

不同病情 BPD 大鼠的 SIRT1/PGC-1 α 和 TGF- β 1-Smad2 通路激活状态分析

彭可昕¹ 黄巍¹ 应瀚霆¹ 李细珍² 刘梅¹(通讯作者)

(1 长沙医学院 湖南长沙 410219 2 长沙市中医医院 湖南长沙 410002)

摘要: 目的 分析不同病情支气管肺发育不良 (Bronchopulmonary dysplasia, BPD) 大鼠 SIRT1/PGC-1 α 和 TGF- β 1-Smad2 信号通路的激活状态特征。方法 取 50 只 BPD 模型大鼠的支气管组织, 比较不同病情 (轻度、中度、重度) 大鼠组织中 SIRT1/PGC-1 α 信号通路 (包括 SIRT1、PGC1 α 、TFAM) 和 TGF- β 1-Smad2 信号通路 (包括 TGF- β 1、Smad2、NLRP3) 有关蛋白的相对蛋白表达含量的统计学差异。结果 BPD 重度组大鼠支气管组织中 SIRT1、PGC1 α 、TFAM 蛋白表达含量低于轻度组或中度组 ($P<0.05$); BPD 重度组大鼠支气管组织中 TGF- β 1、Smad2、NLRP3 蛋白表达含量高于轻度组或中度组 ($P<0.05$)。结论 BPD 大鼠 SIRT1/PGC-1 α 和 TGF- β 1-Smad2 两个信号通路均有不同程度抑制和激活, BPD 病情越重其 SIRT1、PGC1 α 、TFAM 表达水平越低, 而 TGF- β 1、Smad2、NLRP3 表达水平越高。

关键词: 病情; 支气管肺发育不良; SIRT1/PGC-1 α 信号通路; TGF- β 1-Smad2 信号通路

BPD 疾病是受遗传因素影响, 同时由于产前和产后多种因素交互作用而引发的肺部损伤, 是临床早产儿最为常见的呼吸系统疾病, 由于存在肺泡或肺部血管的发育不良而典型表现为进行性呼吸困难^[1]。最新研究指出, BPD 发生和发展还与肺血管发育障碍、炎症反应、氧化应激、肺纤维化、细胞外基质合成及降解失衡密切相关, 病情较重的动物模型其支气管或肺部组织中存在多种特征指标的异常表达, 表征着病灶局部信号通路的异常激活或抑制^[2]。同时综合诸多文献^[3-4]总结可知, SIRT1/PGC-1 α 和 TGF- β 1-Smad2 信号通路是诸多呼吸系统疾病关联较为密切的两种信号通路途径, 基于此背景, 特比较分析不同病情 BPD 大鼠其两种典型信号通路相关特征蛋白的表达水平, 旨在为 BPD 患者临床病情分析、预后评估提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究动物: 研究动物为 50 只成功造模的 BPD 模型 Wistar 大鼠, 该研究在学校进行医学伦理备案, 动物实验操作过程符合《赫尔辛基宣言》。筛选入组动物体重处于 250-300g 之间, 平均 (276.30 \pm 12.47) g, 均为雌性。饲养条件设置如下: 昼夜交替, 培养温度控制为 22-28 $^{\circ}$ C, 适度控制为 35-37% 左右。

1.2 造模方法: 主要参照邢玉娇研究文献《高-低氧双向诱导制备新生大鼠支气管肺发育不良并发肺动脉高压模型》^[5]所使用的方法进行造模, 具体步骤如下: 首先将母鼠首日置于高氧环境 (23h 暴露 60%O₂+1h 暴露 13%O₂), 次日将大鼠置于低氧环境 (23h 暴露 13%O₂+1h 暴露 60%O₂), 单双日轮换, 直至小鼠生后 14d, 全程保障母鼠的哺乳能力并预防氧中毒。

1.3 病情评估: 用 MouseOx 小动物生理监护仪监测大鼠保持正常状态所需吸入氧浓度, 并根据其划分病情, 分别是: 轻度 (无需用氧)、中度 (吸入氧气浓度<30%)、重度 (吸入氧气浓度 \geq 30%)。

1.4 指标检测: 培养 14 天后用颈椎脱臼法处死大鼠, 解剖大鼠取其支气管组织, 组织和裂解液按固定比例 (20mg: 150 μ L) 混匀, 先后经裂解、离心、洗涤等操作, 取上清液进行电泳、转膜、洗膜、孵育等操作, 最终定量检测 SIRT1/PGC-1 α 信号通路 (包括 SIRT1 蛋白、PGC1 α 蛋白、TFAM 蛋白) 和 TGF- β 1-Smad2 信号通路 (包括 TGF- β 1 蛋白、Smad2 蛋白、NLRP3 蛋白) 有关蛋白的相对蛋白表达含量。

1.5 统计分析: 用 SPSS 22.0 软件对数据库进行统计分析。计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 组间比较用两独立样本 t 检验。P<0.05 为差异具有

统计学意义。

2 结果

2.1 不同病情 BPD 大鼠支气管组织中 SIRT1/PGC-1 α 信号通路相关蛋白含量的比较

组间比较, 三组不同病情大鼠支气管组织中 SIRT1 蛋白、PGC1 α 蛋白、TFAM 蛋白含量的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 不同病情 BPD 大鼠支气管组织中 TGF- β 1-Smad2 信号通路相关蛋白含量的比较

组间比较, 三组不同病情大鼠支气管组织中 TGF- β 1 蛋白、Smad2 蛋白、NLRP3 蛋白含量的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 1 不同病情 BPD 大鼠支气管组织中 SIRT1/PGC-1 α 信号通路相关蛋白含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

病情严重程度	SIRT1 蛋白	PGC1 α 蛋白	TFAM 蛋白
轻度组 (n=32)	0.41 \pm 0.05	0.45 \pm 0.04	0.39 \pm 0.04
中度组 (n=14)	0.24 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03
重度组 (n=4)	0.14 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03
F	237.899	485.835	241.629
P	0.000	0.000	0.000

表 2 不同病情 BPD 大鼠支气管组织中 TGF- β 1-Smad2 信号通路相关蛋白含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

病情严重程度	TGF- β 1 蛋白	Smad2 蛋白	NLRP3 蛋白
轻度组 (n=32)	3.04 \pm 0.19	0.92 \pm 0.10	0.40 \pm 0.06
中度组 (n=14)	3.78 \pm 0.21	1.90 \pm 0.13	0.59 \pm 0.14
重度组 (n=4)	5.12 \pm 0.07	2.15 \pm 0.08	0.66 \pm 0.09
F	633.731	615.752	28.056
P	0.000	0.000	0.000

3 讨论

BPD 疾病高发于早产儿, 同时因早产儿各项身体机能发育不全或存在一定缺陷而更易受 BPD 基础疾病的深远影响, 继而影响其生命质量。BPD 疾病病情的临床评估现阶段多根据早产儿需要吸入氧气浓度见分级判定, 但在实际应用中容易受多种混杂因素干扰, 导致病情判定不精准, 并由此而影响临床医师早期治疗措施的开展, 因此, 基于 BPD 疾病的病理生理机制探明特殊组织中特殊蛋白的表达特征, 不但有助于 BPD 疾病早期诊断、精准评估, 还将有助于对其预后进行判定, 从而控制疾病风险^[6]。

本研究发现,三组不同病情大鼠支气管组织中 SIRT1 蛋白、PGC1 α 蛋白、TFAM 蛋白含量的差异有统计学意义 ($P<0.05$),相对而言,病情越重的 BPD 大鼠其表达水平相对越低,说明其支气管组织中 SIRT1/PGC-1 α 信号通路处于抑制状态。具体分析, SIRT1 是能量稳态的重要调节剂, BPD 病情较重的大鼠由于呼吸系统存在固有损伤,其能量代谢也处于紊乱状态,若不及时予以纠正将恶性循环加重病情发展。同时, SIRT1 作为 PGC1 α 的下游靶基因,可以在线粒体基质中通过可逆酶脱乙酰作用调节线粒体脂肪酸的氧化^[7-9]。PGC1 α 则是一小类转录调节因子的成员,兼具有调控与线粒体代谢、氧化应激等相关基因和蛋白表达的作用,其表达含量受到 SIRT1 正向反馈作用,其同样可以影响乙酰化酶活性来间接参与线粒体氧化代谢、细胞凋亡和信号调节等过程^[9]。因此,大鼠支气管组织中 SIRT1 蛋白、PGC1 α 蛋白表达含量的下降综合验证 BPD 病情重大鼠其病灶局部存在典型的能量代谢障碍,因此临床 BPD 患儿在疾病诊断早期即要积极采取能量补充或相关策略,若短期内其能量代谢障碍无法纠正则预示 BPD 患儿病情会进行性快速发展^[9]。分析不同病情 BPD 大鼠 TFAM 蛋白表达含量出现差异的具体原因,肯能与 TFAM 通过多相相分离凝聚转录起始、延伸和终止因子,继而富集底物以促进转录,从而影响线粒体类核自组装及转录有关,因此,其表达水平同样与能量代谢存在直接或间接联系。

本研究还发现,三组不同病情大鼠支气管组织中 TGF- β 1 蛋白、Smad2 蛋白、NLRP3 蛋白含量的差异有统计学意义 ($P<0.05$)。病情越重的 BPD 大鼠三项蛋白表达水平相对越高,具体分析原因如下:首先, TGF- β 1 是 TGF 超家族中的一份子,其对细胞的增殖、分化均有影响,作为具有多种生物学功能的细胞因子,其可介导许多病理生理等生物学过程,诸如炎症反应、组织创面的修复、血管的生成和组织重构等。其次, TGF- β 1 兼具有调节多种类型免疫细胞的作用,炎症反应发生时,其还会介导 IL-6、IL-17 等炎症因子的高水平表达^[11]。因此, TGF- β 1 蛋白对 BPD 的影响可能与其影响病灶局部炎症反应及自身免疫作用有关,但是该研究尚未对 BPD 模型大鼠支气管或肺部组织进行炎症因子的检测,该猜测能否成立后后续研究尚需进一步确认。第三, TGF- β 1 表达水平对 Smads 家族也有激活作用, Smad2/3 是 Smads 家族中的重要组成部分,其被激活后会激发免疫系统作用。Smad 蛋白作为 TGF- β 1/Smads 信号通路的特异性细胞内信号转导蛋白,其在 TGF- β 1 信号从细胞表面传导至细胞核的过程中具有关键性的作用^[12]。BPD 疾病进行发展时, TGF- β 1 可直接或经自分泌和旁分泌途径激活 Smad2/3 通路,上调血管内皮生长因子和血小板衍生因子的表达,继而激活成纤维细胞并诱导肌成纤维细胞转化及 ECM 合成和沉积,最终促进气道重塑。而 Smad3 亦可激活 TGF- β 1 诱导的 α -SMA 启动因子的活性及 α -SMA 蛋白的表达,进而调节肌成纤维细胞分化^[13]。因此, TGF- β 1 蛋白、Smad2 蛋白、NLRP3 蛋白三者对 BPD 疾病发生或病情发展的影响主要与其参与气道重塑或肌成纤维细胞分化有关,至于具体病理变化特征后续研究需结合病理切片进行具体描述。

综上, BPD 大鼠 SIRT1/PGC-1 α 和 TGF- β 1-Smad2 两个信号通路均有不同程度抑制和激活, BPD 病情越重其 SIRT1、PGC1 α 、TFAM 表达水平越低,而 TGF- β 1、Smad2、NLRP3 表达水平越高。该结果给临床医师指示, BPD 早产儿在疾病发展早期就要积极进行

能量补充或平衡,同时基于疾病发展趋势针对性采取炎症控制和自我免疫反应的抑制干预。而在疾病发生和发展的机制层面,支气管组织中 TGF- β 1-Smad2 信号通路的激活则提示,需在 BPD 疾病早期就通过多项综合措施来缓解气道重塑过程,避免疾病进展到不可逆阶段。

参考文献:

- [1]段蓉蓉,鲁利群.氧化应激与 Nrf 2 在支气管肺发育不良中的机制研究[J].安徽医学,2022,43(8):972-975.
 - [2]祝巍,孙智勇,王立君,等.外源性 TSG-6 干预对支气管肺发育不良新生大鼠高氧肺损伤的保护作用及相关机制[J].临床和实验医学杂志,2022,21(13):1351-1356.
 - [3]瞿色华,单连强,陈爽,等.重组人胰岛素样生长因子 1 对新生大鼠高氧诱导的支气管肺发育不良的保护作用及机制研究[J].中国临床药理学杂志,2022,38(12):1359-1362.
 - [4]李羽白,王军,殷静.Wnt 5a 在支气管肺发育不良模型中的作用机制探讨[J].天津医药,2022,50(6):566-570.
 - [5]邢玉娇,衣曼,富建华,等.高-低氧双向诱导制备新生大鼠支气管肺发育不良并发肺动脉高压模型[J].中国医科大学学报,2020,49(9):846-853.
 - [6]杨坤.白藜芦醇激活 SIRT1/PGC-1 α 信号通路减轻新生大鼠高氧性肺损伤[D].西南医科大学,2022.
 - [7]谢圆媛,杨丹芬,王莉.藏红花素通过 PGC-1 α /SIRT3 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的气道炎症[J].临床肺科杂志,2020,25(11):1648-1654.
 - [8]许杰.不同强度的运动对大鼠心肺耐力及 PGC-1 α 通路的影响[D].北京体育大学,2015.
 - [9]于小寒.基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路探讨桃红四物汤对肺纤维化大鼠模型的干预作用机制[D].湖南中医药大学,2022.
 - [10]杨利萍,张友兰,唐凤鸣,等.基于 TGF β 1/Smad7 通路观察麻黄碱对肺心病大鼠血管内皮结构及功能的影响[J].西部中医药,2022,35(4):48-54.
 - [11]米洋,邓虎,赵克明.加味小柴胡汤对哮喘模型大鼠 TGF- β 1/Smad3 信号传导通路影响的实验研究[J].山西中医药大学学报,2021,22(6):410-413,419.
 - [12]李妙晨,卞相丽,郑芳,等.基于 TGF- β 1-Smad2 信号通路探讨布地奈德对高氧诱导支气管肺发育不良新生小鼠的保护作用及机制研究[J].现代生物医学进展,2021,21(20):3823-3827.
 - [13]李向峰,陈文霞.野菊花提取物对慢性支气管炎大鼠肺组织病理的影响及对 TGF- β 1/Smad3 通路的调控机制[J].中成药,2021,43(9):2336-2341.
- 作者简介:彭可昕(1994年10月-)女,汉族,本科,助教,研究方向:内科学方向
通讯作者:刘梅(1983年5月-)女,汉族,本科,高级实验师
项目编号:湖南省教育厅科学研究项目(编号21C0889、编号18C1162)