

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.007

文章编号: 1005-8982(2016)15-0038-06

论著

磷酸化蛋白激酶样内质网激酶、C/EBP 同源蛋白在慢性间歇低氧大鼠肺组织中的表达变化及意义*

张嘉宾, 张盼盼, 王红阳, 寇育乐, 王玲
(华北理工大学附属医院 呼吸科, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探讨慢性间歇低氧 (CIH) 大鼠肺组织中磷酸化的蛋白激酶样内质网激酶 (p-PERK)、CCAAT 增强子结合蛋白 (C/EBP) 同源蛋白 (CHOP) 表达变化及意义。 **方法** 将 60 只大鼠随机分成正常组 (UC 组)、CIH 组, 每组各自分成 3、7、14、21 和 28 d 5 个时间亚组。采用 HE 法观察 UC 组和 CIH 组大鼠肺组织病理形态变化; 采用免疫组织化学法检测 p-PERK、CHOP 蛋白表达及两者的相关性; 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测两组大鼠肺组织 CHOP mRNA 表达。 **结果** ① CIH 组肺泡壁及间质轻度水肿, 少量炎症细胞浸润, 肺泡结构紊乱, 部分肺泡融合; UC 组大鼠肺组织无明显病理变化。② CIH 组肺组织 p-PERK、CHOP 蛋白表达高于 UC 组, 于 21 d 表达最高。③ CIH 组肺组织 CHOP mRNA 表达高于 UC 组, 于 21 d 表达最高。④ p-PERK、CHOP 表达的上调呈正相关。 **结论** 慢性间歇低氧可引起肺组织损伤, 而 p-PERK、CHOP 蛋白的活化表达在慢性间歇低氧大鼠肺组织的损伤中可能存在一定的作用。

关键词: 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征; 慢性间歇低氧; 磷酸化蛋白激酶样内质网激酶; C/EBP 同源蛋白; 肺损伤

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

Expression and significance of p-PERK and CHOP protein in lung tissue of rats in chronic intermittent hypoxia*

Jia-bin Zhang, Pan-pan Zhang, Hong-yang Wang, Yu-le Kou, Ling Wang
(Department of Respiratory Diseases, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK) and CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) homology protein (CHOP) expression in lung tissue of rats with chronic intermittent hypoxia (CIH). **Methods** Wistar rats were selected to produce a sleep rat model with chronic intermittent hypoxia. Sixty rats were randomly divided into normal group (UC) and CIH group; and each group was separated into 3-d, 7-d, 14-d and 21-d and 28-d five subgroups. HE method was used to observe the pathological changes of the rat lung tissue in the control and model groups. Immunohistochemical method was used to detect the p-PERK and CHOP expressions and their correlation was analyzed. RT-PCR was adopted for detection of CHOP mRNA expression in the rat lung tissue of the two groups. **Results** In the CIH group, there were mild edema and a small amount of inflammatory cell infiltration in the alveolar walls and interstitium, alveolar structure disorder, and partial alveolar fusion; while there were no obvious pathological changes of rat lung tissue in the UC group. The expressions of p-PERK and CHOP in the CIH group was higher than those in the UC group, the expression levels on the 21st d were the highest. The expression of CHOP mRNA in the lung tissue of the CIH group was higher than that

收稿日期: 2015-08-12

* 基金项目: 河北省自然科学基金 (No: H2014209231)

[通信作者] 王红阳, E-mail: tsmywhy@163.com; Tel: 15383056835

in the lung tissue of the UC group, which was the highest on the 21st d. The up-regulated p-PERK and CHOP expressions were in a positive correlation. **Conclusions** Chronic intermittent hypoxia can cause lung injury; and the up-regulated expressions of p-PERK and CHOP may play certain roles in the injury of lung tissue in rats with chronic intermittent hypoxia.

Keywords: obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; chronic intermittent hypoxia; phosphorylated protein kinase-like ER kinase; CCAAT enhancer binding protein (C/EBP); lung tissue

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)是以反复发生的低氧/复氧过程为特征的睡眠障碍性疾病^[1],使人体在睡眠过程中处于慢性间歇低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)状态,目前已知这种特殊模式的低氧可对人体的多个系统造成损害,如心脑血管疾病、认知功能障碍、内分泌系统疾病及肝损害等^[2-3]。而缺氧是诱导内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress response, ERS)的重要外界因素之一^[4]。磷酸化的蛋白激酶 R 样内质网激酶(phosphorylated protein kinase like ER kinase, p-PERK)、CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP)是参与 ERS 的重要因子,当 ERS 持续存在时细胞外受体激酶磷酸与葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)解离,发生自身联合,自身磷酸化而激活,p-PERK 磷酸化真核翻译起始因子重组人真核起始因子 2- α (eukaryotic initiation factor 2- α , eIF2 α),继而选择性地增加活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)mRNA 的表达,最终上调促凋亡因子 CHOP 的表达,导致细胞凋亡^[5]。本课题通过建立 CIH 大鼠模型,模拟 OSAHS 患者睡眠过程中的低氧状态,探讨 ERS 相关因子 p-PERK、CHOP 在 CIH 大鼠肺组织的表达变化,阐述 p-PERK、CHOP 蛋白的表达在 CIH 大鼠肺损伤发生过程中的作用,为临床治疗及预防 OSAHS 患者肺组织损伤提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 慢性间歇低氧模型的建立及分组

采用随机数字表法将 60 只 Wistar 大鼠随机分成正常组(UC 组)、CIH 组。每日于相同时间,将 CIH 组大鼠置于有机玻璃饲养箱内,首先,给予氮气 30 s(氧浓度低至 5%),流速压力为 0.15 MPa;其次,注入空气 40 s(恢复氧浓度至 21%),流速压力控制在 0.8 MPa;再次,继续注入空气 50 s(氧浓度维持在 21%),流速压力 0.8 MPa,使低氧箱内氧浓度在 5%~21%间形成周期交替,每 120 s 为 1 个循环周期,造成

间歇低氧条件。将 UC 组大鼠每日于相同时间置于与 5%CIH 组相同的有机玻璃饲养箱内,持续注入空气 120 s,流速压力为 0.8 MPa,氧气浓度维持在 21%。两组大鼠生活条件及饲养条件相同。两组分别在建立模型的 3、7、14、21 和 28 d 随机选取 6 只大鼠处死备用。

1.2 方法

各组大鼠以 10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉后,开胸暴露心脏和双肺。室温肝素生理盐水经左升主动脉将心脏血液快速冲洗干净,取出双肺,再次用生理盐水冲洗 2 遍后,将左侧肺浸入 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片,用于 HE 染色及免疫组织化学法染色;将右侧肺组织置入 -80℃冰箱冷冻保存,用于逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 CHOP mRNA。

1.3 病理形态观察

4%多聚甲醛固定肺组织,常规石蜡包埋、切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,光镜下观察病理形态变化。

1.4 免疫组织化学法检测各组肺组织 p-PERK、CHOP 蛋白的表达

分别于 3、7、14、21 和 28 d 的两组大鼠中随机抽取 2 张切片,经 3%过氧化氢溶液浸润 10 min 去除内源性过氧化物酶,按照免疫组织化学法试剂盒说明书进行操作。运用 Motic 医学图像分析系统对结果进行分析,以每张切片的积分光密度值(integral optical density, IOD)代表蛋白相对表达水平,每张切片在 $\times 200$ 镜下随机选取 5 个视野,检测 IOD 值,取平均值作为样本。

1.5 RT-PCR 法检测 CHOP mRNA 的表达

CHOP 基因引物序列的设计与合成由上海生物工程技术有限公司完成。于冰上取冻存的右侧肺组织,每份样本约 30 mg,严格按照 RNA 提取试剂盒(日本 TaKaRa 公司)提取 mRNA,并检测其浓度,将提取的

RNA 进行琼脂糖凝胶电泳判断所提取的 RNA 有无降解,根据逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)合成 cDNA,再按照扩增试剂盒(TaKaRa)操作步骤进行扩增,CHOP cDNA 正反向引物各取 $0.4 \mu\text{l}$ (其中正向引物为:5'-CTTCTCTGGCTTGGCTGACT-3',反向引物为:5'-TCCCTTGGTCTTCCTCCTCT-3'),之后一次添加产物片段,cDNA 模板 $2.0 \mu\text{l}$ 、ROX1 $0.4 \mu\text{l}$ 以及荧光(避光) $10 \mu\text{l}$,将以上混合物按照以下条件进行扩增:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 31 s,共 40 个循环。分别得到扩增曲线、熔解曲线及待测样本表达量,应用 Rotor-Gene 3000 分析软件判断熔解曲线特异性及扩增曲线是否为阳性;采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 相对定量分析法计算两组 CHOP mRNA 的相对含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,若方差齐则用两两比较 t 检验,用 Pearson 相关性分析法分析 p-PERK 与 CHOP 表达的关系, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

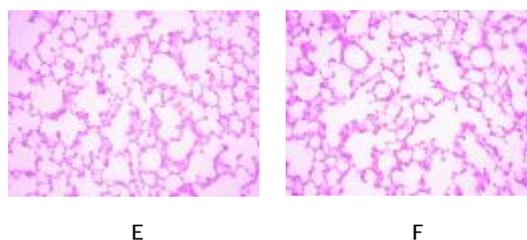
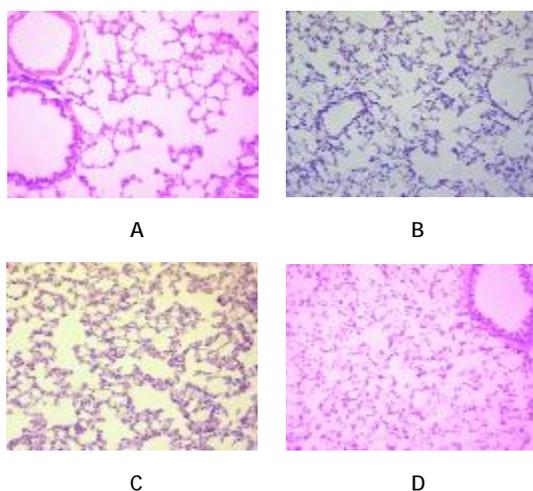
2 结果

2.1 两组大鼠肺组织病理形态的变化

CIH 组大鼠肺组织水肿,肺泡间隔增宽,部分肺泡融合成较大的含气囊腔,肺泡腔可见出血和蛋白渗出物,毛细血管床可见炎症细胞浸润;与 CIH 组比较,UC 组无明显病理变化。实验结果说明慢性低氧环境可造成大鼠肺组织损伤。见图 1。

2.2 免疫组织化学法检测两组大鼠肺组织 p-PERK、CHOP 蛋白表达的变化

光学显微镜下观察阳性细胞,阳性细胞胞浆呈棕黄色或浅黄色。UC 组仅见少量散在阳性表达,CIH



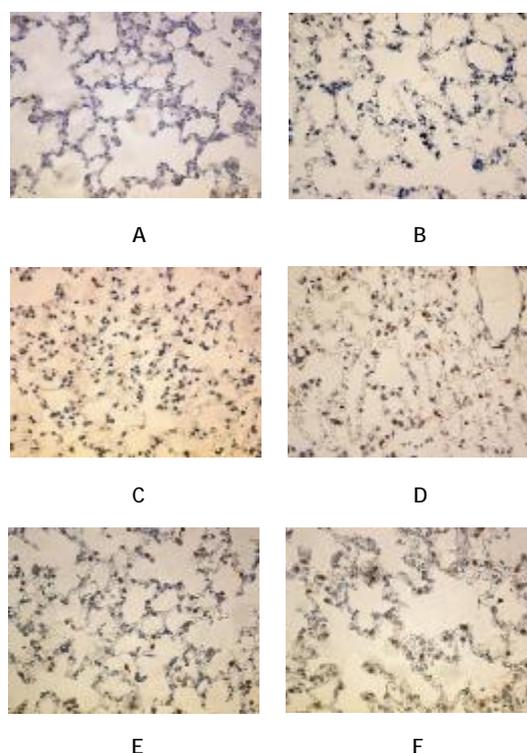
A: UC 组肺组织;B: CIH 组 3 d 肺组织;C: CIH 组 7 d 肺组织;D: CIH 组 14 d 肺组织;E: CIH 组 21 d 肺组织;F: CIH 组 28 d 肺组织

图 1 大鼠肺组织病理形态 (HE $\times 200$)

组阳性细胞表达明显增多,主要集中在肺泡上皮细胞。UC 组各时间亚组 p-PERK、CHOP 蛋白的表达未见明显差异;与 UC 组比较,CIH 组各时间点 p-PERK、CHOP 蛋白表达 IOD 值均高于 UC 组($P < 0.05$)。p-PERK、CHOP 蛋白表达 IOD 值均随间歇低氧时间延长呈逐渐上升趋势,其中 p-PERK 蛋白表达 28 d 最高,而 CHOP 蛋白表达 21 d 最高,21 与 28 d 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果说明,慢性间歇低氧环境可使大鼠肺组织 p-PERK、CHOP 蛋白表达升高。见图 2、3 和表 1、2。

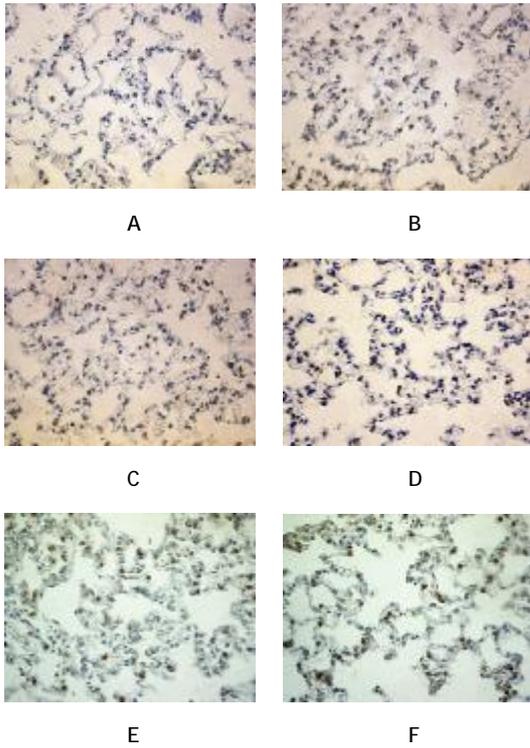
2.3 RT-PCR 法检测 CHOP mRNA 表达的变化

UC 组各时间亚组 CHOP mRNA 的表达未见明显



A: UC 组;B: CIH 组 3 d;C: CIH 组 7 d;D: CIH 组 14 d;E: CIH 组 21 d;F: CIH 组 28 d

图 2 大鼠肺组织 p-PERK 表达 (免疫组织化学法 $\times 200$)



A:UC 组;B:CIH 组 3 d;C:CIH 组 7 d;D:CIH 组 14 d;E:CIH 组 21 d;F:CIH 组 28 d

图 3 大鼠肺组织 CHOP 表达 (免疫组织化学法 × 200)

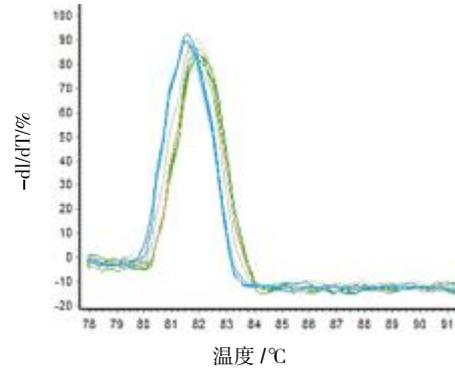
表 1 UC 组与 CIH 组 p-PERK 蛋白表达 IOD 值比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
UC 组	11.36 ± 0.51	11.41 ± 0.39	11.50 ± 0.70	11.27 ± 0.5	11.23 ± 0.42
CIH 组	14.94 ± 0.48	30.19 ± 6.51	45.80 ± 6.14	61.85 ± 2.23	66.19 ± 7.40
F 值	25.374	96.215	207.326	278.175	269.873
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

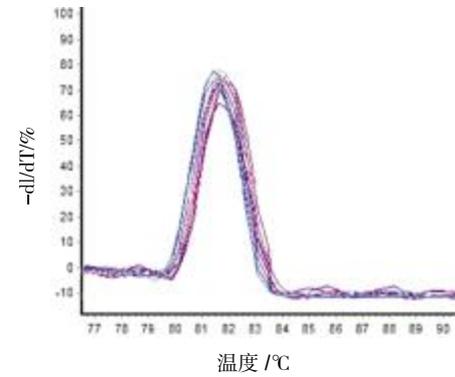
表 2 UC 组与 CIH 组 CHOP 蛋白表达 IOD 值比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
UC 组	8.77 ± 0.61	8.83 ± 0.65	8.74 ± 0.48	8.53 ± 0.48	8.94 ± 0.52
CIH 组	11.71 ± 0.62	25.86 ± 1.99	41.93 ± 3.38	62.89 ± 9.22	62.29 ± 5.54
F 值	36.867	72.615	102.722	285.267	236.783
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

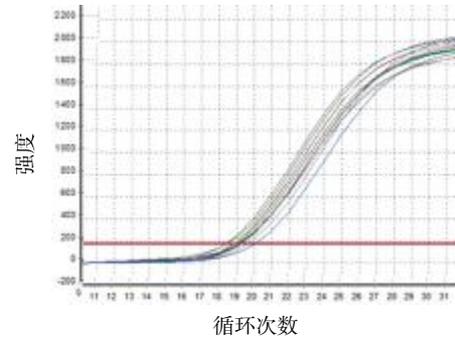
变化;与 UC 组比较,CIH 组各时间点 CHOP mRNA 的表达增强 ($P < 0.05$),且 CHOP mRNA 的表达随慢性间歇低氧时间的延长呈逐渐增强趋势,于 21 d 表达最高,21 与 28 d 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果说明慢性间歇低氧可使大鼠肺组织 CHOP mRNA 的表达升高。见图 4 和表 3。



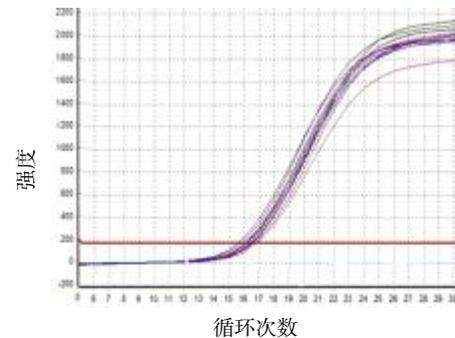
A



B



C



D

A:CHOP mRNA 熔解曲线;B:GADPH 熔解曲线;C:CHOP mRNA 扩增曲线;D:GADPH 扩增曲线

图 4 大鼠肺组织 CHOP mRNA 表达

表 3 UC 组与 CIH 组 CHOP mRNA 表达水平比较

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
UC 组	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.04
CIH 组	0.18 ± 0.01	0.27 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.07
F 值	23.578	87.564	184.226	296.366	269.788
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 大鼠肺组织 p-PERK 蛋白与 CHOP 表达的相关性分析

模型组大鼠肺组织 p-PERK 与 CHOP 蛋白表达 IOD 值呈正相关($r=0.937, P=0.000$)。

3 讨论

OSAHS 是呼吸科常见的睡眠障碍性疾病,有近 4% 的人受其影响,有着较高的发病率及死亡率。研究证实,OSAHS 增加了神经认知性疾病、代谢性疾病及心血管疾病的发生风险^[6-7]。关于 OSAHS 对肺组织影响的研究甚少,CIH 为 OSAHS 独特的病理生理改变,通过建立 CIH 模型,模拟 OSAHS 患者睡眠过程中的低氧状态,探讨 OSAHS 对肺组织的影响,实验结果显示,CIH 组大鼠肺泡壁间隔增宽,部分肺泡结构破坏、融合,间质充血、水肿,同时伴有少量炎症细胞浸润,说明 CIH 这种独特的低氧模式可引起大鼠肺组织损伤。

内质网是细胞代谢和蛋白折叠、修饰及转运的中心场所,当细胞遭受缺氧、能量耗竭、钙超载等外界刺激时,可诱导 ERS 的发生^[8-10]。ERS 参与多种疾病的发生、发展过程,如神经退行性疾病、多发性硬化症及糖尿病等^[11-12],目前其机制研究认为,ERS 状态下,大量未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网腔内堆积,激活下游信号通路,引起一系列的偶联反应来应对内质网应激反应,该反应统称为未折叠蛋白反应(unfold protein response,UPR)^[13]。ERS 持续存在时,UPR 不能缓解内质网应激状态,UPR 中一些促凋亡信号通路被激活,分别为 PERK、活化转录因子 6、人 X 盒结合蛋白 13 条信号通路,该 3 条信号通路均可激活 CHOP 蛋白,从而诱导细胞凋亡^[14-16]。然而目前关于 ERS 对 CIH 大鼠肺组织的影响研究较少。

PERK 通路是 UPR 中最先被激活也是最主要的信号通路。PERK 可诱导胰岛 B 细胞凋亡、加重神经元损伤、加重缺血再灌注损伤等^[17-18]。免疫组织化学法

结果提示随间歇低氧时间的延长,p-PERK、CHOP 蛋白在肺组织的表达均呈现逐渐升高趋势,且两者的升高趋势一致,分别在 28 d 组和 21 d 组表达最多,21 与 28 d 组比较表达无明显变化;同时 RT-PCR 结果显示 CHOP mRNA 表达随间歇低氧时间的延长表达逐渐升高,在 21 d 组表达最高,与 28 d 组比较表达无明显变化。实验结果说明,CIH 这种特殊的低氧模式可能诱导 ERS 的发生,而 p-PERK、CHOP 蛋白的表达趋势呈正相关,进一步说明 CIH 大鼠肺组织损伤可能与 ERS 激活 PERK 通路,诱导 CHOP 蛋白高表达,从而介导细胞凋亡有相关性。

综上所述,慢性间歇低氧可以引起肺组织损伤,而内质网应激反应相关因子 p-PERK、CHOP 可能参与慢性间歇低氧肺组织的损伤过程,为临床预防及治疗慢性间歇低氧造成的肺损伤提供靶点,同时也为诊治 OSAHS 患者继发的肺部疾病提供实验基础。

参 考 文 献:

- [1] JULIAN G S, OLIVEIRA D E, FAVARO V M, et al. Chronic intermittent hypoxia increases encoding pigment epithelium-derived factor gene expression, although not that of the protein itself, in the temporal cortex of rats[J]. J Bras Pneumol, 2015, 41(1): 39-47.
- [2] 王玲, 张盼盼, 王红阳, 等. 线粒体自噬对间歇低氧早期大鼠认知功能影响的初探[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(11): 840-844.
- [3] 刘志娟, 郝青林. 氧化应激在 OSAHS 合并代谢综合征作用机制研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16: 1437.
- [4] 王琪, 段冷昕. 内质网应激中 GRP78 和 ATF4-CHOP-Puma 信号通路及帕金森病的关系及其治疗靶点的研究进展[J]. 神经药理学报, 2013, 3(3): 20.
- [5] KAPOOR A, SANYAL A J. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response[J]. Clin Liver Dis, 2009, 13(4): 581-590.
- [6] PASCHETTA E, BELIC P, ALISI A, et al. OSAS-related inflammatory mechanisms of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 1-10.
- [7] DEWAN N A, NIETO F J, SOMERS V K. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities[J]. Chest, 2015, 147(1): 266-274.
- [8] LUO K, CAO S S. Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterol Res Pract, 2015, 2015: 328791. DOI: 10.1155/2015/328791.
- [9] ULIANICH L, INSABATO L. Endoplasmic reticulum stress in endometrial cancer[J]. Front Med (Lausanne), 2014, 1: 55.

- [10] 刘蜜,刘秀华.内质网应激与心血管疾病[J].国际病理科学与临床杂志,2011,31(4):305-309.
- [11] YANG E S, BAE J Y, KIM T H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress response in orofacial inflammatory pain [J]. *Exp Neurobiol*, 2014, 23(4): 372-380.
- [12] HUANG L, XIE H, LIU H. Endoplasmic reticulum stress, diabetes mellitus, and tissue injury[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2014, 15(8): 812-818.
- [13] JUNG E J, AVLIYAKULOV N K, BOONTHEUNG P, et al. Pro-oxidative DEP chemicals induce heat shock proteins and an unfolding protein response in a bronchial epithelial cell line as determined by DIGE analysis[J]. *Proteomics*, 2007, 7(21): 3906-3918.
- [14] 刘宝琴,王华芹.内质网应激与未折叠蛋白反应的研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2010,17(11):869-872.
- [15] UZI D, BARDA L, SCAIEWICZ V, et al. Endoplasmic reticulum (Er) stress and the unfolded protein response (Upr) are major regulators of acetaminophen (Apop)-induced hepatotoxicity [J]. *Hepatology*, 2011, 59(3): 495-503.
- [16] LI G, MONGILLO M, THORP E, et al. UPR-induced macrophage apoptosis involves a novel CHOP-ER oxidase-calcium/Ca MK II -ROS pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2008. 28(6): E52-E53.
- [17] WANG C, CUAN Y, YANG J. Cytokines in the progression of pancreatic-cell dysfunction[J]. *Int J Endocriol*, 2010, 10: 136.
- [18] 宋洋,袁宜勤,郁洁.内质网应激 PERK 凋亡通路研究进展[J].中华中医药学刊,2013,31(5):1009-1011.

(申海菊 编辑)