论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0642-05

宫内致敏及生后高氧暴露对新生小鼠 TGF-β1 及 α-SMA 表达的影响

赵倩倩,邓 春,郭春宝,华子瑜,冯 杰 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科)

[摘要] **目的** 观察宫内炎性致敏及生后高氧暴露新生小鼠转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)在新生鼠肺组织的表达情况,探讨支气管肺发育不良(Bronchopulmonary dysplasia,BPD)发病机制。**方法** 新生小鼠按照随机数字表法分为 LPS 组 + 空气组、LPS + 高氧组、生理盐水 + 空气对照组、生理盐水 + 高氧组,应用 HE 染色、放射性肺泡计数(RAC)、免疫组织化学、免疫荧光化学和荧光定量 PCR 技术,讨论生后第 1、3、7、10、14 天肺组织的病理改变,检测 TGF-β1、α-SMA 蛋白和基因 mRNA 表达水平。**结果** ①LPS + 高氧组和生理盐水 + 高氧组出现肺发育障碍,肺泡逐渐融合,RAC 逐渐降低,与生理盐水 + 高氧组比较,LPS + 高氧组降低明显($P<0.05$)。②LPS + 高氧组和生理盐水 + 高氧组第 3 天后肺组织 TGF-β1 蛋白表达明显高于 LPS 组 + 空气组和生理盐水 + 空气组($P=0.000$),随着暴露时间的延长进行性增高。③LPS + 高氧组和生理盐水 + 高氧组 7 d 后肺组织α-SMA 蛋白表达明显高于 LPS 组 + 空气组和生理盐水 + 空气组($P=0.000$),亦随着暴露时间的延长而增高。④TGF-β1 和 α-SMA mRNA 表达规律与其蛋白表达变化规律基本一致。**结论** 宫内致敏增强了高氧暴露导致新生鼠肺 TGF-β1 和 α-SMA 表达的上调,肺发育受阻;由宫内致敏及生后高氧引起支气管肺发育不良样改变可能与 TGF-β1 和 α-SMA 表达上调有关。

[关键词] 高氧症;支气管肺发育不良;转化生长因子 β1;肌动蛋白类;小鼠
[中图法分类号] R722.190.2; R392.3; R-332 **[文献标志码]** A

Intra-amniotic endotoxin and postborn hyperoxic exposure upregulate transforming growth factor-β1 and α-smooth muscle actin in newborn mice lung

Zhao Qianqian, Deng Chun, Guo Chunbao, Hua Ziyu, Feng Jie (Department of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and α-smooth muscle actin (α-SMA) in the lungs of mice with intra-amniotic endotoxin priming and exposed to 60% hyperoxia after born in order to elucidate the possible relationship with bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** Fifty C57 pregnant mice were divided into 2 groups: lipopolysaccharide (LPS, 40 μg/L) group and saline solution group, and then received an intra-amniotic injection of corresponding solution on E15. The neonatal mice of each group were randomized to be set in 60% oxygen exposure or in room air. So there were 4 subgroups, LPS + air, LPS + hyperoxia, saline + air and saline + hyperoxia groups. On days 1, 3, 7, 10 and 14 after birth (8 rats each time point), the lung histological changes was assessed with hematoxylin and eosin (HE) staining for radial alveolar counting (RAC). The expressions of TGF-β1 and α-SMA proteins were detected by immunohistochemical and immunofluorescence staining, and the expressions of TGF-β1 and α-SMA mRNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** In the LPS + hyperoxia group and saline + hyperoxia group, RAC began to decrease on day 3 , and then further declined in a time-dependent manner. Compared with saline + hyperoxia group, LPS + hyperoxia group had significantly lower RAC ($P<0.05$). The expression of TGF-β1 protein in LPS + hyperoxia group and saline + hyperoxia group was significantly higher than those in LPS + air group and saline + air group on day 7 ($P=0.00, 0.00$), which was elevated with the elapse of hyperoxia exposure time. The expression of α-SMA protein in LPS + hyperoxia group and saline + hyperoxia group was significantly higher than those in LPS + air group and saline + air group on day 7 ($P=0.00, 0.00$), which was increased with the increasing of hyperoxia exposure time. The changes of mRNA

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770950)
[通信作者] 邓 春,电话:(023)66750760,E-mail:gchunbao@yahoo.com.cn

expression of TGF-β1 and α-SMA were basically consistent with the changes on protein expression. **Conclusion** These results suggest that the intra-amniotic endotoxin priming can enhance the effect of hyperxia exposure in up-regulating TGF-β1 and α-SMA, which may be involved in the pathogenesis of BPD.

[Key words] hyperoxia; bronchopulmonary dysplasia; transforming growth factor beta; actins; mice

Supported by the General Program of National Science Foundation of China (30770950). Corresponding author: Deng Chun, Tel: 86-23-66750760, E-mail: gchunbao@yahoo.com.cn

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是一种慢性肺疾病,多见于早产儿,发病率逐渐增高[1],但其发生机制尚未明确。近来研究发现转化生长因子(transforming growth factor, TGF-β1)与BPD的发生有着密切的关系。Gauldie等[2]通过改变新生鼠肺激活型TGF-β1基因,肺发育的重要时期过度表达TGF-β1,出现BPD样形态改变;临床报道发生BPD的患儿,肺泡灌洗液中TGF-β1的水平超过正常[3],这些研究都表明内源性TGF-β1是调控肺泡发育的一个重要因素。另外,平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)在BPD动物模型中表达增高,可能与BPD的产生有关。因此,本研究着重就TGF-β1和α-SMA在新生鼠宫内致敏及生后60%氧暴露诱导BPD样改变中可能存在的作用进行讨论。

1 材料与方法

1.1 动物模型

清洁级定期受孕C57小鼠50只(购于重庆医科大学实验动物中心),按照随机数字表法分为LPS组和生理盐水对照组。根据Prince等[4]的实验方法,于孕15 d打开孕鼠腹腔,用微量加样器将LPS(40 μg/L)注入羊膜腔内,每个孕囊5 μl。盐水对照组注入等量的生理盐水(0.9%)。新生小鼠出生后12 h内按随机数字表法分为:LPS+高氧组,生理盐水+高氧组,LPS+空气组,生理盐水+空气组。分别置自制氧箱和空气箱内,氧气浓度维持在60%,氧箱内湿度维持在60%~65%,每组10~12只,高氧处理组和空气对照组母鼠每天定时兑换,避免母鼠氧中毒对仔鼠护理降低,每天开箱1 h,喂水及饲料,更换敷料称量,空气组饲养条件与高氧组相同。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 第1、3、7、10、14天分别从4组中各抽取8只小鼠,腹腔内注射10%水合氯醛麻醉。气管插管保持肺充气状态,开胸放血,PBS冲洗肺直至白色,右支气管结扎,迅速切取右肺,液氮速冻后存于-80 ℃冰箱,用于荧光定量PCR(real time polymerase chain reaction, RT-PCR)。左支气管注入4%多聚甲醛至肺尖膨胀,取左肺,置4%多聚甲醛固定液中常温固定24 h,常规石蜡包埋切片,连续切片,5 μm/片,用于HE染色,观察肺组织形态学结构。

1.2.2 放射肺泡计数 参照Jakkula等[5]的方法,从呼吸性细支气管中心至最近纤维隔或胸膜,该直线上的肺泡数即为RAC值,光镜下观察,每张切片计数10次,取其平均值。

1.2.3 免疫组织化学检测TGF-β1 S-P二步法。免疫组织化学时间盒购于美国Abcam公司(ab64715)。具体操作按说明说进行(抗TGF-β1单抗稀释浓度为1∶50),结果以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性。每张切片在10×40倍显微镜下随机选5个视野计算光密度,求其平均值。

1.2.4 免疫荧光化学检测α-SMA 免疫荧光化学时间和(FITC标记)购于美国Abcam公司(ab15267)。具体操作按说明说进行(抗α-SMA多抗为工作液),以细胞内见绿色荧光物质表达为阳性细胞。每张切片在10×40倍显微镜下随机选5个视野计算光密度,求其平均值。

1.2.5 荧光定量PCR

1.2.5.1 引物 引物序列由上海鼎安生物有限公司设计并合成,TGF-β1的上游引物:5′-AGTCAGTCCGTTGGGTCTTCTC-3′;下游引物:5′-TCTGGGGATTGGTATCACTATGTT-3′。α-SMA的上游引物:5′-TCTGGGGATTGGTATCACTATGTT-3′;下游引物:5′-GGAGCCTGGCAAGCACCTA-3′。内参β-actin的上游引物:5′-CACACCCGCCACCAGTTCG-3′;下游引物:5′-GTCCTTCT-GACCCATTCCCACC-3′。使用前,将引物稀释至10 μmol/L,-20 ℃保存。

1.2.5.2 总RNA的提取及荧光定量PCR 总RNA提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司,逆转录试剂盒TaKaRa及SYBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ试剂盒购于大连宝生物有限公司。利用Bioteke试剂提取肺组织总RNA, NANODROP 1000分析仪测定RNA浓度,根据总RNA浓度进行逆转录,共20 μl。TGF-β1和α-SMA mRNA GenBank序列号分别为: NM_011577和C77251,以做内参。PCR反应体系包括SYBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ 10 μl,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μl, cDNA模板2 μl,6.4 μl灭菌蒸馏水,总体积20 μl。于Step-one real time PCR System扩增仪进行扩增。反应条件:两步法PCR扩增,第一步,95 ℃ 30 s预变性。第二步,95 ℃ 5 s,61 ℃ 30 s,共40个循环,其间读板检测荧光。扩增完后,行溶解曲线分析,以0.17 ℃/s变化速度从55 ℃到95 ℃每隔2 s记录一次荧光值,获得溶解曲线。反应在Step-one荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, USA)中进行。采用相对定量法[6],测定目的基因PCR产物和β-actinPCR产物的Ct值。相对定量公式:$2^{-\triangle Ct}\times 100\%$,其中$\triangle Ct = Ct_{(目的基因)} - Ct_{(\beta\text{-actin})}$。

1.3 统计学分析

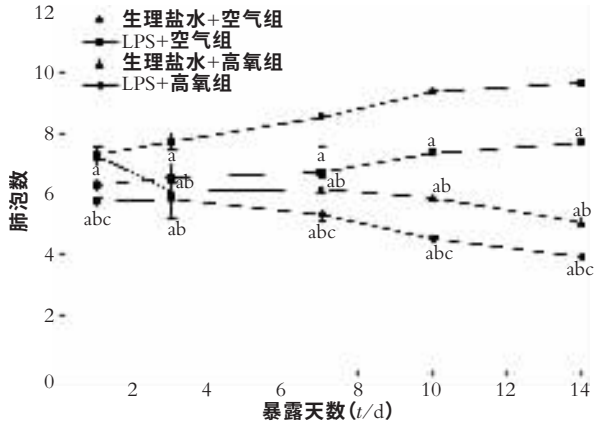
数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察

生理盐水+空气组:新生小鼠在生后1~14 d,随着鼠龄增

加肺组织发育逐渐成熟,肺泡结构规则,大小均匀,肺泡间隔变薄,肺泡数 RAC 逐渐增多;LPS + 空气组:在第 1 天 RAC 低于生理盐水 + 空气组($P<0.05$),之后随鼠龄增加逐渐增高,至第 14 天已高于高氧组($P<0.05$),但仍低于生理盐水 + 空气组($P<0.05$);生理盐水 + 高氧组、LPS + 高氧组:第 3 天开始 RAC 低于生理盐水 + 空气组和 LPS + 空气组($P<0.05$),随鼠龄增加逐渐下降,肺泡壁增厚,肺泡逐渐出现融合,简单化。见图 1、2。

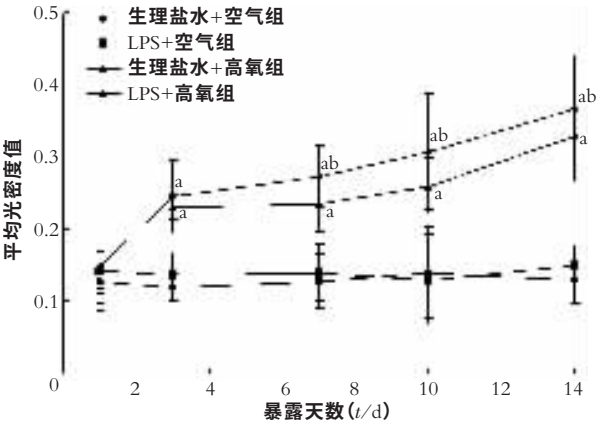


a:$P<0.05$,与生理盐水 + 空气组比较;b:$P<0.05$,与 LPS + 生理盐水组比较;c: $P<0.05$,与生理盐水 + 高氧组比较

图 1 4 组新生小鼠肺组织肺泡数的动态变化

2.2 免疫组织化学法检测 TGF-β1 蛋白的表达

TGF-β1 在正常肺组织主要表达于细支气管黏膜上皮细胞和血管内皮细胞,定位于细胞浆内。生理盐水 + 空气组 TGF-β1 在支气管黏膜有少量的表达,各时间点低表达($P>0.05$);LPS + 空气组第 1 天时与 LPS + 高氧组相同($P>0.05$),其余各时间点 LPS + 空气组、生理盐水 + 空气组呈相似趋势,均低于生理盐水 + 高氧组和 LPS + 高氧组($P<0.05$);生理盐水 + 高氧组、LPS + 高氧组随暴露时间延长,逐渐增高,LPS + 高氧组增高明显,至第 14 天 TGF-β1 表达以肺内间质和支气管上皮、肺泡上皮为主,并出现 TGF-β1 阳性的肺泡巨噬细胞。见图 3、4。

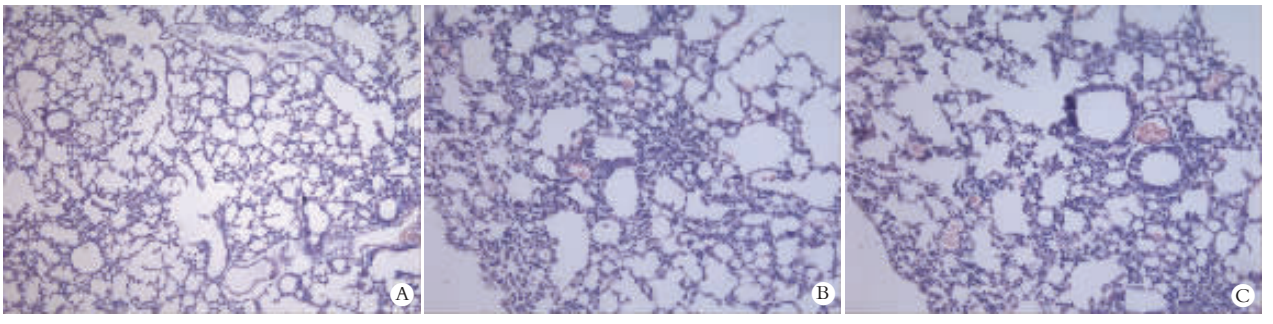


a:$P<0.05$,与生理盐水 + 空气组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水 + 高氧组比较

图 3 各组各时间点新生小鼠肺组织 TGF-β1 表达的动态变化

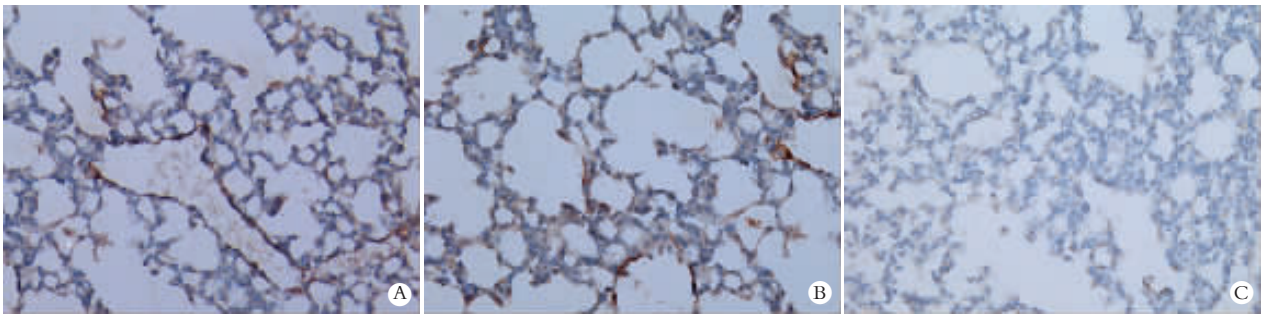
2.3 免疫荧光化学法检测 α-SMA 蛋白的表达

α-SMA 在正常肺组织主要表达于支气管和血管平滑肌,定位于细胞质。免疫荧光结果显示,4 组生后 1 ~ 14 天随鼠龄增加 α-SMA 蛋白均有逐渐上升趋势,在第 1、3 天,4 组表达均无差别($P>0.05$),主要表达于血管和气道平滑肌,肺间质没有观察到 α-SMA,第 7 天后 LPS + 高氧组和生理盐水 + 高氧组均高于其他 2 组($P<0.05$), LPS + 高氧组升高明显,主要分布于血管和气道平滑肌、肺间质内有阳性表达。见图 5、6。



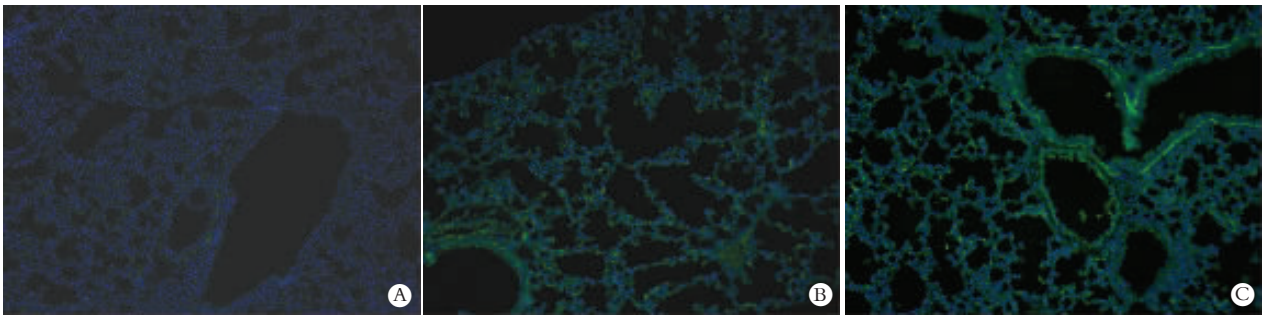
A:生理盐水 + 空气组;B:LPS + 高氧组;C:生理盐水 + 高氧组

图 2 各组 14 d 肺组织病理改变 (HE ×100)



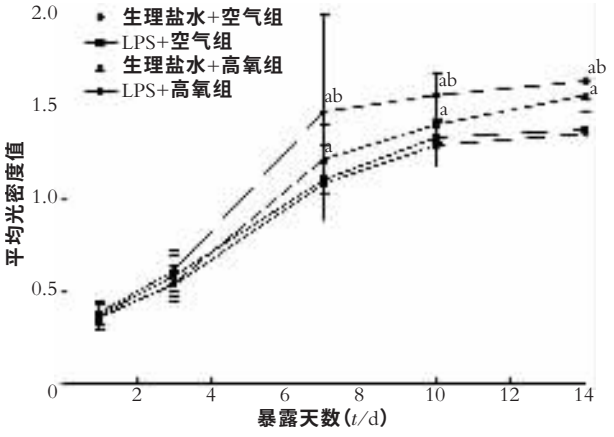
A:LPS + 高氧组;B:生理盐水 + 高氧组;C: 生理盐水 + 空气组

图 4 免疫组织化学法检测新生鼠 14 d 时肺组织 TGF-β1 的表达 (S-P ×400)



A:生理盐水 + 空气组;B:生理盐水 + 高氧组;C:LPS + 高氧组

图 5　免疫荧光化学检测新生鼠 14 d 时肺组织 α-SMA 的表达　(S-P ×200)



a:$P<0.05$,与生理盐水和空气组比较;b:$P<0.05$,与生理盐水 + 高氧组比较

图 6　各组各时间点新生小鼠肺组织 α-SMA 表达的动态变化

2.4　TGF-β1 和 α-SMA mRNA 表达情况

TGF-β1 mRNA 表达:第 1 天 4 组表达均无差异;第 3 天后生理盐水 + 高氧组、LPS + 高氧组表达逐渐增高,LPS + 高氧组增高明显。生理盐水 + 空气组、LPS + 空气组各时间点表达无显著性差异($P>0.05$),与其蛋白表达规律相一致。α-SMA mRNA 表达:4 组表达均有增高趋势,但生理盐水 + 高氧组、LPS + 高氧组增高明显,与其他 2 组比较,差异显著($P<0.05$),与其蛋白表达规律基本一致(表 1、2)。

表 1　各组 α-SMA mRNA 表达变化($2^{-\triangle Ct}$)

组别	1 d	3 d	7 d	10 d	14 d
生理盐水 + 空气组	0.181 ± 0.073	0.464 ± 0.323^{a}	1.133 ± 0.735^{a}	2.500 ± 1.222^{a}	1.421 ± 1.392
生理盐水 + 高氧组	0.154 ± 0.077	0.503 ± 0.271^{a}	6.000 ± 2.191^{ab}	69.333 ± 31.462^{ab}	320.000 ± 156.760^{ab}
LPS + 空气组	0.075 ± 0.328	0.711 ± 0.328^{a}	1.128 ± 0.736^{a}	2.911 ± 2.763^{a}	1.000 ± 0.552
LPS + 高氧组	0.270 ± 0.118	1.080 ± 0.489^{ab}	18.667 ± 10.932^{ba}	160.000 ± 78.381^{ab}	(4.2 ± 3.6) × 10^{6ab}

a:$P<0.05$,与同一时间点生理盐水 + 空气组比较;b:$P<0.05$,与同一组前一时间点比较

表 2　各组 TGF-β1 mRNA 表达变化($2^{-\triangle Ct}$)

组别	1 d	3 d	7 d	10 d	14 d
生理盐水 + 空气组	0.008 ± 0.005	0.012 ± 0.046	0.091 ± 0.003	0.085 ± 0.091	0.095 ± 0.091
生理盐水 + 高氧组	0.010 ± 0.004	0.065 ± 0.049^{a}	0.917 ± 0.545^{ab}	3.333 ± 1.032^{ab}	10.000 ± 4.898^{ab}
LPS + 空气组	0.076 ± 0.054^{a}	0.013 ± 0.003	0.012 ± 0.004	0.112 ± 0.195	0.152 ± 0.172
LPS + 高氧组	0.074 ± 0.058^{a}	0.219 ± 0.156^{ab}	2.417 ± 1.357^{ab}	6.667 ± 2.065^{ab}	29.330 ± 18.704^{ab}

a:$P<0.05$,与同一时间点生理盐水 + 空气组比较;b:$P<0.05$,与同一组前一时间点比较

3　讨论

支气管肺发育不良的发病率逐渐提高,研究其发生机制就成了当前的热点之一,而研究的前提是合适的 BPD 动物模型的制作。很多学者采用高浓度氧暴露新生鼠或早产鼠制作 BPD 动物模型,然而临床上发生支气管肺发育不良的患儿,他们的母亲都有不同程度的绒膜羊膜炎,胎肺在宫内处于炎性环境中,生后肺发育尚不成熟,可能出现呼吸窘迫、呼吸暂停等症状,需要通氧或甚至用机械通气,可能诱导生前炎性暴露早产儿或新生儿的未成熟肺发生进一步损伤,最终发展为 BPD[7]。流行病学调查和临床研究发现引起宫内感染的病原体主要为解脲脲原体,其可以导致孕妇发生绒毛羊膜炎[8],而 Moss 等[9]通过动物实验推测内毒素等致病物质可能通过多种途径影响肺的正常发育。Steffen 等[10]研究发现予孕羊宫腔内注射 LPS 后,早产羊出现肺发育受阻,肺泡简单化,且啮齿类动物实验也有类似发现[11]。故宫内致炎后给予中、高浓度氧暴露,这样更符合临床上 BPD 的发生。

TGF-β1 是一类具有双向调节功能的细胞因子,具有多种生物学效应,在多种正常及转化细胞中都有表达,如活化 T 细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞等,它调控细胞生长、分化,在个体发育、免疫、炎症过程都有重要作用。大量研究表明 TGF-β1 是肺发育过程中的关键因子,与 BPD 发生有着密切的联系。过度表达的 TGF-β1 可以抑制肺泡Ⅱ型上皮细胞的增殖、分化而导致新生鼠肺发育障碍[12];TGF-β1 可能与肺组织细胞膜上的受体结合,将活化的信号传递至细胞内,细胞内 Smad2、Smad3 磷酸化将信号传入细胞核内,激活核内转录蛋白 STAT-1 促进合成胶原蛋白[13,14];选择性抑制胶原酶、基质金属蛋白酶(MMP)的表达,诱导组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)的表达,使胶原降解减少[15],肺细胞外基质增多。

本实验采用LPS致使小鼠宫内感染的实验方法，于孕15 d C57孕鼠羊膜腔内注射LPS(40 ng/ml)，于20 d对子宫进行HE染色发现胎膜、子宫和胎盘中性粒细胞、淋巴细胞浸润，表明胎肺在宫内处于炎性环境。宫内炎性致敏后给予60%氧暴露新生小鼠14 d，制作BPD模型，探讨BPD发病机制。我们发现生理盐水+空气组新生小鼠生后1～14 d，随着鼠龄增加肺组织发育逐渐成熟，肺泡结构逐渐规则，大小均匀，肺泡间隔变薄，RAC逐渐增高；LPS+空气组RAC逐渐增高但未达到正常水平，表明宫内炎症抑制胎肺的发育，生后虽有一定程度恢复，仍不完全，但其TGF-β1表达与生理盐水+空气组没有明显差异，可能由于单纯宫内感染未激活TGF-β1通路，而是通过其他通路导致肺损伤，尚需进一步研究。LPS+高氧组、生理盐水+高氧组各时间点TGF-β1蛋白和mRNA的表达，明显高于相应时间点生理盐水+空气组，随暴露时间的延长逐渐增强，而LPS+高氧组明显高于生理盐水+高氧组。由此推断宫内炎性致敏或/和生后高氧暴露均可引起新生小鼠肺组织TGF-β1表达上调，过度表达TGF-β1导致肺泡发育受阻，但宫内致敏和生后高氧的这种作用更强。而宫内致敏如何加强高氧所致肺损伤的作用机制，目前尚不清楚，可能与内毒素激活细胞外信号激活酶(Erk)调控巨噬细胞活性有关，也可能与内毒素引起突发氧化作用有关，尚需进一步实验探寻。

同时，我们还发现α-SMA蛋白和mRNA与TGF-β1的表达趋势相似，可能由于TGF-β1可以诱导肺Ⅱ型上皮细胞发生肺内上皮-间质转换机制（Epithelial-Mesenchymal Transition，EMT），上调肺间质细胞，并表达间质细胞特异性细胞标记α-SMA[16]。TGF-β1表达增高促进了α-SMA的表达，间质细胞的增生，可能在BPD发病过程中具有关键性意义。

宫内炎性致敏及生后高氧暴露上调肺组织TGF-β1和α-SMA，导致肺发育受阻，故宫内致敏和生后高氧暴露对TGF-β1和α-SMA肺发育信号传导通路的研究对于阐明BPD的发生机理有重要价值，为探索新的防治途径开辟新经。

参考文献：

[1] Alejandre-Alcazar M A, Kwapiszewska G, Reiss I, *et al*. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(2): L537－L549.

[2] Gauldie J, Galt T, Bonniaud P, *et al*. Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Pathol, 2003, 163(6): 2575－2584.

[3] Lecart C, Cayabyab R, Buckley S, *et al*. Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation[J]. Biol Neonate, 2000, 77(4): 217－223.

[4] Prince L S, Okoh V O, Moninger T O, *et al*. Lipopolysaccharide increases alveolar type Ⅱ cell number in fetal mouse lungs through Toll-like receptor 4 and NF-kappa B[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(5): L999－L1006.

[5] Jakkula M, Le-Cras T D, Gebb S, *et al*. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(3): L600－L607.

[6] Stams W A, den-Boer M L, Beverloo H B, *et al*. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21) + pediatric ALL[J]. Blood, 2003, 101(7): 2743－2747.

[7] Speer C P. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2006, 11(5): 345－362.

[8] Moss T J, Nitsos I, Kramer B W, *et al*. Intra-amniotic endotoxin induces lung maturation by direct effects on the developing respiratory tract in preterm sheep[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(4): 1059－1065.

[9] Schelonka R L, Waites K B. Ureaplasma infection and neonatal lung disease[J]. Semin Perinatol, 2007, 31(1): 2－9.

[10] Kunzmann S, Speer C P, Jobe A H, *et al*. Antenatal inflammation induced TGF-beta1 but suppressed CTGF in preterm lungs[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1): L223－L231.

[11] Ueda K, Cho K, Matsuda T, *et al*. A rat model for arrest of alveolarization induced by antenatal endotoxin administration[J]. Pediatr Res, 2006, 59(3): 396－400.

[12] Northway W H Jr, Rosan R C, Porter D Y. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia[J]. N Engl J Med, 1967, 276(7): 357－368.

[13] Roberts A B, Piek E, Bottinger E P, *et al*. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? [J]. Chest, 2001, 120(1 Suppl): 43S－47S.

[14] Datta P K, Moses H C. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(9): 3157－3167.

[15] Buckley S, Warburton D. Dynamics of metalloproteinase-2 and -9, TGF-beta, and uPA activities during normoxic vs. hyperoxic alveolarization[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4): L747－L754.

[16] Janda E, Lehmann K, Killisch I, *et al*. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways[J]. J Cell Biol, 2002, 156(2): 299－313.

（**收稿**：2009-10-12；**修回**：2009-12-13）

（编辑　吴培红）