

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 (BILD) 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。

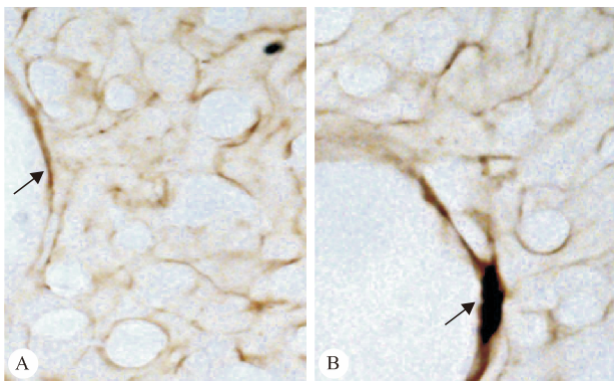


图 1 *trkB* 在脑缺血肺损伤后 3 d 大鼠肺上皮的表达(\uparrow)。SP \times 200

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。

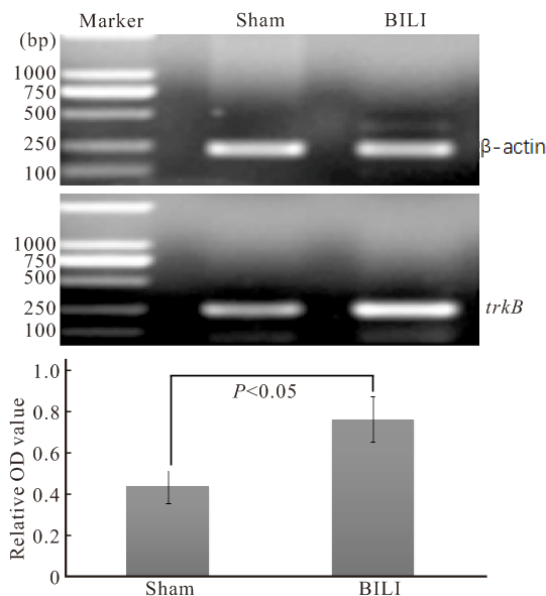


图 2 *trkB* mRNA 在脑缺血肺损伤后 3 d 大鼠肺组织的表达

Fig 2 Data on *trkB* mRNA level in lung at day 3 after BILI, indicated by RT-PCR

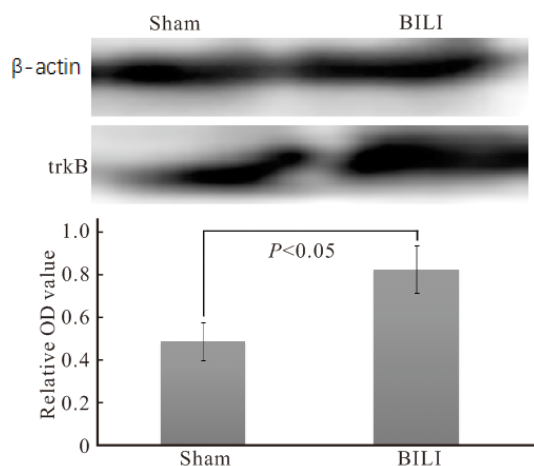


图 3 *trkB* 蛋白在脑缺血肺损伤 3 d 大鼠肺组织的表达

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.

- Inserted Central Catheter(PICCs). *Paediatr Anaesth*,2003;13(6):527-529.
- 3 吴旭红, 马爱萍, 杨颖等. 早产儿 PICC 液体渗出的相关因素. *中国临床营养杂志*,2008;16(1):57-59.
 - 4 Bourgeois FC, Lamagna P, Chiang VW. Peripherally inserted central catheters. *Pediatr Emer Care*,2011;27(6):556-564.
 - 5 范静, 崔洪文. 喜疗妥防治 PICC 致机械性静脉炎临床效果观察. *临床护理杂志*,2010;9(6):27-28.
 - 6 夏彩莲, 王蓓, 薛海莉等. 水胶体敷料预防 PICC 置管术后机械性静脉炎的效果. *解放军护理杂志*,2010;27(15):1190-1192.
 - 7 Heidi L. The use of bedside ultrasonography for PICC placement and insertion. *Advance in Neonatal Care*,2011;11(1):52-53.
 - 8 杜华. 湿热敷预防 PICC 致机械性静脉炎的效果观察. *中国实用护理杂志*,2005;21(12):7-8.
 - 9 惠宁, 郑守华, 上官志毅. 硫酸镁湿热敷联合氦氖激光照射治疗 PICC 静脉炎效果观察. *护理管理杂志*,2010;10(4):301-302.
 - 10 Stocker M, Berger TM. Arterial and central venous catheters in neonates and infants. *Anaesthesist*,2006;55(8):873-82.
 - 11 Jacobs BR, Heygoog M, Hingl J. Recombinant tissue plasminogen activator in the treatment of central venous catheter occlusion in children. *J Pediatr*,2001;139(4):593-596.
 - 12 Blaney M, Shen V, Kerner JA, *et al.* Alteplase for the treatment of central venous catheter occlusion in children: results of a prospective, open-label, single-arm study (The Cathflo Activase Pediatric Study). *J Vasc Interv Radiol*,2006;17(11 Pt 1):1745-1751.
 - 13 Shen V, Li X, Murdock M, *et al.* Recombinant tissue plasminogen activator (alteplase) for restoration of function to occluded central venous catheters in pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol*,2003;25(1):38-45.
 - 14 Mahieu LM, De Muyenck AO, Ieven MM, *et al.* Risk factors for central catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*,2001;48(2):108-116.
 - 15 Lemarie C, Savagner C, Leboucher B, *et al.* Central-venous-catheter-related bacteremia in neonatology. *Med Mal Infect*,2006;36(4):213-218.
 - 16 McKee C, Berkowitz I, Cosgrove S, *et al.* Reduction of catheter-associated bloodstream infections in pediatric patients: experimentation and reality. *Pediatr Crit Care Med*,2008;9(1):40-46.

(2012-04-27 收稿, 2012-07-31 修回)

编辑 沈进

(上接第 903 页)

- 5 冯丹, 姚尚龙, 武庆平等. 酪氨酸蛋白激酶抑制剂对大鼠呼吸肌所致肺损伤的保护作用. *中国药理学通报*,2007;23(3):370-373.
- 6 王关嵩, 蔡文琴, 钱桂生等. 肺微血管内皮细胞系的建立及脂多糖作用后酪氨酸激酶受体活性的变化. *第三军医大学学报*,2003;25(2):94-97.
- 7 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.
- 8 Yang HJ, Yang XY, Ba YC, *et al.* Role of Neurotrophin 3 in spinal neuroplasticity in rats subjected to cord transection. *Growth Factors*,2009;27(4):237-246.
- 9 Wang XY, Li XL, Hong SQ, *et al.* Electroacupuncture induced spinal plasticity is linked to multiple gene expressions in dorsal root deafferented rats. *J Mol Neurosci*,2009;37(2):97-110.
- 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 Zhai J, Zhou W, Li J, *et al.* The *in vivo* contribution of motor neuron TrkB receptors to mutant SOD1 motor neuron disease. *Hum Mol Genet*,2011;20(21):4116-4131.
- 12 Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, *et al.* Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB. *FEBS Lett*,2011;585(20):3224-3228.
- 13 Raap U, Fokkens W, Bruder M, *et al.* Modulation of neurotrophin and neurotrophin receptor expression in nasal mucosa after nasal allergen provocation in allergic rhinitis. *Allergy*,2008;63(4):468-475.
- 14 Bennedich Kahn L, Gustafsson LE, Olgart Höglund C. Brain-derived neurotrophic factor enhances histamine-induced airway responses and changes levels of exhaled nitric oxide in guinea pigs *in vivo*. *Eur J Pharmacol*,2008;595(1-3):78-83.
- 15 Prakash YS, Thompson MA, Pabelick CM. Brain-derived neurotrophic factor in TNF-alpha modulation of Ca²⁺ in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2009;41(5):603-611.
- 16 Gruber H, Hoelscher G, Bethea S, *et al.* Interleukin 1-beta upregulates brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neuropilin 2 gene expression and NGF production in annulus cells. *Biotech Histochem*,2012;87(8):506-511.
- 17 García-Suárez O, Pérez-Pinera P, Laura R, *et al.* TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respir Physiol Neurobiol*,2009;167(3):281-291.
- 18 Yao Q, Zaidi SI, Haxhiu MA, *et al.* Neonatal lung and airway injury: a role for neurotrophins. *Semin Perinatol*,2006;30(3):156-162.

(2012-07-18 收稿, 2012-09-25 修回)

编辑 余琳