

的系膜细胞水平上证实了 $\text{TNF} - \alpha / \text{PKC} - \alpha / \text{IP}_3\text{R}$ 信号机制^[11]。由于肾小球是主管肾脏滤过功能的重要器官,本研究应用体外分离的肾小球,在器官水平上通过肾小球毛细血管容量测量来证实肾小球对内皮素的敏感度。菊粉分子质量为 5.5kDa,可自由通过肾小球滤过膜且不被肾小管重吸收及分泌。FITC 分子质量仅为 0.39kDa,用其标记菊粉后,通过测定肾小球菊粉容积(GIS)间接测量了肾小球毛细血管容量,当 GIS 减少 >5% 时证明肾小球有收缩。GIS 增加 >5% 时证明肾小球有舒张。通过 MTT 比色法,发现蓝紫色结晶甲瓚沉积在细胞中,而死细胞无此功能;通过台盼蓝染色发现肾小球内细胞没有被染成蓝色证明了我们分离的肾小球其形态学、活性、GIS 及肾小球周长均与文献报道的相似。本研究通过肾小球菊粉容积测量、肾小球周长测量证实了肝硬化大鼠肾小球对缩血管物质内皮素的敏感度较对照组增强,这可能是肝硬化晚期易于发生肾小球滤过率下降的原因之一。能否在肝肾综合征动物模型上验证阻断 $\text{TNF} - \alpha$ 、 IP_3R 可改善 GFR 及探讨相关的信号通路是我们进一步研究的方向。

参考文献

- 1 Prakash J, Mahapatra AK, Ghosh B, *et al.* Clinical spectrum of renal disorders in patients with cirrhosis of liver[J]. *Ren Fail*, 2011; 33(1): 40 - 46
- 2 王静艳,刘洪艳,刘沛.肝硬化大鼠肾小球血管袢和肾小球前小动脉 I 型 1,4,5 - 三磷酸肌醇受体的表达[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(10): 609 - 611

- 3 Ying W, Wei C, Pei L. Renal I inositol 1,4,5 - triphosphate receptors increased in fulminant hepatic failure mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 2344 - 2348
- 4 White C, McGeown JG. Inositol 1,4,5 - triphosphate receptors modulate Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} store content in vas deferens myocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(1): C195 - 204
- 5 闻颖,陆旭,刘沛.肿瘤坏死因子 α 增强肾小球系膜细胞胞内钙释放参与肝肾综合征发病机制[J]. *中国医师杂志*, 2013; 15(1): 11 - 14
- 6 涂云忠,张坚,刘惠萍,等.白细胞介素 10 基因修饰的骨髓间充质干细胞抑制大鼠肝纤维化形成的实验研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(12): 908 - 911
- 7 Wyczalkowska - Tomasiak A, Bartłomiejczyk I, Gornicka B, *et al.* Strong association between fibronectin accumulation and lowered cathepsin B activity in glomeruli of diabetic rats[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(5): 525 - 530
- 8 van Bemmelen MX, Szczepańska - Konkel M, Jastorff B, *et al.* Effect of cAMP analogues on glomerular inulin space of isolated rats renal glomeruli[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(1): 111 - 120
- 9 Kayali Z, Herring J, Baron P, *et al.* Increased plasma nitric oxide, L - arginine, and arginase - 1 in cirrhotic patients with progressive renal dysfunction[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(6): 1030 - 1037
- 10 Wong F. Recent advances in our understanding of hepatorenal syndrome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(7): 382 - 391
- 11 闻颖,王冬蕾,刘沛.蛋白激酶 C α 激活参与了肿瘤坏死因子 α 引起的肝肾综合征时肾小球滤过率下降[J]. *医学研究杂志*, 2013, 3: 120 - 123

(收稿日期:2013 - 06 - 11)

(修回日期:2013 - 06 - 25)

p38 MAPK 通路介导急性肺栓塞大鼠单核细胞趋化蛋白 1 表达的研究

蔡学定 陈 淳 丁 城 徐晓梅 黄晓颖 王良兴

摘 要 **目的** 探究急性肺栓塞后大鼠肺组织中 MCP - 1 的表达及 p38 MAPK 信号通路对 MCP - 1 的影响。**方法** 通过自体血栓回输法复制大鼠急性肺栓塞模型,分成 1、4、8h 组。采用免疫组化法检测急性肺栓塞大鼠 MCP - 1、p38 MAPK 磷酸化蛋白的表达,采用半定量 RT - PCR 检测急性肺栓塞大鼠肺组织 MCP - 1 mRNA 的表达,采用 Western blot 检测急性肺栓塞大鼠肺组织 p - p38 MAPK 表达。**结果** 免疫组化检测结果显示 MCP - 1、p - p38 MAPK 在大鼠肺组织中有明显表达,RT - PCR、Western blot

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871138)

作者单位:325003 浙江省温州医学院附属第一医院呼吸内科(蔡学定、丁城、徐晓梅、黄晓颖、王良兴);310014 杭州,浙江省人民医院呼吸内科(陈淳)

通讯作者:王良兴,电子信箱:38805@163.com

检测结果显示急性肺栓塞后大鼠肺组织中 MCP-1 mRNA、p-p38 MAPK 的表达水平随时间点有明显升高,且两者呈正相关。结论 急性肺栓塞大鼠 MCP-1 表达水平明显升高,其机制可能是肺栓塞后 p38 MAPK 通路被激活实现的。

关键词 肺栓塞 p38 单核细胞趋化蛋白 1

P38 MAPK Pathway Mediated Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 in Rats with Acute Pulmonary Embolism. Cai Xueding, Chen Chun, Ding Cheng, Xu Xiaomei, Huang Xiaoying, Wang Liangxing. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325003, China

Abstract Objective To explore the expression of the MCP-1 and the effect of the p38 MAPK after the acute pulmonary embolism of rats. **Methods** Model of acute pulmonary embolism was replicated Thorough inputing thrombus (jugular vein catheter inserted to the right pulmonary artery). The group was divided into 1h, 4h, 8h groups. Immunohistochemical method was used to detect MCP-1 and the expression of p38 MAPK. Semiquantitative rt-PCR the mRNA of MCP-1. Western blot was used to detect the expression of p38 MAPK. **Results** Immunohistochemical assay showed that MCP-1, p38 MAPK had obvious expression in rat's lung tissue. Also, the Rt-PCR and Western Blot detection results showed that the MCP-1 mRNA and p38 MAPK expression was significantly increased after acute pulmonary embolism. And both of them had positively relationships. **Conclusion** In acute pulmonary embolism in rat lung tissue, the expression of MCP-1 was significantly increased. The mechanism maybe through activating p38 MAPK pathway.

Key words Pulmonary embolism; p38MAPK; Monocyte chemotactic protein-1

肺血栓栓塞症(PTE)主要是由来自静脉系统或右心的血栓阻塞肺动脉系统或其分支所致。越来越多的研究表明,多种炎症介质如细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ET-1 等在急性肺栓塞后表达升高。近年来对肺栓塞后肺部炎症反应备受关注。有研究报道,在肺栓塞后大鼠肺部单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)有明显表达,并参与肺部炎症反应,但其具体机制尚不清楚。p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, p38 MAPK)信号传递通路是多种细胞因子,炎症介质调控细胞增殖、分化与凋亡的共同早期信号通路。本文是关于 MCP-1 参与肺栓塞后肺部炎症反应的发病机制及与 p38 MAPK 关系的研究。

材料与方法

1. 材料:健康雄性 SD 大鼠 72 只, SPF 级, 体重 300~350g, 由温州医学院动物实验中心提供; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购于 Pierce 公司; DAB 显色试剂盒购于福建迈新生物技术开发有限公司; NF- κ B/p65 兔抗鼠抗体购于 Lab Vision 公司; 磷酸化 p38 抗体、总 P38 抗体和山羊抗兔 HRP 二抗购于 Cell signaling 公司; 兔抗鼠 MCP-1 抗体购于美国 Biolegend 公司。

2. 实验分组: 72 只体重 300~350g 雄性 SD 大鼠按完全随机设计分为正常对照(N)1、4、8h 组, 溶剂对照(D)1、4、8h 组, 肺栓塞(T)1、4、8h 组, 每组 8 只。

3. PTE 模型制作: 采用温州医学院比较成熟的自体血栓回输制作肺栓塞模型^[1]: (1) 自体血栓制备: 大鼠颈部消毒, 19G 头皮针(内径 1.1mm) 鼠左颈动脉取血。静置 10min, 凝后 37℃ 水浴 20min, 切成 1.1mm×3.0mm 栓子, 以上操作在无菌条件下完成。(2) PTE 模型的建立: 大鼠以 5% 水合氯醛(3mg/kg)腹腔注射麻醉, 分离颈外静脉, 插入 19G 聚乙烯导

管为在血栓输注过程中将大鼠致死率降至最低程度, 将血栓(18mg/100g), 输入时间>5min, 附以生理盐水 0.8ml(0.2ml/min), 血栓即随血液循环嵌顿于肺动脉, 急性肺动脉血栓栓塞大鼠模型建立。溶剂对照组只注入等量溶液, 其余操作同上。N 组大鼠直接处死留取肺组织, D、T 组大鼠分别在各时间点处死留取肺组织。

4. 免疫组化检测: 取大鼠左肺中叶用 4% 多聚甲醛液固定, 石蜡包埋切片, 用免疫组化法检测 MCP-1、p-p38 的表达。切片在经脱蜡、水化、封闭及修复后, 滴加抗 MCP-1 抗体(1:50, Biolegend) 以及抗 P38 抗体(1:50, cell signal) 于 4℃ 过夜后, 加入山羊抗兔二抗(1:50, 福建迈新生物技术有限公司), DAB 显色苏木素复染, 脱水、透明中性树脂胶封片后显微镜下观察 MCP-1、p-p38 在肺组织中的表达。

5. Western blot 检测 p-p38MAPK 表达: 新鲜肺组织中加入细胞裂解液充分研磨后经超声细胞粉碎机粉碎后离心取上清液, 上清液的蛋白浓度用 BCA 法检测。上清液用等体积 2×上样缓冲液充分混匀后沸水煮沸 5min, 进行电泳, 之后将蛋白转至 PVDF 膜后用脱脂奶粉封闭, 加入 5% 牛血清白蛋白稀释的兔抗大鼠磷酸化 p38 单克隆抗体(1:1000)或兔抗大鼠总 p38 单克隆抗体克隆抗体(1:1000) 4℃ 孵育过夜后, 用 TBST 充分洗涤, HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2000), 将膜放入其中, 室温孵育 1h, 用 TBST 充分洗涤, ECL 试剂显色, 胶片曝光。结果经图像分析系统对目的条带进行扫描存图并进行密度分析。

6. RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 表达: 以 Trizol 试剂盒提取肺组织总 RNA。MCP-1 引物序列: MCP-1 引物序列: 上游: 5'-CTCTTCCTCCACCACTATGC-3', 下游: 5'-TG-GAAAAGAGACTGGATGC-3', 扩增片段长度 413bp; 内参 β -actin 引物序列: 上游: 5'-CCATTGAACACGGCATTG-3', 下游: 5'-ACGACCAGAGGCATACAG-3', 扩增片段长度 233bp。用 TaKaRa RT-PCR 试剂盒进行反转录扩增, RT 扩增条件:

65℃ 1min, 30℃ 5min, 65℃ 15min, 98℃ 5min, 5℃ 5min, 转录成 cDNA 后, 取 5μl 加入 PCR 反应体系, PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 1min, 56.2℃ 1min, 72℃ 1min, 循环 30 次。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳及紫外灯下观察照相、吸光度扫描分析。各样本的基因表达量用该样本扩增后产物胶上条带的吸光度值与 β -actin 基因条带的吸光度值的比值半定量表示。

7. 统计学方法: 采用 SPSS 16.0 统计软件分析所有数据, 各组间计量资料均数比较多组样本均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 每组重复 3 次。

结 果

1. 急性肺栓塞大鼠 MCP-1 在肺内的表达部位: 免疫组化法检测显示 MCP-1 在肺栓塞大鼠的肺实质、肺动脉血管壁上均有表达 (图 1)。磷酸化 p38 在肺栓塞大鼠的肺实质、肺动脉血管壁细胞核内均有表达 (图 2)。

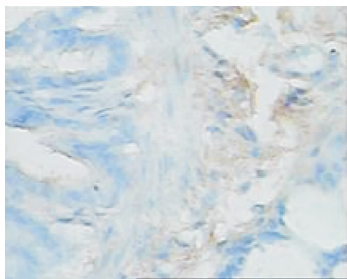


图 1 MCP-1 在肺栓塞大鼠肺部的表达 (×400)

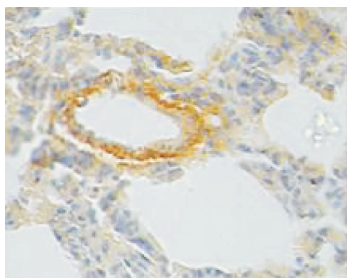


图 2 磷酸化 p38 在肺栓塞大鼠肺部的表达 (×400)

2. 急性肺栓塞大鼠肺组织磷酸化 p38 蛋白表达量的变化: 各时间点 N、D、T 组大鼠肺组织磷酸化 p38 OD 比值比较结果显示, T 组 4、8h 组大鼠肺组织磷酸化 p38 OD 比值分别较 N、D 组 4、8h 组高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组各时间点大鼠磷酸化 P38 蛋白的比较 ($\text{OD}, \bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/ml}$)

组别	1h 组	4h 组	8h 组
N 组	0.21 ± 0.07	0.21 ± 0.08	0.24 ± 0.07
D 组	0.23 ± 0.09	0.23 ± 0.07	0.25 ± 0.08
T 组	0.36 ± 0.09 [△]	0.53 ± 0.08 [*]	0.67 ± 0.06 [*]

与 N、D 组比较, [△] $P > 0.05$, ^{*} $P < 0.05$

3. 急性肺栓塞大鼠肺组织 MCP-1 mRNA 表达的变化: 各时间点 N、D、T 组大鼠肺组织 MCP-1 mRNA OD 比值比较结果显示, T 组 4、8h 组大鼠肺组织 MCP-1 mRNA OD 比值分别较 N、D 4、8h 组高 ($P < 0.05$) (表 2, 图 4)。

表 2 各时间点各组 MCP-1 mRNA 表达的比较 ($\text{OD}, \bar{x} \pm s, n = 8, \text{pg/ml}$)

组别	1h 组	4h 组	8h 组
N 组	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.03
D 组	0.26 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0.04
T 组	0.34 ± 0.04 [△]	0.44 ± 0.05 [*]	0.63 ± 0.09 [*]

与 N、D 组比较, [△] $P > 0.05$, ^{*} $P < 0.05$

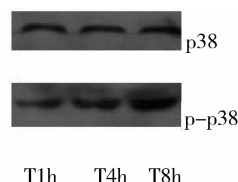


图 3 Western blot 检测 p-p38 蛋白表达

T1h. 肺栓塞 1h 组; T4h. 肺栓塞 4h 组; T8h. 肺栓塞 8h 组

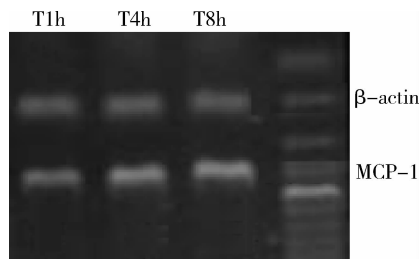


图 4 RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 表达

T1h. 肺栓塞 1h 组; T4h. 肺栓塞 4h 组; T8h. 肺栓塞 8h 组

4. 急性肺栓塞大鼠肺组织 MCP-1 mRNA 和磷酸化 p38 的相关分析: 肺栓塞各组大鼠肺组织 MCP-1 mRNA 和磷酸化 p38 OD 比值的相关性分析显示, 肺栓塞组大鼠肺组织中 MCP-1 mRNA 的升高和 p38 呈正相关 ($r = 0.93, P < 0.05$, 图 5)。

讨 论

肺血栓栓塞症 (PTE) 为临床常见病、危重病。近年来研究表明肺栓塞时栓塞血管周围大量炎性细胞浸润, 其释放的细胞因子可加重肺动脉内皮的损伤, 在肺栓塞后肺动脉高压的形成中起着不可忽视的作用。

单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 作为炎症趋化因子 CC 亚族的一员, 在趋化单核细胞和 T 淋巴细胞, 诱导单核细胞、内皮细胞表达黏附分子, 使各种炎性细胞尤其是单核 -

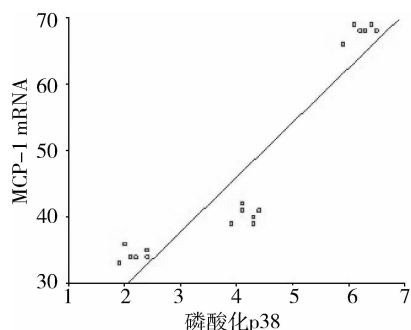


图 5 肺栓塞组大鼠肺组织中 MCP-1 mRNA 和磷酸化 p38 的相关性

吞噬细胞向病变部位聚集的过程中发挥了决定性作用。有研究报道, MCP-1 本身可以通过趋化和激活单核细胞来损伤组织, 并能加剧组织病变^[2,3]。此外, 研究表明 MCP-1 还参与到血管内皮生长因子(VEGF)介导的血管生成, 并增加血管通透性, 从而炎症细胞渗出明显增加^[4]。MCP-1 在吸引单核细胞和巨噬细胞浸润后, 进而可通过反馈吸引作用扩大其他单核-吞噬细胞的聚集, 并产生更多的 MCP-1。本研究中 RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 结果显示栓塞 4、8h 组的表达量较对照组显著升高, 且 8h 组较 4h 组亦有统计学意义, 这与国外学者的报道相同^[5]。在大鼠肺栓塞后大鼠肺组织中 MCP-1 表达明显增高, 这对大鼠肺栓塞后肺部炎症反应加重起到重要的作用。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, p38 MAPK) 信号传递通路是多种细胞因子, 炎症介质调控细胞增殖、分化与凋亡的共同早期信号通路。炎症刺激, 如 LPS、TNF、IL-1 和缺血-再灌注等, 均可介导单核细胞、内皮细胞和中性粒细胞等免疫细胞中 p38 MAPK 的激活。在静止细胞中, p38 定位于细胞质与细胞核。一旦被激活, 细胞质

中的 p38 即移位到细胞核。本研究中发现肺动脉内皮细胞核内、肺动脉周围肺组织均可见 p38 有明显的表达, 提示在肺栓塞后 1~8h 即被激活。免疫印迹检测 p-p38 的结果发现, 肺栓塞 8h 组大鼠较对照组大鼠 p-p38 表达明显增高。栓塞组大鼠磷酸化 p38 的表达量 4、8h 组较对照组具有统计学差异, 并且 8h 组较 4h 差异有统计学意义, 表明在肺栓塞后 p38 MAPK 信号转导通路被激活, 并且呈时间依赖性。这可能和氧化应激、炎症介质的刺激等有关。

对肺栓塞组大鼠肺组织中 MCP-1 mRNA 的量 and 磷酸化 p38 的量进行相关分析结果表明 MCP-1 和磷酸化 p38 呈正相关。急性肺栓塞后 MCP-1 表达量的增高, 可能是由于激活 p38 MAPK 信号转导通路而上调了肺组织 MCP-1 的表达, 从而加重急性肺栓塞后大鼠肺部炎症细胞聚集, 炎症介质释放, 最终加重肺部炎症损伤。

参考文献

- 1 叶瑞海, 陈少贤, 王良兴, 等. 急性自体血栓肺栓塞大鼠动物模型制备[J]. 温州医学院学报, 2006, 36(4): 323-325
- 2 Jiao B, Wang YS, Cheng YN, *et al.* Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF-beta1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels[J]. *Biosci Trends*, 2011, 5(4): 173-181
- 3 Wu Y, Yang L, Su T, *et al.* Pathological significance of a panel of urinary biomarkers in patients with drug-induced tubulointerstitial nephritis[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010, 5(11): 1954-1959
- 4 Bhardwaj S, Roy H, Babu M, *et al.* Adventitial gene transfer of VEGFR-2 specific VEGF-E chimera induces MCP-1 expression in vascular smooth muscle cells and enhances neointimal formation[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 84-91
- 5 Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE, *et al.* Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism[J]. *J Vasc Surg*, 2002, 36(3): 581-588 (收稿日期: 2013-05-16)
(修回日期: 2013-06-14)
- 6 Santandreu FM, Valle A, Oliver J, *et al.* Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(2): 219-228
- 7 Palomer X, Capdevila-Busquets E, Alvarez-Guardia D, *et al.* Resveratrol induces nuclear factor-kappaB activity in human cardiac cells[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 6(6): 1016-1026
- 8 Lamont KT, Somers S, Lacerda L, *et al.* Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanisms involved in resveratrol- and melatonin-induced cardioprotection[J]. *J Pineal Res*, 2011, 50(4): 374-380
- 9 Lee H, Zhang P, Herrmann A, *et al.* Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor-suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(20): 7765-7769
- 10 Quoc Trung L, Espinoza JL, Takami A. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55183
- 11 Agrawal M, Kumar V, Singh AK, *et al.* trans-Resveratrol protects ischemic PC12 cells by inhibiting the hypoxia associated transcription factors and increasing the levels of antioxidant defense enzymes[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(2): 285-294
- 12 Li H, Xia N, Förstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol[J]. *Nitric Oxide*, 2012, 26(2): 102-110 (收稿日期: 2013-05-02)
(修回日期: 2013-06-25)

(上接第 22 页)