

环境低温对肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 表达的影响

王建琳 乔健 赵立红 王慧煜 利凯 徐彤 田勇

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 研究环境低温诱发肉鸡肺动脉高压综合征 (PHS) 过程中肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 的表达变化, 从而确定原癌基因 *c-jun* 在环境低温诱发肉鸡 PHS 过程中的参与作用, 为肉鸡 PHS 发生机制的研究提供基础。160 只雄性 AA 商品代肉鸡 15 日龄随机分为对照组 (22 ± 1.5) 和低温组 (11 ± 2)。15 ~ 50 日龄, 每周每组随机取 6 只, 做肺组织石蜡切片, 应用原位杂交染色法进行 *c-jun* mRNA 杂交, 并结合图像分析法, 测定对照组与低温组肉鸡肺小动脉壁原癌基因 *c-jun* mRNA 的表达情况。1) 低温组肉鸡 PHS 发生率 (18.75%) 极显著高于对照组 (1.25%) ($P < 0.01$); 2) 低温组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 的表达从 22 日龄开始较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 从 29 ~ 50 日龄较对照组极显著升高 ($P < 0.01$)。说明环境低温明显诱发了肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 的表达, 且 *c-jun* mRNA 的表达参与了环境低温诱发的肉鸡 PHS 的发生。

关键词 肉鸡; 肺动脉高压综合征; 肺小动脉壁; *c-jun* mRNA; 环境低温

中图分类号 S 856.2

文章编号 1007-4333(2006)06-0083-04

文献标识码 A

Effect of low ambient temperature on expression of *c-jun* mRNA oncogene in the wall of pulmonary arteries in broilers

Wang Jianlin, Qiao Jian, Zhao Lihong, Wang Huiyu, Li Kai, Xu Tong, Tian Yong

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The study was conducted to assess the expression of *c-jun* mRNA oncogene in the wall of pulmonary arteries in the development of pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers induced by a low ambient temperature. Six broilers in control group (22 ± 1.5) and low temperature group (11 ± 2) were sampled every week from 15 to 50 days of age and lungs were paraffin-embedded and sectioned. The expression of *c-jun* mRNA oncogene in the wall of pulmonary arteries was assessed by in situ hybridization and image analysis. Finally, the incidence of PHS was calculated. The results showed that the incidence of PHS in low temperature groups was significantly higher than that in the control group and the expression of *c-jun* mRNA oncogene in the wall of pulmonary arteries in low temperature group was also higher than that in the control group. These demonstrated that the expression of *c-jun* mRNA oncogene in the wall of pulmonary arteries in broilers was induced by low ambient temperature, and facilitated the development of PHS in broilers induced by low ambient temperature.

Key words broilers; pulmonary hypertension syndrome; pulmonary artery; *c-jun* mRNA; low ambient temperature

人类慢性缺氧性肺动脉高压形成过程中肺血管发生明显重塑, 这与肺动脉血管平滑肌细胞增殖及某些原癌基因的激活和表达增强密切相关^[1]。在环境低温诱发肉鸡肺动脉高压综合征 (pulmonary hypertension syndrome, PHS) 发生发展过程中, 也明显出现了肺血管重塑, 其机制并不完全清楚^[2],

但研究发现环境低温诱发肉鸡 PHS 发生过程中肺小动脉血管平滑肌细胞增殖明显增加, 是否原癌基因在此过程中也被激活而表达明显增强, 并未见研究报告, 故研究原癌基因在肉鸡肺小动脉壁表达的变化将为肉鸡肺血管重塑机制的研究和肉鸡 PHS 机制的研究提供基础。

收稿日期: 2006-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070567; 30571398); 博士点基金资助项目 (2003001932)

作者简介: 王建琳, 博士研究生, E-mail: bjsxxw@126.com; 乔健, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事禽类心血管系统病理生理研究, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

在细胞生长调控研究中发现, *c-jun* 是与细胞增殖调控相关的主要原癌基因,其编码的核蛋白作为主要的转录调控因子,通过结合在次级反应基因5'侧翼区的某些序列上,促进其表达而参与细胞的增殖调控^[3]。研究发现血管平滑肌细胞 *c-jun* mRNA 表达水平于激光损伤血管后迅速增加,并且其高度表达出现在形态可见的血管平滑肌细胞增殖之前^[4],表明血管平滑肌细胞的增殖与 *c-jun* mRNA 的表达密切相关。有关肉鸡 PHS 发病过程中肺动脉壁原癌基因的表达,只检索到高盐诱发肉鸡 PHS 过程中肺小动脉壁 *c-myc* mRNA 的表达^[5],而未见环境低温对其他癌基因的影响。

本课题同期研究发现,环境低温诱发肉鸡 PHS 过程中肺动脉血管平滑肌细胞发生明显增殖,而肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 是否发生明显表达,并不清楚。

本试验旨在研究环境低温诱发肉鸡 PHS 过程中肺小动脉壁原癌基因 *c-jun* mRNA 表达的动态变化,从而为环境低温诱发肉鸡 PHS 过程中肺血管重塑机制的研究提供基础,为肉鸡 PHS 发生机制的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

160只1日龄AA商品代肉仔鸡(购于北京华都肉鸡场)常规育雏和免疫,15日龄时随机分为2组各80只,常温对照组,(22±1.5)℃环境饲养;低温试验组,(11±2)℃环境饲养,自由采食和饮水。每天观察并记录PHS发生情况,最后统计PHS发生率以肉鸡腹腔积液>20mL为PHS发生的判定标准;肉鸡处死后按Julian^[6]方法计算右心肥大指数,即右心室占全心室的质量比($m(RV)/m(TV)$),以其>0.250作为PHS发生的另一判定标准。二者同时具备作为肉鸡PHS发生的最后判定标准。

1.2 肺小动脉壁原癌基因 *c-jun* mRNA 的测定

从15~50日龄,每周每组随机选取6只,翅静脉注射过量的戊巴比妥钠处死,打开胸腔,取右侧肺叶下1/3,立即固定于4%(体积分数)多聚甲醛/0.1mol/L PBS(pH7.0~7.6)中,内含有1/1000(体积分数,下同)DEPC,酒精脱水,二甲苯透明后石蜡包埋,切片。

1.2.1 原位杂交操作程序 1)石蜡切片经常规脱蜡至水。30%(体积分数)H₂O₂1份+蒸馏水10份

混合,室温孵育10min以灭活内源性过氧化物酶;蒸馏水洗5min,3次。2)暴露mRNA核酸片段。在切片上滴加0.03mg/mL柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1mL0.03mg/mL柠檬酸滴加2滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),室温消化5min。原位杂交用PBS洗5min,3次;蒸馏水洗5min,1次。3)后固定。室温固定10min;蒸馏水洗5min,3次。固定液为0.01mg/mL多聚甲醛/0.1mol/L PBS(pH7.0~7.6),含有1/1000DEPC。4)预杂交。干的杂交盒底部加20%(体积分数)甘油20mL以保持湿度。每张切片加20μL预杂交液,于恒温箱42℃孵育2h,吸取多余液体,不洗。5)杂交。每张切片加20μL杂交液,将原位杂交专用盖玻片保护膜揭开,盖在切片上,恒温箱50℃杂交过夜。6)杂交后洗涤。揭掉盖玻片,37℃左右水温的2×SSC洗涤5min,2次;37℃0.5×SSC洗15min,1次;37℃0.2×SSC洗涤15min,2次。7)滴加封闭液。37℃孵育30min,甩去多余液体,不洗。8)滴加生物素化鼠抗地高辛。37℃孵育60min,原位杂交用PBS洗5min,4次。9)滴加SABC:37℃孵育20min。原位杂交用PBS洗5min,3次。10)滴加生物素化过氧化物酶。37℃孵育20min。原位杂交用PBS洗5min,4次。11)DAB显色剂显色7~8min,自来水充分冲洗。12)苏木素复染,充分冲洗,酒精脱水,二甲苯透明,封片。空白对照采用PBS替代杂交液。

c-jun mRNA 序列为:

5'—TATGA CGATG CCCTC
AACGC CTCGT TCCTC—3'

5'—CCGGT CTACG CAAAC
CTCAG CAACT TCAAC—3'

5'—TTAAC AGTGG GTGCC
AACTC ATGCT AACGC—3'

1.2.2 分析方法 Olympus-BX51显微镜并结合图像处理系统(Image-Pro plus 5.0)分别对每张切片进行观察和分析,选择与副支气管伴行、较圆整的肺小动脉(直径小于100μm)。应用图像处理分析软件测量所采集肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 阳性物质的平均光密度,用来反映 *c-jun* mRNA 的相对含量。

2 结果

2.1 各组肉鸡肺动脉高压综合征发生率

整个试验饲养阶段,对照组肉鸡PHS发生率为1.25%,低温组发生率为18.75%,差异极显著($P <$

0.01) (表 1)。低温处理后, 肉鸡 PHS 主要发生于 30~50 日龄, 其中 37~43 日龄为高峰期, 占整个饲养过程中 PHS 发生率的 66.7%。

2.2 各组肉鸡右心肥大指数的变化

低温组肉鸡右心肥大指数从 22 日龄开始升高, 29~50 日龄较对照组显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (表 2)。

2.3 各组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 的变化

低温组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 从 22 日龄开始较对照组升高 ($P < 0.05$), 29~50 日龄较对

照组极显著升高 ($P < 0.01$) (表 3)。

表 1 对照组和低温处理组肉鸡肺动脉高压综合征发生率

Table 1 Incidence of PHS in different groups

组别	日龄/d						PHS 发生总数	发病率/%
	15	22	29	36	43	50		
对照组(CK)	0	0	0	0	0	1	1	1.25
低温组(L)	0	0	0	4	10	1	15	18.75**

注: **低温组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), $n = 80$; 下表同。

表 2 各组肉鸡右心肥大指数的动态变化

Table 2 $m(RV)$ $m(TV)$ of broilers in different groups

组别	日龄/d					
	15	22	29	36	43	50
对照组(CK)	0.200 ± 0.02	0.214 ± 0.031	0.208 ± 0.013	0.198 ± 0.013	0.208 ± 0.019	0.216 ± 0.018
低温组(L)	0.200 ± 0.01	0.257 ± 0.016	0.270 ± 0.036**	0.289 ± 0.055**	0.289 ± 0.040**	0.275 ± 0.046*

注: *低温组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), $n = 6$, 下表同。

表 3 各组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 变化

Table 3 *c-jun* mRNA in pulmonary arteries of broilers in different groups

组别	日龄/d					
	15	22	29	36	43	50
对照组(CK)	0.016 ± 0.00044	0.020 ± 0.00085	0.022 ± 0.00145	0.021 ± 0.00218	0.021 ± 0.0209	0.023 ± 0.00222
低温组(L)	0.014 ± 0.00293	0.024 ± 0.00031*	0.0328 ± 0.00052**	0.082 ± 0.00202**	0.132 ± 0.02551**	0.112 ± 0.01024**

3 讨论

低温环境是诱发肉鸡 PHS 的有效方法, 本研究通过环境低温诱发肉鸡 PHS, 其发生率高达 18.75%, 远高于对照 (1.25%), 表明低温成功诱发了 PHS。 $m(RV)$ $m(TV)$, 作为右心肥大指数, 是 PHS 发生过程中的一个病理参数, 可用来测定肉鸡在损伤明显出现以前的 PHS 发生进程状态^[7-8]。本试验低温组肉鸡 $m(RV)$: $m(TV)$ 在低温处理后期 (29~50 日龄) 明显高于对照组, 表明低温处理肉鸡处于 PHS 发生过程中。

c-jun 是核内癌基因, 其表达产物为核内磷蛋白。该蛋白实际上是转录活性因子, 它可与某些基因的顺式作用 DNA 区域特异结合, 从而调节这些基因的表达, 来对细胞分裂增殖进行调控^[9]。研究表明, 在外界因素刺激下 *c-jun* 表达明显增加。对动脉损伤早期不同时间点动脉血管平滑肌细胞 *c-*

jun 基因表达的研究表明, *c-jun* mRNA 在损伤后 30 min 达到高峰, 1~2 h 仍可检测到多量的表达^[10]。本试验研究中发现从低温处理后 1 周开始到试验结束, 低温组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 表达明显高于对照组, 表明环境低温明显诱发了肉鸡肺小动脉壁 *c-jun* mRNA 的表达。

在正常情况下, 原癌基因不表达或只是有限表达, 当其受到各种理化因素或机械刺激时, 被激活而异常表达^[9]。研究表明, 哺乳动物 *c-jun* mRNA 的异常表达与血管平滑肌细胞的过度增殖密切相关。血管平滑肌细胞受到细胞增殖丝裂信号刺激后, 原癌基因 *c-jun* 表达活性明显升高^[11]。应用反义技术抑制 *c-jun* 基因表达可有效抑制血管平滑肌细胞增殖^[12]。林全等^[13]发现 *c-jun* 蛋白及 *c-jun* mRNA 的相对含量与平滑肌细胞增殖程度呈正相关, 说明 *c-jun* 参与了低氧性肺动脉高压的肺血管重塑过程。本研究发现, 对照组肉鸡肺小动脉壁 *c-jun*

mRNA 15日龄时表达较低,从22日龄开始到50日龄表达相对恒定,保持在较小变动范围内,这提示 *cjun* mRNA 的正常表达可能参与了肺动脉血管的某些正常的生理功能。低温处理组肉鸡肺小动脉壁 *cjun* mRNA 于低温处理后1周(即22日龄)开始增加,处理后2周(29日龄)开始显著增加,到处理后4周(43日龄)为最高峰,达到同期对照组的6.3倍,处理后5周(50日龄)开始下降。在 *cjun* mRNA 表达明显增强的阶段,恰好是肉鸡 *m* (RV): *m* (TV) 明显升高和 PHS 发生的时期,表明低温诱发肉鸡肺小动脉壁 *cjun* mRNA 的表达与肉鸡 PHS 的发生密切相关。本试验同期的研究表明,环境低温明显诱发了肉鸡肺动脉血管平滑肌细胞的增殖和肺血管重塑,这是否与 *cjun* mRNA 的表达相关,有待于进一步研究。

本试验中环境低温明显诱发了肉鸡肺小动脉壁 *cjun* mRNA 的表达,表明 *cjun* mRNA 的表达参与了环境低温诱发的肉鸡 PHS 的发生发展,提示 *cjun* mRNA 的表达可能与肺动脉血管平滑肌细胞增殖和肺血管重塑有关。

参 考 文 献

- [1] 陶清国,张珍祥. 肺血管结构改建、平滑肌细胞增生与原癌基因[J]. 国外医学呼吸分册,1997,17:22-24
- [2] Tan Xun, Liu YanJuan, Li JinChun, et al. Activation of PKCa and pulmonary vascular remodeling in broilers[J]. Research of Veterinary Science, 2005, 79, 131-137
- [3] Kyriakis J M, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of *cjun* kinases[J]. Nature, 1994, 369: 156-160
- [4] 陈明哲,陈大新,陈风荣. 1.06 μm 激光血管成形术后动脉平滑肌细胞中的癌基因表达[J]. 中国激光医学杂志,1994,3(1):5-8
- [5] 高铭宇. 肺动脉高压在高盐负荷所致肉鸡腹水综合征中作用及机制[D]. 北京:中国农业大学,2004
- [6] Julian R J. The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens[J]. Avian Pathology, 1987, 16:61-71
- [7] Peacock A J, Pickett C, Morris K, et al. The relationship between rapid growth and pulmonary haemodynamics in the fast-growing broiler chicken[J]. American Review of Respiratory Disease, 1989, 139:15-24
- [8] Balog J M, Kidd B D, Huff W E, et al. Effect of cold stress on broilers selected for resistance or susceptibility to ascites syndrome[J]. Poultry Science, 2003, 82:1383-1387
- [9] 韩启德,文允镒. 血管生物学[M]. 北京:北京医科大学-中国协和医科大学联合出版社,1997:289-290
- [10] 蒲庆华,时德,赵渝. 大鼠颈动脉气囊导管损伤早期原癌基因 *cfos*、*cjun* 研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(1):12-15
- [11] 温进坤,贾根深,魏素珍. 内皮素促进细胞增殖相关基因的表达和血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志,1995,3(1):5-8
- [12] 石纓,温进坤. 反义癌基因 *cjun* 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 生物化学杂志,1996,12(2):153-156
- [13] 林全,王良兴,周向锋,等. 姜黄素防治慢性低 O₂ 高 CO₂ 大鼠肺动脉高压与 *cjun*、*cfos* 的关系研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2005,10(10):1118-1122