基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000798

棉鼠 SP-D 基因的克隆及其在 LPS 诱导肺损伤模型中的表达分析

冯　怡，任　洛，黄道超，李娅莎，钟海英，赵　丽

（重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆　400014）

【摘　要】目的：初步探讨棉鼠肺表面活性蛋白 D（surfactant-associated protein D，SP-D）核苷酸和氨基酸序列与其他物种间的同源性和交叉反应性，观察 SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白在棉鼠肺损伤模型中的表达规律，为探究呼吸道疾病发病机制提供科学的实验依据。**方法**：SPF 级棉鼠 32 只随机分为生理盐水对照组和脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）实验组（实验组再按给药后 24、48 和 96 h 分为 3 个亚组，每组 8 只）。实验组采用腹腔注射给予 2 mg/kg 的脂多糖，对照组给予相当剂量的生理盐水。提取棉鼠肺总 RNA，经 RT-PCR 扩增 SP-D 基因并克隆测序，采用生物信息学软件对测序结果进行同源性和系统进化分析；HE 染色观察各组棉鼠肺组织病理学变化；real-time PCR 检测 SP-D mRNA 水平；Western blot 检测 SP-D 蛋白表达。**结果**：棉鼠 SP-D 基因开放阅读框含 1 113 bp，编码 370 个氨基酸，与部分已知其他物种 SP-D 核苷酸和氨基酸序列同源性分别在 75.64%~90.01% 和 72.68%~88.56%之间；在 SP-D 基因构建的系统进化树上，棉鼠与其他啮齿类动物形成一个独特的分支；与对照组相比，实验组肺组织病理特征性变化随 LPS 刺激时间延长而加剧；SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白表达水平随 LPS 处理时间的延长而逐渐增加，在 LPS 处理 24 h 后，SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白表达开始明显增加并出现统计学差异（$P<0.05$），48 h 时后 SP-D mRNA水平和 SP-D 蛋白表达水平均增加到峰值，96 h 后两者仍保持较高水平，与对照组相比有统计学差异（$P<0.01$）。**结论**：棉鼠 SP-D 核苷酸和氨基酸序列与其他物种间具有较高同源性，且棉鼠和其他物种 SP-D 蛋白间存在交叉反应性；棉鼠SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白表达水平在肺损伤模型中均存在时间依赖性，可作为判断肺损伤疾病不同发展阶段的生物标记。

【关键词】棉鼠；肺表面活性蛋白 D；克隆；表达；脂多糖

【中图分类号】R563.9　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-05-05

Cloning and expression analysis of surfactant-associated protein D in cotton rat with lung injury induced by lipopolysaccharide

Feng Yi, Ren Luo, Huang Daochao, Li Yasha, Zhong Haiying, Zhao Li

(*Department of Pediatric Research Institute, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the homology and cross-reactivity of nucleotide and amino acid sequences of cotton rat surfactant-associated protein D (SP-D), and to observe the mRNA level and protein expression pattern of SP-D in cotton rat with lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS). ***Methods***: Thirty-two cotton rats were randomly divided into normal saline control group and experiment group (also named LPS group; LPS group was subdivided into three subgroups at 24, 48 and 96 h after LPS injection; 8 cotton rats in each subgroup). Rats in experiment groups were injected with 2 mg/kg LPS while those in control group were given the same amount of normal saline. Total RNA was extracted from lung tissue of cotton rat, SP-D gene was cloned and sequenced after RT-PCR, and then the homology and phyletic evolution were analyzed by bioinformatics software. Histopathological changes were observed after HE-staining; the mRNA level of SP-D was measured by qRT-PCR; the protein level of SP-D was determined by Western blot. ***Results***: Cotton rat SP-D was obtained with the size of 1 113 bp encoded 370 amino acids. The SP-D homologies of cotton rat and other animals were shown at 75.64%-90.01% in nu-

作者介绍：冯　怡，Email：carlasday@163.com，研究方向：儿童发育疾病研究。

通信作者：赵　丽，Email：lilily_333@sina.com。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151022.2106.028.html（2015-10-22）

cleotide sequences and at 72.68%–88.56% in deduced amino acid sequences. In the phylogenetic analysis, cotton rat and other rodents fell into one of the distinct groups. Histopathological changes in experiment group became more obvious and severe as of the time of LPS injection prolonged. The mRNA and protein levels of SP-D in cotton rat were increased after LPS injection. At the first 24 h, SP-D mRNA and protein levels were up-regulated with significant differences ($P<0.05$), and reached the peak at the 48 h, then decreased a little at the 96 h, but still kept a high level with extreme significant differences ($P<0.01$). ***Conclusion***: Cotton rat SP-D shares high level of identity to other species both at nucleotide and amino acid levels, and they show cross-reactivity at protein level. Changes of mRNA and protein expression of SP-D in cotton rat with lung injury are time-dependent. SP-D has close relation with the severity of lung injury and it could be regarded as a valuable biomarker in lung injury.

【Key words】cotton rat; surfactant-associated protein D; cloning; expression; lipopolysaccharide

肺表面活性蛋白 D（surfactant-associated protein D，SP-D）是由肺泡Ⅱ型上皮细胞和细支气管上Clara细胞分泌的一种水溶性肺泡表面活性物质。它对维持肺泡正常张力和促进气体交换起着重要作用[1-2]。它在发挥初始免疫应答，介导先天性免疫防御以及清除凋亡细胞等方面的作用均已得到证实[3-4]。目前的研究表明，SP-D 参与多种呼吸道疾病的发生和发展，其表达水平与某些呼吸道疾病直接或间接相关，可作为多种呼吸道疾病的生物标记之一[5]。

棉鼠是一种啮齿类实验动物，主要分布于美国南部、中美洲北部以及墨西哥等区域[6-7]。1972 年由瑞士引入我国上海，目前已分布于浙江、福建、广西、云南、山东、新疆等地。棉鼠具有对多种人类病原体（包括病毒、细菌和寄生虫）易感的生物学特性，其中尤其对呼吸道病毒（合胞病毒、偏肺病毒和流感病毒等）的易感性远超其他模式动物[8]。作为研究人类呼吸道疾病的理想模型，棉鼠 SP-D 基因却未见国内外报道，且 SP-D 在脂多糖诱导棉鼠肺损伤模型中的表达情况尚需探究。为此，本研究旨在探讨棉鼠 SP-D 基因编码的蛋白是否和其他物种间存在高度同源性和交叉反应性，以及 SP-D 蛋白在肺损伤棉鼠模型肺部表达规律，为研究呼吸道疾病发病机制和寻求有效的治疗途径提供科研数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级棉鼠种源系委托北京维通利华实验动物技术有限公司从美国 Charles River Laboratories 购买，饲养在重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心（使用许可证号：SYXK［渝］2012-0015）。棉鼠均按近交系繁育方式进行生产，即采取同胞兄妹间合笼繁育，其所得子代用于本实验研究。

1.2 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂盒（BioTeke）；RT-PCR 试剂盒（Thermo Scientific）；胶回收纯化试剂盒（TaKaRa）；qRT-PCR 试剂盒（KAPA Biosystems）；脂多糖（Sigma）；SP-D 兔多克隆抗体 ab97849（ABCAM）；β-actin 小鼠单抗 AC-15（Sigma）；山羊抗兔荧光二抗 C680（Lincoln）；山羊抗鼠荧光二抗 C800（Lincoln）；核酸浓度测定仪 NanoDrop 2000（Thermo Scientific）；qRT-PCR 仪（BioRad），凝胶成像系统（Bio-Rad）；组织切片机（Leica）；显微成像系统（Nikon）；远红外荧光成像系统（Odenssey）。

1.3 动物分组及处理

SPF 级棉鼠 32 只，4 周龄，体质量 30~40 g，随机分为生理盐水对照组（control 组）和脂多糖实验组（LPS 组），实验组再按给药后 24、48、96 h 分为 3 个亚组，每组 8 只，采用腹腔注射的方法给药，LPS 组给予 2 mg/kg 剂量的脂多糖溶液，control 组给予相当剂量的生理盐水。在 LPS 处理后的各时间点，采用 5 ml/kg 体重的剂量腹腔注射 10%水合氯醛麻醉处死，取左侧部分肺组织并保存于-80 ℃冰箱待检，取右侧部分肺组织固定于 4%多聚甲醛溶液中。

1.4 总 RNA 提取及 SP-D 基因的 RT-PCR 扩增

参照 BioTeke 总 RNA 提取试剂盒使用说明书，提取肺组织总 RNA，在核酸浓度测定仪 NanoDrop 2000 上测定其浓度，分装后-80 ℃保存备用。根据 GenBank 中已报道的各种哺乳动物 SP-D 基因 cDNA 序列的高度保守区，利用软件 Primer 5.0 设计引物：F：5'-AAGGGTGATCCAGGTTTGC-3'；R：5'-GGTGAAGATCTCCACACAGTTC-3'，然后以 1 μg 总 RNA 为模板，OligodT 为反转录引物，参照 Thermo 公司 RT-PCR 试剂盒使用说明书进行反转录合成 cDNA，再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 45 s，55 ℃退火 60 s，72 ℃延伸 70 s，循环扩增 35次，最后 72 ℃延伸 10 min。扩增结束后取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 SP-D 基因的克隆与序列分析

参照 TaKaRa 公司胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收，回收所得 cDNA 片段与 pGEM-T Easy 载体连接后，转化JM109

感受态细菌，经含有氨苄青霉素的平板筛选阳性克隆，挑取阳性克隆菌扩大培养并提取质粒，用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切对其进行鉴定，对鉴定为阳性的质粒送公司测序。将所得测序结果，采用 BLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）搜索功能与 GenBank 中相近物种的核苷酸和氨基酸序列进行比对。利用在线软件 SignalP version 4.1（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽的预测；利用 Compute pI/Mw Tool（http://web.expasy.org/compute_pi/）进行蛋白分子量预测；利用 GOR4（http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html）和 NetNGlyc version 1.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）对氨基酸序列 α 螺旋和糖基化位点进行预测，利用 ClustalX1.83 和 MEGA6 软件将棉鼠 SP-D 氨基酸序列与从 GenBank 中获取的其它物种的序列进行多序列联配，构建进化树。

1.6 肺组织病理学观察

LPS 分别处理 24、48、96 h 后，安乐处死棉鼠，取 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 肺组织，用 4%多聚甲醛固定，然后经常规方法脱水，石蜡包埋，切片，HE 染色后观察比较各组棉鼠肺组织病理学变化。

1.7 Real-time PCR 检测 SP-D mRNA 水平

将 1 μg 肺组织总 RNA 逆转录成 cDNA，并将其浓度稀释为 50 ng/μl。应用荧光染料 SYBR Green qRT-PCR 试剂盒进行 SP-D 相对定量，SP-D 正向引物为：5'-CTGCTGCTGAGAATACTGCC-3'，反向引物为：5'-CTGCTCCACCATTGTTGTTG-3'；内参 β-actin 正向引物为：5'-CCGTCTTCCCCTCCATCGT-3'，反向引物为：5'-GCCTCGTCGCCCACATAG-3'。real-time PCR 反应体系为：cDNA 模板 2 μl，2 × Master Mix 10 μl，正向及反向引物（10 μmol/L）各 0.5 μl，双蒸水 7 μl；qRT-PCR 反应条件为：95 ℃、3 min，1 个循环；热循环 95 ℃、30 s，59 ℃、30 s，72 ℃、30 s，45 个循环。每个样品做 3 个平行反应孔，最后结果采用 2-Ct 法（Ct=Ct SP-D-Ctβ-actin）进行定量分析。

1.8 Western blot 检测 SP-D 蛋白表达

取肺组织提取蛋白，取总蛋白量相同的样品，在 16% SDS-PAGE Tris- N-三（羟甲基）甲基甘氨酸中电泳分离蛋白，然后将蛋白转移在硝酸纤维素膜上，将膜于 5%脱脂奶粉中封闭 1 h，吐温磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution + Tween20，PBST）洗 3 次，每次 5 min；在 ab97849 抗体（该抗体为 ABCAM 公司参照人 SP-D[GenBank 序列号：NP_003010] 第 107-156 位氨基酸制备的兔源抗体，抗原氨基酸序列为：PPGPPGVPGP AGREGPLGKQ GNIGPQGKPG PKGEAGPKGE VGAPGMQGSA）和 AC-15 抗体中 4 ℃孵育过夜，PBST 洗 3 次，每次 5 min；室温下孵育二抗 60 min，PBST 洗 3 次，每次 5 min。应用双色荧光成像系统成像，采用图像分析系统进行蛋白表达的半定量分析，β-actin 作为内参校正 SP-D 蛋白的相对表达水平。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据的统计学分析，所有实验数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Turkey 检验，检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结 果

2.1 棉鼠 SP-D 基因的序列鉴定

测序结果表明扩增所得片断大小为 1 113 bp，与预期大小相符。利用 BLAST 对获得的序列进行核苷酸和氨基酸分析，结果无论在核苷酸水平还是在氨基酸水平，所得序列与 GenBank 中其他物种的 SP-D 之间均存在较高的同源性（表 1），确定克隆序列为棉鼠 SP-D 基因的 cDNA 序列，该序列已登录于 GenBank（登录序列号为：KJ586799）。

2.2 棉鼠 SP-D 基因的序列分析

利用在线软件 SignalP version 4.1、Compute pI/Mw Tool、GOR4 和 NetNGlyc version 1.0 对序列进行相关生物信息学分析，结果棉鼠 SP-D 基因的开放阅读框含有 1 113 个核苷酸，编码 370 个氨基酸，其中前 19 个氨基酸组成信号肽，成熟肽含 351 个氨基酸残基，预测蛋白分子量为 37.4 kD。同时预测 SP-D 蛋白在 91~94 位氨基酸含 1 个 N-糖基化位点，

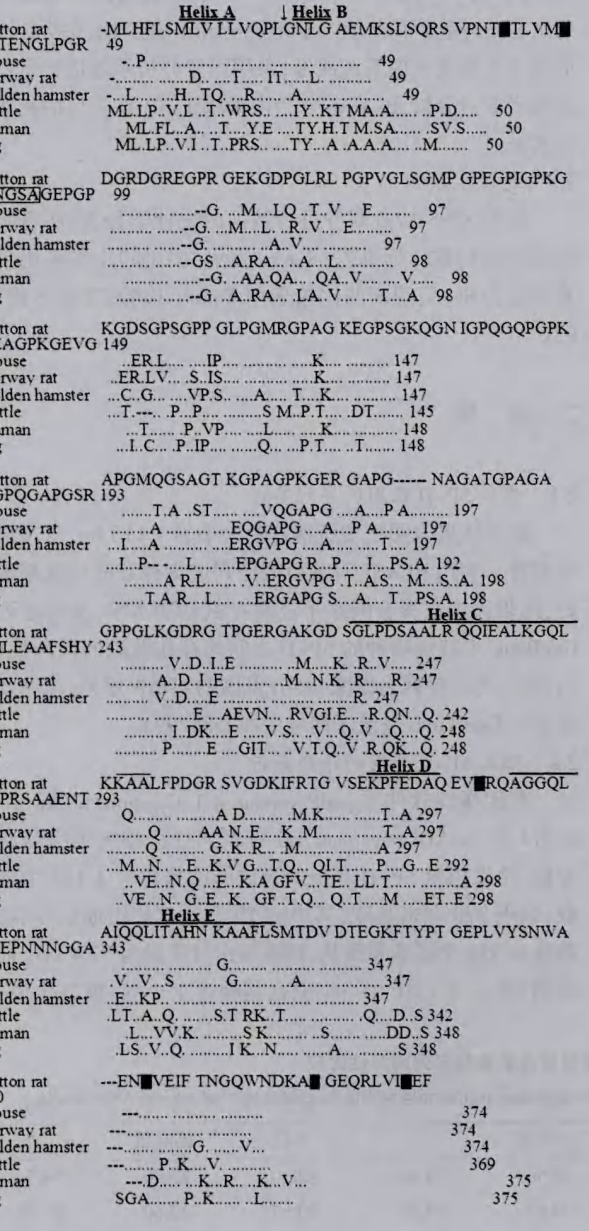
表 1 棉鼠与其他动物 SP-D 基因核苷酸及氨基酸序列同源性比较

Tab.1 Homology comparison of SP-D from cotton rat with other reported mammals at the nucleotide and amino acid levels

GenBank 编号	物种	棉鼠	猫	牛	金仓鼠	人	小鼠	挪威鼠	猪
KJ586799	棉鼠	-	73.74	72.68	88.56	74.80	88.30	85.90	74.74
XM_003994112	猫	78.48	-	75.73	74.67	77.87	73.87	73.60	81.75
NM_181026	牛	75.64	82.00	-	72.00	73.07	70.93	70.13	80.16
XM_005080973	金仓鼠	89.21	79.43	76.42	-	77.33	86.63	85.83	74.60
NM_003019	人	79.72	83.33	80.14	80.05	-	74.67	74.93	77.25
NM_009160	小鼠	90.01	78.46	75.73	88.18	79.79	-	91.98	74.60
NM_012878	挪威鼠	88.51	78.37	75.98	87.02	78.46	92.18	-	73.81
NM_214110	猪	78.92	87.86	85.14	79.60	83.38	78.89	78.89	-

注：对角线上部和下部分别为 SP-D 的氨基酸和核苷酸的百分比；各动物 SP-D 核苷酸序列号已列出，其氨基酸序列号请见图 2

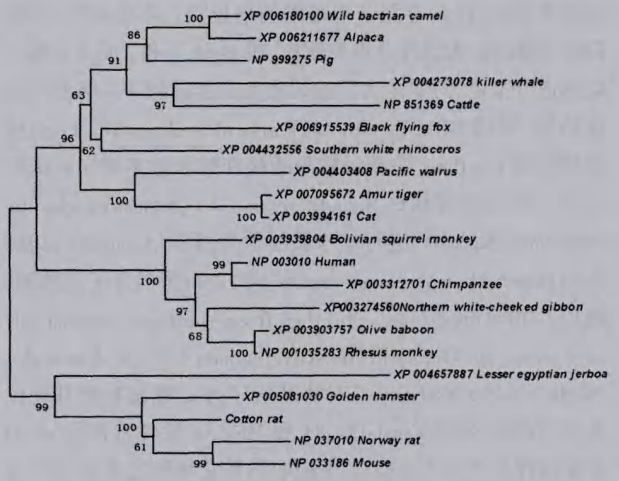
在 34、39、276、346、360 和 368 位点含 6 个保守的半胱氨酸位点，此外 SP-D 蛋白在 7~12、20~25、219~247、271~278 和 286~311 位点形成了 5 个 α 螺旋的二级结构（图 1）。利用 ClustalX1.83 和 MEGA6 软件将棉鼠 SP-D 氨基酸序列与 GenBank 中获取的其它物种的序列进行多序列联配，构建进化树。结果表明，在所比较的物种中，棉鼠与啮齿类动物金仓鼠亲缘关系最近（图 2）。



注：与棉鼠序列一致的氨基酸用点号表示；缺失的氨基酸位点用破折号表示；半胱氨酸位点被灰色标亮；α 螺旋位点用横线标示；信号肽切割位点用箭头标示；糖基化位点用方框标示。

图 1 棉鼠与其他动物 SP-D 氨基酸序列的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of SP-D amino acid sequence between cotton rat and other animals



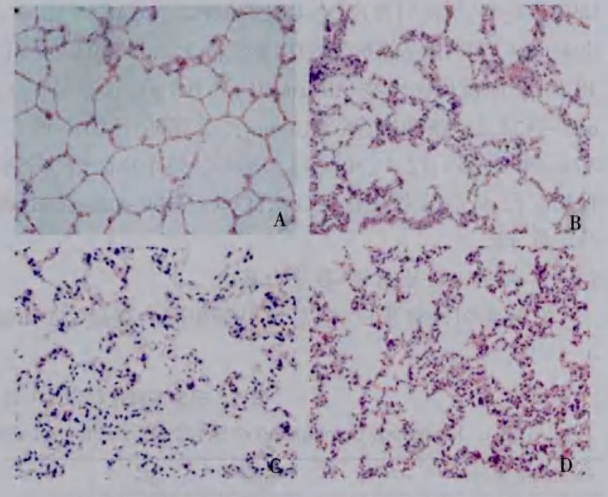
注：各动物对应的 SP-D 氨基酸 GenBank 序列号已列出，AIA98493 是棉鼠的氨基酸序列号

图 2 棉鼠和其他物种 SP-D 基因的系统进化树

Fig.2 Un-rooted phylogenetic tree of SP-D gene in cotton rat and other species

2.3 肺组织病理学变化

将实验组与对照组棉鼠肺组织进行 HE 染色后观察其病理变化，对照组无明显病理改变。实验组在给予 LPS 处理 24、48、96 h 后均出现程度不同的病理变化，主要表现为肺泡壁增厚，肺泡腔变窄，炎性细胞浸润，且随着 LPS 刺激时间的增加，肺部病理变化加重。见图 3。



A：对照组；B、C、D：分别为 LPS 处理 24、48 和 96 h 后的 3 个实验亚组

图 3 各组棉鼠肺组织病理学变化（HE，200×）

Fig.3 Pathological changes of lung tissues of cotton rats in various groups（HE，200×）

2.4 LPS 对 SP-D mRNA 水平的影响

应用 qRT-PCR 方法检测 LPS 对 SP-D mRNA 水平影响的结果显示（表 2，图 4），在 LPS 处理 24 h 后 SP-D mRNA 水

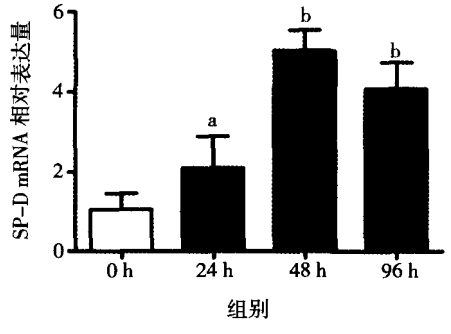
平增加，48 h 时 SP-D mRNA 水平上升到峰值，96 h 后 SP-D mRNA 水平有所降低，但仍高于 0 h 和 24 h 时的 mRNA水平，与对照组比较，有统计学差异。

表 2 LPS 对 SP-D mRNA 水平的影响（n=6，$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Effects of LPS on SP-D mRNA level（n=6，$\bar{x} \pm s$）

组别	SP-D mRNA 相对表达量
0 h 组	1.057 ± 0.403
24 h 组	2.106 ± 0.799
48 h 组	5.044 ± 0.513
96 h 组	4.090 ± 0.658
F 值	52.707
P 值	0.000

注：24 h 组与 0 h 组比，P=0.035；48 h 组与 0 h 组比，P=0.000；96 h 组与 0 h 组比，P=0.000



注：24 h 组与 0 h 组比，a，P < 0.05；48 h 组和 96 h 组与 0 h 组比，b，P < 0.01

图 4 棉鼠肺组织中 SP-D mRNA 水平

Fig.4 Relative level of SP-D mRNA in lung tissues of cotton rats

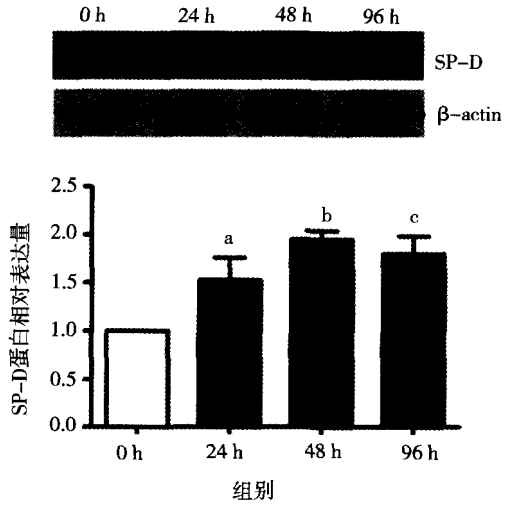
2.5 LPS 对 SP-D 蛋白表达的影响

从 Western blot 结果来看（图 5A），利用人 SP-D 的部分氨基酸制备的抗体来检测棉鼠 SP-D 蛋白是可行的，证明棉鼠 SP-D 蛋白和其他物种间存在一定交叉反应性。应用 Western blot 检测棉鼠肺组织中 SP-D 蛋白表达的变化情况，结果显示（图 5B）：棉鼠经 LPS 处理 24 h 后肺组织中 SP-D 蛋白表达增加，在 LPS 处理 48h 后 SP-D 蛋白表达量达到最大值，96 h 后 SP-D 蛋白表达量略有下降，但仍然高于 0 h 和 24 h 时的 SP-D 蛋白表达量。见表 3。

表 3 LPS 对 SP-D 蛋白水平的影响（n=3，$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Effects of LPS on SP-D protein level（n=3，$\bar{x} \pm s$）

组别	SP-D 蛋白相对表达量
0 h 组	1.000 ± 1.000
24 h 组	1.527 ± 0.236
48 h 组	1.953 ± 0.090
96 h 组	1.800 ± 0.188
F 值	21.275
P 值	0.000



注：A：SP-D 蛋白的 Western blot 图；B:SP-D 蛋白表达的相对定量分析图，24 h 组与 0 h 组比，a，P=0.015；48 h 组与 0 h 组比，b，P=0.000；96 h 组与 0 h 组比，c，P=0.001（n=3，$\bar{x} \pm s$）

图 5 棉鼠肺组织中 SP-D 蛋白的表达

Fig.5 Expression of SP-D in lung tissues of cotton rats

3 讨 论

棉鼠作为生命科学研究的一种啮齿类实验动物模型，由于对其生物学特性和医学应用的开发性研究相对较慢，可利用商业化的特异性生化试剂（尤其是抗体）无法规模化开发生产，导致其可用于生命科学研究的领域相对局限；加上地理分布、空间隔离以及饲养环境差异性等因素，使得目前我国高校及科研机构使用棉鼠模型用于科学研究的相对较少，但其在呼吸道疾病特别在呼吸道病毒研究方面确实是一个非常理想的实验动物模型。有研究表明棉鼠对合胞病毒的敏感性是其他啮齿动物的 50~1 000 倍[6,9]；另有研究也证实流感病毒感染模型很容易在棉鼠体内建立，但在小鼠体内却非常困难[10]。最近研究报道偏肺病毒感染模型在棉鼠体内成功构建，该病毒模型仅在少有的几个动物体内成功构建[9,11]。这些研究结果，再一次肯定了棉鼠在呼吸道疾病研究方面的重要作用。因而利用棉鼠建立肺损伤模型，对研究肺表面活性蛋白 SP-D 可能更具有一定敏感性和优越性。

SP-D 在机体肺部免疫防御和免疫调节方面发挥着重要作用，一方面可调节免疫细胞的功能与多种微生物、脂类和有机颗粒抗原相互作用，另一方面可通过脂多糖、磷脂和肽聚糖等一系列微生物靶

标实现对肺内病原菌的识别，并通过抑制炎性介质（细胞因子和氧化自由基）的释放来抵抗病原菌，同时也能下调炎性反应维持机体的免疫平衡[12-14]。近年来大量研究通过检测血液或支气管肺泡灌洗液中 SP-D 的水平来诊断和监测疾病的发生发展情况，结果均表明 SP-D 表达调控的差异性变化与呼吸道感染性疾病、呼吸窘迫综合征、急性肺损伤、慢性肺梗阻、哮喘以及肺囊性纤维化等人类疾病有关[15-18]。有研究指出 SP-D 还可作为评价急性呼吸窘迫综合征患者肺损伤程度的一种较好的生物标志物[3]，因而研究棉鼠肺泡表面活性蛋白 SP-D 在疾病发生发展过程中的变化规律，对研究疾病本身具有一定研究意义。

棉鼠 SP-D 基因的序列国内外尚未报道，且无检测棉鼠 SP-D 蛋白的商业化生化试剂，本研究从克隆棉鼠 SP-D 基因入手，首先要确定棉鼠 SP-D 基因的序列与其他物种是否具有较高的同源性，棉鼠 SP-D 蛋白的检测可否使用其他动物的检测试剂。研究结果表明，在核苷酸水平和氨基酸水平，棉鼠 SP-D 基因序列与 GenBank 中其它物种之间均存在较高的同源性，且利用人 SP-D 的部分氨基酸制备的抗体来检测棉鼠 SP-D 蛋白是可行的。通过对棉鼠 SP-D 基因序列的分析，证明在生物进化过程中 SP-D 基因是一个相对保守的基因，棉鼠 SP-D 蛋白和其他物种间存在一定交叉反应性。

肺损伤是由多种致病因素引起，造成炎症细胞过度性、失控性地释放大量炎症因子，从而介导肺内强烈的炎症反应，它是绝大多数呼吸道疾病发生发展的一个病理性发展过程[19]。研究 LPS 诱导的肺损伤对于研究其他病原体诱发的呼吸道疾病，在其病理学改变以及肺损伤的发展机制上均具有共性和典型性。本研究利用 LPS 诱导棉鼠肺损伤模型，其肺部的组织病理学变化随 LPS 刺激时间的延长，肺泡上皮细胞损伤更严重，细胞间隙增宽，肺泡腔内大量炎细胞浸润和渗出。同时发现棉鼠肺部 SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白表达水平，随着 LPS 处理时间的延长而逐渐增加。在 LPS 处理 24 h 后，棉鼠肺部 SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白的表达就出现差异性变化，48 h 后两者的表达水平到达峰值，96 h 后仍呈现高水平的表达。棉鼠 SP-D mRNA 水平和 SP-D 蛋白表达水平的增加，在肺损伤模型中均存在一定时间依赖性，可作为判断肺损伤疾病不同发展阶段的生物标记。SP-D 蛋白水平的增加，其机制目前仍不清楚，但其原因可能是由于肺部持续性炎症反应的结果。当肺部组织受到损伤后，机体会自动启动自身组织的重塑，修复对上皮细胞和内皮组织的损伤以及形成血管再生，在组织修复过程中，细胞的渗透性发生改变，从而使得大分子量的肺表面活性物质得以释放。同时炎症反应和细胞通透性的变化又促进了 SP-D 蛋白表达的增加。

本研究初步得出 SP-D 在棉鼠肺损伤模型中表达规律，证明了 SP-D 可作为肺损伤疾病不同发展阶段的生物标记的可能性，但关于 SP-D 的研究工作还需深入，许多科学问题仍待解决，同时本研究结果仍需大样本动物实验的进一步完善和证实。

参 考 文 献

[1] Weaver TE, Whitsett JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins[J]. Biochem J, 1991, 273(Pt 2): 249-264.

[2] Ketko AK, Donn SM. Surfactant-associated proteins: structure, function and clinical implications[J]. Curr Pediatr Rev, 2014, 10(2): 162-167.

[3] Guzel A, Karadag A, Okuyucu A, et al. The evaluation of serum surfactant protein D(SP-D) levels as a biomarker of lung injury in tuberculosis and different lung diseases[J]. Clin Lab, 2014, 60(7): 1091-1098.

[4] Boukhvalova MS, Blanco JC. The cotton rat Sigmodon hispidus model of respiratory syncytial virus infection[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013(372): 347-358.

[5] Johansson SL, Tan Q, Holst R, et al. Surfactant protein D is a candidate biomarker for subclinical tobacco smoke-induced lung damage [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(9): L887-895.

[6] Niewiesk S, Prince G. Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (Sigmodon hispidus) in infectious diseases[J]. Lab Anim, 2002, 36(4): 357-372.

[7] Faith RE, Montgomery CA, Durfee WJ, et al. The cotton rat in biomedical research[J]. Lab Anim Sci, 1997, 47(4): 337-345.

[8] Blanco JC, Pletneva L, Boukhvalova M, et al. The cotton rat: an underutilized animal model for human infectious diseases can now be exploited using specific reagents to cytokines, chemokines, and interferons [J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(1): 21-28.

[9] Boukhvalova MS, Prince GA, Blanco JC. The cotton rat model of respiratory viral infections[J]. Biologicals, 2009, 37(3): 152-159.

[10] Ottolini MG, Blanco JC, Eichelberger MC, et al. The cotton rat provides a useful small-animal model for the study of influenza virus pathogenesis[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 10): 2823-2830.

[11] Chakraborty K, Zhou Z, Wakamatsu N, et al. Interleukin-12p40

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000844

小白菊内酯对球囊损伤后内膜增殖的影响及其机制

毛　霞，高丽华，邓昌明
（重庆医科大学附属第二医院心血管内科，重庆　400010）

【摘　要】**目的**：探讨小白菊内酯（parthenolide，PN）对球囊损伤后内膜增殖的影响及其可能机制。**方法**：通过球囊损伤联合高脂喂养建立兔髂血管炎症反应及内膜增殖模型，将 30 只兔高脂适应性喂养 1 周后随机分为 6 组：对照组：假手术+0.9%生理盐水（normal saline，NS）（n=5）；假手术+4%二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（n=5）；模型组：球囊损伤+0.9%NS（n=5）；球囊损伤+ 4%DMSO（n=5）；治疗组（PN 溶解于 4%DMSO）：低剂量：球囊损伤+ PN 1 mg/（kg·d）（n=5）；高剂量：球囊损伤+PN 2 mg/（kg·d）（n=5），假手术组分离结扎股动脉不行球囊损伤，术后立即按分组给药。4 周后检测比较各组血管内膜增殖、核转录因子-κB（nuclear transcription factor-κB，NF-κB）、白介素（interleukin，IL）-6 和肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 的表达。**结果**：模型组与对照组比较，内膜厚度、NF-κB、IL-6 和 TNF-α 明显增加（P<0.05）；治疗组与模型组比较，上述指标在高剂量组显著降低（P<0.05）。**结论**：PN 通过抑制 NF-κB 及其下游炎症因子 IL-6 和 TNF-α 表达来抑制炎症反应，从而抑制内膜增殖。

【关键词】小白菊内酯；球囊损伤；内膜增殖；核转录因子-κB
【中图分类号】R541.4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-05-12

Effect of parthenolide on intimal hyperplasia after balloon injury and the underlying mechanism

Mao Xia，Gao Lihua，Deng Changming
（*Department of Cardiology，the Second Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To detect the effect of parthenolide（PN） on intimal hyperplasia and the underlying mechanism. ***Methods***：The inflammatory model of intimal hyperplasia was established by a combination of balloon injury and high-fat diet. After one week of high-fat feeding，30 rabbits were randomly divided into 6 groups. Control groups：rabbits got 0.9% normal saline（NS，n=5） or 4% DMSO（n=5） after sham operation. Model groups：rabbits got equal volume of 0.9% NS（n=5） or 4% DMSO（n=5） after balloon injury. PN groups（PN dissolved in 4% DMSO）：rabbits immediately injected with PN（dissolved in 4%DMSO） at 1 mg/（kg·d）（low） or 2 mg/（kg·d）（high） after balloon injury. Four weeks later，the thicknesses of intima，the expression of nuclear transcription factor-κB（NF-κB），interleukin-6（IL-6） and tumor necrosis

作者介绍：毛　霞，Email：maoxia2013@sina.cn，
研究方向：冠心病诊断与治疗。
通信作者：邓昌明，Email：dy070308@126.com。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2115.032.html
（2016-01-09）

modulates human metapneumovirus-induced pulmonary disease in an acute mouse model of infection[J].PLoS One，2012，7(5)：e37173.

[12] 李　瑞，周立新.肺泡表面活性物质蛋白 D 与急性肺损伤关系的研究进展[J].医学综述，2012，18(24)：4141-4144.

[13] Mahajan L，Gautam P，Dodagatta-Marri E，et al.Surfactant protein SP-D modulates activity of immune cells：proteomic profiling of its interaction with eosinophilic cells[J].Expert Rev Proteomics，2014，11(3)：355-369.

[14] Moran AP，Khamri W，Walker MM，et al.Role of surfactant protein D(SP-D) in innate immunity in the gastric mucosa：evidence of interaction with Helicobacter pylori lipopolysaccharide[J].J Endotoxin Res，2005，11(6)：357-362.

[15] Hu F，Liang W，Ren Z，et al.Surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human renal tubular epithelial cells：implication for tubulointerstitial fibrosis[J].Clin Exp Immunol，2012，167(3)：514-522.

[16] Yamazoe M，Nishitani C，Takahashi M，et al.Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors[J].J Biol Chem，2008，283(51)：35878-35888.

[17] Zhou Y，Wang H，Xing J，et al.Expression levels of surfactant-associated proteins and inflammation cytokines in serum and bronchoalveolar lavage fluid among coal miners：a case-control study[J].J Occup Environ Med，2014，56(5)：484-488.

[18] 舒林华，魏克伦，尚云晓，等.肺表面活性蛋白 A，D 在内毒素急性肺损伤时变化的研究[J].中国医科大学学报，2008，37(2)：217-220.

[19] Kati C，Alacam H，Duran L，et al.The effectiveness of the serum surfactant protein D(Sp-D) level to indicate lung injury in pulmonary embolism[J].Clin Lab，2014，60(9)：1457-1464.

（责任编辑：冉明会）