文章编号: 1000-5404(1999)12-0919-04

哮喘豚鼠肺组织 PKC的表达及对 TXA_2 释放的影响

吴 奎,杨肇亨 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042)

【提要】 目的: 探讨蛋白激酶 C(PKC)在哮喘发病中的作用。方法: 采用卵蛋白雾化吸入致敏哮喘模型,在诱发哮喘 24 h后,放射性同位素标记方法测定哮喘豚鼠肺组织总 PKC活性及膜活性变化,采用免疫组织化学的方法检测肺组织 PKC的表达,体外检测 PKC活化剂 PMA和抑制剂 H-7对肺组织血栓烷 A_2(TXA$_2$)释放的影响。结果:① 哮喘组肺组织 PKC活性显著增加; PKC呈强阳性表达;② PMA引起了肺组织 TXA$_2$ 的释放的增加,而 H-7则抑制了 PMA的效应;③ 相关分析表明, PKC活性与 TXA$_2$ 的释放量呈显著正相关。结论: PKC的过度表达可能在哮喘发病中起着重要作用,抑制 PKC的活性可能是将来哮喘防治的另一条途径。

关键词 蛋白激酶 C;血栓烷 A_2;哮喘
中图法分类号 R394.3; R562.25 文献标识码 A

蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)是一个在组织中广泛分布的磷酸化酶,静息状态下定位于细胞胞浆中,受到刺激后,它可以转位至胞膜而活化,在细胞分泌、增生、分化等功能中发挥着重要作用[1]。支气管哮喘是有多种炎性细胞参与的气道慢性炎症[2],炎性细胞释放多种炎性介质引起气道上皮损伤,神经末梢暴露,支气管平滑肌增生肥厚,对刺激的反应性增加,诱发气道高反应性。在以上过程中, PKC起着重要信号转导作用。哮喘时肺组织中多种炎性细胞 PKC的表达及活化增加,但肺组织中 PKC的活化及其作用的研究较少。本实验采用卵蛋白(OVA)雾化吸入致敏和诱发豚鼠哮喘模型,哮喘发作 24 h后以放射性同位素标记方法测定哮喘豚鼠肺组织 PKC活性的变化,测定 PKC活化剂 PMA 抑制剂 H-7对豚鼠肺组织炎性介质血栓烷 A_2(TXA$_2$)释放的影响,并采用免疫组织化学方法,测定肺组织 PKC表达及分布,以探讨 PKC可能在哮喘发病过程中所起的作用,为寻求哮喘治疗的新途径提供一些可能有效的提示。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PMA H-7 组蛋白 H-mix PS Sigma公司; γ-^{32}P-ATP(比活度 > 5 000 Ci/mmol)福瑞公司; APC试剂盒中山公司;抗 PKC抗体 Pharmigen公司; TXB_2 放免药盒苏州医学院。

1.2 实验动物模型的制作及处理

1.2.1 哮喘动物模型的制作 20只雄性豚鼠,体重 250~300 g,随机分为对照组(C)、哮喘组(A)。A组: 参照 Huston[3] 方法,第 1、4、7天将 1%的 OVA雾化吸入 3 min致敏豚鼠,第 21~27天用 2%的 OVA雾化吸入 5 min诱发其哮喘发作,诱发后 24 h采集标本。C组: 用生理盐水替代 OVA致敏,诱发同 A组。

1.2.2 标本采集 实验豚鼠麻醉后,开胸暴露心脏,经左心室→主动脉弓灌注生理盐水约 200 ml(至从左心房流出的液体基本清亮为止),同时分离出气管,结扎左肺从根部剪下,置于 4%多聚甲醛-PBS缓冲液固定,修整、石蜡包埋后,切 5 μm切片。右肺在 4℃条件下剪切成 1 mm×1 mm大小的碎块,以备 PKC提取及 TXA_2 的测定。

1.3 PKC活性的测定[4]

1.3.1 组织样品的制备 胞液和膜性酶液的制备: 将剪碎的肺组织,称取 0.25 g,进行下列操作: (1)以 1∶5(W∶V)的缓冲液(内含 20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl、0.25 mol/L蔗糖、0.5 mmol/L PMSF、2 mmol/L EDTA、10 mmol/L EGTA)在冰浴中高速匀浆; (2) 700× g离心去核(4℃、15 min),超声粉碎; (3)上清液经(100 000× g) 4℃离心 1 h,上清液即为胞液 PKC酶液; (4)① 沉淀部分溶解于含有 0.5% TritonX-100的上述缓冲液中;② 冰浴中搅拌抽提 1 h;③ 100 000× g 4℃离心 1 h,上清液为 PKC膜性组分。

1.3.2 PKC活性的测定 采用标记的放射性同位素法进行,总反应体积 50 μl,内含终浓度 25 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、10 mmol/L $MgCl_2$、0.5 mol/L $CaCl_2$、10 μg PS、10 μg组蛋白 H-mix 10 μl酶制剂、1 μg PMA 加入 γ-^{32}P-ATP 0.2 μCi起动反应; 对照组用 2.5 mmol/L EGTA代替 PS、PMA和 $CaCl_2$。37℃水浴中准确温育 5 min,立即移入 2℃~4℃冰浴中,随后加入 10 μl 2 mmol/L EDTA终止反应、将液体移于微孔滤膜上,10%三氯乙酸抽滤 2 ml×5,烤干后放入装有 5 ml闪烁液(ppo 5 g、popop 0.2 g/1 000 ml甲苯)的液闪瓶内,于液

作者简介: 吴 奎,男, 1971.01.02生,江苏省沛县人,硕士,住院医师,主要从事哮喘发病机制方面的研究,发表论文 2篇。电话: (023)68757625

收稿日期: 1999-01-26;修回日期: 1999-07-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

闪仪测 cpm,酶的活力单位以 37℃时每分钟每毫克酶蛋白转移 1μmol磷酸根来表示,其表示单位为 fmol/mg·min^{-1}。

1.3.3 蛋白定量 采用 Folin-酚法进行。

1.4 TXA_2的放免测定

1.4.1 样品制备 将剪碎的肺组织每只动物称取 0.25 g×3,分别放入装有 2 ml台氏液 (NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, $CaCl_2$ 0.2 g/L, $NaHCO_3$ 1.0 g/L, $MgCl_2$ 0.1 g/L, NaH_2PO_4 0.05 g/L, Glucose 1.0 g/L)的 A B C 3只试管中,其中 A管中含有 100 ng/ml H-7,先 37℃孵育 5 min,然后 A B 2管加 PMA至 10 ng/ml, 3管同时 37℃孵育 30 min,吸取上清进行放射免疫测定(由于 TXA_2代谢迅速,半衰期短,因此测定其稳定的代谢产物 TXB_2以代替)。

1.4.2 放免测定根据试剂盒说明书进行。

1.5 PKC免疫组织化学染色

参照文献[5]进行。

观察方法及判断标准:阳性染色显示肺组织细胞及浸润的炎性细胞中出现黄色染色。每张切片由 2位观察者独立计数,随机取染色区域 4个高倍视野(× 400)的阳性细胞平均数,用半定量计分,染色强度用 0~3级计分:0:无染色;1:轻度阳性染色;2:中度阳性染色;3:强阳性染色;染色范围根据细胞阳性染色的百分数而分为 0~4级;0:无染色;1:<25%细胞染色;2:25~50%细胞染色;3:50~75%细胞染色;4:>75%细胞染色。染色总评分为染色强度+染色范围。

1.6 数据统计学分析

本实验数据采用均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$)。组间比较及相关分析全部用非配对计量资料检验和直线相关分析。$P<0.05$表示相差或相关显著,$P<0.01$表示相差或相关非常显著。

2 结果

2.1 实验动物肺组织中 PKC活性的变化

结果表明,哮喘组动物总 PKC活性明显高于对照组,且膜 PKC活性及所占比例亦较对照组明显上升,见表 1

表 1 各组肺组织总 PKC及膜 PKC活性 (fmol/mg·min^{-1}, n= 10)

Tab 1 The activity of total and membrane PKC in lung tissue (fmol/mg·min^{-1}, n= 10)

Group	tPKC	mPKC	mPKC(%)
Control	101.88±13.55	26.46±5.86	26.4±4.17
Asthma	466.37±110.96*	155.97±40.82*	33.29±3.97#

#: $P<0.05$,*: $P<0.01$ *vs* control

2.2 实验动物肺组织 PKC的表达水平

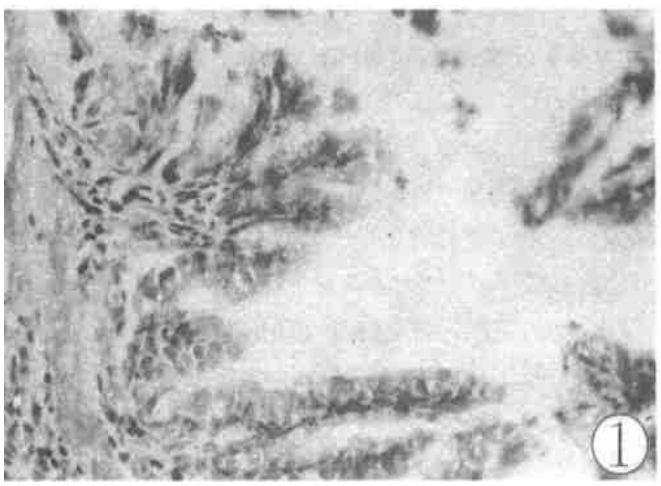
实验动物肺组织 PKC免疫组化结果镜下显示,哮喘组肺组织见较广泛阳性染色细胞,主要分布于支气管粘膜上皮、粘膜下、气管平滑肌,见图 1,肺泡间、甚至肺泡腔内,见图 2 高倍镜下见阳性染色 PKC定位于胞浆及胞膜,呈棕黄色。正常组实验动物肺组织可见少许染色较浅细胞,见图 3,气道粘膜光滑,染色较浅,见图 4 肺组织 PKC表达的半定量计分结果,见表 2

表 2 肺组织 PKC的表达 (n= 10)

Tab 2 The expression of PKC in lung tissue (n= 10)

Group	Expression
Control	1.73±0.50
Asthma	4.65±0.59*

*: $P<0.01$ *vs* control



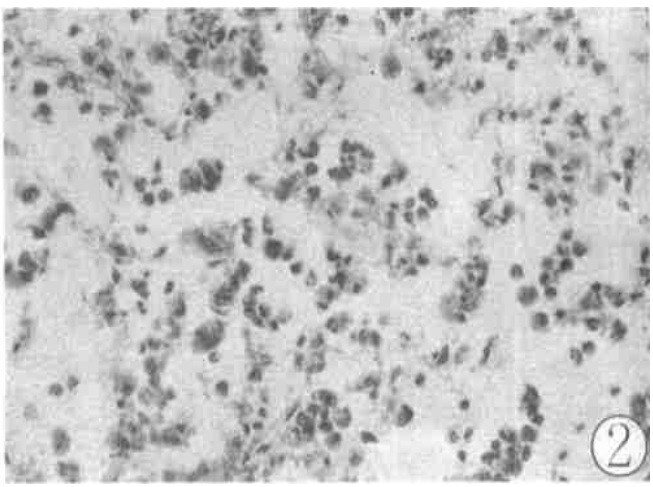


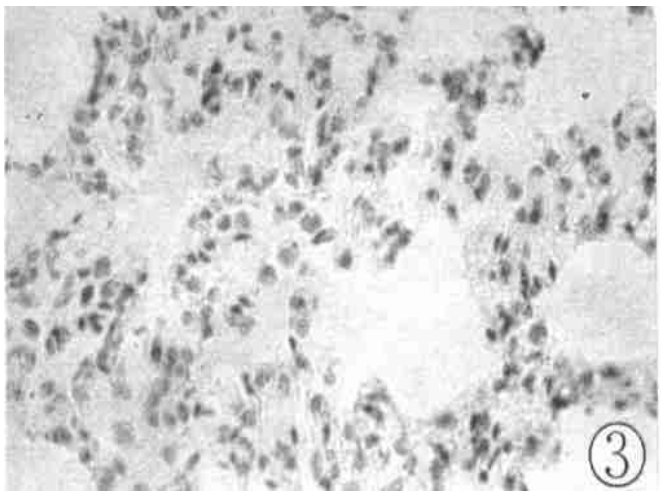
图 1 哮喘豚鼠支气管腔嗜酸性细胞浸润,浸润细胞及支气管粘膜、气道平滑肌 PKC呈强阳性表达 (DAB显色,苏木素复染,× 400)

Fig 1 Infiltration of Eos in bronchial cavity, expression of PKC is strongly positive in infiltrated cells, bronchial mucosa and airway smooth muscle in bronchus of asthmatic guinea pig (DAB stain, Hematoxylin restain,× 400)

图 2 哮喘豚鼠肺泡内大量炎性细胞浸润,PKC呈阳性表达 (DAB显色,苏木素复染,× 400)

Fig 2 Massive infiltration of inflammatory cells in alveolar, positive expression of PKC in alveolus of asthmatic guinea pig (DAB stain, Hematoxylin restain,× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



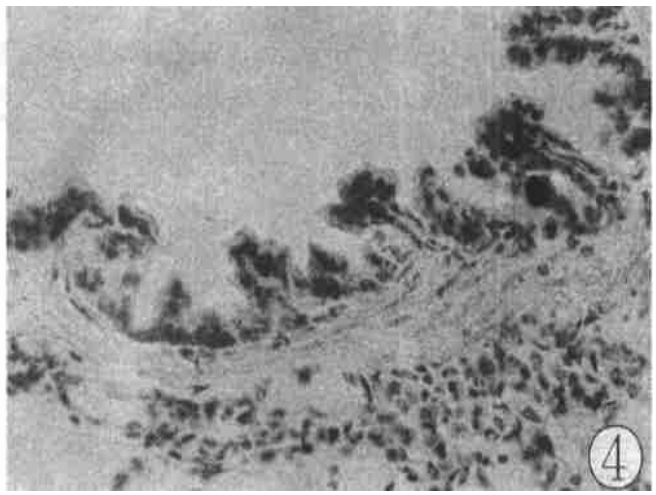


图 3　正常豚鼠肺泡内无炎性细胞浸润,**PKC**表达呈弱阳性　(DAB显色,苏木素复染,× 400)

Fig 3　No inflammatory cells infiltration, PKC expression weak positive in alveolar of normal guinea pig (DAB stain, Hematoxylin restain,× 400)

图 4　正常豚鼠支气管粘膜光滑,无炎性细胞浸润,**PKC**表达呈弱阳性　(DAB显色,苏木素复染,× 400)

Fig 4　Mucosa of bronchus smooth, no inflammatory cell infiltration, PKC expression weak positive in normal guinea pig (DAB stain, Hematoxylin restain,× 400)

2.3　PKC对肺组织释放 TXA_2的作用

放免结果显示,PKC活化剂 PMA可以刺激肺组织释放 TXA_2,而其抑制剂 H-7则显著抑制 PMA的作用,见表 3.

表 3　**PKC**活化剂和抑制剂对 **TXA_2**释放的作用(**pg/ml**,***n*= 10**)

Tab 3　The release of TXA_2 induced by activator and inhibitor of PKC(pg/ml,*n*= 10)

Group	PMA	H-7+ PMA	Blank control
Control	228.45± 53.42#	33.75± 4.69**	34.30± 5.19
Asthma	391.63± 52.43**	63.34± 14.21**	60.60± 19.47

* : $P < 0.01$ *vs* control; # : $P < 0.01$ *vs* H-7+ PMA; ** : $P > 0.05$ *vs* without medicine

2.4　相关分析

相关分析表明,PKC活性 PMA诱导的 TXA_2释放量呈显著正相关($\gamma = 0.702$; $P < 0.01$).

3　讨论

本研究采用了同位素标记 γ-^{32}P-ATP测定哮喘豚鼠肺组织中 PKC活性的变化及其在细胞中定位比例的变化;采用免疫组织化学的方法,检测 PKC在肺组织中的表达和分布;并且分别采用 PKC活化剂 PMA以及抑制剂 H-7加 PMA处理肺组织,检测对炎症介质 TXA_2释放的影响. 结果表明,哮喘豚鼠肺组织中总 PKC活性较正常组显著增高,膜 PKC活性所占比例与正常组相比亦显著增高,提示哮喘时 PKC活性增加及活化. 免疫组化结果表明,正常豚鼠肺组织中见 PKC呈弱阳性表达,而哮喘组豚鼠肺组织中支气管粘膜、肺泡、毛细血管、以及肺泡内浸润的炎性细胞中均见 PKC呈强阳性表达. PMA导致肺组织释放 TXA_2增加,而先用 H-7预处理后再加 PMA则未引起 TXA_2的释放.

研究表明,在哮喘发病过程中,炎性细胞出现了 PKC活性变化,以及 PKC分布比例的变化. Bansal[6]研究发现,哮喘患者淋巴细胞总 PKC活性增加,膜 PKC活性所占比例亦显著增加,且患者的一秒钟用力呼气量(FEV 1)与总 PKC活性显著负相关. Bates等[7]的研究表明,哮喘病人的血和 BALF低密度嗜酸性粒细胞 PKC活性显著增加. 本实验结果和 Bansal[6]、Bates等[7]的结果相符,表明哮喘动物不仅出现 PKC含量增加,同时发生 PKC的转位活化.

已知 PMA是 PKC的高效活化剂,而 H-7是 PKC的特异性抑制剂,说明是 PKC的活化引起了 TXA_2的释放增加,而 PKC的抑制剂则阻抑了 TXA_2的合成及释放. 相关分析表明 PKC活性与 TXA_2的释放量呈显著正相关. PKC活化引起 TXA_2释放增加的作用的可能机制是促使 TXA_2的合成增加. 因为 TXA_2的半衰期极短,生成后迅速代谢成为 TXB_2而灭活. 据报道,PKC的活化还可引起 cPLA$_2$[8]、COX[9]活性增加. cPLA$_2$活性增加引起花生四烯酸(AA)的生成增加,COX活性增加则促使 AA向 TXA_2转变. 既往研究证实,PKC活化可以引起肥大细胞、T淋巴细胞、Eos中性粒细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞等释放组织胺、白三烯、TXA_2,诱发 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-16、IN F-α等的表达、分泌增加,诱发炎性细胞脱颗粒、粘附、呼吸暴发.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本实验表明,在哮喘豚鼠肺组织中,组织细胞中PKC表达增加,伴 PKC的转位活化。PKC的活化进一步引起炎性介质释放增加,而 PKC特异性抑制剂 H-7阻抑炎性介质的释放,说明 PKC在哮喘炎性介质的释放中起着重要作用。

参考文献

[1] Nishizuka Y. Protein kinase 5, Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses[J]. FASEB J, 1995, 9(5): 484-494.

[2] 中华医学会呼吸系病学分会.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗、疗效判断标准及教育和管理方案)[J].中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(5): 261-265.

[3] Huston P A, Church M K, Clay T P, *et al*. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of non-anesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration[J]. Am Respir Dis, 1988, 137(3): 548-557.

[4] Ooka Y, Kuwata T, Asada A, *et al*. Regulation of thymocyte lineage commitment by the level of classical protein kinase C activity[J]. J Immunol, 1997, 158(12): 5707-5716.

[5] 蔡文琴,王伯ǎ.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M].四川科学技术出版社, 1994. 94-96.

[6] Bansal S K, Jha A, Jaismal A S, *et al*. Increased levels of protein kinase C in lymphocyte in asthma: Possible mechanism of regulation[J]. Eur Respir J, 1997, 10(2): 308-313.

[7] Bates M. E, Bertics P. J, Calhoun W. J, *et al*. Increased protein kinase C activity in low density Eosinohils[J]. J Immunol, 1993, 150(10): 4486-4493.

[8] Chang E Y, Szallasi Z, Acs P, *et al*. Functional effects of overexpression of protein kinase C-α, -β, -δ, -ε and -η in the mast cell line RBL-2H3[J]. J Immunol, 1997, 159(6): 2624-2632.

[9] Vezza R, Habib A, Li H, *et al*. Regulation of cyclooxygenase by protein kinase C[J]. J Biol Chem, 1996, 271(47): 300028-300033.

(编辑 王 红)

The expression of protein kinase C in lung tissues and its effects on TXA_2 release in asthmatic guinea pigs

WU Kui, YANG Zhao-heng (Department of Respiratory Disease, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract **Objective**: To study the role of protein kinase C (PKC) in the pathogenesis of asthma. **Methods**: Guinea pigs were sensitized by exposing to aerosolized ovalbumin. 24 hours after exposure, the activity of PKC in lung tissues was determined, the expression of PKC in the lungs was identified and the quantity of TXA_2 release induced by PMA, a PKC activator, and H-7, a specific inhibitor of PKC, was measured. **Results**: ① The activity and expression of PKC in the asthmatic lung tissues were significantly increased and they were positively correlated to the release of TXA_2. ② PMA after incubated with lung tissues, promoted the release of TXA_2 and H-7 was able to antagonize the effects of PMA after preincubated with lung tissues. **Conclusion**: Overexpression of PKC may play an important role in the development of asthma. Consequently the inhibition of the activity of PKC may exert therapeutic effects on asthma.

Key words protein kinase C; asthma; thromboxane A_2; guinea pig

(上接 918页)

由于异丙酚清除半衰期短,用于全麻的维持需采取持续滴入法。过去规定异丙酚只能与 5%葡萄糖液配用,临床使用十分不便。我们以往的研究结果显示异丙酚能与普鲁卡因注射液配用[1]。在 2%普鲁卡因注射液中,异丙酚至少能稳定保存 2h 以 0.5~ 1.5 ml/kg·h^{-1}的速率输注复合液,血液中异丙酚浓度有效和稳定。说明异丙酚与普鲁卡因、芬太尼配伍合理有效,而用该方法配制简单,使用方便。

普鲁卡因-异丙酚-芬太尼三者伍用,异丙酚维持剂量与其它报道相比明显降低,有效减少了药物副作用的发生[2]。异丙酚突出的缺点是循环抑制,其抑制作用呈现剂量依赖性。异丙酚血药浓度与心血管效应关系研究表明,当血中异丙酚浓度大于 2.0μg/ml时,循环处于明显抑制状态[3]。我们采用 IPPFBA,当平均滴速为 1.2 ml/kg·h^{-1}(异丙酚剂量为 2.4 ml/kg·h^{-1})时,异丙酚血药浓度平均为 1.1μg/ml,血压和心率保持于基础水平,既获得了理想的麻醉效果,又维持了血流动力学的稳定。显示出此种复合方法的优越性,是一较理想的 TIVA方法。

关键词 全凭静脉麻醉;异丙酚;普鲁卡因;芬太尼
中图法分类号 R614.24 文献标识码 B

参考文献

[1] 陶 军,刘桥义.异丙酚与普鲁卡因注射液配伍稳定性观察[J].临床麻醉学杂志, 1998, 14(2): 84-85.

[2] Struys M, Versichelen L, Thas O, *et al*. Comparison of computer-controlled administration of propofol with two manually controlled infusion techniques[J]. Anaesthesia, 1997, 52(1): 41-50.

[3] 王祥瑞,孙大金,杭燕南,等.异丙酚的血药浓度与临床效应的关系[J].中华麻醉学杂志, 1996, 16(7): 76-79.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net