文章编号:1000-5404(2009)09-0831-04

论著

SSeCKS 蛋白在新生大鼠高氧肺损伤中的表达

路 荣,李华强,史 源,周立奉 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所儿科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察新生大鼠高氧肺损伤模型肺组织中 Src 抑制的蛋白激酶 C 的底物(SSeCKS)的表达及细胞定位。**方法** 64 只新生大鼠按照随机数字表法分为空气对照组和高氧暴露组,分别建立动物模型,于 12、24、48、72 h 处死动物,进行肺组织的病理学检查及肺湿干质量比(W/D)检测,应用 Western blot 及免疫组化法检测各组各时相点肺组织中 SSeCKS 蛋白的表达,用间接免疫荧光双标法明确 SSeCKS 蛋白在肺组织中的定位。**结果** 病理 HE 染色:高氧暴露 24 h 肺泡内出现少量红细胞,肺泡壁增厚;48 h 肺泡内红细胞增多,肺间隔增宽,粒细胞附壁;72 h 出现肺出血,肺泡内可见大量的红细胞,肺泡间隔粒细胞浸润。Western blot 法检测 SSeCKS 蛋白:空气对照组可检测到极少量的 SSeCKS 的表达,高氧暴露 24 h 表达增加,72 h 达到最高,72 h 内随高氧暴露时间延长而增加;免疫组化定量分析与 Western blot 结果一致;间接免疫荧光双标法明确 SSeCKS 定位于毛细血管内皮细胞。**结论** 提示 SSeCKS 参与了新生大鼠高氧肺损伤的过程。

关键词: SSeCKS;肺损伤;高氧;新生大鼠;内皮细胞
中图法分类号: R-332; R341; R725.63 **文献标识码**: A

Expression of SSeCKS in hyperoxia-injured lung of new-born rats

LU Rong, LI Hua-qiang, SHI Yuan, ZHOU Li-feng (Department of Paediatrics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medica1 University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) in the neonatal rat lung after hyperoxia-induced injury. Methods Totally 64 rats at the age of 12 h were randomly and equally divided into 2 groups, control group (normal air condition) and hyperoxia-induced lung injury group (O_2 95% and CO_2 5%). Then the rats were executed at the time points of 12, 24, 48 and 72 h after hyperoxic exposure, and the right upper lung was resected for the examination of histopathology and immunohistochemistry, the right below lung for wet weight/dry weight ratio, and the left lung for detecting the expression of SSeCKS by Western blot analysis. The location of SSeCKS in the cells of lung tissue was tested by confocal scanning microscopy. Results At 24 h after the hyperoxic exposure, HE staining showed a few red blood cells in the alveoli and thickening alveolar wall. There were more red blood cells, distended alveolar septa and granulocyte infiltration in 48 h. Obvious acute inflammation, including hemorrhage, large amount of red blood cells, inflammatory cell infiltration into alveolar wall appeared at 72 h. In control group, SSeCKS was detected little. But in hyperoxia-induced lung injury group, the expression level of SSeCKS started to increase at 24 h, reached to the peak at 72 h and continued to increase with the elapse of time. SSeCKS was located in the capillary endothelial cells of alveolar septa. Conclusion SSeCKS is involved in the process of hyperoxia induced lung injury.

Key words: Src-suppressed C kinase substrate; lung injury; hyperoxia; newborn rats; endothelial cells

随着机械通气在儿科的广泛应用,高浓度氧造成的肺损伤逐渐引起人们的重视。在吸入高浓度氧时,早期引起急性肺损伤,包括炎性细胞浸润、肺出血和肺水肿。这些变化与肺组织毛细血管通透性的改变有关。已经证实,在肺损伤中,蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)作用于血管内皮细胞的细胞骨架可以调节毛细血管的通透性[1],但其具体机制尚不清楚。目前,PKC 在急性肺损伤中的作用已有较多研究,但是对于 PKC 的底物在急性肺损伤中所充当的角色有待进一步研究。Src 抑制的蛋白激酶 C 的底物(Src-

作者简介:路 荣,女,宁夏回族自治区银川市人,硕士,主治医师,主要从事新生儿高氧肺损伤方面的研究。E-mail:lrzlf@sohu.com
通信作者:李华强,E-mail: lihuaqiang15@163.com
收稿日期:2008-11-21;修回日期:2008-12-15

suppressed C kinase substrate, SSeCKS)是一种新近发现的相对分子质量为(280~290)×10^3的细胞支架蛋白,是PKC的结合底物,它位于PKC通路的下游区域并受其调控,同时也是一种脂多糖反应蛋白,其表达量与炎症的严重程度相关[2]。本研究通过检测新生大鼠高氧肺损伤模型肺组织中SSeCKS的表达及细胞定位,探讨其在高氧肺损伤过程中的作用,为防治高氧肺损伤提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

出生12 h内的清洁级SD大鼠64只(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),体质量6~8 g,雌雄不限。SSeCKS的绵羊多克隆抗体(Sigma公司),碱性磷酸酶标记的驴抗绵羊抗体(Sigma公司),FITC标记驴抗绵羊抗体(Sigma公司),CD31兔多克隆抗体(博士德公司),Cy5标记的山羊抗兔抗体(Jackson公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 新生的清洁级SD大鼠64只按照随机数字表法分为2组:空气对照组和高氧暴露组,每组32只。高氧暴露组置于常压高氧仓中(带新生大鼠母鼠),氧体积分数>0.95,二氧化碳体积分数<0.05;空气对照组置于同一室内,空气中氧体积分数为0.21。每间隔12 h测氧仪监测氧浓度,使其保持在0.95以上。高氧暴露组每天开仓1次,将母鼠置于空气中休息1 h,添加水和食物,更换垫料。两组温度均控制在21~25 ℃,湿度为60%~70%。

1.2.2 标本制备 取12、24、48、72 h 4个时相点的2组新生大鼠,每组8只。断头法处死,尽量放血后,仰卧位固定,剪开胸腔,暴露心脏和双肺,剔除心脏、气管等非肺组织,完整取出双肺,置于冷的生理盐水中反复漂洗。取右上肺置于4%的多聚甲醛固定24 h后石蜡包埋,右下肺滤纸拭干水分测肺湿干质量比值(W/D),左肺留取Western blot法检测SSeCKS的表达。

1.2.3 肺组织病理学检查 将包埋好的肺组织4 μm切片,常规HE染色,光镜下观察其病理变化。

1.2.4 肺组织湿干质量比值的测定 取右下肺,拭干水份,立即称质量,为湿质量(W),将肺组织置于80°烤箱,至48 h质量恒定后称取,为干质量(D)。计算肺湿干质量比值(W/D)反映肺水肿程度。

1.2.5 Western blot法检测SSeCKS的表达 各时相点处死新生大鼠取肺,提取蛋白质,应用组织蛋白裂解液裂解,15 000×g离心20 min取上清。蛋白质经6% SDS-PAGE,转移到PVDF膜上,PVDF膜用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗涤3次,SSeCKS绵羊多克隆抗体(1∶1 500)室温孵育1 h,4 ℃过夜,TBST洗涤3次,碱性磷酸酶标记的驴抗绵羊抗体室温孵育1 h,TBST洗涤3次,BCIP/NBT显色液显色,适时终止,光密度扫描。

1.2.6 免疫组化法检测肺组织中SSeCKS的表达 4 μm的石蜡切片,脱蜡水化,热抗原修复后,依次滴加二抗封闭血清,SSeCKS绵羊多克隆抗体(1∶400),碱性磷酸酶标记的驴抗绵羊抗体(1∶50),BCIP/NBT显色液显色,核固红复染,缓冲甘油封片。阴性对照一抗以PBS代替,以细胞质和细胞膜蓝染为阳性表达。

1.2.7 采用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件进行光密度分析 每组每个时相点取来源于不同新生大鼠的3张4 μm石蜡切片,抗原修复后依次滴加二抗封闭血清、SSeCKS绵羊多克隆抗体和碱性磷酸酶标记的驴抗绵羊抗体,BCIP/NBT显色液显色,不复染,封片。每张切片高倍镜下随机取8个视野,测定每个视野下阳性细胞的累计光密度(IOD)和有效面积(Area,用PPT软件检测为像素值),取IOD/Area值作为测量值,分析SSeCKS表达与高氧暴露时间的关系。

1.2.8 间接免疫荧光双标法检测SSeCKS在肺组织中的细胞定位 4 μm石蜡切片脱蜡水化,热修复抗原,依次滴加封闭血清、SSeCKS绵羊多克隆抗体(1∶100)和CD31兔多克隆抗体(1∶20)混合液、FITC标记驴抗绵羊抗体(1∶10)和Cy5标记的山羊抗兔抗体(1∶50),置于SP-2激光共聚焦显微镜下观察。

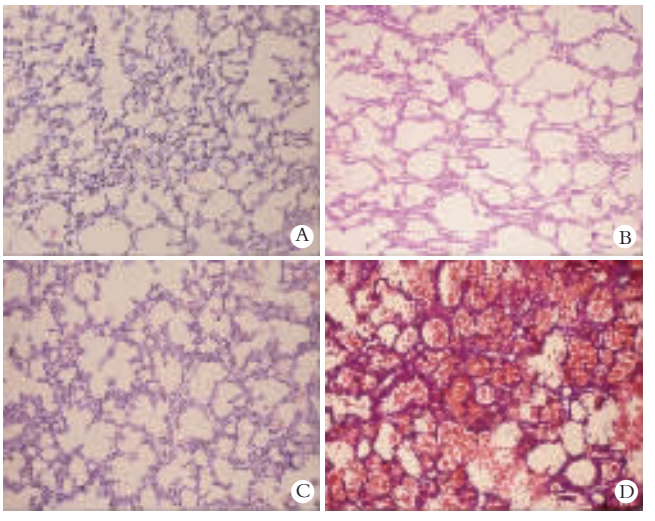
1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 肺组织病理学检查

空气对照组:肺泡结构完整,肺泡内未见红细胞,肺泡壁无肿胀;高氧暴露组:高氧暴露12 h未见明显改变(图1A);高氧暴露24 h肺泡出现少量红细胞,肺泡壁增厚肿胀(图1B);48 h肺间隔增宽,肺泡内红细胞增多,粒细胞附壁(图1C);72 h出现肺出血,肺泡间隔粒细胞浸润(图1D)。

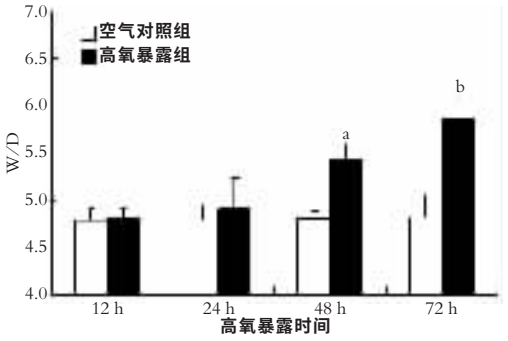


A:12 h; B:24 h; C:48 h; D:72 h

图1 高氧暴露各时相点肺组织病理变化 (HE×100)

2.2 肺组织湿干质量比(W/D)的检测

高氧暴露48 h W/D较空气对照组增加,差异有显著性($P<0.05$);高氧暴露72 h,W/D明显增加,差异非常显著($P<0.01$)。提示在高氧48 h肺组织出现了肺水肿,72 h肺水肿进一步加重。见图2。

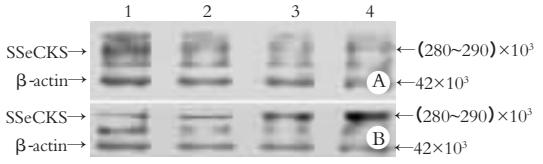


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与空气对照组比较

图 2　各时相点肺湿干质量比值(W/D)

2.3　Western blot 法检测 SSeCKS 蛋白的表达

SSeCKS 在空气对照组有极少量的表达(图 3A)，高氧暴露 24 h 表达较空气对照组增加，72 h 达到最高，在高氧暴露 72 h 内随高氧暴露时间延长而增加(图 3B)。



1：12 h；2：24 h；3：48 h；4：72 h

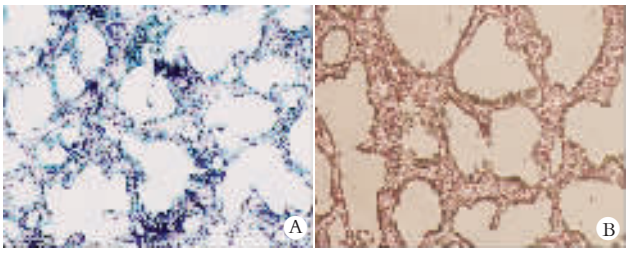
图 3　SSeCKS 在空气对照组(A)与高氧暴露组(B)中的表达

2.4　免疫组化法检测肺组织中 SSeCKS 蛋白的表达

通过间接免疫组化法，以碱性磷酸酶为示踪酶，通过 BCIP/NBT 显色，核固红复染，在空气对照中未发现 SSeCKS 蛋白的特异性着色，在高氧暴露 12 h 起，肺组织中 SSeCKS 蛋白出现表达，主要表达在肺泡间隔(图 4)。用 IPP 图像分析软件对高氧暴露各时相点的免疫组化结果进行分析，发现在高氧暴露 72 h 内，SSeCKS 蛋白表达随高氧暴露时间延长而增加(图 5)。

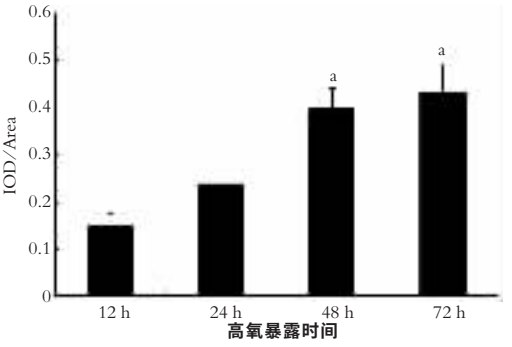
2.5　SSeCKS 与 CD31 的免疫荧光双标

在免疫组化实验中，我们发现 SSeCKS 蛋白在肺组织中主要表达在肺泡间隔，为了进一步明确 SSeCKS 在肺组织中的定位，我们选取了在 SSeCKS 表达最多的 72 h 高氧暴露组的石蜡切片，通过 SSeCKS 蛋白和毛细血管内皮细胞的标示物 CD31 的免疫荧光双标染色，在激光共聚焦显微镜下观察。发现 SSeCKS 与 CD31 共定位表达，说明 SSeCKS 蛋白在肺组织中主要定位在毛细血管内皮细胞。见图 6。



A：SSeCKS 蛋白的表达；B：阴性对照

图 4　免疫组化观察 SSeCKS 在肺组织中的定位　(×200)



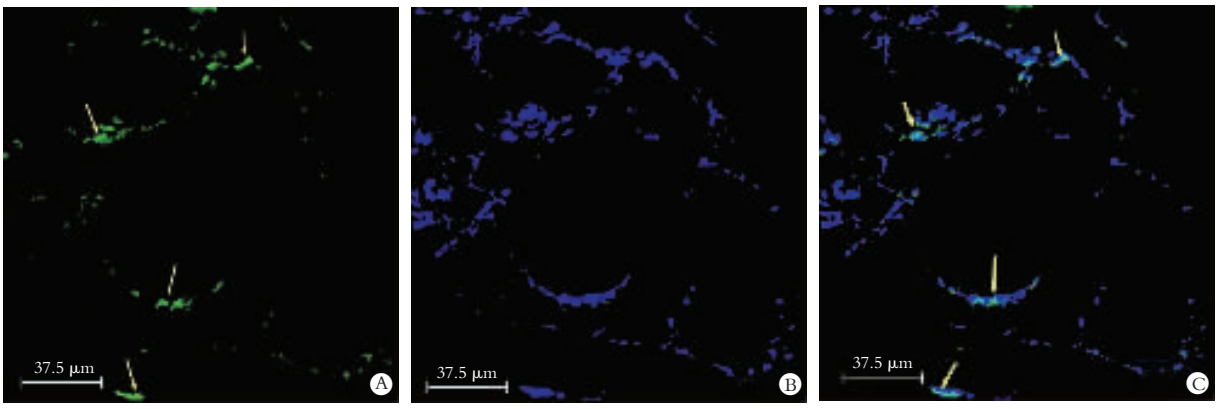
a：$P<0.01$，与 12 h 比较

图 5　高氧暴露对 SSeCKS 蛋白表达的影响

3　讨论

在本次实验中，我们通过病理学检查及肺组织湿干质量比的检测，发现高氧暴露 48 h 出现了急性炎症及肺水肿，72 h 有明显的肺出血，炎症水肿进一步加重，说明我们成功地建立了高浓度氧急性肺损伤模型。

采用 Western blot 法在空气对照组的肺组织中检测到了极少量的 SSeCKS 蛋白，但免疫组化法未发现空气对照组的肺组织中有 SSeCKS 蛋白的特异性着色，这可能是因为在正常的肺组织中，SSeCKS 蛋白的表达很微量，免疫组化法无法检测到，而 Western blot 法检测蛋白较灵敏所致。两种方法对高氧暴露组中各



A：FITC 标记的 SSeCKS；B：Cy5 标记的 CD31；C：SSeCKS 与 CD31 的共定位表达　　↑：SSeCKS 表达在毛细血管内皮细胞

图 6　激光共聚焦显微镜观察免疫荧光双标定位 SSeCKS 的表达

时相点 SSeCKS 蛋白相对表达量进行半定量分析,发现在高氧暴露 72 h 内,SSeCKS 蛋白的表达随高氧暴露时间延长而增加。提示在高浓度氧急性肺损伤中,SSeCKS 蛋白的表达与高氧暴露时间有关,与急性肺损伤的程度有关。

为了进一步研究 SSeCKS 蛋白在高浓度氧急性肺损伤中表达的意义,我们采用免疫组化法发现它在肺组织中主要表达在肺泡间隔,通过免疫荧光双标结合激光共聚焦显微镜技术观察到 SSeCKS 蛋白主要定位在毛细血管内皮细胞。肺组织中毛细血管内皮细胞是炎症反应和氧化应激主要的靶器官,它的形态改变和功能的紊乱可以导致一系列的病理反应:包括细胞皱缩、细胞间距增大从而使微血管通透性增高;炎症细胞在局部附着、聚集;释放炎症介质造成组织细胞损伤;分泌的抗凝物质减少,促凝物质增多导致微循环障碍、出血[3,4]等;同时它也是重要的内分泌和旁分泌细胞,分泌内皮素、血管生长因子等。

目前,人们对急性肺损伤中 PKC 的活化研究较多,最主要的是可以引起毛细血管内皮细胞细胞骨架重构,导致毛细血管通透性增加,但具体的机制尚不清楚。SSeCKS 蛋白是 PKC 的结合蛋白,有研究表明,在内毒素炎症损伤中,肝脏的内皮细胞和网状细胞中表达 SSeCKS 蛋白,并在细胞骨架调节有丝分裂,细胞分化和运动过程中起重要作用[5]。Gelman 等[6]报道,体外培养的成纤维细胞过表达异源性 SSeCKS 导致纤维肌动蛋白和纽蛋白相关的细胞粘着斑的暂时缺失和细胞层状伪足和足状伪足样突起。在本次实验中我们发现,随着高氧暴露时间的延长,SSeCKS 的表达增加,且在肺组织中主要定位在毛细血管内皮细胞,因此我们推测,在高氧肺损伤中 SSeCKS 蛋白的表达可能会影响毛细血管内皮细胞细胞骨架的重构,造成毛细血管内皮细胞形态发生变化,毛细血管通透性增加,这可能是高氧肺损伤的发病机制之一。SSeCKS 蛋白在毛细血管内皮细胞中的表达变化,这种变化是否会引起细胞骨架的改变及其中的具体机制,我们将进一步研究。

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)是近年来高氧肺损伤研究的热点。研究发现持续性高氧暴露可以降低 VEGF 蛋白和 mRNA 表达;患支气管肺发育不良的早产儿的肺组织中 VEGF 水平低,子宫内胎儿给予重组 VEGF 可以预防呼吸窘迫综合征的发生;在高氧肺损伤的研究中也发现,给予重组的 VEGF ,可以促进肺的发育,预防支气管肺发育不良的发生[7-9]。对 SSeCKS 近年来的研究表明,它调节血脑屏障的血管发生是通过抑制 VEGF 的表达实现的[10];SSeCKS 作为抑癌基因,抑制 VEGF 的表达也是抑制癌症转移的重要机制之一[11]。在高氧肺损伤中 SSeCKS 的表达的增加是否参与了 VEGF 表达降低的过程,有待进一步研究证实。

SSeCKS 作为一种支架蛋白、PKC 的结合蛋白,它在高氧肺损伤肺组织中表达增加,且有时间依赖性以及它在毛细血管内皮细胞的定位,提示在高氧肺损伤中,SSeCKS 的表达有着重要的意义。进一步研究它在高氧肺损伤中的具体作用机制,将为防治高氧肺损伤提供新的方向和思路。

参考文献:

[1] Sandoval R, Malik A B, Minshall R D, *et al*. Ca^{2+} signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions[J]. J Physiol, 2001, 533(Pt 2):433-445.

[2] Kitamura H, Okita K, Fujikura D, *et al*. Induction of Src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) in vascular endothelial cells by bacterial lipopolysaccharide[J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(2):245-255.

[3] 党 润,许 峰,匡凤梧,等. 高氧致肺损伤大鼠 TGF-β1 和 MMPs 基因表达的变化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4): 352-354,383.

[4] Fenster B E, Tsao P S, Rockson S G. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress[J]. Am Heart J, 2003, 146(2): 218-226.

[5] Rung-ruangkijkrai T, Fujikura D, Kitamura H, *et al*. The expression of src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) and uptake of exogenous particles in endothelial and reticular cells[J]. Arch Histol Cytol, 2004, 67(2):135-147.

[6] Gelman I H, Tombler E, Vargas J Jr. A role for SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumour suppressor activity, in cytoskeletal architecture, formation of migratory processes, and cell migration during embryogenesis[J]. Histochem J, 2000, 32(1):13-26.

[7] 刘 博,刘雪燕,李 娟,等. 持续高氧暴露降低新生大鼠肺组织血管内皮生长因子的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(5): 447-450.

[8] Asikainen T M, Ahmad A, Schneider B K, *et al*. Effect of preterm birth on hypoxia-inducible factors and vascular endothelial growth factor in primate lungs[J]. Pediatr Pulmonol, 2005, 40(6): 538-546.

[9] Kunig A M, Balasubramaniam V, Markham N E, *et al*. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(4):L529-L535.

[10] Lee S W, Kim W J, Choi Y K, *et al*. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier[J]. Nat Med, 2003, 9(7): 900-906.

[11] Su B, Zheng Q, Vaughan M M, *et al*. SSeCKS metastasis-suppressing activity in MatLyLu prostate cancer cells correlates with vascular endothelial growth factor inhibition[J]. Cancer Res, 2006, 66(11): 5599-5607.

(编辑 龙 亮)