

P38与ERK在慢性低氧高二氧化碳小鼠 骨骼肌凋亡中的作用

宋菁 李军 闵晶晶 金露 王小同*

(温州医学院附属第二医院脑科、康复中心, 温州 325000)

摘要 探讨P38与ERK信号通路在慢性低氧高二氧化碳小鼠骨骼肌凋亡中的作用。该研究将造模组小鼠置于低氧高二氧化碳舱内, 氧浓度9%~11%, 二氧化碳浓度5%~6%, 每天8小时, 每周6天, 共4周。称量小鼠体重; 观察骨骼肌细胞形态及线粒体结构; 检测骨骼肌线粒体和胞浆内Cyt C和AIF含量; 检测*Bad* mRNA、*Bcl-xl* mRNA、p-P38蛋白与p-ERK蛋白的表达。结果显示, 造模组小鼠体重减轻; 骨骼肌纤维断裂, 脂肪沉积; 线粒体膜部分破坏, 嵴排列紊乱; 线粒体内Cyt C、AIF含量降低, 胞浆内Cyt C、AIF含量升高; *Bad* mRNA表达增多, 而*Bcl-xl* mRNA表达减少; p-P38蛋白与p-ERK蛋白表达增多。因此, 慢性低氧高二氧化碳导致小鼠骨骼肌凋亡, 可能与激活P38与ERK信号通路, 促进Bad活化, 抑制Bcl-xl活化, 从而促进Cyt C、AIF释放到胞浆, 最终导致凋亡有关。

关键词 凋亡; 低氧; 高二氧化碳; 小鼠; 骨骼肌; p-P38; p-ERK

The Role of P38 & ERK in Apoptosis of Skeletal Muscle of Chronic Hypoxia-hypercapnia Mice

Song Jing, Li Jun, Min Jingjing, Jin Lu, Wang Xiaotong*

(Center of Neurology and Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of
Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325000, China)

Abstract To investigate the role of P38 and ERK in apoptosis of skeletal muscle of chronic hypoxia-hypercapnia mice. The hypoxia hypercapnia group mice were placed in a sealed chamber, where O₂ concentration maintained at 9%~11%, and CO₂ concentration maintained at 5%~6%, for 8 hours a day, 6 days a week, 4 weeks. The weight of mice was weighted. The cell morphology and the mitochondrial structure of skeletal muscle were observed. The content of Cytochrome C and apoptosis-inducing factor in the mitochondria and in the cytoplasm was determined. The expression of *Bad* mRNA, *Bcl-xl* mRNA, p-P38 protein and p-ERK protein was detected. The results showed that the HH group mice had lost weight. There was fibers fracture and fat deposition in the HH group mice. The mitochondrial membrane was partially destroyed, and the cristae was disorganized. The content of Cyt C and AIF in the mitochondria was reduced, while the content of Cyt C and AIF in the cytoplasm was increased. The expression of *Bad* mRNA was increased, while the expression of *Bcl-xl* mRNA was decreased. The expression of p-P38 protein and p-ERK protein was increased. Thus, apoptosis of skeletal muscle of mice was induced by chronic hypoxic hypercapnia. P38 and ERK signaling pathway might be in the process of apoptosis, by activating the Bad, inhibiting the Bcl-xl and promoting Cyt C and AIF releasing into the cytoplasm.

Key words apoptosis; hypoxia; hypercapnia; mouse; skeletal muscle; p-P38; p-ERK

收稿日期: 2012-11-27 接受日期: 2013-01-09

浙江省自然科学基金(批准号: Y2080503)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699362, E-mail: wangxiaotong22@163.com

Received: November 27, 2012 Accepted: January 9, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y2080503)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699362, E-mail: wangxiaotong22@163.com

网络出版时间: 2013-03-28 17:01 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1701.001.html>

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种气流受限为特征的肺部疾病,气流受限不完全可逆,呈进行性发展。根据WHO报告,在2001年COPD是导致死亡的第五大因素,2020年将会上升为第三大因素^[1]。慢性阻塞性肺疾病是一种对健康状况产生负面影响的疾病,部分慢性阻塞性肺疾病患者出现骨骼肌功能障碍,如肌力下降、肌耐力下降,同时伴有肌纤维萎缩、纤维类型改变,从而影响生活质量^[2],甚至影响生存时间。我们前期研究已发现,在慢性低氧高二氧化碳条件下,小鼠骨骼肌形态改变,凋亡指数升高^[3-4]。本实验采用慢性低氧高二氧化碳动物模型模拟COPD的疾病过程,探讨凋亡在COPD引起骨骼肌萎缩的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年SPF级雄性C57BL/6小鼠32只(由上海斯莱克动物提供,SCXK(沪)2007-2005),体重20~25 g,剪趾标号,按随机数字表法分为2组:正常对照组(normal control group, NC)($n=16$)和造模组,即低氧高二氧化碳组(hypoxia hypercapnia group, HH)($n=16$)。

1.2 仪器与设备

动物实验复合模拟舱、KD-TS3A型生物组织自动脱水机、KD-BMIII电脑生物组织包埋机、KD-BLIII包埋机冷冻台、H-600型透射电镜、Olympus显微镜、Denley Dragon Wellscan MK 3酶标仪、Wellwash 4 MK2洗板机、LithtCycler480实时定量PCR仪。

1.3 模型建立

参照包绍智等^[3-4]的实验模型建立低氧高二氧化碳动物模型,HH组置于低氧高二氧化碳舱中(O_2 浓度为9.0%~11.0%, CO_2 浓度为5.0%~6.0%),每天8 h,每周6天,共4周,其余时间与NC组在同一室内(室温20~23 °C,相对湿度50%~70%),NC组生活在正常大气环境中,饲养条件2组相同。

1.4 体重测量

以造模组造模前一天16:00时间点称量的体重为造模前体重,按上述方法饲养4周,以造模组4周造模结束后16:00时间点称量的体重为造模后体重,最后计算小鼠体重差。

1.5 骨骼肌组织取材

造模结束后,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉小

鼠,仰卧固定,迅速分离,取左右两侧股外侧肌,2组中各8只小鼠两侧股外侧肌提取线粒体,左侧透射电镜观察小鼠骨骼肌线粒体结构,右侧用于ELISA检测线粒体和胞浆细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C)和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF),余下各8只小鼠,左侧股外侧肌经液氮冷冻后放入-80 °C冰箱保存,用于Real-time PCR检测,右侧股外侧肌用4%多聚甲醛固定,用于HE染色观察骨骼肌形态和免疫组化检测。

1.6 提取线粒体

根据线粒体提取试剂盒说明书,将股外侧肌冲洗、研磨、离心、弃上清液,沉淀物加BSA/A液,振荡、孵育、加B液、振荡、孵育、加C液、离心、弃沉淀、将上清转移到2 mL新管中,离心、取出上清液(即胞浆),沉淀中加洗涤缓冲液,离心、弃上清液,得到线粒体沉淀,在沉淀中加入200 μ L线粒体保护液制成线粒体悬液。

1.7 透射电镜切片的制备和观察

提取的线粒体,以2.5%戊二醛电镜专用固定液固定2 h, PBS 缓冲液冲洗1次,1%锇酸后固定60 min,行常规脱水、浸透、包埋、超薄切片、铅铀染色。H-600型透射电镜观察骨骼肌线粒体形态。

1.8 光镜切片的制备和观察

组织经4%多聚甲醛固定,常规脱水、透明、石蜡包埋,5 μ m切片。HE染色切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗,苏木素染色10 min,以1%盐酸酒精分化3 s,流水冲洗返蓝25 min,0.5%伊红染色30 s,行常规脱水、封片。免疫组化:切片脱蜡,经各级乙醇至水洗,高压修复,灭活内源性酶,山羊血清封闭,加一抗,过夜,复温,加二抗,DAB显色,行常规脱水、封片。最后用Olympus显微镜观察拍片。

1.9 ELISA法线粒体和胞浆内Cyt C和AIF含量

BCA蛋白定量法检测线粒体和胞浆内的蛋白浓度,线粒体内取最小值4 mg/mL,用线粒体保护液把每个标本稀释到4 mg/mL,胞浆内取最小值5 mg/mL,用PBS把每个标本稀释到5 mg/mL。按照说明书操作步骤,酶标仪上450 nm波长检测各孔的光密度值(D 值)。用Ascent software for Multiskan分析软件,以 D 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标绘制标准曲线,根据样本的 D 值在标准曲线上读出样本中所测物质的量。

1.10 Real-time PCR检测Bad、Bcl-xl mRNA的表达

用Trizol抽提总mRNA,提取1 μ L RNA样品,采用

紫外分光光度法测定RNA纯度, 要求比值在1.8~2.0之间。根据逆转录试剂盒说明书操作, 进行逆转录。*Bad*引物序列上游: 5'-TTG AGC CGA GTG AGC AGG AA-3', 下游: 5'-CCC GCT GGG TAC GAA CTG T-3'; *Bcl-xl*引物序列上游: 5'-GAG AGA GGC AGG CGA TGA TGA GT-3', 下游: 5'-GCA TTG TTC CCG TAG AGA T-3'; 采用 β -*actin*作为内参, 上游引物序列: 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3', 下游序列: 5'-GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC G-3'。用LightCycler 480 PCR仪检测。Ct为每个反应管内荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。记录LightCycler 480软件中各指标与内参Ct比值。

1.11 统计学分析

用SPSS 20.0统计软件进行分析。数据经检验符合正态分布, 用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本t检验; 小鼠体重差值经检验不符合正态分布, 采用非参数检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重

造模4周后, NC组体重为(24.78 \pm 0.75) g, HH组体重为(20.18 \pm 0.54) g, HH组体重低于NC组, 体重差值差异有统计学意义($P<0.01$, 表1)。

表1 NC组与HH组小鼠体重($\bar{x}\pm s$, $n=16$)

Table 1 Weight of NC group and HH group($\bar{x}\pm s$, $n=16$)

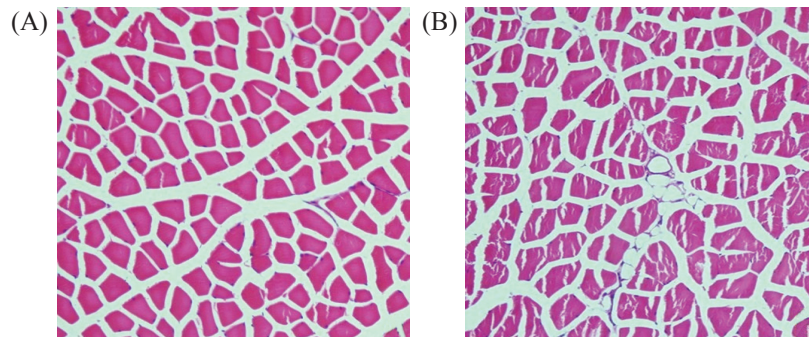
组别 Group	造模前体重(g) Before weight(g)	造模后体重(g) After weight(g)
NC group	19.89 \pm 0.33	24.78 \pm 0.75
HH group	19.74 \pm 0.46	20.18 \pm 0.54

2.2 骨骼肌细胞结构

NC组小鼠骨骼肌肌纤维形态正常(图1A); HH组小鼠骨骼肌肌纤维排列紊乱、断裂, 局部萎缩, 脂肪沉积(图1B)。

2.3 骨骼肌线粒体结构

NC组线粒体结构完整, 内外膜完整, 嵴存在, 排

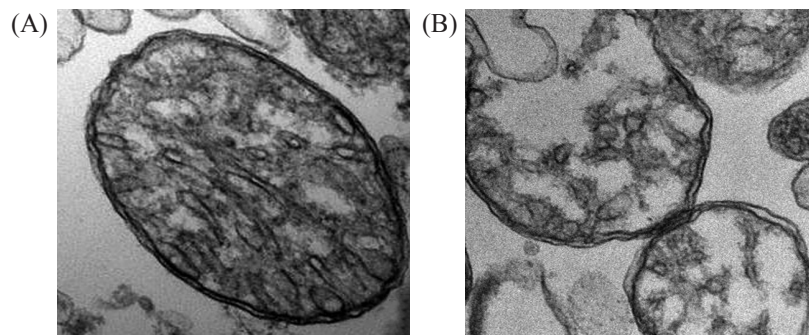


A: 对照组; B: 造模组。

A: NC group; B: HH group.

图1 HE染色骨骼肌形态(200 \times)

Fig.1 Structure of skeletal muscle detected by HE staining(200 \times)



A: 对照组; B: 造模组。

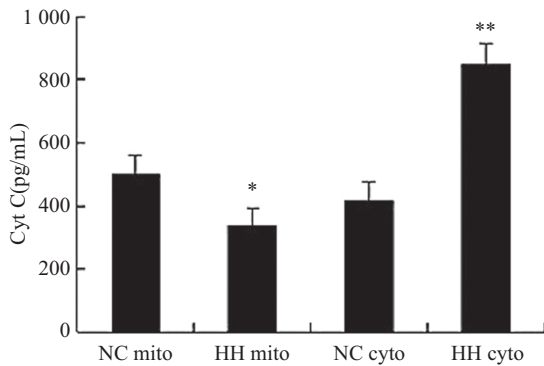
A: NC group; B: HH group.

图2 线粒体结构(100 000 \times)

Fig.2 Mitochondria structure(100 000 \times)

列基本整齐(图2A); HH组线粒体膜部分破坏, 嵴排列紊乱, 部分消失(图2B)。

2.3.1 骨骼肌Cyt C的含量 骨骼肌线粒体内Cyt C含量, NC组(498.84±63.39) pg/mL, HH组(333.08±61.12) pg/mL, 差异有统计学意义($P<0.01$); 胞浆内Cyt C含量, NC组(412.77±62.10) pg/mL, HH组(848.09±69.42) pg/mL, 差异有统计学意义($P<0.01$, 图3)。



* $P<0.01$, 与对照组线粒体内比较; ** $P<0.01$, 与对照组胞浆内比较。
* $P<0.01$ vs NC mitochondrial group, ** $P<0.01$ vs NC cytosolic group.

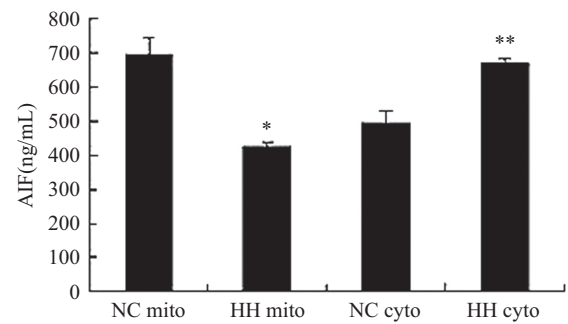
图3 线粒体和胞浆内Cyt C含量

Fig.3 The expression of Cyt C in mitochondrial and cytosolic

2.3.2 骨骼肌AIF的含量 骨骼肌线粒体内AIF含量, NC组(693.67±51.21) ng/mL, HH组(425.83±10.77) ng/mL, 差异有统计学意义($P<0.01$); 浆内AIF含量, NC组(493.55±35.92) ng/mL, HH组(667.72±14.01) ng/mL, 差异有统计学意义($P<0.01$, 图4)。

2.4 *Bad*、*Bcl-xl* mRNA含量

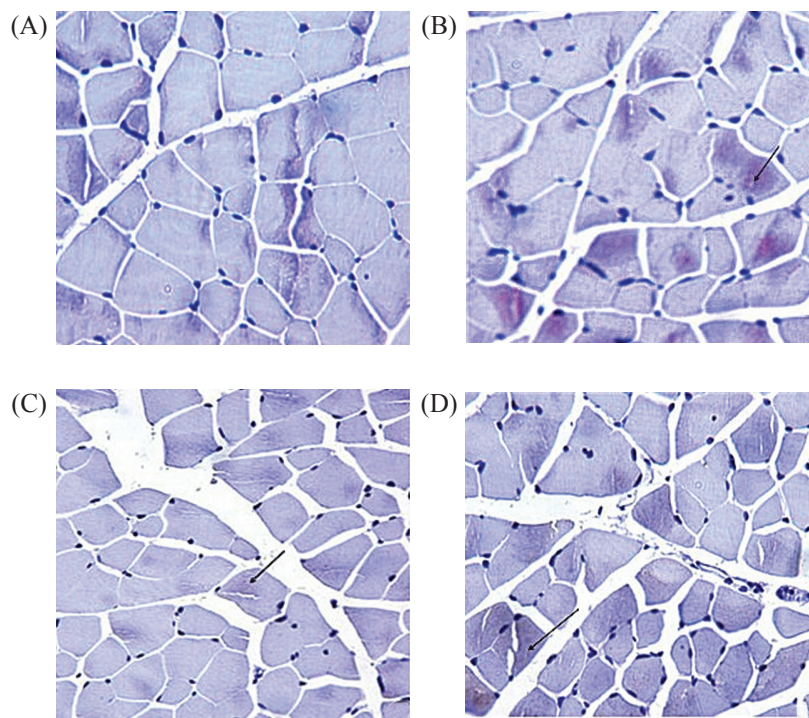
与NC组相比, HH组的*Bad* mRNA呈高表达, 差异有统计学意义($P<0.01$), 而*Bcl-xl* mRNA呈低表达, 差异有统计学意义($P<0.01$, 表2)。



* $P<0.01$, 与对照组线粒体内比较; ** $P<0.01$, 与对照组胞浆内比较。
* $P<0.01$ vs NC mitochondrial group, ** $P<0.01$ vs NC cytosolic group.

图4 线粒体和胞浆内AIF含量

Fig.4 The expression of AIF in mitochondrial and cytosolic



A: p-P38对照组; B: p-P38造模组; C: p-ERK对照组; D: p-ERK造模组。
A: p-P38 of NC group; B: p-P38 of HH group; C: p-ERK of NC group; D: p-ERK of HH group.

图5 免疫组化检测p-P38、p-ERK表达(400×)

Fig.5 The expression of p-38 and p-ERK in skeletal muscle was detected by immunohistochemistry(400×)

表2 *Bad*、*Bcl-xl* mRNA的表达量($\bar{x}\pm s$, $n=8$)Table 2 The expression of *Bad*, *Bcl-xl* mRNA($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

指标 Target	NC组 NC group	HH组 HH group
<i>Bad</i>	0.022±0.004	0.038±0.009*
<i>Bcl-xl</i>	0.028±0.006	0.019±0.003**

* $P<0.01$, 与对照组比较; ** $P<0.01$, 与对照组比较。** $P<0.01$ vs NC group, ** $P<0.01$ vs NC group.

2.5 骨骼肌p-P38、p-ERK蛋白

与NC组相比, HH组中p-P38、p-ERK表达明显增加(图5)。

3 讨论

慢性阻塞性肺疾病是一种全身性疾病,除了肺部表现外,肺外表现如骨骼肌功能障碍也成为近几年的研究热点。骨骼肌病理性改变作为COPD的肺外效应愈来愈受到人们的关注,其原因有很多,如蛋白质分解代谢异常、废用性萎缩、炎症刺激、组织缺氧及皮质激素的使用等,但其具体的分子生物学机制尚未明确^[2]。与单纯吸入低氧的动物模型相比,本实验采用的低氧高二氧化碳的动物模型,较好的模拟人类COPD的病理生理特点,本实验通过检测P38 MAPK与ERK信号通路进一步阐明在慢性低氧高二氧化碳条件下,凋亡是导致小鼠骨骼肌萎缩的主要作用机制之一。

COPD患者的骨骼肌萎缩可能是引起体重下降的主要原因^[2]。本实验发现,造模组的小鼠体重明显低于正常对照组,造模组小鼠骨骼肌纤维排列紊乱、断裂,局部萎缩,脂肪沉积的光镜结果及线粒体膜部分破坏,嵴排列紊乱,部分消失的电镜结果,更好地说明了低氧高二氧化碳造成小鼠骨骼肌萎缩,这可能是造成造模组小鼠体重下降的原因之一。这与我们的前期的实验结果相一致^[4]。

P38是由360个氨基酸残基组成的蛋白,多种因素如紫外线、热休克、促炎因子均能激活P38。在骨骼肌细胞中,P38激活是肌肉特异性基因表达、细胞分化、凋亡的前提^[6]。多种因素能促进ERK自身磷酸化,并抑制Bcl-2、Bcl-xl等抑制细胞凋亡蛋白的表达^[7-8],从而促进凋亡。本实验中造模组骨骼肌中p-P38、p-ERK表达明显增强,提示骨骼肌系统凋亡增强。

Bcl-2家族是目前较公认的与凋亡密切相关的基因,包括促进细胞凋亡蛋白和抑制细胞凋亡蛋白。*Bad*与*Bcl-xl*都属于此家族。在低氧、缺血再灌注、钙超载等应激条件下,Bcl-2家族可以促进线粒体内

的细胞色素C、凋亡诱导因子释放到胞浆,从而激活Caspase途径等凋亡信号途径,最终导致凋亡^[9-12]。本实验中慢性低氧高二氧化碳造成小鼠骨骼肌中*Bad* mRNA表达增多,而*Bcl-xl* mRNA表达减少,线粒体内Cyt C、AIF含量降低,胞浆内Cyt C、AIF含量升高。这些可能与p-P38、p-ERK表达明显增加有关。

综上所述,本实验证实了慢性低氧高二氧化碳导致小鼠骨骼肌凋亡;P38与ERK信号通路参与了该凋亡过程。至于慢性低氧高二氧化碳是否还通过其他机制促进小鼠骨骼肌凋亡,尚有待进一步研究探讨。

参考文献 (References)

- Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, *et al*. International variation in the prevalence of COPD(the BOLD study): A population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370(9589): 741-50.
- Kent BD, Mitchell PD, McNicholas WT. Hypoxemia in patients with COPD: Cause, effects, and disease progression. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011; 6: 199-208.
- 包绍智, 房春燕, 王小同, 李芙蓉, 张大贵. 慢性低氧高二氧化碳对小鼠骨骼肌形态的影响. *温州医学院学报*(Bao Shaozhi, Fang Chunyan, Wang Xiaotong, Li Xiaorong, Zhang Dagui. Alteration of the structure of mice's muscle induced by chronic hypoxia-hypercapnia. *Journal of Wenzhou Medical College*) 2009; 39(1): 8-10.
- 戴震宇, 包绍智, 黄汉津, 王小同. 凋亡在慢性低氧高二氧化碳小鼠骨骼肌萎缩中的作用. *中国临床神经科学*(Dai Zhenyu, Bao Shaozhi, Huang Hanjin, Wang Xiaotong. Apoptosis on skeletal muscle atrophy of mice induced by chronic hypoxic hypercapnia. *Chin J Clin Neurosci*) 2009; 17(4): 361-4.
- Ji G, Liu D, Liu J, Gao H, Yuan X, Shen G. p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates NF-kappaB transcriptional activation through RelA phosphorylation during stretch -induced myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1): 547-51.
- Lluís F, Perdiguero E, Nebreda AR, Muñoz-Cánoves P. Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends Cell Biol* 2006; 16(1): 36-44.
- Hansen JM, Klass M, Harris C, Csete M. A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: Implications for regeneration in aged muscle. *Cell Biol Int* 2007; 31(6): 546-53.
- Lixuan Z, Jingcheng D, Wenqin Y, Jianhua H, Baojun L, Xiaotao F. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(5): 411-9.
- Léveillé F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, *et al*. Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 2010; 30(7): 2623-35.
- Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, *et al*. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 2011; 145(1): 104-16.
- Teijido O, Dejean L. Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS Lett* 2010; 584(15): 3305-10.
- Lin JW, Chen JT, Hong CY, Lin YL, Wang KT, Yao CJ, *et al*. Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase protease pathway. *Neuro Oncol* 2012; 14(3): 302-14.