

• 论著 • 基础研究 •

脾多肽注射液通过肿瘤转移相关蛋白 1 参与大鼠急性肺损伤的保护作用

葛鹏¹, 李汉杰¹, 陈鑫¹, 景瑞军¹, 姚月娟¹, 李建忠², 张卫东³, 杨波³

1. 西安医学院第二附属医院 心胸外科 (西安 710038)
2. 西安交通大学第二附属医院 胸外科 (西安 710004)
3. 南开大学附属第一中心医院 胸外科 (天津 300192)

【摘要】 目的 将脾多肽应用于脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤模型, 探讨其肺保护机制, 为临床应用提供基础研究依据。方法 将 80 只健康 SD 大鼠随机分为脂多糖组 (LPS 组), 对照组, 脾多肽组和脂多糖+脾多肽组, 每组各 20 只。脂多糖 (LPS) 5 mg/kg 通过腹腔内注射的方式建立大鼠急性肺损伤模型。6 h 后麻醉处死大鼠获取肺组织, 通过 ELISA、湿干重比值、HE 染色、TUNEL 以及 Western-blot, 检测肺损伤相关指标。结果 脾多肽显著改善肺组织损伤, 减轻肺水肿, 抑制炎症因子的释放和细胞的凋亡, 此外, 脾多肽可抑制肿瘤转移相关蛋白 1 (MTA1) 的表达。结论 脾多肽注射液对大鼠急性肺损伤具有保护作用。

【关键词】 脾多肽注射液; 脂多糖; 急性肺损伤; 肿瘤转移相关蛋白

Lienal polypeptide injection attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats by metastasis associated protein-1

GE Peng¹, LI Hanjie¹, CHEN Xin¹, JING Ruijun¹, YAO Yuejuan¹, LI Jiangzhong², ZHANG Weidong³, YANG Bo³

1. Department of Cardio-Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an, 710038, P.R.China

2. Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, P.R.China

3. Department of Thoracic Surgery, Tianjin First Central Hospital of Nankai University, Tianjin, 300192, P.R.China

Corresponding author: YANG Bo, Email: yangbochest@126.com

【Abstract】 Objective To analyzed the role of lienal polypeptide injection in acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in rat. **Methods** Eighty male SD rats were randomly allocated into 4 groups: a LPS group, control group, lienal polypeptide group and LPS+ lienal polypeptide group (20 rats in each group). Lienal polypeptide or normal saline was given with an intramuscular injection 30 min after an intraperitoneal injection of LPS (5 mg/kg). The severity of pulmonary injury was evaluated 6 h after LPS challenge. **Results** Lienal polypeptide injection treatment significantly attenuated LPS-induced pulmonary histopathologic changes, alveolar hemorrhage, and neutrophil infiltration. Moreover, the lung wet-to-dry weight ratios, as the index of pulmonary edema, were markedly decreased by lienal polypeptide injection. In addition, lienal polypeptide injection decreased the productions of the proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 β and apoptosis. Furthermore, lienal polypeptide injection significantly suppressed LPS-induced activation of metastasis associated protein-1. **Conclusion** Lienal polypeptide injection has been demonstrated to protect rats from LPS-induced ALI by the expression of Metastasis-associated protein 1 (MTA1).

【Key words】 Lienal polypeptide injection; lipopolysaccharide; acute lung injury; metastasis-associated protein 1

急性肺损伤 (ALI) 是呼吸系统危重症, 以局部

炎症过度反应进而引发全身炎症反应综合征为主要特征^[1]。然而其发病机理异常复杂, 尤其是分子调控机制。因此, 深入了解 ALI 的发生、发展及其相关分子调节机制, 不仅对于理解 ALI 的病理特点非常重要, 也将为从不同水平、不同发病阶段针对

DOI: 10.7507/1007-4848.201803045

基金项目: 国家自然科学基金 (81070062); 南开大学附属第一中心医院科技基金项目 (CM201803; CF201807)

通信作者: 杨波, E-mail: yangbochest@126.com

不同靶点采取新的干预措施提供新的重要线索。

从健康小牛提取的脾多肽注射液具有免疫调节作用,可以使机体免疫功能得到纠正,因此,其主要用于免疫功能低下的肿瘤患者^[2,3]。由于脾多肽注射液具有非特异性免疫功能,既往研究发现其对 Toll 样受体 9 介导的炎症信号通路具有抑制作用^[4]。然而,国内外关于脾多肽注射液对 ALI 的作用机制报道少见,因此,本实验旨在通过 LPS 诱导急性肺损伤模型,探讨脾多肽注射液对 ALI 可能的作用机制。

1 料与方法

1.1 主要试剂和仪器

实验用 SD 大鼠购自西安医学院动物实验中心;脾多肽注射液购自吉林丰生制药有限公司;脂多糖、兔抗大鼠 β -actin 抗体购自 Sigma 公司;大鼠 TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒购自北京鼎国生物技术公司;Tunel 试剂盒购自碧云天生物技术公司;电热恒温干燥箱为北京科伟永兴仪器有限公司产品;Western-blot 蛋白电泳仪为 Bio-Rad 公司产品;电子显微镜为德国蔡司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及分组 将购自西安医学院动物实验中心的健康成年雄性 SD 大鼠随机分 4 组,分别为脂多糖组;对照组;脾多肽组;脂多糖+脾多肽组,每组 20 只,实验前均禁食 12 小时,自由饮水。1% 戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射诱导麻醉。脂多糖 (LPS) 5mg/kg 腹腔注射制造大鼠急性肺损伤模型。

脂多糖组,向腹腔内注射 LPS 5mg/kg;对照组,腹腔内注射与 LPS 等量生理盐水;脾多肽组,腹腔内注射上述等量生理盐水,30 min 后肌肉注射脾多肽注射液 2 ml;LPS+脾多肽组,腹腔内注射 LPS 5mg/kg,30 min 后肌肉注射脾多肽注射液 2 ml。各分组在 4 h 后过量戊巴比妥处死大鼠。

1.2.2 ELISA 左肺用于支气管肺泡灌洗 (BAL) 收集上清液,进行 ELISA 检测。通过 ELISA 试剂盒检测白介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 炎症因子的水平。

1.2.3 肺组织湿/干重 (W/D) 取右肺上叶放置电子天平称的计数为湿重 (W),迅速置 70 $^{\circ}$ C 电热恒温干燥箱中烤 24 h 后电子天平称的计数为干重 (D),计算湿干重比值 W/D。

1.2.4 HE 染色 右肺中叶用于 HE 染色。肺组织经过甲醛 24 h 固定、梯度酒精脱水、石蜡包埋、切

片、染色、中性树胶封片,光镜下观察各组肺组织形态结构。

1.2.5 TUNEL 右肺下叶经过脱蜡、脱水、TUNEL 检测液孵育、封片。随意选取镜下 10 个视野 (100 \times),分别计数凋亡细胞和总细胞数,根据公式 凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数计算凋亡指数 (AI)。

1.2.6 Western-blot 肺组织 200 mg 通过 SDS 细胞裂解液、PMSF 于冰上充分匀浆,离心取上清,用 BCA 法蛋白定量,加上样缓冲液并煮沸 5 min,上样 10 μ l,进行 SDS-PAGE,电泳转移到 PVDF 膜上。50 ml 脱脂奶封闭 1 h,分别滴加 MTA1 抗体、 β -actin 抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗。ECL 显色,凝胶成像系统分析灰度值。

1.2.7 统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析数据均用 SPSS 19.0 统计软件进行分析处理。两组间的比较采用 Tukey's 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 湿干重比值

LPS 组与对照组相比,湿干重比明显增高,提示 LPS 诱导的肺水肿形成。给予脾多肽干预后,大鼠肺湿干重比值显著下降,肺水肿减轻 (图 1)。

2.2 IL-1 β 和 TNF- α 的影响

LPS 导致大鼠 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平显著升高,LPS+脾多肽组能显著抑制 IL-1 β 和 TNF- α 炎症因子的水平表达量 (图 2)。

2.3 大鼠肺组织的病理变化

光镜下,对照组和脾多肽组,肺组织正常结构 (图 3a、3b);LPS 导致肺组织水肿,肺泡间隔部分增宽,肺泡形态破坏,可见红细胞、中性粒细胞浸润 (图 3c);LPS+脾多肽组比较,肺组织损伤程度

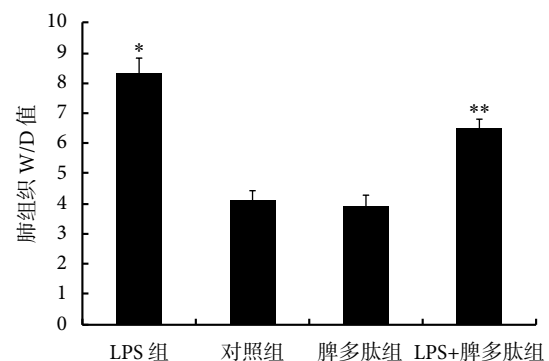


图 1 脾多肽注射液对大鼠肺湿干重比值的影响
与对照组比较,* $P < 0.05$

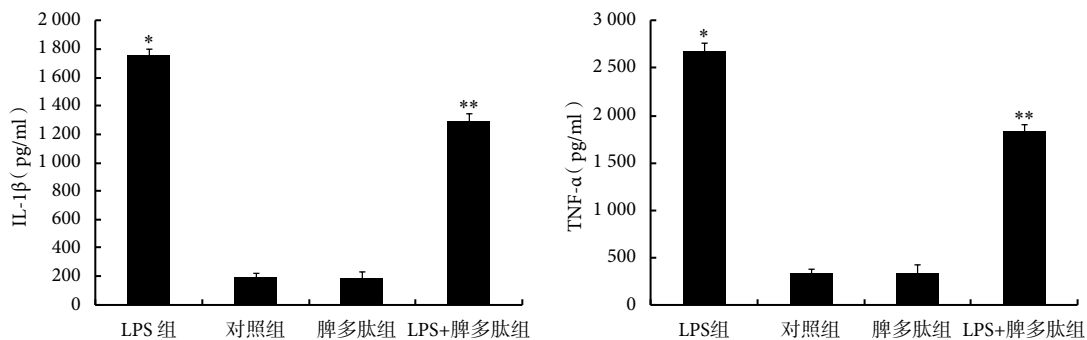


图 2 IL-1β 和 TNF-α 的变化
与 LPS 组比较, *P<0.05

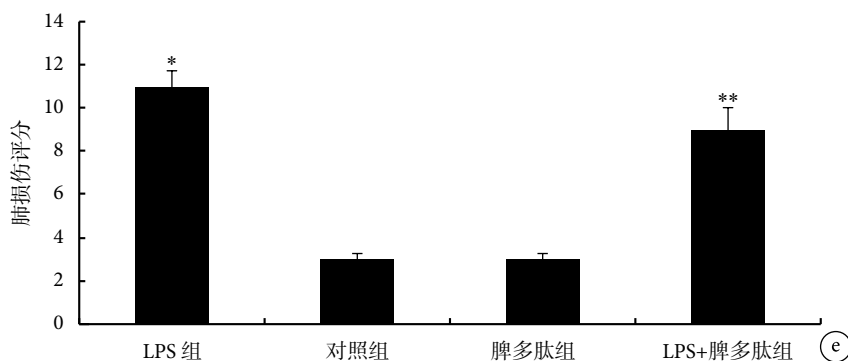
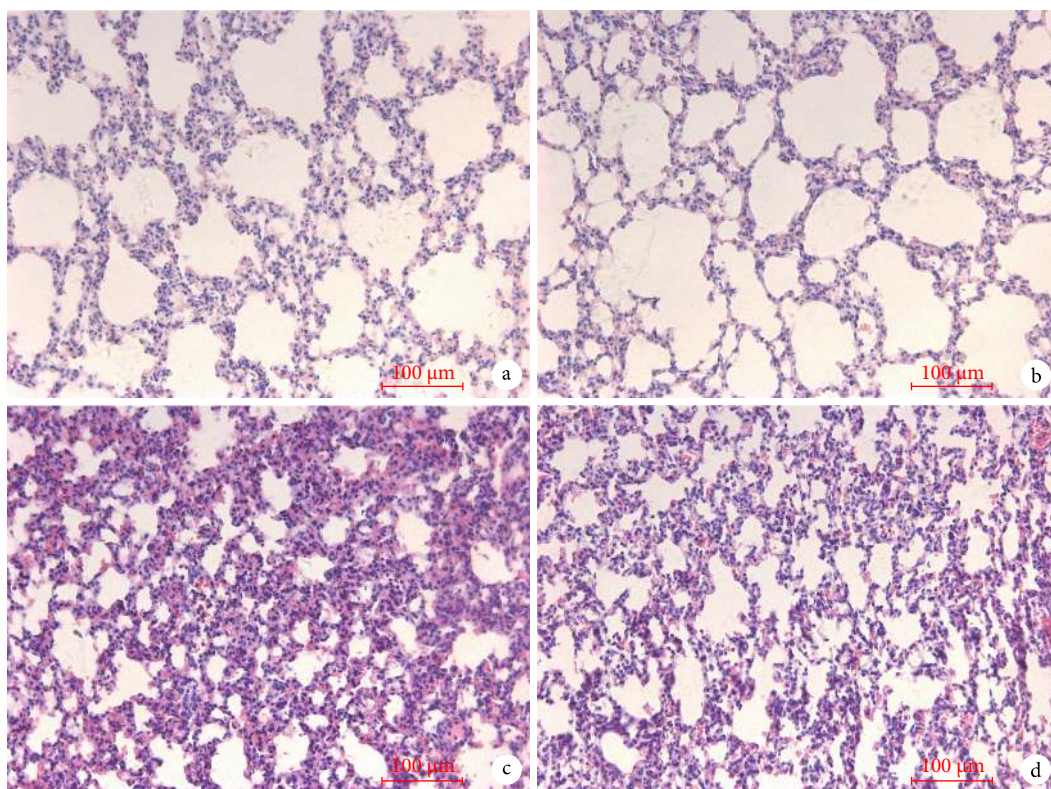


图 3 各组肺组织 HE 染色 (200×)

a: 对照组; b: 脾多肽组; c: LPS 组; d: LPS+脾多肽组; e: 病理评分, 与对照组比较, *P<0.05

明显减轻(图 3d)。

2.4 凋亡细胞的影响

LPS 导致大量细胞凋亡, 给予脾多肽干预后,

凋亡细胞指数显著下降(图 4)。

2.5 肺组织肿瘤转移相关蛋白 1 的表达

LPS 导致肺组织 MTA1 的表达水平显著增多,

* $P < 0.05$; 而给予脾多肽干预后, MTA1 蛋白表达水平显著降低, ** $P < 0.05$, 有统计学意义(图 5)。

3 讨论

急性肺损伤(ALI)是 Ashbaugh 等于 1967 年第一次提出, 根据急性肺损伤流行病学验证数据(Acute Lung Injury Verification of Epidemiology, ALIVE)显示, ICU 病人中约有 7% 罹患 ALI, 这其中, 约有 54% 的 ALI 患者将最终发展成为 ARDS, 病死率高达 26% ~ 35%; 老年患者病死率可高达 60%; 其年死亡人数与艾滋病、乳腺癌、心肌梗塞等疾病相当^[5]。虽然针对 ALI/ARDS 病理生理、保守性输液策略和肺保护性通气研究已经取得一些进展, 但我们还未完全理解其发病机制, 尤其是肺损伤和肺修复的分子调控机制, 以至于 ALI 的发病

率及病死率仍然较高^[6-8]。

肿瘤转移相关蛋白 (metastasis associated protein/metastasis tumor antigen, MTA) 是近几年发现的一类非常重要的转录调控分子超家族, 其主要作用机理是通过募集组蛋白去乙酰化酶复合物于靶基因的启动子序列进行转录水平的调控(主要为转录抑制)^[9]。作为这个超家族第一个被发现也是迄今为止分布最广泛、转录调控作用研究最为透彻的成员, MTA1 在肿瘤转移和侵袭、细胞增殖和生殖细胞发育分化等方面发挥重要的调控作用, 已被视为主调控子^[10]。

文献证实, LPS 诱导的 ALI 可以上调 MTA1 在巨噬细胞的表达水平, 这种刺激作用为 NF- κ B 信号依赖性; 在 MTA1 敲除后, LPS 诱导的 NF- κ B 通路活化减弱且 NF- κ B 调控的炎症因子(IL-1 β , TNF- α 和 MIP2) 的产量也显著降低^[11]。MTA1 既可作为 NF- κ B 通路的靶点又可作为 NF- κ B 通路中必不可少的一个中心环节参与了巨噬细胞对 LPS 刺激的炎症反应^[12]。因此, MTA1 在 LPS 刺激的 NF- κ B 依赖性炎症因子产生过程中发挥了至关重要的调节作用。

脾多肽注射液是一种具有激活机体非特异性免疫功能作用的免疫调节剂。通过激活致敏淋巴细胞、促进自然杀伤细胞的细胞毒活性、调节巨噬细胞吞噬功能, 从而提高生物免疫功能, 广泛应用于免疫功能低下的肿瘤患者, 如肺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌等^[13, 14]。近年来对其深入研究, 脾多肽开始应用于感染、损伤疾病的治疗^[4, 15]。

本实验证明, 脾多肽注射液对 LPS 诱导的大鼠 ALI 具有保护作用, 使肺组织的炎性细胞如 IL-1 β 、TNF- α 渗出减少、保护血管内皮细胞、显著降低肺毛细血管通透性, 并可显著改善凋亡细胞数目。

肺组织通透性水肿 (Pulmonary permeability edema) 是伴随 ALI 发生、发展的重要病理进程, 由于肺泡内液体增多, 有效呼吸面积降低导致低氧刺激, 进一步诱发炎症因子的产生, 加重 ALI 对肺泡上皮细胞的损害^[16-17]。脾多肽 + LPS 组肺组织 W/D 比值显著减低, 提示水肿减轻, 目前已知 MTA1 主要表达于 II 型肺泡上皮细胞, 脾多肽 + LPS 组肺组织 MTA1 蛋白表达水平明显降低, 我们推测脾多肽注射液通过抑制 MTA1 蛋白的表达, 发挥肺保护作用。

然而, 我们只研究了脾多肽对 MTA1 的影响, 调控急性肺损伤信号通路较多, 脾多肽注射液究竟通过哪条通路如 NF- κ B 通路作用于 MTA1 有待我

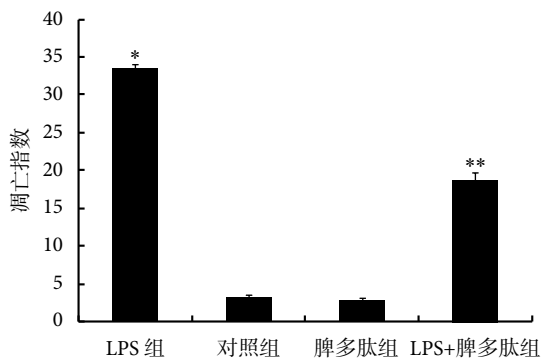


图 4 各组肺组织凋亡指数
与对照组比较, * $P < 0.05$

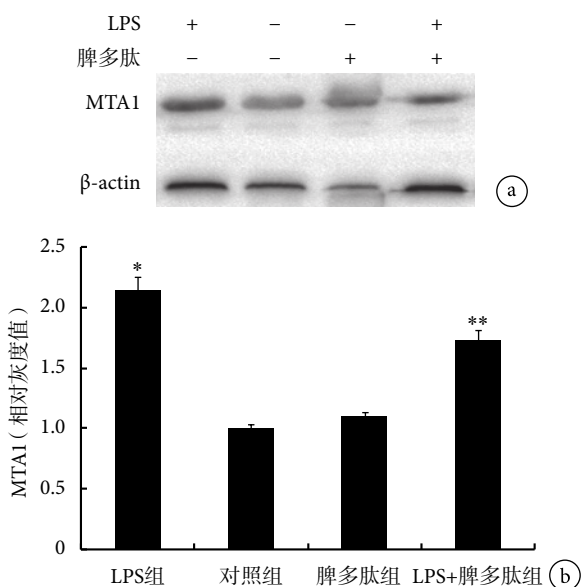


图 5 肺组织 MTA1 蛋白的表达

a: Western blot 法检测肺组织 MTA1 蛋白的代表性图像; b: MTA1 表达水平的相对灰度值, 与对照组比较, * $P < 0.05$

们进一步研究。

综上所述,我们首次发现,脾多肽对 LPS 诱导的急性肺损伤具有保护作用,其机制可能是通过影响 MTA1 蛋白的表达来实现的,本实验结果为研究急性肺损伤提供新的思路。

参考文献

- 1 Yang B, Li XP, Ni YF, *et al.* Protective Effect of Isorhamnetin on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*, 2016, 39(1): 129-137.
- 2 Zhou J, Niu G, Pei Y, *et al.* The effect and clinical efficacy of lienal polypeptide injection combined with FOLFOX chemotherapy regimen in colon cancer patients. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3191-3194.
- 3 Huang XE, Wang L, Ji ZQ, *et al.* Safety of Lienal Polypeptide Injection Combined with Chemotherapy in Treating Patients with Advanced Cancer. *Asian Pac Cancer Prev*, 2015, 16(17): 7837-7841.
- 4 苏俊孟, 郭晖, 夏飞, 等. 脾多肽对急性肺损伤大鼠 TLR9 信号相关因子的影响. *贵州医科大学学报*, 2017, (3): 296-299.
- 5 Castillo RL, Carrasco Loza R, Romero-Dapueto C. Pathophysiological Approaches of Acute Respiratory Distress syndrome: Novel Bases for Study of Lung Injury. *Open Respir Med J*, 2015, 9: 83-91.
- 6 Yang B, Ni YF, Wang WC, *et al.* Melatonin attenuates intestinal ischemia--reperfusion-induced lung injury in rats by upregulating N-myc downstream-regulated gene 2. *Surg Res*, 2015, 194(1): 273-280.
- 7 杨波, 张卫东, 夏彦民, 等. 盐酸羟考酮注射液对大鼠急性肺损伤的保护作用及机制分析. *中华医学杂志*, 2016, 96(31): 2498-2501.
- 8 王牧野, 廖辰, 王丽娟, 等. 内皮祖细胞减少肺移植后的缺血-再灌注损伤. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2018, 25(7): 610-615.
- 9 Amodio N, Raimondi L, Juli G, *et al.* MALAT1: druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches. *Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 63.
- 10 Sun X, Xu Y, Zhang S, *et al.* MicroRNA-183 suppresses the vitality, invasion and migration of human osteosarcoma cells by targeting metastasis-associated protein 1. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5058-5064.
- 11 Chen JK, Wang WC, Zang L, *et al.* Repression of chromatin modifier aggravates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4): 515-521.
- 12 Li DQ, Pakala SB, Nair SS, *et al.* Metastasis-associated protein 1/nucleosome remodeling and histone deacetylase complex in cancer. *Cancer Res*, 2012, 72(2): 387-394.
- 13 周福平, 杨喜晶, 王真, 等. 脾多肽注射液联合经导管肝动脉化疗栓塞治疗中晚期原发性肝癌. *第二军医大学学报*, 2017, 38(3): 379-382.
- 14 严虹霞, 杜娟, 柴丽敏, 等. 不同免疫增强剂对肿瘤患者免疫功能的影响. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(5): 454-458.
- 15 满明昊, 李立宏, 杨彦龙, 等. 颅脑损伤术后细胞免疫指标变化及脾多肽对其影响. *中国临床神经外科杂志*, 2016, 21(6): 362-365.
- 16 杨波, 张卫东, 李小飞, 等. 大剂量盐酸氨溴索对大鼠肺缺血再灌注损伤后的肺保护机制. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2016, 37(3): 367-371.
- 17 陈家宽, 王荣, 李建忠, 等. N-myc 下游调节基因-2 过表达对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响. *现代生物医学进展*, 2016, 16(15): 2816-2819.

收稿日期: 2018-03-17 修回日期: 2018-08-14
本文编辑: 董敏