

脑缺血大鼠肺组织中 MEK 的表达变化*

王盛兰¹, 但齐琴², 荣 荣³, 李劲涛⁴, 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. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041); 3. 安徽省立医院 老年医学科(合肥 230001);
4. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)

【摘要】 目的 探讨脑缺血大鼠肺组织中丝裂原细胞外激酶(MEK)基因、蛋白的表达变化,为了解 MEK 在脑缺血肺损伤中的作用提供实验依据。**方法** 成年 SD 大鼠,随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组。用线栓塞大鼠大脑中动脉建立脑缺血模型,假手术组仅分离大脑中动脉不进行栓塞。分别于手术后 3 d 处死。每组 5 只大鼠取肺组织进行 HE 染色、8 只大鼠肺组织分别采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 MEK 的表达变化。**结果** 脑缺血后肺组织炎性细胞浸润,MEK mRNA 在脑缺血肺损伤组表达明显高于假手术组($P<0.05$)。MEK 蛋白水平亦较假手术组升高,两组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 脑缺血大鼠肺损伤后肺组织 MEK 表达明显上调,提示 MEK 信号可能在脑缺血肺损伤中发挥作用。

【关键词】 大鼠 脑缺血肺损伤 丝裂原细胞外激酶

Expression Changes of MEK in Lung of Rats Subjected to Brain Ischemia WANG Sheng-lan¹, DAN Qi-qin², RONG Rong³, LI Jin-tao⁴, ZHANG Yun-hui^{1△}. 1. Department of Respiration, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, China; 2. Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chendu 610041, China; 3. Cadre's Ward, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 4. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China
△ Corresponding author, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

【Abstract】 Objective To explore the expression changes of mitogen extracellular kinase (MEK) in injured lung after brain ischemia in rats. **Methods** Adult SD rats were assigned randomly to sham operation group and brain ischemia lung injury (BILI) group. Rats in BILI group were subjected brain ischemia and allowed to survived 3 d. Pathological changes in lung were indicated by HE staining. The MEK expression was determined by RT-PCR and Western blot technique. **Results** After brain ischemia, the bulk of inflammatory cells invaded into lung were observed. Upregulated level of MEK mRNA and protein were found at 3 days after ischemia ($P<0.05$). **Conclusion** The upregulated expression of MEK implied that the MEK may play some roles in lung injury after brain ischemia.

【Key words】 Rat Brain ischemia lung injury MEK

脑缺血性损伤是临床神经科常见的脑部疾病。资料显示,中国每年发生脑中风患者达 200 万,发病率高达 120/10 万。在目前中风幸存的 700 万患者中,450 万患者存在不同程度丧失劳动力^[1],甚至生活不能自理,给国家、社会和家庭带来了沉重的经济负担。至 2012 年,脑卒中致死率已高达 22.45%,致残率高达 75%,成为超心脏病致死的首位原因^[2]。最近的研究显示,脑缺血常常伴有肺损伤^[3],开展脑缺血肺损伤机制研究意义重大。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2)及其上游激酶丝裂原细胞外激酶(MEK)是细胞分裂素(丝裂原)活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的主要成员。

号传递进入细胞核。从而在细胞增殖和分化中发挥重要作用^[4]。已知 ERK1/2 不仅在脑内有明显表达^[5],且缺血性损伤和氧化应激均可促使 ERK1/2 磷酸化^[6],进而加重损伤。而应用 MEK1/2 酶活性的抑制剂 U0126 能有效抑制其活性^[7],从而保护损伤细胞^[8]。尽管 MEK 在肺炎损伤中已经有报道^[9],但脑缺血引起肺损伤中是否涉及 MEK 表达仍不清楚。本实验拟探讨 MEK 在脑缺血肺组织中的表达变化,探讨其功能意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

MEK 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)、二抗 Streptavidin-HRP 复合物(美国 sigrna 公司)、Reagent Kit 的试剂 I 和 II (Chemicon, Anti-Rabbit/Mouse Poly-HRP IHC Detection Kit, USA)、二氨基联苯胺(北京中彬公司)。

* 云南省自然科学基金(No. 2010ZC206, No. 2011FZ272, No. 2012fb086)

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

它能对各种细胞外刺激发生反应,然后将细胞外信

1.2 方法

1.2.1 动物与分组 健康成年雌性 SD 大鼠 26 只,体质量 200~220 g,购于昆明医科大学实验动物中心。随机将大鼠分为假手术组和脑缺血肺损伤(BILI)组。每组 13 只动物,其中每组 8 只分别用 RT-PCR 检测肺组织 MEK mRNA 表达,用 Western blot 检测 MEK 蛋白表达,5 只动物用于病理学评价。

1.2.2 动物脑缺血模型的建立 用 3.6%的水合氯醛麻醉腹腔注射(1 mL/100 g)麻醉 SD 大鼠。仰卧位固定于手术台上,消毒后从颈部做正中切口,游离出左侧颈总动脉及其颈内外动脉的分支,BILI 组大鼠在近心端结扎劲总动脉,约距此结 5 mm 处的劲总动脉打活结,用眼科剪在预先准备好的两结之间开一个小口,将线栓用小弯镊夹住送入颈总动脉,当线栓头部进去后将近心端的线向左摆个小角度,以使线栓进入颈内动脉,之后再向右摆个小角度,以使线栓能被插入脑膜中动脉并将其堵塞。插线栓时当感到有轻微阻力感时表明线栓已插入大脑中动脉,阻断了其血流,造成大脑中动脉供血范围的局部性脑缺血状态,假手术组大鼠仅分离暴露出脑中动脉,不线栓,大鼠止血,缝合肌层和皮肤。

1.2.3 脑缺血肺组织病理学观察 术后 3 d,取每组大鼠 5 只经 3.6%水合氯醛腹腔注射麻醉,开胸,心内插管,40 g/L 多聚甲醛心内灌注固定后取肺组织,于-20 ℃进行恒冷箱切片,片厚 20 μm。常规 HE 染色,观察肺组织红细胞、白细胞浸润情况。

1.2.4 脑缺血大鼠肺组织 MEK mRNA 的表达 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测。MEK mRNA 引物设计采用 Primer premier 5.0 软件,由大连宝生物公司制备上、下游引物。MEK mRNA 上游引物:5'-TGACGCAGAAGCAGAAGGTG-3',下游引物:5'-AGGTCGGCTATCCATTCCAT-3',片段长度:758 bp,以 β-actin 为内对照(β-actin 上游引物:5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游引物:5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3',片段长度:227 bp)。以 Trozol 法分别提取假手术组和脑缺血组大鼠术后 3 d 肺组织(每组 8 只大鼠,颈动脉放血处死大鼠,取肺组织)总 RNA,并逆转录为 cDNA。按以下反应条件进行 PCR 扩增:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1 min,50.5 ℃(MEK)和 52.5 ℃(β-actin)退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,循环 30 次,72 ℃总延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物。凝胶成像系统(BIO-RAD)检测

MEK mRNA 的 PCR 产物,图像分析软件(Quantity One)进行 MEK mRNA 和 β-actin 的光密度测定,分别以 MEK mRNA 和 β-actin 平均光密度比值进行半定量分析。

1.2.5 Western blot 检测脑缺血肺组织中 MEK 蛋白的表达^[10] 术后 3 d 颈动脉放血处死大鼠,取肺组织用 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,用 TBST 洗涤 5 min×3 次后,分别用含 P-MEK 蛋白一抗(1:500),和 β-actin (1:1000)的 1% BSA TBST 缓冲液孵育,4 ℃过夜。TBST 漂洗 5 min×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×3 次,置入免疫印迹化学发光试剂 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 P-MEK 和 β-actin 的光密度测定,分别以 P-MEK 和 B-actin 平均光密度值进行半定量分析。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验进行。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及肺组织病理变化

所有大鼠均存活,成功制备脑缺血模型。脑缺血大鼠肺组织 HE 染色显示充血、水肿,炎性细胞(中性粒细胞)浸润。假手术组大鼠肺组织 HE 染色未见异常。

2.2 脑缺血大鼠肺组织 MEK mRNA 表达的变化

假手术组能检测到 MEK mRNA 表达。但脑缺血后,肺组织 MEK mRNA 表达明显升高,组间比较差异有统计学意义(*P*<0.05),见附表,图 1。

2.3 P-MEK 蛋白在脑缺血大鼠肺组织中的变化

附表 脑缺血大鼠肺组织 MEK mRNA 和蛋白表达变化
Table Changs of MEK mRNA and protein in lung of rats with brain ischemia lung injury

Group	<i>n</i>	MEK mRNA	MEK protein
Sham	8	0.39±0.05	0.42±0.07
BILI	8	0.57±0.06*	0.65±0.08*

* *P*<0.05, vs. sham group

Western blot(图 2)结果显示,P-MEK 蛋白在肺组织表达较少。而脑缺血肺组织 P-MEK 蛋白表

达水平较假手术组明显升高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见附表,图 2。

图 1 MEK mRNA 在脑缺血后 3 d 大鼠肺组织表达

Fig 1 MEK mRNA expression in lung of rats at day 3 after brain ischemia

图 2 P-MEK 蛋白在脑缺血后 3 d 大鼠肺组织中的表达变化

Fig 2 P-MEK expression in lung of rats at day 3 after brain ischemia

3 讨论

本研究发现,MEK 在肺组织表达,这提示 MEK 参与了正常肺组织功能的维持。MEK 是 MAPK 下游家簇主要成员。可进一步激活下游 ERK 表达。MEK 在脑源性神经营养因子(BDNF)分子信号中发挥重要作用。MEK 一般分布于细胞浆中。成年大鼠肺组织有 MEK 表达,提示 MEK 的生理作用与肺功能有关。BDNF 与受体 trkB 结合发挥作用需要 MEK。MEK 位于 trkB 下游,参与 BDNF 信号及功能调节,具有抑制神经元凋亡及神经保护作用^[11-13]。MEK 还与炎性病理性疼痛过程有关,文献显示,在对大鼠后肢进行机械刺激引起疼痛过程中,脊髓后角浅层 P-MEK 表达明显增加^[14]。

在本实验中,脑缺血 3 d 后,肺组织 MEK 蛋白明显多于假手术组,提示肺损伤促进了 MEK 磷酸化,其功能意义有利于 MEK 发挥信号转导作用。鉴于 MEK mRNA 亦增多,说明内源性 MEK 激活是脑缺血肺损伤的反应结果,即 MEK 在肺损伤反应中发挥作用。关于 MEK 的脑缺血肺损伤中的具体作用至今尚不十分清楚,在其他炎症状态下,

MEK 信号激活是炎症反应,特别是疼痛相关的重要环节^[14]。可以肯定,MEK 与炎症反应有关。文献显示,使用 MEK 抑制剂可以影响炎症因子 IL-1 β mRNA 表达^[15],说明 MEK 是启动炎症反应的核心信号。

综上,本实验证明了脑缺血肺损伤中存在肺组织 MEK 的表达变化,提示可能与脑缺血肺组织损伤机制有关。

参 考 文 献

- 1 周盛年,孙 弦,韩永涛等. 神经干细胞与脑缺血治疗的相关研究. 中国卒中杂志,2008;3(5):381-384.
- 2 刘青青,郭 虹,王少峡等. 脑缺血损伤机制的研究进展. 中华中医药学刊,2012;30(6):46-48.
- 3 但齐琴,戴 萍,王盛兰等. 脑缺血肺损伤大鼠肺组织中脑源性神经营养因子的表达变化. 四川大学学报(医学版),2012;43(6):897-900.
- 4 Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade. FASEB J, 1995;9(9):726-735.
- 5 Fiore RS, Bayer VE, Pelech SL, *et al.* p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites. Neuroscience,1993;55(2):463-472.
- 6 Ohtsuki T, Matsumoto M, Kitagawa K, *et al.* Delayed neuronal death in ischemic hippocampus involves stimulation of protein tyrosine phosphorylation. Am J Physiol,1996;271(4 Pt 1):C1085-C1097.
- 7 Zhang XM, Huang GW, Tian ZH, *et al.* Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells. Nutr Neurosci,2009;12(5):226-232.
- 8 Namura S, Iihara K, Takami S, *et al.* Bonventre, and Alessandro Alessandrini. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A,2001;98(20):11569-11574.
- 9 张 璐,姜 勇,张 琳等. MAPK 研究进展. 国外医学(生理、病理科学与临床分册),1999;19(2):84-87.
- 10 Xiyang YB, Liu S, Liu J, *et al.* Roles of platelet-derived growth factor-B expression in the ventral horn and motor cortex in the spinal cord-hemisected rhesus monkey. J Neurotrauma,2009;26(2):275-287.
- 11 刘丽敏,黄海霞,高建新. BDNF 和 NT-3 对胚胎大鼠脊髓神经元生长发育的影响. 首都医科大学学报,2002;(3):202-205.
- 12 Han B, Costa A, Back SA, *et al.* BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. Neurobiol Dis,2000;7(1):38-53.
- 13 Yajima Y, Narita M, Usui A, *et al.* Direct evidence for the involvement of brain-derive neurotrophic factor in the development of neuropathic pain-like state in mice. J Neurochem,2005;93(3):584-594.
- 14 金小高,施庆余,罗爱林. 神经病理性疼痛大鼠脊髓中 MEK-ERK 与 NF-kB 信号途径的变化. 临床麻醉学杂志,2010;26(2):151-153.
- 15 王知秋,陈衍城,杨国源等. MEK 抑制剂阻断小鼠脑缺血后 ERK 通路的激活和 IL-1 β mRNA 合成. 复旦大学学报(医学版),2004;31(2):119-123.

(2012-07-09 收稿,2012-09-13 修回)

编辑 沈 进