

分泌型钙激活 Cl^- 通道在 ARDS 小鼠肺组织表达的变化及规律



扫码阅读电子版

郭晓雅 梁家宁 陈洁 杨学敏 宋立强

空军军医大学西京医院呼吸与危重症医学科, 西安 710032

通信作者: 宋立强, Email: songlq@fmmu.edu.cn

【摘要】 **目的** 观察小鼠分泌型钙激活 Cl^- 通道 (mCLCA3) 在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 模型肺组织中的表达量及随时间的变化规律, 探究其在急性肺损伤过程中的作用。**方法** 18 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和脂多糖 (LPS) 组 ARDS 小鼠 (分为气道滴入 LPS 诱导 6 h 组、24 h 组), 每组 6 只。HE 染色观察小鼠肺组织形态结构改变, 并进行肺损伤评分; 阿尔辛蓝-过碘酸雪夫 (AB-PAS) 染色观察小鼠气道上皮中杯状细胞的数量; 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测小鼠肺组织中 mCLCA3 的 mRNA 表达水平; 蛋白质印迹法 (Western blot) 法检测 mCLCA3 蛋白在 ARDS 小鼠肺组织及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的表达。**结果** HE 染色结果, 与对照组相比, LPS 组 ARDS 小鼠肺部正常结构明显被破坏, 肺泡上皮呈弥漫性损伤, 肺泡内出血并伴有大量炎性细胞浸润, 肺间质蛋白质沉积, 有透明膜形成; 与对照组小鼠相比较, LPS 组 ARDS 小鼠的肺损伤评分 (对照组: 1.40 ± 0.54 ; LPS 组: 7.40 ± 0.54 , $P < 0.05$) 显著升高; AB-PAS 染色观察小鼠气道上皮中杯状细胞的数量; real-time RT-PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 结果显示: 相比于对照组小鼠, LPS 组 ARDS 小鼠的肺组织中 mCLCA3 的基因表达量明显下降 ($P < 0.05$); mCLCA3 蛋白在 ARDS 小鼠的肺组织和 BALF 中均显著降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且下降水平呈时间依赖性。**结论** LPS 诱导的 ARDS 小鼠模型中气道杯状细胞数量明显增加, 而其肺组织及 BALF 中 mCLCA3 的 mRNA 及蛋白表达水平 (评分) 均明显下降, 并表现为时间依赖性。气道杯状细胞产生的分泌型 CLCA 表达水平与 ARDS 损伤程度呈负相关, 提示前者可能在肺部炎症机制中扮演着负性调节作用。

【关键词】 杯状细胞; 急性呼吸窘迫综合征; 钙激活氯离子通道蛋白

基金项目: 国家自然科学基金 (81570072)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.004

Changes and regularity of calcium-activated chloride channel in lung tissues of acute respiratory distress syndrome mice

Guo Xiaoya, Liang Jianing, Chen Jie, Yang Xuemin, Song Liqiang

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Song Liqiang, Email: songlq@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the expression levels of murine calcium-activated chloride channel (mCLCA3) in lung tissue of acute respiratory distress syndrome (ARDS) mouse model and its changing rule with time, to explore its role in the process of lung tissue injury in the mice.

Methods Eighteen male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) group ARDS mouse (LPS tracheal instillation for 6 hours group and 24 hours group), with 6 mice in each group. HE staining was used to observe the morphological changes of lung tissue, and the lung injury score was calculated. Alcian blue-Periodic acid-Schiff (AB-PAS) staining was used to observe changes in the number of goblet cells in pulmonary of mice. Real-time RT-PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to test the mRNA and the protein expression levels of mCLCA3 in lung tissue of mice. **Results** HE staining showed that

compared with the control group, the normal tissue structure of alveolar and interstitial in ARDS mice were destroyed and filled with lots of inflammatory cells and red cells. The lung injury score of ARDS mouse in LPS group (7.40 ± 0.54) was higher than that of the normal control group (1.40 ± 0.54) ($P < 0.05$). AB-PAS staining results showed that the numbers of bronchial epithelial goblet cells in LPS group were higher than those in normal control group ($P < 0.05$). Real-time RT-PCR and Western blot results revealed that the mRNA expression levels of mCLCA3 were decreased significantly in lung tissue in ARDS mice ($P < 0.05$). And the protein levels of mCLCA3 were decreased markedly in lung tissue and BALF in ARDS mice ($P < 0.05$), its decline decreased more with time. **Conclusions** The number of the Goblet cell in the LPS-induced ARDS mice model is increase mildly, but mRNA expression and the protein levels of mCLCA3 are decreased significantly in its lung tissue and BALF lung tissue in ARDS mice, and its decline decreased more with time. The expression of CLCA produced by airway goblet cells is negatively correlated with the extent of ARDS damage, suggesting that the former may play an inhibitory role in the mechanism of lung inflammation.

【Key words】 Goblet cells; Acute respiratory distress syndrome; Calcium-activated chloride channel

Fund program: National Nature Science Foundation of China (81570072)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.004

ARDS 以急性呼吸衰竭为特征, 病死率居高不下, 是危重症医学临床救治的难点, 主要原因是其发病机制仍不明确^[1]。“炎症是 ARDS 的本质”这一观点已被大多数学者所认可^[2]。因此, 彻底阐明 ARDS 发生与发展过程中级联放大的炎症反应机制, 是实现 ARDS 防治突破性进展的关键。气道上皮细胞作为肺脏的第一道防御屏障, 在受到烟雾、病原体或过敏原等刺激时, 能够分泌多种炎症介质, 从而已经被证实能够参与或调节某些肺部炎症性疾病的发生发展。其中气道上皮杯状细胞的角色更是日益受到关注。在外界因子的刺激下, 杯状细胞能迅速分泌黏蛋白, 并参与黏液-纤毛清除系统的防御功能; 此外, 应激状态时还能分泌一种特异性钙激活氯离子通道蛋白 (calcium-activated chloride channel, CLCA), 后者在人类和小鼠的基因型分别是 hCLCA1 和 mCLCA3 (两者异种同源)。既往研究证实, CLCA 在支气管哮喘、COPD 等慢性炎症性疾病中表达水平增高, 并促进气道黏液高分泌症状的形成, 其在这些疾病慢性炎症发生机制中的角色尚在探索之中。目前未能检索到 CLCA 与 ARDS 相关性的研究报道。基于此, 本课题组拟探讨气道上皮分泌的 CLCA 在 ARDS 发生机制中的变化及作用, 旨在为临床防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 SPF 级 6~8 周雄性 C57BL/6

小鼠 18 只, 随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别是对照组和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (10 mg/kg) 刺激 6 h 组 (LPS-6 h 组)、24 h 组 (LPS-24 h 组)。动物购自四川大学及空军军医大学实验动物中心。

1.1.2 材料与仪器 LPS (Escherichia coli 055: B5) 购自美国 Sigma 公司; Trizol 购自美国 GIBCO 公司; 逆转录试剂盒购于中国天根生化科技有限公司; 兔抗鼠 mCLCA3 一抗、鼠抗鼠 β -actin 一抗、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗均购自美国 Abcam 公司; 蛋白质印迹法 (Western blot) 相关试剂、RIPA 裂解液均购自中国碧云天公司; 蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自美国 Sigma 公司; BCA 蛋白试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司; mCLCA3 (Gene_ID 23844) 引物, 其上游引物序列为: 5'-TTCTGGAAGGAGTTCTGAGTG-3', 其下游引物的序列是: 5'-CGGGAATCAAAATGGCAACA-3', 产物长度为 204 bp。内参基因 β -actin (Gene_ID 11461), 其上游引物序列是: 5'-TGTATGAAGGCTTTGGTCTC-3', 下游引物序列是: 5'-GGT-GTGCACCTTTTATTGGTC-3', 产物长度为 96 bp。引物均由中国上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 造模过程 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 麻醉, 对照组小鼠气道内滴注 50 μ l 生理盐水; LPS 组 ARDS 小鼠气道内滴注

10 mg/kg LPS, 注射体积为 50 μ l, 分别于 6 h、24 h 后收取样本^[3-4]。

1.2.2 肺组织病理检查 取左侧肺组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片, 经 HE 切片染色后在显微镜下观察肺部形态^[3]。参照 Mikawa 等^[5]的方法以 4 项指标进行肺损伤半定量评分: 肺泡充血; 出血; 间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集; 肺泡间隔增厚或透明膜形成。0 分: 极轻度损伤; 1 分: 轻度损伤; 2 分: 中度损伤; 3: 重度损伤; 4 分: 严重损伤。4 项指标得分相加作为总分。

1.2.3 阿尔辛蓝-过碘酸雪夫 (alcian blue-periodic acid schiff, AB-PAS) 染色计数杯状细胞 石蜡切片脱蜡后行 AB-PAS 化学染色, 中性糖蛋白呈现紫红色, 酸性糖蛋白为蓝色。气道上皮中的杯状细胞是分泌黏液糖蛋白的主要细胞, AB-PAS 能特异性结合糖蛋白, 并呈现亮紫红色、颗粒状的阳性反应。在高倍显微镜下 ($\times 400$) 随机选取 6 个管壁完整的小支气管截面, 采用 ImageTool 3.0 图像分析软件测量周径 (circular ratio Pi, Pi), 计数杯状细胞数量 (number, No), 计算单位长度周径小支气管内的杯状细胞数量 (No/Pi)。

1.2.4 小鼠肺组织 mCLCA3 的 mRNA 表达水平的检测 取右肺上叶, 置于 Trizol 中, 将组织充分剪碎, 反复冻融后提取小鼠肺组织中总 RNA, 经逆转录后通过逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 定量检测小鼠肺组织 mCLCA3 mRNA 水平的表达变化。

1.2.5 Western blot 法检测 mCLCA3 蛋白在 ARDS 小鼠肺组织中的表达 RIPA 法提取小鼠肺组织中总蛋白, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度, 依照测得的蛋白浓度, 按照上样量为 25 μ g 计算上样体积 (μ l), 分装于 10 个小 EP 管中。每管加入 5 \times sample beffer (提前解冻), 其体积为蛋白体积/4。混匀, 离心, 上机, 程序为: Run-Main-DB (95 $^{\circ}$ C, 5 min)。Western blot 法检测小鼠肺组织中 mCLCA3 蛋白的表达量。

1.2.6 Western blot 法检测 mCLCA3 蛋白在 ARDS 小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中的表达 方法同上步煮蛋白后, 采用 Western blot 法检测 mCLCA3 蛋白在 ARDS 小鼠 BALF 中的表达量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行

统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 不同组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察小鼠肺部形态及计算肺损伤评分 对照组小鼠精神活动度良好, 呼吸平稳; LPS 组 ARDS 小鼠精神萎靡, 活动度差, 呼吸急促, 且刺激时间越长, 小鼠状态越差。

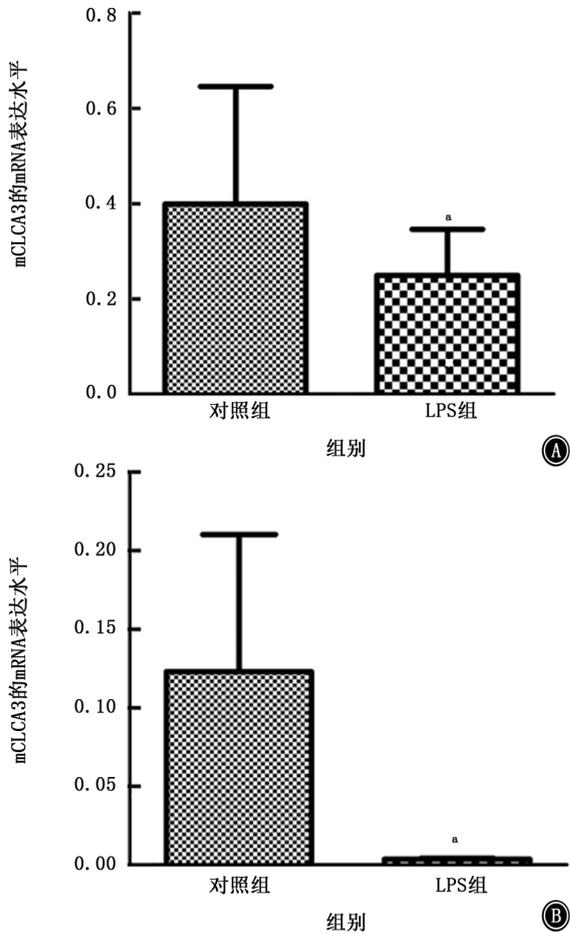
肉眼观察肺组织大体形态: 对照组小鼠双肺光滑红润; LPS 组 ARDS 小鼠双肺肿胀, 呈暗红色, 有散在出血点和出血斑。HE 染色显示: 对照组小鼠肺组织结构清晰, 基本正常; LPS 组 ARDS 小鼠的肺组织正常结构被破坏, 肺泡上皮弥漫性损伤, 肺泡及肺间质出血并伴有大量炎性细胞浸润, 肺间质明显增宽伴部分肺泡塌陷, 肺间质蛋白质沉积, 有透明膜形成。LPS 组 ARDS 小鼠的肺损伤评分明显高于对照组小鼠 (分别为 7.40 ± 0.54 和 1.40 ± 0.54 , $P < 0.05$)。此外, LPS 刺激 24 h 后比 6 h 后的肺损伤评分要高 ($P < 0.05$)。

2.2 AB-PAS 染色观察小鼠肺部支气管上皮杯状细胞数量变化情况 小鼠肺部 AB-PAS 染色结果显示, 对照组小鼠小支气管上皮有少量杯状细胞 (No/Pi 值 16.27 ± 1.53), 呈散在分布, 管腔干净。LPS 组 ARDS 小鼠小支气管出现大量簇状聚集分布的杯状细胞 (No/Pi 值 48.66 ± 3.40), 高于对照组 ($P < 0.05$), 并在管腔中能见到少许着色黏液的分泌。提示 ARDS 小鼠肺支气管上皮中的杯状细胞轻度增生。也就是说如果 mCLCA3 表达水平下降, 能够排除由于造模过程中杯状细胞脱落至数量减少带来的参杂因素。

2.3 反转录实时定量聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 检测小鼠肺组织内 mCLCA3 基因表达情况 RT-qPCR 对小鼠肺组织 mCLCA3 的 mRNA 表达水平检测, 扩增结果 (图 1) 显示: LPS 刺激 24 h 的 ARDS 小鼠 mCLCA3 的基因表达水平在肺组织中明显低于对照组小鼠 ($P < 0.05$), 且呈时间依赖性。

2.4 Western blot 检测小鼠肺组织中 mCLCA3 蛋白的表达情况 Western blot 法对小鼠肺组织进行 mCLCA3 蛋白表达水平检测 (图 2), 显影结果显示: 在约 100 000 处, ARDS 小鼠肺组织出现条带的亮度均低于对照组小鼠。证明 mCLCA3 蛋白在 LPS 刺激 24 h 后的 ARDS 小鼠肺组织中的表达水平低于对照组小鼠 ($P < 0.05$), 并且呈时间依赖性。

2.5 Western blot 检测小鼠肺 BALF 中 mCLCA3 蛋白的表达情况 Western blot 法对小鼠 BALF 进行 mCLCA3 蛋白表达情况的检测 (图 3), 显影结果显示: 在约 100 000 处, LPS 组 ARDS 小鼠 (LPS 刺激 6 h) BALF 出现条带的亮度均低于对照组小鼠。证明 mCLCA3 蛋白在 LPS 刺激 6 h 后的 ARDS 小鼠肺 BALF 中的表达水平低于对照组小鼠 ($P < 0.05$)。



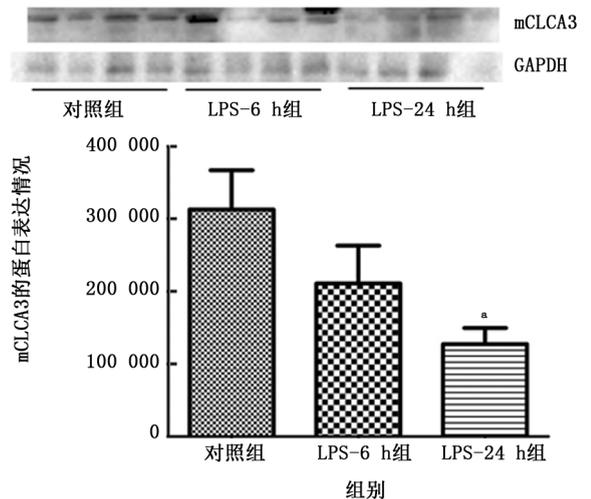
注: mCLCA3 为分泌型钙激活 Cl^- 通道; LPS 为脂多糖; 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 1 反转录实时定量聚合酶链式反应检测小鼠肺组织内 mCLCA3 基因表达情况 A: LPS 刺激 6 h; B: LPS 刺激 24 h

3 讨论

ARDS 是一种急性、弥漫性、炎症性肺损伤, 其发病率逐年升高, 住院病死率高, 而其发病机制仍未完全阐明。目前认为炎症反应和免疫反应在 ARDS 的病理生理发展过程中发挥着关键作用^[6]。炎症反应影响了肺泡上皮细胞及血管内皮细胞等组织细胞的结构与功能, 后者也参与了 ARDS 的炎症反应^[7]。然而, 支气管上皮细胞在 ARDS 发生中的角色还关注得远远不够。CLCA 系气道上皮杯

状细胞旁分泌型蛋白。CLCA 在支气管哮喘、COPD 等慢性炎症性疾病中高度活跃, 能促进气道黏液高分泌症状的形成, 其在这些疾病慢性炎症发生中的角色逐渐被人们关注。研究表明, 在 COPD 及哮喘中 hCLCA1 (小鼠基因型为 mCLCA3) 显著增加了黏蛋白基因 MUC5AC 的表达, 并促进其分泌。CLCA 成为潜在的治疗支气管哮喘和 COPD 黏液高分泌症状的靶向药物目标^[8]。有研究称, LPS 能够诱导人支气管上皮细胞表达 hCLCA1 和 MUC5AC, 增加黏液的分泌^[9]。2006 年, Long 等^[10]报道 CLCA 敲除小鼠给予 OVA 刺激后, BALF 中炎症水平相比于野生型小鼠显著升高; 同时, 与野生型小鼠相比, CLCA 敲除小鼠气道接受 LPS 刺激后, BALF 中以中性粒细胞为主的炎症反应明显加重。这些结果揭示 CLCA 除了能够调节杯状细胞增生与气道黏液的分泌, 还能够在机体的固有免疫应答中抑制组织炎症反应^[11]。杯状细胞分泌的 CLCA 近年也受到很多关注。越来越多的研究报道, CLCA 不仅与气道高反应性和气道黏液分泌有关, 与慢性炎症反应过程也有联系。但是 CLCA 在急性炎症中是否也发挥着相应的作用尚不明确。

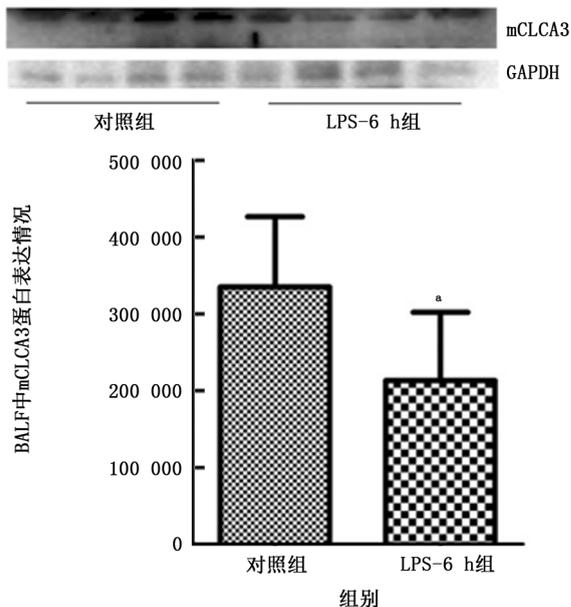


注: mCLCA3 为分泌型钙激活 Cl^- 通道; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶; LPS 为脂多糖; 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 2 蛋白质印迹法检测小鼠肺组织中 mCLCA3 蛋白的表达情况

CLCA 家族基因群在人和小鼠分别位于 1 号和 3 号染色体, 在这里我们主要研究人体内 hCLCA1 的表达与功能, 该基因在小鼠的同源基因是 mCLCA3。两者分别编码 914、913 个氨基酸残基, 相对分子质量约 110 000。CLCA 蛋白主要由肺支气管上皮杯状细胞分泌, 为可溶性蛋白^[12]。根据

以往研究, CLCA 蛋白调控上皮 Cl^- 通道及气道黏液蛋白的合成^[8]。然而 CLCA 在炎症反应中发挥的作用尚不明确。因此我们在成功建立 ARDS 小鼠模型的基础上观察肺部支气管上皮杯状细胞数量及肺组织和 BALF 中 CLCA 的表达变化情况, 进一步了解 CLCA 在炎症反应中发挥的作用。



注: mCLCA3 为分泌型钙激活 Cl^- 通道; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶; LPS 为脂多糖; 与对照组比较, $*P < 0.05$

图 3 蛋白质印迹法检测小鼠肺 BALF 中 mCLCA3 蛋白的表达情况

本实验研究通过 LPS 诱导建立 ARDS 小鼠模型, 观察杯状细胞在 ARDS 小鼠模型中的表达变化, 研究中我们观察到 ARDS 小鼠肺泡及间质组织正常结构破坏, 炎症浸润明显; 与对照组相比, ARDS 小鼠肺组织内杯状细胞数量明显增加; 在体内研究中, 我们观察到 ARDS 小鼠 mCLCA3 的基因和蛋白表达水平均明显低于对照组小鼠。为了解它的动态变化过程, 我们检测了 LPS 刺激 6 h 的基因和蛋白的表达, 发现 24 h 的基因和蛋白表达量比 6 h 的表达量更低, 说明 CLCA 的降低呈时间依赖性。而对 BALF 中蛋白量的检测只显示出 LPS 刺激 6 h 时的条带, LPS 刺激 6 h 后的蛋白表达量明显低于对照组 BALF, 可能的原因是 LPS 刺激 24 h 后 CLCA 在 BALF 中的表达量过于低, 以至于 Western blot 法没能检测出条带。

本实验研究结果显示, ARDS 小鼠气道杯状细胞不但没有明显的减少, 反而有轻度增高的趋势, 这就排除了体内研究中肺部 CLCA 的降低是由于

ARDS 造模过程中杯状细胞数量因损伤而减少的参杂因素。因此我们推测, CLCA 在机体炎症反应中可能扮演保护性角色, 由于 CLCA 表达水平的下降使得机体防御力量下降, 肺部炎症的级联反应加重。但是对于气道上皮杯状细胞是如何通过 CLCA 表达量的变化, 从而实现对 ARDS 炎症程度的反向调控, 目前尚不清楚。我们将继续开展下一步的研究工作解决这些问题, 为 ARDS 的发病机制提供一定依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 刘军, 邹桂娟, 李维勤. 急性呼吸窘迫综合征的诊断新进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (2): 70-73. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.02.003.
- [2] 何流漾, 郑建洲, 夏蕾, 等. 炎症反应在 ARDS 中的作用机制研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29 (7): 651-655. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.017.
- [3] 梁家宁, 周倩倩, 张天相, 等. CXCL1 和 CXCL2 在 ARDS 小鼠肺组织表达的变化规律及评价 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37 (8): 600-604. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.08.008.
- [4] Chen Y, Wu H, Nie YC, et al. Mucoactive effects of naringin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and beagle dogs [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38 (1): 279-287. DOI: 10.1016/j.etap.2014.04.030.
- [5] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. Anesth Analg, 2003, 7 (6): 1751-1755.
- [6] Pires-Neto RC, Morales MM, Lancas T, et al. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome [J]. J Crit Care, 2013, 8 (1): 111.e9-111.e15. DOI: 10.1016/j.jccr.2012.05.013.
- [7] Han S, Mallampalli RK. Correction: The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation [J]. J Immunol, 2015, 194 (11): 5569. DOI: 10.4049/jimmunol.1500741.
- [8] Sala-Rabanal M, Yurtsever Z, Berry KN. Novel roles for chloride channels, exchangers, and regulators in chronic inflammatory airway diseases [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:497387. DOI: 10.1155/2015/497387.
- [9] Hauber HP, Goldmann T, Vollmer E, et al. LPS-induced mucin expression in human sinus mucosa can be attenuated by hCLCA inhibitors [J]. J Endotoxin Res, 2007, 13 (2): 109-116.
- [10] Long AJ, Sypek JP, Askew R, et al. Gob-5 contributes to goblet cell hyperplasia and modulates pulmonary tissue inflammation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 35 (3): 357-365.
- [11] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. N Engl J Med, 2005, 353 (16): 1685-1693.
- [12] Winpenny JP, Marsley LL, Sexton DW. The CLCA gene family: putative therapeutic target for respiratory diseases [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8 (2): 146-160.