

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.26.005

血红素加氧酶-1 在高氧肺损伤小鼠中的表达及作用*

罗喜钢¹, 王毅¹, 张凤香^{2△}

(1. 锦州医科大学附属第三医院检验中心, 辽宁锦州 121001;

2. 锦州医科大学附属第一医院胸外科, 辽宁锦州 121001)

[摘要] **目的** 探讨血红素加氧酶-1(HO-1)在高氧造成的肺损伤转基因小鼠和正常小鼠中的肺部表达水平及其作用。**方法** 把 32 只新生小鼠分成 4 组:野生型组(WT 组),特异性转基因小鼠全高表达 HO-1 组[HO-1-FL(H)组,细胞质],特异性转基因小鼠全低表达 HO-1 组[HO-1-FL(L)组,细胞质]和切去 C 末端 HO-1(Nuc-HO-1-TR 组,细胞核)。把 4 组小鼠暴露在高氧环境中 3 d,然后放到正常空气环境中,通过免疫组织化学、免疫荧光等实验技术来观察小鼠 3 d、7 d 和 14 d 肺泡发育情况及 HO-1 在小鼠肺部表达情况。**结果** HO-1 在 HO-1-FL(H)组小鼠肺部高表达,高氧暴露 3 d 后 4 组小鼠肺部肺泡发育都受到了损害,在正常空气环境中 7、14 d 时 HO-1-FL(H)组小鼠的肺泡发育恢复得最好。**结论** 小鼠肺部适度高水平的 HO-1 表达有助于高氧环境造成的小鼠肺损伤的恢复。

[关键词] 肺损伤;血红素加氧酶-1;基因敲除小鼠**[中图分类号]** R-332**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)26-3614-03

Expression and role of heme oxygenase-1 in mouse lung injury induced by hyperoxia*

Luo Xigang¹, Wang Yi¹, Zhang Fengxiang^{2△}

(1. Laboratory Center, Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China;

2. Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of heme oxygenase-1 in lungs of transgenic mice and normal mice and its effects. **Methods** 32 newborn mice were divided into four groups: wild-type group (WT group), specific transgenic mice expressed hemoglobin oxygenase-1 high level group[HO-1-FL(H) group, cytoplasm], low level WT group[HO-1-FL(L) group, cytoplasm] and the C-terminal heme oxygenase-1 group(Nuc-HO-1-TR group, nucleus). Then four groups of mice were exposed to high oxygen for 3 days, after that placed in normal air environment. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to observe the alveolar development and hemoglobin addition at 3 days, 7 days and 14 days oxygenase-1 expression in the lungs of mice. **Results** The levels of heme oxygenase-1 were significantly higher in the lungs of HO-1-FL(H) group, and the alveolar development in the lungs of the four groups after 3 days of hyperoxia exposure was impaired. In the normal air environment, the recovery of alveolar development in HO-1-FL(H) group on the 7th and 14th day was the best. **Conclusion** The moderately high levels of heme oxygenase-1 expression in the lungs contribute to the recovery of lung injury in mice caused by hyperoxic environments.

[Key words] pulmonary injury; heme oxygenase-1; knockout mice

血红素加氧酶-1(HO-1)是内质网的锚定蛋白^[1],在新生儿肺中含量丰富,但不响应于高氧的诱导^[2-3]。HO-1 高水平的超表达与体外氧的细胞毒性相关联^[4-5]。同成人比较,暴露高氧中的新生小鼠 HO-1 局限于细胞核中^[6-7]。本研究对 HO-1 表达水平与亚细胞定位进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要实验仪器设备及耗材 全自动生化分析仪(日立 7600-110),液氮冰箱(海尔),生物组织自动包埋机(KH-BL),切片机(KH-Q380),气相色谱仪(北京恒通瑞利 GC6891N),荧光显微镜(奥林巴斯)。

1.1.2 主要试剂及药品 盐酸氯胺酮(西安汉丰药业),甲苯噻嗪盐酸盐、磷酸盐缓冲液(PBS,武汉普诺赛),抗血凝素(HA)、抗小鼠肺表面活性物质蛋白(SP-C)抗体、抗波形蛋白抗体、抗 α -平滑肌肌动蛋白抗体、抗 CD45,核质提取试剂盒

(NE-PER, Sigma)。

1.1.3 实验对象 实验动物为锦州医科大学实验动物中心提供的 SPF 级新生小鼠。小鼠分成 4 组,每组 8 只,即野生型组(WT 组),特异性转基因小鼠全高表达 HO-1 组[HO-1-FL(H)组,细胞质],特异性转基因小鼠全低表达 HO-1 组[HO-1-FL(L)组,细胞质]和转基因小鼠切去 C 末端 HO-1 组(Nuc-HO-1-TR 组,细胞核)。

1.2 方法 (1)本研究把 4 组新生的小鼠幼崽分到含正常空气容器和含 95%氧气的容器内,其中 95%氧气的容器能够连续监测、调节氧和二氧化碳的含量,在此容器内小鼠被暴露于高氧环境中 3 d,然后放到正常环境中恢复,一直持续到第 2 周结束。(2)肺组织收集:小鼠被腹腔注射盐酸氯胺酮(100 mg/kg)和甲苯噻嗪盐酸盐(10 mg/kg)进行麻醉,肺动脉用 PBS 进行灌注后,切下右肺放入液氮中冷冻保存并进行蛋白质分析,左肺膨胀并用 10%中性甲醛固定 24 h^[8]。肺组织被石

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81541099)。 作者简介:罗喜钢(1980—),硕士,主管检验师,主要从事体液酶学方面研究。 △

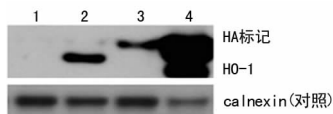
通信作者,Email:zhangfengxiang64@163.com。

蜡包埋制成 5 mm 厚切片,固定在载玻片上。(3)免疫组织化学:本研究使用生物素化抗增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组织化学染色作为细胞增殖的一般标记,蛋白印记分析作为细胞凋亡的标记。石蜡包埋的组织切片用免疫荧光或修饰后的生物素进行间接染色,切片在 4 °C 的温度下和抗血凝素(HA)、PCNA、抗 SP-C、抗波形蛋白、抗 α -平滑肌肌动蛋白及抗 CD45 抗体一起过夜孵育,然后在荧光显微镜下进行观察。(4)免疫沉淀,使用 NE-PER 核质提取试剂盒,抗 HA 结合到琼脂糖珠上进行免疫沉淀反应^[8];组织裂解液转移至旋转柱,接着加入抗 HA 琼脂糖珠上 4 °C 孵育过夜。旋转柱子移除组织裂解物,洗涤珠子。还有一部分和钙连蛋白(calnexin)抗体进行免疫沉淀,免疫沉淀得到的蛋白质进行洗涤和免疫印记。(5)HO-1 活性测定:以 CO 产生量用气相色谱仪进去测定,间接测定出 HO-1 活性^[9]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 *q* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HA 标记肺组织的 HO-1 的表达 用 HA 标记的 HO-1 在 HO-1-FL(H)组小鼠肺部特异性的高表达,而在其他类型小鼠少量表达或无表达,见图 1、2。通过免疫荧光方法观察 HA 染色的肺泡上皮细胞的表达与分布,在 HO-1-FL(H)组中能看到大量的绿色荧光,而在 HO-1-FL(L)组和 Nuc-HO-1-TR 组上有少量的绿色荧光,WT 组上没有绿色荧光,HO-1 在 HO-1-FL(H)组肺泡上皮细胞上大量分布,见图 2。



1:WT 组;2:Nuc-HO-1-TR 组;3:HO-1-FL(L)组;4:HO-1-FL(H)组
图 1 HO-1 在小鼠肺部的表达

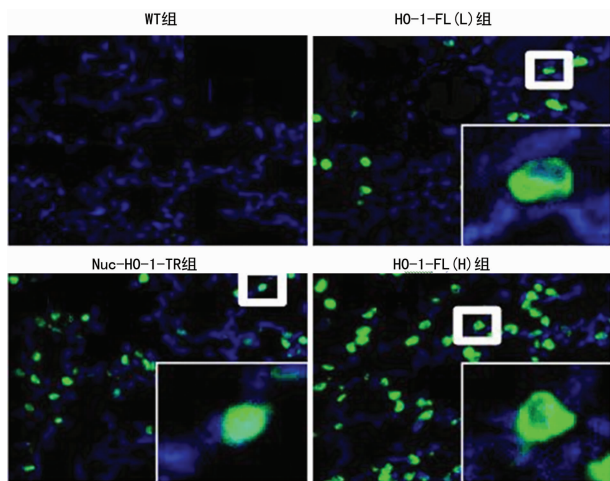


图 2 小鼠 HA 染色(绿色)图和细胞核 DAPI 染色(蓝色)图($\times 400$)

2.2 肺部 HO-1 酶活性的测定 总 HO-1 酶活性 HO-1-FL(H)组高于 WT 组($P < 0.05$),HO-1 酶活性在 HO-1-FL(L)和 Nuc-HO-1-TR 组与 WT 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

2.3 在高氧和恢复之后肺泡发育受到损害程度的比较 在正常空气环境中,WT 组小鼠发展成有序的通气道,与之相反,

WT 组新生小鼠暴露高氧环境中 3 d,肺泡的发育受到损害,导致肺泡简化和肺组织辐射状肺泡计数(RAC)均显著降低。HO-1-FL(L)组在高氧环境中的 RAC 也较差,但同暴露在高氧中 WT 组相比,在正常空气中恢复后,RAC 得到了显著提高。与此相反,Nuc-HO-1-TR 组和 HO-1-FL(H)组在 14 d 时后,RAC 均得到了显著提高,见图 4。

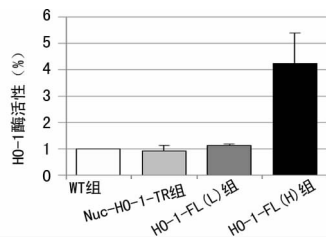


图 3 14 d 小鼠肺部 HO-1 酶活性计数

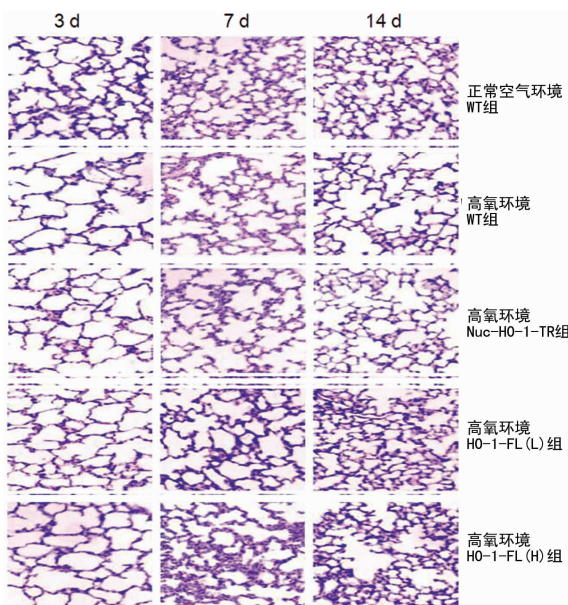


图 4 肺泡发育受损程度的比较

2.4 高氧暴露后肺细胞增殖和细胞凋亡情况 在正常空气环境中,4 组小鼠肺部 PCNA 阳性细胞数量相差不多。而在高氧环境中,除 HO-1-FL(H)组外,其余 3 组细胞数大量减少,见图 5。

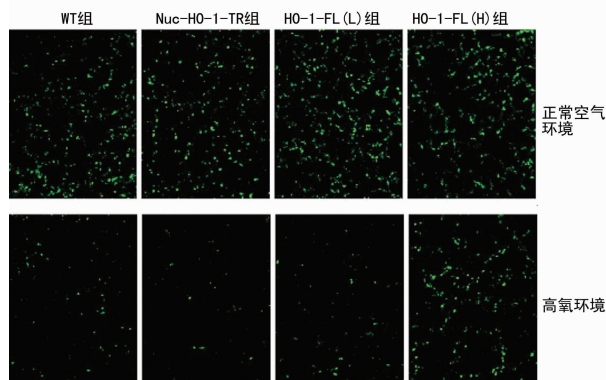


图 5 高氧暴露 3 d 后 PCNA 免疫组织化学染色(绿色)

3 讨论

虽然,高氧环境在自然界中尚未证实存在,但是在临床环境和适应性反应中存在这种挑战^[10-11]。暴露在高氧环境中成年啮类动物被观察到的 HO-1 的诱发是一种保护作用,但是

新生小鼠在同样的条件下,肺部的 HO-1 没有被诱导^[12-13]。本研究先前已经表明,低水平的 HO-1 表达是有益的^[14-15],但是在体外研究表明 HO-1 表达的增加也是有益的^[6,12],这就暗示 HO-1 的有益表达是有阈值的。本课题组的研究表明,HO-1 的表达的程度和它细胞内表达定位改变着它在小鼠体内的保护能力。

本研究模拟临床环境,新生转基因小鼠暴露高氧中 3 d 后,然后放在正常空气中恢复,这个模型用来评估新生小鼠急性肺损伤和修复。同经过 3 d 高氧环境的 WT 组相比,HO-1-FL(H)组在第 14 d 从肺损伤中完全恢复。这表明 HO-1 在肺上皮细胞中的适度表达在高氧引起的肺损伤的恢复起着至关重要的作用。

综上所述,本研究构建出一种新生小鼠对高氧环境应激反应模型,通过 HO-1 在转基因小鼠和野生型小鼠肺部表达的对比,研究得出适度的 HO-1 在肺部表达有益小鼠急性肺损伤的恢复,为进一步的研究工作奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] An J, Li T, Dong Y, et al. Terminalia chebulanin attenuates psoriatic skin lesion via regulation of heme oxygenase-1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2):531-543.
- [2] Noda M, Doi Y, Liang J, et al. Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(27):14388.
- [3] Go H, La P, Namba F, et al. MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2):L400-411.
- [4] Iho S, Maeyama J, Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(4):755-760.
- [5] Ko SH, Rhoda J. Bacteroides fragilis enterotoxin upregulates heme oxygenase-1 in intestinal epithelial cells via a mitogen-activated protein kinase- and NF- κ B-dependent pathway, leading to modulation of apoptosis [J]. *Infect Immun*, 2016, 84(9):2541-2554.
- [6] Prado E. Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era [J]. *Innate immunity*, 2013, 19(1):227-241.
- [7] Cheng X, Gao D, Chen B, et al. Endotoxin-binding peptides derived from casein glycomacropeptide inhibit lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses via blockade of NF- κ B activation in macrophages [J]. *Nutrients*, 2015, 7(8):3119-3137.
- [8] Negi G, Nakkina V, Kamble P, et al. Heme oxygenase-1, a novel target for the treatment of diabetic complications: focus on diabetic peripheral neuropathy [J]. *Pharmacol Res*, 2015(102):158-167.
- [9] Russell Cruz C, Bollard CM. T-cell and natural killer cell therapies for hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: enhancing the graft-versus-leukemia effect [J]. *Haematologica*, 2015, 100(6):709-719.
- [10] Lee HS, Lee JG, Yeom HJ, et al. The Introduction of human heme oxygenase-1 and soluble tumor necrosis factor- α receptor type I with human IgG1 Fc in porcine islets prolongs islet xenograft survival in humanized mice [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(1):44-57.
- [11] Allin KH, Nordestgaard BG, Zacho J, et al. C-reactive protein and the risk of cancer: a mendelian randomization study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(11):202-206.
- [12] Cheng HT, Yen CJ, Chang CC, et al. Ferritin heavy chain mediates the protective effect of heme oxygenase-1 against oxidative stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(12):2506-2517.
- [13] Wu MM, Chiou HY, Lee TC, et al. GT-repeat polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter and the risk of carotid atherosclerosis related to arsenic exposure [J]. *J Bio Med Sci*, 2010, 17(6):70.
- [14] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2731-2740.
- [15] Aird WC, Mosnier LO, Fairhurst RM. Plasmodium falciparum picks on EPCR [J]. *Blood*, 2014, 123(2):163-167.

(收稿日期:2017-02-21 修回日期:2017-06-06)

(上接第 3613 页)

- [8] injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(8):1538-1546.
- [9] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, et al. Oxidant mechanisms in renal injury and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(3):119-146.
- [10] Granata S, Gassa AD, Tomei P, et al. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease [J]. *Nutr Metab*, 2015(25):10.
- [11] Baek JH, Zeng R, Menke JW, et al. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8):3198-3214.
- [12] Mellwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase function in cell death and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 7(4):a026716.
- [13] He YJ, Chen WH, Hu YC, et al. Eadenophorum induces cell cycle and apoptosis of renal cells through mitochondrial pathway and caspase activation in saanen goat [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0138504.
- [14] Chien CT, Chang TC, Tsai CY, et al. Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(6):1194-1203.
- [15] Basile D, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury [J]. *Compro Physiol*, 2012, 2(2):1303-1353.

(收稿日期:2017-02-22 修回日期:2017-06-06)