

肺组织细胞自噬在内毒素诱导的急性肺损伤中发挥保护作用

郜 冶 王 妮 张 锦

摘 要 **目的** 探讨在内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)中肺组织细胞自噬是否发挥保护作用。**方法** 24只小鼠随机分为3组,每组8只。对照组(C):腹腔注射生理盐水;LPS组(L):腹腔注射LPS(30mg/kg);LPS+自噬拮抗剂组(L+3MA):在注射LPS前30min,腹腔注射3-MA(15mg/kg)。**结果** 肺组织细胞自噬被抑制后(p62水平增高,LC3 II/I水平及电镜每高倍镜视野的自噬小均数下降,差异有统计学意义($P<0.05$)),肺损伤加重,即TNF- α 、IL-6、肺泡灌洗液中总蛋白及肺泡灌洗液中IgM浓度明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 肺组织细胞自噬在内毒素诱导的急性肺损伤中发挥保护作用。

关键词 内毒素 急性肺损伤 自噬 3-甲基腺嘌呤

中图分类号 R563

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.024

Autophagy of the Lung Tissue Cells Play a Protective Role in Lipopolysaccharide - induced Acute Lung Injury in Rat. Gao Ye, Wang Ni, Zhang Jin. Department of Anesthesiology, Shengjing Affiliated Hospital, China Medical University, Liaoning 110004, China.

Abstract **Objective** To investigate the effect of autophagy of the lung tissue cells on lipopolysaccharide(LPS) - induced acute lung injury (ALI) in rat. **Methods** Twenty - four male C57BL/6 rats were randomly assigned to three groups, the control(C), LPS(L) and LPS + 3 - MA (methyladenine) (L + 3MA) groups. The three groups received different treatment, then light microscope and electronic microscopy were used to evaluate the degree of lung injury and the level of autophagy. The enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor alpha (TNF - α), interleukin - 6(IL - 6), the total protein of bronchoalveolar lavage fluid(BAL) and the concentration of IgM in BAL. The western blot was used to measure LC3 II / I and P62 in lung tissue. **Results** In the L + 3MA group, TNF - α , IL - 6, total protein of BAL and the concentration of IgM in BAL were increased($P<0.05$) compared to the L group. In the L group, the level of LC3 II / I and the number of autophagosome in every high magnification field increased, but the level of p62 declined, compared to the L + 3MA group. **Conclusion** Autophagy of the lung tissue cells play a protective role in lipopolysaccharide - induced acute lung injury in rat.

Key words Lipopolysaccharide; Acute lung injury; Autophagy; 3 - Methyladenine

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)以及其更严重的形式急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)为内毒素休克患者中病死率非常高的疾病。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为革兰阴性细菌的细胞壁成分,可引发炎症反应以及免疫系统功能紊乱,其可直接激活肺内炎症细胞,释放大炎症介质,并由此引发瀑布式炎症反应,导致ALI^[1]。自噬是存在于真核生物中的通过回收和再利用来维持细胞稳态和生存能力的一种高度保守的生物学过程,具有一定的保护性作用,负责将细胞中

损坏或无用的蛋白或细胞器降解,对细胞存活有重要作用^[2]。多种细胞信号能够对自噬的发生进行调节,包括营养缺乏、胰岛素及其他生长因子的存在或缺乏、缺氧等^[2]。另外,在炎症反应、氧化应激及内质网应激等应激反应时,自噬也可以被激活。但自噬在内毒素所致损伤中的作用目前仍不明确,相关研究的结论有所不同,因此本研究以LPS诱导的ALI小鼠为模型,并应用自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA),探讨肺组织细胞自噬与内毒素诱导的急性肺损伤的关系。为寻求ALI新的治疗方法奠定基础。

材料与方法

1. 材料:LPS购自美国Sigma公司;高效RIPA组织/细胞裂解液和3-MA购自Solarbio公司;TNF-

基金项目:沈阳市科技计划项目(F14-231-1-60)

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学盛京医院麻醉科

通讯作者:张锦,教授,主任医师,电子信箱:zhangj_sj@163.com

α 、IL-6、IgM 和 p62 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自沈阳博洋生物技术有限公司;抗-LC3B 抗体、羊抗兔 IgG 抗体和 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

2. 方法: (1) 动物及处理: 健康雄性 C57BL/6 野生型小鼠, 体重 22~25g, 有中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供。自由进食水, 环境温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50 \pm 10\%$, 12:12 小时昼夜节律, 实验研究遵循动物伦理委员会制定的指导原则。24 只小鼠随机分为 3 组, 每组 8 只。①对照组 (C): 腹腔注射生理盐水; ② LPS 组 (L): 腹腔注射 LPS (30mg/kg); ③ LPS + 3-MA 组 (L + 3MA): 在注射 LPS 前 30min, 腹腔注射 3-MA (15mg/Kg)。 (2) 标本的取材和制备: 注射 LPS 8h 后处死小鼠, 沿正中中线剪开颈部皮肤, 分离气管。用丝线在环状软骨下结扎头侧气管。在气管正中剪一 V 形切口, 用头皮针沿向心方向穿入气管内, 并用丝线固定。取注射器抽取预冷的 NS 1ml 注入肺腔, 轻轻按摩肺脏, 停留 1min 后再缓慢回抽支气管肺泡灌洗液。以上操作重复 15 次, 约 10~15ml 液体吸入离心管。3000r/min 离心 5min, 弃去上层悬液冷冻保存。取出肺泡灌洗液后, 立即开胸取出完整的肺组织, 用滤纸吸干血污, 取双下肺组织放入 -80°C 冰箱保存; 取右中上叶肺组织用 4% 多聚甲醛固定, 留做病理学检查。每组中随机取 2 份肺组织固定于 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中行透射电镜检

查肺组织超微结构。 (3) 光学显微镜分析: 取 4% 多聚甲醛溶液固定的肺组织, 常规石蜡包埋、切片, 切片厚 $5\mu\text{m}$, 行 HE 染色, 采用单盲法由专科医师在 AX70 Olympus 光学显微镜下阅片, 每张切片随机选择 5 个高倍镜视野, 观察肺组织病理学变化。 (4) 电子显微镜分析: 小鼠处死后, 迅速取出肺脏组织, 减压后固定于 4°C 2.5% 戊二醛固定液中 4h 半薄切片 (厚度 $1\mu\text{m}$) 定位, LKB-III 型超薄切片机切片 (厚度 70nm); 醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重电子染色; JEM-1200EX 型透射电子显微镜下观察、摄片。 (5) ELISA 分析: 按照 ELISA 操作说明, 测定肺组织中 TNF- α 、IL-6 浓度, 以及肺泡灌洗液中的中总蛋白及 IgM 浓度。 (6) Western blot 法分析: 蛋白分解在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上, 经过转膜, 封膜, 一抗、二抗, 最后曝光, 测量蛋白浓度。

3. 统计学方法: 实验数据用 SPSS 13.0 软件进行分析。所有数据采用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺组织 HE 染色结果: 与 C 组比较, L 和 L + 3MA 组两组肺组织均有损伤, 可见肺泡腔、肺间质弥漫性炎性细胞浸润, 部分区域肺泡隔断裂, 肺泡间隔增宽, 肺泡萎陷以及结构消失, 部分肺泡内可见出血, 以 L + 3MA 组更重 (图 1)。

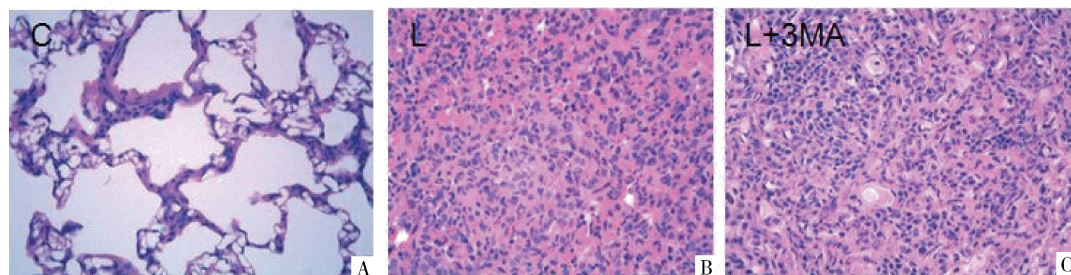


图 1 肺组织 HE 染色

A. C 组; B. L 组; C. L + 3MA 组

2. 肺组织炎性因子: L 和 L + 3MA 组分别与 C 组比较肺组织内炎性因子均有差异 ($P < 0.05$)。L + 3MA 组与 L 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

3. 肺泡灌洗液中总蛋白及 IgM 浓度: L 和 L + 3MA 组分别与 C 组比较, 肺泡灌洗液内总蛋白及 IgM 浓度差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。L + 3MA 组与 L 组比较肺泡灌洗液内总蛋白及 IgM 浓度差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

4. 肺组织 P62 水平: C 组与 L + 3MA 组比较, 肺组织中 P62 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。L 组分别与 C 组和 L + 3MA 组比较, 肺组织中 P62 水平差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

5. 肺组织中 LC3 II 及 LC3 I 的 Western blot 法检测结果: 经生物图像处理软件 Quantity One v4.62 进行灰度分析, LC3 II/LC3 I 结果, L 组相对较高, C 组次之, L + 3MA 组最低 (图 5)。

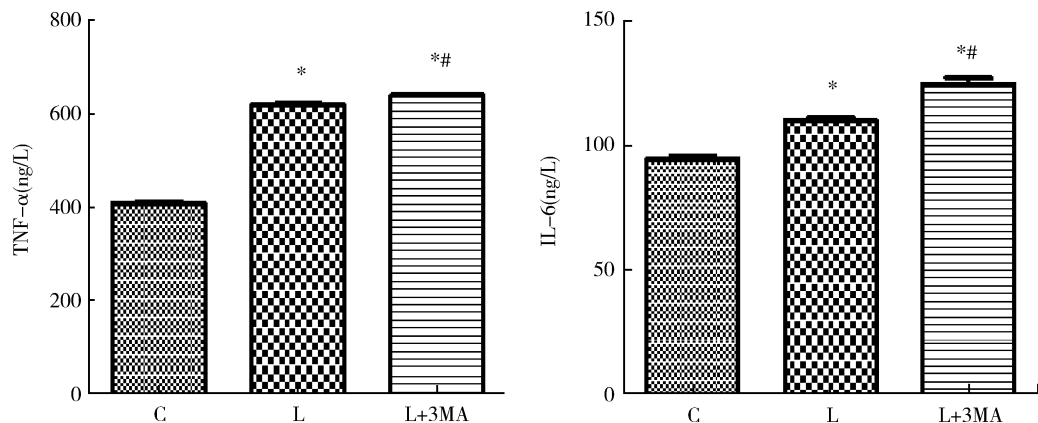


图2 肺组织炎症因子

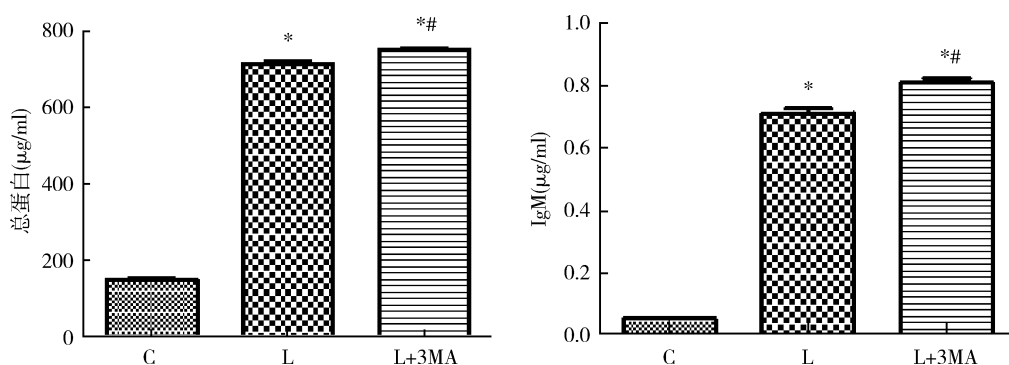
与C组比较, * $P < 0.05$; 与L组比较, # $P < 0.05$ 

图3 肺泡灌洗液中总蛋白及IgM浓度

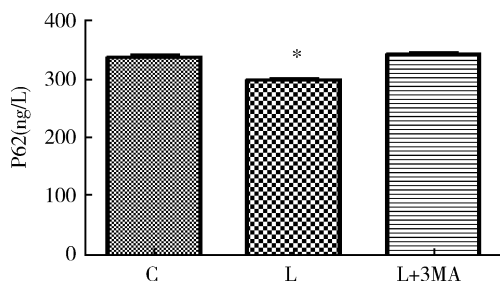
与C组比较, * $P < 0.05$; 与L组比较, # $P < 0.05$ 

图4 肺组织P62水平

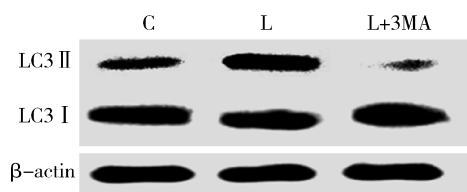
与C组比较, * $P < 0.05$ 

图5 肺组织中LC3 II及LC3 I的表达

每只小鼠制作1个电镜标本,每个标本连续切片(厚度 $1\mu\text{m}$),随机取5张切片,由专业人员采用盲法进行电镜下观察,在2万倍的视野下,每张切片随机选取5个视野,记录每个视野观察到的自噬小体数量,最后统计每组中观察到的自噬小体总数。每组中选取1张有代表性的电镜片展示如图6, L组与C组比较,每高倍镜视野下的自噬小体数量差异有统计学意义($P < 0.05$)。L组与L+3MA组比较,每个高倍镜视野下的自噬小体数量差异有统计学意义($P < 0.05$,图7)。

讨 论

ALI以及ARDS为临床常见疾病,具有病死率高,治疗费用昂贵,后遗症严重等特点,目前仍无特效治疗方法,其病理过程包括炎症细胞进入肺组织,肺毛细血管通透性增加以及肺间质水肿^[3,4]。ALI以及ARDS为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的一部分,而在MODS中,肺往往是最先受损器官。因此本实验选择LPS

6. 肺组织细胞中自噬小体的电镜观察结果:每组中小鼠处死后,迅速取肺尖组织,制作电镜标本。

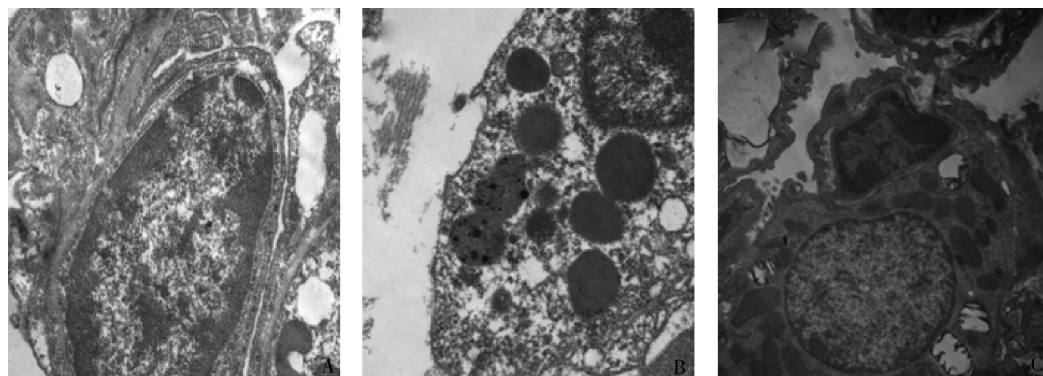


图 6 肺组织细胞中自噬小体的电镜观察结果

A. C 组; B. L 组; C. L + 3MA 组

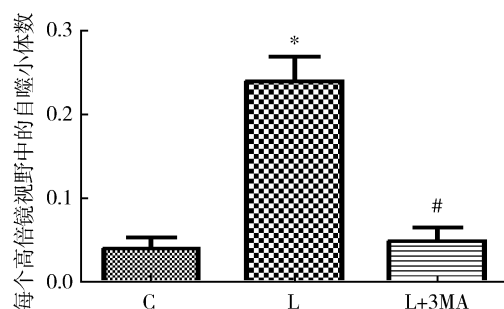


图 7 每个高倍镜视野中自噬小体的平均水平

与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 L 组比较, # $P < 0.05$

诱导的 ALI 小鼠为模型,寻求 ALI 新的有效的治疗方法。

自噬是维持细胞稳态和生存的一种生物学过程,分为 3 种类型:大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬^[2]。大自噬为细胞成分循环的一条通路,由基因控制,在真核细胞中普遍存在^[5]。生理条件下,自噬在细胞中蛋白质的周转以及细胞器的质量控制方面发挥着重要作用,另外,当机体细胞处于饥饿状态时,还可通过自噬降解自身高分子物质,从而延长细胞存活时间^[6,7]。自噬可由细胞周围环境的变化而诱发,其为哺乳动物应激反应的重要组成部分^[8]。有研究表明,自噬可以调节线粒体内稳态、执行程序性细胞死亡以及对先天和适应性免疫应答进行调节,进而参与一些病理过程,可影响疾病的结局^[9,10]。由于自噬可以维持细胞稳态和成分循环,在细胞生存方面发挥重要作用,那么自噬在病理情况下如 ALI 中是否也发挥相应的作用呢?

本实验应用 LPS 及 3-MA (是一种广泛应用的细胞自噬抑制剂^[11])腹腔注射,通过检测 LC3 II/I 以及电镜下观察自噬小体等自噬的敏感指标^[12,13],

明确各组自噬的水平,从而判断自噬在 LPS 诱导的 ALI 中的作用。由实验结果得出 L + 3-MA 组自噬水平较 L 组降低,同 C 组相近,说明自噬抑制剂 3-MA 成功抑制自噬的发生(图 4、图 5 和图 7);L + 3-MA 组与 L 组的肺损伤指标比较,可得 L + 3-MA 组肺组织炎性因子 $\text{TNF}-\alpha$ 、IL-6、肺泡灌洗液中总蛋白及 IgM 浓度明显高于 L 组,可知 L + 3-MA 组肺损伤较 L 组重(图 1 至图 3)。综上所述,可得出自噬在 LPS 诱导的 ALI 中是发挥保护作用的。

自噬在 ALI 中的确切作用仍需进一步研究。目前,关于自噬在 ALI 中的作用有许多不一致的结论,有研究表明在溺水导致的 ALI 中,自噬发挥破坏作用,自噬为导致肺损伤的重要因素^[14,15]。有实验显示局部缺血再灌注导致的肺损伤中,自噬能够破坏肺组织细胞稳态,导致 ALI^[16]。也有实验报道在盲肠结扎穿孔导致的 ALI 中,提高自噬能够减轻肺的损伤程度^[17,18]。另有研究显示出血休克导致的 ALI 中自噬具有抗炎的作用^[19]。本实验中笔者采用的给药剂量为 30mg/kg,在此剂量的 LPS 诱导的 ALI 中,得出自噬在 ALI 中是发挥保护作用的。

本实验的不足之处有以下几点,笔者只研究了 30mg/kg LPS 诱导的肺损伤中自噬的作用,自噬在其他 LPS 给药剂量下的作用仍不明确。本实验的取材时间为 LPS 腹腔注射后 8h,其他时间自噬的作用仍不明确。另外,在这项研究中笔者没有区分肺组织的哪种类型的细胞发挥作用,只是粗略地得出肺组织细胞自噬在 ALI 中的作用,具体哪种细胞仍需后续的一些细胞学研究。综上所述,本研究在 LPS (30mg/kg) 诱导的急性肺损伤中自噬发挥保护性作用,提示可以通过调节自噬水平的高低来治疗 ALI。

参考文献

- 1 Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, *et al.* Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide - induced acute lung injury[J]. *Res Res*, 2014, 15(1):150
- 2 Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox sign*, 2014, 20(3):460 - 473
- 3 Villar J, Blanco J, Anon JM, *et al.* The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation[J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(12):1932 - 1941
- 4 Herridge MS, Tansey CM, Matte A, *et al.* Canadian critical care Trials Group: functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(14):1293 - 1304
- 5 Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4):728 - 741
- 6 Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy[J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012:736905
- 7 Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biology*, 2011, 12(1):9 - 14
- 8 Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2):280 - 293
- 9 Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? [J] *Autophagy*, 2011, 7(5):457 - 465
- 10 Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330):323 - 335
- 11 Horwacik I, Gaik M, Durbas M, *et al.* Inhibition of autophagy by 3 - methyladenine potentiates sulforaphane - induced cell death of BE(2) - C human neuroblastoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):535 - 542
- 12 Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells[J]. *Seminars in Immunopathol*, 2010, 32(4):397 - 413
- 13 Chen C, Deng M, Sun Q, *et al.* Lipopolysaccharide stimulates p62 - dependent autophagy - like aggregate clearance in hepatocytes [J]. *BioMed Res Int*, 2014, 2014:267350
- 14 Liu Q, Zhou DX, Sun L, *et al.* Bone Marrow mesenchymal stem cells ameliorates seawater - exposure - induced acute lung injury by inhibiting autophagy in lung tissue [J]. *Pathol Research International*, 2014, 2014:104962
- 15 Liu QP, Zhou DX, Lin P, *et al.* Participation of autophagy in acute lung injury induced by seawater[J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(10):441 - 452
- 16 Hu R, Chen ZF, Yan J, *et al.* Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy - mediated alveolar macrophage apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1330
- 17 Yen YT, Yang HR, Lo HC, *et al.* Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis - induced acute lung injury[J]. *Surgery*, 2013, 153(5):689 - 698
- 18 Lo S, Yuan SS, Hsu C, *et al.* Lc3 over - expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(2):352 - 363
- 19 Wen Z, Fan L, Li Y, *et al.* Neutrophils counteract autophagy - mediated anti - inflammatory mechanisms in alveolar macrophage; role in posthemorrhagic shock acute lung inflammation [J]. *J Immunol*, 2014, 193(9):4623 - 4633

(收稿日期:2015 - 07 - 24)

(修回日期:2015 - 08 - 19)

DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 EZH2 在急性髓系白血病中的表达及相关性研究

吴圣豪 陈松燕 石岳坚 林弼靖 刘 珍 周文锦 郑翠苹

摘 要 **目的** 探讨 DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 EZH2 在急性髓系白血病(AML)中的表达及其相关性。**方法** 采用荧光定量 PCR 技术检测 50 例 AML 患者骨髓细胞中 DNMT1 与 EZH2 mRNA 的表达水平,分析 DNMT1 表达水平与临床特征和预后的关系以及与 EZH2 的相关性。**结果** 50 例 AML 患者骨髓细胞中 DNMT1 mRNA 的表达显著高于 30 例正常供者的(2.72 ± 0.73 vs 0.89 ± 0.27 , $P < 0.01$);EZH2 的表达水平也显著高于正常供者的(4.39 ± 1.06 , 1.87 ± 0.33 , $P < 0.01$);EZH2 与 DNMT1 的表达水平呈显著正相关($r = 0.51$, $P = 0.002$);DNMT1 表达水平与外周血幼稚细胞比例 $\geq 60\%$ ($P < 0.05$)、WBC $\geq 50 \times 10^9/L$ ($P < 0.05$) 显著相关;DNMT1 高表达组患者中位生存时间 15 个月(95% CI:9 ~ 19 个月),显著低于 DNMT1 低表达组患者的 32 个月(95% CI:27 ~ 40 个月)($P = 0.006$)。**结论** DNMT1 和 EZH2 在 AML 患者中均高表达,两者表达水平呈正相关,DNMT1 与 AML 患者预后不良相关。

基金项目:温州市科技计划项目(Y20130242)

作者单位:325000 温州市中心医院(温州医科大学定理临床学院)血液化疗科