



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2020.08.015

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.08.015

· 临床基础研究 ·

P38 有丝分裂原活化蛋白激酶在 烟雾暴露大鼠肺血管重塑中的作用

马海丽 彭红星 曾玉兰 江雅婷 周月泉

[摘要] **目的** 探讨 P38 有丝分裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)在烟雾暴露大鼠肺血管重塑中的作用。**方法** 50 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组(C 组)、烟雾暴露 4 周组(S4 组)、烟雾暴露 12 周组(S12 组)、P38MAPK 抑制剂(SB203580)干预 4 周组(SB4 组)及 SB203580 干预 12 周组(SB12 组),每组各 10 只。采用苏木素-伊红染色观察大鼠肺动脉形态改变,测量并计算肺动脉管壁面积/血管总面积比值(WA)和血管壁厚度/血管外径比值(WT);采用免疫组化法检测大鼠肺动脉 α -平滑肌肌动蛋白(SMA)和 P38MAPK 蛋白的表达水平;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠肺动脉 P38MAPK mRNA 的表达水平。**结果** 烟雾暴露组大鼠肺动脉管壁可见不同程度增生;与烟雾暴露各组比较,P38MAPK 抑制剂干预各组大鼠肺动脉管壁增生减弱。S4 组、S12 组大鼠肺动脉 WA、WT、 α -SMA、P38MAPK 蛋白及 mRNA 的表达水平均高于 C 组,且 S12 组上述指标均高于 S4 组($P < 0.05$);SB4 组大鼠肺动脉 WA、WT、 α -SMA、P38MAPK 蛋白及 mRNA 的表达水平均低于 S4 组,SB12 组上述指标均低于 S12 组($P < 0.05$)。**结论** 烟雾暴露可上调大鼠肺血管 P38MAPK 的表达并促使肺血管重塑,SB203580 明显抑制大鼠肺血管 P38MAPK 的表达和肺血管重塑,推测 P38MAPK 信号通路可能参与烟雾暴露引起的大鼠肺血管重塑过程。

[关键词] 烟雾暴露; P38 有丝分裂原活化蛋白激酶; 肺血管重塑

Effect of P38 mitogen-activated protein kinase on pulmonary vascular remodeling in rats exposed to smoke Ma Haili, Peng Hongxing, Zeng Yulan, Jiang Yating, Zhou Yuequan. Department of Respiratory Medicine, Liyuan Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of P38 mitogen-activated protein kinase(P38MAPK) on pulmonary vascular remodeling in rats exposed to smoke. **Methods** Fifty SD male rats were randomly divided into control group(C group), 4-week smoke exposure group(S4 group), 12-week smoke exposure group(S12 group), 4-week SB203580 treatment group(SB4 group) and 12-week SB203580 treatment group(SB12 group), with 10 rats in each group. Morphological changes of pulmonary artery were assessed by hematoxylin-eosin staining, and the ratio of pulmonary artery wall area/total vessel area(WA) and the ratio of vessel wall thickness/vascular outer diameter(WT) were measured and calculated. Expression level of α -smooth muscle actin(SMA) and P38MAPK protein of pulmonary artery in rats were detected by immunohistochemical staining. Expression level of P38MAPK mRNA of pulmonary artery in rats was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** Pulmonary artery wall of rats in smoke exposure groups showed different degree of hyperplasia. Compared with smoke exposure group, P38MAPK inhibitor intervention weakened hyperplasia of pulmonary artery wall of rats. WA, WT, α -SMA, P38MAPK protein and mRNA in S4 group and S12 group were higher than those in C group, above in S12 group were higher than those in S4 group($P < 0.05$); WA, WT, α -SMA, P38MAPK protein and mRNA in SB4 group were lower than those in S4 group, indexes in SB12 group were lower than those in S12 group($P < 0.05$). **Conclusion** Smoke exposure can up-regulate the expression of P38MAPK in pulmonary vascular and induce pulmonary vascular remodeling. SB203580 can significantly inhibit the expression of P38MAPK in pulmonary vascular and pulmonary artery remodeling. P38MAPK signaling pathway may participate in pulmonary vascular remodeling induced by smoke exposure.

[Key words] Smoking exposure; P38 mitogen-activated protein kinase; Pulmonary vascular remodeling

基金项目:华中科技大学自主创新基金资助项目(NO2016YXMS129)

作者单位:430077 武汉,华中科技大学同济医学院附属梨园医院呼吸内科

通讯作者:彭红星, E-mail: penghx2008@126.com

肺血管重塑在慢性阻塞性肺疾病和肺源性心脏病过程中起关键作用,吸烟、炎症、低氧等均可诱导肺血管重塑^[1],其中长期烟雾暴露可引起肺血管平滑肌细胞的异常增殖,促使肺肌型动脉增加、肺小动脉结构改变^[2],是引起肺血管重塑的一项独立危险因素。有研究表明,烟雾暴露可促使 P38 有丝分裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)的活化增加,激活一系列炎症和细胞因子,在慢性阻塞性肺疾病的气道炎症及气道重塑病理过程中发挥重要作用。本研究通过制备烟雾暴露大鼠模型,观察不同时间段 P38MAPK 的表达水平及肺血管重塑情况,以及加入 P38MAPK 抑制剂后 P38MAPK 表达水平及肺血管重塑的变化,探讨 P38MAPK 信号通路与烟雾暴露大鼠肺血管重塑的关系。

材料与方法

1. 材料:SD 雄性大鼠 50 只,体质量为 200 ~ 220 g,饲养于华中科技大学同济医学院动物中心。兔抗 P38MAPK 多克隆抗体购于爱必信(上海)生物科技有限公司, P38MAPK 特异性抑制剂 SB203580(美国 Selleck 公司)、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(SMA)单克隆抗体、DAB 显色试剂盒均购于武汉谷歌生物公司, Mix 试剂盒和逆转录试剂盒购于康为世纪公司, P38MAPK、GAPDH 引物由天一辉远公司合成。

2. 方法

(1)动物模型制备及分组:制备烟熏箱(110 cm × 75 cm × 50 cm),每 5 支香烟捆扎点燃后放入烟熏箱,将大鼠分别装入小钢丝笼中,置于烟熏箱内被迫吸入烟雾,使用 CY-12C 数字测氧仪监测烟熏箱中的氧浓度,使烟熏箱中的氧浓度保持在 20% ~ 21%^[3]。将 SD 大鼠随机分为 5 组:对照组(C 组)、烟雾暴露 4 周组(S4 组)、烟雾暴露 12 周组(S12 组)、SB203580 干预 4 周组(SB4 组)、SB203580 干预 12 周组(SB12 组),每组各 10 只。C 组大鼠在常规无烟环境中饲养;烟雾暴露各组大鼠放入烟熏箱中,每天烟雾暴露 2 次,2 次暴露时间间隔 > 4 h;SB203580 干预各组:前期制备同烟雾暴露组,每次吸烟前予每只大鼠腹腔注射 5 mg/kg SB203580。SB203580 以二甲基亚砜(DMSO)溶解,使用前以生理盐水稀释,使 DMSO 的终浓度为 2%, SB203580 的最终浓度为 5 mg/ml。C 组大鼠分别于第 4、12 周各处死 5 只, S4 组和 SB4 组大鼠均于第 4 周处死, S12 组和 SB12 组大鼠均于第 12 周处死。

(2)病理标本制作:各构造模完成后麻醉后处死大鼠,分离肺脏和右肺动脉,右肺动脉置于 -80 °C 冰箱保存供逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)用。左肺放入 4% 的中性甲醛固定,脱水、石蜡包埋,用于苏木素-

伊红(HE)染色和免疫组化。

(3)肺组织 HE 染色和病理形态观察:石蜡包埋切片后对肺组织进行 HE 染色,观察各组大鼠肺组织及肺血管的病理学改变。每张切片随机选取结构完整、断面直径为 50 ~ 200 μ m 的肺动脉 5 支,采用 HMIAS-2000 彩色图文分析系统进行测量分析,测量血管的内外径,计算血管壁厚度、血管壁面积、血管总面积及血管重塑指标[血管壁面积/血管总面积(WA)及血管壁厚度/血管外径(WT)]。

(4)免疫组化法检测肺动脉 α -SMA 和肺动脉 P38MAPK 蛋白的表达水平:石蜡切片脱蜡水化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,每次 5 min,3% 过氧化氢孵育 10 min, PBS 冲洗 2 次,每次 5 min, 枸橼酸钠缓冲液抗原修复后,滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20 min,分别加入小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体和兔抗 P38MAPK 多克隆抗体,4 °C 过夜,加入 DAB 试剂盒显色,脱水、透明、封片后,在显微镜下随机选取每张切片上肺动脉采集图像,采用 HMIAS-2000 图文分析系统进行定量分析。

(5)RT-PCR 检测肺动脉 P38MAPK mRNA 的表达水平:将保存于 -80 °C 冰箱中的肺动脉组织加入 TRIzol 试剂,按照试剂盒说明书提取肺动脉总 RNA,取 3 μ g RNA 进行逆转录合成 cDNA,然后取 1 μ l cDNA 进行 PCR 扩增,设计特异性引物,反应在 25 μ l 体系中进行,反应条件为 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。由 BioRad 软件分析计算各组 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 P38MAPK mRNA 表达水平。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
P38MAPK	CGGTGTCTGCTGCTTTTGTAT	CTGTAGGTCCTTTTGGCGTG
β -actin	ACAGCAACAGGCTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

3. 统计学处理:应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1.5 组大鼠肺动脉 HE 染色结果比较:C 组大鼠肺动脉管壁较薄、光滑,平滑肌细胞排列规则,可见少量炎症细胞;烟雾暴露组大鼠肺动脉管壁可见不同程度增生,管壁周围较多炎症细胞浸润,随着暴露时间逐渐延长,管壁增生逐渐明显;与烟雾暴露各组比较, P38MAPK 抑制剂干预各组大鼠肺动脉管壁增生减弱,

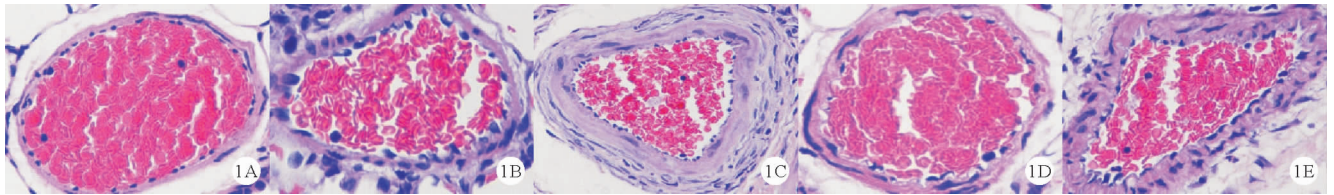


图 1 5 组大鼠肺动脉 HE 染色结果比较(A:C 组;B:S4 组;C:S12 组;D:SB4 组;E:SB12 组;HE 染色, ×400)

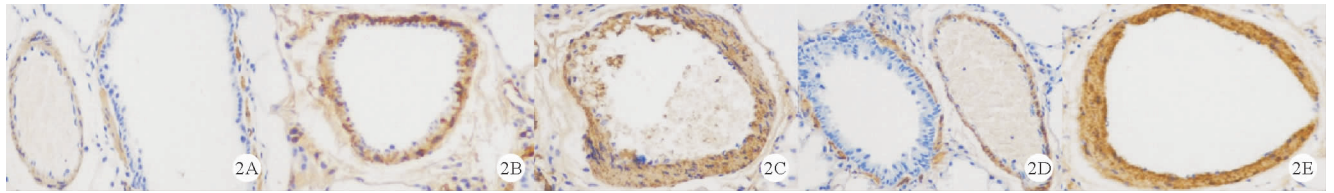


图 2 5 组大鼠肺动脉 α-SMA 的表达水平比较(A:C 组;B:S4 组;C:S12 组;D:SB4 组;E:SB12 组;免疫组化染色, ×200)

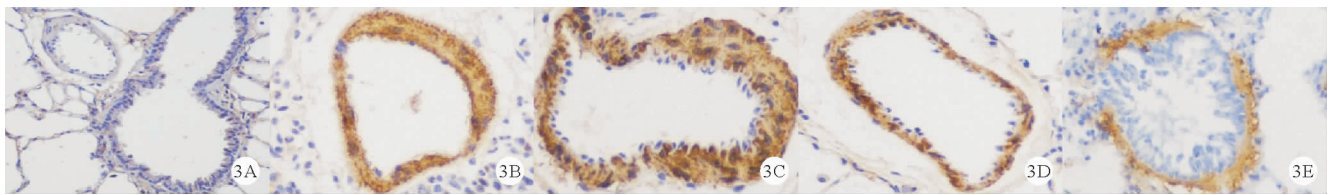


图 3 5 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白的表达水平比较(A:C 组;B:S4 组;C:S12 组;D:SB4 组;E:SB12 组;免疫组化染色, ×200)

表 2 5 组大鼠肺血管重塑指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	WA (%)	WT (%)
C 组	10	31.56 ± 2.06	20.05 ± 0.75
S4 组	10	42.37 ± 2.24 ^a	38.22 ± 0.95 ^a
S12 组	10	63.09 ± 2.99 ^{ab}	59.87 ± 0.86 ^{ab}
SB4 组	10	25.80 ± 1.67 ^b	26.30 ± 2.32 ^b
SB12 组	10	47.51 ± 2.34 ^c	42.38 ± 1.14 ^c

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 S4 组比较,^b $P < 0.05$;与 S12 组比较,^c $P < 0.05$

炎症细胞浸润明显减少。见图 1。S4 组、S12 组大鼠肺动脉 WA 和 WT 均高于 C 组,S12 组大鼠肺动脉 WA 和 WT 均高于 S4 组,SB4 组大鼠肺动脉 WA 和 WT 均低于 S4 组,SB12 组大鼠肺动脉 WA 和 WT 均低于 S12 组($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 组大鼠肺动脉 α-SMA 的表达水平比较:C 组、S4 组、S12 组、SB4 组、SB12 组大鼠肺动脉 α-SMA 的表达水平分别为 0.10 ± 0.01 、 0.16 ± 0.01 、 0.29 ± 0.02 、 0.09 ± 0.01 及 0.17 ± 0.02 ,其中 S4 组和 S12 组高于 C 组,S12 组高于 S4 组,SB4 组低于 S4 组,SB12 组低于 S12 组($P < 0.05$)。见图 2。

3.5 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达水平比较:胞质呈棕黄色染色为 P38MAPK 蛋白阳性表达。S4 组、S12 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达水平均高于 C 组,S12 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达水平均高于 S4 组,SB4 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达水

平均低于 S4 组,SB12 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达水平均低于 S12 组($P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

表 3 5 组大鼠肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P38MAPK 蛋白	P38MAPK mRNA
C 组	10	0.12 ± 0.02	0.56 ± 0.08
S4 组	10	0.25 ± 0.02 ^a	1.13 ± 0.29 ^a
S12 组	10	0.44 ± 0.03 ^{ab}	2.31 ± 0.16 ^{ab}
SB4 组	10	0.11 ± 0.05 ^b	0.10 ± 0.02 ^b
SB12 组	10	0.36 ± 0.05 ^c	1.40 ± 0.12 ^c

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 S4 组比较,^b $P < 0.05$;与 S12 组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

研究发现,香烟烟雾可直接作用于肺血管系统,进而引起一系列病理生理改变。香烟烟雾提取物可引起 COPD 患者早期肺血管改变,甚至在无气流受限的吸烟者中即已出现肺血管改变,与非吸烟者比较,吸烟者的肺血管厚度明显增加^[4]。本研究通过建立烟雾暴露大鼠模型,发现其存在不同程度的肺泡结构破坏,肺血管的管壁增厚,管腔变窄,肺动脉 WA 和 WT 高于 C 组,随着烟雾暴露时间的延长,WA 和 WT 均逐渐增加,肺动脉壁逐渐增厚,周围炎症细胞浸润逐渐明显,S12 组大鼠的肺动脉管壁增厚、管腔狭窄最明显。

α -SMA 主要表达于肺平滑肌细胞和成纤维细胞中,可间接反映肺血管重塑及肺小动脉肌化^[5]。本研究结果显示,烟雾暴露各组大鼠肺动脉 α -SMA 的表达水平均高于 C 组,且与烟雾暴露时间呈正比,表明香烟烟雾可直接引起肺血管重塑,肺血管重塑的程度随着暴露时间延长逐渐增加。

烟雾暴露可通过激活多种炎症因子参与肺血管重塑过程^[6]。P38MAPK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)介导细胞反应通路的重要分支,P38MAPK 活化后作用于下游的激酶、细胞因子等,产生多种效应,在体内作用广泛^[7]。烟雾暴露可激活中性粒细胞、肺泡巨噬细胞等炎症细胞,促进多种细胞因子的表达,如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-2、基质金属蛋白酶(MMP)-12 等,活化 P38MAPK,上调 P38MAPK 的表达^[8]。本研究结果显示,P38MAPK 蛋白在 C 组大鼠肺动脉中存在少量表达,而烟雾暴露刺激后 P38MAPK 蛋白的表达明显增加,且随着时间的延长,P38MAPK 蛋白的表达水平逐渐增加。此外,与 C 组比较,烟雾暴露各组大鼠 P38MAPK mRNA 的表达水平上调,且 P38MAPK mRNA 的表达与暴露时间呈正比,推测 P38MAPK 可能参与了烟雾暴露引起的肺血管重塑过程。既往研究结果显示,肺血管重塑可能与肺动脉平滑肌细胞的增殖分化有关,MAPK 信号通路可能参与肺平滑肌细胞的增殖和凋亡的调控,进而引起肺血管重塑^[9]。程振玲^[10]在低氧引起肺动脉高压模型中也发现了 P38MAPK 的表达增加。有研究结果发现,相对于非肺动脉高压,肺动脉高压患者中活化 P38MAPK 的表达水平明显升高,P38MAPK 信号通路激活可引起肺血管平滑肌细胞异常增殖,最终导致肺动脉高压^[11]。

SB203580 作为 P38MAPK 抑制剂的一种,可抑制 P38MAPK 信号通路介导的细胞反应。有研究结果发现,P38MAPK 抑制剂可逆转低氧引起的肺血管重塑,通过抑制 P38MAPK 信号通路,减轻炎症因子释放,进而逆转肺动脉高压^[12-13],抑制肺动脉收缩^[14]。本研究结果显示,与烟雾暴露组比较,加入 P38MAPK 抑制剂后,大鼠肺动脉管壁变薄,管壁增生减弱,炎症细胞浸润减轻,肺血管重塑指标 WA 和 WT 及 α -SMA 的表达水平均降低,提示肺小动脉肌化程度下降。同时,肺动脉 P38MAPK 蛋白和 mRNA 的表达明显受到抑制,表

明通过抑制 P38MAPK 下调 P38MAPK 的表达,可减缓肺血管重塑的程度,提示 P38MAPK 可能是引起肺血管异常增生的重要因子之一。但本研究未进一步探讨该通路下游因子的表达,尚存在一定的不足。

综上所述,烟雾暴露可能通过上调 P38MAPK 的表达引起肺血管平滑肌增生,进而引起肺血管重塑,P38MAPK 抑制剂可降低 P38MAPK 的表达,减轻肺血管重塑,提示 P38MAPK 可能参与了吸烟引起的肺血管重塑。但对于 P38MAPK 信号通路及其 P38MAPK 抑制剂的作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 廖艺璇,陈亚红,米文君.慢性阻塞性肺疾病肺血管重塑的研究进展[J].生理科学进展,2016,47(4):295-299.
- [2] Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig[J]. J Appl Physiol,2006,100(2):672-678.
- [3] 王萍,曾玉兰,熊玮,等. TLR4/NF- κ B 在烟雾暴露大鼠肺血管重塑中的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(11):2083-2087.
- [4] Barber JA. Mechanisms of development of chronic obstructive pulmonary disease-associated pulmonary hypertension [J]. Pulm Circ, 2013, 3(1):160-164.
- [5] Good RB, Gibbane AJ, Trinder SL, et al. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension[J]. Am J Pathol,2015,185(7):1850-1858.
- [6] 涂洪波,白莉.吸烟对肺血管重构的作用机制[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2015,8(1):89-91.
- [7] 胡丽,黄翠萍.姜黄素对糖尿病大鼠肺损伤的保护作用[J].临床内科杂志,2018,35(8):560-562.
- [8] Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, et al. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice[J]. BMC Pulm Med,2014,1(14):79-93.
- [9] 黄林静,张聪聪,赵美平,等. MAPK 信号通路对大鼠低氧性 PSMCs 增殖、凋亡的调控[J]. 中国应用生理学杂志,2017,33(3):226-230.
- [10] 程振玲. ERK1/2、p38MAPK 在慢性低氧肺动脉高压大鼠肺血管重塑中的作用[D]. 太原:山西医科大学,2013.
- [11] Wilson JL, Yu J, Taylor L, et al. Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK[J]. PLoS One, 2015,10(4):e1-e16.
- [12] Church AC, Martin DH, Wadsworth R, et al. The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK- α : a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2015,309(4):L333-L347.
- [13] Xu Y, Gu Q, Qu C. Capsaicin pretreatment reversed pulmonary arterial hypertension by alleviating inflammation via p38MAPK pathway[J]. Exp Lung Res,2017,43(1):8-18.
- [14] Zheng M, Zhao M, Tang L, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates hypoxia and hypercapnia-induced vasoconstriction in isolated rat pulmonary arterial rings by reducing the expression of p38 [J]. J Thorac Dis, 2016,8(7):1513-1523.

(收稿日期:2019-05-31)

(本文编辑:周三凤)