

rhEPO 对新型 BPD 模型肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 表达的影响及意义

岳嗣凤 张 华

摘要 目的 探讨磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路在重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 保护新型支气管肺发育不良 (BPD) 中的作用。方法 40 只定期受孕的 SD 大鼠,于孕第 15 天孕囊内注射脂多糖 (LPS) 或磷酸盐缓冲液 (PBS),新生大鼠分为 4 组:对照组、高氧组、rhEPO 组、rhEPO + LY294002 组。采用 Western blot 法和 RT-PCR 法检测肺组织中 BCL-2 和 Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达。结果 高氧组、rhEPO + LY294002 组新生大鼠肺组织 BCL-2 蛋白及 mRNA 表达减少,Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达明显增加;rhEPO 组 BCL-2 蛋白及 mRNA 表达增加,Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达减少;于高氧暴露第 1、7、14 天各组间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 宫内炎性暴露联合生后高氧可导致肺细胞凋亡增加,rhEPO 可能通过减少肺细胞凋亡对新型 BPD 起一定的保护作用,其机制可能与 PI3K/AKT 信号转导通路有关。

关键词 支气管肺发育不良;重组人促红细胞生成素;细胞凋亡;磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0933-04

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿重要的并发症,致死率和致残率极高。近年来,随着肺泡表面活性物质和机械通气的应用,极低出生体重儿和极早早产儿 (胎龄 < 28 周) 成活率不断上升,BPD 的发病率也呈逐年上升趋势,目前仍无确切有效的防治方法。研究^[1]显示,重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rhEPO) 能治疗并降低早产儿 BPD 的发病风险,于生后 4 周内使用疗效明显,但其机制尚未明确。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号转导通路参与调节细胞迁移、增殖、凋亡、膜泡转运的过程。研究^[2-3]证实,PI3K/AKT 通路可通过 B

淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, BCL-2)、半胱天冬酶 (Caspase-9) 和核转录因子 (nuclear factor, NF- κ B) 等途径发挥抑制细胞凋亡的作用。该研究应用 rhEPO 及 LY294002 干预新型 BPD 大鼠模型,观察肺组织 Caspase-9 和 BCL-2 的表达,探讨外源性 rhEPO 对新型 BPD 大鼠模型的保护机制,为 rhEPO 的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 清洁级 SD 大鼠,雌鼠 40 只,体重 230 ~ 250 g;雄鼠 20 只,体重 280 ~ 300 g,均由广西医科大学-广西实验动物中心提供。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自美国 Sigma 公司;LY294002 购自美国 Selleck 公司;rhEPO 购自协和发酵麒麟 (中国) 制药有限公司;WIP 裂解液购自北京博奥森生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;BCL-2、Caspase-9 及 β -actin 一抗购自武汉博士德生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒均购自北京康为世纪公司; β -actin、BCL-2 引物由 Invitrogen (上海) 公司合成;Caspase-9 引物由北京奥科鼎盛生物公司合成。引物序列: BCL-2 (188 bp) 上游引物: 5'-GCCTTCTTT-GAGTTCGGT-3',下游引物: 5'-TCAAACAGAGTTCG-CAT-3'; Caspase-9 (204 bp) 上游引物: 5'-TGGCATA-CACCCTGGACTC-3',下游引物: 5'-TCTCCAT-CAAAGCCGTGAC-3'; β -actin (299 bp) 上游引物: 5'-CCTTCTTGCAGCTCCTCCGTC-3',下游引物: 5'-TCTCCATATCGTCCCAGTTGCTG-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备及分组 40 只怀孕第 15 天 (70% 胎龄) 的 SD 大鼠随机分成两组: LPS 组 (30 只) 和 PBS 组 (10 只)。参阅前期本课题组的实验方法^[4]。孕鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (5 ml/kg) 麻醉,切开腹腔,将 LPS (30 ng/ml) 按 5 μ l 每孕囊注射到孕囊内,PBS 组注入等量的 PBS。所产新生大鼠生后 12 h 内分为 4 组:对照组、高氧组、rhEPO 组、rhEPO + LY294002 组,每组 24 只。高氧组新生大鼠

2015-03-10 接收

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题 (编号: 重 2011011)

作者单位: 桂林医学院附属医院新生儿科 桂林 541001

作者简介: 岳嗣凤,女,硕士研究生;

张 华,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: zh4205@163.com

连同母鼠一起饲养于氧箱内,持续给氧,维持氧浓度60%,氧箱内放置无水氯化钙吸收水分,钠石灰吸收过多的CO₂; rhEPO 治疗组在高氧干预第1、3、5、7、9、11、13天背部皮下注射 rhEPO (1 200 IU/kg), LY294002 处理组于每次注射 rhEPO 前30 min 背部皮下注射 LY294002 (0.3 mg/kg),共7次。对照组新生大鼠连同母鼠置常压空气中饲养。

1.2.2 肺组织标本采集 于实验第1、7、14天每组随机选取8只,10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔麻醉后,断头放血处死动物,迅速打开胸腔,取双肺,液氮速冻后存于-80℃冰箱保存备用。

1.2.3 Western blot 法检测肺组织 BCL-2、Caspase-9 蛋白表达 在液氮冷冻下研磨肺组织,将组织粉末转移到EP管中,加入1 ml WIP 裂解液,冰上放置15 min,4℃、12 000 r/min 离心15 min,取上清液并适量分装,测定总蛋白浓度,调整蛋白浓度,按各孔加入30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,半干法转膜,含5%脱脂奶粉的TBST 室温封闭1 h,然后加入 BCL-2、Caspase-9 或 β-actin 一抗(1:300 稀释),4℃孵育过夜, TBST 洗膜3次后加入辣根酶标记的二抗(1:6 000 稀释),室温孵育50 min,洗膜后进行 ECL 显影, X 光片曝光,拍照测定条带灰度值,计算 BCL-2 和 Caspase-9 与 β-actin 灰度值的比值,重复3次,取平均值。

1.2.4 肺组织 BCL-2、Caspase-9 mRNA 表达水平检测 采用 RT-PCR 法,将肺组织研磨成粉末,根据超纯总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,取2 μl RNA 溶液置于1.5%琼脂糖凝胶上电泳,检测其完整性,紫外分光光度计测 RNA 浓度和纯度,计算上样体积,取总 RNA 3 μg 逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,以 β-actin 为内参。取5 μl 扩增产物于含有 EB 的1.8%琼脂糖凝胶上电泳,结果通过自动凝胶图像分析仪显示并拍照,分别测定条带光密度值,计算 BCL-2、Caspase-9 与 β-actin 光

密度值的比值,重复3次,取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 蛋白的表达 实验第1、7、14天:与对照组比较,高氧组 BCL-2 蛋白表达显著减弱, Caspase-9 蛋白表达显著增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与高氧组比较, rhEPO 组 BCL-2 蛋白表达增加, Caspase-9 蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 rhEPO 组比较, rhEPO + LY294002 组 BCL-2 蛋白表达明显下降, Caspase-9 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);高氧组和 rhEPO + LY294002 组 BCL-2 蛋白表达均明显降低, Caspase-9 蛋白表达均明显增加,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1、图1。

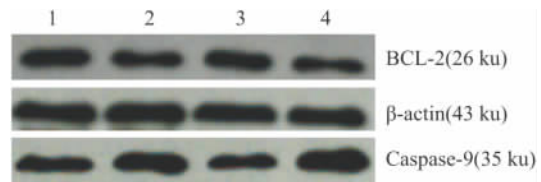


图1 不同实验组新生大鼠肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 蛋白的表达
1: 对照组; 2: 高氧组; 3: rhEPO 组; 4: rhEPO + LY294002 组

2.2 肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 mRNA 的表达 实验第1、7、14天:与对照组比较,高氧组 BCL-2 mRNA 表达明显减少, Caspase-9 mRNA 表达明显增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与高氧组比较, rhEPO 组 BCL-2 mRNA 表达增加, Caspase-9 mRNA 表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 rhEPO 组比较, rhEPO + LY294002 组 BCL-2 mRNA 表达明显降低, Caspase-9 mRNA 表达显著增加,差

表1 不同实验组各时间点大鼠肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 蛋白的表达 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	高氧组	rhEPO 组	rhEPO + LY294002 组	F 值	P 值
BCL-2						
第1天	0.56 ± 0.14	0.35 ± 0.10*	0.46 ± 0.09#	0.35 ± 0.07 [△]	7.452	0.002
第7天	0.59 ± 0.15	0.37 ± 0.11*	0.56 ± 0.13#	0.37 ± 0.10 [△]	7.145	0.001
第14天	0.75 ± 0.22	0.41 ± 0.16*	0.64 ± 0.20#	0.41 ± 0.15 [△]	6.610	0.002
Caspase-9						
第1天	0.33 ± 0.07	0.52 ± 0.11*	0.40 ± 0.11#	0.50 ± 0.09 [△]	6.591	0.002
第7天	0.37 ± 0.08	0.63 ± 0.11*	0.39 ± 0.09#	0.62 ± 0.12 [△]	15.699	0.000
第14天	0.44 ± 0.08	0.81 ± 0.11*	0.49 ± 0.09#	0.79 ± 0.14 [△]	26.433	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高氧组比较: # $P < 0.05$; 与 rhEPO 组比较: [△] $P < 0.05$

异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高氧组和 rhEPO + LY294002 组, BCL-2 mRNA 表达均明显降低, Caspase-9 mRNA 表达均显著增加, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 图 2、3。

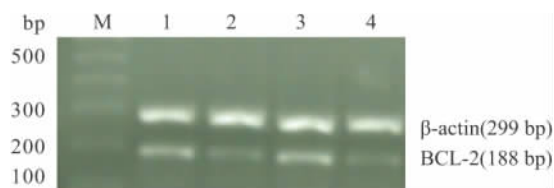


图 2 BCL-2 在不同实验组肺组织中 mRNA 表达水平

M: Marker; 1: 对照组; 2: 高氧组; 3: rhEPO 组; 4: rhEPO + LY294002 组

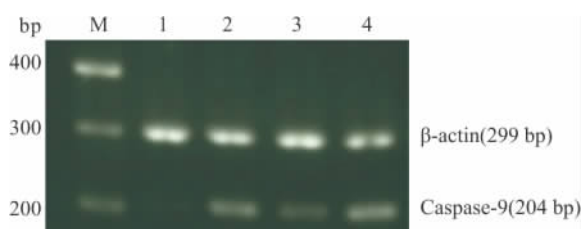


图 3 Caspase-9 在不同实验组肺组织中 mRNA 表达水平

M: Marker; 1: 对照组; 2: 高氧组; 3: rhEPO 组; 4: rhEPO + LY294002 组

3 讨论

目前认为早产、宫内感染性肺炎、长时间吸氧及机械通气等是 BPD 的主要危险因素^[5]。研究^[6]显示 80% 早于 30 周分娩的产妇存在不同程度的宫内感染, 胎肺长期暴露于炎性环境中。早产儿, 尤其是小早产儿肺功能不完善, 需要长时间吸氧和机械通气, 常并发气压伤及反复肺部感染, 加重肺血管及肺间质损伤。新生 SD 大鼠与新生儿肺发育过程具有很强的相似性, 新生大鼠的肺发育处于囊泡期, 肺泡期发生于生后 4 ~ 13 d, 新生大鼠相当于胎龄 < 30 周早产儿的肺发育阶段^[7]。本实验模拟宫内

感染及生后高氧暴露建立新型 BPD 模型, 并在此基础上做进一步实验研究, 具有科学性和可行性。

宫内炎性暴露及生后高氧损伤是导致新型 BPD 发生的重要因素。研究^[8]表明, 孕期注射 LPS 可导致胚胎期及出生早期肺组织细胞过度凋亡, 肺组织上皮细胞和微血管内皮细胞受损, 肺微血管发育受阻, 其机制可能与 Bax / Bcl-2 途径有关。动物实验^[9]显示, 高氧干预可导致新生小鼠肺组织细胞凋亡数目增加, 随着高氧时间延长肺凋亡数增加越明显, 凋亡数与肺损伤程度相关^[9]。本实验结果显示, LPS (30 ng/ml) 孕囊注射联合生后高氧可增加肺 Caspase-9 表达、减少 BCL-2 表达, 推测宫内感染联合生后高氧暴露可导致新生大鼠肺细胞凋亡增加。

rhEPO 是一种多功能的糖蛋白类激素, 具有抗氧化、抗炎、抑制凋亡及促进血管生成等非造血作用^[10], 对高氧和感染所致的肺损伤具有保护作用。研究^[11]显示, rhEPO 可减少高氧肺损伤模型的细胞凋亡指数, 从而减轻高氧性肺损伤。本实验结果显示, rhEPO 干预能有效减少 SD 新生大鼠新型 BPD 模型肺 Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达, 同时增加 BCL-2 蛋白及 mRNA 表达, 从而推测 rhEPO 可能通过抑制细胞凋亡, 对新型 BPD 发挥保护作用。

PI3K 是联系胞外信号与细胞内应答效应的桥梁, 可通过多种途径作用于其下游信号因子, 对细胞凋亡起调节作用^[12-13], 其中 Caspase-9 是 PI3K / AKT 传导通路下游细胞凋亡的启动者和效应者, BCL-2 则具有抗凋亡的作用。LY294002 是 PI3K 特异性抑制剂, 通过抑制 PI3K 活性, 使 AKT 活化受阻, 抑制 PI3K / AKT 通路的功能。本课题前期研究^[3]显示: 在新型 BPD 模型中, rhEPO 明显增加肺组织 PI3K 蛋白和 mRNA 的表达, 有效减少肺细胞的凋亡, 推测 rhEPO 的抗凋亡作用可能与上调 PI3K / AKT 通路有关。本实验通过在新型 BPD 模型

表 2 不同实验组各时间点大鼠肺组织 BCL-2 和 Caspase-9 mRNA 的表达 ($n = 8 \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	高氧组	rhEPO 组	rhEPO + LY294002 组	F 值	P 值
BCL-2						
第 1 天	0.32 ± 0.04	0.09 ± 0.04*	0.18 ± 0.03#	0.12 ± 0.02 [△]	63.961	0.000
第 7 天	0.45 ± 0.09	0.17 ± 0.12*	0.36 ± 0.10#	0.20 ± 0.08 [△]	14.876	0.000
第 14 天	0.51 ± 0.09	0.10 ± 0.08*	0.44 ± 0.12#	0.14 ± 0.03 [△]	49.181	0.000
Caspase-9						
第 1 天	0.21 ± 0.14	0.59 ± 0.09*	0.41 ± 0.14#	0.62 ± 0.07 [△]	21.582	0.000
第 7 天	0.27 ± 0.12	0.74 ± 0.09*	0.37 ± 0.13#	0.76 ± 0.05 [△]	50.422	0.000
第 14 天	0.25 ± 0.15	0.91 ± 0.07*	0.30 ± 0.10#	0.86 ± 0.11 [△]	81.322	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高氧组比较: # $P < 0.05$; 与 rhEPO 组比较: [△] $P < 0.05$

新生大鼠背部皮下注射 LY294002 (0.3 mg/kg) 然后观察 Caspase-9 和 BCL-2 表达变化,结果显示 Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达显著增强,而 BCL-2 蛋白及 mRNA 表达减弱,推测 rhEPO 对新型 BPD 的保护机制可能与 PI3K/AKT 信号转导通路有关。

参考文献

- [1] Rayjada N, Barton L, Chan L S, et al. Decrease in incidence of bronchopulmonary dysplasia with erythropoietin administration in preterm infants: a retrospective study [J]. *Neonatology*, 2012, 102(4): 287-92.
- [2] van Opstal A, Bijvelt J, van Donselaar E, et al. Inhibition of protein kinase B activity induces cell cycle arrest and apoptosis during early G1 phase in CHO cells [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(4): 357-65.
- [3] Zhang R, Chae S, Lee J H, et al. The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(6): 1987-97.
- [4] 刘漫君, 张华, 赵日红. 重组人促红细胞生成素对宫内炎性暴露和高氧肺损伤新生大鼠凋亡及 PI3K 表达的影响 [J]. *临床儿科杂志*, 2013, 31(2): 178-81.
- [5] 李燕, 潘新年, 杨广林, 等. 早产儿支气管肺发育不良危险因素分析 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(20): 3093-5.
- [6] Tibboel J, Reiss I, de Jongste J C, et al. Sphingolipids in lung

- growth and repair [J]. *Chest*, 2014, 145(1): 120-8.
- [7] 王晓蕾, 岳冬梅, 陈宁, 等. 促红细胞生成素对高体积分数氧肺损伤新生大鼠单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2010, 25(2): 92-5.
- [8] 王伟, 罗向阳, 蔡丽霞, 等. 宫内炎性暴露对胎鼠及早产大鼠肺细胞凋亡及肺 Bax/Bcl-2 基因表达的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(26): 4304-7.
- [9] Xu D, Perez R E, Rezaiekhaliq M H, et al. Knockdown of ERp57 increases BiP/GRP78 induction and protects against hyperoxia and tunicamycin-induced apoptosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1): L44-51.
- [10] Zhang F, Xing J, Liou A K, et al. Enhanced delivery of erythropoietin across the blood brain barrier for neuroprotection against ischemic neuronal injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2010, 1(2): 113-21.
- [11] 丁璐, 吴本清, 黄进洁, 等. 促红细胞生成素对新生大鼠高氧肺损伤细胞凋亡的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(7): 576-9.
- [12] Lu X, Masic A, Li Y, et al. The PI3K/Akt pathway inhibits influenza A virus-induced Bax-mediated apoptosis by negatively regulating the JNK pathway via ASK1 [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 6): 1439-49.
- [13] Hu L, Sun Y, Hu J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced endothelium by activating the PI3K/Akt signaling pathway and modulating expression of Bcl-2 and Bax [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 628(1-3): 155-63.

The effect and significance of rhEPO to the expression of BCL-2 and Caspase-9 in the new type BPD model's lung tissue

Yue Sifeng, Zhang Hua

(Dept of Newborn, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To explore the role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway in recombinant human erythropoietin (rhEPO) protecting new type BPD. **Methods** Injected LPS or PBS to 40 Sprague-Dawley (SD) rats, gestational sacs on 15th day of gestation, the newborn rats were divided into four groups: control group, hyperoxia group, rhEPO group, rhEPO + LY294002 group. To detect the expression of lung tissue BCL-2 and Caspase-9 protein and mRNA by Western blot and RT-PCR. **Results** In the hyperoxia group and rhEPO + LY294002 group, BCL-2 expression was decreased, while Caspase-9 expression was increased apparently; in the rhEPO group, BCL-2 expression was increased, while Caspase-9 expression was decreased. The differences between each group were statistically significant on 1st, 7th and 14th day of hyperoxia exposure ($P < 0.05$). **Conclusion** Intrauterine inflammatory exposure combined with hyperoxia after birth can cause lung cell apoptosis increases. While rhEPO has certain control effects on BPD, possibly by reducing the pulmonary apoptosis. The mechanism may be associated with PI3K/AKT signaling pathway.

Key words bronchopulmonary dysplasia; recombinant human erythropoietin; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B