论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0836-03

降钙素基因相关肽对高氧暴露胎鼠原代肺泡Ⅱ型细胞的保护作用及其Wnt信号机制

王少华,许 峰,党红星 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院PICU)

[摘要] **目的** 探讨降钙素基因相关肽(calcitonin generelated peptide, CGRP)是否可促进高氧损伤肺泡Ⅱ型上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cells, AECⅡ)的存活及其可能涉及的Wnt信号机制。**方法** SD胎鼠原代AECⅡ分为空气组、高氧组、高氧+CGRP组、高氧+CGRP+$hCGRP_{8-37}$组,采用MTT测定各组细胞增殖,流式细胞仪检测细胞死亡,Western blot检测Wnt7b、β-catenin及p-β-catenin表达。**结果** 与空气组对照比较,高氧暴露24 h后死亡细胞数显著升高($P<0.01$),细胞增殖活性明显受到抑制($P<0.01$),CGRP干预可明显下调高氧暴露后死亡细胞数($P<0.01$),减弱高氧对细胞增殖的抑制作用($P<0.01$)。高氧暴露后Wnt7b及β-catenin蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),p-β-catenin表达水平显著增加($P<0.01$),CGRP干预后,与单纯高氧暴露组相比Wnt7b、β-catenin蛋白表达水平增加,而p-β-catenin表达水平降低,具统计学差异($P<0.01$)。**结论** CGRP可减少高氧诱导的细胞死亡、减弱高氧对细胞增殖的抑制效应,改善AECⅡ存活,Wnt7b/β-catenin通路可能参与了CGRP这一调控过程。

[关键词] 降钙素基因相关肽;高氧;肺泡Ⅱ型细胞;肺损伤;Wnt信号
[中图法分类号] R322.35; R329.26; R341 [文献标志码] A

Calcitonin gene-related peptide protects premature rat primary type Ⅱ alveolar epithelial cells against damage induced by hyperoxia

Wang Shaohua, Xu Feng, Dang Hongxing (Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of calcitonin gene related peptide (CGRP) and Wnt on type Ⅱ alveolar epithelial cells (AECⅡ) upon the exposure of hyperoxia. **Methods** AECⅡ were isolated and purified from premature rats and exposed to air, hyperoxia, hyperoxia + CGRP (10^{-7} mol/L) and hyperoxia + CGRP + $hCGRP_{8-37}$ (10^{-6} mol/L) respectively. The proliferation of AECⅡ was measured by MTT cell proliferation assay. Cell apoptosis was measured by flow cytometry. The activation of Wnt7b, β-catenin and p-β-catenin was assessed by Western blot analysis. **Results** Cell proliferation was significantly decreased and apoptosis was increased upon the treatment of hyperoxia ($P<0.01$). Compared with hyperoxia exposure alone, additional CGRP treatment promoted cell proliferation and reduced the apoptosis of AECⅡ ($P<0.01$). Hyperoxia exposure resulted in significant decrease of Wnt7b and β-catenin ($P<0.01$) and increased expression of p-β-catenin ($P<0.01$), while CGRP treatment reversed above results significantly ($P<0.01$). **Conclusion** CGRP decreases cell death and attenuates the inhibited proliferation of hyperoxia exposure, and improves the survival of AECⅡ exposed to hyperoxia, which might be associated with the activation of Wnt7b/β-catenin.

[**Key words**] calcitonin gene-related peptide; hyperoxia; lung injury; type Ⅱ alveolar epithelial cells; Wnt signal pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973218). Corresponding author: Xu Feng, Tel: 86-23-63630685, E-mail: xufeng9899@yahoo.com.cn

新生儿危重症急救医学的发展使得早产儿存活率大大提高,但支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)仍然是影响极低体质量早产儿生活质量、威胁其生命的重要疾病,且目前尚无有效方法防治。BPD的重要病理特点是在肺发育不成熟基础上,长期供给高浓度氧(高氧)、机械通气等引发的肺部氧化应激性损伤及损伤后未成熟肺发育停滞、纤维组织替代异常修复[1-2]。肺泡Ⅱ型上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cells, AECⅡ)作为肺泡上皮的干细胞,高氧暴露后存活与否与高氧肺损伤的发生和受损肺泡上皮能否恢复正常的形态功能密切相关。寻找能够促进AECⅡ存活再生的调控因子可能为BPD的防治提供新的方法。降钙素基因相关肽(calcitonin generelat-

[基金项目] 国家自然科学基金(30973218)
[通信作者] 许 峰,电话:(023)63630685, E-mail:xufeng9899@yahoo.com.cn

ed peptide, CGRP)是神经肽家族中的成员之一,广泛存在于呼吸道感觉神经 C 纤维末端及神经内分泌细胞中,发挥细胞调控因子和细胞外信号分子的作用,与胚胎发育和细胞增殖分化有关,并参与了呼吸道自我修复的过程[3]。Wnt 信号通路作为一条高度保守的信号转导途径在多种发育相关性肺疾病的发生、发展中发挥重要作用,其作用效应涉及细胞凋亡、增殖、氧化应激等多个层面。CGRP 是否可以改善高氧损伤 AECⅡ的存活、促进其再生修复,CGRP 作用的下游信号机制是否涉及 Wnt 信号通路尚少见相关研究报道。本研究以早产大鼠原代 AECⅡ为对象,观察了高氧暴露及外源性 CGRP 干预后 AECⅡ死亡增殖的变化及其在此过程中 Wnt 信号通路的活化情况,旨在了解 CGRP 在高氧损伤 AECⅡ再生修复的作用及其信号机制,为 BPD 的防治提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级成年 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),MTT(美国 Sigma 公司),AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),兔抗鼠 Wnt7b 多克隆抗体、兔抗鼠 β-catenin 多克隆抗体、兔抗鼠磷酸化 β-catenin(p-β-catenin)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,兔抗鼠 β-actin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)CGRP,CGRP 抑制剂 $hCGRP_{8-37}$(美国 AnaSpec 公司)。

1.3 胎鼠 AECⅡ分离及原代培养

健康成年 SD 大鼠,按雌雄 1∶1 合笼交配,第 2 天查见阴栓计为孕第 1 天,将孕 20 d(足月 22 d)大鼠行剖宫产取出胎鼠,分离 AECⅡ,经改良巴氏染色及台盼蓝拒染法证实纯度及存活率均为 90% 以上,备用。

1.4 实验分组

原代 AECⅡ分离、接种于细胞培养板,DMEM/F12 10% FBS 培养生长至细胞 80% 左右融合后,分为 4 组,每组 6 个样本:空气对照组、高氧组、高氧 + CGRP 组、高氧 + CGRP + $hCGRP_{8-37}$组。空气组直接置于 37 ℃、5 ml/L CO_2 培养箱中培养,高氧 + CGRP 组和高氧 + CGRP + $hCGRP_{8-37}$组在高氧暴露前分别加入终浓度为 10^{-7} mol/L 的 CGRP 及 10^{-6} mol/L 的 $hCGRP_{8-37}$,与高氧组置于氧浓度 >90% 的密闭氧舱中(测氧仪监测氧浓度),入 37 ℃、5 ml/L CO_2 培养箱培养,24 h 后检测相关指标。

1.5 MTT 法检测 AECⅡ增殖率

将原代分离的 AECⅡ以 1×10^4/ml、100 μl/孔接种于 96 孔细胞培养板,DMEM/F12 10% FBS 培养生长至细胞 80% 左右融合后,随机进行上述实验分组,各组设 6 个复孔,于处理后 24 h 行 MTT 检测。加入 20 μl/孔 5 mg/ml MTT,继续培养 4 h,小心去除上清,加入 DMSO 150 μl/孔,振荡 10 min 紫色结晶完全溶解后,酶标仪检测 490 nm 波长处各孔光密度值[D(490)]。

1.6 Annexin V/PI 双标记法检测 AECⅡ死亡

AECⅡ以 1×10^5/ml 接种于 6 孔板,细胞生长至 80% 融合时进行高氧干预,24 h 后 0.25% 胰酶消化收集各组细胞,Annexin V-FITC/PI 双标记法进行流式细胞仪检测,具体操作严格按试剂盒说明书进行。计算早期凋亡细胞、晚期凋亡及坏死细胞的总和作为死亡细胞数。

1.7 Western blot 检测 Wnt、β-catenin、p-β-catenin 蛋白表达

裂解细胞提取细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白。上样 50 μg 总蛋白,10% SDS-PAGE,半干式电转将蛋白质转移至 PVDF 膜,含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST(0.01 mol/L Tris-HCl, pH = 7.5; 0.9% NaCl; 0.05% Tween 20)室温封闭 1 h,分别加入兔抗鼠 Wnt7b 多克隆抗体、兔抗鼠 p-β-catenin,兔抗鼠 β-actin 多克隆抗体,4 ℃过夜。TBST 漂洗 3 次,HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 2 h。TBST 漂洗 3 次,ECL 化学发光显色系统显色,Chemi-DocXRS 图像采集系统采集图像,Quantity One 4.5.0 软件分析。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,各组间比较采用单因素方差分析,组间差别比较采用最小显著差 t 检验(least-significant difference, LSD)。

2 结果

2.1 CGRP 干预对高氧暴露 AECⅡ存活的影响

与空气对照组比较,高氧暴露后 24 h,死亡细胞数显著升高($P<0.01$,表 1),细胞增殖活性明显受到抑制($P<0.01$,表 2),10^{-7}mol/L CGRP 干预可明显下调高氧暴露后死亡细胞数($P<0.01$),减弱高氧对细胞增殖的抑制作用($P<0.01$,表 1)。

表 1 高氧及 CGRP 对原代 AECⅡ存活的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	早晚期凋亡及坏死(%)	D(490)值
空气对照组	2.82 ± 0.29	0.956 ± 0.036
高氧组	15.74 ± 0.38[a]	0.759 ± 0.009[a]
高氧 + CGRP 组	10.90 ± 1.43[ab]	0.835 ± 0.034[ab]
高氧 + CGRP + $hCGRP_{8-37}$组	15.40 ± 1.25[a]	0.789 ± 0.005[a]

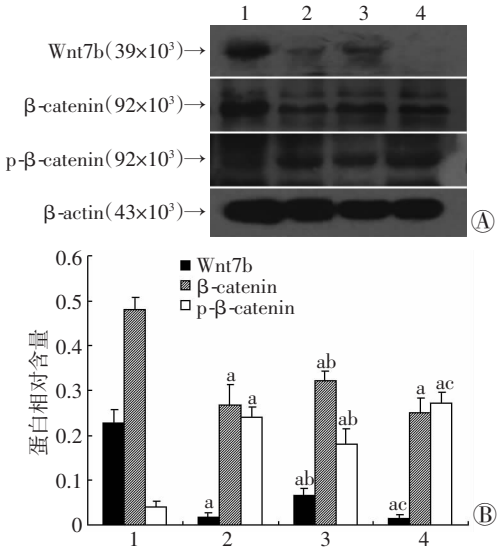
a: $P<0.01$,与空气对照组比较; b: $P<0.01$,与高氧组比较

2.2 高氧及 CGRP 干预对细胞内 Wnt/β-catenin 活化的影响

与空气对照组比较,高氧暴露组 Wnt7b 蛋白及 β-catenin 总蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),p-β-catenin 表达水平显著增加($P<0.01$),CGRP 干预后,与单纯高氧暴露组相比 Wnt7b、β-catenin 蛋白表达水平增加,而 p-β-catenin 表达水平降低,差异具有统计学差异($P<0.01$,图 1)。

3 讨论

高氧机械通气是抢救危重早产儿的常用措施,但长时间高氧暴露可诱导肺泡上皮细胞死亡过多,同时细胞增殖再生受到抑制,未成熟肺的正常发育受阻,受损肺泡壁不能完全再生修复而由纤维组织增生替代[4-6]从而导致肺组织氧化应激性损伤,发生慢性肺



1:空气对照组;2:高氧组;3:高氧+CGRP组;4:高氧+CGRP+$hCGRP_{8-37}$组;A:Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与空气对照组比较;b:$P<0.01$,与高氧组比较;c:$P<0.01$,与高氧+CGRP组比较

图1 高氧暴露及CGRP干预后Wnt7b/β-catenin通路信号分子的蛋白表达

疾病。AECⅡ作为肺泡上皮的干细胞,通过增殖、迁移并转化为AECⅠ以保证肺泡壁正常上皮化及肺结构的完整[7]。高氧等氧化性刺激诱导AECⅡ发生氧化应激性损伤、死亡,抑制AECⅡ增殖,使得细胞存活减少是高氧肺损伤的关键事件[8]。因此探讨促进AECⅡ存活再生的机制对BPD的防治尤为必要。

CGRP是一种由37个氨基酸残基组成的感觉神经肽,具有抗氧化损伤的作用。肺部的CGRP主要由感觉神经末梢和神经内分泌细胞释放,含量丰富,AECⅡ细胞膜上有CGRP特异性受体及结合位点,提示AECⅡ是CGRP靶细胞之一[9-11]。本实验采用外源性CGRP干预的方法,发现CGRP可促进高氧暴露的SD胎鼠原代AECⅡ增殖,减少高氧诱导的AECⅡ的死亡,改善高氧暴露后AECⅡ存活。由此推测,CGRP可通过影响细胞的增殖及死亡来调控AECⅡ的自我更新,可能对高氧损伤的AECⅡ具有保护作用。

为进一步了解CGRP保护作用涉及的具体分子机制,本研究对高氧及CGRP干预下Wnt信号通路的活化情况进行了初步观察。Wnt信号通路在胚胎发育中具有指导细胞的命运的作用,近来研究发现Wnt通路各成员可通过旁分泌及自分泌方式调节肺上皮和肺间质的发育,与肺细胞分化及结局、肺形态发育密切相关[12]。经典Wnt信号通路中Wnt1、Wnt3、Wnt7b、Wnt8等信号分子与其跨膜受体Frizzled蛋白结合,抑制糖原合成酶3β活性使β-catenin无法磷酸化从而避免被降解,β-catenin在细胞内积累并进入细胞核内与T细胞因子/淋巴细胞增强因子结合,启动抗凋亡基因survivin、增殖基因c-myc等靶基因的转录。本研究显示,高氧暴露后β-catenin总蛋白表达减弱,而p-β-catenin表达增加,提示高氧可促进β-catenin的降解,使得细胞内β-catenin水平降低,同时Wnt7b表达也下降,Wnt7b/β-catenin通路活化受到抑制。而高氧暴露前予CGRP干预后,Wnt7b及β-catenin表达均有所增强,p-β-catenin表达降低,表明CGRP可改善高氧对Wnt7b/β-catenin通路活化的抑制作用,从而促进高氧损伤AECⅡ的存活。

综上所述,CGRP可能为高氧肺损伤后肺上皮再生的调控因子,通过Wnt7b/β-catenin通路的介导,减轻高氧对AECⅡ增殖的抑制作用,减少细胞高氧性损伤及死亡,改善AECⅡ存活,有利于肺损伤后结构及功能的再生,为BPD的防治提供了新的方向。

参考文献:

[1] Hernandez-Ronquillo L, Tellez-Zenteno J F, Weder-Cisneros N, *et al*. Risk factors for the development of bronchopulmonary dysplasia: a case-control study[J]. Arch Med Res, 2004, 35(6): 549-553.

[2] Konigshoff M, Eickelberg O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 42(1): 21-31.

[3] Dakhama A, Larsen G L, Gelfand E W. Calcitonin gene-related peptide: role in airway homeostasis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(3): 215-220.

[4] Ao X, Fang F, Xu F. Vasoactive intestinal peptide protects alveolar epithelial cells against hyperoxia *via* promoting the activation of STAT3 [J]. Regul Pept, 2011, 168(1/3): 1-4.

[5] Huang B, Fu H, Yang M, *et al*. Neuropeptide substance P attenuates hyperoxia-induced oxidative stress injury in type Ⅱ alveolar epithelial cells *via* suppressing the activation of JNK pathway[J]. Lung, 2009, 187(6): 421-426.

[6] 李永旺, 麻莉, 张德明, 等. TLR4及MD2反义基因对内毒素诱导的肺泡Ⅱ型细胞活化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1271-1274.

[7] Gore A, Muralidhar M, Espey M G, *et al*. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease[J]. J Immunotoxicol, 2010, 7(4): 239-254.

[8] 蒋静, 许峰, 陈娟, 等. 氧化应激状态下肺泡Ⅱ型上皮细胞修复存活、凋亡及调控因子Bcl-2/p53的变化[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(1): 74-75.

[9] Li Y, Wang J, He H Y, *et al*. Immunohistochemical demonstration of airway epithelial cell markers of guinea pig[J]. Tissue Cell, 2011, 43(5): 283-290.

[10] 周燕, 张纲, 卓贤露, 等. 降钙素基因相关肽对兔成骨细胞增殖和TGF-β1表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 412-414.

[11] 蔡宇红, 孙国成, 毛云英, 等. 先天性心脏病肺动脉高压患儿血浆ET-1、CGRP、TXA2及肺组织中其受体的变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 253-256.

[12] Weng T, Liu L. The role of pleiotrophin and beta-catenin in fetal lung development[J]. Respir Res, 2010, 11: 80.

(**收稿**:2011-12-31;**修回**:2012-02-24)

(编辑 吴培红)