

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.21.021

神经肽 P 物质对高氧肺损伤的保护作用调控机制研究*

李青¹,徐树红¹,李文莲¹,韩允¹,杨丹¹,杨胜林¹,邹莹波¹,许峰²,黄波^{1△}

(1.贵州省遵义市第一人民医院儿童保健科 563000;

2.重庆医科大学附属儿童医院儿童重症医学科 400014)

摘要:目的 观察 JNK2 信号途径在高氧肺损伤中的表达,探讨神经肽 P 物质(SP)在高氧肺损伤中的保护作用及机制。方法 将 16 只早产 SD 大鼠分配给代母鼠并分为 4 组(每组 n=4):空气加 9 g/L 盐水组(A 组),空气加 SP 组(B 组)、高氧加 9 g/L 盐水组(C 组)、高氧加 SP 组(D 组),B、D 组予腹腔注射 SP 1×10^{-6} mol · L⁻¹ · kg⁻¹ · d⁻¹,A、C 组腹腔注射同等体积的 9 g/L 盐水。实验 14 d 后,观察肺组织病理改变;并测定肺湿质量/干质量(W/D)值,肺组织中 SP 的水平;免疫组织化学观察增殖细胞核抗原(PCNA)表达和原位末端标记法(TUNEL)法观察肺组织细胞凋亡的情况;检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)水平;用 Western blot 检测 JNK2 蛋白水平。结果 与 A 组相比,高氧各组均有不同程度的肺损伤,但 D 组肺损伤较 C 组有所减轻。Western blot 显示,C 组 JNK2 水平明显高于 A 组;干预后,D 组 JNK2 水平低于 C 组。各组肺 W/D 值、PCNA 和 TUNEL 组织分布表达以及 SOD、MDA 和 GSH 的表达与 JNK2 蛋白水平变化趋势一致。结论 高氧应激可激活损伤肺组织 JNK2 活性;SP 对高氧肺损伤保护作用机制可能是通过下调高氧诱导的 JNK2 的激活以抑制氧化损伤实现的。

关键词:高氧肺损伤;JNK2;神经肽 P 物质

中图分类号:R563

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)21-2749-04

Protective effect of substance P on hyperoxia lung injury and its regulation*

Li Qing¹, Xu Shuhong¹, Li Wenlian¹, Han Yun¹, Yang Dan¹, Yang Shenglin¹, Zou Yingbo¹, Xu Feng², Huang Bo^{1△}

(1. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Zunyi City, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Children's Critical Care Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of JNK2 in hyperoxic lung injury, and explore the protective effect of substance P (SP) on hyperoxic lung injury and its mechanism. **Methods** Sixteen SD rats were divided into four groups with 4 rats in each group: room-air and f 9 g/L saline group (group A), room-air and SP group (group B), hyperoxia injury group and f 9 g/L saline group (group C), hyperoxia injury group and SP group (group D). Rats in group B and D were injected with SP 1×10^{-6} mol · L⁻¹ · kg⁻¹ · d⁻¹ intraperitoneally, group A and group C were injected with an equal volume of 9 g/L saline. The animals were sacrificed after 14 days of experiment. Lung pathology was examined with light microscopy, lung wet/dry (W/D) ratio and the level of SP and PCNA and TUNEL in lung were evaluated. The Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) level were assayed respectively in lung tissue. The quantity of JNK2 protein was detected by Western blot analysis. **Results**

Compared with group A, the high oxygen groups all had different degrees of lung injury, while the lung pathological pictures in group D was improved significantly compared with group C. Western blot showed that level of JNK2 in group C was obviously higher than that of group A; After the intervention, level of JNK2 in group D was lower than that of group C. The lung W/D ratio, TUNEL and PCNA expression and distribution SOD, MDA and GSH was consistent with the trends of JNK2 protein expression.

Conclusion High oxygen stress can activate damage lung tissue JNK2 activity; SP protection mechanism of high oxygen lung injury may be induced by cutting high oxygen activation of JNK2 to inhibit oxidative damage.

Key words: hyperoxic lung injury; JNK2; substance P

早产儿肺发育不成熟导致急性缺氧性呼吸衰竭常需高浓度氧疗,氧疗能改善血氧供给,提高血氧饱和度,防止由于缺氧、酸中毒而导致的重要器官功能受损。高氧肺损伤是指高浓度氧疗在改善机体供氧的同时引起的肺结构和功能的异常^[1-2]。高氧暴露刺激肺组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成并导致细胞活性的改变,造成肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞结构的改变和功能的损害,从而导致严重的肺氧化应激损伤^[3-4]。高氧引起的肺损伤机制尚未完全阐明,

其中 ROS 导致大量细胞因子的产生和各种信号通路的激活,在高氧引起的早期急性肺损伤中起着重要作用。近年来丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路是细胞内一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在炎症、凋亡、组织损伤方面的调控作用成为了研究热点。P 物质(substance P, SP)是最早发现的速激肽家族神经肽,广泛分布于气道上皮细胞层中,包括肺血管、气管和支气管平滑肌内及腺体和支气管神经节周围,SP 具有多种生物学活性。研究表明,SP 能对修复细胞的增殖、迁移和分化起

* 基金项目:贵州省卫生厅科学技术基金项目(gzkwj2011-1-092);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2011]2341 号)。 作者简介:李青(1971-),副主任医师,本科,主要从事儿童生长发育学研究。 △ 通讯作者, E-mail:672879381@qq.com。

调控作用。SP 能否修复高氧肺损伤,且是否与 MAPK 通路中的 JNK 信号蛋白有关,目前尚不清楚,此问题将在本课题探讨。

1 材料与与方法

1.1 动物 体质量 200~250 g 的 12 只健康成年雌性 SD 大鼠,分为 6 组,每组 2 只。每组放入 1 只雄鼠过夜,第 2 日晨查见阴栓记为妊娠第 1 天,将孕鼠分笼饲养并于第 21 天(足月为 22 天)时行剖宫产取出早产鼠。

1.2 方法

1.2.1 分组与建模 4 窝早产 SD 大鼠出生 12~24 h 内聚拢,分别分配给代母鼠并分为 4 组(每组 $n=4$):空气加 9 g/L 盐水组(A 组),空气加 SP 组(B 组)、高氧加 9 g/L 盐水组(C 组)、高氧加 SP 组(D 组),C、D 组持续暴露于高氧中,B、D 组予腹腔注射 $SP 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,A 组和 C 组腹腔注射同等体积的 9 g/L 盐水。用如下方法构建早产鼠(孕第 21 天 SD 胎鼠仔)高氧肺损伤模型,代母鼠每 24 小时在 4 组之间轮换 1 次,以避免氧中毒并排除不同组间代母鼠影响。高氧暴露在自制氧箱(90 cm × 60 cm × 50 cm)内完成,氧流量 5 L/min,连续检测氧浓度(CYS-1 数字测氧仪,上海嘉定电子仪器厂),使之维持在 85%左右。早产大鼠高氧或空气暴露 4 d,昼夜各 12 h,室温维持在 24~25 °C,自由进食和水,每天开箱 15 min 进行清扫,无水氯化钙和生石灰吸收水蒸气和 CO₂ 并每天更换。

1.2.2 标本制备和指标检测 全部动物于生后 14 d 取材,3.5%水合氯醛(10 mL/kg)腹腔麻醉大鼠,开胸并结扎右肺,剪开左心耳,右心室注入含肝素的生理盐水,直到左心耳流出的液体清亮为止,分离心、肺。右中肺行形态学检查,其余右肺行肺湿质量/干质量(W/D)值测定。左肺称质量,置于-70 °C 冰箱备用。留取右中肺组织,经 4%多聚甲醛固定,常规进行切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织形态学改变。右肺其余部分称湿质量后置 80 °C 温箱,48 h 后称量肺干质量,计算肺 W/D 值,评定急性炎症反应和肺水肿程度。用放射免疫法检测 SP 水平的变化。

1.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)水平的检测 用预冷的 9 g/L 盐水洗净余下右肺组织,吸干水分,称 1 克湿质量肺组织剪碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成 10% 的组织匀浆,4 °C 低温离心机 3 000 r/min 离心 10

min 后取上清液,按照南京建成生物工程研究所提供试剂盒要求,分别采用硫代巴比妥酸法、亚硝酸盐法检测,二硝基苯甲酸法用分光光度剂依次在 532、550、422 nm 处测定其吸光度(A)值,用所给公式分别计算其质量浓度。

1.2.4 增殖细胞核抗原(PCNA)表达 采用免疫组织化学 SP 法,DAB 显色,细胞核呈棕黄色为阳性。

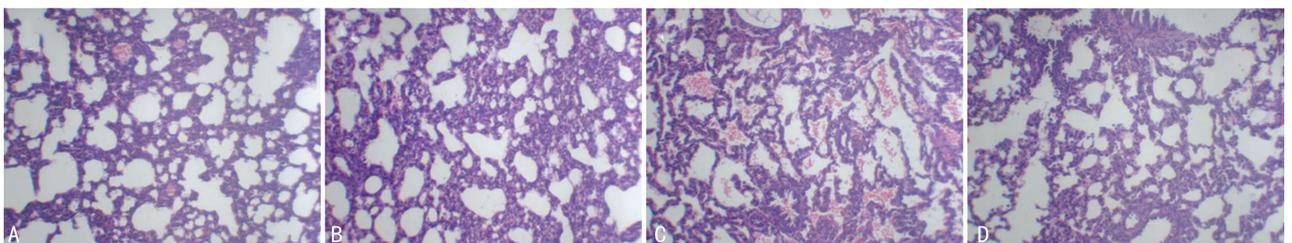
1.2.5 采用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡 实验步骤按试剂盒说明书进行。取组织切片按常规方法脱蜡至水,加入蛋白酶 K 作液,21 °C 至 37 °C 反应 15~30 min,30 mL/L H₂O₂ 室温下(15~25 °C)封闭 10 min,滴加 50 μL TUNEL 反应混合液(酶反应液与标记液的比例为 1:9),湿盒中 37 °C 避光湿润反应 1 h。再滴加 50 μL Converter2POD,湿盒中 37 °C 避光湿润反应 30 min,DAB 显色,苏木素复染、脱水、透明、封片。结果判断:胞核呈现棕黄色为阳性细胞。

1.2.6 Western blot 法检测 JNK2 蛋白水平 称取肺组织,按每 100 mg 组织加入 0.5 mL 改良 RIPA 缓冲液[Tris-HCl 50 mmol,NaCl 150 mmol,乙二胺四乙酸(EDTA)1 mmol,NaF 50 mmol,Na₂P₂O₇ 2.5 mmol,Na₃VO₄ 1 mmol,Triton X-100 1%,甘油 10%,十二烷基硫酸钠(SDS) 0.1%,脱氧胆酸钠 0.5%,leupeptin 100 μmol,PMSF 1 mmol],充分匀浆。冰浴 30 min,4 °C 12 000 × g 离心 30 min,取上清液-20 °C 保存。BCA 比色法测定蛋白质浓度。制胶,以等体积 2 × 上样缓冲液混匀待测蛋白,加样(50 μg 上样量),行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)电泳,电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,以 5%脱脂牛奶封闭 1 h,JNK2 抗体 4 °C 孵育过夜(1:1 000),二抗(1:2 500)孵育 1 h,ECL 工作液孵育 5 min,用 Quantity One 图像采集系统及分析软件(美国 Bio-Rad 公司)对蛋白条带进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件处理实验相关数据,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别采用 *t* 检验,组内差别采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学比较 观察肺组织以及病理学检查后发现高氧 14 d 之后,A、B 组肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡间隔无水肿。C 组肺表面见点片状或斑片状出血,切面见红色泡沫样液体渗出,肺泡内有出血和大量渗出的炎症细胞,肺泡壁及肺泡严重水肿状。D 组肺表面出血点明显减少,肺泡结构紊乱有一定程度的改善,见图 1。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 1 各组大鼠 HE 染色 14 d 肺组织病理结果(HE × 200)

2.2 肺 W/D 值测定 测定早产大鼠暴露于高氧后不同时间的 W/D 值,其中 A 组为 5.032 ± 0.102 ,B 组为 5.084 ± 0.089 ,C 组为 5.623 ± 0.162 ,D 组为 5.316 ± 0.106 。C 组肺 W/D 在第 14 天明显高于 A 组($P < 0.05$);D 组与 C 组肺 W/D 在第

14 天差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 SP 水平的测定 测定早产大鼠第 14 天肺组织中 SP 的水平,其中 A 组为 $(1 034 \pm 125)$ pg/mL,B 组为 $(6 695 \pm 440)$ pg/mL,C 组为 $(1 244 \pm 188)$ pg/mL,D 组为 $(6 690 \pm 563)$

pg/mL。B、D 两组腹腔注射 SP 之后,肺组织中第 14 天的 SP 水平与 A 组相比均显著升高($P < 0.01$)。

表 1 早产大鼠肺组织第 14 天 SOD、MDA 和 GSH 水平测定

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	GSH(U/mg)
A 组	355±15	3.21±0.32	57.3±1.91
B 组	358±35	3.24±0.43	53.2±3.1
C 组	142±25 ^a	6.77±0.15 ^a	27.9±1.6 ^a
D 组	250±41 ^b	4.95±0.42 ^b	40.4±3.1 ^b

^a: $P < 0.05$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,与 C 组比较。

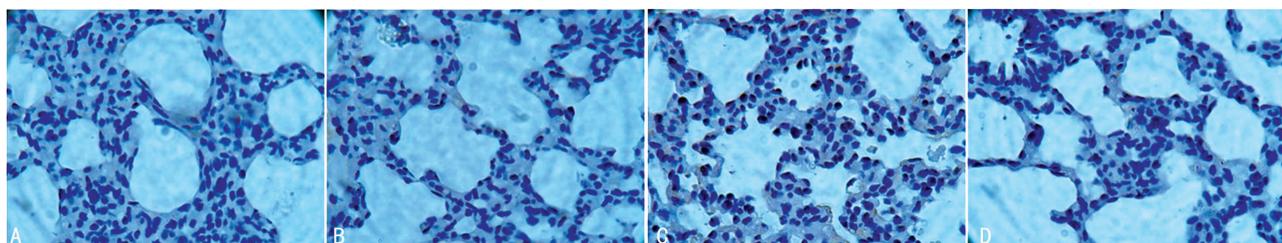
2.4 SOD、MDA、GSH 测定 C 组早产 SD 大鼠肺组织第 14 天 SOD 和 GSH 的活力显著降低($P < 0.05$),而 MDA 的活力则显著增强($P < 0.05$)。SP 干预之后,D 组与 C 组比较有显著的改善,见表 1。

2.5 高氧肺损伤或补充 SP 后肺细胞凋亡蛋白 PCNA 的变化

PCNA 检测结果显示,C 组和 A、B 组相比,高氧暴露 14 天后,支气管上皮、肺泡上皮等细胞中 PCNA 阳性细胞明显增加,而腹腔注射 SP 后,阳性细胞有所减少,见图 2。

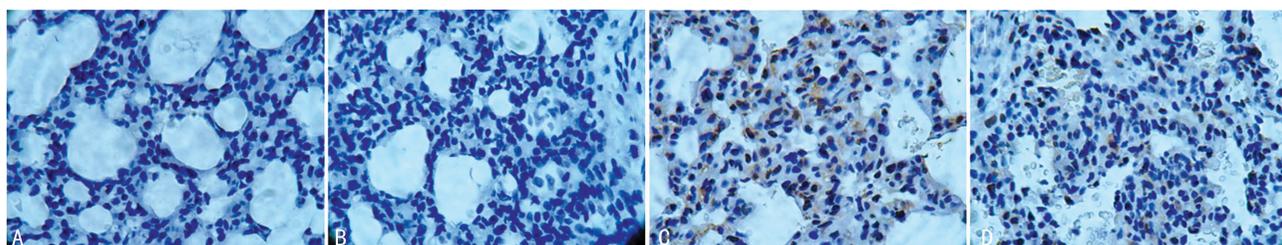
2.6 高氧肺损伤或补充 SP 后肺细胞凋亡指数变化 A、B 组肺组织中少见 TUNEL 阳性细胞。而 C 组暴露 14 d 肺组织中可见大量 TUNEL 阳性细胞,与 A 组比较,肺组织细胞凋亡指数显著增加。而 D 组腹腔注射 SP 之后,第 14 天肺组织 TUNEL 阳性细胞则明显减少,见图 3。

2.7 肺组织 JNK2 蛋白水平变化及 SP 的调控作用 JNK2 在第 14 天的表达在 A、B 组中差异无统计学意义($P > 0.05$),C 组明显上升,而 D 组在腹腔注射 SP 后,JNK2 的表达有所恢复,见图 4。



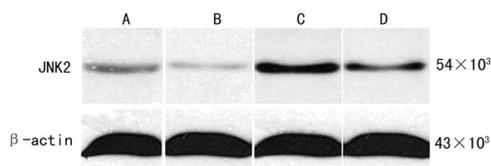
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 2 PCNA 在高氧肺损伤表达及 SP 干预 14 d 后的表达(免疫组织化学×200)



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 3 高氧肺损伤及 SP 干预 14 d 后 TUNEL 染色结果(TUNEL×200)



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组

图 4 各组肺组织在第 14 天 JNK2 蛋白表达情况

3 讨论

急性缺氧性呼吸衰竭的救治通常需要进行高浓度的氧疗,但高浓度氧是一把双刃剑,保证重要脏器的氧气供应的同时也会引起机体肺结构和功能的损害,即高氧肺损伤,轻度影响患者的生活质量,重度可危及患者生命安全。对早产或新生儿等正在发育中的肺组织进行高浓度氧疗后,高氧甚至会造成不可逆的畸形发育,导致如支气管肺发育不良、肺气肿等慢性肺疾病^[5]。高氧诱导的急性肺损伤主要的特征包括聚集炎症细胞,增加肺组织通透性以及血管内皮和肺泡上皮细胞的损伤和(或)凋亡^[6-7]。进一步探索高氧肺损伤的发病机制及研发相关的防治药物具有重要的理论及现实意义。

PCNA 是 DNA 聚合酶的一种辅助蛋白,在 DNA 复制和修复过程中发挥重要作用,PCNA 表达程度可反映细胞 DNA 修复的情况,并与高氧肺损伤时细胞增殖状况相关。本研究发现 SP 可以改变支气管上皮、肺泡上皮等细胞中 PCNA 阳性细胞的增加。另外,MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化而形成的脂质过氧化产物。肺是富含脂质的器官,高浓度氧气容易导致其受到氧自由基的攻击,形成脂质过氧化物,其进一步分解又能引起细胞损伤^[8]。本研究显示,高氧暴露 14 d 后,肺组织中 MDA 水平显著增加,说明在高氧肺损伤时有大量的脂质过氧化物产生,这种氧化性损害持续存在,氧自由基与肺部脂质发生过氧化反应,引发脂质过氧化连锁反应。而 SOD 和 GSH 是抗氧化酶类,SOD 和 GSH 的高低可以间接反映机体清除氧自由基的能力^[9-10]。本研究显示高氧暴露 14 d 后 SOD 和 GSH 的活性显著降低。氧化/抗氧化失衡可以进一步引起蛋白质损伤、DNA 损伤、改变信号传导通路、刺激转录因子活化、诱导细胞凋亡,引起肺组织的过度损伤。

MAPK 信号通路中包括 ERK、JNK 和 p38 激酶 3 个亚族

成员。其中编码 JNK 的基因有 JNK1、JNK2、JNK3,相应地编码产物 JNK1/JNK2 在各种组织中广泛表达,JNK 可被多种因素如细胞因子、生长因子、应激(如热休克、氧化损伤、电离辐射等)等激活,激活的 JNK 信号通路在细胞分化、细胞凋亡、炎症反应等发生发展过程中起到至关重要的调节作用。JNK 参与了如胚胎发育、免疫反应和细胞分化等重要的生理过程,在糖尿病、心脏肥大中也有涉及^[11],其过度活化被证实与多种肿瘤的发生发展密切相关^[12-13]。本实验中发现高氧肺损伤激活了 JNK2 信号蛋白。

研究表明 SP 在修复细胞的增殖、迁移、分化方面有重要作用^[14],在气道损伤、烧伤修复的患者血浆 SP 均明显升高。在无血清培养基中加入 SP,培养的肌细胞进入 S 期的数量明显增加。SP 对角质细胞、平滑肌细胞、成骨细胞、血管内皮细胞均有明显的促增殖分化作用^[15-16]。本研究发现,外源性 SP 干预后通过抑制 JNK2 的表达,肺组织病理学形态有一定程度的改善,炎症细胞浸润减少,水肿减轻,且肺 W/D 值均较高氧暴露 SD 大鼠显著下降。本研究为探讨高氧肺损伤的药物防治提供了新的依据。

参考文献:

- [1] Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, et al. Hyperoxia-induced reactive Oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006,34(4):453-463.
- [2] Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury [J]. *Respir Care*, 2013,58(1):123-141.
- [3] Sharek PJ, Baker R, Litman F, et al. Evaluation and development of potentially better practices to prevent chronic lung disease and reduce lung injury in neonates[J]. *Pediatrics*, 2003,111(4 Pt 2):e426-431.
- [4] Faller S, Spassov SG, Zimmermann KK, et al. Hydrogen sulfide prevents hyperoxia-induced lung injury by down-regulating reactive Oxygen species formation and angiotensin-2 release[J]. *Curr Pharm Des*, 2013,19(15):2715-2721.
- [5] Gordo-Vidal F, Calvo-Herranz E, Abella-Alvarez A. Hyperoxia induced pulmonary toxicity[J]. *Med Intensiva*, 2010,34(2):134-138.
- [6] Bhandari V. Molecular mechanisms of hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Front Biosci*, 2008,13:6653-6661.

- [7] Konsavage WM, Umstead TM, Wu Y, et al. Hyperoxia-induced alterations in the pulmonary proteome of juvenile rats[J]. *Exp Lung Res*, 2013,39(2):107-117.
- [8] Tarhan OR, Ceylan BG, Kapucuoglu N, et al. Activated protein C and normal saline infusion might prevent deleterious effects of remote acute lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion: an experimental study in the rat model[J]. *J Surg Res*, 2011,168(1):e81-86.
- [9] Starr ME, Ueda J, Yamamoto S, et al. The effects of aging on pulmonary oxidative damage, protein nitration, and extracellular superoxide dismutase down-regulation during systemic inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011,50(2):371-380.
- [10] Chen Y, Nie YC, Luo YL, et al. Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013,58:133-140.
- [11] Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes[J]. *Diabetes*, 2005,54(Suppl 2):S73-78.
- [12] Mueller H, Fhry N, Eppenberger-Castori S, et al. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast Cancer[J]. *Ontology*, 1999,57(Suppl 2):37-44.
- [13] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in Cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009,9(8):537-549.
- [14] Carthew HL, Ziebell JM, Vink R. Substance P-induced changes in cell genesis following diffuse traumatic brain injury[J]. *Neuroscience*, 2012,12(214):78-83.
- [15] Ito T, Ogura T, Ogawa N, et al. Modulation of pulmonary neuroendocrine cells in idiopathic interstitial pneumonia [J]. *Histol Histopathol*, 2002,17(4):1121-1127.
- [16] Stathis M, Pietra C, Rojas C, et al. Inhibition of substance P-mediated responses in NG108-15 cells by netupitant and palonosetron exhibit synergistic effects [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012,689(1/3):25-30.

(收稿日期:2014-01-08 修回日期:2014-03-09)

(上接第 2748 页)

- Neurosci, 2010,11(5):339-350.
- [11] Yang L, Zhang Z, Sun D, et al. Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011,26(5):495-502.
- [12] Snaphaan L, van der Werf S, Kanselaar K, et al. Post-stroke depressive symptoms are associated with post-stroke characteristics [J]. *Cerebrovascular Dis*, 2009,28(6):551-557.
- [13] Mineur YS, Picciotto MR. Nicotine receptors and depres-

sion; revisiting and revising the cholinergic hypothesis [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010,31(12):580-586.

- [14] Chung YC, Kim SR, Park JY, et al. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation[J]. *Neuropharmacology*, 2011,60(6):963-974.
- [15] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression[J]. *Nature*, 2008,455(7215):894-902.

(收稿日期:2014-02-25 修回日期:2014-04-10)