文章编号:2095 - 1116(2014)02 - 0125 - 04 ·基础医学·

藻蓝素对脓毒性急性肺损伤大鼠血红素氧合酶-1 表达的影响及分子机制

周定耕[1],詹向阳[1],张永虎[1],张大利[2]
(1. 南华大学附属第二医院急诊科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学附属第一医院急诊科)

摘 要: **目的** 观察藻蓝素(CPC)对脓毒症急性肺损伤(ALI)大鼠血红素氧合酶-1(HO-1)表达的影响及分子机制。 **方法** SD 大鼠根据不同实验目的随机分为对照组、模型组和 CPC 干预组。其中模型组采用盲肠结扎穿刺建立脓毒症急性肺损伤大鼠模型。CPC 干预组在模型组基础上分别给予浓度为 20、40、60 mg/kg CPC 腹腔注射。术后 72 h 后获肺组织标本,观察 CPC 处理前后 HO-1 蛋白的表达,比色法检测 HO-1 酶活性改变情况。提取组织总蛋白和核蛋白,Western blot 检测蛋白激酶 B(Akt)磷酸化以及转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)核转位情况。化学发光法检测超氧化物的含量。 **结果** CPC 处理可明显促进 ALI 的肺组织中 HO-1 的表达,并能增强其酶活性。同时,CPC 也可促进 Akt 磷酸化,并能诱导转录因子 Nrf2 核转位。同时,CPC 也可显著减少大鼠肺组织中过氧化物产生,而 HO-1 抑制剂锡原卟啉Ⅸ(SnPP)能明显降低 CPC 对超氧化物的抑制作用。 **结论** CPC 诱导 HO-1 表达可能与 Akt 磷酸化以及 Nrf2 的激活有关。

关键词: 藻蓝素; 脓毒症; 急性肺损伤; 血红素氧合酶-1
中图分类号:R453.9 **文献标识码:**A

Effect of C-phycocyanin on Heme Oxygenase-1 Expression and its Molecular Mechanism in Acute Lung Injury Septic Rats

ZHOU Dinggeng, ZHAN Xiangyang, ZHANG Yonghu, et al
(*Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** To observe the effect of C-phycocyanin (CPC) on Heme oxygenase-1 (HO-1) expression and its molecular mechanism in acute lung injury (ALI) in septic rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group and CPC group. Cecal ligation and puncture was used to establish septic acute lung injury rats (model group). For the CPC groups, septic acute lung injury rats were administrated by 20, 40 and 60mg/kg of CPC by peritoneal injection. 72h after the operation, serum and lung tissue were obtained, and expression of HO-1 and its enzymic activity were detected by Western blot and colorimetric method, respectively. The total proteins in lung tissue and the nuclear proteins were extracted, phosphorylation of Akt and nuclear translocation of Nrf2 were detected by Superoxide Level production in Lungs and were measured by chemiluminescence. **Results** CPC could significantly induce ALI rats expression of HO-1, and increase its enzymic activily. In addition, CPC could also induce Akt phosphorylation and Nrf2 nuclear translocation. Furthermore, CPC could elevate superoxide formation. However, blocking HO-1 activity by tin protoporphyrin IX (SnPP), an HO-1 inhibitor, markedly abolished the inhibitory effect of superoxide production induced by CPC in septic-induced ALI rats. **Conclusion** CPC induced HO-1 expression in septic-induced ALI rats is mediated by Akt and Nrf2.

Key words: C-phycocyanin; sepsis; acute lung injury; heme oxygenase-1

收稿日期:2013 - 11 - 21
基金项目:湖南省自然科学基金衡阳联合基金(13JJ9009).
作者简介:周定耕,硕士,主治医师,研究方向:急性肺损伤发病机制与防治,E-mail:zhoudinggeng@163.com.

脓毒症急性肺损伤是一种由败血症或严重感染引起的一种危急并发症,虽然目前的治疗方法和手段已经取得了较大的进步,但其死亡率依然可达30% ~50%[1]。和其他因素引起的急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合症(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)一样,病理生理学上是肺泡毛细血管广泛损伤,通透性增加,从而导致肺水肿、缺氧,以及多形核中性粒细胞渗入肺泡腔内,最终导致呼吸功能受损。血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是催化血红素降解为CO、亚铁离子(Fe^{2+})以及胆红素的限速酶。研究显示,HO-1对机体炎症反应和氧化应激具有保护作用。因此,HO-1有可能是ALI进展的一个潜在治疗靶点。藻蓝素(C-phycocyanin, CPC)是一种从螺旋藻提取、加工而成的天然食用色素,是一种营养价值极高的营养物质[2]。本研究旨在探讨CPC对HO-1表达的影响,并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

CPC,锡原卟啉(tin protoporphyrin IX, SnPP)为Sigma-Aldrich产品(纯度98%)。抗HO-1多克隆抗体,抗Nrf2单克隆抗体、抗Akt磷酸化以及总Akt抗体购自Cell Signaling公司。抗鼠β-actin、抗TATA盒结合蛋白(TATA-boxbinding protein, TBP)多克隆抗体购自Santa Cruz公司,HRP标记IgG抗体购自Abcam公司。Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自Bio-Rad。

1.2 脓毒症急性肺损伤大鼠模型的构建及分组

40只雄性SPF级Sprague-Dawley雄性大鼠(动物许可证号:SCXK(湘)2010-0004,体重200 ~250 g)购自南华大学实验动物中心。将其随机分为5组:对照组(或假手术组):SD大鼠用10%水合氯醛生理盐水麻醉(400 mg/kg),去除毛发并进行皮肤消毒后,沿前腹正中线作3 cm长的切口,取出盲肠,然后逐层关腹。模型组:取出盲肠后,用4.0丝线在距盲端1.5 cm处结扎,用18号针头在盲肠结扎处远端穿刺2次,挤出少量粪便,随后将盲肠回纳入腹腔中,逐层关腹。不同浓度CPC(20、40、60 mg/kg)干预组:术后2 h分别予20、40、60 mg/kg CPC腹腔注射,12 h后给予第二次注射。此外,在研究HO-1对超氧化物含量影响时,另设SnPP干预组,即在60 mg/kg CPC干预组的基础上,同时加入SnPP(30 μmol/kg)处理。72 h后处死大鼠用于下一步研究。

1.3 肺部 O^{2-} 测定

新鲜的右肺组织切成5 mm × 5 mm小块,用Krebs-HEPES缓冲液孵育5 ~10 min。随后加至含200 μL Krebs-HEPES缓冲液(含1.25 mm光泽精)的96孔培养板中,用发光测定仪(Microlumat LB96V, Berthold)于1 min读取化学发光强度。随后将所有肺组织在60 ℃干燥48 h,计算其总蛋白干重。化学发光强度以1 min每毫克干重蛋白的相对发光单位(relative light unit, RLU)表示。

1.4 Western blot 检测 HO-1 表达,Akt 磷酸化以及 Nrf2 核转位

根据试剂盒(Pierce)提供的步骤提取肺组织中的总蛋白或核蛋白,并测定其浓度。获取100 μg蛋白用于SDS-PAGE。分离的总蛋白或核蛋白随后转印至PVDF膜上(Millipore),并利用含有5%脱脂牛奶的TBST封闭1 h,随后加入抗、抗HO-1(1∶500)、β-actin(1∶5 000)、抗Akt(1∶1 000)或抗Nrf2(1∶1 000),抗TBP(1∶1 000)的抗体4 ℃孵育过夜。多次洗涤之后,加入HRP标记的二抗(1∶10 000稀释)孵育膜1 h。ECL法(Amersham)发光、显影。

1.5 HO-1 酶活性测定

将获取的肺组织匀浆18 000 × g 4 ℃离心10 min,获取400 μL上清加到反应混合物中(含0.8 mmol/L NADPH、2 mmol/L葡糖糖-6-磷酸盐、0.2 U葡糖糖6磷酸盐-1脱氢酶、2 mg大鼠肝脏胞浆、100 mmol/L PBS以及10 μmol/L氯化血红素)。反应在黑暗的环境中37 ℃孵育1 h后加入1 mL氯仿终止反应。并在463 nm和530 nm双波长测吸光度值(胆红素吸光系数为40),以生成的胆红素量表示HO-1活性,单位为nmol/(mg protein · h),并计算其与对照组的相对值。

1.6 统计学分析

应用SPSS17.0软件进行统计学分析,数据用$\bar{x} \pm s$表示,并采用单因素方差分析数据,$P < 0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CPC 对肺组织中 HO-1 蛋白表达的影响

对照组HO-1表达水平较低,脓毒性ALI大鼠肺组织中HO-1蛋白表达水平有轻微增高,而经20 ~60 mg/kg CPC处理后,HO-1表达进一步增强(图1)。

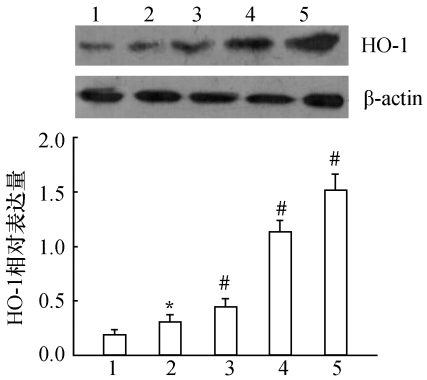

图 1　CPC 对肺组织中 HO-1 表达的影响　1:对照组;2:模型组;3:20 mg/kg CPC 干预组;4:40 mg/kg CPC 干预组;5:60 mg/kg CPC 干预组.　与对照组比较,*:$P<0.05$;与模型组比较,#:$P<0.05$

2.2　CPC 对肺组织中 HO-1 酶活性的影响

与对照组相比,模型组大鼠肺组织中 HO-1 酶活性轻微增高。给予 CPC 处理后,HO-1 酶活性随 CPC 浓度的增高而递增。当 CPC 浓度为 30 mg/kg 时,HO-1 活性是对照组的 4.6 倍(图 2)。

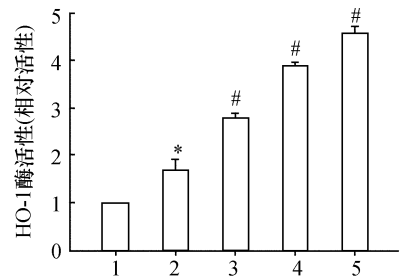

图 2　CPC 对肺组织中 HO-1 酶活性的影响　1:对照组;2:模型组;3:20 mg/kg CPC 干预组;4:40 mg/kg CPC 干预组;5:60 mg/kg CPC 干预组.　与对照组比较,*:$P<0.05$;与模型组比较,#:$P<0.05$

2.3　CPC 对肺组织中 Akt 磷酸化的影响

对照组以及模型组大鼠肺组织中磷酸化 Akt 含量较低。CPC 处理后能明显增加磷酸化 Akt 的水平,而总 Akt 在所有处理组中保持恒定(图 3)。

2.4　CPC 对转录因子 Nrf2 活化的影响:

Western blot 结果显示,ALI 大鼠肺组织内细胞核中 Nrf2 含量仅轻微高于对照组,而 CPC 处理后,细胞核中 Nrf2 水平随着 CPC 浓度的增高而递增,表明 CPC 能诱导 Nrf2 从细胞浆转移至细胞核中(图 4)。

2.5　CPC 对肺组织中超氧化产物含量的影响

与对照组相比,ALI 大鼠肺组织中 O^{2-} 明显增高。不同浓度 CPC 干预后,与模型组相比,超氧化产物含量随之降低。其中 60 mg/kg CPC 处理后,其含量降低至 30.7%,而 SnPP 可明显消除 CPC 的抑制作用(图 5)。

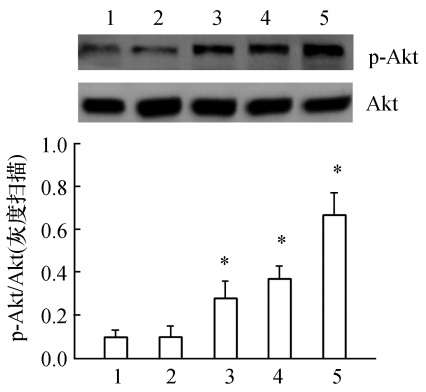

图 3　CPC 对肺组织中 Akt 磷酸化的影响　1:对照组;2:模型组;3:20 mg/kg CPC 干预组;4:40 mg/kg CPC 干预组;5:60 mg/kg CPC 干预组.　与模型组比较,*:$P<0.05$

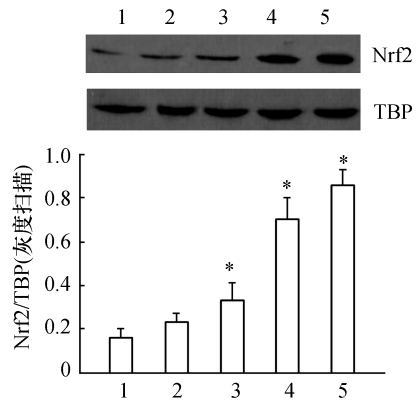

图 4　CPC 对肺组织中 Nrf2 核转位的影响　1:对照组;2:模型组;3:20 mg/kg CPC 干预组;4:40 mg/kg CPC 干预组;5:60 mg/kg CPC 干预组.　与模型组比较,*:$P<0.05$

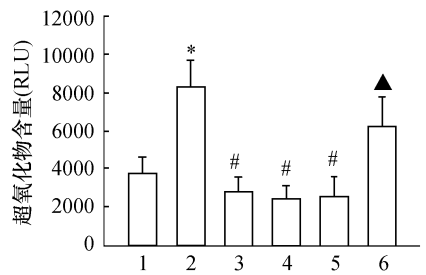

图 5　CPC 对脓毒性 ALI 大鼠肺组织中超氧化物含量的影响　1:对照组;2:模型组;3:20 mg/kg CPC 干预组;4:40 mg/kg CPC 干预组;5:60 mg/kg CPC 干预组;6:SnPP + 60 mg/kg CPC.　与对照组比较,*:$P<0.01$;与模型组比较,#:$P<0.05$;与 60 mg/kg CPC 组比较,▲:$P<0.05$

3　讨　　论

HO-1 是催化血红素降解为 CO、亚铁离子和胆红素的限速酶,并在机体的抗炎症、抗氧化损伤中发

挥重要作用[3]。研究发现,HO-1 的表达增加被认为是宿主细胞免受免疫病理损伤或应激损伤的一种适应性保护机制。Rushworth 等[4]研究发现,LPS 可诱导人单核细胞产生 HO-1 和 NQO1,从而调节机体过度的免疫应答。在大龄小鼠模型中,HO-1 能调节流感病毒或病毒感染引起的免疫反应[5]。因此,以 HO-1 为出发点,寻求有效的诱导剂,对 ALI 的炎症反应的防治具有重要意义。本研究发现,CPC 处理后,不但可诱导 HO-1 蛋白的表达,也能上调其酶活性水平,这说明 CPC 通过上调 HO-1 的表达而抑制肺组织内的过度的炎症反应。目前,HO-1 发挥抗炎作用的机制仍未完全明了。其介导的游离血红素降解,以及产生抗炎症的复合物比如胆绿素/胆红素和 CO 等可能与 HO-1 的抗炎症活性有关[6]。

PI3K 是参与细胞生长以及骨架重塑的重要激酶,其激活后可导致脂质底物磷酸化而形成第二信使,并激活下游蛋白激酶 B,即 Akt。因此检测 Akt 的磷酸化可间接反映 PI3K 的激活[7]。本研究证实 CPC 处理后能明显诱导 Akt 磷酸化。研究显示,PI3K/Akt 的活化不仅可以上调 HO-1 基因表达,而且可能与 HO-1 的细胞保护作用相关。因此,CPC 对 HO-1 的诱导可能与激活 PI3K 通路有关。

研究显示,HO-1 基因的启动子区域含有转录因子 Nrf2 的结合位点。在非激活情况下,Nrf2 通过与抑制物 keap1 结合于细胞质内。当细胞受到外源性刺激时,Nrf2 从 keap1 中分离出来,转移至细胞核内,从而与应激诱导性基因包括 HO-1 的启动子区域的抗氧化剂应答元件结合[8-9]。本研究发现 CPC 处理后,Nrf2 转位增加,这与肺组织中 HO-1 蛋白表达的趋势一致,表明 CPC 诱导 HO-1 的表达可能是由于 Nrf2 的活化所致。HO-1 的代谢产物如 CO 和胆绿素在多种肺部疾病包括 ALI 中发挥抗氧化和抗炎症作用,包括抑制促炎症细胞因子、趋化因子、ROS 形成[10]。为了进一步评价 HO-1 在 CPC 的保护效应中的作用,在干预过程中加入 SnPP,对组织中超氧化物的含量进行了分析。结果表明,不同浓度 CPC 处理可明显降低脓毒性 ALI 大鼠中的超氧化物含量。此外,利用 HO-1 抑制剂 SnPP 处理后,可削弱 CPC 的保护效应,这再次表明 CPC 的保护效应与 HO-1 有关。

总之,本研究证实 CPC 能有效诱导脓毒性 ALI 大鼠肺组织表达 HO-1,其机制可能与 PI3K/Akt 和 Nrf2 的激活有关。HO-1 可通过多种机制降低肺组织中超氧化物含量,最终发挥对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用。

参考文献:

[1] Du B, An Y, Kang Y, et al. Characteristics of critically ill patients in ICUs in Mainland China[J]. Crit Care Med, 2013, 41(1): 84-92.

[2] Shih CM, Cheng SN, Wong CS, et al. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin[J]. Anesth Analg, 2009, 108(4): 1303-1310.

[3] Deshane J, Chen S, Caballero S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism[J]. J Exp Med, 2007, 204(3): 605-618.

[4] Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes[J]. J Immunol, 2008, 181(10): 6730-6737.

[5] Cummins NW, Weaver EA, May SM, et al. Heme oxygenase-1 regulates the immune response to influenza virus infection and vaccination in aged mice[J]. FASEB J, 2012, 26(7): 2911-2918.

[6] 刘大男,吴立荣,方颖,等. 血红素氧合酶 1/一氧化碳系统对球囊损伤后内膜增殖及内皮功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(6): 345-349.

[7] Mo L, Yang C, Gu M, et al. PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(2): 314-320.

[8] Zhang Z, Cui W, Li G, et al. Baicalein protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity through activation of Keap1/Nrf2/HO-1 and involving PKCalpha and PI3K/AKT signaling pathways[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(33): 8171-8182.

[9] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(9): 1304-1309.

[10] Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, et al. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(6): L1131-1137.

(此文编辑:蒋湘莲)