

吴文棋,庄旭辉,王姝晨,等. PD98059 抑制哮喘中 TGF- β 1 诱导的人支气管上皮细胞上皮间质转化进程 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 34-40.

Wu WQ, Zhuang XH, Wang SC, et al. PD98059 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial cells in asthma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 34-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.005

PD98059 抑制哮喘中 TGF- β 1 诱导的人支气管上皮细胞上皮间质转化进程

吴文棋^{1,2}, 庄旭辉^{1,3}, 王姝晨^{1,3}, 李静静^{1,4}, 王霞^{1,3}, 王勇³, 马武华^{3*}

(1.广州中医药大学, 广州 510006; 2.中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科, 广州 510000;
3.广州中医药大学第一附属医院麻醉科, 广州 510006; 4.晋城市人民医院麻醉科, 山西 晋城 048000)

【摘要】 目的 探究 PD98059 对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导人支气管上皮细胞 BEAS-2B 上皮间质转化 (EMT) 进程的影响及可能的分子机制。**方法** 本研究采用人支气管上皮细胞 (BEAS-2B), 使用 TGF- β 1 诱导 BEAS-2B 上皮间质转化模型, 使用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 探究抑制 ERK/MAPK 信号转导是否影响 EMT 进程。通过免疫荧光检测 BEAS-2B 气道重塑模型 α -SMA 蛋白的表达及定位; CCK-8 法检测各组细胞存活率; Edu 实验检测各组细胞增殖能力水平; transwell 实验检测各组细胞迁移能力水平; Western blot 检测各组 EMT 标志蛋白表达及 ERK/MAPK 通路的激活情况。**结果** 与正常组相比, 模型组 α -SMA 表达增加, α -SMA 在 BEAS-2B 细胞胞质上表达。PD98059 在 40 μ mol/L 浓度与 5 ng/mL TGF- β 1 共处理抑制 BEAS-2B 细胞生长 ($P < 0.05$)。与三组 Edu 阳性率无显著差异 ($P > 0.05$)。与正常组相比, 模型组迁移细胞数增加 ($P < 0.05$), 上皮间质标志蛋白表达增加 ($P < 0.05$), p-ERK 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), PD98059 可以明显减少迁移细胞数 ($P < 0.05$), 抑制上皮间质标志蛋白的表达 ($P < 0.05$) 及 ERK 通路的激活 ($P < 0.05$)。**结论** TGF- β 1 可能通过 ERK/MAPK 通路促进人支气管上皮细胞上皮间质转化进程, PD98059 可以通过抑制 ERK/MAPK 通路的激活抑制支气管上皮细胞 EMT 进程。

【关键词】 哮喘; PD98059; ERK/MAPK; 上皮间质转化; 气道重塑

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0034-07

PD98059 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial cells in asthma

WU Wenqi^{1,2}, ZHUANG Xuhui^{1,3}, WANG Shuchen^{1,3}, LI Jingjing^{1,4}, WANG Xia^{1,3}, WANG Yong³, MA Wuhua^{3*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China. 2. Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000. 3. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006.
4. Jincheng Department of Anesthesiology, Municipal People's Hospital, Jincheng 048000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of PD98059 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced human bronchial epithelial cells BEAS-2B and the possible molecular mechanism. **Methods** Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were used for the BEAS-2B EMT model established

【基金项目】 国家自然科学基金 (81673922, 82074357)。

【作者简介】 吴文棋 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 针刺治疗哮喘的机制。E-mail: vinciuwork@outlook.com

【通信作者】 马武华 (1967—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针刺治疗哮喘的机制。E-mail: gzmwh@aliyun.com

with TGF- β 1, and the ERK1/2 inhibitor PD98059 was used to explore whether inhibition of ERK/MAPK signal transduction affects the EMT process. Immunofluorescence was used to detect the expression and location of α -SMA protein in the BEAS-2B airway remodeling model. CCK-8 assays were used to assess the cell survival rate. An Edu proliferation assay was used to assess cell proliferation. Transwell assays were used to assess cell migration. Western blot was used to detect the expression of EMT marker proteins and activation of the ERK/MAPK pathway. **Results** Compared with the control group, α -SMA expression in the model group was increased, and α -SMA was expressed in the cytoplasm of BEAS-2B cells. Cotreatment with 40 μ mol/L PD98059 and 5 ng/mL TGF- β 1 inhibited BEAS-2B cell growth ($P < 0.05$). There was no significant difference in Edu-positive cells among the three groups ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the number of migrating cells ($P < 0.05$), expression of EMT marker proteins ($P < 0.05$), and expression of p-ERK protein were increased in the model group ($P < 0.05$). PD98059 significantly reduced the number of migrating cells ($P < 0.05$) and inhibited the expression of EMT marker proteins ($P < 0.05$) and activation of the ERK pathway ($P < 0.05$).

Conclusions TGF- β 1 promotes the EMT of human bronchial epithelial cells via the ERK/MAPK pathway. PD98059 inhibits EMT of bronchial epithelial cells by suppressing activation of the ERK/MAPK pathway.

【Keywords】 asthma; PD98059; ERK/MAPK; epithelial-mesenchymal transition; airway remodeling

支气管哮喘(bronchial asthma)是在儿童及成人中最常见的慢性非传染性疾病之一,据统计全球共有 3.34 亿哮喘患者^[1]。流行病学显示我国成人及儿童哮喘发病率均呈逐年上升趋势,给医疗系统和社会都造成了巨大负担^[2]。气道重塑(airway remodeling)是慢性哮喘的重要病理特征,是导致哮喘患者持续气道阻塞,糖皮质激素等治疗不敏感的重要因素^[3-4]。已有大量研究证实,在支气管哮喘患者中,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在气道重塑的发展进程中起关键作用^[5-6]。因此,寻找有效的干预目标及靶标分子来抑制支气管上皮细胞 EMT 进程,以改善气道重塑并提高糖皮质激素类药物的敏感性,对改善支气管哮喘患者疾病转归及生活质量至关重要。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路包含 3 种不同的级联通路,这些级联根据其 MAPK 关键蛋白命名,包括细胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinases, ERK)、Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)、和 p38-MAPK。据报道,ERK/MAPK 通路与细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡有关^[7]。有研究报道 ERK/MAPK 作为关键信号转导通路参与各类纤维化疾病中的 EMT 进程^[8-9]。本研究旨在验证 ERK/MAPK 信号转导在哮喘气道重塑模型/支气管上皮细胞 EMT 进程中的激活情况,并探讨 ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 对该进程的影响,为通路抑制剂的临床应用积累基础的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人支气管上皮细胞 BEAS-2B(购于美国生物标准品资源中心)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司;重组 TGF- β 1 购于 peprotec 公司;CCK-8 试剂 MedChemExpress 公司、PD98059 购于 MedChemExpress 公司;Edu 细胞增殖试剂盒、Cy3 抗兔 IgG 购于上海碧云天生物技术有限公司;transwell 迁移板购于 Corning 公司;vimentin 一抗、 α -SMA 一抗、GAPDH 一抗购于 CST 公司;p-ERK1/2 一抗、ERK1/2 一抗购于上海艾比玛特生物医药有限公司。

Multiskan GO 酶标仪购于赛默飞公司;BG-gdsAUTO710PRO 化学发光成像系统购于北京百晶生物技术有限公司;IX73 倒置荧光显微镜显微镜购于日本奥林巴斯株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养、分组及处理

将 BEAS-2B 细胞培养于 10% FBS 和 1% 青/链霉素配置的 DMEM 高糖培养基中,培养条件 37℃、5% CO₂;重组 TGF- β 1 使用 10 mmol/L citric acid 溶解配置为 50 μ g/mL 溶液,后用细胞培养液配置为 5 ng/mL 溶液。PD98059 使用 DMSO 溶解为 40 mmol/L 溶液储存于 -20℃ 冰箱,并用细胞培养液配置为 2.5、5、10、20、40 μ mol/L 溶液。实验分组:正常组(Con 组),模型组(TGF- β 1 5 ng/mL),干预组(TGF- β 1 5 ng/mL + PD98059 2.5~40 μ mol/L)。

1.3.2 细胞免疫荧光观察细胞 α -SMA 蛋白表达定位情况

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个/孔接种于 96 孔板, 设置正常组, 模型组(TGF- β 1 5 ng/mL), 培养 24 h 后, 对细胞进行不同的处理干预 72 h。弃去培养液, 4%多聚甲醛固定 10 min, 使用封闭液室温孵育 1 h, 加入兔抗多克隆抗体(1:200)过夜, Cy3 抗兔 IgG 孵育 1 h, DAPI 孵育 10 min 后在倒置荧光显微镜显微镜下采集分析图像。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活力

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个/孔接种于 96 孔板, 设置空白组、正常组(Con 组)、模型组(TGF- β 1 5 ng/mL), 干预组(TGF- β 1 5 ng/mL+PD98059 2.5~40 μ mol/L, 共 5 个浓度梯度)。培养 24 h, 待细胞贴壁后更换为含 5 ng/mL TGF- β 1 及 2.5、5、10、20、40 μ mol/L PD98059 的细胞培养液, 设置 3 个复孔, 在培养箱孵育 72 h。处理结束后, 每组每孔加入 CCK-8 10 μ L, 在培养箱孵育 2 h 后在酶标仪下测 450 nm 下吸光度值, 细胞存活率(%) = ((A 实验孔-A 空白孔)/(A 对照孔-A 空白孔)) $\times$ 100%。

1.3.4 Edu 检测细胞增殖活性

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个细胞/孔接种于 96 孔板, 设置正常组, 模型组(TGF- β 1 5 ng/mL), 干预组(TGF- β 1 5 ng/mL+PD98059 10 μ mol/L), 培养 24 h 后, 参考课题组以往研究及前人研究对细胞进行不同的处理干预 72 h^[10-11]。干预结束后每组每孔加入 50 μ mol/L Edu 试剂, 根据预实验结果, 在培养箱孵育 4 h。严格按照 Edu 细胞增殖试剂盒说明书操作, 其结果由 Edu 阳性细胞(绿色)与 hoechst 33442 阳性细胞(蓝色)的比率表示细胞增殖率。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力

细胞分组及处理同 1.3.4, 将 BEAS-2B 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 对细胞进行不同的处理干预 72 h。将处理完毕的细胞用胰酶消化后, 用无血清培养基配成每毫升 7000 个细胞的细胞悬液, 加入 300 μ L 细胞悬液到 Transwell 小室, 下室加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养液 700 μ L, 培养箱孵育 12 h 后, 将小室风干, 结晶紫染色 15 min, 在显微镜观察并随机计数 3 个视野的细胞。

1.3.6 Western blot 检测 EMT 标志蛋白及 ERK/MAPK 蛋白表达情况

细胞分组及干预同 1.3.5, 每孔加入 RIPA 裂

解液, 细胞刮刀刮取细胞, 4 $^{\circ}$ C 15000 r/min 离心。取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 $\times$ Loading Buffer 后煮沸使蛋白变性。配置 SDS-PAGE 凝胶。经电泳、转膜、室温下使脱脂奶粉封闭 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜, 室温孵育二抗 1 h, 化学发光仪发光成像, Image J 分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。数据使用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行展示。各组正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验。如实验数据符合正态性分布, 检验多组数据组间差异采用单因素方差分析(One way ANOVA)。当方差齐, 多组间两两组间比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 dunnett's T3 检验。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 α -SMA 蛋白在支气管上皮细胞及气道重塑/上皮间质化细胞模型表达、定位

结果如图 1 所示, 与正常组相比, TGF- β 1 (5 ng/mL) 可使细胞 α -SMA 表达增多, 表现为细胞胞质红色荧光更亮更密。结果提示 TGF- β 1 成功诱导 BEAS-2B 细胞上皮间质转化模型。

2.2 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞存活率的影响

结果如图 2 所示, 与正常组相比, 模型组的细胞存活率没有影响($P>0.05$)。与模型组相比, PD98059 与在 2.5、5、10、20 μ mol/L 浓度与 TGF- β 1 共孵育处理对细胞存活率没有影响($P>0.05$)。而 PD98059 浓度增加到 40 μ mol/L 时, 可对 BEAS-2B 活性产生明显抑制作用($P<0.05$)。

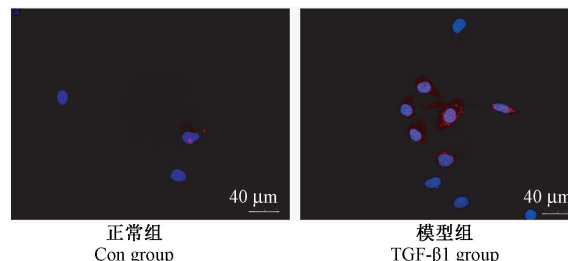
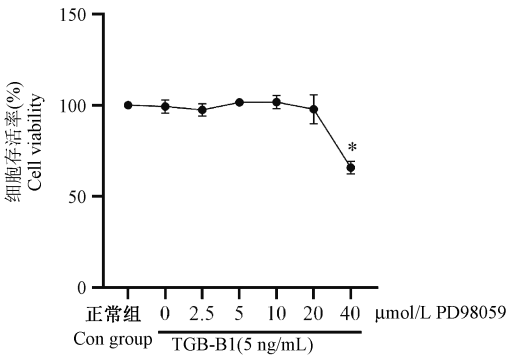


图 1 α -SMA 蛋白在支气管上皮细胞及气道重塑/上皮间质化细胞模型表达、定位

Figure 1 Expression and localization of α -SMA in bronchial epithelial cells and airway remodeling/epithelial mesenchymal cell models

表 1 各组细胞增殖能力比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of proliferation ability among groups

组别 Groups	阳性细胞率(%) Edu positive cell rate	<i>F</i>	<i>P</i>
正常组 Con group	44.42 $\pm$ 2.42	0.314	0.742
模型组 TGF- β 1 group	42.01 $\pm$ 6.93		
干预组 TGF- β 1+PD98059 group	41.43 $\pm$ 4.29		



注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞细胞存活率的影响

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Effect of PD98059 and TGF- β 1 on the survival rate of bronchial epithelial cells

2.3 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响

为排除增殖对细胞迁移的结果造成的影响,使用 Edu 增殖试剂盒检测各组细胞增殖情况。结果如图 3 所示:正常组 Edu 阳性率为(44.42 $\pm$ 2.42),模型组 Edu 阳性率为(42.01 $\pm$ 6.93),干预组 Edu 阳性率为(41.43 $\pm$ 4.29)。3 组间 Edu 阳性率无显著差异($P > 0.05$)。结果提示 TGF- β 1 及 PD98059 对 BEAS-2B 细胞增殖无影响(表 1)。

2.4 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响

结果如图 4 所示:与正常组相比,模型组细胞迁移数明显增加($P < 0.05$),与模型组相比,PD98059 干预后 BEAS-2B 细胞迁移数明显减少($P < 0.05$)。结果表明 PD98059 能抑制 TGF- β 1 诱导的细胞迁移(表 2)。

2.5 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞 EMT 标志蛋白和 ERK/MAPK 通路蛋白表达的影响

结果如图 5 所示:与正常组相比,模型组细胞 vimentin、 α -SMA 和 p-ERK 表达升高($P < 0.05$),与模型组相比,PD98059 干预后 BEAS-2B 细胞 vimentin、 α -SMA 和 p-ERK 表达下降($P < 0.05$)。结果表明 PD98059 能抑制 TGF- β 1 诱导的细胞 EMT 和 ERK/MAPK 通路激活(表 3)。

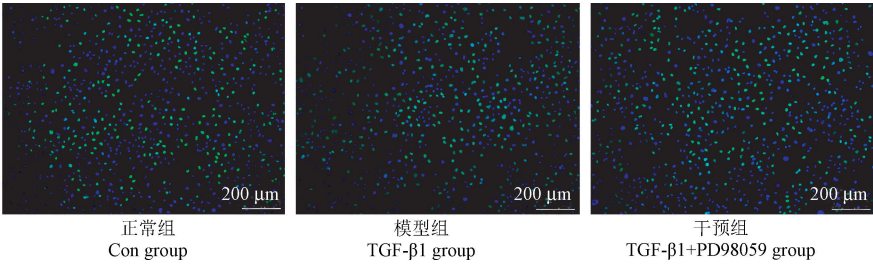


图 3 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响
Figure 3 Effect of PD98059 and TGF- β 1 on the proliferation of bronchial epithelial cells

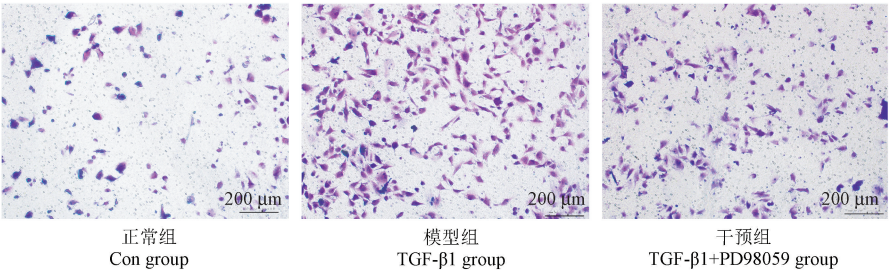


图 4 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞迁移能力的影响
Figure 4 Effect of PD98059 and TGF- β 1 on the migration of bronchial epithelial cells

表 2 各组细胞迁移能力比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of migration ability among groups

组别 Groups	迁移率 (%) Migration rate	<i>F</i>	<i>P</i>
正常组 Con group	100.00±0.00		
模型组 TGF-β1 group	231.47±19.65*	91.321	<0.001
干预组 TGF-β1+PD98059 group	157.76±6.46 [#]		

注:与正常组相比, **P*<0.05;与模型组相比, [#]*P*<0.05。

Note. Compared with Con group, **P*<0.05. Compare with TGF-β1 group, [#]*P*<0.05.

表 3 各组细胞蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of protein expression level among groups

组别 Groups	Vimentin	α-SMA	p-ERK
正常组 Con group	0.47±0.01	0.43±0.15	0.16±0.09
模型组 TGF-β1 group	1.09±0.08*	1.36±0.05*	0.64±0.10*
干预组 TGF-β1+PD98059 group	0.85±0.01 [#]	0.77±0.07 [#]	0.35±0.11 [#]
<i>F</i>	114.680	62.232	16.411
<i>P</i>	0.000	0.000	0.004

注:与正常组相比, **P*<0.05;与模型组相比, [#]*P*<0.05。

Note. Compared with Con group, **P*<0.05. Compare with TGF-β1 group, [#]*P*<0.05.

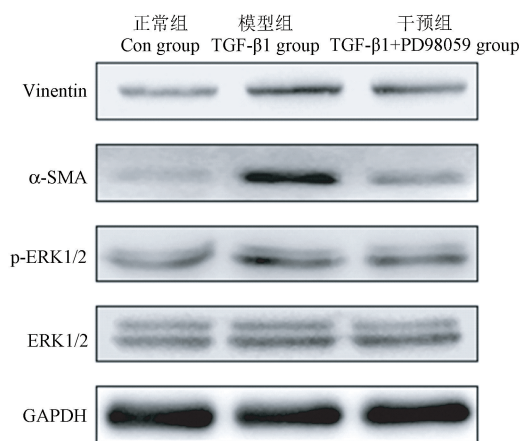


图 5 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞 EMT 标志蛋白和 ERK/MAPK 通路蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of PD98059 and TGF-β1 on the expression of EMT protein and ERK/MAPK pathway protein in bronchial epithelial cells

3 讨论

本研究以 TGF-β1 诱导人支气管上皮细胞 EMT 模型, 检测 TGF-β1 干预及 TGF-β1 及 PD98059 联

合干预 BEAS-2B 细胞的细胞活力、增殖能力、迁移能力及 EMT 进程标志蛋白表达情况。

本研究参考 Doerner 等^[10]报道建立 TGF-β1 诱导支气管上皮细胞 BEAS-2B 上皮间质转化模型, 模拟临床患者哮喘气道重塑的情况。观察到 BEAS-2B 细胞 α-SMA 蛋白、vimentin 蛋白表达增多, 细胞迁移能力增加而且不影响细胞增殖, 提示细胞造模成功。在 TGF-β1 造模后, 加入 ERK/MAPK 通路抑制剂 PD98059 作为干预组, 在文献报道中, PD98059 在 BEAS-2B 上的干预剂量从 10 ~ 30 μmol/L 不等^[12-14], 且 Tian 等^[13]报道 PD98059 在 30 μmol/L 时已经对细胞活力产生抑制作用。因此, 本研究设置浓度梯度检测 PD98059 对 BEAS-2B 细胞活性的影响。结果发现 PD98059 浓度增加到 40 μmol/L 时, 可对 BEAS-2B 活性产生明显抑制作用。为控制 PD98059 对细胞活性抑制而可能带来的影响, PD98059 采用 10 μmol/L 浓度用作后续实验。

上皮间质转化是一种生物学过程, 上皮细胞通过转变为间质细胞, 失去细胞间的紧密连接, 获得的迁移能力和分泌细胞外基质的能力, 伴随着 E-cadherin 的减少以及间质细胞来源蛋白: vimentin 和 α-SMA 等的增加^[15]。其中 α-SMA 负责构成间质细胞纤维的主要成分, 参与细胞骨架的重塑^[16]。近年来, 随着对上皮间质转化研究的不断深入, 由 TGF-β1 诱导的上皮间质转化在哮喘患者气道重塑中的作用愈发受到关注^[17-18]。TGF-β1 作为在炎症和细胞外基质调节因素中的核心因子, 已被证实与哮喘炎症与重塑起关键作用^[19]。

气道重塑作为慢性哮喘的重要病理特征, 其典型变化包括上皮损伤、粘液腺增生、上皮基底膜沉积、血管生成和气管平滑肌增加^[20]。气道重塑是长期过敏源暴露及气管炎性损伤的结果^[21], 是导致哮喘患者激素治疗不敏感的重要因素。因此探索气道重塑发生发展的分子机制及潜在的治疗靶点是支气管哮喘研究领域亟需解决的重难点。

在本研究中, 我们发现 TGF-β1 诱导 BEAS-2B 中 p-ERK1/2 表达明显上升, 通过使用 PD98059 抑制 ERK/MAPK 可以抑制细胞迁移、α-SMA 蛋白、vimentin 蛋白的表达, 进而抑制 EMT 进程。ERK/MAPK 通路是所有 MAPK 信号转导通路中最重要信号级联通路, 其中分为 ERK1~5 五个亚族, 而 ERK1/2 途径是目前研究最火热的 MAPK 途径^[22]。

ERK1/2 亚族能被生长因子或者激素刺激并激活 Raf/MEK/ERK 级联通路, 最终激活下游 MAPK 信号并且发生磷酸化入核, 导致相应的基因转录^[23]。最近的研究发现抑制 ERK/MAPK 通路可以在癌症、纤维化等疾病中发挥治疗作用。此外, 考虑到 ERK/MAPK 通路参与细胞增殖生长过程^[24], 因此本研究筛选出对细胞活力与增殖能力无影响的药物浓度参与 Transwell 实验, 证明了 PD98059 抑制 TGF- β 1 诱导的迁移细胞数增多与抑制细胞增殖无关, PD98059 通过抑制 BEAS-2B 迁移能力导致迁移细胞数的减少。本研究结果提示 ERK 通路在支气管上皮细胞 EMT 中发挥重要作用, 通过抑制 ERK/MAPK 通路介导的 EMT 可能成为治疗支气管哮喘患者的一个潜在的靶点。与之类似的是, 张爱芝等^[25]研究发现激活大鼠平滑肌细胞可以有效促进 cyclinD1 和气道重塑。Zha 等^[26]报道 PD98059 可以通过抑制肾小管上皮细胞的 EMT 进程, 减轻肾纤维化。以上研究与本研究结果一致, 说明了 PD98059 通过抑制 EMT 进程在治疗哮喘气道重塑中的潜在价值。

本研究的不足之处在于我们的实验仅在 ERK/MAPK 通路上对 TGF- β 1 诱导的支气管上皮细胞 EMT 进行研究与分析, 但事实上, MAPK 通路中 P38 通路及 JNK 通路也参与了该过程^[5]。我们计划在未来拓展研究, 试图更加充分的认识气道重塑中 EMT 的发展进程。

综上所述, 本研究发现 TGF- β 1 可能通过 ERK/MAPK 通路促进人支气管上皮细胞上皮间质转化进程, PD98059 可以通过抑制 ERK/MAPK 通路的激活抑制支气管上皮细胞 EMT 进程。

参考文献:

- [1] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 783-800.
- [2] 农英, 林江涛, 王文巧, 等. 我国城区支气管哮喘患者疾病认知与控制水平关系的多中心调查 [J]. *中华医学杂志*, 2017, 97(18): 1425-1429.
- [3] 何婷, 钱佩瑶, 洪敏, 等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 117-123.
- [4] Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, et al. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper 2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis [J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 134-150.
- [5] Song Y, Wang Z, Jiang J, et al. DEK-targeting aptamer DTA-64 attenuates bronchial EMT-mediated airway remodelling by suppressing TGF- β 1/Smad, MAPK and PI3K signalling pathway in asthma [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(23): 13739-13750.
- [6] 朱晓华, 李秋根. 哮喘气道重塑中上皮间质转化及其分子调控 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(5): 566-570.
- [7] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [8] Geng XQ, Ma A, He JZ, et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(5): 670-677.
- [9] 邹梦林, 胡星星, 张铭杨, 等. ERK1/2 信号通过钙蛋白酶调控结缔组织生长因子参与肺纤维化的形成 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2020, 41(5): 720-724.
- [10] Doerner AM, Zuraw BL. TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids [J]. *Respir Res*, 2009, 10: 100.
- [11] 任晓杰. 基于 TGF- β 和 Notch 信号通路探讨针刺调控哮喘动物模型气道重塑的机制 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [12] Liu Y, Tang J, Yuan J, et al. Arsenite-induced downregulation of occludin in mouse lungs and BEAS-2B cells via the ROS/ERK/ELK1/MLCK and ROS/p38 MAPK signaling pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 332: 146-154.
- [13] Tian X, Xie G, Ding F, et al. LPS-induced MMP-9 expression is mediated through the MAPKs-AP-1 dependent mechanism in BEAS-2B and U937 cells [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(4-5): 217-225.
- [14] Sivanantham A, Pattarayan D, Bethunaickan R, et al. Tannic acid protects against experimental acute lung injury through downregulation of TLR4 and MAPK [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6463-6476.
- [15] Hackett TL. Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012, 12(1): 53-59.
- [16] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [J]. *J Pathol*, 2003, 200(4): 500-503.
- [17] Tang J, Liu J, Zhang X. The role of osthole on TGF- β -induced lung epithelium apoptosis injury and epithelial-mesenchymal transition-mediated airway remodeling in pediatric asthma [J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 7099097.
- [18] Guo Y, Yuan X, Hong L, et al. Promotor hypomethylation mediated upregulation of miR-23b-3p targets pten to promote bronchial epithelial-mesenchymal transition in chronic asthma [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 771216.
- [19] Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, et al. Transforming

- growth factor- β 1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling [J]. *Allergy*, 2012, 67(10): 1193-1202.
- [20] Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, et al. Airway remodeling in asthma [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 191.
- [21] 张星东. 过敏性哮喘动物模型在致敏、哮喘发作和气道高反应性等方面的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(9): 1-7.
- [22] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [23] 刘梦琪, 张文文, 陈晓伟, 等. PD98059 抑制 MAPK/ERK 信号通路对胃癌细胞生物学功能的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2019, 31(1): 15-21.
- [24] Wang Y, Yang L, Yang Y, et al. Liver kinase B1 (LKB1) regulates proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells via targeting ERK signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 65-74.
- [25] 张爱芝, 张焕萍, 蔺鹏翔. ERK 活化对哮喘大鼠气道重塑及 CyclinD1 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(3): 26-29.
- [26] Zha D, Wu S, Gao P, et al. Telmisartan attenuates uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3851718.
- [收稿日期] 2021-11-24

幼年生活忽视模型大鼠前额叶皮层不同类型神经元特异性的兴奋性变化差异研究

幼年是大脑发育的关键时期,幼年生活忽视可对神经系统和情绪发展产生不可逆的影响。近年有文献报道包括前额叶皮层、眶额叶和杏仁核等脑区参与该情绪行为的神经过程。北京协和医学院-中国医学科学院医学实验动物研究所秦川教授团队前期工作已证实,前额叶皮层谷氨酸能神经元参与调节幼年生活忽视模型大鼠的焦虑等行为,前额叶皮层神经元的内在兴奋性变化可能是模型大鼠行为表型及其性别差异的基础。本文进一步探究大鼠前额叶皮层谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元在雄性和雌性大鼠之间的不同神经兴奋性改变特征,为疾病模型动物的行为学症状探究相应的神经机制。

本研究建立大鼠母子分离早期断乳模型(maternal separation with early weaning, MSEW)作为幼年生活忽视的疾病模型,通过全细胞脑片膜片钳记录大鼠前额叶皮层谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元,并检测各组内在兴奋性的改变。结果表明,以神经元动作电位和幅度、阈值和个数作为检测指标,前额叶谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元表现出不同特征的神经电生理改变:谷氨酸能神经元兴奋性在雄性模型组明显上升,更易激发动作电位,雌性模型组无明显差异。不同于谷氨酸能神经元,GABA 能神经元的兴奋性表现为单个动作电位阈值绝对值在雄性和雌性模型组增加,不易激发动作电位。

综上所述,大鼠母子分离早期断乳模型的前额叶皮层表现为神经元特异性的兴奋性改变,同时具有雌雄差异,进一步造成前额叶皮层的兴奋-抑制平衡改变,为大鼠母子分离早期断乳的情绪行为学表型提供神经功能基础。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(3): 274-280; <https://doi.org/10.1002/ame2.12252>)