

抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可减轻脓毒症急性肺损伤*

熊杰¹ 陈正平^{2*} 沈迎念³ 李永胜²

华中科技大学同济医学院附属同济医院 ¹重症医学科 ²急诊科 ³综合医疗科,湖北武汉 430030

摘要 目的:探讨抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对脓毒症急性肺损伤(ALI)的影响。方法:选取(250±10)g 健康成年 SD 雄性大鼠 50 只,随机分为 3 组:对照组 10 只、脓毒症 ALI 组(CLP 组)20 只、脓毒症 ALI 治疗组(CLP + XAV939 组)20 只。统计各组大鼠体重下降率及死亡率,取肺组织观察肺组织病理学变化,通过蛋白印迹法(WB)、免疫组化(IHC)、免疫荧光(IF)、实时定量 PCR 等技术检测 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白(TNF- α 、 β -catenin、Cyclin D、LRP5/6)表达在 3 组之间的差异性。结果:CLP 组 48 h 内死亡率为 40%,而对照组和 CLP + XAV939 组无大鼠死亡。对照组大鼠术后 48 h 体重无变化,而 CLP 组大鼠体重下降 20%,CLP + XAV939 组下降 10%。组织病理学表现,对照组可见完整的肺泡结构,未见炎症细胞浸润;CLP 组见肺泡水肿和塌陷,肺泡间隔增厚增宽并有大量炎症细胞浸润,肺血管充血明显;CLP + XAV939 组可见基本完整的肺组织结构,炎症细胞数量及分部范围较 CLP 组减小。WB 显示,与对照组比较,CLP 组、CLP + XAV939 组 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白表达量上升,且 CLP 组高于 CLP + XAV939 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。实时定量 PCR 示,CLP 组 β -catenin mRNA 表达量较对照组增高($P < 0.05$),CLP + XAV939 组与对照组无差异。IHC 示,与对照组比较,CLP 组和 CLP + XAV939 组肺内多种细胞内 β -catenin 蛋白表达量明显增多,且 CLP 组多于 CLP + XAV939 组($P < 0.05$)。IF 示,与对照组比较,CLP 组和 CLP + XAV939 组肺内 LRP5/6 表达量明显升高,且 CLP 组高于 CLP + XAV939 组(P 均 < 0.05)。结论:Wnt/ β -catenin 信号通路参与脓毒症 ALI 过程,腹腔注射 XAV939 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可减轻 ALI。

关键词 脓毒症;急性肺损伤;Wnt/ β -catenin 信号通路;XAV939;修复

中图分类号 R631;R563 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjjwzzz20210616

Inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway can alleviate acute lung injury in sepsis XIONG Jie¹, CHEN Zheng-ping^{2*}, SHEN Ying-nian³, LI Yong-sheng². ¹Department of Critical Care Medicine, ²Emergency Department, ³Integrated Medical Department, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: Xiong Jie, E-mail: tjxiaoxu@163.com

Abstract Objective: To explore the effect of inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway on acute lung injury in sepsis. Methods: A total of 50 SD male rats [(250±10)g] were randomly divided into three groups: control group ($n = 10$), sepsis acute lung injury group (CLP group, $n = 20$), and medication group (CLP + XAV939 group, $n = 20$). The rate of weight loss and the mortality were observed. The pathological changes of lung tissue were examined. Western blotting, immunohistochemistry, immunofluorescence, and real-time quantitative PCR (RT-PCR) were used to investigate the difference in expression levels of the key proteins (TNF- α , β -catenin, CyclinD, LRP5/6) in the Wnt signaling pathway among three groups. Results: Within 48 h, the mortality in the CLP group was 40%, and there were no deaths in the control group and the CLP + XAV939 group. After 48 h, weight in the control group had no significant change, and that in the CLP group and the CLP + XAV939 group dropped by 20% and 10% respectively. Pathologically, the control group had intact alveolar structure with no inflammatory cell infiltration, the CLP group showed alveolar edema and collapse, thickened and widened alveolar septa and substantial inflammatory cells infiltration, and obvious pulmonary vascular congestion, and the CLP + XAV939 group had basically intact alveolar structure, with less infiltration of inflammatory cells and smaller distribution than the CLP group. The Western blotting showed that the expression of key proteins in the Wnt/ β -catenin signaling pathway was increased significantly in the CLP group and CLP + XAV939 group as compared with the control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and that in the CLP group was higher than that in the CLP + XAV939 group ($P < 0.05$). RT-PCR showed that the expression level of β -catenin mRNA in the CLP group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the CLP + XAV939 group and the control group ($P < 0.05$). The immunohistochemistry

*基金项目:湖北省自然科学基金(No:2019CFB645)

*通信作者:陈正平, E-mail:908075933@qq.com,湖北省武汉硚口区解放大道 1095 号

showed that the expression level of β -catenin in the CLP + XAV939 group and the CLP group was higher than that in the control group, and that in the CLP group was higher than that in the CLP + XAV939 group. The immunofluorescence showed that the expression level of LRP5/6 in the CLP + XAV939 group and the CLP group was higher than that in the control group, and that in the CLP group was higher than that in the CLP + XAV939 group. Conclusion: The Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in the process of acute lung injury in sepsis. The intraperitoneal injection of XAV939 to inhibit Wnt/ β -catenin signaling pathway can alleviate acute lung injury in sepsis.

Key words Sepsis; Acute lung injury; Wnt/ β -catenin signaling pathway; XAV939; Repair

脓毒症是机体感染微生物后引起的失控性全身炎症反应综合征^[1, 2],而肺是最易受损的靶器官,急性呼吸窘迫综合征/急性肺损伤(acute respiratory distress syndrome, ARDS/ acute lung injury, ALI)的症状出现最早,其发生率和死亡率较高^[3]。有研究发现 Wnt/ β -catenin 信号通路在肺泡上皮细胞损伤过程,肺血管内皮细胞损伤过程,以及炎症介质过量释放和炎症细胞与内皮细胞的粘附过程中、肺纤维化过程中均具有作用,在脓毒症模型中发现该条信号通路被异常激活,减轻炎症因子水平可减轻病情的进展^[4, 5]。在成熟肺中, Wnt 通路通常在损伤修复和组织再生过程中被重新激活而发挥作用, Wnt/ β -catenin 信号转导是肺发育,细胞稳态和伤口愈合的关键^[6]。XAV939 是一种可以选择性抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的小分子化合物,其对 NF- κ b、TGF- β 等信号通路没有影响^[7, 8]。本实验通过盲肠结扎术(cecum ligation and puncture, CLP)建立大鼠脓毒症 ALI 模型,探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路对脓毒症 ALI 的影响。

材料与方法

材料 戊巴比妥钠(购自德国默克), 0. 9% NaCl 注射液购自武汉双鹤药业公司; SYBR Green qPCR Mater Mix 购自美国 fermentas; cDNA #k1622 合成试剂盒购自美国 Thermo 公司, trizol 购自美国 Invitrogen 公司, 实时定量 PCR 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司, 生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒购自北京中山金桥公司, XAV939 小分子抑制剂购自美国 selleck, Cy3 标记的抗小鼠 IgG(谷歌生物), β -catenin Rabbit 一抗、Cyclin D Rabbit 一抗均购自美国 CST 公司, LRP5/6 Mouse 购自美国 abcam 公司, TNF- α 兔来源、GAPDH 抗体均购自美国 Proteintech Group 公司, HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗鼠二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司。引物设计并合成由伯尔生物科技有限公司提供。

实验动物 选用健康成年 SD 雄性大鼠, 体重

(250 $\pm$ 10) g, 由武汉大学实验动物中心(CNAS BL0001)提供。

方法 术前准备: 配置按照 50% DMSO/50% NaCl 比例的溶液, 取 20 mL 50% DMSO/50% NaCl 溶液配置作为溶剂, 配置 1 mg/mL 的 XAV939 溶液放于 4℃ 冰箱中保存待用。CLP 方法建立大鼠脓毒症动物模型^[9, 10]: (250 $\pm$ 10) g 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只随机分为 3 组, 对照组 10 只, CLP 组和 CLP + XAV939 组各 20 只, 所有大鼠均编号后称体重并记录。腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)溶液麻醉 SD 大鼠, 常规消毒大鼠皮肤, 沿着大鼠腹部中线逐层打开腹腔, 腹部手术切口长约 3 ~ 4 cm, 用钝头镊子轻轻翻动便可在大鼠左下腹部找到盲肠。

对照组: 打开大鼠腹腔, 找到盲肠后不作处理, 放回原处后逐层缝合伤口。

CLP 组: 打开大鼠腹腔, 找到盲肠, 在盲肠中部用 4-0 无菌缝合线进行结扎, 结扎后在结扎的盲肠远端靠近结扎部位用 22G 针头贯穿盲肠两端, 挤出少量粪便(每组小鼠挤出粪便量应保持一致, 且不能让粪便散播至腹腔内及切口上), 结扎后的盲肠放回原处, 逐层缝合切口, 立即腹腔注射按照 50% DMSO/50% NaCl 配置的溶液每只 1 mL/d, 并连续 2 d 在同一时间同一部位腹腔注射相同剂量的 50% DMSO/50% NaCl 溶液。

CLP + XAV939 组: 打开大鼠腹腔后, 找到盲肠, 在盲肠中部用 4-0 无菌缝合线进行结扎; 结扎后在结扎的盲肠远端靠近结扎部位用 22G 针头贯穿盲肠两端, 挤出少量粪便, 把结扎后的盲肠放回原处; 逐层缝合切口; 立即腹腔注射按照 50% DMSO/50% NaCl 溶液配置的 XAV939 药物每只 1 mL/d, 并连续 2 d 在同一时间同一部位腹腔注射相同剂量的 50% DMSO/50% NaCl 溶液配置的 XAV939 每只 1 mL/d。术后, 3 组大鼠均腹腔注射 5 mL 37℃ 生理盐水模拟临床上的脓毒症病理生理变化。所有大鼠均正常给予食水, 统一在 25℃ 室温下饲养, 术后计算大鼠 48 h 内死亡率并称体重。术后 48 h 颈椎脱臼法处死存活大鼠共计 42 只(对照组 10 只, CLP 组 12 只,

CLP + XAV939 组 20 只),取所有大鼠左肺组织和右上中叶肺组织,用生理盐水洗净肺组织表面血液后立即置于液氮中固化处理,放入-80℃冰箱中保存待进行下一步检查;取所有大鼠右下叶肺组织用生理盐水洗净肺组织表面血液后立即置于4%多聚甲醛溶液中浸泡,并置于4℃冰箱中保存24~48 h后,进行下一步检测。

WB 检测肺组织中 TNF-α 及 β-catenin、Cyclin D 蛋白表达量 收集肺组织,RIPA 裂解液及 PMSF 提取总蛋白,取 80 μg 蛋白行 SDS-PAGE 分离蛋白,将

蛋白质转移至甲醇激活的 PVDF 膜,5% BSA 封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜,用含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液(TBST)漂洗 3 次,每次 5 min;加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下反应 1 h;洗膜步骤同前,曝光。以内参 GAPDH 蛋白的表达强度为基准,用 Quantity one 软件分析蛋白样品的相对表达量。

Real-time PCR 检测 β-catenin mRNA 表达水平 Trizol 方法提取总 RNA 后进行逆转录获取 cDNA,后进行实时定量 PCR 检测 β-catenin mRNA 表达水平,见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
β-catenin	ATGCGGCTGCTGTTCTATTC	ACCAATGTCCAGTCCGAGAT
Actin	CCTCTATGCCAACACAGTGC	ATCTGCTGGAAGGTTFFACAG

肺组织固定及石蜡切片 取出 4% 多聚甲醛液浸泡 24~48 h 的肺组织置于包埋框中,在脱水机中经过梯度酒精、二甲苯等脱水透明化后取出。脱水完成后在通风橱中石蜡包埋,冷却切片,待进行下一步实验。

石蜡切片及 HE 染色 在 60℃ 下烤切片 30min。脱蜡复水步骤:二甲苯 I (10~20 min)→二甲苯 II (10~20 min)→95% 酒精 I (1 min)→95% 酒精 II (1 min)→80% 酒精 (1 min)→自来水冲洗 (10 min)→苏木素染色 (2~10 min)→自来水冲洗 (5 s)→1% 盐酸酒精分化 (约 5 s 左右)→自来水冲洗 (10 min)→伊红染色 (30 s~1 min)→自来水冲洗 (10 min)→无水乙醇脱水 (2 min)。擦干载玻片表面水分,中性树脂封片。

石蜡切片及免疫组化(IHC) 石蜡切片步骤同前。在用自来水冲洗 10 min 后进行抗原修复,用山羊血清封闭 30 min,β-catenin 一抗 4℃冰箱孵育过夜 16~19 h。第 2 天复温 30 min,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)漂洗 3 次,每次 5 min,滴加二抗室温下孵育 25 min,洗涤同前,擦干水分滴加二氨基联苯胺(DAB)显色液显色。显色完成后置于自来水中终止显色反应。置于苏木素中染核 2~5 min,自来水冲洗 5 s 后置于 1% 盐酸酒精缓冲液脱染 2~3 s,显微镜下观察,若核染色过深,可再置于盐酸酒精缓冲液中脱染 2~3 s,自来水冲洗 10 min,无水乙醇脱水 2 min。擦干载玻片表面水分,中性树脂封片。

统计学分析 采用 SPSS 14.0 统计学软件,所有数据用($\bar{x} \pm s$)表示,通过 *F* 检验方差齐性检测及 *T* 检验等统计方法计算,以 *P* < 0.05 为差异有统计

学意义。

结 果

术后一般情况 CLP 术后 48 h 内,CLP 组死亡率为 40%,而其余 2 组无大鼠死亡。术后 48 h 存活大鼠进行称重,对照组大鼠体重无明显变化;CLP 组体重下降 20%;CLP + XAV939 组体重下降 10%。

肺组织病理学表现 CLP 组大鼠肺泡水肿和塌陷,肺泡间隔增厚增宽并可见大量炎症细胞浸润,肺血管充血明显,有局部的肺不张形成;CLP + XAV939 组可看到基本完整的肺组织结构,炎症细胞数量及炎症细胞分部范围减小,提示肺组织病理损伤程度较 CLP 组减轻,见图 1。

肺组织中 β-catenin、TNF-α、Cyclin D 表达量 与对照组比较,其余 2 组 β-catenin、TNF-α、Cyclin D 表达量明显上升 (*P* 均 < 0.01),且 CLP 组高于 CLP + XAV939 组 (*P* 均 < 0.05),见图 2~4。

肺组织 β-catenin mRNA 基因表达水平 实验以 Actin 为内参,上机后 2 组曲线特异性较好,结果可靠,见图 5。

脓毒症模型建立后,按照曲线图计算出 β-catenin 蛋白基因水平 mRNA 表达量变化情况,研究显示,CLP 组 β-catenin mRNA 表达水平明显高于对照组 (*P* < 0.05),是对照组的 1.67 倍;CLP + XAV939 组 mRNA 表达水平与对照组比较无明显差异,见图 6。

β-catenin 在肺组织中的表达情况 对照组大鼠肺组织中 β-catenin 有少量表达;CLP 组中泡上皮细胞,肺内炎症细胞以及肺血管内皮细胞等细胞中均有大量 β-catenin 的表达;在 CLP + XAV939 组中

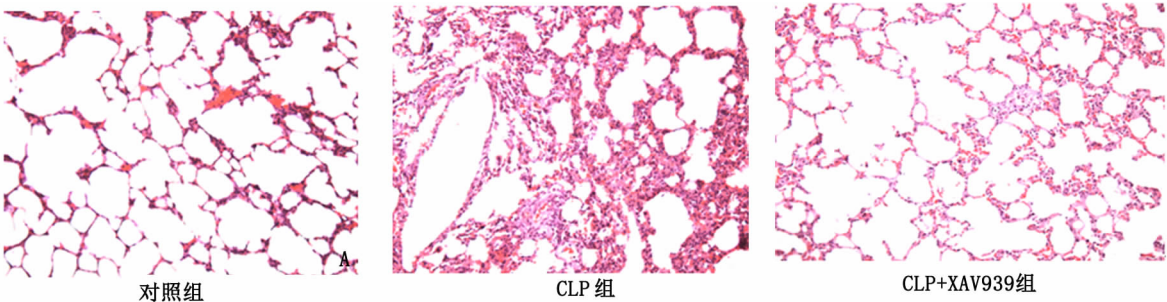


图 1 3 组大鼠肺组织病理切片(HE 染色)

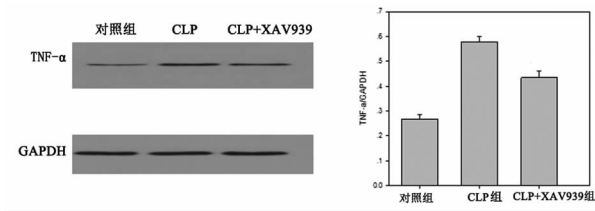


图 2 3 组 TNF-α 表达量比较

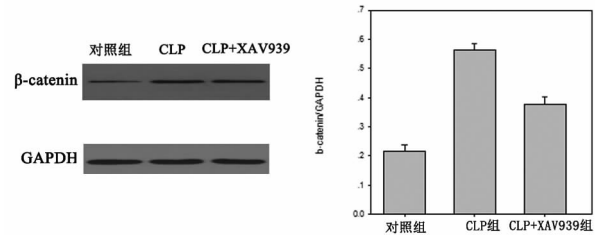


图 3 3 组 β-catenin 蛋白表达量对比

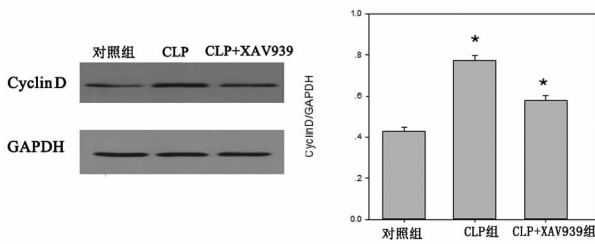
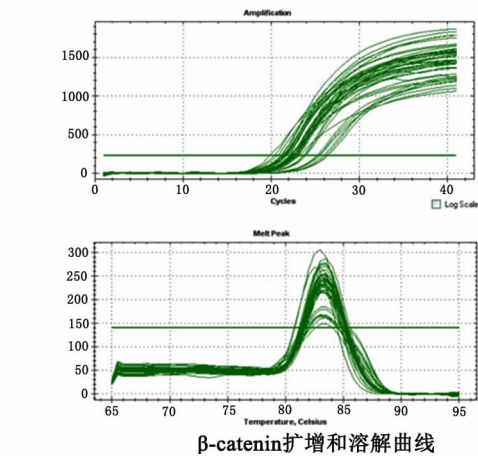


图 4 3 组 Cyclin D 表达量对比



β-catenin 扩增和溶解曲线

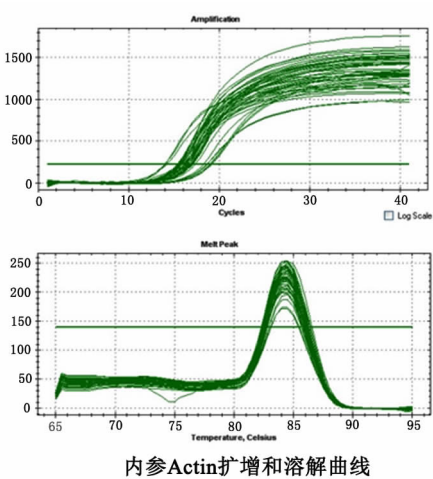


图 5 β-catenin 及内参 Actin 扩增和溶解曲线

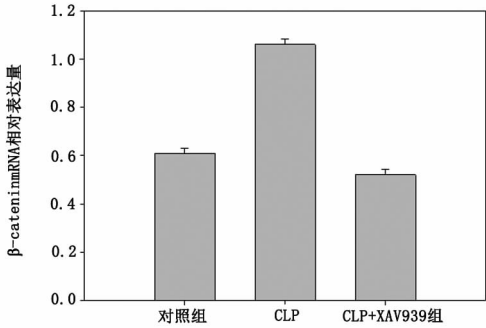


图 6 3 组肺组织中 β-catenin 蛋白基因水平 mRNA 表达量 (* $P < 0.05$)

β-catenin 肺泡上皮细胞、肺内炎症细胞及肺血管内皮细胞等细胞中的表达量较对照组增多,但是较 CLP 组明显减少,见图 7。

LRP5/6 在肺组织中的表达情况 由于 LRP5/6 为胞膜蛋白,IF 观察效果更佳。其中,亮蓝色部位为细胞核所在部位,红色部位为 LRP5/6 所在部位。对照组肺脏组织中 LRP5/6 表达量较少,见图 A、B、C;CLP 组中观察到较多阳性信号,提示 LRP5/6 表达量较对照组增加,见图 D、E、F;CLP + XAV939 组阳性信号较 CLP 组明显减少,提示腹腔注射 XAV939 药物后,LRP5/6 表达量降低,见图 G、H、I,见图 8。

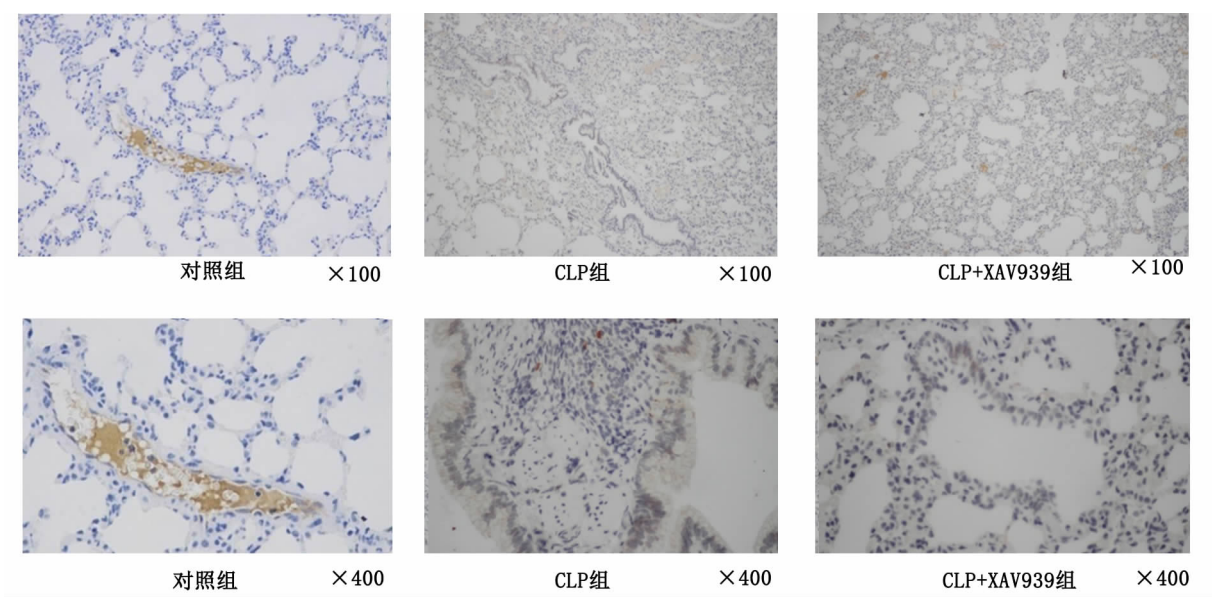


图 7 免疫组化检测大鼠肺组织 β -catenin 蛋白表达

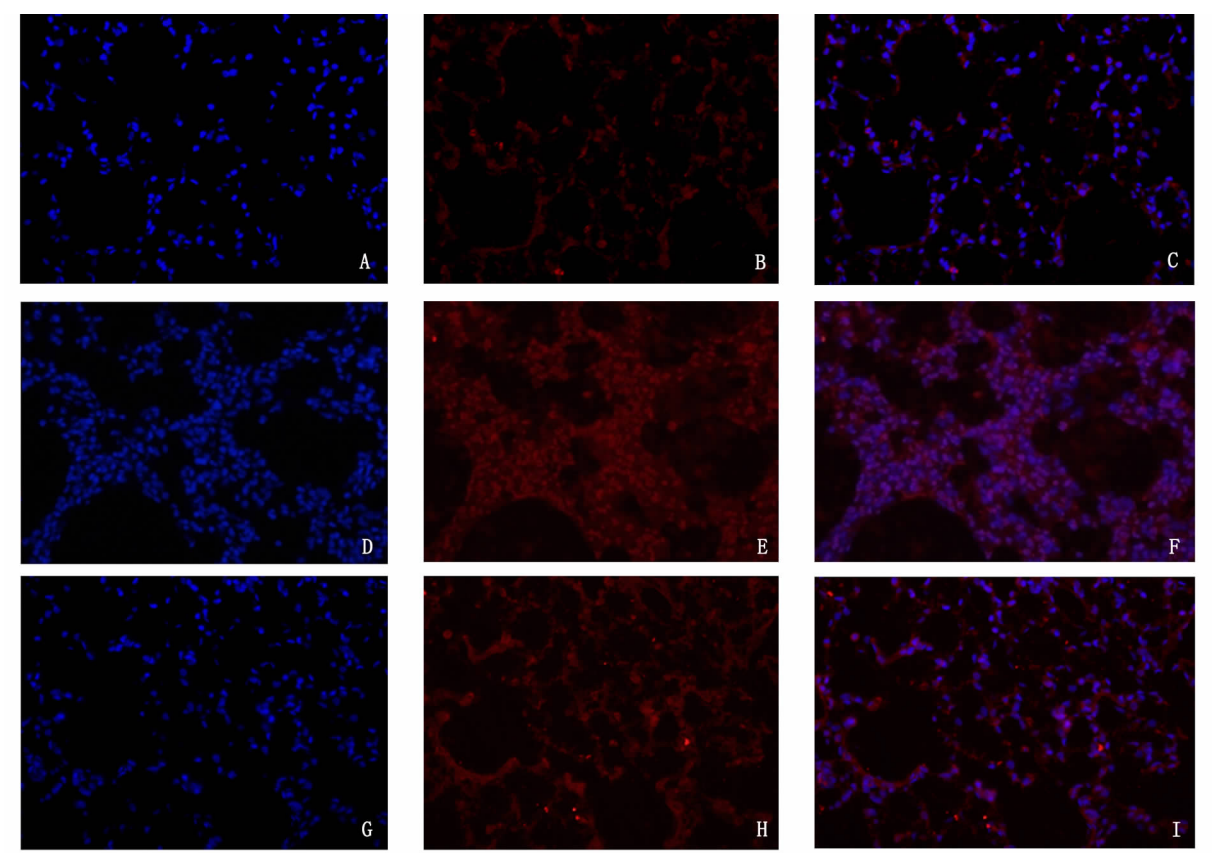


图 8 免疫荧光检测大鼠肺脏组织 LRP5/6 蛋白表达量

讨 论

体外研究表明,Wnt/ β -catenin 信号通路参与肺泡上皮细胞的损伤过程,在损伤的肺泡上皮细胞中发现 Wnt/ β -catenin 信号通路的效应蛋白 β -catenin 表达量明显升高^[11,12]。Wnt/ β -catenin 参与炎症细

胞与内皮细胞间的粘附和炎症细胞游走出血管外^[13,14],还通过调节上皮细胞间质化^[15]和骨髓间质细胞转化细胞表型^[3, 16]来参与肺损伤后的修复。Wnt/ β -catenin 通路核心部分包括 Wnt 小分子蛋白家族、Frizzled 受体、低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP5/6)、肠腺瘤息肉蛋白 (APC)、糖原合成酶激

酶-3 β (GSK-3 β)、轴蛋白(Axin)、Dsh 蛋白、 β -catenin 蛋白、T 淋巴细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)和下游靶基因 Cyclin D 等。正常情况下,大部分 β -catenin 结合于钙黏素和 Actin 细胞骨架上维持细胞骨架的稳定性,其余部分被 Axin-APC-GSK3 β 磷酸化复合体磷酸化,进而被泛素-蛋白酶体系统标记后降解,因此,胞质和胞核内游离 β -catenin 蛋白含量很低。然而,当细胞外存在大量 Wnts 配体时,Wnts 小分子与细胞膜上的 Frizzled 受体和 LRP5/6 受体结合,将信号传递到胞质内,导致磷酸化复合体解体, β -catenin 降解过程受阻,胞质内蓄积的 β -catenin 转运至胞核内并与 LEF 和 TCF^[16] 等转录因子结合,激活下游 Cyclin D 等靶基因的转录过程,进而调控生物体的生命活动^[17]。

本研究发现,CLP 组大鼠肺组织中炎症因子 TNF- α 、 β -catenin 效应蛋白及 Cyclin D 表达量明显升高,且 CLP 组大鼠肺内结构严重破坏,肺泡水肿或塌陷,肺间质中大量炎症细胞浸润,肺间质增生;而 CLP + XAV939 组大鼠肺组织内 TNF- α 、 β -catenin 效应蛋白及 Cyclin D 表达量明显降低;肺组织结构破坏明显减轻。CLP 组中 β -catenin mRNA 基因表达量较对照组明显上升,而 CLP + XAV939 组与对照组无明显差异,提示在脓毒症肺损伤过程中, β -catenin 蛋白降解受阻,蛋白合成活跃。Wnt/ β -catenin 信号通路在脓毒症 ALI 过程中起到一定作用;用小分子 XAV939 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可减轻脓毒症 ALI 而达到治疗目的。然而,本文尚有待进一步深入研究关于 Wnt/ β -catenin 信号通路是如何调节脓毒症肺损伤过程以及抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路是否可以治疗其它因素导致的 ALI 等,进一步探索出可用于 ARDS 患者的可靠药物,改善 ARDS 患者死亡率,这将对临床上 ARDS 的治疗产生深远影响。

参考文献

- Singer M,Deutschman CS,Seymour CW,et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA,2016,315(8):801-810.
- Villar J. What is the acute respiratory distress syndrome? [J]. Respir

- Care,2011,56(10):1539-1545.
- Sun Z,Gong X,Zhu H,et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling promotes engraftment of mesenchymal stem cells to repair lung injury [J]. J Cell Physiol,2014,229(2):213-224.
- Villar J,Cabrera-Benítez NE,Ramos-Nuez A,et al. Early activation of pro-fibrotic WNT5A in sepsis-induced acute lung injury [J]. Crit Care,2014,18(5):568.
- 朱勇,张丽,彭鹏. 连续性血液净化对脓毒症患者促炎/抗炎免疫、内皮细胞功能及预后的影响 [J]. 内科急危重症杂志,2018,24(5):385-388.
- 李红,沈明霞,谢海彬,等. Wnt/ β -catenin 信号通路与特发性肺间质纤维化研究进展 [J]. 中医临床研究,2019,11(18):4.
- Peterson RT. Drug discovery: Propping up a destructive regime [J]. Nature,2009,461(7264):599-600.
- Huang SM,Mishina YM,Liu S,et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. Nature,2009,461(7264):614-620.
- Rittirsch D,Huber-Lang MS,Flierl MA,et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc,2009,4(1):31-36.
- Villar J,Cabrera N,Casula M,et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model [J]. Intensive Care Med,2010,36(6):1049-1057.
- Li Z,Fang F,Xu F. Effects of different states of oxidative stress on fetal rat alveolar type II epithelial cells in vitro and ROS? induced changes in Wnt signaling pathway expression [J]. Mol Med Rep,2013,7(5):1528-1532.
- 赵春燕,刘畅,朱忠立,等. 百草枯通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肺泡上皮细胞上皮间质转化 [J]. 局解手术学杂志,2017,26(11):790-795.
- Schaale K,Neumann J,Schneider D,et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses [J]. Eur J Cell Biol,2011,90(6~7):553-559.
- Lee DK,Nathan Grantham R,Trachte AL,et al. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway enhances monocyte adhesion to endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,347(1):109-116.
- Zou W,Zou Y,Zhao Z,et al. Nicotine-induced epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ β -catenin signaling in human airway epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2013,304(4):L199-L209.
- Wang C,Zhu H,Sun Z,et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2014,307(3):C234-C244.

(2021-04-14 收稿 2021-10-23 修回)