维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

EGF和TRH对不同时间胎肺SP-B基因表达的影响

王凤英[1]，王玉梅[2]，俞炽阳[1]，李玉艳[1]，袁吉钊[1]（第三军医大学附属西南医院：1. 妇产科；2. 肝胆科，重庆 400038）

[摘 要] **目的** 探讨表皮生长因子（EGF）和促甲状腺激素释放激素（TRH）对胎肺SP-B基因表达的影响，并与地塞米松（Dex）进行比较。**方法** 采用兔作动物模型，产前分别给予EGF、TRH及Dex处理，通过RT-PCR及Southern印迹分析检测第25天和27天胎肺的SP-B mRNA，电镜观察胎肺板层体的形成。**结果** EGF、TRH和Dex处理组胎肺SP-B mRNA水平明显高于对照组，各处理组之间无显著差别，但在第25天SP-B mRNA表达仅见于Dex处理组。超微结构显示TRH、EGF和Dex处理组第27天的胎肺不仅含有板层体的Ⅱ型上皮细胞的数量显著多于对照组，而且单个Ⅱ型上皮细胞内的板层体数目也多于对照组。妊娠第25天，除Dex处理组可观察到个别Ⅱ型上皮细胞含有少量不成熟板层体外，其余处理组和对照组内均未发现。**结论** 在妊娠第27天，EGF和TRH均能促进兔胎肺SP-B表达，其作用程度与Dex接近，但在妊娠更早时间，EGF和TRH对SP-B的促进作用不如Dex显著。胎肺SP-B mRNA可检出和升高时间与板层体出现和增加时间一致，SP-B mRNA可能是胎肺成熟的标志。

[关键词] 表面活性物质蛋白B；胎肺；板层体；兔
[中图分类号] R722 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2006)03-0145-03

Effects of EGF and TRH on SP-BmRNA expression in fetal lung at different gestation time

WANG Feng-ying, WANG Yu-mei, YU Chi-yang, LI Yu-yan, YUAN Ji-zhao (Department of Obstetric and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective Sduty on the effects of EGF and TRH on SP-B mRNA in fetal lung, and compare their efficacy with dexamethsone (Dex). **Methods** Pregnant rabbits were treated respectively by EGF, TRH and Dex. SP-B mRNA in their fetal lung were detected with RT-PCR and Southern blotting. Lamellar bodies were observed by electron microscope. **Results** SP-B mRNA level in 27th gestation day lung from EGF, TRH and Dex treated groups were significantly higher as compared with that from the control, but no significant difference among the three treated groups. However, only Dex appeared to increase the SP-B mRNA levels, and SP-B mRNA in other treated groups and in the control group was undetectable in 25th day fetal lung. The ultrastructural features showed that alveolar type Ⅱ cells in each treatment group contained more lamellar bodies than thant in control group. However, only few type Ⅱ cell of Dex-treated fetal lungs contained less and small, lamellar bodies in 25 day lung. The other treated groups and the control group showed no any lamellar body. **Conclusion** EGF, TRH and Dex can promote SP-B expression in fetal lung at 27th gestation day, and their effects have no significant difference, but at more early time, their efficacy less than that of Dex. The time when SP-B mRNA can be detectable and rise was coincident with the time that lamellar body appear and increase in fetal lung, so SP-B mRNA may be as a mark of fetal lung maturation.

Keywords: SP-B; fetal lung; lamellar body; rabbit

呼吸窘迫综合征（respiration distress syndrome, RDS）是早产儿死亡的主要原因，是由于肺发育不成熟，表面活性物质蛋白（surfactant proteins, SP）缺乏或产生不足所致。SP主要由SP-A、SP-B、SP-C及SP-D等组成。其中SP-B为其最重要的组分，具有保持表面活性物质生物特征和生理功能以及肺Ⅱ型上皮细胞分泌功能的作用，是新生儿正常呼吸和存活的基本需要。有研究表明表皮生长因子（EGF）、促甲状腺激素释放激素（TRH）对胎儿肺成熟均有促进作用，产前给予EGF或TRH处理可增加表面活性物质产生，减少动物RDS的发生[1-2]。为进一步了解TRH和EGF对胎肺发育的调节机制，本文通过动物模型，研究产前EGF、TRH对未成熟胎肺SP-B表达的影响，并与临床促胎肺成熟药物地塞米松（Dex）进行比较。

1 材料与方法

1.1 动物准备及标本采集

采用日本种大耳雌性白兔，于发情期与雄兔合笼交配一次，以交配后1 d定为妊娠第1天。孕兔于妊娠第22天或第24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目（39700149）
[作者简介] 王凤英（1965-），女，四川省高县人，副主任护师，博士，主要从事围产期母胎保健、辅助生殖技术方面的研究。电话：（023）68765903
[收稿日期] 2006-02-23 [修回日期] 2006-03-30

维普资讯 http://www.cqvip.com

天开始用药处理。耳静脉注射 TRH 40 μg/kg(TRH 组)、EGF 20 μg/kg(EGF 组),Dex 2.5 mg/只(Dex 组),每日 1 次,连续用药 3 d。对照组用生理盐水代替以上药物。于妊娠第 25 或第 27 天(即处理 3 d 后)剖宫取出胎仔,取胎肺,一部分胎肺用 3% 的戊二醛固定用于电镜观察。一部分立即投入液氮保存。

1.2 胎肺 SP-B mRNA 测定

1.2.1 提取总 RNA 胎肺于 Tripure 分离液中匀浆,参照有关文献提供的方法提取和纯化 RNA。RNA 样品通过核酸分析仪测定 260、280 nm 波长的 OD 值及核酸浓度。

1.2.2 SP-B mRNA 的 RT-PCR 引物序列:SP-B 上游引物 5′-ATCGTCAACATCCTAACCAAG-3′,下游引物5′-AGCTGGAACTCAAACTGGTG-3′,产物长度 1 303 bp;β-actin 上游引物5′-AGGAGCACCCCGTGCTGCTGA-3′,下游引物5′-GTCCACCGCAAATGTTCTAG-3′,产物长度 833 bp。RT-PCR 反应体系:按试剂说明书配制,总反应体积 50 μl。各样品同时扩增 β-actin 作为内参照,以标化不同样本的 RNA 模板浓度。RT-PCR 反应参数:48 ℃,45 min×1→94 ℃,2 min×1→94 ℃,30 s;50 ℃,1 min;68 ℃,2min; ×40 →68 ℃,7 min ×1。

1.2.3 产物电泳及 Southern 印迹 RT-PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm^2。电泳后凝胶进行凝胶成像,用毛细管转移法将产物转移至尼龙膜。

1.2.4 寡核苷酸探针的标记和纯化 用于 RT-PCR 产物 Southern 杂交的寡核苷酸探针序列,SP-B 为 5′-ATTTGTGGAGCTGCACACGCCCCA-3′,β-actin 为5′-CATCACCATTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG-3′。采用 T4 噬菌体多核苷酸激酶催化的磷酸化反应标记寡核苷酸探针,标记后探针用乙醇沉淀法纯化。

1.2.5 杂交及放射自显影 将印迹尼龙膜置于一容器中,加入预杂交液,密封容器,55 ℃预杂交 5 h 以上。换入新的预杂交液和已标记的探针(SP-B 1.5 pmol,β-actin 3 pmol),55 ℃杂交过夜。取出印迹膜,包于塑料薄膜中,将杂交膜与 X 光片紧贴一起置于两侧已固定增感屏的片盒中,-50 ℃冰箱内曝光至有清晰影象出现。

1.3 电镜观察

胎肺标本按电镜标本常规处理方法制成超薄切片,双铅染色,在透射电镜下观察胎肺Ⅱ型上皮细胞及肺泡腔内板层体的发育情况。

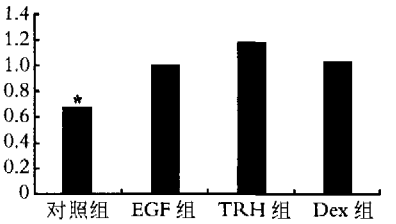
1.4 统计学分析

通过图像扫描仪将杂交印迹进行扫描,用 Photosharp 软件分别测得 SP-B 和 β-actin 杂交信号的灰度值。以 SP-B 基因灰度值与相同样本的 β-actin 的灰度值的比值作为统计参数,采用方差分析比较各组胎肺 SP 基因表达的相对差异。

2 结果

2.1 各组胎肺 SP-B mRNA 水平

EGF、TRH 和 Dex 处理组胎肺 SP-B mRNA 水平明显高于对照组,但各处理组之间无显著差别(图 1)。但在第 25 天,SP-B mRNA 的表达仅见于 Dex 处理组,对照组和其他两个处理组低于可检测水平。母兔 SP-B mRNA 表达与对照组第 27 天胎肺接近。

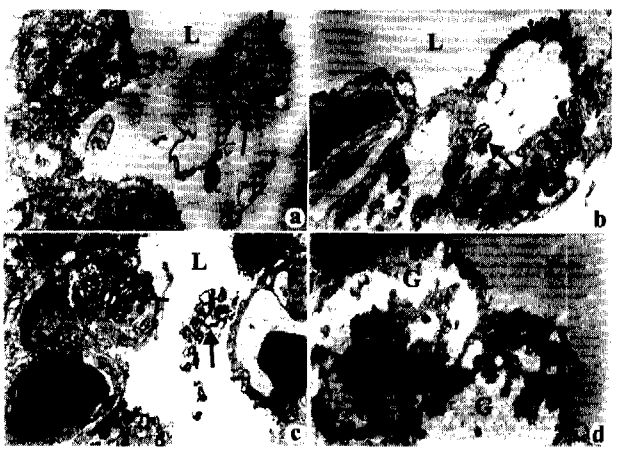


*:与 EGF、TRH、Dex 组比较,$P<0.05$

图 1 第 27 天各组胎肺 SP-B mRNA 表达水平

2.2 胎肺Ⅱ型细胞及肺泡腔内板层体的形成

TRH、EGF 和 Dex 处理组第 27 天的胎肺不仅表现含有板层体的Ⅱ型上皮细胞数量显著多于对照组,而且单个Ⅱ型上皮细胞内板层体的数目也多于对照组,并常见向肺泡腔排出的大量板层体,胞浆内糖原沉积池小(Dex 组)或不明显(EGF 组与 TRH 组);对照组胎肺Ⅱ型上皮细胞胞浆内板层体数目较少,板层体形状较小,细胞内糖原沉积池明显大于其它组(图 2)。但在妊娠第 25 天,胎肺Ⅱ型上皮细胞的发育程度明显不如第 27 天的胎肺成熟,除在 Dex 处理组观察到个别Ⅱ型上皮细胞含有少量不成熟(形状小)的板层体外,其余处理组和对照组内均未发现,相反,糖原沉积在各组胎肺的细胞浆内非常丰富,在对照组几乎充满全部胞浆。



a:EGF 组(×3 000);b. Dex 组(×4 000);c:TRH 组(×3 000);d:对照组(×4 000);→:板层体;L:肺泡腔;G:糖原池

图 2 第 27 天胎肺的超微结构 (TEM)

3 讨论

极不成熟早产儿胎肺由于 SPs 表达水平低或不表达而影响表面活性物质合成,可导致肺不张或 RDS 发生。遗传性 SP-B 缺失疾病已成为足月新生儿呼吸衰竭的原因之一,通常由 SP-B 的编码基因纯合性移码突

维普资讯 http://www.cqvip.com

变引起[3]，新生儿表现为肺组织完全缺乏SP-B mRNA及其蛋白质，出生后若不能进行肺移植会迅速呼吸衰竭而死亡。在电镜下，SP-B缺失的大鼠肺Ⅱ型上皮细胞因不能包装表面活性磷脂成为同心性板层结构，而导致完全缺乏板层体[4]。

板层体为表面活性物质在细胞内的贮存形式。板层体在肺内出现，是肺Ⅱ型上皮细胞分化成熟的特征性标志，而糖原池大小在一定时间内与胎肺成熟存在着负相关。本实验结果显示，各处理组第27天的胎肺Ⅱ型上皮细胞胞浆内板层体数量比对照组增多，而糖原池比对照组小，表明TRH、EGF和Dex在妊娠第24天至26天能促进胎肺Ⅱ型上皮细胞分化及SP-B表达。在妊娠第25天各处理组几乎未见到板层体出现，肺Ⅱ型上皮细胞分化明显比第27天的胎肺差。表明在兔妊娠第22天至24天用Dex、EGF、TRH处理，均不能达到使肺Ⅱ型上皮细胞分化成熟及表面活性物质合成的目的。虽然Dex作用程度可能好于EGF和TRH，但不能排除处理剂量差异造成的影响。本研究结果也提示药物对胎肺的促进作用受妊娠时间的限制，在胎肺发育的早期阶段，这些激素对肺Ⅱ型上皮细胞的功能分化无明显作用。这也许可以解释“在人妊娠24～29周用Dex处理并不能减少RDS发生”[5]的部分原因。

妊娠第24至26天各处理均可增加SP-B mRNA的含量，而在妊娠第22至24天，仅Dex处理组可见SP-B mRNA表达。同时SP-B mRNA的出现和蓄积增加与Ⅱ型细胞内板层体的出现和增加一致，表明SP-B的基因表达与板层体形成的关系非常紧密，SP-B mRNA水平升高可能是胎肺更成熟的表现。妊娠第25天的对照组、EGF及TRH处理组胎肺可能正是由于SP-B mRNA水平低，影响了SP-B的表达，从而不能帮助磷脂形成板层体结构。本文结果提示在本研究使用的剂量范围内，Dex也许能够在更早的时间促进胎肺SP-B表达。

在体外，Dex可因其浓度、培养时间及胎龄不同的影响而对胎肺SP-B mRNA水平表现出上调或下调。在体内，妊娠早期孕鼠用Dex处理可引起SP-B mRNA增加，但出生后新生鼠和成年鼠对Dex无反应[6]。本研究发现，母体内使用Dex可增加胎肺SP-BmRNA水平，与以往的研究结果一致。

有关TRH影响胎肺SP mRNAs的研究不多，有人发现单独TRH处理可增加未成熟胎肺SP-B mRNA水平，其作用程度比Dex小，当TRH与Dex联合使用时，可对抗Dex的诱导作用[7]。但本文的研究结果未发现TRH与Dex处理存在明显差异。

EGF通过结合肺上皮细胞的EGF-R促进SP-A蛋白合成，EGF-R抑制剂可显著降低胎肺SP-A的蛋白含量及SP-A mRNA水平[8]。本文结果表明母体应用EGF可提高胎肺SP-B mRNA的水平，其作用程度与TRH和Dex近似，进一步提示EGF母体途径给药具有促进胎肺成熟的作用。本研究中EGF未直接用于胎儿体内，其增加SP-B mRNA的作用是否系直接作用于胎肺的结果还有待进一步阐明。

[参考文献]

[1] Li J, Hu T, Liu W, et al. Effect of epidermal growth factor on pulmonary hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia[J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(1): 37-42.

[2] Ballard RA, Ballard PL, Creasy RK, et al. Respiratory disease in very-low-birthweight infants after prenatal thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid[J]. Lancet, 1992, 339(8792): 510-515.

[3] Somaschini M, Wert S, Mangili G, et al. Hereditary surfactant protein B deficiency resulting from a novel mutation[J]. Intensive Care Med, 2000, 26(1): 97-100.

[4] Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, et al. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice[J]. Lab Invest, 2000, 80(3): 395-403.

[5] Silver RK, Vyskocil C, Solomon SL, et al. Randomized trial of antenatal dexamethasone in surfactant-treated infants delivery before 30 weeks' gestation[J]. Obstet Gynecol, 1996, 87(5 Pt 1): 683-691.

[6] Phelps DS, Floros J. Dexamethasone in vivo raises surfactant protein B mRNA in alveolar and bronchiolar epithelium[J]. Am J Physiol, 1991, 260 (2 Pt 1): L146-L152.

[7] Losada A, Tovar JA, Xia HM, et al. Down-regulation of thyroid transcription factor 1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocortiods[J]. Endocrinology, 2000, 141(6): 2166-2173.

[8] Klein JM, McCarthy TA, Dagle JM, et al. Antisense inhibition of epidermal growth factor receptor decreases expression of human surfactant protein A[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(6): 676-684.

（编辑：余汇洋）