

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.010

脑缺血大鼠肺组织 NGF/TrkA 表达变化及其意义*

顾晓燕¹ 杜强^{2Δ} 潘化平¹ 冯慧¹ 付娟¹ 梅程瑶¹ 纪纤¹ 张保国¹

(1 南京医科大学附属江宁医院康复医学科 江苏南京 211100;

2 南京医科大学第二附属医院呼吸内科 江苏南京 210011)

摘要 目的:探讨大鼠脑缺血后肺组织神经生长因子(nerve growth factor, NGF)/酪氨酸蛋白激酶 A(tropomyosin-related kinase A, TrkA)表达的变化。**方法:**成年雄性大鼠随机分为假手术组和脑缺血后 6 h、24 h 及 48 h 组,每组 8 只。建立大鼠中动脉永久性局灶性缺血模型,术后于各时间点麻醉处死大鼠后,测定肺组织湿重/干重(W/D),光镜下观察 HE 染色肺组织病理学改变;Western blot 法检测肺组织 NGF、TrkA 蛋白表达。**结果:**与假手术组相比,脑缺血后 6 h 肺组织 W/D 有增加,差异无统计学意义($P>0.05$),而脑缺血后 24 h 及 48 h 肺组织 W/D 均有显著增高($P<0.05$),其中以 24 h 组最明显($P<0.01$);脑缺血后 6 h 肺组织出现轻度充血、水肿及炎性改变,24 h 及 48 h 组肺泡结构破坏明显。病理学评分结果显示,脑缺血后 24 h 及 48 h 组大鼠肺组织病理评分较假手术组显著升高($P<0.05$);Western blot 法显示,脑缺血 6 h 肺组织中 NGF 表达增加($P<0.05$),48 h 时表达有下降趋势,但仍高于假手术组($P<0.05$)。而肺组织中 TrkA 表达在脑缺血 6 h 有下降($P>0.05$),24 h 下降明显($P<0.05$),48 h 时 TrkA 蛋白表达虽有上升,仍显著低于假手术组($P<0.05$)。**结论:**大鼠肺组织 NGF/TrkA 的动态变化可能参与了脑缺血后肺损伤的病理生理过程。

关键词:NGF; TrkA; 脑缺血; 肺损伤

中图分类号:R-33; R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-255-04

Dynamic Expressions of Nerve Growth Factor and Its Tyrosinekinase A Receptor in Lung Tissue of Rats with Lung Injury Induced by Cerebral Ischemia*

GU Xiao-yan¹, DU Qiang^{2Δ}, PAN Hua-ping¹, FENG Hui¹, FU Juan¹, MEI Cheng-yao¹, JI Xian¹, ZHANG Bao-guo¹

(1 Department of Rehabilitation, The Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China;

2 Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the dynamic expressions of nerve growth factor (NGF). And its tyrosinekinase A (TrkA) receptor in lung tissue of rats with cerebral ischemia. **Methods:** Thirty two adult male SD rats were randomly divided into four groups using a random number table (n = 8each): Sham-operated group, Cerebral ischemia group (6 h, 24 h, 48 h). We established a rat model of cerebral ischemia by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). At different time points after pMCAO, the rats were sacrificed and lung tissues were excised for analysis of wet/dry (W/D) weight ratio and HE examination. At the same time, the expression of NGF and TrkA in lung tissues were detected by Western Blot analysis. **Results:** Compared with sham-operated group, W/D of lung tissue increased significantly at 24h and 48h after cerebral ischemia ($P<0.05$), especially in 24 h group ($P<0.01$). Mild hyperemia, edema and inflammatory changes were observed in lung tissue at 6 hours after cerebral ischemia. While the destruction of alveolar structure was obvious at 24 and 48 hours after cerebral ischemia. The pathological score of lung tissues in 24 and 48 hours was significantly higher than that in sham-operated group ($P<0.05$). Interestingly, the expression of NGF in lung tissue increased at 24 h after cerebral ischemia ($P<0.05$), but decreased at 48h, which still higher than that in sham-operated group ($P<0.05$); TrkA began to decrease at 6 h after cerebral ischemia ($P>0.05$), decreased significantly at 24 h ($P<0.05$), and increased at 48 h, but still significantly lower than that in sham-operated group ($P<0.05$). **Conclusion:** The dynamic changes of NGF/TrkA in rat lung tissue may be involved in the pathophysiological process of lung injury after cerebral ischemia.

Key words: NGF; TrkA; Cerebral ischemia; Acute lung injury

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-255-04

* 基金项目:南京市江宁区科技发展计划项目(2018C056);江苏省第十二批六大人才高峰项目(WSN015)

作者简介:顾晓燕(1974-),女,博士,副主任医师,主要研究方向:呼吸系统疾病治疗及康复,

电话:15150586309, E-mail: guxiaoyan05@163.com

Δ 通讯作者:杜强(1974-),男,博士,主任医师,主要研究方向:呼吸系统疾病诊断与治疗,电话:18951872628, E-mail: jingshuyue@163.com

(收稿日期:2019-06-23 接受日期:2019-07-18)

前言

近年研究发现,脑缺血显著增加急性肺损伤(acute lung injury,ALI)的发生率^[1-3],极大提高了患者的致残率和致死率,但其发病机制尚不清楚。目前认为卒中后诱发的机体免疫炎症反应为发生 ALI 的危险因素^[4,5]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是神经营养因子家族重要成员之一,酪氨酸激酶 A (tropomyosin-related kinase A, TrkA)是其高亲和力受体。TrkA 与 NGF 结合后主要介导神经细胞生长、存活等^[6]。最新研究显示,NGF/TrkA 作为重要的神经、免疫可塑性的双重调控介质,亦存在于呼吸系统,参与相关疾病的调控^[7,8]。NGF/TrkA 是否参与调节脑缺血后急性肺损伤的病理生理过程有待明确。本研究通过建立脑缺血大鼠模型,观察肺组织病理改变及 NGF/TrkA 在肺组织中的表达变化,以探讨 NGF/TrkA 在脑缺血后 ALI 发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,体重 200~220 g,购自上海杰斯捷动物有限公司,实验由医院动物实验伦理和福利委员会审批通过。随机将大鼠分为假手术组、脑缺血 6 h 组、24 h 组和 48 h 组(分别于缺血后 6、24 及 48 h 处死动物,检测相关指标),每组 8 只。

1.2 主要试剂及设备

BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物公司;兔抗 NGF、TrkA 多克隆抗体及 DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物科技有限公司;光学显微镜(日本 Nikon, eclipse 80i);图像积分光密度测量采用 IPP6.0 图像分析软件。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠脑缺血模型建立 参照文献^[9]方法制作大鼠中动脉永久性缺血损伤大鼠模型(pMCAO)。术前大鼠禁食 12 h,可自由饮水。10%水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔注射麻醉大鼠后,仰卧位固定,常规消毒,颈部正中切口。分离出右侧颈总及颈内外动脉分支,结扎颈总及颈外动脉,颈内动脉远心端用动脉夹夹闭后,在颈总动脉分叉距颈内动脉 0.5 cm 处切开 1 个小口,将尼龙线导入颈内动脉,调整角度,以使线栓进入脑膜中动脉并将其堵塞,最后止血,缝合肌层和皮肤。假手术组采用相同的手术步骤,但不插入线栓。术后将动物置于清洁垫料的鼠笼中,室温控制在 22~25℃,自由进食,饮水。依据 Zea Longa 5 级评分法,1~3 分大鼠入选后续实验。

1.3.2 标本采集 在各观察时间点以 10%水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定,经心脏采血后立刻断头处死大鼠,取出全肺,左肺用以肺组织含水量测定;右肺上、中叶组织用 4%多聚甲醛固定;将右肺下叶组织分装入冻存管,放入 -80℃冰箱保存备用。

1.3.3 肺组织湿/干比值测定 取左肺组织,滤纸吸干表面水分后称重,即为湿重(W),然后用 100℃红外线烤箱烘烤 24 h,取出称干重(D)。肺组织湿/干重比值为 W/D。

1.3.4 HE 染色观察肺组织病理改变 部分右肺组织经 4%多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋组织,切片、HE 染色,光镜下观察

各组大鼠肺毛细血管淤血、肺泡腔蛋白渗出、炎性细胞浸润、肺泡间隔增厚和小气道损伤等病理改变情况,并进行肺损伤病理评分(每组取 6 张切片,每张切片取 5 个视野)。

1.3.5 Western blot 检测肺组织 NGF/TrkA 蛋白表达 预冷 RIPA 裂解液裂解大鼠肺组织,12000× g 离心 20 min 收取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量测定。取各组样品 50 μg 上样,15% SDS-PAGE 进行电泳,分离蛋白质,将蛋白转移至 PVDF 膜上。3%的 BSA 常温封闭 2 h,分别用含 NGF、TrkA 蛋白一抗和 β-actin 的 1%BSA TBST 缓冲液孵育 4℃过夜, TBST 洗膜 3 次,二抗孵育 2 h, TBST 洗膜后, ECL 化学发光法进行观察,软件进行灰度扫描,测定光密度值,以目标条带与 β-actin 密度比值反映蛋白相对含量,进行组间比较。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

脑缺血各时点组大鼠精神萎靡,呼吸频率增快,呈现神经功能障碍,神经功能缺损评分均高于假手术组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm SD$)

Table 1 Comparison of neurological functional deficit score in each group ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	n	Score
Sham-operated group	8	0.10± 0.03
Cerebral ischemia group (6h)	8	1.08± 0.36*
Cerebral ischemia group (24h)	8	3.39± 0.57*
Cerebral ischemia group (48h)	8	2.21± 0.42*

Note: Compared with the Sham-operated group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 各组大鼠肺组织 W/D 比较

与假手术组相比,大鼠脑缺血 6 h 组肺组织 W/D 有增加,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),脑缺血后 24 h 及 48 h 肺组织 W/D 均显著增高 ($P < 0.05$),其中以 24 h 组最明显 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 各组大鼠肺组织 HE 染色结果比较

肺组织 HE 染色光镜下:假手术组肺泡结构清晰,肺泡间隔无增厚及炎性细胞浸润,肺泡腔内有少量渗出物,肺血管轻微充血;大鼠脑缺血 6 h 组肺泡壁毛细血管充血,肺泡开始有渗出,少许炎性细胞浸润;脑缺血 24 h 组及 48 h 组肺泡间隔增厚、肺泡结构破坏及炎性细胞浸润(图 1)。病理学评分结果显示,脑缺血 24 h 及 48 h 组大鼠肺组织病理评分均较假手术组有显著升高 ($P < 0.05$),以 24 h 组明显 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.4 各组大鼠肺组织 NGF 蛋白表达比较

与假手术组相比,脑缺血 6 h 组大鼠肺组织 NGF 蛋白表达上升,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);脑缺血 24 h 组肺组织中 NGF 表达显著增加 ($P < 0.05$),48 h 组表达有下降趋势,但仍高于假手术组 ($P < 0.05$)。见图 2。

表 2 各组大鼠肺组织 W/D 比较($\bar{x} \pm SD$)

Table 2 Comparison of the W/D of lung tissues in each group ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	n	W/D
Sham-operated group	8	4.06± 0.94
Cerebral ischemia group (6h)	8	5.17± 1.15
Cerebral ischemia group (24h)	8	8.92± 1.36 [#]
Cerebral ischemia group (48h)	8	7.03± 1.48*

Note: Compared with the Sham-operated group, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$.

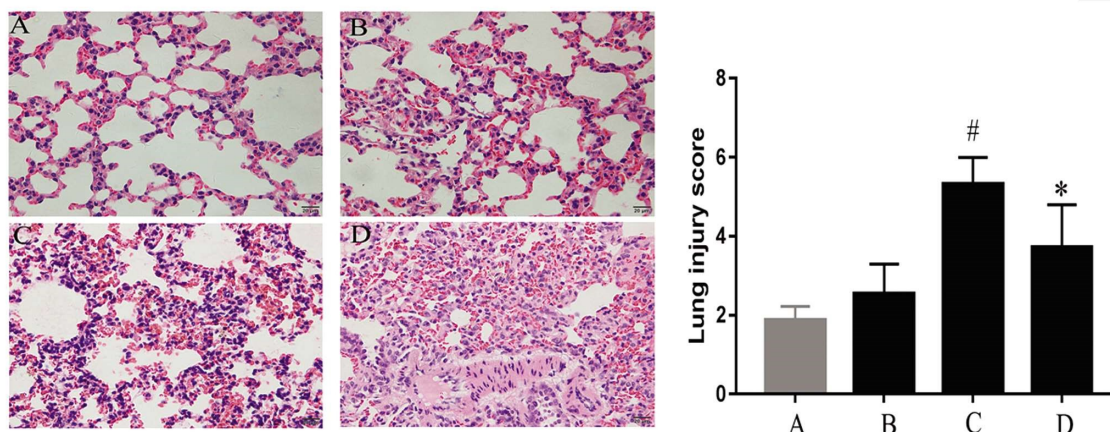


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色($\times 100$)及病理评分结果比较

Fig. 1 HE staining ($\times 100$) of lung tissue and lung injury score in different groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. A: Sham-operated group, B: Cerebral ischemia group (6 h),

C: Cerebral ischemia group (24 h), D: Cerebral ischemia group (48 h). * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$, compared with Sham-operated group (A).

2.5 各组大鼠肺组织 TrkA 蛋白表达比较

由图 3 所示,与假手术组相比,脑缺血后 6 h 肺组织 TrkA 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$),24 h 组 TrkA 蛋白表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),48 h 组 TrkA 蛋白表达有所上升,但仍明显低于假手术组($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验中,永久性线栓大鼠大脑中动脉后 24 h 及 48 h,大鼠肺组织 W/D 比值显著高于假手术组,肺组织病理学检查可见炎性细胞浸润、肺泡水肿、肺间质淤血增宽等肺损伤征象,均提示脑缺血后出现肺损伤。

NGF 为免疫细胞与神经细胞之间的双向信号分子。NGF 有两种受体:低亲和力受体 p75 和高亲和力受体 trkA。其中, trkA 是 NGF 的功能性受体,NGF 与其结合后,通过 PI3K 激活、AKT 磷酸化和核/胞浆穿梭、转录因子激活等一系列过程促进神经细胞生长、维持神经细胞的存活等^[6,10]。近年来研究显示,NGF 与 TrkA 亦表达于肺组织结构细胞及炎性细胞,可影响内皮细胞、血管平滑肌细胞、肺泡巨噬细胞等的存活和生理功能^[8,11,12]。炎症环境可以通过改变 NGF 和其受体 TrkA 的表达及活性,进而影响肺部疾病的病理生理过程。

有研究推测,NGF 具有促炎作用,局部组织中的 NGF 浓度似乎是与炎症程度和/或临床严重程度相关^[13,14]。然而近年来研究认为,NGF 与抗炎、组织修复和纤维化有关^[15,16]。通过对多发性硬化、结肠炎和紫外线照射等动物模型的研究发现,NGF

体内给药可以改善疾病的严重程度,减轻组织炎症和免疫细胞浸润,增加抗炎介质 IL-10 的产生^[17,18]。体外研究也发现,NGF 与 TrkA 结合后抑制 TLR 活化单核细胞产生炎性细胞因子 TNF- α , IL-6 和 IL-8,诱导 IL-10 的产生^[19]。而 TrkA 抑制剂显著

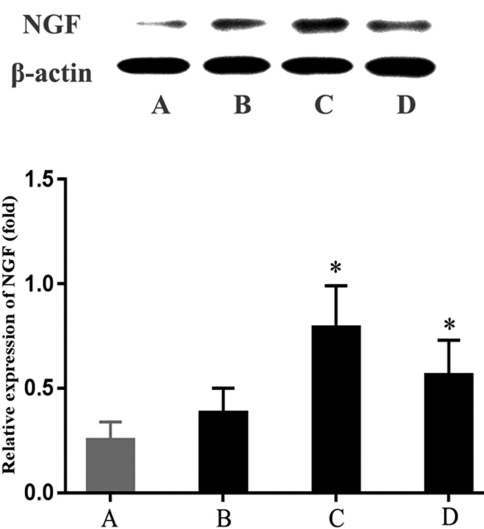


图 2 各组大鼠肺组织 NGF 蛋白表达比较

Fig. 2 The expression of NGF in lung tissues from different group (Western blot)

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. A: Sham-operated group, B: Cerebral ischemia group (6 h), C: Cerebral ischemia group (24 h), D: Cerebral ischemia group (48h). * $P < 0.05$, compared with Sham-operated group (A).

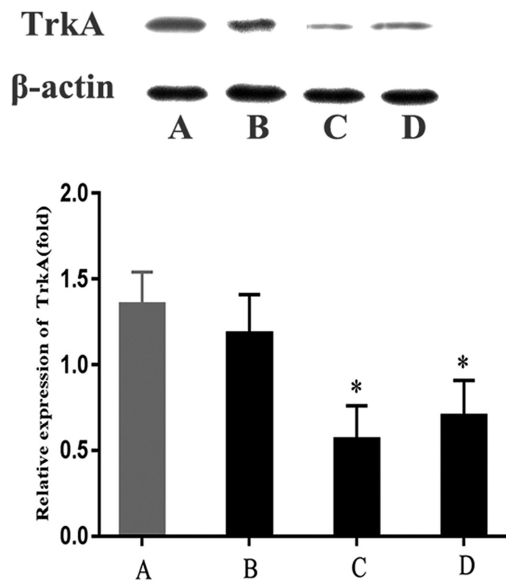


图 3.各组大鼠肺组织 TrkA 蛋白表达比较

Fig. 3 The expression of TrkA in lung tissues from different group (Western blot)

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. A: Sham-operated group, B: Cerebral ischemia group (6 h), C: Cerebral ischemia group (24 h), D: Cerebral ischemia group (48h). * $P < 0.05$, compared with Sham-operated group (A).

削弱 NGF 的这种抗炎作用。由此提示, NGF 可能通过 TrkA 调节下游通路从而发挥抗炎等保护作用。

本实验通过对大鼠脑缺血肺损伤模型的研究发现, 与假手术组相比, 脑缺血 12 h 时 NGF 即有增加, 24 h 及 48 h 时增高显著。提示脑缺血应激所诱发的肺组织 NGF 表达增加可能是机体的内源性保护机制, 然而大鼠脑缺血后肺组织 NGF 的高表达并未减轻肺组织损伤程度。进一步研究发现, 脑缺血后肺组织 TrkA 蛋白有表达下降, 说明 NGF 在肺组织中虽然以高浓度存在, 但其保护作用可能因 TrkA 下调而受影响。因此, TrkA 表达的降低可能打破了促炎和抗炎之间的不平衡, 并通过负反馈持续刺激早期 NGF 升高。而 NGF 的持续升高可能诱导低亲和受体 p75 的表达^[15]。目前对 p75 在 NGF 信号传导中的作用还不清楚。p75 是否通过调节 TrkA 的活性来介导 NGF 参与脑缺血肺损伤反应是我们下一步实验拟解决的问题。

综上, 本研究发现, 脑缺血可诱发肺损伤, 其机制可能与组织中 NGF/TrkA 信号传导通路异常有关, 而对该通路的调节将可能有助于减轻脑缺血引起的肺损伤。

参考文献(References)

[1] He QQ, He X, Wang YP, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) improves brain ischemia-induced pulmonary injury in rats associated to TNF- α expression [J]. Behav Brain Funct, 2016, 12(1): 1-14

[2] Arruza L, Pazos MR, Mohammed N, et al. Hypoxic-ischemic brain damage induces distant inflammatory lung injury in newborn piglets [J]. Pediatr Res, 2016, 79(3): 401-408

[3] Xu FF, Zhang ZB, Wang YY, et al. Brain-Derived Glia Maturation Factor β Participates in Lung Injury Induced by Acute Cerebral Ischemia by Increasing ROS in Endothelial Cells [J]. Neuroscience

Bulletin, 2018, 34(6): 1077-1090

[4] Winklewski PJ, Radkowski M, Demkow U. Cross-talk between the inflammatory response, sympathetic activation and pulmonary infection in the ischemic stroke [J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 213

[5] James, Nijkamp. Neuro-immune interactions in the lung[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2010, 29(10): 1309-1319

[6] Duan L, Hope JM, Guo S, et al. Optical activation of TrkA signaling [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(7): 1685-1693

[7] Freund-Michel V, Frossard N. Overexpression of functional TrkA receptors after internalization in human airway smooth muscle cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(10): 1964-1971

[8] Prakash Y, Thompson MA, Meuchel L, et al. Neurotrophins in lung health and disease[J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(3): 395-411

[9] Ansari S, Azari H, McConnell DJ, et al. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in mice[J]. J Vis Exp, 2011, 8(51): 2879

[10] Yu T, Calvo L, Anta B, et al. Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions [J]. Traffic, 2011, 12(4): 521-534

[11] Audrit KJ, Delventhal L, Aydin Ö, et al. The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3): 571-590

[12] Freund-Michel V, Coste F, Dubois M, et al. NGF contributes to medial and intimal remodelling of pulmonary arteries in pulmonary hypertension: receptors and signalling pathways involved in smooth muscle and endothelial cell proliferation [J]. Arch Cardiovasc Dis Suppl, 2014, 6: 76

[13] Wu X, Zhou X, Hu Y, et al. Neutralization of nerve growth factor (NGF) inhibits the Th2 response and protects against the respiratory syncytial virus (RSV) infection[J]. Immunologic Research, 2017, 65 (3): 1-8

[14] Kritas S K, Saggini A, Cerulli G, et al. Neuropeptide NGF mediates neuro-immune response and inflammation through mast cell activation[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2014, 28(2): 177-181

[15] Bracci-Laudiero L, Aloe L, Buanne P, et al. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?[J]. J Neuroimmunol, 2002, 123(1): 58-65

[16] Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, et al. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair [J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98(11): 6162-6167

[17] Barada KA, Mourad FH, Sawah SI, et al. Up-regulation of nerve growth factor and interleukin-10 in inflamed and non-inflamed intestinal segments in rats with experimental colitis [J]. Cytokine, 2007, 37(3): 236-245

[18] Townley SL, Grimbaldeston MA, Ferguson I, et al. Nerve growth factor, neuropeptides, and mast cells in ultraviolet-B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(3): 396-401

[19] Principe G, Minnone G, Strippoli R, et al. Nerve growth factor downregulates inflammatory response in human monocytes through TrkA[J]. J Immunol, 2014, 192(7): 3345-3354