

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.014.html>

## 蛋白激酶抑制剂 LY333531 对大鼠烟雾吸入性肺损伤氧化应激的影响

程浩<sup>1,2</sup>, 宋立成<sup>2</sup>, 吴剑波<sup>2</sup>, 陈丽娜<sup>2</sup>, 陈旭昕<sup>2</sup>, 韩志海<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探索蛋白激酶抑制剂(LY333531)对大鼠烟雾吸入后氧化应激的作用。方法 6~8周龄SD雄性SPF级大鼠40只,随机分为空白对照组、抑制剂对照组、烟雾吸入组和烟雾吸入+抑制剂组。抑制剂对照组大鼠和烟雾吸入+抑制剂组大鼠在烟雾吸入实验前1周按1 mg/(kg·d)腹腔注射LY333531。1周后,于自制产烟箱建立大鼠烟雾吸入性肺损伤模型。12 h后解剖,留取动脉血、肺组织和肺泡灌洗液。对各组大鼠进行湿干比(W/D)、肺泡灌洗液(BALF)蛋白浓度、丙二醛(MDA)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和衔接蛋白(P66Shc)的检测,制作HE染色切片,在光学显微镜下观察肺组织病理学特点。结果 与空白对照组和抑制剂对照组相比,烟雾吸入组大鼠肺组织W/D、肺泡灌洗液蛋白浓度均明显上升( $P < 0.05$ );肺组织及血清中MDA、NOS浓度明显上升( $P < 0.05$ );SOD、CAT活性明显下降( $P < 0.05$ );衔接蛋白(P66Shc)及活化后的p-P66Shc表达明显增加;病理切片可见明显肺泡壁增厚、肺泡断裂、渗出、炎性细胞浸润等。与烟雾吸入组相比,烟雾吸入+抑制剂组大鼠肺组织W/D、肺泡灌洗液蛋白浓度均有所降低( $P < 0.05$ );血清MDA、NOS有

所降低( $P < 0.05$ );SOD以及CAT活性增加( $P < 0.05$ );衔接蛋白(P66Shc)及活化后的p-P66Shc表达减少;肺泡断裂、渗出、炎性细胞浸润等病理改变减轻。结论 LY333531能减轻大鼠烟雾吸入后的氧化应激效应,减轻氧化应激对机体的损伤。

**关键词** LY333531; 烟雾吸入; 氧化应激; 肺损伤

**中图分类号** R 563.9

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)03-0407-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.014

烟雾吸入后,其固有的高温及富含有毒有害颗粒等特性可导致气管及肺实质的直接和间接损害,从而引发烟雾吸入性肺损伤(smoke inhalation induced acute lung injury, SI-ALI)。火灾中若合并有烟雾吸入性肺损伤,死亡率将上升至60%~80%<sup>[1]</sup>。烟雾吸入后,氧化应激的加强对肺损伤的加重起着重要作用<sup>[2]</sup>。近年来学者发现激活PKC $\beta$ /P66Shc信号通路会加强机体氧化应激,致使机体损伤加重<sup>[3-4]</sup>。而特异性PKC $\beta$ 抑制剂LY333531能够抑制该通路激活,减少机体氧化应激的损伤。目前,已有研究证实,应用LY333531后能有效减轻高氧刺激对细胞的损伤<sup>[5]</sup>。但是,在烟雾吸入性肺损伤中,LY333531是否能够通过抑制PKC $\beta$ /P66Shc信号通路进而减轻氧化应激损伤,尚不明确。因此,本实验拟通过建立SD大鼠烟雾吸入性

2018-10-10 接收

基金项目:军队后勤科研计划重点项目(编号:BJH16J011)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学海军临床学院,北京 100048

<sup>2</sup>海军总医院呼吸与危重症医学科,北京 100048

作者简介:程浩,男,硕士研究生;

韩志海,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: hanzhihai@hotmail.com

tissues were collected for examining the gene expression changes by human genome microarray. Bioinformatics analysis was used to identify the enriched pathways and biological processes by the deregulated genes, meanwhile, the interaction of the gene encoding proteins were also analyzed. **Results** Gene expression profile analysis showed that 2 779 deregulated genes during the malignant transformation of atrophic gastritis, the top 15 up-regulated and the top 15 down-regulated genes were selected for a brief summary, including some novel gastric cancer related genes, such as *CPA2*, *HCAR3*, *BCL2A1*, *ITGAX*. Moreover, bioinformatics analysis showed the physiological significance of deregulated genes, such as inflammation, cell migration, TNF signaling pathway, NF- $\kappa$ B signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway. **Conclusion** During the process of atrophic gastritis malignant transformation to gastric cancer, the gene expression profile changes obviously and represents the corresponding physiological significance.

**Key words** inflammation malignant; gastric carcinoma; atrophic gastritis; gene expression profile; GO analysis; KEGG pathway; PPI network analysis

肺损伤模型,探究 LY333531 能否减轻烟雾吸入后肺组织的氧化应激损伤。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 40 只体质量为(200 ± 10) g 的健康雄性 SPF 级 SD 大鼠由军事医学科学院动物实验中心提供,实验动物许可证号: SCXK(京)2016-0002,大鼠随机分成 4 组:空白对照组(吸入空气 + 无干预)、抑制剂对照组(吸入空气 + LY333531 干预)、烟雾吸入组(吸入烟雾 + 无干预)、烟雾吸入 + 抑制剂组(吸入烟雾 + LY333531 干预),每组各 10 只大鼠。实验方案通过海军总医院动物伦理委员会批准。

**1.2 实验仪器** 自制产烟箱、集烟箱(产烟箱与集烟箱用管道联通,产烟箱一侧有排风扇);产烟用电炉(兴化市楚水电热电器厂);电热恒温干燥箱(上海上迈电子仪器有限公司);泵吸式四合一气体检测仪(加拿大 BW 公司);低温离心机、酶标仪、微量移液器(美国 Thermo 公司);一次性采血针(江苏治宇医疗器材有限公司);真空采血管等[北京积水医疗科技(中国)有限公司]。

**1.3 实验试剂** MDA 试剂盒、NOS 试剂盒、SOD 试剂盒、CAT 试剂盒(南京建成生物工程研究所);Anti-SHC 抗体 [EP332Y]、Anti-SHC( phospho S36) 抗体 [6E10] (英国 Abcam 公司);GAPDH 抗体(美国 CST 公司);ECL 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司)蛋白酶抑制剂 LY333531(美国 CST 公司);二甲亚砜(德国 Applichem 公司)等。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 实验动物预处理** 抑制剂对照组大鼠及烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠在进行烟雾实验前 1 周按 1 mg/(kg · d)<sup>[6]</sup> 腹腔注射蛋白酶抑制剂 LY333531。空白对照组与烟雾吸入组均无干预。四组大鼠均按正常饮食饲养。

**1.4.2 实验动物模型建立** 本实验选用室内火灾中常见的易燃材料发泡橡塑绝热制品、阻尼材料、电缆线、硅丙乳胶漆等混合材料作为产烟材料。将各种产烟材料(各 10 g)粉碎后充分混匀置于产烟箱中的电磁炉托盘上,封闭产烟箱,将电磁炉通电,加热维持炉丝温度 300 °C。待烟雾充满产烟箱后,打开排风扇将烟雾吹向集烟箱中,监测集烟箱中气体成分及浓度,利用排风扇控制集烟箱中 CO: 300 ~ 500 ppm, H<sub>2</sub>S: 10 ~ 15 ppm, O<sub>2</sub>: 20% ~ 21.9%。将预处理完毕的烟雾吸入组和烟雾吸入 + 抑制剂组

SD 大鼠置于集烟箱中,封闭集烟箱,稳定吸入 25 min。25 min 后将实验大鼠移出烟雾环境置于正常环境。空白对照组与抑制剂对照组也放入集烟箱中吸入空气 25 min。观察各组大鼠呼吸、心跳、精神状态,记录大鼠死亡率。

**1.4.3 实验动物处理** 各组 SD 大鼠在吸入处理后正常食水喂养 12 h, 12 h 后各组 SD 大鼠腹腔注射戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉后解剖。

**1.4.4 实验动物标本采集** 实验大鼠麻醉后开腹,于腹主动脉抽取 5 ml 动脉血置于真空采血管中,随后置于离心机中 3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液置于 EP 管中于 -80 °C 冰箱中冻存以备后用。抽取动脉血后放血处死大鼠,随后开胸、结扎气管,取出肺组织,结扎右肺,用生理盐水对左肺行肺泡灌洗,收集约 1 ml BALF 3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液置于 EP 管中于 -80 °C 冰箱中冻存以备后用。随后分离右肺各叶;右肺上叶称重后置于 60 °C 恒温箱中烘干至质量不再改变后再称重,检测其湿干比(W/D);右肺中叶取出后置于 EP 管中于 -80 °C 冰箱中冻存以备后用;右肺下叶取出后迅速放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后进行石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

**1.4.5 肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中蛋白浓度测定** 将收集的 BALF 采用 BCA 法检测肺泡灌洗液中的蛋白浓度,检测方法按照 BCA 蛋白试剂盒(美国 Thermo 公司)说明书进行。

**1.4.6 肺组织匀浆及血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)浓度测定** 将取出的右肺中叶研磨制成肺组织匀浆以及收集的血清分别按照各自试剂盒说明书操作检测肺组织匀浆和血清中反映氧化应激的 MDA、NOS、SOD、CAT。

**1.4.7 Western blot 方法检测肺组织匀浆中 P66Shc 及磷酸化 P66Shc 蛋白表达情况** 将上述取出的右肺中叶取出 0.1 g 与 1 ml 裂解液混合后研磨制成肺组织匀浆,应用 BCA 法检测蛋白浓度,随后按 loading buffer: 肺组织匀浆液 = 1 : 3 比例制成蛋白样本,加样后于 10% 的丙烯酰胺凝胶分离蛋白,60 mA 湿转 3 h 至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 适量稀释比例的一抗 P66Shc(1 : 1 000)、磷酸化 P66Shc(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,1 × TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育(1 : 10 000) 1 h, 1 × TBST 洗膜 3 次, ECL 化学显影,运用 Image J 软件对

Western blot 结果行半定量灰度值分析。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。若方差齐, 多组间计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA) 组间比较采用 LSD 检验。若方差不齐, 组间则采用 Dunnett T3 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验大鼠呼吸、心率、精神状态及死亡率** 与空白对照组、抑制剂对照组相比, 烟雾吸入组与烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠在烟雾吸入 25 min 后, 呼吸频率、心率明显加快。接受吸入处理后至解剖处理前, 烟雾吸入组大鼠死亡 3 只(3/10), 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠死亡 2 只(2/10)。空白对照组与抑制剂对照组大鼠无死亡。成活大鼠中, 烟雾吸入组和烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠精神萎靡, 烦躁, 偶有呃逆现象出现。置于正常环境后, 上述现象逐渐好转, 在吸入处理 3 h 后大鼠精神状态恢复。

**2.2 BALF 蛋白浓度** 与空白对照组相比, 抑制剂对照组 BALF 浓度无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组和烟雾吸入 + 抑制剂组 BALF 中蛋白浓度均明显上升, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组 BALF 蛋白浓度减少, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.3 肺组织 W/D 比较** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组 W/D 无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组与烟雾吸入 + 抑制剂组肺组织 W/D 均上升

( $P < 0.05$ ), 其中, 烟雾吸入组大鼠肺组织 W/D 上升更明显; 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠肺组织 W/D 有所下降( $P < 0.05$ )。见表 1。

## 2.4 肺组织匀浆 MDA、NOS、SOD、CAT

**2.4.1 MDA** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组肺组织匀浆中 MDA 无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组与烟雾吸入 + 抑制剂组肺组织匀浆中 MDA 均升高( $P < 0.05$ ); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠肺组织 MDA 有所下降( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.4.2 总一氧化氮合酶(total nitric oxide synthase, TNOS) 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组大鼠肺组织匀浆 TNOS 和 iNOS 无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组大鼠和烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠肺组织匀浆中 TNOS 和 iNOS 均上升( $P < 0.05$ ); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组 TNOS 与 iNOS 均未见明显减少, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.4.3 SOD** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组大鼠肺组织匀浆 SOD 活力无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组及烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠 SOD 活力明显下降( $P < 0.05$ ); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠 SOD 活力有所上升( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.4.4 CAT** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组大鼠肺组织匀浆 CAT 活性无明显变化, 差异无统计学

表 1 各组大鼠 BALF 蛋白浓度、肺组织 W/D 结果( $\bar{x} \pm s$ )

指标	空白对照组 (n=10)	抑制剂对照组 (n=10)	烟雾吸入组 (n=7)	烟雾吸入 + 抑制剂组(n=8)	F 值	P 值
BALF 蛋白浓度(mg/L)	451.27 ± 170.45	441.74 ± 203.44	1057.90 ± 159.81* #	823.67 ± 129.95* #△	25.490	<0.001
W/D	4.69 ± 0.92	4.42 ± 1.15	9.13 ± 0.81* #	7.14 ± 0.42* #△	50.198	<0.001

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与抑制剂对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与烟雾吸入组比较: △  $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肺组织匀浆 MDA、NOS、SOD、CAT 结果( $\bar{x} \pm s$ )

指标	空白对照组 (n=10)	抑制剂对照组 (n=10)	烟雾吸入组 (n=7)	烟雾吸入 + 抑制剂组(n=8)	F 值	P 值
MDA(nmol/mg)	0.85 ± 0.08	0.86 ± 0.06	1.42 ± 0.20* #	1.01 ± 0.04* #△	49.818	<0.001
TNOS(U/mg)	1.59 ± 0.24	1.64 ± 0.18	2.12 ± 0.18* #	2.02 ± 0.08* #	17.344	<0.001
iNOS(U/mg)	0.60 ± 0.06	0.59 ± 0.08	0.89 ± 0.16* #	0.73 ± 0.03* #	18.165	<0.001
SOD(U/mg)	68.09 ± 4.68	68.82 ± 6.32	49.80 ± 4.51* #	62.07 ± 0.99* #△	27.437	<0.001
CAT(U/mg)	49.49 ± 7.54	49.13 ± 10.78	20.75 ± 1.34* #	23.47 ± 2.98* #	40.083	<0.001

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与抑制剂对照组比较: #  $P < 0.05$ ; 与烟雾吸入组比较: △  $P < 0.05$

表3 各组大鼠血清MDA、NOS、SOD、CAT结果( $\bar{x} \pm s$ )

指标	空白对照组 (n=10)	抑制剂对照组 (n=10)	烟雾吸入组 (n=7)	烟雾吸入+ 抑制剂组(n=8)	F值	P值
MDA(μmol/L)	1.19 ± 0.29	1.11 ± 0.33	3.18 ± 0.86*#	1.96 ± 0.36*#△	32.132	<0.001
TNOS(kU/L)	20.37 ± 2.82	20.58 ± 2.24	29.82 ± 1.78*#	22.98 ± 2.33*#△	26.951	<0.001
iNOS(kU/L)	11.66 ± 2.72	11.85 ± 1.30	20.91 ± 1.53*#	17.49 ± 2.15*#△	40.537	<0.001
SOD(kU/L)	19.68 ± 1.52	18.95 ± 1.96	7.84 ± 1.32*#	14.26 ± 1.38*#△	92.972	<0.001
CAT(kU/L)	8.97 ± 2.21	9.03 ± 1.90	2.35 ± 0.61*#	4.74 ± 0.99*#△	32.610	<0.001

与空白对照组比较: \* P < 0.05; 与抑制剂对照组比较: # P < 0.05; 与烟雾吸入组比较: △ P < 0.05

意义(P > 0.05); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组及烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠CAT活性明显下降(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组CAT活性未见明显增加, 差异无统计学意义(P > 0.05)。见表2。

### 2.5 血清MDA、NOS、SOD、CAT

**2.5.1 MDA** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组血清中MDA无明显变化, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组与烟雾吸入 + 抑制剂组血清中MDA浓度均增加(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清MDA有所下降(P < 0.05)。见表3。

**2.5.2 TNOS和iNOS** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组血清中TNOS、iNOS无明显变化, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组大鼠和烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清中TNOS和iNOS均明显上升(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组TNOS、iNOS水平下降(P < 0.05)。见表3。

**2.5.3 SOD** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组血清SOD活力无明显变化, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与空白对照组、抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组及烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清中SOD活力明显下降(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清SOD活力升高(P < 0.05)。见表3。

**2.5.4 CAT** 与空白对照组比较, 抑制剂对照组血清CAT活性无明显变化, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与空白对照组和抑制剂对照组比较, 烟雾吸入组及烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清中CAT活性明显下降(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组大鼠血清中CAT活性增加(P < 0.05)。见表3。

**2.6 肺组织匀浆P66Shc、磷酸化P66Shc表达** Western blot显影结果显示空白对照组与抑制剂对照组P66Shc蛋白表达较低, 烟雾吸入组大鼠肺组织

P66Shc蛋白表达明显增加, 烟雾吸入 + 抑制剂组较烟雾吸入组有所减轻。而活化后的磷酸化P66shc, 抑制剂对照组表达明显低于空白对照组, 而烟雾吸入组与烟雾吸入 + 抑制剂组表达明显上升。运用Image J软件对显影结果行灰度值分析可见, 与空白对照组比较, 抑制剂对照组p-P66Shc/P66Shc比值明显下降(P < 0.05), 烟雾吸入组p-P66Shc/P66Shc比值则明显上升(P < 0.05); 烟雾吸入 + 抑制剂组p-P66Shc/P66Shc比值明显上升(P < 0.05); 与烟雾吸入组比较, 烟雾吸入 + 抑制剂组p-P66Shc/P66Shc比值上升(P < 0.05), 见图1。

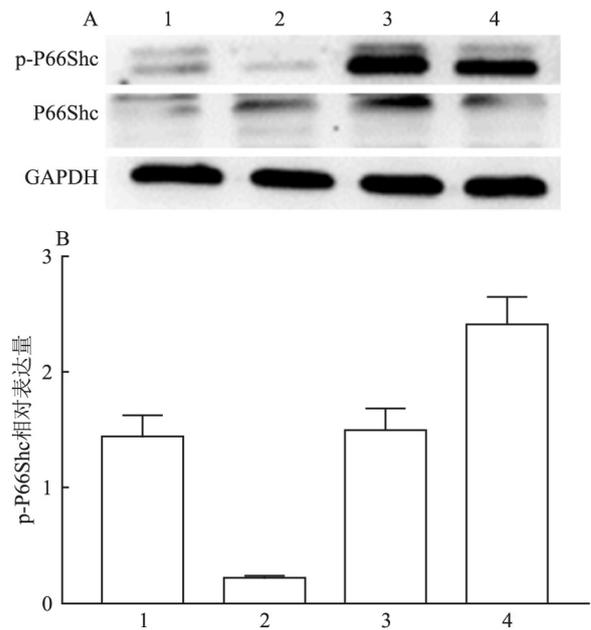


图1 Western blot检测各组大鼠肺组织P66Shc及p-P66Shc蛋白表达情况

A: P66Shc及p-P66Shc Western blot结果; B: p-P66Shc与P66Shc灰度值比值; 1: 空白对照组; 2: 抑制剂对照组; 3: 烟雾吸入组; 4: 烟雾吸入 + 抑制剂组

**2.7 肺组织病理学特征** 光镜下可见空白对照组与抑制剂对照组肺泡结构完整, 肺泡间隔正常, 肺泡腔内可见少许炎性细胞浸润。烟雾吸入组肺泡结构

遭到破坏,出现肺泡断裂,肺泡间隔明显增厚,肺泡腔内大量炎性细胞浸润以及粉红色液体渗出。烟雾吸入+抑制剂组肺泡结构相对完整,肺泡间隔增厚,肺泡腔内有炎性细胞及红色渗出物出现,与烟雾吸入组相比,损伤较轻。见图2。

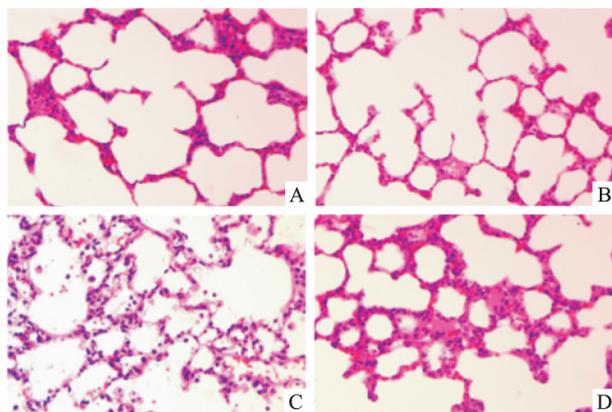


图2 肺组织病理 HE 染色 HE ×400

A: 空白对照组; B: 抑制剂对照组; C: 烟雾吸入组; D: 烟雾吸入+抑制剂组

### 3 讨论

合并烟雾吸入是火灾中死亡最主要的原因。而氧化应激在烟雾吸入性肺损伤中也占据着重要地位,其中,脂质过氧化、iNOS 过表达引起的肺水肿、抗氧化相关酶的大量消耗等均是机体损伤的重要原因<sup>[2]</sup>。烟雾吸入后,刺激引起机体产生过多的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),而机体内大部分 ROS 需通过抗氧化酶 SOD、CAT 等还原成无氧化毒性的水,从而保证机体氧化还原平衡<sup>[7-8]</sup>。活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)的过多表达则是由于烟雾吸入后,机体内的 iNOS 显著增多, iNOS 分解 L-精氨酸产生远超过生理剂量的 NO,进而加重机体氧化应激损伤<sup>[9]</sup>;故机体内的氧化还原酶常用来反映机体氧化应激的水平。PKC  $\beta$ /P66Shc 信号通路的激活是机体氧化应激加强的重要因素,LY333531 是特异性蛋白激酶(PKC  $\beta$ )抑制剂,能抑制 PKC  $\beta$ /P66Shc 信号通路的激活,减轻机体氧化应激<sup>[3,10]</sup>。本实验显示烟雾吸入后,大鼠 BALF 蛋白浓度、W/D、MDA、NOS 明显增加,SOD、CAT 明显减少,而预防注入 LY333531 后则有所缓解,可说明烟雾吸入后机体氧化应激加重,而 LY333531 可减轻烟雾吸入性肺损伤大鼠的氧化应激水平,进而减轻机体损伤。

衔接蛋白 P66Shc 是机体调控凋亡与调节氧化应激的重要蛋白,正常情况下,P66Shc 处于失活状态,主要定位于细胞质。当机体接受外源性刺激或内源性刺激时,PKC/P66SHC 信号通路被激活,该蛋白发生构象改变,并转移至线粒体中,并在线粒体内氧化细胞色素 C 使电子不能顺利传递至复合体 IV 形成 H<sub>2</sub>O,而是形成 ROS(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>[11]</sup>。蛋白激酶抑制剂 LY333531 能够抑制 PKC  $\beta$ /P66Shc 信号通路的激活,有研究<sup>[12]</sup>表明运用该抑制剂能通过抑制 NADPH 氧化酶,增加 SOD 的表达减轻糖尿病肾病大鼠模型中氧化应激的肾损害;也有学者研究发现 LY333531 能减少大鼠心肌组织的氧化损伤,进而发挥其心脏保护作用<sup>[13]</sup>。本实验 Western blot 结果显示,烟雾吸入后,大鼠肺组织 P66Shc 及活化后的 p-P66Shc 蛋白表达明显增多,而烟雾吸入+抑制剂组则表达相对较少。行灰度值分析时,发现烟雾吸入+抑制剂组 p-P66Shc 与 P66Shc 灰度值比值高于烟雾吸入组,这可能是因为烟雾吸入组 P66Shc 表达远高于烟雾吸入+抑制剂组,而不是因为后者活化 p-P66Shc 表达更多。结合上述 W/D、BALF 浓度、氧化还原酶结果及肺组织病理特点。课题组推断:烟雾吸入后,大鼠体内 PKC  $\beta$ /P66Shc 信号通路激活,下游 P66Shc 蛋白表达增多,并且活化的磷酸化 P66Shc 蛋白表达也明显增多,进入线粒体后阻断氧化呼吸链传递,产生过多的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,使得 ROS 含量明显上升,同时烟雾刺激使得 iNOS 表达增多,进而体内 NO 含量明显上升,最终加重大鼠机体的氧化应激损伤。随着 ROS 的增加,大量脂质过氧化产物 MDA 聚集,并且消耗体内原有的抗氧化酶 SOD、CAT 等,使得机体损伤进一步加重。蛋白激酶抑制剂 LY333531 能特异性抑制 PKC  $\beta$ /P66Shc 信号通路的激活,使 P66Shc 活化减少,导致 ROS、RNS 产生减少,最终使得机体氧化应激减轻,肺水肿、渗出等损伤随之减轻。

### 参考文献

- [1] De Carvalho F O, Silva R, Felipe F A, et al. Natural and synthetic products used for the treatment of smoke inhalation: a patent review [J]. Expert Opin Ther Pat 2017 27(8): 877-86.
- [2] 程浩,宋立成,韩志海. 氧化应激在急性肺损伤中作用的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志 2018 38(11): 866-70.
- [3] Wojtala A, Karkucinska-Wieckowska A, Sardao V A, et al. Modulation of mitochondrial dysfunction-related oxidative stress in fibroblasts of patients with Leigh syndrome by inhibition of prooxidative p66Shc pathway [J]. Mitochondrion, 2017 37: 62-79.

- [4] Kong X, Guan J, Li J, et al. P66(Shc)-SIRT1 regulation of oxidative stress protects against cardio-cerebral vascular disease [J]. *Mol Neurobiol* 2017 54(7): 5277-85.
- [5] 车忠丽,董文斌,李清平,等. PKC $\beta$ /P66Shc 氧化应激通路在高氧诱导人肺泡上皮细胞活性氧簇产生中的作用 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(3): 275-80.
- [6] Wang Z B, Zhang S, Li Y, et al. LY333531, a PKC beta inhibitor, attenuates glomerular endothelial cell apoptosis in the early stage of mouse diabetic nephropathy *via* down-regulating swiprosin-1 [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2017 38(7): 1009-23.
- [7] Bala A, Mondal C, Haldar P K, et al. Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(6): 595-607.
- [8] Li Z, Han X, Song X, et al. Overexpressing the sedum alfredii Cu/Zn superoxide dismutase increased resistance to oxidative stress in transgenic arabidopsis [J]. *Front Plant Sci* 2017 8: 1010.
- [9] Bi J, Cui R, Li Z, et al. Astaxanthin alleviated acute lung injury by inhibiting oxidative/nitrative stress and the inflammatory response in mice [J]. *Biomed Pharmacother* 2017 95: 974-82.
- [10] Almedia M, Han L, Ambrogini E, et al. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- $\kappa$ B in osteoblastic cells *via* a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens [J]. *Mol Endocrinol* 2010 24(10): 2030-7.
- [11] Feng D, Yao J, Wang G, et al. Inhibition of p66Shc-mediated mitochondrial apoptosis *via* targeting prolyl-isomerase Pin1 attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Clin Sci (Lond)* 2017, 131(8): 759-73.
- [12] 高霞,叶凤,周赤燕,等. PKC- $\beta$  抑制剂 LY333531 对糖尿病肾脏 NADPH 氧化酶与 SOD 蛋白表达的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2011 32(3): 392-6.
- [13] 赵黎,魏敏,孙媛,等. 蛋白激酶 C $\beta$  II (PKC $\beta$ 2) 抑制剂 LY333531 减少心肌梗死后心肌肥大细胞浸润 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2017 33(4): 517-20, 525.

## Effect of protein kinase inhibitor LY333531 on oxidative stress in rats with smoke inhalation lung injury

Cheng Hao<sup>1</sup>, Song Licheng<sup>2</sup>, Huan Jianbo<sup>2</sup> et al

(<sup>1</sup>*Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048;*

<sup>2</sup>*Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, Navy General Hospital, Beijing 100048)*

**Abstract Objective** To explore the effect of protein kinase inhibitor (LY333531) on oxidative stress after smoke inhalation in rats. **Methods** Forty SD male SPF rats, 6~8 weeks old, were randomly divided into the blank control group, inhibitor control group, smoke inhalation group and smoke inhalation + inhibitor group. Rats in the inhibitor control group and the smoke inhalation + inhibitor group were intraperitoneally injected with LY333531 at a dose of 1 mg/(kg·d) for one week before smoke inhalation. Then, the smoke inhalation induced acute lung injury (SI-ALI) rat model was established in a smoking generator. After 12 hours, the rats were dissected and the arterial blood, lung tissue, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. The wet and dry ratio (W/D), protein concentration of BALF, malondialdehyde (MDA), nitric oxide synthase (NOS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and adaptor protein (P66Shc) were detected. Hematoxylin-Eosin staining was performed and the histopathological features of the lung were observed under a light microscope. **Results** Compared with the blank control group and the inhibitor control group, the W/D of lung tissue and the protein concentration of BALF was increased significantly ( $P < 0.05$ ); the MDA and NOS concentrations in lung tissue and plasma increased significantly ( $P < 0.05$ ); the SOD and CAT activity decreased significantly ( $P < 0.05$ ); The expression of adaptor protein (P66Shc) and activated p-P66Shc was significantly increased; obvious alveolar wall thickening, alveolar rupture, exudation, and inflammatory cell infiltration were observed in pathological sections after smoke inhalation. Compared with the smoke inhalation group, the W/D and BALF protein concentrations were decreased ( $P < 0.05$ ). MDA and NOS in serum were decreased ( $P < 0.05$ ); SOD and CAT activities were increased ( $P < 0.05$ ); the adaptor protein (P66Shc) and activated p-P66Shc expression was decreased, and alveolar rupture, exudation, and inflammatory cell infiltration were alleviated with LY333531 pretreatment. **Conclusion** LY333531 can alleviate the oxidative stress effect after smoke inhalation in rats, and reduce the damage of oxidative stress to the body.

**Key words** LY333531; smoke inhalation; oxidative stress; lung injury