

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.01.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211110.2020.005.html\(2021-11-12\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211110.2020.005.html(2021-11-12))

降钙素基因相关肽对高氧肺损伤的 Notch 通路调控*

邓 健,王少华[△]

(广东省深圳市福田区妇幼保健院儿科 518045)

[摘要] **目的** 研究降钙素基因相关肽(CGRP)对早产鼠高氧肺损伤的 Notch 通路调控作用。**方法** 将 SD 早产鼠分为空气组、高氧组、高氧联合 CGRP 组、高氧联合 CGRP 和 CGRP8-37 组及高氧联合 CGRP 和 MW167 组。CGRP8-37 为 CGRP 拮抗剂,MW167 为 Notch 信号通路阻断剂。分别于第 3、7、14 天观察和比较 5 组早产鼠肺组织病理变化及肺损伤病理评分,并应用实时定量聚合酶链反应(Q-PCR)法检测各组早产鼠肺组织 Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达情况。**结果** 与高氧组、高氧联合 CGRP 和 CGRP8-37 组、高氧联合 CGRP 和 MW167 组比较,高氧联合 CGRP 组早产鼠第 3、7、14 天肺损伤病理评分均明显降低,Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达水平均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CGRP 可能通过 Notch 通路促进其信号表达,对早产鼠高氧肺损伤发挥保护效应。

[关键词] 降钙素基因相关肽;Notch 信号通路;高氧肺损伤**[中图分类号]** R722.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)01-0025-04

Calcitonin gene-related peptide regulates Notch pathway in hyperoxia induced lung injury*

DENG Jian,WANG Shaohua[△]

(Department of Pediatrics, Futian District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518045, China)

[Abstract] **Objective** To study the regulatory effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on Notch signaling pathway in premature rats with hyperoxia lung injury. **Methods** SD premature rats were divided into the air group, hyperoxia group, hyperoxia+CGRP group, hyperoxia+CGRP8-37 group and hyperoxia+CGRP+MW167 group. The pathological changes of lung tissue and pathological scores of lung injury on 3, 7, 14 d were observed and compared among 5 groups, and the mRNA expressions of Notch 1, Hes and heRP in lung tissue were detected by Q-PCR. **Results** The pathological scores of lung injury on 3, 7, 14 d in the high oxygen+CGRP group were significantly decreased compared with those in the high oxygen group, high oxygen+CGRP+CGRP8-37 group and high oxygen+CGRP+MW167 group ($P < 0.05$), while the mRNA expression levels of Notch 1, Hes and heRP were significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** CGRP may play a protective role in hyperoxia induced lung injury in premature rats by promoting its signal expression possibly through Notch pathway.

[Key words] calcitonin gene-related peptide; Notch signaling pathway; hyperoxia-induced lung injury

氧疗是临床常用手段,但当早产儿肺组织长时间接受高氧时反而会引引起高氧肺损伤,对其预后造成不同程度的影响^[1]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)为一类主要由感觉神经释放的生物活性神经肽类物质^[2]。Notch 通路是一条

参与体内多种器官和组织调控的信号通路^[3]。近年来,相关研究表明,CGRP 和 Notch 通路均参与了肺损伤修复重建过程^[4-5]。然而,对 CGRP 是否通过 Notch 通路调控高氧肺损伤的修复,目前国内相关研究仍较匮乏。本研究以 SD 早产鼠及其肺组织作为研

* 基金项目:2020 年广东省深圳市福田区科技局重点项目(FTWS2020005)。 作者简介:邓健(1983—),主治医师,硕士,主要从事早产儿高氧肺损伤研究。 [△] 通信作者,E-mail:15309602@qq.com。

研究对象,通过比较在高氧暴露的不同时间点使用 CGRP 及其拮抗剂、Notch 信号通路阻断剂干预后肺组织的病理改变,以及其中 Notch 信号的 Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达情况,以探讨 CGRP 是否通过调控 Notch 通路对肺组织发挥效应,从而为高氧肺损伤的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

每天下午将健康 SD 成年雄鼠和雌鼠(由深圳市拓普生物科技有限公司实验室购置)按 1:1 比例合笼交配,次日清晨检查到雌鼠阴道涂片显示精子者定义为妊娠第 0 天。雌鼠妊娠第 19 天用乙醚麻醉后剖宫产取出胎仔作为研究对象。将胎龄 19 d 的 SD 早产鼠分为空气组(A 组)、高氧组(B 组)、高氧联合 CGRP 组(C 组)、高氧和 CGRP 联合 CGRP8-37 组(D 组)及高氧和 CGRP 联合 MW167 组(E 组),每组至少 18 只,依次编为 A~E 组。CGRP8-37 为 CGRP 拮抗剂,MW167 为 Notch 信号通路阻断剂。

1.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂与仪器为 CGRP(ANASPEC)、CGRP8-37(Wurogentec)、MW167(millipore)、Notch-1(AB-clonal)、heRP(Biobynt)、Hes(Santa)、反转录试剂盒(全式金)、苏木精-伊红染色(hematoxylin eosin, HE)染色液(Servicebio)、荧光倒置显微镜(Mshot)等。

1.2 方法

1.2.1 制备动物模型

参照梁木林等^[6]介绍的方法制备高氧动物模型。同时对各组早产鼠腹腔注射干预试剂,A、B 组均为生理盐水,C~E 组分别为 CGRP、CGRP 联合 CGRP8-37、CGRP 联合 MW167。注射完毕后约 1 h 将早产鼠给近期正常分娩的母鼠哺乳。除 A 组外,B~E 组代乳鼠和未成熟鼠均放置在 95%高氧容器中,定时添增水和饲料,持续 14 d。

1.2.2 肺组织标本制备及病理检查

哺乳期第 3、7、14 天每组处死 6 只早产鼠并取出肺组织保存于-80℃液氮快速冷冻。常规切片、HE 染色,光镜下观察肺组织病理改变。采用 BAUMAN 等^[7]介绍的肺组织损伤评分法评估其病理改变。

1.2.3 定量实时聚合酶链反应(Q-PCR)法检测肺组织 Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达水平

提取总 RNA 逆转录合成 cDNA 进行扩增。反应条件:95℃预变性 3 min,95℃变性 10 s,60℃退火延伸 34 s,共 40 个循环。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资

料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验、单因素方差分析等。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变

A 组早产鼠肺组织气管、血管正常。B、D、E 组早产鼠第 3 天可见炎症细胞浸润;第 7 天可见肺泡上皮细胞肿胀,间质水肿;第 14 天气管、血管广泛破坏,管壁增厚。C 组早产鼠第 3 天大致正常,第 7 天肺泡间隔少许断裂,第 14 天肺泡融合,肺泡内充满渗出液,见图 1。

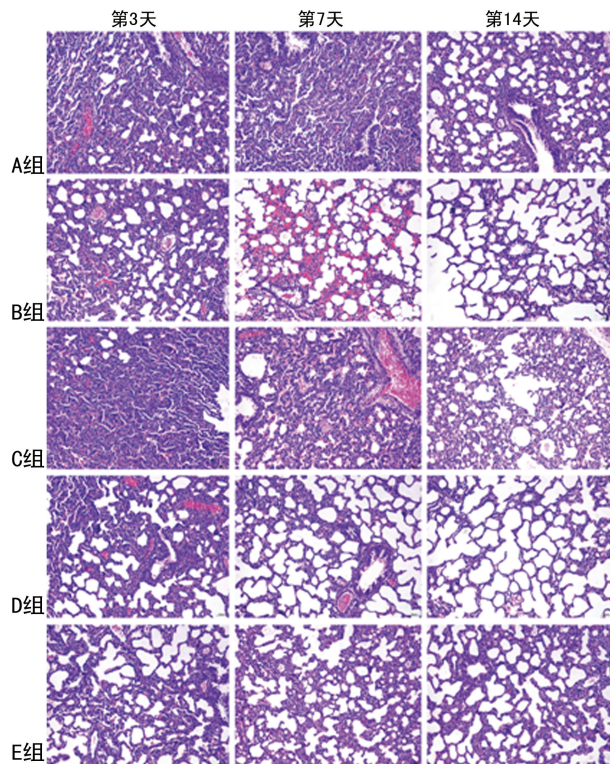


图 1 各组早产鼠不同时间点肺组织病理改变比较(HE 染色,200×)

2.2 肺损伤病理评分

C 组早产鼠第 3、7、14 天肺损伤病理评分均低于 B、D、E 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组早产鼠不同时间点肺损伤病理评分比较($n=6, \bar{x} \pm s$, 分)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
A 组	1.60±0.23	1.63±0.24	1.73±0.19
B 组	6.30±0.30 ^a	16.21±2.30 ^a	27.14±2.02 ^a
C 组	1.72±0.25	2.03±0.24	10.35±1.43
D 组	6.24±0.49 ^a	14.49±1.25 ^a	25.39±1.23 ^a
E 组	3.14±0.26 ^a	8.31±0.52 ^a	20.46±2.05 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 C 组同时时间点比较。

2.3 肺组织 Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达水平

C 组早产鼠第 3、7、14 天 Notch 1、Hes、heRP

mRNA 表达水平明显高于 B、D、E 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组早产鼠不同时间点肺组织 Notch 1、Hes、heRP mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Notch 1	Hes	heRP
A 组			
第 3 天	1.03±0.14	0.99±0.16	1.01±0.20
第 7 天	0.96±0.16	0.85±0.04	0.87±0.07
第 14 天	0.58±0.02	0.57±0.03	0.57±0.04
B 组			
第 3 天	0.66±0.06 ^a	0.65±0.06 ^a	0.63±0.09 ^a
第 7 天	0.47±0.03 ^a	0.48±0.04 ^a	0.49±0.04 ^a
第 14 天	0.32±0.03 ^a	0.30±0.02 ^a	0.30±0.01 ^a
C 组			
第 3 天	0.94±0.09	0.93±0.08	0.91±0.14
第 7 天	0.75±0.03	0.74±0.04	0.76±0.05
第 14 天	0.55±0.04	0.54±0.03	0.55±0.05
D 组			
第 3 天	0.64±0.07 ^a	0.65±0.07 ^a	0.63±0.06 ^a
第 7 天	0.49±0.04 ^a	0.48±0.05 ^a	0.48±0.05 ^a
第 14 天	0.36±0.03 ^a	0.34±0.03 ^a	0.36±0.03 ^a
E 组			
第 3 天	0.63±0.03 ^a	0.63±0.04 ^a	0.65±0.04 ^a
第 7 天	0.55±0.03 ^a	0.48±0.05 ^a	0.49±0.03 ^a
第 14 天	0.36±0.03 ^a	0.35±0.04 ^a	0.36±0.03 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 C 组同时间点比较。

3 讨 论

CGRP 由 37 个氨基酸组成, 是人类用分子生物学方法发现的第 1 个活性多肽, 广泛分布于神经系统、呼吸系统、循环系统等, 生物半衰期约为 18 min^[8]。近年来, 有研究表明, 人和鼠肺泡 II 型上皮细胞 (typeal II veolarepithelial cell, AEC II) 膜上也发现了 CGRP 特异性受体及结合位点, 并在胚胎肺的发育和肺生理、病理过程均发挥了重要作用^[9]。当不成熟肺受到氧化应激后 CGRP 通过免疫调节加快清除自由基, 减少合成及释放炎症因子, 并促进水通道蛋白过表达而减轻肺水肿, 从而对机体起到抗炎、抗氧化损伤等作用。此外, 在氧化应激的条件下 AEC II 增殖受到抑制, 而 CGRP 可减弱该抑制作用, 促进细胞转化为 AEC II, 减少功能细胞凋亡并改善其存活, 可能是 CGRP 促进高氧肺损伤修复的关键^[10]。

Notch 通路是一条进化上高度保守的信号通路^[11]。Notch 信号可介导转录因子的表达, 由此实现调控肺泡上皮细胞和血管内皮细胞的生物学活动, 如分化、增殖、凋亡等^[12-13]。因此, Notch 信号通路在肺

的发育、损伤及修复过程中发挥着十分重要的作用。Notch 信号包括 Notch 受体、配体、细胞内效应分子蛋白和调节分子等^[14]。目前, 在哺乳动物中发现的 Notch 受体有 4 种 (Notch 1~4), 均广泛分布于肺组织中。气道上皮细胞主要表达 Notch 1、4, 肺泡上皮、肺间质、血管内皮及成纤维细胞主要表达 Notch 2、3。Notch 1 与配体结合可启动靶基因 Hes、Su(H) 转录, 促进 AEC II 增殖。在氧化应激条件下血管内皮细胞、气道和肺泡上皮细胞 Notch 1 活性下降, 表达减少, AEC II 转化为 AEC I, 最终影响肺发育和肺损伤修复^[15]。

本研究结果显示, 早产鼠在高氧暴露后肺组织结构破坏, 炎性渗出, 间质水肿, 成纤维细胞增生, 与此同时, Notch 1 及其下游靶基因 Hes、heRP mRNA 表达均下降。给予外源性 CGRP 干预后早产鼠肺组织病理损伤程度明显减轻, Notch 信号上升。当分别加入 CGRP 受体拮抗剂——CGRP8-37 和 Notch 信号通路抑制剂——MW167 时肺损伤程度加重, Notch 信号下降。由此可见, CGRP 可能通过促进 Notch 通路中 Notch 1、Hes、heRP 等生物信号的表达, 从而对氧化应激性损伤的肺发挥保护效应。今后应从信号传导通路方面阐释 CGRP 如何实现 Notch 信号下游靶分子的调控, 可能对高氧肺损伤的预防和治疗产生深远意义。

参考文献

- [1] ZHU X, LEI X, WANG J, et al. Protective effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by alleviating apoptosis and ROS production[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2020, 33 (24): 4150-4158.
- [2] GINGELL J J, REES T A, HENDRIKSE E R, et al. Distinct patterns of internalization of different calcitonin gene-related peptide receptors [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2020, 3 (2): 296-304.
- [3] ZHAO W, ZHENG Z, AWEYA J J, et al. Litopenaeus vannamei Notch interacts with COP9 signalosome complex subunit 1 (CNS1) to negatively regulate the NF- κ B pathway [J]. J Proteomics, 2021, 234: 104104.
- [4] HONG-MIN F, CJUN-RONG H, RUI Z, et al. CGRP 8-37 enhances lipopolysaccharide-induced acute lung injury and regulating aquaporin 1 and 5 expressions in rats [J]. J Physiol Bio-

- chem, 2016, 73(3):381-386.
- [5] 杨琦, 曾迎楠, 许永安. 急性肺损伤发病与发展相关信号通路的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(24):1904-1909.
- [6] 梁木林, 党红星, 鲁雪, 等. 抑制 mTOR 信号通路对幼鼠肺损伤时 p-AKT1 分子的影响及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3):506-514.
- [7] BAUMAN Z M, GASSNER M Y, COUGHLIN M A, et al. Lung Injury Prediction Score Is Useful in Predicting Acute Respiratory Distress Syndrome and Mortality in Surgical Critical Care Patients[J]. Crit Care Res Pract, 2015, 2015:157408.
- [8] MUFF R, BORN W, FISCHER J A. Receptors for calcitonin, calcitonin gene related peptide, amylin, and adrenomedullin[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1995, 73(7):963-967.
- [9] FU H, ZHANG T, HUANG R, et al. Calcitonin gene-related peptide protects type II alveolar epithelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and cell death[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(4):1279-1284.
- [10] LV X, GAO F, ZHANG S, et al. Maladjustment of β -CGRP/ α -CGRP Regulation of AQP5 Pro-
- motes Transition of Alveolar Epithelial Cell Apoptosis to Pulmonary Fibrosis[J]. J Interferon Cytokine Res, 2020, 40(8):377-388.
- [11] FALO-SANJUAN J, BRAY S J. Decoding the Notch signal[J]. Dev Growth Differ, 2020, 62(1):4-14.
- [12] LIU X, ZHU X, ZHU G, et al. Effects of different ligands in the notch signaling pathway on the proliferation and transdifferentiation of primary type ii alveolar epithelial cells[J]. Front Pediatr, 2020, 8:452.
- [13] AKIL A, GUTIÉRREZ-GARCÍA A K, GUENTER R, et al. Notch signaling in vascular endothelial cells, angiogenesis, and tumor progression; an update and prospective[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:642352.
- [14] MATSUNO K. Notch signaling[J]. Dev Growth Differ, 2020, 62(1):3.
- [15] 鲁雪, 汪超, 张超, 等. 高氧肺损伤幼鼠 II 型肺泡上皮细胞蛋白质组学变化的相关研究[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(4):474-479.

(收稿日期:2021-03-26 修回日期:2021-09-11)

(上接第 24 页)

- proliferation of vascular smooth muscle cells via regulating MEG3/miR-125a-5p/IRF1[J]. Cell Adh Migr, 2019, 13(1):41-49.
- [11] 刘勇志, 张童, 沈毅, 等. miR-125a-5p 靶向 LIMK1 逆转非小细胞肺癌 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(6):1047-1054.
- [12] HUANG W T, TSAI Y H, CHEN S H, et al. HDAC2 and HDAC5 up-regulations modulate survivin and miR-125a-5p expressions and promote hormone therapy resistance in estrogen receptor positive breast cancer cells[J]. Front Pharmacol, 2017, 8:902.
- [13] 许婕灵, 张振辉, 江慧琳, 等. 微小 RNA-101 和微小 RNA-125a-5p 在脂多糖诱导人 THP-1 巨噬细胞自噬中的调控作用[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(4):334-338.
- [14] KIM S H, KIM G, HAN D H, et al. Ezetimibe ameliorates steatohepatitis via AMP activated protein kinase-TFEB-mediated activation of autophagy and NLRP3 inflammasome inhibition[J]. Autophagy, 2017, 13(10):1767-1781.
- [15] MARGALEF P, COLOMER C, VILLANUEVA A, et al. BRAF-induced tumorigenesis is IKK α -dependent but NF- κ B-independent[J]. Sci Signal, 2015, 8(373):ra38.
- [16] 尹昭懿, 闫岩, 张璇, 等. 珍珠梅黄铜纳米粒通过调节 MAPK 通路诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡和保护性自噬的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2):271-275.
- [17] LEONARDI M, PERNA E, TRONNOLONE S, et al. Activated kinase screening identifies the IKBKE oncogene as a positive regulator of autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(2):312-326.

(收稿日期:2021-04-18 修回日期:2021-08-29)