

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.12.1481

棉鼠肺表面活性相关蛋白 A 基因生物信息学分析及其与肺损伤相关性

杨 守,冯 怡,赵 丽,黄 轶,黄道超*

重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014

[摘要] **目的** 分析棉鼠肺表面活性相关蛋白 A(SP-A)的基因序列结构和生物信息学特点,观察棉鼠肺损伤模型中 SP-A mRNA 和蛋白的表达水平,初探 SP-A 表达规律与肺损伤的相关性。**方法** 将 32 只棉鼠随机均分为 4 组:3 个实验组棉鼠分别腹腔注射 2 mg/kg 脂多糖(LPS)处理 24、48 和 96 h,对照组腹腔注射等量生理盐水。建模后提取棉鼠肺组织总 RNA,经 RT-PCR 扩增 SP-A 基因,并对其进行生物信息学分析;组织切片观察 LPS 作用不同时期肺组织病理学变化;qRT-PCR 分析 SP-A mRNA 的表达水平;蛋白质印迹法检测 SP-A 蛋白表达。**结果** 棉鼠 SP-A 基因编码区长 744 bp,编码 248 个氨基酸,具有多个半胱氨酸保守位点、 α 螺旋结构和糖基化位点,与其他物种相比其核苷酸(75.4%~90.1%)和氨基酸(70.6%~87.1%)序列均具有较高的同源性。在 LPS 诱导肺损伤模型中发现,与对照组相比,实验组棉鼠肺组织病理学改变随 LPS 刺激时间延长而加重,具有时间依赖性;SP-A mRNA 和蛋白的表达水平在 LPS 处理 24 h 后开始迅速增加,差异有统计学意义($P<0.001$ 和 $P<0.01$),48 h 时仍持续上升($P<0.001$ 和 $P<0.01$),96 h 时略有下降,但仍保持在较高水平,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。**结论** 棉鼠 SP-A 基因具有高度保守性;棉鼠 SP-A mRNA 和蛋白的表达水平与肺损伤严重程度密切相关,可反应肺损伤的不同时期。

[关键词] 棉鼠亚科;肺表面活性物质相关蛋白质 A;肺损伤;计算生物学

[中图分类号] R 563.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)12-1481-07

Bioinformatics analysis of surfactant-associated protein A in cotton rat and its relationship with lung injury

YANG Shou, FENG Yi, ZHAO Li, HUANG Yi, HUANG Dao-chao*

Institute of Pediatric Research; Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education; International Science and Technology Cooperation Base for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Major Diseases in Children; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

[Abstract] **Objective** To analyze the pulmonary surfactant-associated protein A (SP-A) gene sequence and its bioinformatic characteristics and to observe SP-A mRNA and protein levels in lung injury model of cotton rats, so as to explore the correlation between lung injury and SP-A expression. **Methods** A total of 32 cotton rats were randomly divided into control (normal saline, NS) group and three lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury groups (the cotton rats were injected intraperitoneally with 2 mg/kg LPS for 24, 48 and 96 hours, respectively). The total RNA was extracted from lung tissue and SP-A gene was amplified by RT-PCR. Then bioinformatic analysis was done for SP-A characteristics. Histopathological changes of lung tissue were observed at different time points by hematoxylin-eosin staining; the mRNA level of SP-A was detected by real time-PCR and the protein level of SP-A was detected by Western blotting analysis. **Results** The coding region of cotton rat SP-A gene had 744 bp and encoded 248 amino acids, containing six cysteine conserved sites, four α -helices and two predicted N-glycosylation sites. Meanwhile, cotton rat SP-A shared high level of homology in the nucleotide sequences (75.4%~90.1%) and in deduced amino acid sequences (70.6%~87.1%) with other species. Moreover, histopathological changes of lung tissues in three LPS groups were more notable and severe than those in the control group, and the changes were related to LPS treatment time. Compared with the control group, the mRNA and protein levels of SP-A in lung tissues were significantly

[收稿日期] 2016-10-09 **[接受日期]** 2016-11-25

[基金项目] 国家自然科学基金(81302523),重庆市科委基础与前沿研究计划项目(cstc2016jcyjA0387, cstc2016jcyjA0007). Supported by National Natural Science Foundation of China (81302523) and Basic Science and Advanced Technology Research Foundation of Chongqing Science and Technology Committee (cstc2016jcyjA0387, cstc2016jcyjA0007).

[作者简介] 杨 守,硕士生. E-mail: 532051165@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-63631041, E-mail: huangdaocho@aliyun.com

increased in three LPS groups, with rapid increase starting from 24 h after treatment ($P < 0.001$, $P < 0.01$), with continuous increase at 48 h ($P < 0.001$ and $P < 0.01$), and slight decrease and still keeping at a high level at 96 h ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion SP-A gene of cotton rat is highly conservative; the mRNA and protein levels of SP-A are closely associated with the severity of lung injury.

[Key words] sigmodontinea; pulmonary surfactant-associated protein A; lung injury; computational biology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(12): 1481-1487]

肺表面活性相关蛋白 A (surfactant-associated protein A, SP-A) 是肺表面活性物质的重要组成部分, 来源于 II 型肺泡上皮细胞和 Clara 细胞, 分泌至肺泡气液界面和细支气管表面, 不仅维持着肺泡表面活性物质结构的稳定, 还参与了肺组织中重要的免疫调节^[1-2]。目前研究表明, SP-A 可通过吞噬作用、中和反应等方式与机体多种免疫因子共同作用调节肺部炎症反应^[3-5]。

棉鼠是一种主要分布于美洲的小型啮齿类实验动物, 20 世纪 80 年代首次引入我国。从最早用于脑脊髓灰白质炎的实验研究到目前广泛用于生命科学和医学领域的科学研究, 棉鼠作为实验动物已有 40 余年的应用历史^[6-7]。目前棉鼠已作为研究人类呼吸道疾病的理想动物模型, 它对人类呼吸道病毒的易感性和特异性远超其他模式动物^[8-10]。但目前国内外尚无棉鼠 SP-A 的基因序列及其生物信息学的相关报道, 且有关棉鼠 SP-A 在机体肺损伤过程中的免疫功能和免疫调控也亟待进一步探究。为此, 本研究探讨了棉鼠 SP-A 基因序列结构和生物信息学特点, 观察棉鼠肺损伤模型中 SP-A mRNA 和蛋白的表达水平, 初探 SP-A 表达规律与肺损伤的相关性, 为探究肺损伤发病进程建立理想的动物模型、提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及处理 4 周龄 SPF 级棉鼠 32 只, 体质量 30~40 g (棉鼠种源由北京维通利华实验动物技术有限公司代购), 随机均分为 3 个脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 实验组和 1 个生理盐水对照组, 每组 8 只。实验组棉鼠均腹腔注射给予 2 mg/kg 剂量的 LPS 溶液, 再按 LPS 处理 24、48 和 96 h 的 3 个不同时间点分为 3 个实验组; 对照组给予注射相同剂量的生理盐水。所有动物实验均在重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心完成 [动物使用许可证号: SYXK(渝)2012-0015]。

1.2 主要试剂 LPS 和 β -actin 小鼠单抗 AC-15 购自 Sigma 公司; RT-PCR 反转录试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; SYBR[®] Green qRT-PCR 试剂盒购自 KAPA biosystem 公司; 蛋白酶抑制剂购自罗氏公司; SP-A 兔多克隆抗体 PA1458 (该抗体为 Boster 公司生产, 主要用于检测大、小鼠 SP-A 蛋白, 是参照小鼠 SP-A 蛋白 C 端第 233~248 位氨基酸制备的兔源抗体, 抗原氨基酸序列为: WNDKGCLQYRLAICEF, 小鼠与大鼠的该抗原序列在第 237 位存在 1 个氨基酸差异, 与棉鼠在第 236 位和第 237 位存在 2 个氨基酸差异) 购自博士德生物公司; 山羊抗兔荧光二抗 C680 和山羊抗鼠荧光二抗 C800 购自 Lincoln 公司。

1.3 SP-A 基因的扩增 通过查询和比对 GenBank 中多个物种间 SP-A 基因的序列, 结合 Primer5.0 软件进行引物设计 (F 5'-ATG TCA CTG TGT TCT TTG GCC-3'; R 5'-TCA AAA TTC ACA AAT GGC CAG-3')。利用总 RNA 提取试剂盒提取棉鼠肺组织总 RNA; 再以总 RNA 为模板, 利用反转录试剂盒合成 cDNA; 然后以 cDNA 为模板进行 SP-A 基因的 PCR 扩增。扩增条件为: 预变性 (94°C, 3 min); 循环扩增 40 次 (94°C 变性 40 s, 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s); 延伸 (72°C, 5 min)。扩增结束后琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 SP-A 基因的生物信息学分析 将所得的 PCR 扩增产物及与预期片段大小一致的样品送上海嘉根生物科技有限公司进行测序, 所得测序结果采用 Standard Nucleotide BLAST 在线比对, 检索 GenBank 中与测序所得核苷酸和预测氨基酸序列结果相近的物种, 以确定所得序列为棉鼠 SP-A 基因序列。同时采用不同的生物信息学软件对该序列进行分析: 采用 Compute pI/Mw 分析 SP-A 蛋白相对分子质量; 采用 SignalP version 4.1 分析 SP-A 蛋白信号肽; 采用 GORIV 分析 SP-A 氨基酸序列 α 螺旋

结构;采用 NetNGlyc version 1.0 分析 SP-A 氨基酸序列糖基化位点。

1.5 肺组织病理学分析 实验组棉鼠在经 2 mg/kg LPS 分别处理 24、48 和 96 h 后置 20% CO₂ 盒内安乐死处死,解剖取肺组织保存于 4% 多聚甲醛溶液中,再取少许肺组织经脱水和包埋后,石蜡切片,然后 H-E 染色观察比较各组病理学特征。

1.6 SP-A mRNA 表达水平检测 在核酸浓度测定仪 NanoDrop 2000 上测定肺组织总 RNA 浓度后,各组样本均取相同浓度的 RNA,经反转录后生成 cDNA,然后以该 cDNA 作为反应模板,应用 SYBR® Green qRT-PCR 试剂盒定量分析 SP-A mRNA 的表达水平。SP-A 和内参 β -actin 的 qRT-PCR 扩增引物分别为:F 5'-CTG GCA GAG ATG GGC GAG AT-3',R 5'-CAG GCT CTC CCT TGT CTC CAC-3';F 5'-CCG TCT TCC CCT CCA TCG T-3',R 5'-GCC TCG TCG CCC ACA TAG-3'。每个样本均做 3 个复孔,所得检测结果采用 2^{- Δ Ct}法 (Δ Ct=Ct_{SP-A} - Ct _{β -actin}) 进行定量分析。

1.7 SP-A 蛋白表达检测 将肺组织经加有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解后,用 BCA 试剂盒测定其蛋白总浓度。各组取蛋白量相同的样品,加入 4× 上样缓冲液混匀,沸水中煮 5 min 后行 16% SDS-PAGE。电泳后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,并于含 5% 脱脂奶粉的缓冲液中封闭 1 h;然后在稀释

的多克隆抗体 PA1458 和 AC-15 抗体中 4℃ 孵育过夜;次日孵育荧光二抗,最后应用双色荧光成像系统进行图像采集和蛋白表达的半定量分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,运用 GraphPad Prism 5.0 软件作图;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间 SP-A 的 mRNA 和蛋白水平比较均采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 棉鼠 SP-A 基因的序列分析和鉴定 将 PCR 产物送生物公司测序,测序结果显示该片段长为 744 bp,编码 248 个氨基酸,该片段长度与我们预期的棉鼠 SP-A 基因相符。为进一步确认该片段是否为棉鼠 SP-A 基因,再利用 Standard Nucleotide BLAST 软件对该片段进行在线比对,结果所得序列与 GenBank 中其他 11 个物种的 SP-A 基因在核苷酸水平的同源性在 75.4%~90.1%之间,在氨基酸水平的同源性在 70.2%~87.1%之间(表 1),其中尤其与金仓鼠(90.1%和 87.1%)和小鼠(89.7%和 86.3%)的 SP-A 基因同源性最高,由此推定扩增获得的序列为棉鼠 SP-A 基因。我们首次扩增所得的棉鼠 SP-A 基因序列已录入 GenBank(序列号: KJ586796)。

表 1 棉鼠与其他 11 个物种 SP-A 基因序列同源性比较

Tab 1 Homology comparison of cotton rat SP-A gene seruence with other species

GenBank No.	Species	Cotton rat	Cattle	Golden hamster	Guinea pig	Horse	Human	Mouse	Norway rat	Pig	Rabbit	Macaque	Sheep
KJ586796	Cotton rat	—	77.4	87.1	71.4	71.8	70.6	86.3	85.5	71.9	72.6	70.2	76.6
NM_001077838	Cattle	79.4	—	80.2	72.2	79.0	75.8	79.4	77.0	81.9	82.7	76.2	96.0
XM_005080971	Golden hamster	90.1	80.3	—	73.0	75.8	72.2	86.7	86.7	73.9	76.6	72.2	80.7
CPU40869	Guinea pig	76.6	78.2	77.9	—	69.4	70.2	73.4	73.0	68.9	71.0	70.2	71.8
AB015963	Horse	78.3	85.3	79.9	79.0	—	73.0	73.4	73.4	76.3	78.2	73.0	77.8
NM_005411	Human	75.4	81.7	78.1	78.6	82.1	—	71.4	71.1	73.5	75.0	91.9	75.4
NM_023134	Mouse	89.7	80.7	88.9	78.1	79.9	77.2	—	91.9	73.5	75.8	71.4	79.0
NM_001270645	Norway rat	88.4	79.4	88.2	77.8	79.0	93.3	77.5	—	71.1	75.0	71.4	76.2
NM_214265	Pig	77.5	86.8	78.8	78.4	84.8	79.3	81.7	78.7	—	76.3	73.1	80.7
NM_001082229	Rabbit	76.1	83.5	78.9	78.5	83.8	79.0	81.1	77.8	80.3	—	75.0	83.1
NM_001195376	Macaque	75.8	82.2	78.7	78.2	81.7	76.8	93.6	77.0	81.1	80.9	—	75.0
NM_001195376	Sheep	79.0	95.6	80.1	78.9	84.7	80.2	81.8	78.3	86.7	83.8	81.8	—

Upper diagonal: Percentage of amino acid; Lower diagonal: Percentage of nucleotide. SP-A: Surfactant-associated protein A

2.2 棉鼠 SP-A 基因的生物信息学分析 利用 Compute pI/Mw、SignalP version 4. 1、NetNGlyc version 1. 0 和 GOR IV 等生物信息学软件对所得棉鼠 SP-A 基因序列进行分析,结果棉鼠 SP-A 基因开放阅读框含 744 个核苷酸,编码 248 个氨基酸,其中前 17 个氨基酸组成信号肽,预测蛋白相对分子质量为 26 300。同时发现 SP-A 蛋白在 4、26、155、224、

238 和 246 位氨基酸含 6 个保守的半胱氨酸位点;在 21~24 和 207~210 位氨基酸含 2 个 N-糖基化位点。此外,SP-A 蛋白在 7~15、101~127、129~134 和 172~177 氨基酸位点形成了 4 个 α 螺旋的二级结构(图 1),稳定的 α 螺旋约占总预测二级结构的 19%。结果表明,SP-A 基因是一个保守的基因,其蛋白结构相对稳定。

		<u>Helix A</u> ↓							
Cotton rat	MSL	SLAFVL	FLTVAA	GIKV	NGTBV	ITGSP	GIPGTPGSHG	LPGRDGRDGI	50
Mouse	...	G...	T...	A...	N...	50
Norway rat	T...	V. D.	A...	A. N...	50
Golden hamster	A.	L.....	A...	50
Cattle	. L...	TLT.	LWM.	S. LEC	DVK.	. L...	50
Human	. W.	P.	LN.	I. MA.	S. AVC	EVKD.	. V...	50
Pig	. LRWP.	. LTF	L. LAVS.	LEC	DVK.	. LA...	50
Cotton rat	KGDP	PPGPM	GPPGGMPGLP	GRDGLPGAPG	APGERGDKGE	PGERGLPGFP			100
Mouse	100
Norway rat	100
Golden hamster	100
Cattle	100
Human	100
Pig	100
		<u>Helix B</u>			<u>Helix C</u>				
Cotton rat	AYLDEKLQTE	LHEIKHKILQ	IMGVLSFQGY	MLAVGKVFPS	SNGQSVNFDT				150
Mouse	E...A	. Y...	Q...	T.....	L..S	. S..D...	T.....	150
Norway rat	E...	. Y...	Q...	T.....	L..S	. S..D...	T.....	150
Golden hamster	E. M.	. Q. R...	M. . . .	LH. S	. S. . . .	T.....	150	
Cattle	E. GT	R. QV..	SQ. . .	RL. S	V.	T.....	150
Human	. H.	E. AT	. DFR.	Q. . .	TR. A.	L. S	IMT.	IT. A	150
Pig	. H.	E. SA	R. Q. . .	S. . . .	EF	T. . . .	150
		<u>Helix D</u>							
Cotton rat	IRET	TRAGG	-NIAVPR	SPE	ENEAISSITT	KYNIYTYLGM	VEGQTPGDFQ		199
Mouse	...	M.	-H. A. N.	A.	K	T. P. . . .	V I.	H
Norway rat	. K. M.	-	T.	A. AK	N. V. . . .	I. D.
Golden hamster	A.	-	T.	VN	. H. T. A. D.	R
Cattle	. K. L. A. V.	-H. A.	V. VK	T. A. . . .	L	P. A. . . .	Y
Human	. Q. A. A. . . .	-R.	N.	A. FVK	T. A. V. L	T. PS. . . .	R
Pig	SL. S. VPEQV	GR. A.	A. VK	. H. T. A. . . .	L	P. A. . . .	F
Cotton rat	YLDGASV	NVT	NWYPGEPKGR	GQEN	VEMYT	DGSWDRN	L QYRLAI	EF	248
Mouse	R.	K. K.	K.	KG.	248
Norway rat	R.	K. K.	T.	G.	V.
Golden hamster	P.	A.	R.	K. K.	N. R.	K.	248
Cattle	P.	R.	K. K.	I. Q.	K.	248
Human	. S. TP.	R.	A.	K. Q. Q.	YS.	T.
Pig	TP.	R.	K. K. Q.	Q	249

图 1 棉鼠 SP-A 基因的生物信息学分析

Fig 1 Bioinformatics analysis of SP-A gene between cotton rat and other species

Conserved sequences with respect to cotton rat SP-A are indicated by dots. Dashes indicate missing residues. The arrow indicates the signal peptide cleavage site. The conserved cysteine residues are highlighted. The positions of α-helices are marked with single line. The boxed amino acids indicate potential N-glycosylation sites. SP-A: Surfactant-associated protein A

2.3 肺组织病理学变化 将实验组与对照组棉鼠的肺组织通过固定、脱水和包埋后,经石蜡切片和 H-E 染色,最后在显微镜下观察,比较各组棉鼠肺组织的病理学特征。结果显示对照组棉鼠肺组织纹理清晰,肺泡均匀,肺泡腔干净,无异常细胞浸润,组织无明显病理性改变(图 2A);而 2 mg/kg LPS 处理

24、48 和 96 h 的 3 个实验组棉鼠肺组织均呈现出不同程度的病理学改变,主要表现为肺泡壁增厚、肺泡腔变窄,甚至部分肺泡壁结构不清晰,同时伴有大量炎性细胞浸润,且随 LPS 刺激时间的延长,肺部组织的病理学改变逐渐加重(图 2B~2D)。

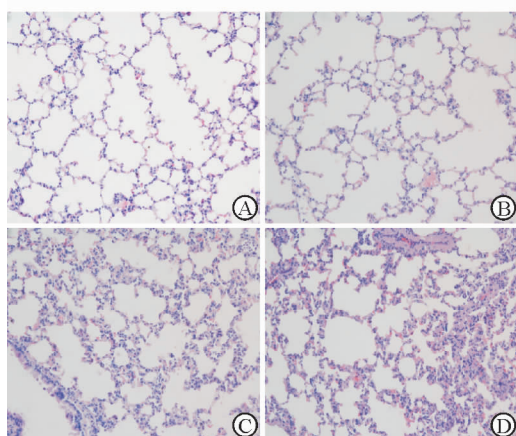


图 2 各组棉鼠肺组织病理学比较(H-E 染色)

Fig 2 Pathological changes of cotton rat lung tissues (H-E staining)

A: Control group; B-D: 2 mg/kg LPS treatment for 24, 48 and 96 h, respectively. Original magnification: $\times 200$

2.4 LPS 对 SP-A mRNA 表达水平的影响 应用 qRT-PCR 方法检测实验组和对照组棉鼠肺组织中 SP-A mRNA 的表达水平。如图 3 所示,与对照组相比,实验组棉鼠在用 LPS 处理 24 h 后肺组织中的 SP-A mRNA 的表达水平增加($P < 0.01$);持续处理 48 h 后,肺组织中的 SP-A mRNA 水平仍继续上升;持续处理 96 h 后,肺组织中的 SP-A mRNA 水平比 48 h 和 24 h 时下降($P < 0.01$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。

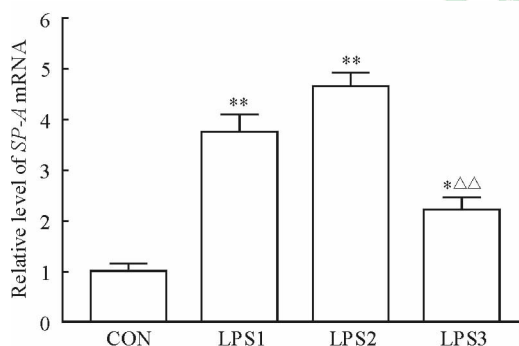


图 3 LPS 处理不同时间对肺组织 SP-A mRNA 表达的影响

Fig 3 The changes of relative level of SP-A mRNA in cotton rat lung tissues at different time points

CON: Control group; LPS1-3: Three groups of 24, 48 and 96 h after treatment with 2 mg/kg LPS. SP-A: Surfactant-associated protein A; LPS: Lipopolysaccharide. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs LPS1 group or LPS2 group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

2.5 LPS 对 SP-A 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果如图 4 所示,与对照组相比,24 h 实验组棉鼠肺组织中 SP-A 蛋白的表达水平迅速增加($P <$

0.01),LPS 连续处理 48 h 后 SP-A 蛋白的表达水平仍略有上升。当 LPS 处理 96 h 后,棉鼠肺组织中 SP-A 蛋白的表达水平相比 24 h 组和 48 h 组均略有下降(差异无统计学意义),但仍高于对照组($P < 0.01$)。结果表明利用 SP-A 抗小鼠多克隆抗体来检测棉鼠 SP-A 蛋白是有效可行的,也证明 SP-A 蛋白具有高度的保守性。

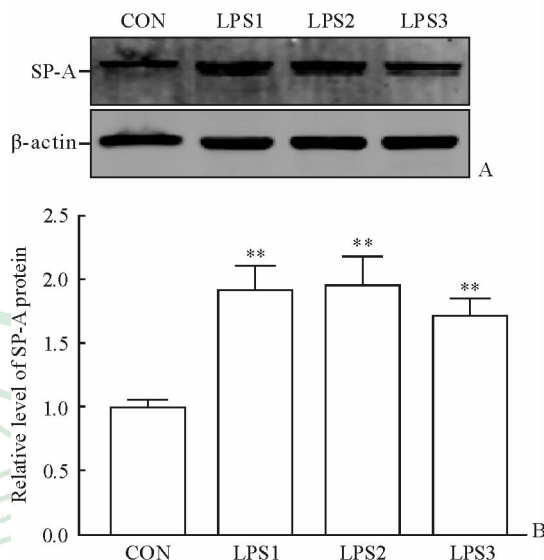


图 4 LPS 处理不同时间对肺组织中 SP-A 蛋白表达的影响

Fig 4 The changes of SP-A protein in cotton rat lung tissues at different time points

A: Detection of SP-A by Western blotting analysis; B: Relative expression level of SP-A protein. CON: Control group; LPS1-3: Three groups of 24, 48 and 96 h after treatment with 2 mg/kg LPS. SP-A: Surfactant-associated protein A; LPS: Lipopolysaccharide. ** $P < 0.01$ vs CON group. $n=8$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

SP-A 不仅是肺表面活性物质中重要的一种,也是众多天然免疫分子中的一员,它除了具有维持机体正常呼吸的功能外,还在肺组织中发挥着特殊的局部免疫作用^[2,11]。SP-A 可与多种病原微生物发生直接中和反应,并通过糖识别结构域与病原微生物的糖基特异性牢固结合,促发快速凝集反应^[12]。同时,SP-A 作为一种趋化因子,能迅速发挥趋化作用诱发多种免疫细胞发生趋化转移,并以 Ca^{2+} 依赖方式促进免疫细胞对病原微生物的吞噬^[13]。SP-A 还可选择性地与吞噬细胞膜上的特定受体结合,这种结合不仅可介导吞噬细胞识别病原微生物,还可激发细胞内超氧自由基和一氧化氮的合成与释放,

促进细胞发挥吞噬作用^[14-15]。此外,SP-A还具有局部免疫调节作用,它能以剂量依赖方式来调控炎症介质和促炎性细胞因子的合成和释放,诱发机体的防御反应,从而避免因炎症反应的过度恶化造成的肺组织严重损伤,维持局部的免疫稳态^[16-17]。因此,SP-A的异常表达水平从某种程度上体现了炎症反应强度、肺组织的损伤程度及疾病发生和发展的过程。因此,阐明SP-A在机体肺损伤过程中的免疫功能和免疫调控机制对呼吸道疾病的治疗具有重要的参考价值。

棉鼠是众多啮齿类实验动物模型中的一种,相比大鼠、小鼠而言目前对棉鼠生命科学领域的研究相对滞后,其可应用的科研领域和方向相对局限,但由于其对呼吸道病原体的易感性和敏感性远超于其他模式动物,使其成为呼吸道病毒相关研究公认的理想动物模型^[9]。因而利用棉鼠建立肺损伤模型来研究SP-A与疾病的关系可能更具典型性和科学性,然而国内外尚无关于棉鼠SP-A的研究报道,且无检测棉鼠SP-A蛋白的特异性试剂盒。本研究从获得SP-A基因序列着手,分析SP-A基因序列的基本生物信息学构成,结果发现棉鼠与其他11个物种的SP-A基因具有高度同源性,尤其和小鼠SP-A的核苷酸序列同源性高达89.7%,这一结果为后期利用小鼠SP-A的部分氨基酸制备的抗体来检测棉鼠SP-A蛋白奠定了理论基础,也为后期实验的可行性提供了保障。本研究也表明,在生物物种进化过程中SP-A基因是一个相对保守的基因,SP-A基因这种保守性从某种程度上也表明其在机体内具有重要功能和作用。

肺损伤是多数呼吸系统疾病发生和发展的一个重要病理过程,常表现为大量炎症因子的释放以及强烈的炎症反应^[18]。在病理学特点和发病机制上,LPS诱导的肺损伤与其他多种致病因素诱导的肺损伤均具有相似性。Sugahara等^[19]在LPS诱导的大鼠肺损伤模型中发现,SP-A mRNA的表达水平在用LPS处理后明显增加。在人肺泡上皮细胞A549中也证实LPS处理可增加SP-A mRNA的表达水平,同时发现SP-A蛋白浓度与LPS处理存在时间依赖性^[20]。因此本研究基于LPS诱导的肺损伤模型来探讨棉鼠SP-A的表达规律与疾病发生、发展的关系。本研究在棉鼠上成功构建肺损伤模型,且

发现该动物模型肺组织的病理性病变程度与LPS处理时间有关,其病变主要表现为肺泡腔变窄和大量炎性细胞浸润;同时发现SP-A mRNA和蛋白的表达水平在LPS处理24 h后开始增加,48 h时持续上升并到达峰值,96 h时略有下降,但仍保持在较高水平。在该模型中肺组织的病理变化与SP-A mRNA和蛋白的表达水平均存在一定时间依赖性,且SP-A的水平与肺组织病理学改变的严重程度存在量效关系,SP-A在肺组织中的表达水平在一定时间内反映了肺损伤病情的严重程度。可见棉鼠SP-A mRNA和蛋白表达水平反映了肺损伤的不同时程,可作为肺损伤病理进程的标志物之一,同时也为判断肺损伤病情严重程度提供了参考。

本研究首次扩增获得了棉鼠SP-A基因,并分析了其生物信息学结构,结果表明棉鼠SP-A基因具有高度保守性。研究同时发现棉鼠SP-A mRNA和蛋白的表达水平具有LPS刺激时间依赖性,且与肺损伤严重程度密切相关,反映了肺损伤的不同时程,证实了SP-A可作为肺损伤病理进程的标志物,但有关的表达调控机制还需继续深入研究。

[参考文献]

- [1] KISHORE U, GREENHOUGH T J, WATERS P, SHRIVE A K, GHAI R, KAMRAN M F, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors[J]. *Mol Immunol*, 2006, 43: 1293-1315.
- [2] WANG J Y, REID K B. The immunoregulatory roles of lung surfactant collectins SP-A, and SP-D, in allergen-induced airway inflammation [J]. *Immunobiology*, 2007, 212(4/5): 417-425.
- [3] 王谦,宋勇.肺表面活性蛋白A在急性肺损伤发病机制中作用的研究进展[J]. *中国急救医学*, 2005, 25: 588-590.
- [4] JAKEL A, CLARK H, REID K B, SIM R B. The human lung surfactant proteins A (SP-A) and D (SP-D) interact with apoptotic target cells by different binding mechanisms[J]. *Immunobiology*, 2010, 215: 551-558.
- [5] PANDIT H, MADHUKARAN S P, NAYAK A, MADAN T. SP-A and SP-D in host defense against fungal infections and allergies[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 651-661.

- [6] NIEWIESK S, PRINCE G. Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) in infectious diseases[J]. *Lab Anim*, 2002, 36: 357-372.
- [7] GREEN M G, HUEY D, NIEWIESK S. The cotton rat (*Sigmodon hispidus*) as an animal model for respiratory tract infections with human pathogens[J]. *Lab Anim (NY)*, 2013, 42: 170-176.
- [8] BLANCO J C, PLETNEVA L, BOUKHVALOVA M, RICHARDSON J Y, HARRIS K A, PRINCE G A. The cotton rat: an underutilized animal model for human infectious diseases can now be exploited using specific reagents to cytokines, chemokines, and interferons[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24: 21-28.
- [9] BOUKHVALOVA M S, PRINCE G A, BLANCO J C. The cotton rat model of respiratory viral infections [J]. *Biologicals*, 2009, 37: 152-159.
- [10] OTTOLINI M G, BLANCO J C, EICHELBERGER M C, PORTER D D, PLETNEVA L, RICHARDSON J Y, et al. The cotton rat provides a useful small-animal model for the study of influenza virus pathogenesis[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 10): 2823-2830.
- [11] REID K B. Functional roles of the lung surfactant proteins SP-A and SP-D in innate immunity [J]. *Immunobiology*, 1998, 199: 200-207.
- [12] HEINRICH S M, GRIESE M. Assessment of surfactant protein A (SP-A) dependent agglutination [J]. *BMC Pulm Med*, 2010, 10: 59.
- [13] BI X, TANEVA S, KEOUGH K M, MENDELSON R, FLACH C R. Thermal stability and DPPC/Ca²⁺ interactions of pulmonary surfactant SP-A from bulk-phase and monolayer IR spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 13659-13669.
- [14] 王妍亭, 颜 浩, 韩 娟, 刘进衡. 肺表面活性蛋白 A 与肺部疾病关系的研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24: 1-4.
- [15] CARRETO-BINAGHI L E, ALIOUAT EL M, TAYLOR M L. Surfactant proteins, SP-A and SP-D, in respiratory fungal infections: their role in the inflammatory response[J]. *Respir Res*, 2016, 17: 66.
- [16] KISHORE U, BERNAL A L, KAMRAN M F, SAXENA S, SINGH M, SARMA P U, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005, 53: 399-417.
- [17] SU X, LI Z, WANG M, WANG Q, LU W, LI X, et al. The protective effect of different airway humidification liquids to lung after tracheotomy in traumatic brain injury: the role of pulmonary surfactant protein-A (SP-A)[J]. *Gene*, 2016, 577: 89-95.
- [18] HUANG X, LIU Y, LU Y, MA C. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26: 265-271.
- [19] SUGAHARA K, IYAMA K, SANO K, KUROKI Y, AKINO T, MATSUMOTO M. Overexpression of surfactant protein SP-A, SP-B, and SP-C mRNA in rat lungs with lipopolysaccharide-induced injury[J]. *Lab Invest*, 1996, 74: 209-220.
- [20] CHUANG C Y, CHEN T L, CHEN R M. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-caused induction of surfactant protein-A gene expression in human alveolar epithelial A549 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191 (2/3): 132-139.