

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.002>

## 急性肺损伤小鼠肺内热休克蛋白A12B的表达

董良, 刘富兵, 陈永琴

(遵义医学院附属医院麻醉科, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** 目的: 观察急性肺损伤(acute lung injury, ALI)小鼠肺内热休克蛋白A12B(heat shock protein A12B, HSPA12B)的表达改变, 以及脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对血管内皮细胞HSPA12B表达的影响。方法: 采用气管注射LPS(5 mg/kg)复制小鼠ALI动物模型, 6 h后取小鼠肺组织, 采用real-time PCR和Western印迹检测肺组织内HSPA12B mRNA和蛋白表达。体外研究采用LPS(1  $\mu$ g/mL)诱导人脐静脉内皮细胞炎症反应, real-time PCR和Western印迹检测细胞HSPA12B mRNA和蛋白表达, 采用NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂PDTC观察LPS诱导HSPA12B表达的可能分子机制。结果: 与正常组相比, LPS诱导的ALI小鼠肺组织HSPA12B mRNA和蛋白含量显著增加, 同时LPS可时间依赖性地上调人脐静脉内皮细胞HSPA12B mRNA和蛋白表达, 而PDTC预处理可部分逆转LPS诱导的HSPA12B mRNA和蛋白上调。结论: ALI小鼠肺内HSPA12B的表达增加, 其机制可能与LPS激活NF- $\kappa$ B信号通路有关。

**[关键词]** 急性肺损伤; 热休克蛋白A12B; 脂多糖; 脐静脉内皮细胞; 小鼠

## Expression of HSPA12B in lung of acute lung injury mice

DONG Liang, LIU Fubing, CHEN Yongqin

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000, China)

**Abstract** **Objective:** To observe the expression of heat shock protein A12B (HSPA12B) in lungs of acute lung injury (ALI) mice and the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of HSPA12B in vascular endothelial cells. **Methods:** Mouse was injected with LPS (5 mg/kg), and lung tissue was taken at 6 h. The expression of HSPA12B mRNA and protein in lung tissue was detected by real-time PCR and Western blot. In vitro, human umbilical vein endothelial cells were stimulated by LPS (1  $\mu$ g/mL). Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression of HSPA12B mRNA and protein. NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibitor PDTC was used to observe the possible molecular mechanisms of LPS-induced HSPA12B expression. **Results:** Compared with the normal group, the expression of HSPA12B mRNA and protein in LPS-induced lung tissue of ALI mice were significantly increased. The expression of HSPA12B mRNA and protein in human umbilical vein endothelial cells were up-regulated in a time-dependent manner. NF- $\kappa$ B inhibitor (PDTC) pretreatment reversed the LPS-induced

收稿日期 (Date of reception): 2017-05-31

通信作者 (Corresponding author): 董良, Email: donglqqsx2008@163.com

基金项目 (Foundation item): 遵义医学院附属医院博士启动基金 (201703); 遵义医学院大学生创新创业训练计划项目 (20162312)。This work was supported by Scientific Research Foundation for Doctor of Zunyi Medical College (201703); Student's Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program of Zunyi Medical College (20162312), China.

HSPA12B mRNA and protein upregulation. **Conclusion:** The expression of HSPA12B in lung of ALI mice increases, and its mechanism is related to the activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Keywords** acute lung injury; heat shock protein A12B; lipopolysaccharide; umbilical vein endothelial cells; mouse

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)时肺内失控的炎症反应是其病理特征之一<sup>[1]</sup>。已知ALI时肺内的主要致炎因子有TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8和高迁移率簇蛋白1等,参与肺内炎症级联放大反应<sup>[2]</sup>。肺内亦存在抑炎因子,如IL-10等<sup>[3]</sup>,在生理情况下精细调节肺内炎症反应,维持肺内稳态。深入阐明肺内抗炎机制有助于描述ALI时肺内炎症反应网络图,具有重要意义。近年来,一个特异性表达血管内皮细胞的抗炎HSPA12B引起广泛关注。HSPA12B可负性调控LPS诱导的心肌细胞血管内皮细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)/细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和白细胞浸润,进而减轻心肌功能紊乱<sup>[4]</sup>。HSPA12B亦可抑制LPS诱导的脐静脉内皮细胞的炎症反应,机制与激活PI3K/Akt信号通路有关<sup>[5]</sup>。最新研究<sup>[6]</sup>表明HSPA12B过表达小鼠可减轻内毒素小鼠的ALI,另有研究<sup>[7]</sup>发现HSPA12B可能是通过抑制ERK磷酸化和caspase-3的活性,最终减轻脓毒症诱导的小鼠ALI。提示HSPA12B是ALI时肺内的新型抗炎机制。已知LPS可通过活化MAPK通路上调小神经胶质细胞中HSPA12B的表达<sup>[8]</sup>,提示HSPA12B可能是机体对抗炎症反应的适应性机制。但是ALI时肺组织和肺血管内皮细胞HSPA12B表达模式尚未见相关报道。因此,本研究旨在从整体和细胞水平观察LPS诱导的ALI小鼠肺内HSPA12B的表达模式,为进一步阐明ALI时肺内炎症反应网络提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及其处理

健康成年雄性BABL/c小鼠(18~22 g)购自中南大学动物学部。适应性喂养1周后,随机分为对照组和ALI组(每组8只)。麻醉后,ALI组小鼠以气管一次性注射LPS(O111:B4, 5 mg/kg)复制ALI小鼠模型,对照组气管注射等体积的生理盐水。6 h后处死小鼠,取肺组织液氮速冻后保存于-80 °C,用于后续组织总RNA和蛋白提取。

### 1.2 细胞培养及处理

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein

endothelial cells, HUVEC)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。HUVEC加入含10%FBS的RPMI 1640培养基,培养于含5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中。细胞接种于6孔或12孔板(美国Corning公司)中,分为对照组和LPS组,LPS组采用LPS(1  $\mu$ g/mL)处理后不同时间点(6, 12, 24 h)收集细胞,用于细胞总RNA和蛋白提取。观察HSPA12B表达调控机制时,NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂PDTC(10  $\mu$ mol/L)预处理细胞30 min后,再用LPS刺激。

### 1.3 总 RNA 提取及 real-time PCR 检测 mRNA 表达

肺组织用液氮研磨至粉后,加入1 mL TRIzol(美国Invitrogen公司)充分裂解;12孔板中的细胞用PBS洗2次后,加1 mL TRIzol裂解。随后采用酚氯仿法提取总RNA,经多功能酶标仪测定其浓度,取1  $\mu$ g总RNA进行反转录(日本Takara公司)合成cDNA。以GAPDH为内参,采用SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(日本Takara公司)试剂检测小鼠肺组织和细胞中HSPA12B的mRNA表达。特异性引物序列见表1。

### 1.4 Western 印迹检测 HSPA12B 蛋白表达

肺组织和细胞采用RIPA(上海碧云天生物技术有限公司)充分裂解,10 000 r/min离心30 min后,取5  $\mu$ L上清液用BCA进行总蛋白浓度测定,其余上清加缓冲液后100 °C煮沸变性。取40  $\mu$ g总蛋白用SDS-PAGE胶电泳,转至PVDF膜后,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,特异性一抗4 °C孵育过夜(HSPA12B:武汉三鹰生物技术有限公司19016-1-AP, 1:1 000; GAPDH:武汉三鹰生物技术有限公司10494-1-AP, 1:3 000)。次日用TBST洗3次后,室温孵育二抗(武汉三鹰生物技术有限公司SA00001-1, 1:5 000)2 h,清洗未结合抗体后,用化学发光法检测蛋白含量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS18.0进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间均数采用两独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用SNK- $q$ 检测。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Sequence of primer used in this study

基因名称	种属	序列号 (5'-3')	产物大小 /bp
HSPA12B	小鼠	上游: AGCTTTGCTAGTGACCCTGAG 下游: GCAGTGTAGCCAAAACCTGTGA	137
GAPDH	小鼠	上游: AGCTTCGGCACATAITTCATCTG 下游: CGTTCACCTCCCATGACAAACA	89
HSPA12B	人	上游: GGGGATGCTCCGAATGTCTTG 下游: CGCCCACTAGGAACAGCAG	134
GAPDH	人	上游: TGTGGGCATCAATGGATTGG 下游: ACACCATGTATCCGGGTCAAT	116

## 2 结果

### 2.1 ALI 小鼠肺组织 HSPA12B mRNA 和蛋白表达改变

与正常组相比, ALI小鼠肺组织HSPA12B mRNA表达显著增加, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ , 表2)。Western印迹检测结果显示: ALI小鼠肺组织HSPA12B蛋白表达亦显著增加, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图1, 表2)。提示ALI小鼠肺组织HSPA12B适应性表达增加。

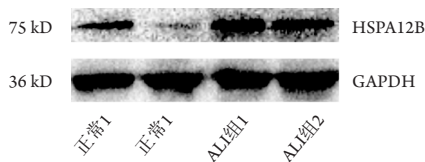


图1 Western印迹检测各组小鼠肺组织HSPA12B蛋白表达  
Figure 1 Expression of HSPA12B in lung tissue of mice detected by Western blot

表 2 各组小鼠肺组织 HSPA12B mRNA 和蛋白表达 ( $n=12$ )  
Table 2 Expression of HSPA12B mRNA and protein in lung tissue of mice ( $n=12$ )

分组	HSPA12B mRNA	HSPA12B 蛋白
正常组	1.013 ± 0.085	0.322 ± 0.047
ALI 组	4.215 ± 0.911**	1.657 ± 0.316**

与对照组相比, \*\* $P<0.01$ 。

Compared with the control group, \*\* $P<0.01$ .

### 2.2 LPS 对 HUVEC 中 HSPA12B 表达的影响

Real-time PCR结果显示: 与正常组相比, LPS诱导6 h后, HUVEC中HSPA12B mRNA表达即显著性升高, 12 h时达峰值( $P<0.01$ , 表3)。Western印

迹检测结果显示LPS处理后可呈时间依赖性上调HUVEC中HSPA12B蛋白表达, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ; 图2, 表3)。

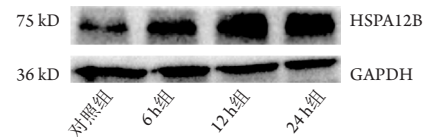


图2 Western印迹检测LPS对HUVEC中HSPA12B蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of LPS on the expression of HSPA12B in HUVEC detected by Western blot

表 3 LPS 对 HUVEC 中 HSPA12B mRNA 和蛋白表达的影响 ( $n=6$ )

Table 3 Effect of LPS on the expression of HSPA12B mRNA and protein in HUVEC ( $n=6$ )

组别	HSPA12B mRNA	HSPA12B 蛋白
正常组	0.995 ± 0.058	0.218 ± 0.033
6 h 组	1.862 ± 0.326*	0.531 ± 0.076*
12 h 组	4.217 ± 0.816** <sup>#</sup>	3.576 ± 0.634** <sup>#</sup>
24 h 组	4.533 ± 1.051** <sup>#</sup>	4.194 ± 0.627** <sup>#</sup>

与正常组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与6 h组相比, \* $P<0.05$ ; 与12 h组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ 。

Compared with the control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; compared with the 6 h group, \* $P<0.05$ ; compared with the 12 h group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

### 2.3 PDTC 对 LPS 诱导 HUVEC 表达 HSPA12B 的影响

为初步探讨LPS诱导HUVEC中HSPA12B表达的机制, 采用PDTC预处理细胞, 发现与LPS组相

比, PDTC组HSPA12B mRNA和蛋白表达均显著降低(图3, 表4,  $P < 0.01$ )。

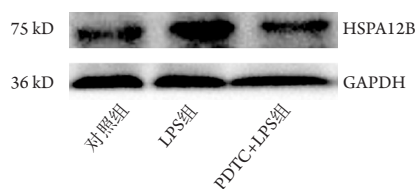


图3 Western印迹检测PDTC对LPS应激HUVEC中HSPA12B蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of PDTC on the HSPA12B protein expression induced by LPS in HUVEC detected by Western blot

表4 PDTC对LPS应激HUVEC中HSPA12B mRNA和蛋白表达的影响 ( $n=6$ )

Table 4 Effect of PDTC on the HSPA12B mRNA and protein expression induced by LPS in HUVEC ( $n=6$ )

组别	HSPA12B mRNA	HSPA12B 蛋白
对照组	1.024 ± 0.033	0.306 ± 0.048
LPS 组	3.627 ± 0.438**	1.573 ± 0.361**
PDTC+LPS 组	1.311 ± 0.028**	0.426 ± 0.364**

与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the LPS group, \*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

ALI/ARDS是重症监护病房导致患者死亡的主要原因之一, 其病死率依然高达40%左右<sup>[1]</sup>。目前大多数研究从抑制促炎因子的角度出发, 探讨ALI的发病机制和治疗策略, 对于肺组织内源性抗炎机制的研究相对较少。在近期研究的基础上, 本研究首次探讨LPS诱导的小鼠ALI动物模型肺内和血管内皮细胞中新型抗炎蛋白HSPA12B的表达, 发现HSPA12B可响应LPS刺激, 适应性表达增加, 呈时间依赖性。机制上, 本研究首次报道LPS诱导HUVEC适应性表达HSPA12B可能与激活NF- $\kappa$ B信号通路有关。

ALI时肺组织内促炎因子爆炸式表达增加, 可参与机体的免疫防御反应, 清除入侵的病原菌。但过度炎症反应亦可导致组织细胞损伤。因此, 机体存在相应的保护措施, 如IL-10具有抑制免疫反应的作用, 参与免疫反应的精细调控<sup>[3]</sup>。一直以来, 研究者认为IL-6是促炎因子, 但最新研究<sup>[9]</sup>表明IL-6可减轻病毒感染诱导的ALI, 呈现保护作用。

此外, 近来研究提示特异性表达于血管内皮细胞的HSPA12B具有抗炎特性, 可对抗心肌损伤<sup>[8]</sup>和改善血管通透性和炎症反应等<sup>[5]</sup>; 并且HSPA12B过表达可减轻脓毒症相关的ALI<sup>[4]</sup>, 其机制与改善ALI时肺血管通透性有关<sup>[7]</sup>。已知肺血管通透性改变是ALI时炎症反应的始动环节<sup>[10]</sup>, 导致肺水肿和肺换气功能障碍。特异性表达于血管内皮细胞的HSPA12B通过减轻内皮细胞损伤改善血管通透性, 最终减轻ALI。因此, 研究HSPA12B对ALI的保护作用有助阐明肺内抗炎机制, 具有重要意义。

本研究首次从整体动物水平和细胞水平探讨LPS刺激下HSPA12B的表达情况, 发现LPS诱导的ALI发生6 h后即可检测出显著增加的HSPA12B。但HSPA12B是否仅表达于血管内皮细胞尚不能明确, 这需要采用血管内皮细胞特异性表达分子CD31<sup>[11]</sup>和HSPA12B进行肺组织切片免疫双荧光检测。已知LPS与其受体TLR4结合后, 可通过MyD88依赖性和非依赖性途径激活NF- $\kappa$ B信号通路, 激发胞内促炎反应, 上调TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等促炎因子的表达<sup>[12]</sup>。本研究证实LPS亦可能通过激活NF- $\kappa$ B信号通路上调抗炎蛋白HSPA12B的表达, 后者为肺内源性保护蛋白。提示ALI时肺内促炎反应和抗炎反应并存, 当平衡紊乱时诱发组织细胞损伤。虽然PDTC是常用的NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂, 可仍具有抗氧化等功能, 若采用多种NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂(如BAY11-8072), 或采用Western印迹检测I- $\kappa$ B或p65核转位, NF- $\kappa$ B信号通路在LPS诱导HUVEC表达HSPA12B的作用更为明确。此外, 已有研究<sup>[8]</sup>显示LPS可通过MAPK信号通路上调小神经胶质细胞HSPA12B的表达, 表明NF- $\kappa$ B信号通路并非唯一调控HSPA12B的分子机制之一。本研究下一步将以原代大鼠肺血管内皮细胞为研究对象, 深入探讨LPS诱导内源性血管保护因子HSPA12B表达的分子机制。

本研究采用人脐静脉内皮细胞作为体外研究的对象, 其原因是人脐静脉内皮细胞与肺血管内皮细胞在胚胎发育过程中来源一致, 对于某些反应具有较好的一致性。不少研究者亦采用人脐静脉内皮细胞作为肺部疾病的靶细胞研究对象, 如非小细胞肺癌上皮间质转化和血管新生机制研究<sup>[13]</sup>, 以及Lewis肺癌细胞血道转移的分子机制探讨等<sup>[14]</sup>。以上提示采用人脐静脉内皮研究LPS应激下HSPA12B的表达模式及其分子机制可一定程度上反映肺内血管内皮细胞的生物学现象。但本研究的后续工作将以大鼠原代肺血管内皮细胞为对象, 深入探讨LPS对其HSPA12B表达的影响和分子机制。

综上所述, 本研究首次从整体水平和细胞水平观察ALI时小鼠肺内抗炎蛋白HSPA12B的表达模型, 其机制可能与LPS激活NF- $\kappa$ B信号通路有关, 提出HSPA12B是ALI时机体内源性保护因子。

## 参考文献

1. Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800.
2. Mokra D, Kosutova P. Biomarkers in acute lung injury[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2015, 209: 52-58.
3. Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, et al. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury[J]. J Immunol, 2014, 192(6): 2800-2811.
4. Zhou H, Qian J, Li C, et al. Attenuation of cardiac dysfunction by HSPA12B in endotoxin-induced sepsis in mice through a PI3K-dependent mechanism[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 109-118.
5. Wu J, Li X, Huang L, et al. HSPA12B inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(3): 544-554.
6. Zhang X, Li J, Li C, et al. HSPA12B attenuates acute lung injury during endotoxemia in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 599-606.
7. Chen Y, Wang L, Kang Q, et al. Heat shock protein A12B protects vascular endothelial cells against sepsis-induced acute lung injury in mice[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1): 156-168.
8. Cui Z, Wang P, Sun L, et al. Lipopolysaccharide-evoked HSPA12B expression by activation of MAPK cascade in microglial cells of the spinal cord[J]. J Neurol Sci, 2010, 294(1/2): 29-37.
9. Yang ML, Wang CT, Yang SJ, et al. IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43829.
10. Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury[J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(Suppl 1): S3-S8.
11. Vanchinathan V, Mirzamani N, Kantipudi R, et al. The vascular marker CD31 also highlights histiocytes and histiocyte-like cells within cutaneous tumors[J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143(2): 177-185.
12. Lee HJ, Shin JS, Lee WS, et al. Chikusetsusaponin IVa methyl ester isolated from the roots of achyranthes japonica suppresses LPS-induced iNOS, TNF-alpha, IL-6, and IL-1beta expression by NF-kappaB and AP-1 inactivation[J]. Biol Pharm Bull, 2016, 39(5): 657-664.
13. Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, et al. MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 18247-18261.
14. Yao H, Shi W, Wu J, et al. Endothelial Rac1 is essential for hematogenous metastasis to the lung[J]. Oncotarget, 2015, 6(19): 17501-17513.

本文引用: 董良, 刘富兵, 陈永琴. 急性肺损伤小鼠肺内热休克蛋白A12B的表达[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(8): 1560-1564. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.002

**Cite this article as:** DONG Liang, LIU Fubing, CHEN Yongqin. Expression of HSPA12B in lung of acute lung injury mice[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(8): 1560-1564. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.002