

# MKK6 p38 $\alpha$ 信号通路在机械牵张诱导肺泡上皮细胞表达晚期糖基化终末产物受体中的作用

丁宁 肖慧 许立新 余守章

**【摘要】** 目的 探讨 p38 $\alpha$  及其上游激酶丝裂素活化蛋白激酶 6(MKK6)在机械牵张诱导肺泡上皮细胞(A549)表达晚期糖基化终末产物受体(RAGE)中的作用。方法 应用阳离子脂质体 DOTAP 介导的基因转染方法将 p38 $\alpha$  显性无活性突变体 p38 $\alpha$ (AF)+绿色荧光表达载体 pGFP 及 MKK6b 的组成性活性突变体 MKK6b(E)+pGFP 分别导入 A549 细胞,以质粒 pcDNA3+pGFP 作为阴性对照,以 pGFP 作为空白对照。应用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测转染基因。建立体外细胞牵张应变模型,观察各组细胞在施加 20%牵张应变时 p38 激酶活性变化及 RAGE 的蛋白和 mRNA 表达变化。结果 Western blotting 检测结果显示,外源基因成功转染 A549 细胞,并在细胞内表达。在 A549 细胞牵张应变模型中观察到,MKK6b(E)转染细胞内 p38 激酶活性明显升高,而 p38 $\alpha$ (AF)转染细胞内 p38 激酶活性显著下降;MKK6b(E)基因转染可促进 20%牵张应变诱导 A549 细胞 RAGE 的蛋白和 mRNA 表达,而 p38 $\alpha$ (AF)基因转染则抑制牵张应变诱导的 RAGE 蛋白和 mRNA 表达。结论 牵张应变通过 MKK6 p38 $\alpha$  信号通路调节 A549 细胞 RAGE 的表达。

**【关键词】** 机械牵张; 肺泡上皮细胞; p38 丝裂素活化蛋白激酶; 晚期糖基化终末产物受体

**Effect of mitogen-activated protein kinase kinase 6-p38 $\alpha$  signal pathway on receptor for advanced glycation end-product expression in alveolar epithelial cells induced by mechanical stretch** DING Ning\*, XIAO Hui, XU Li-xin, SHE Shou-zhang. \* Department of Anesthesiology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong, China  
Corresponding author: XU Li-xin, Email: gzxulixin@163.com

**【Abstract】** Objective To investigate the role of mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) p38 $\alpha$  in mechanical stretch induced receptor for advanced glycation end-product (RAGE) expression in alveolar epithelial cells (A549). Methods Recombinant plasmids were transfected into A549 cells with liposome DOTAP. A549 cells transfected with p38 $\alpha$  (AF)/pGFP and MKK6b (E)/pGFP plasmids were taken as treated groups, while the groups that transfected with pcDNA3 plasmid and pGFP plasmid served as blank transfection group and control group, respectively. All the groups were then cultured in 6-well Bioflex cell culture plates and exposed to cyclic mechanical stretch at 20% elongation. The infection and expression of gene were assessed by Western blotting analysis. The activity of p38 kinase in A549 cells and the expression of RAGE protein and mRNA were observed. Results The transfection of MKK6b (E) led to a markedly increase in p38 kinase activity compared with control group. In contrast, the transfection of p38 $\alpha$  (AF) significantly inhibited p38 kinase activity. Compared with control group, stretch markedly increased RAGE protein and mRNA expression in MKK6b (E) transfected cells, while it markedly decreased RAGE expression in p38 $\alpha$  (AF) transfected cells. Conclusion MKK6 p38 $\alpha$  signaling pathway regulates the expression of RAGE induced by mechanical stretch in A549 cells.

**【Key words】** mechanical stress; alveolar epithelial cell; p38 mitogen-activated protein kinase; receptor for advanced glycation end-product

呼吸机相关性肺损伤(VILI)是危重症患者进行机械通气支持治疗时常见而严重的并发症,其主要致病机制之一是由于机械通气时产生的牵张应变作用于肺内效应细胞,激活了细胞表面某些受体,进而诱导多种炎症介质的表达和释放,造成肺损

伤<sup>[1-2]</sup>。晚期糖基化终末产物受体(RAGE)是属于免疫球蛋白超家族成员的多配体受体,其配体包括高迁移率族蛋白 B1、糖基化终末产物、淀粉样蛋白 A、S100 蛋白等。RAGE 与其配体相互作用常导致快速持续的细胞活化和下游基因转录,多种细胞信号在不同类型细胞中被激活,并通过介导一系列细胞因子的产生和黏附分子的表达维持和扩大炎症反应<sup>[3]</sup>。新近研究发现,大鼠气管内滴注脂多糖后 RAGE 表达增加,表明 RAGE 参与了内毒素性急性肺损伤<sup>[4]</sup>。本研究中通过应用应变加载系统对肺泡上皮细胞

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1003 - 0603. 2009. 10. 009

基金项目:广东省医学科研基金项目(A2009497);广东省广州市医药卫生科技项目(2008ZD14, 2008YB012, 2009YB021)

作者单位:510180 广东,广州市第一人民医院麻醉科和麻醉学实验室(丁宁、许立新、余守章),门诊部(肖慧)

通信作者:许立新,Email: gzxulixin@163.com

(A549)进行诱导培养,研究机械牵张对 A549 细胞 RAGE mRNA 和蛋白表达的影响,并探讨 p38 信号通路在其中的作用,为 VILI 的发生分子机制研究及其临床治疗提供线索。

### 1 材料与与方法

**1.1 实验材料:**质粒 pcDNA3、pcDNA3-p38α 显性无活性突变体 p38α(AF)、pcDNA3-MKK6b 的组成性活性突变体 MKK6b(E)、HA 和 Flag 单克隆抗体(美国 Scripps 研究所 J. Han 教授惠赠),辣根过氧化物酶标记 IgG(HRP-IgG,美国 Santa Cruz 公司),DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、硝酸纤维素膜(美国 GIBCO BRL 公司),TRIzol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司),阳离子脂质体 DOTAP 转染试剂(瑞士 Roche 公司),限制性内切酶、RNA 酶(美国 Promega 公司),人肺泡上皮细胞株(A549)由本室保存。

**1.2 A549 细胞的培养和转染:**以  $1 \times 10^6$  个/L 的密度将 A549 细胞用含 FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后分组进行转染,空白对照组转染绿色荧光表达载体 pGFP,阴性对照组转染 pcDNA3+pGFP, MKK6b(E)转染组共转染 pcDNA3-MKK6b(E)+pGFP, p38α(AF)转染组共转染 pcDNA3-p38α(AF)+pGFP。取 25 μl DOTAP 与 75 μl DMEM 混合,分别取不同质粒 DNA 2 μg 混合于 100 μl DMEM 中,将上述 DOTAP 与质粒混悬液混合,室温下静置 30 min,补充 1.8 ml DMEM;将混悬液用细胞培养皿在 37 °C、CO<sub>2</sub> 中转染 5 h,再加入 2 ml DMEM 继续转染 12 h。

**1.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)方法检测细胞中转染基因表达:**裂解转染后细胞取其上清液,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,蛋白条带半干电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉封闭过夜,分别加入一抗 HA 抗体和 Flag 特异性抗体,4 °C 过夜,漂洗后加入二抗 HRP-IgG,37 °C 孵育 60 min,用增强化学发光法(ECL)检测阳性信号,采用凝胶成像分析系统采集图像。

**1.4 激酶活性测定:**按本课题组前期报道的方法<sup>[5]</sup>,用放射自显影显示蛋白质的磷酸化情况。

**1.5 细胞牵张应变的施加:**将转染后的细胞接种于 6 孔细胞培养皿,连接 Flexercell 4000T 应变加载系统(美国),设定牵张频率为 30 周/min,应变幅度为 20%,在加力状态下培养细胞 4 h。

**1.6 RAGE 蛋白表达检测:**采用 Western blotting

检测 RAGE 蛋白表达,以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照。采集图像并进行半定量分析,以 RAGE/β-actin 灰度比值表示 RAGE 蛋白表达水平。未施加牵张应变的细胞作为对照,各组实验重复 3 次。

**1.7 RAGE mRNA 表达检测:**采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 RAGE mRNA,按照 TRIzol 一步法提取总 RNA,反转录合成 cDNA。取反转录产物进行 PCR 反应:93 °C 50 s,58 °C 60 s,72 °C 60 s,共 30 个循环;最后 69 °C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色显示。采集图像行半定量分析,以 RAGE/三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)吸光度比值表示各组 RAGE mRNA 表达水平。未施加牵张应变的细胞作为对照,各组实验重复 3 次。

**1.8 统计学处理:**使用 SPSS 13.0 统计软件,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,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 转染基因鉴定(图 1):**由于克隆 p38α(AF)和 MKK6b(E)时分别加上了 Flag 和 HA 标记,因此,分别利用 Flag 和 HA 抗体进行 Western blotting 检测重组质粒转染细胞后融合蛋白的表达,发现 p38α(AF)和 MKK6b(E)已转染入细胞并表达。

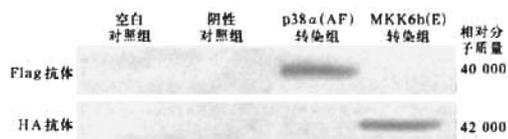
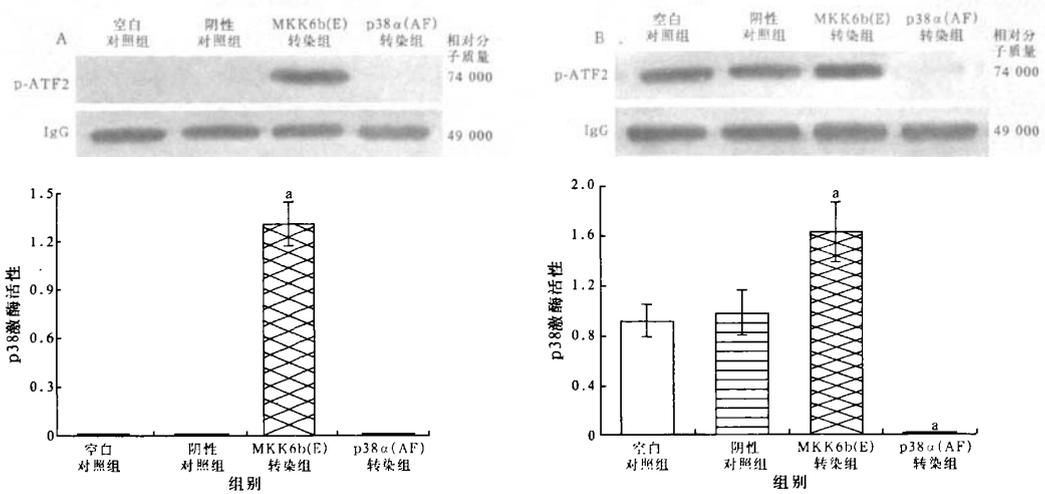


图 1 Western blotting 检测基因转染 A549 细胞后融合蛋白的表达

**2.2 细胞转染对 p38 激酶活性的影响(图 2):**在未牵张时,转染 MKK6b(E)使 p38 对谷胱甘肽巯基转移酶(GST)标记的 ATF2(GST-ATF2)蛋白的磷酸化作用较阴性对照组明显增强( $P < 0.05$ ),而 p38α(AF)转染组则无明显差异( $P > 0.05$ )。而在牵张应变处理的 A549 细胞中,转染 MKK6b(E)可使 p38 对 GST-ATF2 蛋白的磷酸化作用较阴性对照组明显增强( $P < 0.05$ ),而转染 p38α(AF)则使 p38 激酶活性显著降低( $P < 0.05$ )。

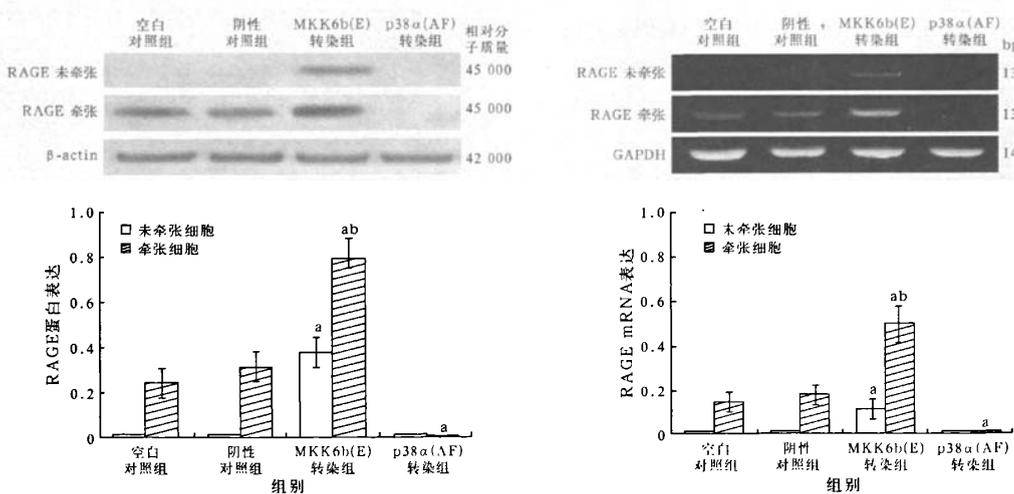
**2.4 不同质粒转染对未牵张 A549 细胞 RAGE 蛋白和 mRNA 表达的影响(图 3):**与阴性对照组相比,p38α(AF)转染组、空白对照组 A549 细胞 RAGE 蛋白和 mRNA 表达无明显变化;而 MKK6b(E)转染组表达则均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。

**2.5 不同质粒转染对牵张应变诱导 A549 细胞**



注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05

图 2 转染质粒对未牵张(A)和牵张应变(B)作用下 A549 细胞 p38 激酶活性的影响



注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与本组未牵张细胞比较,<sup>b</sup>*P*<0.05

图 3 MKK6b 在牵张应变诱导 A549 细胞 RAGE 蛋白和 mRNA 表达中的作用

RAGE 蛋白和 mRNA 表达的影响(图 3):空白对照组与阴性对照组 RAGE 蛋白表达分别为(22.1±8.4)%和(28.5±9.6)%;与阴性对照组相比,在牵张应变作用下,MKK6b(E)转染组 RAGE 表达量明显增加,而 p38α(AF)转染组 RAGE 表达量明显降低(*P*均<0.05);与未牵张时相比,MKK6b(E)转染组细胞施加牵张应变后 RAGE 表达量明显增加(*P*<0.05)。进一步研究细胞转染对机械牵张诱导 RAGE mRNA 表达的影响。结果显示,空白对照组与阴性对照组 RAGE 表达分别为(17.8±8.9)%和(19.3±7.1)%;与阴性对照组相比,在牵张应变作用下,MKK6b(E)转染组 RAGE mRNA 表达量明

显增加,而 p38α(AF)转染组 RAGE mRNA 表达量明显降低(*P*均<0.05)。与未牵张时相比,MKK6b(E)转染组细胞施加牵张应变后 RAGE mRNA 表达量明显增加(*P*<0.05),与 RAGE 蛋白表达的变化一致。

### 3 讨论

机械通气在危重患者的抢救中具有无可替代的作用,更是急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)治疗的革命性进步,然而其本身也可作为一种损伤因素诱发或加重肺损伤,即 VILI,这已成为机械通气治疗失败和影响 ALI/ARDS 预后的重要原因之一<sup>[6]</sup>。近年来,国内外研究证实,异常的机械

力可激活某些特异性受体的表达,进而诱导炎症介质的大量产生,引起或加重肺损伤<sup>[7]</sup>。

RAGE 为免疫球蛋白超家族成员,可表达于单核/巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、肾系膜细胞、成纤维细胞及心肌细胞等。在人体内,RAGE 呈低水平表达;当细胞处于激活或应激状态时,受损细胞中 RAGE 表达增高,激活细胞内信号转导通路,发挥病理效应<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,20%牵张应变(相当于大潮气量通气)可以显著增加 RAGE 蛋白和 mRNA 的表达。

p38 是丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)家族中的一个成员,有 4 个亚型,即 p38 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ ,不同亚型的分布具有一定的组织特异性及不同的生物学功能<sup>[9]</sup>。p38 上游激酶是 MKK6,该通路与炎症、应激反应的调控密切相关,既往研究表明,MAPK 信号通路在机械刺激诱导细胞炎症反应中发挥重要作用。目前研究信号通路最常用的方法是应用特异性抑制剂拮抗该通路中激酶的活性,观察对某种病理生理学过程的影响。但是,p38 激酶抑制剂对其不同亚型皆具有抑制活性,而对于 MAPK 不同成员的区别能力也不完善<sup>[10]</sup>,单独应用抑制剂的方法不能确定何种亚型在介导 RAGE 表达中起主要作用。此时,用单一亚型基因突变体转染的方法可以克服抑制剂方法的不足。

蛋白激酶级联的信号传递是通过蛋白质的磷酸化来完成的<sup>[11]</sup>。导入 MKK 的组成性活性突变体可以持续激活细胞内 MAPK 通路,而导入 p38 无活性突变体则可阻断 MAPK 通路,这些突变体可用于 MAPK 通路的功能研究或相关的基因治疗<sup>[6]</sup>。

本研究中应用脂质体介导的基因转染方法将 MKK6b 的活性突变体和 p38 $\alpha$  的无活性突变体导入 A549 细胞,得到具有 p38 $\alpha$  激酶持续活性和无活性的瞬时表达细胞株,观察 p38 $\alpha$  通路在牵张应变诱导 RAGE 表达中的作用。结果发现,MKK6b 基因

转染可激活 p38 $\alpha$  激酶,继而上调牵张应变诱导的 RAGE 表达;而 p38 $\alpha$  活性的丧失可以抑制牵张应变诱导的 RAGE 表达。上述结果表明,MKK6 p38 $\alpha$  信号通路在牵张应变诱导 A549 细胞表达 RAGE 过程中起重要作用。

#### 参考文献

- [1] 丁宁,许立新,郑彬,等.体外培养大鼠肺泡巨噬细胞周期性牵张模型的建立及其炎症介质的变化.中华生物医学工程杂志,2008,14(1):18-21.
- [2] 冯丹,姚尚龙,尚游,等.大鼠机械通气所致肺损伤时 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路的激活.中国危重病急救医学,2007,19(2):77-80.
- [3] 丁宁,肖慧,高巨,等.晚期糖基化终产物受体胞外段的原核表达及其相互作用蛋白的筛选.中国药理学通报,2009,25(4):492-496.
- [4] Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(9): 1008-1015.
- [5] 丁宁,肖慧,高巨,等.P38 及上游激酶 MKK6 对周期性牵张应变诱导的肺泡巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1 表达的调控.生理学报,2009,61(1):49-55.
- [6] 王烁,李毅贤,李春盛.机械通气对全身炎症反应综合征患者血管内皮功能的影响.中国危重病急救医学,2007,19(3):168-171.
- [7] Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, et al. Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. Anesthesiology, 2008, 109(3):465-472.
- [8] Rauvala H, Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin), roles in health and disease. Curr Mol Med, 2007, 7(8):725-734.
- [9] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene, 2007, 26(22):3100-3112.
- [10] Cao J, Semenova MM, Solovyan VT, et al. Distinct requirements for p38 $\alpha$  and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death. J Biol Chem, 2004, 279(34):35903-35913.
- [11] de la Fuente van Bentem S, Mentzen WI, de la Fuente A, et al. Towards functional phosphoproteomics by mapping differential phosphorylation events in signaling networks. Proteomics, 2008, 8(21):4453-4465.

(收稿日期:2009-03-27) (本文编辑:李银平)

#### • 书讯 •

##### 《心血管疾病诊治关键流程》(中文版原书第 2 版)

由[美]Christopher P. Cannon 和[美]Patrick T. O'Gara 主编,卢才义、张亚晶等翻译的《心血管疾病诊治关键流程》(中文翻译版,原书第 2 版)一书于 2009 年 4 月在科学出版社出版,本书为心血管疾病患者的入院前、急诊科治疗、门诊治疗、住院治疗及提供了以证据为基础并综合考虑成本及效益关系的重要流程。同时,本书充分反映了心血管领域最新的研究成果及心血管疾病预防的最佳方案和最新流程。该书对急诊科医护人员、心血管内外科医师、保健医师具有重要的参考价值。

各地新华书店及医学专业店有售,定价:158.00 元。邮购电话:010-64034601,64019031;地址:100717 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社医学中心 温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。

