

脑缺血肺损伤大鼠肺组织 trkB 的表达变化*

赵珊¹, 荣荣², 但齐琴³, 张云辉^{1△}

1. 昆明理工大学附属昆华医院·云南省第一人民医院 呼吸内科(昆明 650032);

2. 安徽省立医院 老年医学科(合肥 230001); 3. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041)

【摘要】 目的 观察脑缺血肺损伤大鼠肺组织酪氨酸蛋白激酶 B(trkB)的表达变化,并探讨其与肺损伤的关系。**方法** 成年 SD 大鼠分为假手术组和脑缺血肺损伤组,每组 13 只动物。术后 3 d 处死大鼠,每组中 5 只取肺组织进行免疫组化染色,8 只取肺组织进行 RT-PCR 和 Western blot,检测 trkB 蛋白在肺组织的分布、trkB mRNA 和蛋白的表达变化。**结果** trkB 分布于气管上皮和平滑肌。与假手术组相比, trkB mRNA 和蛋白在损伤肺组织表达增加($P<0.05$)。**结论** 脑缺血肺损伤大鼠肺组织 trkB 表达水平明显上调,提示其与脑缺血肺损伤有关。

【关键词】 大鼠 脑缺血肺损伤 酪氨酸蛋白激酶 B

Expression of trkB Gene in the Pulmonary Tissue of Rats with Lung Injury Induced by Cerebral Ischemia ZHAO Shan¹, RONG Rong², DAN Qi-qin³, ZHANG Yun-hui^{1△}. 1. Department of Respiration, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, China; 2. Cadre's Ward, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 3. Translational Neuroscience Center, West Chinal Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of tyrosine kinase B (trkB) in lung tissue of rats with lung injury induced by brain ischemia. **Methods** Twenty six adult SD rats were divided into sham group and brain ischemia lung injury (BILI) group. All rats were sacrificed at 3 days after the operation of modeling, lung tissues were then harvested to measure the protein and mRNA level of trkB by the methods of western blot and RT-PCR, the location of trkB positive cells was observed by immunochemistry study. **Results** trkB mRNA level in the lung tissue of rats with brain ischemia presented a significant increase, in corresponding to the upregulation of BDNF protein levels, when compared with sham one ($P<0.05$). trkB was localized in endothelia cells and smooth muscle. **Conclusion** The upregulated expression of trkB expression may be associated with lung injury after brain ischemia.

【Key words】 Rat Brain ischemia lung injury Tyrosine kinase B

脑缺血可引起一系列细胞、分子及其调节过程变化。其中,炎症反应担负着重要角色^[1]。脑缺血发生后,炎症细胞活化并失控,而后通过自我持续放大和级联反应产生大量炎症介质,弥散到血浆中,在远隔器官如心、肺等引起全身性炎症反应。其中,急性肺损伤的发生率高达 83%~100%^[2]。缺血后因肺组织氧自由基的产生明显增多,清除能力下降,故易造成肺损伤^[3]。肺损伤又可致呼吸功能不全,从而使患者病死率明显增加^[4]。因此,开展脑缺血肺损伤机制研究是重要的科学问题。

酪氨酸蛋白激酶(tyrosine kinase, trk)是机体各种信号转导通路上游的一类重要的激酶,能调节

并激活多种信号转导通路。trkB 是 trk 家族中的一个重要分子,通过该分子可激活下游如 p38、c-Jun 氨基末端激酶(JNKs)等多种和炎症密切相关的信号转导,从而在致病机制中发挥重要作用^[5]。研究显示,脂多糖作用后肺微血管内皮细胞胞浆 trk 活性升高,而胞膜 trk 活性降低,提示 trk 与脂多糖所致的急性肺损伤有关^[6]。但 trkB 是否在脑缺血肺损伤及相关信号通路中发挥重要调节作用尚不清楚。本研究建立脑缺血肺损伤模型,探讨肺组织 trkB 表达变化,为了解 trkB 与脑缺血肺损伤关系提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

成年 SD 大鼠 26 只,购自昆明医科大学实验动

* 云南省自然科学基金(No. 2010ZC206, No. 2012fb086)资助

△ 通讯作者, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

物中心,体质量 200~220 g。随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组,每组 13 只动物;其中每组 8 只用于肺组织 RT-PCR 和 Western blot 检测,另 5 只用于肺组织免疫组化染色。

1.2 脑缺血肺损伤模型制备

采用本实验室成功建立的造模方法^[7]:3.6%水合氯醛(1 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定于手术台,无菌条件下从颈部做正中切口,暴露左侧颈总动脉及其颈内外动脉的分支,结扎颈总动脉,用眼科剪将颈外动脉剪开一小口,将线栓插入,而后送入颈内动脉。继续将线栓送达大脑中动脉以阻断血流,造成大脑中动脉供血范围的局灶性脑缺血状态。随后,缝合肌层和皮肤。假手术组同脑缺血肺损伤组切开颈部,暴露颈内动脉,但不插入线栓。

1.3 肺组织免疫组化染色^[8]

术后 3 d,用 40 g/L 多聚甲醛心内灌注固定大鼠,取肺组织用 3%蔗糖沉底,冰冻切片(20 μ m)。按以下程序进行免疫组化染色:切片于 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;5%羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭背景 30 min;0.3% Triton PBS 羊血清(5%)37 $^{\circ}$ C 通透 30 min。加入 trkB 兔抗鼠多克隆抗体(Chemicon,1:1000)室温 2 h,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,加入 SP 二步法试剂,其中试剂 I 为 Triton 通透液,试剂 II 为羊抗兔 IgG。显色液为 DBA,最后反应物为棕色沉淀。阴性对照以 PBS 代替一抗,其余步骤同上。

1.4 肺组织 RT-PCR

参考文献^[9]方法,用半定量 RT-PCR 检测术后 3 d 肺组织中 *trkB* mRNA 的表达。引物序列为:*trkB*,上游 5'-GGTTCTACAACGGAGCCATAC-3',下游 5'-GTCTTCATAGAGGACTTCAGGGT-3',扩增片段长度 248 bp。 β -actin,上游 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3',扩增片段长度 227 bp。引物由 TaKaRa 公司合成。取术后 3 d 大鼠肺组织(大鼠颈动脉放血处死),用 TRIzol 试剂参照说明提取总 RNA,逆转录成 cDNA。以 2 μ L cDNA 作为模板,上、下游引物各 1 μ L,按下列条件扩增:94 $^{\circ}$ C 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。取 20 μ L PCR 产物用含 0.5 μ g/mL EB 的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,电压 110 V,时间 25 min。BIO-RAD 凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片(β -actin 为内对照)进行电泳条带光密度分析,以目的条带与 β -actin 条带的光密度比值作为目的基因的

相对表达量。

1.5 肺组织 Western blot^[10]

将术后 3 d 肺组织(大鼠颈动脉放血处死)用 RIPA 液裂解,离心取上清液,Bradford 法测定蛋白浓度。和上样缓冲液混合后上样,SDS-PAGE(3%积层胶,12%分离胶)电泳将蛋白质分离,电转移至 PVDF 膜。丽春红染液中染色观察蛋白转移情况并标出蛋白质分子量标。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温下封闭 PVDF 膜以去除非特异蛋白结合位点, TBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次后,分别用含 trkB 蛋白一抗和 β -actin(1:1000)的 1%BSA TBST 缓冲液孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次,加 HRP 偶联羊抗兔 IgG 第二抗体室温下孵育 30 min, TBST 洗膜后 5 min $\times$ 3 次,置入免疫印迹化学发光试剂(ECL Western blot kit)1 min,放射自显影后凝胶成像仪内扫描,图像分析软件(Quantity One)进行 trkB 和 β -actin 的光密度测定,以 trkB 和 β -actin 光密度比值作为 trkB 蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用两样本均数 *t* 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 trkB 在肺组织的分布

由图 1 可见, trkB 阳性细胞出现在假手术组气道上皮和平滑肌,胞浆染色。脑缺血肺损伤后气道上皮和平滑肌 trkB 染色明显加深。

图 1 trkB 在脑缺血肺损伤后 3 d 大鼠肺上皮的表达($\uparrow$)。SP $\times$ 200

Fig 1 trkB expression in lung of rats at day 3 after brain ischemia. SP $\times$ 200

A: Sham group; B: BILI group

2.2 肺组织 *trkB* mRNA 的表达变化

RT-PCR 结果显示,脑缺血肺损伤组肺组织

trkB mRNA 相对表达量(0.77 ± 0.11)高于假手术组(0.44 ± 0.08)($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 trkB 蛋白的表达变化

Western blot 结果显示,假手术组肺组织可检测到 trkB 蛋白表达,但其相对表达量较低(0.59 ± 0.08)。脑缺血肺损伤后,肺组织 trkB 蛋白表达明显增加(0.81 ± 0.09),与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

图 2 *trkB* mRNA 在脑缺血肺损伤后 3 d 大鼠肺组织的表达
Fig 2 Data on *trkB* mRNA level in lung at day 3 after BILI, indicated by RT-PCR

图 3 trkB 蛋白在脑缺血肺损伤 3 d 大鼠肺组织的表达
Fig 3 Data on on trkB in lung at day 3 after BILI, indicated by Western blot

3 讨论

本实验通过建立脑缺血肺损伤大鼠模型,用 Western blot 结合 RT-PCR 技术检测了脑缺血肺损

伤后肺组织 trkB 的表达变化。结果提示,脑缺血致肺损伤中涉及 trkB 表达调节,即 trkB 在脑缺血肺损伤中发挥作用。

3.1 trkB 与脑缺血肺损伤的关系

本实验中,Western blot 和 RT-PCR 技术证明脑缺血肺损伤肺组织 trkB 蛋白和 mRNA 表达明显增加。说明 trkB 可能在脑缺血肺损伤中发挥作用。trkB 是脑源性神经营养因子(BDNF)的功能受体,其为 BDNF 发挥作用提供桥接。BDNF 与其受体 trkB 结合引导一系列下游信号分子(如 Erk、Akt 等)活动^[11,12]。因此,trkB 是 BDNF 发挥功能的关键转导分子。本实验中,脑缺血肺损伤组 trkB 蛋白和 mRNA 表达明显增加,说明损伤肺组织 BDNF 表达被启动。增加的 BDNF 可能通过与 trkB 受体结合影响其它细胞的功能,如增加的 BDNF 可与肥大细胞上的 trkB 结合从而引起过敏反应^[13]。因此,BDNF 可能在脑缺血肺损伤炎症反应中发挥重要作用。文献显示,BDNF 可增加组氨酸激活的气道过敏反应^[14];同时,BDNF 还能增加 TNF- α 反应的钙拮抗,并影响平滑肌收缩^[15];有文献还报道过敏可能增加 BDNF 和神经生长因子(NGF)表达;而 IL- β 1 增加又促进 BDNF 上调^[16]。上述结果提示,BDNF 和炎症因子可以相互调节,而此作用过程中 trkB 是发挥作用的关键。

3.2 trkB 在气道上皮定位及其功能意义

trkB 是 BDNF 的功能受体,trkB 在气道上皮和平滑肌细胞分布,提示气道上皮细胞和平滑肌可能是 BDNF 作用的靶细胞,即在炎症反应过程中,气道上皮和平滑肌可能受 BDNF 调节,而 trkB 是介导 BDNF 作用的转导分子。文献显示,在肺发育中,trkB 表达于支气管上皮和肺血管,trkB 缺乏将影响肺发育^[17],给予高压氧治疗可以增加新生儿肺支气管平滑肌 trkB 表达^[18],提示 trkB 在支气管上皮和平滑肌中发挥作用。

综上,本实验发现,trkB 在脑缺血肺损伤后肺组织中的表达发生改变,从而提示 trkB 与脑缺血后的肺损伤有关。

参 考 文 献

- 1 曾 靖,黎 晓,黄志华. 脑缺血再灌注损伤与炎症反应关系的研究进展. 时珍国医国药,2011;2(3):698-700.
- 2 余 涓,林艳婷. Zileuton 对局灶性脑缺血/再灌注致急性肺损伤的保护作用. 中国药理学报,2009;25(11):1460-1464.
- 3 宋晓丽,李卫平,金 钊等. 茶多酚抗全脑缺血再灌注继发肺损伤的作用及机制研究. 中药学,2010;21(17):1563-1565.
- 4 钟 强,刘纯刚,于 丹等. 长托宁对急性全脑缺血再灌注大鼠肺损伤的保护作用. 内科急危重症杂志,2010;16(5):249-251,271.

(下转第 958 页)