

脂多糖致急性肺损伤时 Tribbles 同源蛋白 3 表达变化

丁竞帆, 尤青海

摘要 目的 探讨 Tribbles 同源蛋白 3 (TRB3) 在脂多糖 (LPS) 致急性肺损伤 (ALI) 时的变化及其与 p38-MAPK 信号通路的关系。方法 体内实验: 复制 LPS 致 ALI 大鼠模型, 分 5 ml/kg 生理盐水组和 5 ml/kg LPS 刺激组, 免疫组织化学法检测肺组织中 TRB3 蛋白表达, RT-PCR 检测肺组织 TRB3 mRNA 表达。体外实验: 体外培养大鼠肺微血管内皮细胞 (PMVEC), 随机分为 LPS 量效组 (0、2、4、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 分别孵育 4 h)、LPS 时效组 (10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 分别孵育 0、4、8、12 h) 和 p38 抑制剂 (SB203580) 干预组 (分为正常对照组、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组、10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组、10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 + 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组)。Western blot 法检测 TRB3 蛋白、p-p38 和 p38-MAPK 表达。结果 免疫组织化学法显示大鼠肺泡壁和腺上皮均表达 TRB3; RT-PCR 法检测大鼠肺组织和大鼠 PMVEC 均表达 TRB3 mRNA; 与生理盐水组比较, LPS 致 ALI 大鼠肺组织 TRB3 mRNA 表达显著增加 ($t = 15.524, P < 0.01$), LPS 刺激的大鼠 PMVEC 中 TRB3 mRNA 表达增加 ($t = 7.549, P < 0.01$); Western blot 法显示 PMVEC 表达 TRB3 蛋白的表达量随 LPS 浓度 (0、2、4、10 $\mu\text{g/ml}$) 增加逐渐升高, 差异有统计学意义 ($F = 12.619, P < 0.001$); 时效组 TRB3 蛋白表达量于 4 h 达高峰, 之后下降, 8 h 时仍高于 0 h, 差异有统计学意义 ($F = 11.273, P < 0.001$)。干预组: 与正常对照组比较, 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组诱导大鼠 PMVEC 的 p-p38、TRB3 蛋白表达量增高 ($t = 49.121, 15.113, P < 0.001$); 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 + 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组与 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组比较, p-p38、TRB3 蛋白表达量下降 ($t = 7.040, 11.900, P < 0.05, 0.001$); 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组对大鼠 PMVEC 表达 p-p38 及 TRB3 蛋白无影响, 与正常对照组比较, 差异无统计学意义。结论 LPS 致 ALI 时 TRB3 表达增加, TRB3 表达受 p38-MAPK 信号通路调控。

关键词 脂多糖; 血管内皮细胞; Tribbles 同源蛋白 3; p38-丝裂原激活蛋白激酶

中图分类号 R 345.5; R 329

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1142-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.010

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是诱发急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的重要致病因素^[1], 研究^[2-3]显示 LPS 可通过一系列信号通路激活血管内皮细胞诱导凋亡, 而肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC) 凋亡可加速急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 进程。Tribbles 同源蛋白 3 (tribbles homolog 3, TRB3) 是新发现的脚手架蛋白, 因其无 ATP 结合位点以及激酶样结构区域, 缺乏催化核心序列, 故 TRB3 不具备蛋白激酶活性, 推测其可能与其它激酶结合, 参与细胞功能调控^[4]。多项研究报告^[5-6] TRB3 参与细胞凋亡, 但其与 ARDS 发病机制的研究尚未见报道。因此, 该研究拟复制 LPS 致 ALI 大鼠模型, 应用免疫组织化学法及 RT-PCR 法观察肺组织 TRB3 表达情况; 体外培养大鼠 PMVEC、RT-PCR 和 Western blot 法观察 LPS 诱导 TRB3 表达变化, 并探讨丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路对 LPS 诱导 TRB3 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料 ① 动物: 健康雄性、100~120 g 和 250~300 g、SPF 级 SD 大鼠购自安徽省实验动物中心 [合格证号: SCXK(皖)2011-002]; ② 材料: Dulbecco 改良 Eagle 高糖培养基干粉 (DMEM) 及胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 兔抗大鼠 TRB3 多克隆抗体 (美国 Merck Millipore 公司); 兔抗大鼠 LaminA/C 多克隆抗体、兔抗大鼠 p38 多克隆抗体、兔抗大鼠 p-p38 多克隆抗体、p38-MAPK 抑制剂选择 SB203580 (美国 Cell signal 公司); 生物素标记的羊抗兔 IgG、抗大鼠 CD34 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); FITC 标记的异植物凝集素 (美国 Sigma 公司); 底物化学发光检测试剂盒 (美国 Pierce 公司); 免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

2017-04-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81100053)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院呼吸内科, 合肥 230022

作者简介: 丁竞帆, 女, 硕士研究生;

尤青海, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: amarmor@126.com

1.2.1 大鼠 ALI 模型构建 参照文献^[7] 构建, 体重约 250 ~ 300 g、健康雄性 SPF 级 SD 大鼠按随机数字表法分为 2 组(每组 8 只): 生理盐水组(5 ml/kg 生理盐水尾静脉注射) 和 LPS 刺激组(5 ml/kg LPS 尾静脉注射后观察 6 h)。

1.2.2 大鼠 PMVEC 分离培养及鉴定 参照本实验室建立的实验方法^[8] 进行。鉴定用二代细胞: 冰冷丙酮固定爬片 3 ~ 6 h 后的 PMVEC, 与 25 $\mu\text{g/ml}$ FITC 标记的异植物凝集素在暗室反应 40 min, 潮干、封片、荧光显微镜观察; 或细胞爬片后, 抗大鼠 CD34 抗体(1 : 200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 生物素化羊抗兔 IgG (1 : 200)、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, DAB 显色, 显微镜观察。

1.2.3 免疫组织化学法观察大鼠肺组织中 TRB3 表达 3% H_2O_2 室温孵育大鼠肺组织, 山羊血清封闭, 兔抗大鼠 TRB3 多克隆抗体(稀释浓度为 1 : 100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 滴加生物素标记二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 孵育、DAB 显色、复染、封片、显微镜下摄片存盘。

1.2.4 RT-PCR 法检测 TRB3 mRNA 表达 肺组织匀浆或生长良好的第 3 代细胞裂解后, Trizol 一步法提取大鼠肺组织或细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定并调整 RNA 浓度。总 RNA 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性后, 参照逆转录试剂盒说明书完成 cDNA 合成。TRB3: 上游引物: 5'-CTATCAGCCTCTGCTCGATG-3', 下游引物: 5'-TCTTCCTCCAGAAAGGCA-3', 扩增片段为 327 bp。内参 GAPDH^[5]: 上游引物: 5'-GGCACAGT-CAAGGCTGAGAATG-3', 下游引物: 5'-ATGGTGGT-GAAGACGCCAGTA-3', 扩增片段为 496 bp。PCR 采用 25 μl 反应体系, 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s 循环 30 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 测定各组目的蛋白与 GAPDH 积分光密度, 比值衡量 mRNA 表达量的相对变化。

1.2.5 Western blot 弃去细胞瓶中培养基, PBS 洗涤干净后向培养瓶中加入少量 PBS, 细胞刮刀刮取细胞瓶内 3 代 PMVEC, 收集含有细胞的 PBS 液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机离心后弃上清液。核蛋白提取试剂盒提取核蛋白; 弃去 6 孔板中培养基, PBS 洗涤干净后将 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、磷酸酶抑制剂加入 6 孔板内裂解 3 代 PMVEC, 30 min 后收集细胞总蛋白。10% 分离胶和 5% 积层胶进行蛋白电泳, 蛋白转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h 后分别予兔抗大鼠 TRB3 多克隆抗体(稀释浓度为

1 : 2 500)、兔抗大鼠 p38 多克隆抗体(稀释浓度为 1 : 1 000)、兔抗大鼠 p-p38 多克隆抗体(稀释浓度为 1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 溶液(稀释浓度为 1 : 20 000) 室温孵育 1 h, 底物化学发光检测法显影, 扫描仪扫描存盘。

1.3 时效、量效和干预实验分组 ① 时效实验(时效组): 以 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 分别刺激大鼠 PMVEC 0、4、8、12 h ($n=5$); ② 量效实验(量效组): 分别用 0、2、4、10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激大鼠 PMVEC 4 h ($n=5$); ③ 干预实验(干预组): 分为正常对照组, 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组, 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组、10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 + 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组 ($n=5$)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组变量比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMVEC 体外培养与鉴定 体外培养的原代 PMVEC 倒置显微镜观察形态呈梭形或多边形、大小均匀、单层汇合时呈鹅卵石样排列; CD34 细胞化学染色后见细胞膜着色显著, 呈明亮棕黄色(图 1A); FITC-标记的异植物凝集素结合试验阳性: PMVEC 呈明亮的黄绿色荧光(图 1B)。

2.2 肺组织和 PMVEC 中 TRB3 表达 TRB3 免疫组织化学染色的大鼠肺组织镜下观察: 肺泡壁(图 1C) 和腺上皮(图 1D) 均有棕黄色阳性信号, 故肺组织表达 TRB3 蛋白; RT-PCR 法检测大鼠肺组织和体外培养的大鼠 PMVEC 均表达 TRB3 mRNA; 与生理盐水组比较, LPS 致 ALI 大鼠肺组织 TRB3 mRNA 表达显著增加(3.675 \pm 0.423 vs 1.056 \pm 0.209, $t=15.524$, $P < 0.01$); 与生理盐水组比较, LPS 刺激的大鼠 PMVEC 中 TRB3 mRNA 表达增加(2.098 \pm 0.317 vs 0.612 \pm 0.314, $t=7.549$, $P < 0.01$, 图 1E)。

2.3 不同浓度 LPS 对 PMVEC 表达 TRB3 蛋白的影响 TRB3 表达量随 LPS 浓度(0、2、4、10 $\mu\text{g/ml}$) 增加逐渐升高, 分别为(0.169 \pm 0.089)、(0.198 \pm 0.071)、(0.338 \pm 0.089)、(0.494 \pm 0.118), 以 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激 PMVEC 4 h 时 TRB3 表达最高, 与 0 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激 PMVEC 时比较差异有统计学意义($F=12.619$, $P < 0.001$), 见图 2A。

2.4 不同时相 LPS 刺激对 PMVEC 表达 TRB3 蛋白的影响 10 $\mu\text{g/ml}$ 刺激 PMVEC 后, TRB3 蛋白表达量于 4 h 达高峰(0.443 \pm 0.087), 8 h 后下降

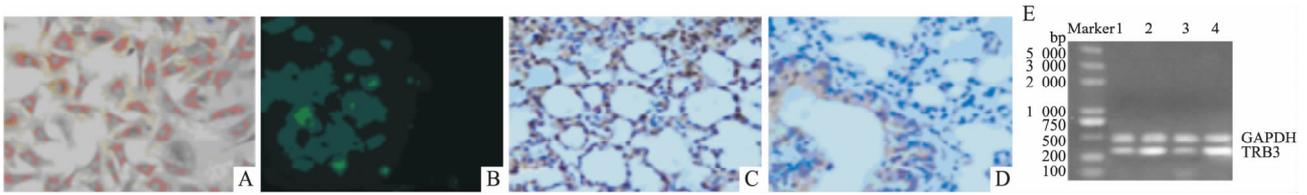


图1 大鼠 PMVEC 特征及 TRB3 表达

A: 显微镜 CD34 细胞化学染色 ×200; B: 荧光显微镜观察细胞 FITC-标记的异植物凝集素染色阳性 ×400; C: 肺泡壁 ×200; D: 腺上皮细胞 ×200; E: RT-PCR 检测大鼠肺组织、大鼠 PMVEC 均表达 TRB3 mRNA; 1: 大鼠尾静脉注射 5 ml/kg 生理盐水后 6 h; 2: 大鼠尾静脉注射 5 ml/kg LPS 后 6 h; 3: 5 ml/kg 生理盐水刺激大鼠 PMVEC 4 h; 4: 5 ml/kg LPS 刺激大鼠 PMVEC 4 h; TRB3 抗体染色大鼠肺组织后, 目标蛋白呈棕色(阳性信号), 细胞呈蓝色

(0.303 ± 0.107), 两组 TRB3 蛋白表达量均高于 0 h (0.159 ± 0.073), 组间比较差异有统计学意义 (F = 11.273, P < 0.001); TRB3 蛋白于 12 h 的表达量与 0 h 比较差异无统计学意义, 见图 2B。

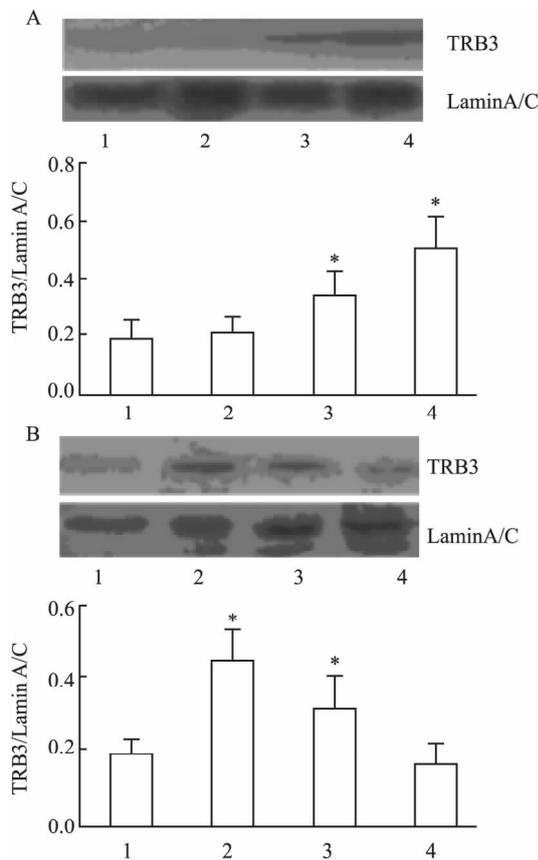


图2 LPS 刺激诱导 PMVEC 表达 TRB3 蛋白

A: 不同浓度 LPS 对 PMVEC 表达 TRB3 蛋白的影响; 1: 0 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h; 2: 2 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h; 3: 4 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h; 4: 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h; 与 0 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h 比较: * P < 0.001; B: 10 μg/ml LPS 刺激不同时间相对 PMVEC 表达 TRB3 蛋白的影响; 1: 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 0 h; 2: 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 4 h; 3: 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 8 h; 4: 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 12 h; 与 10 μg/ml LPS 刺激 PMVEC 0 h 比较: * P < 0.001

2.5 LPS 诱导 PMVEC 表达 p-p38 与正常对照组比较, 10 μg/ml LPS 诱导大鼠 PMVEC 的 p-p38 蛋白表达量增加 (0.660 ± 0.100 vs 0.227 ± 0.085, t = 49.121, P < 0.001); 10 μmol/L SB203580 + 10 μg/ml LPS 组中 p-p38 蛋白表达量 (0.557 ± 0.125) 较 10 μg/ml LPS 组下降 (t = 7.040, P < 0.05); 10 μmol/L SB203580 组对大鼠 PMVEC 表达 p-p38 蛋白无影响, 与正常对照组比较, 差异无统计学意义。见图 3A。

2.6 SB203580 对 LPS 诱导 PMVEC 表达 TRB3 的影响 与正常对照组比较, 10 μg/ml LPS 组诱导大鼠 PMVEC 的 TRB3 蛋白表达增高 (0.461 ± 0.097 vs 0.178 ± 0.084, t = 15.113, P < 0.001); 10 μmol/L SB203580 + 10 μg/ml LPS 组中 TRB3 蛋白表达量较 10 μg/ml LPS 组显著下降 (0.306 ± 0.077 vs 0.461 ± 0.097, t = 11.900, P < 0.001); 10 μmol/L SB203580 组对大鼠 PMVEC 表达 TRB3 无影响, 与正常对照组比较, 差异无统计学意义。见图 3B。

3 讨论

ARDS 发病机制是 PMVEC 通透性以及肺微血管功能改变, Gill et al [9] 通过建立脓毒血症的小鼠模型发现肺微血管功能紊乱可通过 PMVEC 凋亡介导, 提示 ARDS 与 PMVEC 凋亡相关。研究显示 TRB3 可发挥促凋亡作用, 如 Qin et al [10] 发现 TRB3 参与游离脂肪酸诱导胰岛细胞凋亡; Guo et al [11] 证明 TRB3 参与高糖诱导人脐静脉内皮细胞凋亡; 但也有研究 [12] 推测 TRB3 具有有抗凋亡效应, 如 TRB3 可抑制低糖诱导的成骨细胞凋亡, 因此, TRB3 参与凋亡发病机制, 但其具体机制可能具有刺激因素和细胞类型的差异, 那么, TRB3 是否参与 LPS 致 ARDS 发病过程有待于以后的进一步研究。

本研究首先通过基因检测技术和免疫组织化学

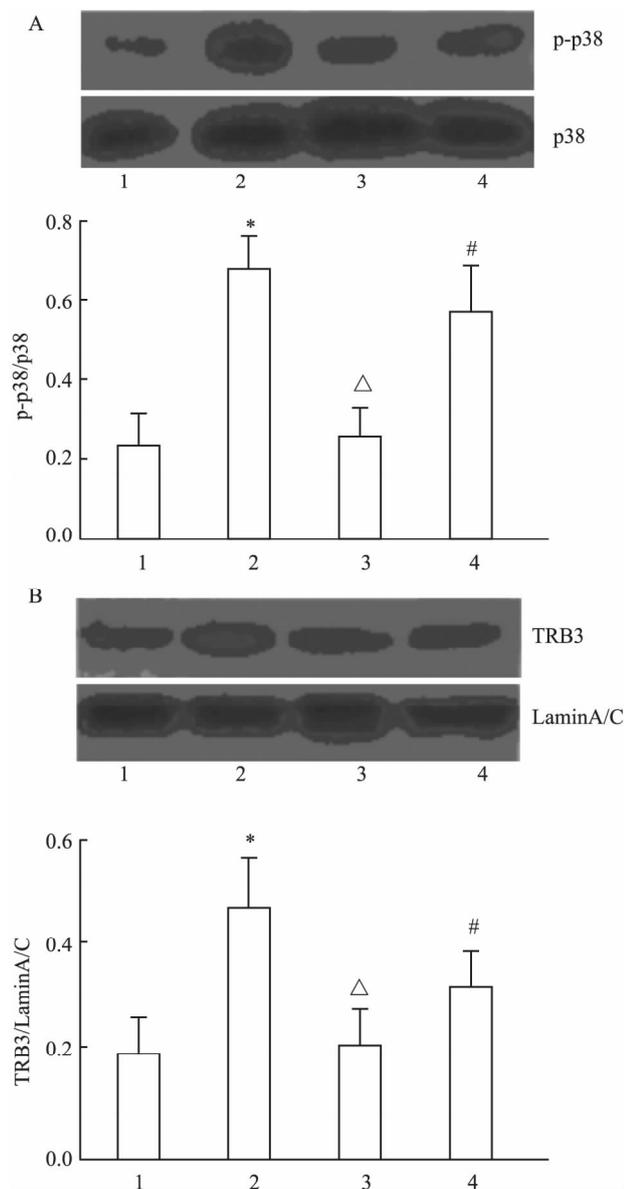


图3 LPS诱导PMVEC表达p-p38及SB203580调控LPS诱导TRB3表达

A: 10 µg/ml LPS刺激PMVEC后, Western blot法检测p-p38表达量; B: 10 µmol/L SB203580与10 µg/ml LPS联合刺激PMVEC后, Western blot法检测TRB3表达; 1: 正常对照组; 2: 10 µg/ml LPS组; 3: 10 µmol/L SB203580组; 4: 10 µmol/L SB203580 + 10 µg/ml LPS组; 与正常对照组比较: * $P < 0.001$; 与10 µg/ml LPS组比较: [#] $P < 0.05$; 与10 µg/ml LPS组比较: [△] $P < 0.001$

染色法证实大鼠肺组织表达TRB3基因和蛋白, 进一步研究显示LPS致损的ALI大鼠肺组织中TRB3基因表达增加, 提示TRB3可能参与LPS致损ALI发病过程。本研究中体外培养ARDS发病的重要靶细胞—PMVEC, 显示LPS呈剂量与时间依赖性上调PMVEC表达TRB3蛋白, 提示TRB3作为凋亡信号

分子可能参与LPS致PMVEC损伤。这一发现与Liu et al^[13]研究一致: LPS刺激原代培养的小鼠肺微血管内皮细胞, 活化的caspase-3以及相关凋亡产物表达增加。因此, 本研究推测TRB3参与LPS致ARDS发病过程, 且主要通过诱导PMVEC表达TRB3增加调控凋亡, 但TRB3是如何调控下游凋亡信号通路参与LPS致ARDS发病值得深入研究。

既往研究^[13]显示LPS可激活细胞内p38-MAPK信号通路, 本研究显示LPS能有效上调PMVEC中p-p38蛋白表达, 故LPS可能通过激活PMVEC中p38-MAPK信号通路调控细胞通透性、凋亡。Liu et al^[13]发现p38-MAPK信号通路特异性抑制剂—SB203580可下调LPS诱导PMVEC凋亡, 本实验显示SB203580也能有效下调LPS诱导TRB3蛋白表达, 提示p38-MAPK信号通路可能通过调控TRB3表达参与LPS诱导PMVEC凋亡。关于TRB3与MAPK相互作用调控细胞功能的研究较多, 如Guan et al^[14]等认为TRB3能与MAPK激酶形成复合物, 从而拮抗MAPK活性, 因为沉默TRB3后, LPS刺激诱导THP-1细胞p38-MAPK活性增加; Kiss-Toth et al^[15]将表达TRB3蛋白的质粒转入Hela细胞, 观察到p38-MAPK活性明显抑制, 因此, TRB3负性调控p38-MAPK信号通路。本研究显示LPS激活的p38-MAPK正调控PMVEC表达TRB3, 从而参与细胞功能调控等, 但关于TRB3与MAPK信号通路在PMVEC中的关系仍有待深入研究。

综上所述, 本实验显示大鼠肺组织和大鼠PMVEC均表达TRB3, LPS刺激诱导TRB3表达增加, 且TRB3表达受p38-MAPK信号通路调控, 从而初步推断TRB3可能参与LPS致ARDS发病过程, 为进一步了解ARDS发病机制提供理论依据。

参考文献

- [1] Yu J, Wang Y, Li Z, et al. Effect of heme oxygenase-1 on mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36530.
- [2] Triggler C R, Samuel S M, Ravishanker S, et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2012, 90(6): 713-38.
- [3] Yi L, Huang X, Guo F, et al. Lipopolysaccharide induces human pulmonary micro-vascular endothelial apoptosis via the YAP signaling pathway [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 133.
- [4] Hegedus Z, Czibula A. Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function [J]. Cell Signal, 2007, 19(2): 238-50.
- [5] Wang W, Cheng J, Sun A, et al. TRB3 mediates renal tubular

- cell apoptosis associated with proteinuria [J]. *Clin Exp Med*, 2015, 15(2): 167–77.
- [6] Zhou X, Wang L, Wang M, et al. Emodin-induced microglial apoptosis is associated with TRB3 induction [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(4): 594–602.
- [7] 张丹, 尤青海, 孙耕耘, 等. 脂多糖诱导急性肺损伤大鼠肺组织小窝蛋白-1 的变化 [J]. *中华急救医学*, 2013, 33(1): 67–71.
- [8] You Q H, Sun G Y, Wang N, et al. Role of src-suppressed C kinase substrate in rat pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability stimulated by inflammatory cytokines [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(11): 949–58.
- [9] Gill S E, Rohan M. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury *in vivo* [J]. *Respir Res*, 2015, 16: 109.
- [10] Qin J, Fang N, Lou J, et al. TRB3 is involved in free fatty acid-induced INS-1-derived cell apoptosis *via* the protein kinase C δ pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96089.
- [11] Guo L, Guo Z X, Gong H P, et al. Tribbles homolog 3 is induced by high glucose and associated with apoptosis in human endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 1963–70.
- [12] Ord D, Meerits K. TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4 [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(16): 3556–67.
- [13] Liu Z F, Zheng D, Fan G C, et al. Heat stress prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells by blocking calpain/p38 MAPK signaling [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(8): 896–904.
- [14] Guan H, Shuaib A, Leon D D, et al. Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32667.
- [15] Kiss-Toth E, Bagstaff S M, Sung H Y, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 42703–8.

Effects of lipopolysaccharide on the expression of tribbles homolog 3 in acute lung injury

Ding Jingfan, You Qinghai

(Dept of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To examine the expression of tribbles homologous 3 (TRB3) on lipopolysaccharide (LPS) induced acute lung injury (ALI) and its relationship with p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.

Methods Rats received a intravenous injection by LPS (5 ml/kg) as models of ALI and a intravenous injection by NS (5 ml/kg) as the control. In rat lung tissue the expression of TRB3 protein was examined using immunohistochemical staining, the expression of TRB3 mRNA was determined by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR). Cultured rat pulmonary microvascular cells (PMVEC) were randomly divided into dose-dependent, time-dependent and intervention groups *in vitro*. In dose-dependent group, PMVEC were stimulated by various concentrations of LPS (0, 2, 4, 10 $\mu\text{g/ml}$) for 4 h, and in time-dependent group PMVEC were challenged by 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for different time (0, 4, 8, 12 h). In intervention group, PMVEC grown in normal medium or medium with 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 4 h were pretreated using p38-MAPK inhibitor (10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580) for 2 h. Western blot was used to examine expression of TRB3, p-p38 and p38-MAPK.

Results Immunohistochemical staining showed that TRB3 protein distributed in rat alveolar walls and glandular epithelium. Increased TRB3 mRNA expression using RT-PCR were found in lung tissue of rats injected by LPS when compared to those in NS group ($t = 15.524$, $P < 0.01$). Increased TRB3 mRNA expression using RT-PCR had also been found in PMVEC stimulated by LPS when compared to those in NS group ($t = 7.549$, $P < 0.01$). In PMVEC, LPS significantly increased the expression of TRB3 protein in a dose-dependent manner (0, 2, 4, 10 $\mu\text{g/ml}$) after stimulation for 4 h ($F = 12.619$, $P < 0.001$). At indicated time-points after PMVEC were challenged by 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, the expression of TRB3 protein raised at 4 h, then decreased gradually at 8 h, but still was higher than 0 h group, there were significant difference ($F = 11.273$, $P < 0.001$). LPS significantly increased the expression of p-p38 protein after stimulation for 4 h when compared to the control group, LPS also increased the expression of TRB3 protein after stimulation for 4 h when compared to the control group ($t = 49.121, 15.113$, $P < 0.001$). SB203580 decreased the protein levels of p-p38 in response to LPS, SB203580 also decreased the protein levels of TRB3 in response to LPS

多梳基因蛋白 EZH2 对 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响

蔡露青¹, 袁小龙², 童铸廷², 夏瑞祥¹

摘要 目的 探讨多梳基因蛋白 EZH2 对鼻腔 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响。方法 采用 MTS 实验测定 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK6 对吉西他滨的半数抑制浓度 (IC₅₀), 利用线性二次模型拟合测定干扰 EZH2 对 SNK6 细胞的放疗增敏比 (SER); 通过流式细胞仪 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡, 并用 Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase-3 和 PARP 的断裂带的水平; 用免疫荧光检测 EZH2 干扰后对放射引起的 DNA 损伤的影响。结果 干扰 EZH2 降低吉西他滨的 IC₅₀ 约为 2.54 倍, 并提高吉西他滨药物引起的凋亡。沉默 EZH2 能够提高 SNK6 细胞的放疗敏感性, SER = 5.855; 提高射线引起的细胞凋亡, 并增加细胞凋亡蛋白断裂带的产生; 增加射线诱导的 DNA 损伤。结论 EZH2 可以提高 NK/T 淋巴瘤细胞的放化疗敏感性。

关键词 鼻腔 NK/T 淋巴瘤; EZH2; 放化疗敏感性; 细胞凋亡; DNA 损伤

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)08-1147-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.011

人类 NK/T 淋巴瘤具有高度侵袭性, 预后差, 尚缺乏有效的治疗手段, 且对其病理生理状态研究较少^[1]。目前 NK/T 淋巴瘤的治疗方式主要包括化疗, 放疗以及放化疗相结合的综合治疗, 化疗、放疗和综合治疗的 5 年生存率分别为: 45%、64% 和 86%; 但仍有 57% 的患者在治疗后半年内复发^[2]。目前推测: 化疗药物耐药以及放疗抵抗是肿瘤复发

的重要影响因素。因此, 阐明 NK/T 淋巴瘤的化疗药物和放疗抵抗的分子机制, 将为临床上提高 NK/T 淋巴瘤的放化疗敏感性提供重要的参考价值。EZH2 是多梳基因蛋白复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 的一个核心组份, 其具有组蛋白 H3 第 27 位酪氨酸 (histone H3 lysine 27 methylation, H3K27) 特异性的组蛋白三甲基化转移酶的活性, 可使抑癌基因转录抑制, 进而引起肿瘤的发生和发展^[3-4]。近来的研究^[5-7]显示, 果蝇 zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 蛋白在人类的很多肿瘤中存在过表达现象, 例如前列腺癌、乳腺癌、B 细胞淋巴瘤、鼻咽癌等, 且 EZH2 的表达水平与肿瘤的预后和进展密切相关。最近的研究^[8]显示: EZH2 可促进 NK/T 淋巴瘤细胞的增殖与进展。然而, 关于 EZH2 与 NK/T 淋巴瘤放化疗敏感性的关系尚未有相关报道。因此, 该研究通过建立 EZH2 的鼻腔 NKT 淋巴瘤细胞株 SNK-6 细胞株的稳定沉默株, 运用 MTT、线性二次模型、Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡等实验方法初步阐明 EZH2 对于 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响, 为 NK/T 淋巴瘤治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 兔抗人单克隆抗体 EZH2G (ab133736) 购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 Cleaved PARP Antibody (Asp214)、兔抗人 Cleaved Caspase-3 (Asp175) 抗体、鼠抗人单克隆抗体 Phospho-Histone H2AX (γ -H2AX)、兔抗人 p53 结合蛋白 1 (p53 binding protein 1, 53BP1) 抗体均购自美国 Cell signaling technology 公司; AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit 购自南京 Vazyme Biotech 公司; Aqueous One Solution MTS assay 购自美国 Promega 公司。

2017-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81201743); 中国教育部博士基金 (编号: 20123420120008); 安徽省博士后科学基金资助项目 (编号: 2015B053)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 血液内科、² 放疗科, 合肥 230022

作者简介: 蔡露青, 女, 硕士研究生;

夏瑞祥, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

($t = 7.040, 11.900, P < 0.05, 0.001$). SB203580 alone had no effect on the expression of p-p38 and TRB3, when compared to the control group, there was not statistically significant. **Conclusion** Levels of TRB3 protein increase in LPS-induced acute lung injury, and is regulated by p38-MAPK pathway.

Key words lipopolysaccharide; vascular endothelial cell; TRB3; p38-mitogen-activated protein kinase