

脂多糖诱导急性肺损伤小鼠肺脏蛋白质电泳图谱分析

张自丽^{1,2}, 胡璇², 刘慧莹², 柏长青^{1,2}

摘要 目的 蛋白质双向电泳技术观察气管滴注脂多糖诱导急性肺损伤后小鼠肺组织在蛋白质水平上的改变。方法

小鼠气管内滴注脂多糖制备小鼠急性肺损伤模型, 48 h 后做小鼠肺 CT、肺病理切片及测肺湿/干重比用于观察肺损伤程度; 并提取总蛋白, 进行双向电泳测定, 对获取的蛋白图谱进行分析, 寻找差异表达的蛋白质。结果 实验组肺 CT 显示明显炎症表现; 病理切片显示小鼠肺组织水肿充血改变明显, 肺泡中有大量红细胞和中性粒细胞浸润, 肺损伤评分和肺湿/干重比正常组增加; 双向电泳结果显示实验组小鼠比正常组小鼠的肺组织总蛋白数增加, 蛋白质点数为 (100 ± 2) , 其中有 21 个表达的蛋白差异点, 通过蛋白质谱鉴定和生物信息检索结果显示蛋白质过氧化物酶 6 在实验组和正常组中有明显差异, 其可能与急性肺损伤的发生相关。结论

通过向小鼠气管内滴注脂多糖可以诱发急性肺损伤, 蛋白质双向电泳结果显示实验组小鼠肺组织中蛋白质过氧化物酶 6 表达的增加, 机制还待进一步研究。

关键词 急性肺损伤; 脂多糖; 蛋白质双向电泳; 过氧化物酶 6

中图分类号 R 563

2017-01-11 接收

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2013ZX10004203); 解放军 307 医院创新科研基金(编号: FC-2014-01)

作者单位: ¹安徽医科大学解放军 307 医院临床学院, 合肥 230032

²军事医学科学院附属医院呼吸与危重症医学科, 北京 100071

作者简介: 张自丽, 女, 硕士研究生;

柏长青, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: mlp1604@sina.com;

刘慧莹, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: liuhuiying1982@sina.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0670-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.010

急性肺损伤(acute lung injury, ALI) 是临床上常见的危重症, 可由多种因素导致其发生, 发生后可引起患者急性、进行性低氧性呼吸衰竭等, 其发病机制复杂, 迄今尚未完全阐明^[1]。目前 ALI 在治疗上主要以机械通气和对症治疗为主, 尚无切实有效的治疗方法, 总体死亡率仍高达 40%, 由于 ALI 具有较高的发病率和死亡率, 因此成为研究的热点^[2]。近年来人们发现多种方法可以诱导实验动物发生 ALI, 其中包括注射脂多糖的方法^[3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 小鼠模型主要表现为毛细血管通透性增加、肺泡和间质水肿、炎症细胞聚集等, 通过这一方法能很好的模拟临床常见疾病如肺炎、脓毒血症所导致的肺损伤^[4], 所以该研究采取气管滴注 LPS 的方法诱导 ALI 动物模型, 以小鼠肺组织为研究对象, 利用双向电泳技术(two-dimensional electrophoresis of protein 2-DE) 对模型小鼠肺组织进行分析^[5], 从蛋白质组水平揭示 ALI 的致病机制, 为进一步分析 ALI 提供了工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康成年雌性 C57BL/6J 小鼠, 8 周龄, 18 ~ 22 g, 购于北京华阜康生物科技公司, 于军事医学科学院实验动物中心内饲养; 脂多糖购于美国 Sigma 公司; 固定化 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPIG) 胶条(18 cm, pH 4 ~ 7, pH 3 ~ 10)、丙

from blood samples that we collected by ficoll liquid separation and treated with different concentrations of IFN- α and VD. Western blot was used to analyze the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA in PBMCs. **Results** After treatment with 0 ~ 1 600 IU/ml IFN- α , the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA protein were significantly increased and reached the highest expression levels when treated with 400 IU/ml IFN- α . Similar to the results of IFN- α , VD alone enhanced the expression levels of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA protein, especially at concentrations of 0.1 nmol/ml. In comparison with IFN- α alone, the combination IFN- α with VD significantly promoted expression of STAT1, STAT2, IRF-9 and MxA. **Conclusion** VD may enhance IFN- α antiviral effect via up-regulation of JAK-STAT signal transduction molecules and the antiviral proteins expression.

Key words vitamin D; hepatitis B virus; peripheral blood mononuclear cells

酮均购于北京 GE Healthcare 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(sodiumdodecylsulfonate, SDS)、四甲基乙二胺、过硫酸铵、碘代乙酰胺、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT) 1.5 mol/L 缓冲液购于北京 AMRESCO 公司; 其余均为国产分析纯试剂; Protein I 水平电泳仪、Protein II 垂直电泳仪及附件购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 ALI 模型的制备 将 10 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组和实验组, 用 0.5% 戊巴比妥钠 300 μ l 麻醉小鼠, 小鼠麻醉后用 1 ml 胰岛素注射器经气管内滴注 LPS 10 mg/kg, 待小鼠清醒后, 在清洁级动物实验室常规喂养。

1.2.2 肺组织病理切片染色及评分 小鼠致伤后 48 h 给予麻醉处死, 取左肺于 10% 福尔马林中固定 20 h, 然后石蜡包埋、切片, HE 常规染色后进行 ALI 评分, 评分标准参照按照文献 Mrozek et al^[6] 的方法进行病理评分, 病理评分范围为 0~16 分, 见表 1。

1.2.3 肺组织湿/干(W/D) 重比测定 取小鼠右侧湿肺组织, 用滤纸彻底吸净表面血迹后准确称取其质量, 用电热恒温干燥箱 80 $^{\circ}$ C 下烘干, 12 h 后称干重, 按公式计算肺 W/D 重比。

表 1 肺组织病理损伤评分标准

病变类型	病变范围及分值				
	0	0~25%	25%~50%	50%~75%	75%~100%
肺泡充血或出血	0	1	2	3	4
水肿	0	1	2	3	4
中性粒细胞浸润	0	1	2	3	4
肺泡壁增厚/透明膜形成	0	1	2	3	4

1.3 蛋白质双向电泳检测

1.3.1 蛋白质样品制备 肺组织经研磨后, 加入裂解液(8 mol/L 尿素, 50 mmol/L DTT, 4% 丙磺酸内盐)。加入 40 μ l 核糖核酸酶 A 和 40 μ l 核糖核酸酶。室温静置 5 h, 离心后收集上清液。用北京 GE Healthcare 公司 2-D Quant Kit 试剂盒定量, 1 mg/支分装后 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3.2 等电聚焦电泳 取 2 mg 蛋白样品量进行一向电泳, 样品中加入 1 ml 预冷的丙酮, 过夜后 4 $^{\circ}$ C、18 891 r/min 离心 30 min, 加入 348 μ l 8 mol/L 水化液(裂解液中加入微量溴酚蓝), 1.7 μ l IPG 缓冲液混匀后, 室温静置 1 h, 15 $^{\circ}$ C、59 134 r/min 离心 40 min, 取上清液上一向电泳。见表 2。

表 2 等电聚焦电泳参数

步骤	电压(V)	时间(h)	总电压时(Vh)
主动水化	0	12	0
1	500	1	500
2	1 000	1	1 000
3	8 000	12	60 000

1.3.3 第二向 - 垂直平板 SDS-PAGE 一向胶条先用 DTT 平衡胶条 15 min, 再用碘代乙酰胺平衡胶条 15 min, 将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方。进行二向电泳 20 mA 先进行 20 min, 再换 90 mA 进行 3 h。二向电泳后凝胶用染色液(考马斯亮蓝 G-250) 染色过夜, 再用 1% 冰乙酸脱色。凝胶用 GE Image scanner III 扫描仪扫描, 并对图像进行分析。

1.3.4 图像扫描与分析 凝胶用 GE Image scanner III 扫描仪扫描, 并对图像进行分析。

1.3.5 蛋白斑点胶内酶解和质谱分析 切取凝胶中的蛋白斑点, 送至华大蛋白质研发中心有限公司分析, 进行胶内酶解和质谱分析, 获得蛋白斑点的肽质量指纹图谱进行数据库搜索比对, 初步对蛋白点进行鉴定。

1.4 统计学处理 数据均采用 SPSS 17.0 软件包处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺 CT 小鼠肺 CT 结果显示, 与正常小鼠相比, 急性肺损伤模型小鼠肺部炎症浸润明显增加, 可观察到大部分肺叶充满炎性渗出。见图 1。

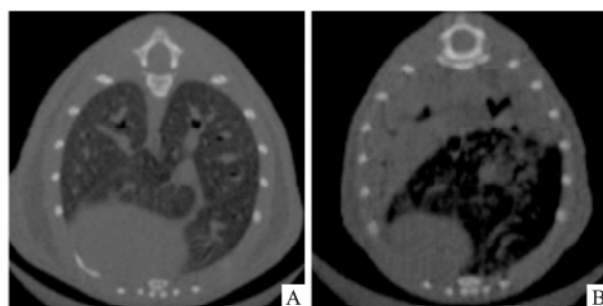


图 1 小鼠肺 CT

A: 正常组; B: 实验组

2.2 肺组织病理切片及评分 正常组观察肺泡结构清晰, 肺泡间隔完整, 肺泡腔清晰; 实验组可见肺泡正常结构消失, 肺泡间隔明显增厚, 肺间质及肺泡腔内大量炎性细胞浸润及红细胞漏出, 肺部炎症反应增加, 此结果与肺 CT 的结果完全吻合。见图 2。

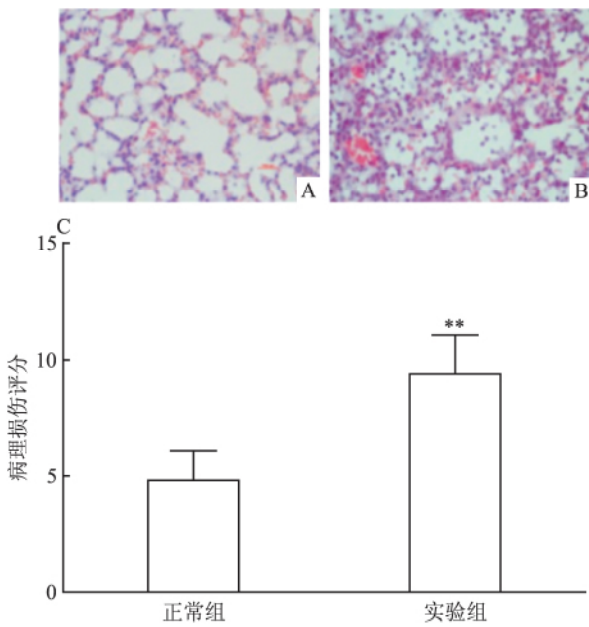


图2 肺组织病理切片和损伤评分 HE ×200

A: 正常组; B: 实验组; C: 正常组和实验组病理损伤评分; 与正常组比较: ** $P < 0.01$

2.3 肺组织湿干重比 (wet-to-dry ratio ,W/D)

W/D 可以对肺水肿程度进行较好的评估 ,实验组小鼠用内毒素建模成功后与正常小鼠相比 ,肺组织 W/D 明显升高。见图 3。

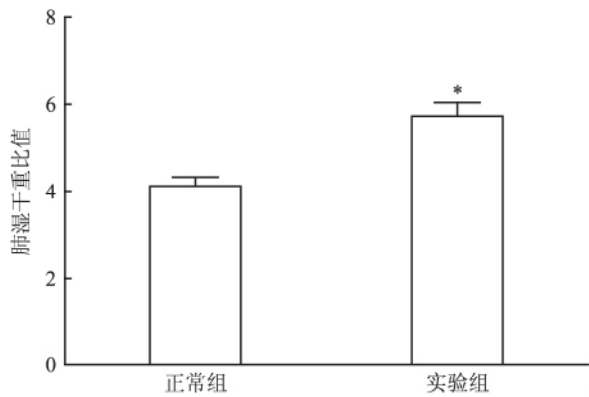


图3 肺 W/D 重比
与正常组比较: * $P < 0.05$

2.4 蛋白质双向电泳 提取全蛋白后 ,取 2 mg 进行电泳 ,一向电泳选取 pH 3 ~ 10 ,18 cm 胶条 ,可以得到蛋白点分布均匀的双向电泳图谱 ,电泳图上能分辨出的蛋白点数是 (100 ± 2) 。在电泳胶上可见正常肺和内毒素所致的实验组的蛋白质组的分布基本相似 ,其主要构成点阵基本一致 ,但有多点差异 ,正常组上样量为 2 mg ,pH 4 ~ 7 ,18 cm 胶条 ,蛋白点

数为 (100 ± 2) ;实验组上样量为 2 mg ,pH 3 ~ 10 ,18 cm 胶条 ,蛋白点数为 (100 ± 2) 。见图 4。

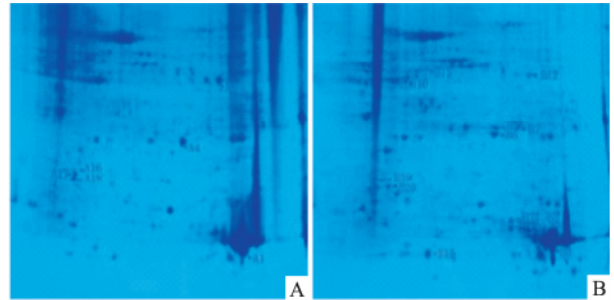


图4 肺组织蛋白质双向电泳
A: 正常组; B: 实验组

2.5 蛋白鉴定结果 选取图 4 中 21 个蛋白质点用液相色谱质谱 (LC-MS/MS) 的方法进行质谱鉴定。质谱分析后 ,获得 21 个蛋白质点的肽质量指纹图谱 ,使用蛋白质谱鉴定和生物信息检索结果显示两组间差异较大的蛋白是过氧化物酶 6 和过氧化物酶 2 ,分子质量分别为 24 969 u 和 21 936 u ,等电点分别为 5.71 和 5.2 ,蛋白得分分别为 26 651 和 29 751 ,覆盖率分别为 95% 和 93% 。

3 讨论

大量研究^[7]表明 ,向气管内滴注 LPS 可以诱发急性肺部炎症 ,较常见于诱导 ALI 动物模型的药物研究^[8] 结果显示滴注 LPS 后小鼠肺 CT 呈炎症浸润表现 ,肺组织病理损伤评分及 W/D 重比较正常组明显增高 ,小鼠肺组织病理改变符合急性期 ALI 的病理改变。本实验选用气管内滴注 10 mg/kg 的 LPS 可以成功建立 ALI 的模型 ,滴入 LPS 后 ,麻醉都可以成功复苏 ,无死亡。W/D 重比提示有肺水肿的发生 ;通过肺组织 HE 染色图片可以看出 ,肺泡结构破坏适中 ,肺组织充血、水肿 ,大量的炎症因子以及炎症细胞浸润 ,肺间质增宽。蛋白质是基因功能的最终执行者 ,双向电泳从等电点和分子量两个方面展示蛋白质 ,是蛋白质组研究^[9] 中的经典方法。双向电泳中蛋白样品的制备直接影响蛋白量的多少 ,用 8 mol/L 尿素提取小鼠肺组织蛋白后 ,用试剂盒进行蛋白定量后 ,蛋白浓度为 50 μl/mg; 根据小鼠肺组织蛋白的等电点一般选取 pH 3 ~ 10 进行一向电泳 ,可以得到蛋白点分布均匀的电泳图。实验显示损伤后小鼠与正常组小鼠肺组织有明显差别 ,本研究选择使用双向电泳的方法得到了实验组和正常

组的蛋白组图谱,两者存在一些表达差异蛋白质,其中过氧化物酶6在实验组中表达增高,有研究^[10]表明过氧化物酶6具有强大的应激作用,在肺部疾病发生发展中扮演重要作用。差异表达的蛋白质往往与疾病的发生和发展有直接或间接的关系,因此,可以利用双向电泳图谱分析疾病的蛋白质表达差异及其特异标志物,也可以根据蛋白质的差异程度进行疾病的诊断^[11]。此次实验仅显示实验组与正常组之间存在差异,还需要通过质谱分析或其他方法得到这些蛋白质的序列,测定其结构,研究这些蛋白质与ALI发生发展的关系,进一步探讨其发生机制。

参考文献

- [1] Matthay M A, Ware L B, Zimmerman G A. The acute respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2731-40.
- [2] Matthay M A, Zimmerman G A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 319-27.
- [3] Fitzgerald M, McAuley D F, Matthay M. Is there a need for emerging drugs for the acute respiratory distress syndrome? [J] *Expert Opin Emerg Drugs*, 2014, 19(3): 323-8.
- [4] Huang W C, Lai C L, Liang Y T, et al. Phloretin attenuates LPS-induced acute lung injury in mice *via* modulation of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Int Immunopharmacol* 2016 40: 98-105.
- [5] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(10): 4007-21.
- [6] Mrozek J D, Smith K M, Bing D R, et al. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(4 Pt 1): 1058-65.
- [7] Matute-Bello G, Frevert C W, Martin T R. Animal models of acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 295(3): L379-99.
- [8] Wu D D, Pan P H, Liu B, et al. Inhibition of alveolar macrophage pyroptosis reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Chin Med J(Engl)* 2015, 128(19): 2638-45.
- [9] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. *Proteomics* 2004, 4(12): 3665-85.
- [10] Weng T I, Wu H Y, Kuo C W, et al. Honokiol rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality *via* the inhibition of oxidative stress and inflammation [J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(3): 533-41.
- [11] 侯伟健, 吴广平, 贾兰玲, 等. 肺癌与良性胸腔积液蛋白质双向电泳图谱差异分析 [J]. *中国医科大学学报* 2007, 36(1): 52-4.

Two-dimensional gel electrophoresis protein analysis of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice

Zhang Zili^{1,2}, Hu Xuan², Liu Huiying², et al

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Respiratory Medicine, PLA Hospital 307, Beijing 100071)

Abstract Objective To observe the changes of lung proteins level with acute lung injury (ALI) by intratracheal instillation of lipopolysaccharide with two-dimensional polypropylene gel electrophoresis (2DE). **Methods** The ALI model was induced by intratracheal instillation of lipopolysaccharide, after 24 hours, the mouse computed tomography, histopathological changes in lung tissue and lung wet/dry weight ratio were observed. The lung total protein extracts of the two groups were analyzed by 2DE, then analyzed the comparison of electrophoregram and found out the differential expression of protein spots. **Results** The experimental mouse computed tomography showed lung inflammation; histopathological changes in lung tissue had higher level of pulmonary edema, red cell and neutrophil infiltration in the pulmonary alveoli; lung injury score and lung wet/dry weight ratio of experiment group were significantly higher than that of control group. Results of 2DE indicated the lung total proteins in experiment group were higher than the control group. There were 21 differential expression proteins in the (100 ± 2) protein points, peroxiredoxin 6 was identified with LC-MS/MS and bioinformatics database of which was differential expression proteins, and the expression changing of this protein may be involved in the acute lung injury. **Conclusion** ALI model could be established after intratracheal instillation of lipopolysaccharide, the results of 2DE show that the peroxiredoxin 6 is found upward-expressed in the experiment group, while the mechanism is still needed to be well studied.

Key words acute lung injury; lipopolysaccharide; two-dimensional polypropylene gel electrophoresis; peroxiredoxin 6