

p38MAPK 在 H9N2 亚型猪流感病毒 诱导小鼠急性肺损伤中的表达

魏 东,张瑞华,徐明举,刘宝剑,王国华,徐 彤*

(河北北方学院,张家口 075000)

摘 要: 为研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)在 H9N2 亚型猪流感病毒(H9N2-SIV)诱导小鼠急性肺损伤(ALI)中的表达,将 180 只 7 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,随机平均分成 H9N2-SIV 感染组(感染组)、H9N2-SIV 感染+p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 组(SB 组)和对照组,在感染后的第 2、4、6、8 和 14 天,分别进行临床观察、肺病理组织学观察、肺中磷酸化 p38MAPK 分布和表达的测定。结果显示:与对照组比较,感染组和 SB 组小鼠均表现明显的临床症状,感染组小鼠肺磷酸化 p38MAPK 蛋白表达在感染后第 2 天即明显增强,至第 6 天蛋白表达达高峰,差异极其显著($P < 0.01$),SB203580 可抑制肺组织中 p38MAPK 的磷酸化,SB 组小鼠肺损伤程度小于感染组,表明 p38MAPK 能够被 H9N2-SIV 激活并参与 ALI 的发生和发展过程,p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 能够减轻 ALI 中肺组织的病理损伤。

关键词: p38MAPK; H9N2 亚型猪流感病毒; BALB/c 小鼠; 急性肺损伤; SB203580

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)03-0471-06

Expression of p38MAPK on H9N2-SIV Induced Acute Lung Injury in Mice

WEI Dong, ZHANG Rui-hua, XU Ming-ju, LIU Bao-jian, WANG Guo-hua, XU Tong*

(Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: To explore the expression of p38MAPK on H9N2-SIV induced acute lung injury(ALI) in mice, 180 seven weeks old SPF BALB/c female mice were randomly divided into H9N2-SIV infected group (infected group), H9N2-SIV infected + SB203580 group (SB group) and control group, and clinical observation, pathological histology observation of lung, and the determination of distribution and expression of phospho-p38MAPK in lung were conducted on the 2nd, 4th, 6th day and the 8th day post infection(p. i.) respectively. We found that the mice of infection group and SB group showed clinically apparent symptoms, compared with control group, the expression of phospho-p38MAPK protein in infection group was stronger with significant difference ($P < 0.05$) on the 2nd day p. i., it reached to the top with extremely significant difference ($P < 0.01$) on the 6th day p. i. SB203580 can inhibits phosphorylated p38MAPK in lung tissue, lung injury of SB group mice is less than that of infection group. It indicates that p38MAPK can be activated by H9N2-SIV and participate in the occurrence and development of ALI, SB203580 can lighten pathological injury of lung in ALI.

Key words: p38MAPK; swine influenza virus(H9N2); BALB/c mice; acute lung injury; SB203580

收稿日期: 2013-07-18

基金项目: 河北省自然科学基金(C2009001028; C2011405002); 河北省教育厅重点课题(ZD20131045); 河北省教育厅课题(Q2012043); 河北北方学院重大项目(ZD201306)

作者简介: 魏 东(1971-), 男, 河北张家口人, 副研究员, 博士, 主要从事基础兽医学研究, E-mail: hbzjkwd@163.com

* 通信作者: 徐 彤(1969-), 男, 博士, 教授, E-mail: xutong1969@sohu.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是流感病毒感染哺乳动物的主要症状之一,其确切发病机理目前仍不很清楚,有资料显示,p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)在多种因素诱导的肺损伤中发挥了重要的调控作用^[1]。但有关 p38MAPK 在 H9N2 亚型猪流感病毒(H9N2-SIV)感染引起 ALI 的研究中还未见报道。

SB203580 是一种吡啶咪唑类复合物,对超家族的 ERK1/2、JNK 及 ERK5 都无作用,仅仅对 p38MAPK 发生抑制作用^[2-3],是一种最常用的 p38MAPK 特异性抑制剂,能够有效阻止细胞中 p38MAPK 的表达,抑制 p38MAPK 信号通路。

本试验以 7 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠为研究对象,复制 H9N2-SIV 诱导小鼠 ALI 模型,同时设立 SB203580 处理模型组,选择小鼠 ALI 的不同时期,通过动态观察小鼠的临床症状、肺的病理变化和 p-p38MAPK 在肺组织中的分布及表达,探讨 p38MAPK 在 H9N2-SIV 诱导小鼠 ALI 中的作用。

1 材料与方法

1.1 病毒和主要试剂

H9N2 亚型猪流感病毒 A/swine/HeBei/012/2008(H9N2)(H9N2-SIV)由本课题组分离,经中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定,河北北方学院动物科技学院预防兽医学实验室保存;采用鸡胚尿囊腔接种法扩增病毒,每只胚接种 0.1 mL,孵化 72 h,收获供研究用病毒。

SB203580,兔源磷酸化 p38MAPK 多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司;4%多聚甲醛(含 DEPC),DMSO,过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG,过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,DAB 显色试剂盒(黄),GAPDH,PMSF(液体),哺乳动物组织总蛋白提取试剂,电泳缓冲液,SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(2×),BCA 蛋白定量试剂盒,凝胶制备试剂盒,转膜缓冲液,快速高效蛋白转移垫(定性滤纸),硝酸纤维素 NC 膜,印迹膜丽春红染色液,Western TBS-T 洗涤缓冲液,BSA TBS-T 缓冲系统封闭液,Western 专用一抗二抗稀释液,购自武汉博士德生物工程有限公司;磷酸化兔二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其他试验药品均为分析纯,试剂由课题组自配。

1.2 主要仪器设备

GRUMBACH 孵蛋器购自德国 Grumbach 公

司;Heraeus Fresco 17 离心机,超低温冰箱,Thermo 1300 series A2 生物安全柜,微量加样器,购自美国 Thermo Scientific 公司;DYY-60 型电泳电源,DYCZ-24DN 型电泳仪(电泳),DYCZ-40D 型电泳仪(转膜)购自北京六一仪器厂;新型电热恒温鼓风干燥箱购自宁波江南仪器厂;SmartGel™增强型一体化凝胶成像分析系统购自北京赛智创业科技有限公司;OLYMPUS BX41 生物显微镜,OLYMPUS CX21 显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.3 实验动物

10 日龄 SPF 鸡胚(北京梅里亚维通实验动物技术有限公司)[SCXK(京)2009-0003];7 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司)[SCXK(京)2009-0004];动物试验在中国人民解放军 251 医院三级生物安全实验室(BSL-3, P3)进行[SYXK(军)2007-018],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.4 实验动物分组与感染

进鼠前,将鼠笼用紫外线照射 12 h 消毒,同时对动物室进行全面消毒,饲料、饮水高压消毒。所有小鼠均在已消毒的动物室中隔离饲养,采取自由饮水和采食,适应性喂养 1 周。

接种前 1 h 配制 SB203580 注射液,按照 1 mg SB203580 : 100 μ L DMSO 的比例将 SB203580 溶解至 DMSO 中,使 SB203580 浓度为 10 μ g \cdot μ L⁻¹。注射前,将药物再用生理盐水稀释(即加入 900 μ L 生理盐水)至最终浓度为 1 mg \cdot mL⁻¹。

180 只小鼠随机平均分成 H9N2-SIV 感染组(感染组)、H9N2-SIV 感染+SB203580 组(SB 组)和对照组。SB 组按体重以 20 g \cdot 只⁻¹ 给药,1 只小鼠需要 100 μ g (5 mg \cdot kg⁻¹^[4]) SB203580;取上面配制 SB203580 液(1 mg \cdot mL⁻¹)100 μ L \cdot 只⁻¹ 于术前 0.5 ~ 1 h 腹腔注射。感染组和 SB 组小鼠分别滴鼻接种用灭菌生理盐水 5 倍稀释的 H9N2-SIV 病毒液,0.1 mL \cdot 只⁻¹。对照组小鼠滴鼻接种经灭菌生理盐水 5 倍稀释的正常鸡胚尿囊液,0.1 mL \cdot 只⁻¹。接种开始前的时刻记为 0 d,各组随机取 7 只小鼠作为观察组,于接种后 14 d 内进行临床症状的观察,24 h \cdot 次⁻¹,统计小鼠死亡数。具体造模方式见文献[5]。

1.5 标本的采集

在感染后第 2、4、6、8、14 d,从 3 组中各随机抽取 5 只小鼠,实施安乐死,用眼科剪和眼科镊迅速剥离肺组织(注意剔除心脏和气管等非肺组织),用冰

冷无菌生理盐水漂洗,以除去表面血污,滤纸吸干,用眼科剪从左肺剪取一小块肺组织放入 4%多聚甲醛液内固定 24 h 以上,固定完成后常规石蜡包埋,切片(4 μm),进行病理组织学和免疫组织化学测定。

在相同时间点,按照武汉博士德生物工程有限公司 Western blot 蛋白抽提试剂盒说明进行 Western blot 测定肺组织标本的采集。

1.6 磷酸化 p38MAPK (phospho-p38MAPK) 在肺组织中分布

采用北京中杉金桥生物技术有限公司磷酸化兔二步法检测试剂盒进行测定,操作程序严格按照说明书进行,胞核和/或胞质呈棕黄色为阳性。

1.7 免疫印迹 (Western blot) 法测定肺组织中 p38MAPK 表达

采用 Western blot 蛋白免疫印迹方法检测肺组织中磷酸化 p38MAPK 蛋白表达,以磷酸化 p38MAPK 蛋白代表 p38MAPK 活化水平。具体操作按照武汉博士德生物工程有限公司 Western blot 系列检测试剂盒进行。

用 SmartGel™ 增强型一体化凝胶成像分析系统对结果进行采集,然后用 Lane 1D 图像分析软件测定所采集图像目的条带的灰度,代表目的条带的表达强度。

1.8 数据处理

试验数据统计分析以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,SPSS13.0 统计软件包进行 *t* 检验 (independent sample *t* test), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 临床表现与剖检观察

对照组小鼠精神状态较佳、被毛光泽、活动灵活,呼吸和进食正常,试验期间体重平缓增长。

感染组小鼠精神状态差、背毛粗糙无光泽、行为迟钝、活动和饮食减少、精神沉郁,后期出现呼吸急促、被毛逆立、缩头弓背、拒食、消瘦等临床症状,小鼠感染病毒后伴随发病和耐过过程,体重出现先降后升的趋势,个别小鼠出现明显的神经症状。从感染的第 3 天末开始出现死亡,从第 8 天开始无小鼠死亡,上述症状开始逐渐减轻,14 d 后基本恢复正常;观察组有 3 只死亡,死亡率为 42.86%。

SB 组小鼠体征表现比感染组减轻,比对照组加重,即介于感染组和对照组之间,精神状态稍差、活

动稍减少、呼吸稍急促,体重呈先降后升的趋势,与感染组相比较,体重下降趋势较缓,而上升趋势较快,从第 4 天末开始出现死亡,从第 7 天开始无小鼠死亡,上述症状开始逐渐减轻,12 d 后基本恢复正常;观察组有 2 只死亡,死亡率为 28.57%;死亡率较感染组降低。

剖检(图 1)可见:对照组小鼠肺呈淡粉红色,质地柔软,肺叶表明光滑润泽,含气,无实变区;感染组小鼠肺明显水肿,体积增大,切面见液体流出,有较大面积淤血和出血,甚者可见红色肝样变区;支气管内流出大量的血色泡沫样的液体;SB 组小鼠肺淤血、出血等病变较感染组减轻。

2.2 肺病理组织学变化(HE 染色)

对照组小鼠肺组织肺泡结构清晰,肺泡壁薄,未见出血水肿等明显炎症病理改变(图 2)。感染组小鼠肺组织主要表现为血管及支气管周围水肿、大量炎性细胞渗出、出血,支气管上皮细胞坏死、脱落,逐渐形成细支气管肺炎(图 2,箭头所示)。SB 组小鼠肺组织血管及支气管壁周围稍有增厚、水肿,肺泡大小形态稍不规则,损伤程度亦明显小于病毒组(图 2)。

2.3 磷酸化 p38MAPK 蛋白在肺组织的分布

经免疫组织化学测定,对照组小鼠肺组织基本正常,仅仅在肺泡隔上皮细胞和气道上皮细胞有极少量的磷酸化 p38MAPK 阳性表达(图 3A);感染组磷酸化 p38MAPK 阳性细胞明显增多,特别是肺泡隔中的上皮细胞几乎全部呈阳性,肺泡管结节状膨大部的肌样细胞同样呈阳性反应。同时磷酸化 p38MAPK 阳性表达还广泛分布于气道上皮细胞、血管内皮细胞、浸润炎性细胞胞质和胞核中,在浸润炎性细胞中表达量也较高(图 3B);SB 组相对于感染组磷酸化 p38MAPK 阳性表达明显减少,介于感染组与对照组之间,仅见肺泡隔中上皮细胞的胞质有少量阳性表达,可见肺泡隔内的毛细血管内皮细胞阳性表达消失(图 3C),至第 14 天磷酸化 p38MAPK 阳性表达量基本恢复至对照组。

2.4 肺组织中磷酸化 p38MAPK 蛋白含量的表达

经 Western blot 法检测,在 H9N2-SIV 感染小鼠的不同时间点,对照组小鼠肺有浅淡的磷酸化 p38MAPK 蛋白条带表达,但在对照组中任何观察时间点都未发现磷酸化 p38MAPK 有统计学意义的变化。和对照组比较,感染组小鼠磷酸化 p38MAPK 蛋白表达在感染后第 2 天即明显增强,有显著性差异 ($P < 0.05$);至第 6 天蛋白表达达高峰,差异极其显著

($P < 0.01$), 从第 8 天开始, 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达有所下降; 到第 14 天仍高于对照组。SB 组小鼠肺

在各时间点磷酸化 p38MAPK 蛋白表达均明显低于感染组, 但仍高于对照组(图 4、5)。

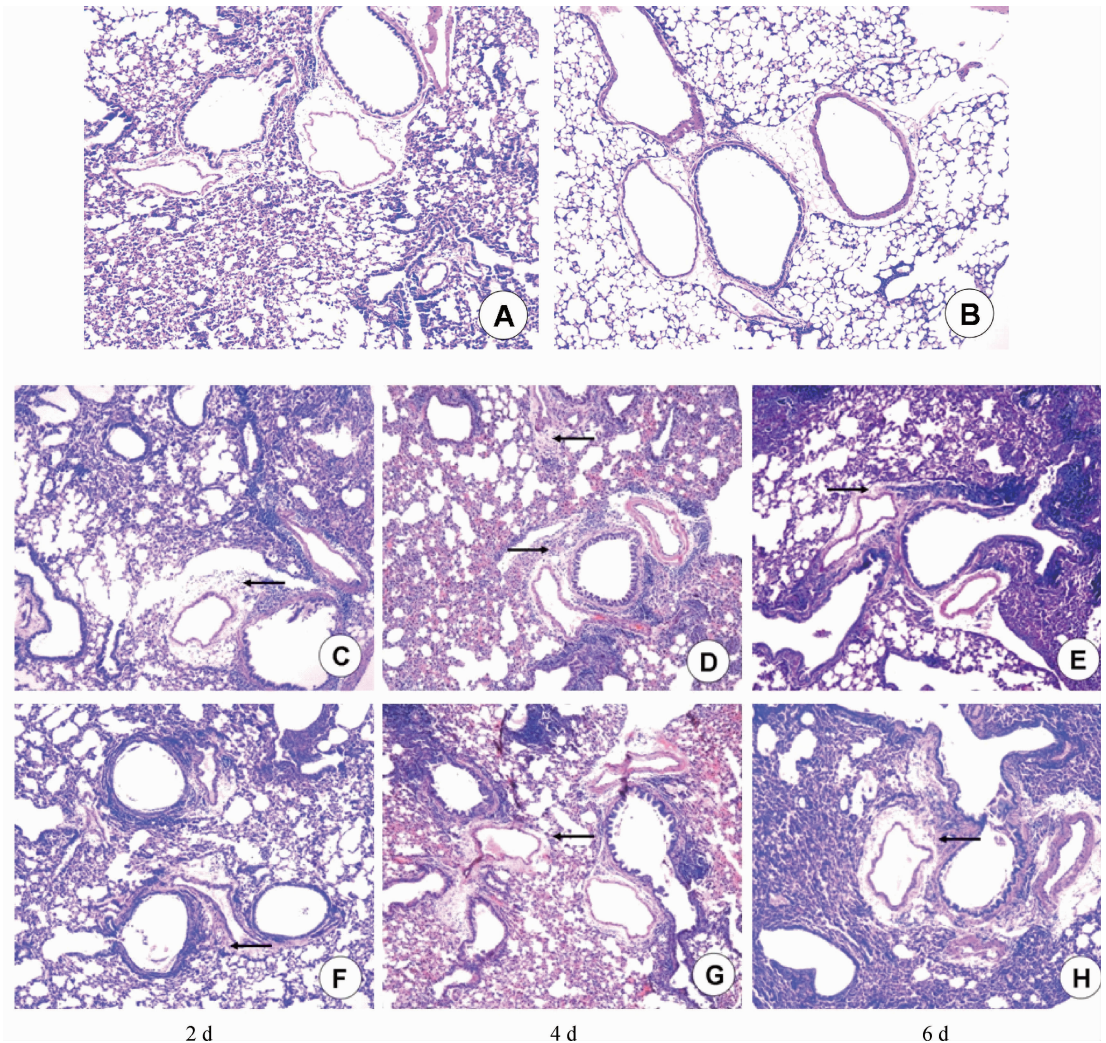


A. 对照组肺; B. SB 组肺; C. 感染组肺

A. Lungs of control group; B. Lungs of SB group; C. Lungs of infected group

图 1 小鼠肺变化

Fig. 1 Changes of the lung of mice



A、B 为对照组; C、D、E 为感染组; F、G、H 为 SB 组

A, B represent the control group; C, D, E represent the infected group; F, G, H represent the SB group

图 2 SB203580 干预后肺组织病理变化 (HE, 100 \times)

Fig. 2 The changes of lung after treated with SB203580 (HE, 100 \times)

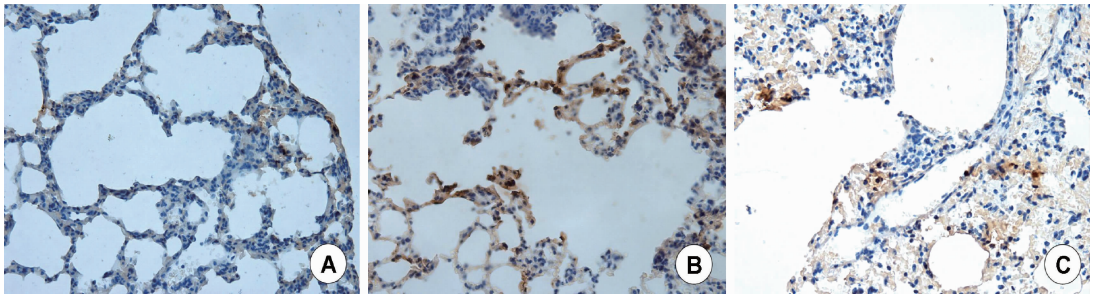


图 3 p-p38MAPK 蛋白在肺组织的分布(第 6 天,400×)
 Fig. 3 Distribution of p-p38MAPK in the lung tissue(The 6th day,400×)

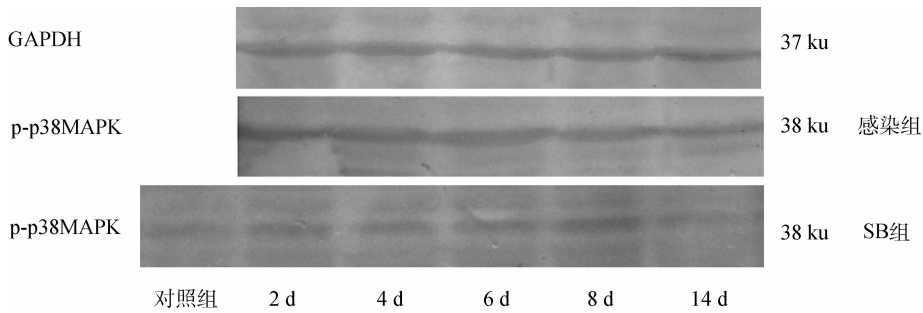
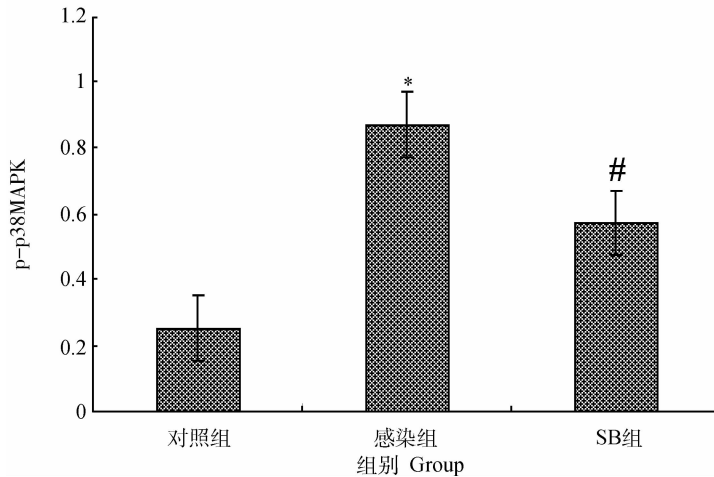
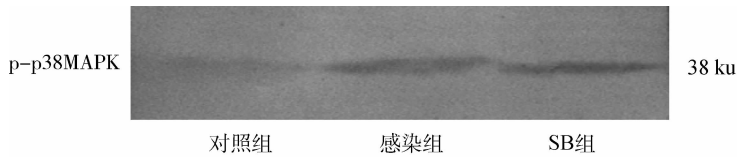


图 4 小鼠肺不同时间点 p-p38MAPK 蛋白的 Western blot 检测情况
 Fig. 4 Expression of p-p38MAPK at different time points in mice of infected group by Western blot



* 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与感染组比较, $P < 0.05$
 Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the infected group, # $P < 0.05$

图 5 不同处理组小鼠第 6 天时 p-p38MAPK 的 Western blot 检测情况
 Fig. 5 Expression of p38MAPK on the 6th day in different groups of mice by Western blot

3 讨论

流感病毒引起的 ALI/ARDS 是导致人类死亡

的主要原因之一, 但因其发病机制尚不很清楚, 对 ALI/ARDS 的治疗仅仅停留在支持疗法和抗炎治疗上, 效果不明显, 进而导致了病情的进一步恶化。

p38MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的重要成员,可被多种不同刺激因素激活,在ALI/ARDS 各种致病因素的刺激下,p38MAPK 得以激活并介导 ALI,目前已初步证明 p38MAPK 在ALI 中发挥重要作用^[6-8]。

SB203580 可以通透细胞膜,在分子水平上作用于 p38MAPK 与 ATP 结合的活性位点 Thr106,使 p38MAPK 失去了与 ATP 结合的能力,干扰 p38MAPK 的活化,从而使其失去激酶活性^[2,9],通过抑制 p38MAPK 的活化与表达,SB203580 可以有效抑制一些炎症因子(如 TNF- α 、IL-1 β)的表达,降低肺毛细血管通透性,改善肺病理学损害。在哺乳动物中,p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 对炎症的抑制作用,已经得到证实^[3,10]。

p38MAPK 信号通路涉及很多重要的生理过程,虽然完全阻断会调节炎症反应,但是对于正常生理反应也会造成很大的影响,即所谓的 p38 机制性(p38-mechanism-based)毒性,因此,p38MAPK 抑制剂使用剂量的选择对试验结果显得非常重要。结合相关文献报道^[11-12],使用较低剂量的 SB203580 (1~4 mg·kg⁻¹)能有效抑制 p38MAPK 活性,而不影响 JNK、ERK 活化,所以本试验选择 5 mg·kg⁻¹术前 0.5~1 h 经腹腔注射 SB203580。

研究结果显示:在第 0—14 天的病理过程中,感染组与 SB 组小鼠均表现急性肺损伤的体征,但 SB 组体征表现比感染组减轻;光镜下观察,SB 组小鼠肺脏肺泡间质和支气管周围的水肿减轻、炎性细胞和红细胞渗出减少,肺水肿、淤血、出血等损伤病变较感染组明显减轻;SB 组肺组织内 p38MAPK 的表达均明显弱于感染组;这些变化表明 p38MAPK 抑制剂 SB203580 发挥了其抑制作用,反证说明了 p38MAPK 能够被 H9N2-SIV 激活并参与了 H9N2-SIV 诱导小鼠 ALI 的发生和发展过程。同时,p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可以下调磷酸化 p38MAPK 的表达水平,能够减轻 ALI 中肺组织的病理损伤,这也为今后病毒性流感的预防和治疗提供了一个新的思路。

参考文献:

[1] POWELL C S, WRIGHT M M, JACKSON R M. p38MAPK and MEK1/2 inhibition contribute to cellular oxidant injury after hypoxia[J]. *Am J Physiol*

Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(4): L826-833.

- [2] ONO K, HAN J. The p38 signal transduction pathway: activation and function[J]. *Cell Signal*, 2000, 12(1): 1-13.
- [3] PEIFER C, WAGNER G, LAUFER S. New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP kinase[J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(2): 113-149.
- [4] 刘道利. p38MAPK 抑制剂 SB203580 在重症急性胰腺炎大鼠模型中作用机制的研究[D]. 四川: 泸州医学院, 2010.
- [5] 魏东, 刘英, 徐彤. H9N2 亚型猪流感病毒感染 BALB/c 小鼠动物模型的建立[J]. *中国实验动物学杂志*, 2012, 20(5): 54-57, 8.
- [6] NICK J A, YOUNG S K, BROWN K K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 2151-2159.
- [7] 王存连, 魏东, 徐明举, 等. p38MAPK 信号通路在猪源 H9N2 流感病毒导致小鼠肺损伤中作用的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(2): 281-288.
- [8] NICK J A, YOUNG S K, ARNDT P G, et al. Selective suppression of neutrophil accumulation in ongoing pulmonary inflammation by systemic inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Immunol*, 2002, 169(9): 5260-5269.
- [9] CHEN X L, XIA Z F, YU Y X, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates burn-induced liver injury in rats[J]. *Burns*, 2005, 31(3): 320-330.
- [10] KAMINSKA B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1-2): 253-262.
- [11] FUJISE T, LWAKIRI R, WU B, et al. Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(1): G110-116.
- [12] WIDMANN C, GIBSON S, JARPE M B, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1): 143-180.

(编辑 白永平)