滴加转化物 POD,37℃ 反应 30 min,用二甲基联苯胺(DAB)染色。苏木精复染,封片,拍照。细胞核棕黄色染色为阳性细胞。在 400 倍光镜下随机观察 5 个视野,计数每个视野的凋亡指数(阳性细胞数/总细胞数 ×100%)。

1.3.2　Western blot 检测肺组织 phospho-p38 蛋白质含量　　采用改良 RIPA 缓冲液常规提取各组织中蛋白质,BCA 比色法(BCA 蛋白定量检测试剂盒)测定所提取蛋白的浓度。各组蛋白取样 100 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜。以封闭缓冲液室温封闭 1 h, phospho-p38(1∶1 000,购自美国 Sigma 公司)4 ℃孵育过夜,二抗(1∶2 500)孵育 1 h,ECL 显色。用 Quantity One ChemiDocXRS 图像采集系统及分析软件(美国 Bio-Rad 公司)对蛋白条带进行分析处理,蛋白含量用目的条带校正容积(Adj volume)/GAPDH 校正容积(Adj volume)表示。

1.4　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,多样本均数比较用单因素方差分析,组间差别比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　肺组织病理学改变

空气对照组和高氧 1、2 d 的大鼠肺组织无明显异常;高氧 3 d 组肺组织呈淡红色,体积增大,表面有点状出血,切面有液体流出。光镜下高氧组在高氧吸入后 1、2 d 时与空气对照组无明显差别;高氧暴露 3 d 组可见小血管扩张、充血和肺泡内少量出血,可见中性粒细胞为主的渗出及肺泡上皮细胞肿胀。

2.2　TUNEL 检测结果

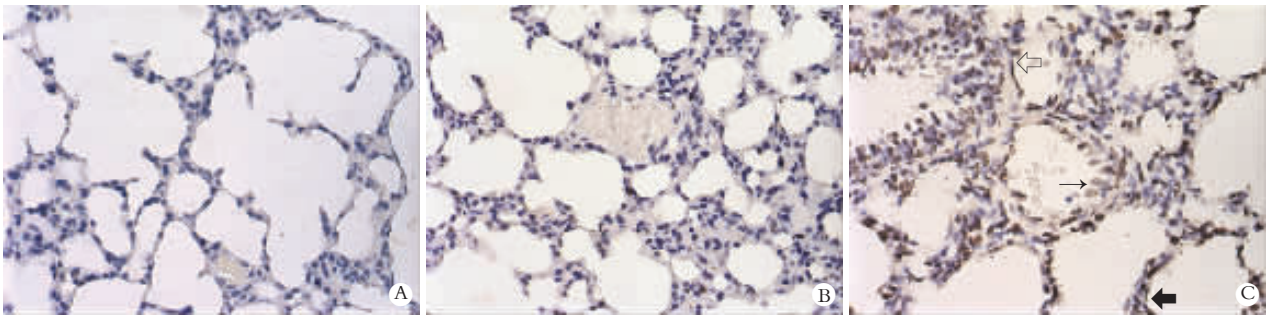
与空气对照组比较,高氧暴露 1、2 d 组肺凋亡指数无明显差异($P > 0.05$)。高氧暴露 3 d 后,支气管上皮、肺泡上皮及血管内皮细胞中 TUNEL 阳性细胞明显增加,肺凋亡指数和空气对照组相比较,差异有显著性($P < 0.05$)(表 1,图 1)。

表 1　各高氧组肺组织细胞凋亡指数及 p-p38MAPK 蛋白表达的变化 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡指数(%)	p-p38MAPK
空气对照组	8.94 ± 2.10	0.10 ± 0.04
高氧暴露 1 d 组	8.42 ± 1.23	0.21 ± 0.04[a]
高氧暴露 2 d 组	11.79 ± 3.60	0.59 ± 0.06[a]
高氧暴露 3 d 组	50.26 ± 6.70[a]	0.38 ± 0.05[a]

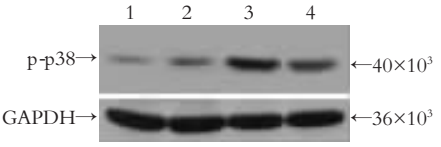
2.3　肺组织磷酸化 p38MAPK 蛋白含量变化

空气对照组可见浅淡的 p-p38MAPK 蛋白条带表达,高氧暴露 1 d, p-p38 蛋白表达即明显增强,和空气对照组相比较,差异有显著性($P < 0.05$)。高氧暴露 2 d 蛋白表达达高峰,高氧暴露 3 d 蛋白表达有所下降,但仍强于空气对照组(表 1,图 2)。



A:阴性对照组;B:空气对照组;C:高氧 3 d 组　⬆:肺泡上皮细胞;↑:血管内皮细胞;⇧:支气管上皮细胞

图 1　各组大鼠肺组织细胞凋亡观察　(TUNEL ×400)



1：空气对照组；2：高氧暴露1 d组；3：高氧暴露2 d组；4：高氧暴露3 d组

图2 各组大鼠肺组织p-p38MAPK蛋白的表达

3 讨论

高氧肺损伤是一个组织弥散性肺泡炎和损伤后修复重建的复杂过程，其肺损伤特征性改变是早期出现肺泡炎，后期出现肺间质增生和纤维化，最终导致呼吸功能的丧失。本实验应用封闭氧仓建立高氧肺损伤模型，从病理结果可以看出，高氧暴露3 d肺组织显示出水肿、充血、中性粒细胞浸润等炎症表现，符合高氧肺损伤急性期的病理学改变。

高氧暴露可导致体内活性氧（reactive oxygen species，ROS）堆积，堆积的ROS可对细胞蛋白质和DNA造成不可逆的氧毒性损伤。研究表明，高氧暴露后产生的ROS是细胞凋亡的重要媒介之一[2,3]。本研究结果表明，高氧3d组的肺凋亡指数较空气对照组明显增加，凋亡发生的主要部位为肺泡、支气管上皮及血管内皮细胞。这和McGrath-Morrow[4]及Husari等[5]的报道相一致，表明高氧可以诱导幼鼠肺组织的细胞凋亡。分析高氧暴露后出现的肺细胞凋亡可能是机体对高氧刺激的一种应激反应，主要用于清除增生过程中过多的肺上皮干细胞和过多的肺间质细胞，限制炎症反应[5]，使肺结构恢复正常。但过度的凋亡将不利于肺组织的重塑和炎症的清除，另外，还可能引起肺纤维化[6,7]。

p38 MAPK蛋白是丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）家族的一个重要成员。各种细胞外信号（活性氧、细菌内毒素脂多糖、紫外线、高渗、炎症介质等）均能激活p38MAPK通路。激活的p38MAPK由细胞质转移至细胞核内，通过调节效应基因的表达，介导细胞分化、存活、死亡、炎症反应等多种细胞生物学反应[8]。近年来的研究显示，p38 MAPK通路的活化参与了内毒素性肺损伤[9]、烧伤性肺损伤[10]、体外循环[11]等多种肺损伤的发生、发展调控。本实验结果显示，高氧暴露1d，肺组织的p38MAPK活性迅速升高，于第2天达到高峰，第3天活性有所下降，但仍高于基础值。表明高氧可以激活p38MAPK通路，参与高氧性肺损伤的调控。体外实验结果显示，p38MAPK通路参与了H_2O_2诱导的MLE-12肺上皮细胞[12]、肺血管内皮细胞[13]及大鼠原代ATⅡ细胞[14]凋亡的调控。本实验结果显示，高氧暴露1 d，肺组织的p38MAPK活性得以表达，同时TUNEL检查结果示高氧暴露3d肺凋亡指数才明显增加，结合体外研究我们推测，高氧暴露可以激活肺组织中p38MAPK信号通路，活化的p38MAPK可能参与了高氧诱导的肺组织细胞凋亡的调控。但其作用及机制有待进一步探讨。

参考文献：

[1] 富建华，薛辛东. 高氧致CLD早产鼠肺上皮细胞凋亡及相关基因表达的动态研究[J]. 中国医科大学学报，2005，34(2)：100－101，104.

[2] Castillo S S，Levy M，Thaikoottathil J V，*et al*. Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells[J]. Exp Cell Res，2007，313(12)：2680－2686.

[3] Kang Y H，Lee E，Choi M K，*et al*. Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha-tocopheryl succinate[J]. Int J Cancer，2004，112(3)：385－392.

[4] McGrath-Morrow S A，Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2001，25(2)：150－155.

[5] Husari A W，Dbaibo G S，Bitar H，*et al*. Apoptosis and the activity of ceramide，Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia[J]. Respir Res，2006，7：100.

[6] Uhal B D. Apoptosis in lung fibrosis and repair[J]. Chest，2002，122(6 Suppl)：293S－298S.

[7] Young L R，Pasula R，Gulleman P M，*et al*. Susceptibility of Hermansky-Pudlak mice to bleomycin-induced type II cell apoptosis and fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2007，37(1)：67－74.

[8] Zarubin T，Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. Cell Res，2005，15(1)：11－18.

[9] Kim H J，Lee H S，Chong Y H，*et al*. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages[J]. Toxicology，2006，225(1)：36－47.

[10] Ipaktchi K，Mattar A，Niederbichler A D，*et al*. Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury[J]. J Immunol，2006，177(11)：8065－8071.

[11] Dong X，Liu，Du M，*et al*. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates pulmonary inflammatory response in a rat cardiopulmonary bypass model[J]. Eur J Cardiothorac Surg，2006，30(1)：77－84.

[12] Romashko J，3rd.，Horowitz S，Franek W R，*et al*. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells[J]. Free Radic Biol Med，2003，35(8)：978－993.

[13] Machino T，Hashimoto S，Maruoka S，*et al*. Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells[J]. Crit Care Med，2003，31(12)：2776－2781.

[14] Carvalho H，Evelson P，Sigaud S，*et al*. Mitogen-activated protein kinases modulate H(2)O(2)-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells[J]. J Cell Biochem，2004，92(3)：502－513.

（编辑 王小寒）