基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0685-04

高氧诱导肺损伤新生鼠肺表面活性蛋白基因表达的研究

宋纪国,刘友红,陈贻骥
(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨高氧对肺组织结构和表面活性蛋白(Surfactant protein,SP)A、B、C、D(SP-A、SP-B、SP-C、SP-D)基因表达的影响和机制。方法:应用高氧诱导新生大鼠肺损伤观察肺组织结构和 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 基因表达的变化。将生后 6 h 内的 SD 新生大鼠随机分为空气组和高氧组,于 1、4、7 d 和 14 d 4 个时间点,分别取肺组织,计算肺系数(肺重/体重 × 100%),通过 HE 染色观察组织病理学变化,采用逆转录 - 聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 SP mRNAs 的表达。结果:高氧组 14 d 新生大鼠体重低于空气组,差异有显著统计学意义($P<0.01$),而 7 d 和 14 d 新生大鼠的肺系数明显高于空气组相应时间点,差异有显著统计学意义($P<0.05$);高氧组 1、4 d 和 7 d 新生大鼠 SP-A、SP-D mRNAs 的表达均高于空气组相应时间点,且差异有显著统计学意义($P<0.05$),14 d 新生大鼠的表达水平较空气组减低,差异有显著统计学意义($P<0.05$);高氧组 1、4 d 新生大鼠 SP-B、SP-C mRNAs 的表达均高于空气组,且差异有显著统计学意义($P<0.05$),7 d 差异无显著统计学意义($P>0.05$),而 14 d 新生大鼠的表达水平较空气组减弱,差异有显著统计学意义($P<0.05$)。结论:长期高氧抑制肺泡发育,并抑制肺 SP 基因的表达,这可能是肺损伤的重要因素。

【关键词】高浓度氧;表面活性蛋白;肺损伤;新生鼠
【中国图书分类法分类号】R722.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-29

The expression of surfactant protein genes hyperoxia-induced neonatal rat lung injury

SONG Ji-guo et al
(*Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of hyperoxia on the changes of pulmonary histology and surfactant protein gene expression. *Methods*: SD newborns which less than 6 h old were randomly divided into 2 groups: normal air control group and hyperoxia group. The lungs of rats were removed at the time points 1, 4, 7, 14 d, histopathological changes of the lung tissues were examined by HE staining and the lung factor were calculated (lung weight/body weight × 100%); the expression of all surfactant protein genes were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Results*: To compare with corresponding air control group, in hyperoxia group, the body weight is significantly deceased after 14 days of hyperoxia exposure ($P<0.01$), and the lung factor increased significantly from day 7 ($P<0.05$), and kept increasing at 14 d ($P<0.05$); the levels of SP-A and SP-D mRNAs increased significantly from day 1 ($P<0.05$), remained higher at 4 d and 7 d ($P<0.05$), and began to significantly decreased at 14 d ($P<0.05$); the levels of SP-B and SP-C mRNAs increased from day 1 ($P<0.05$), remained higher at 4 d ($P<0.05$), but there were no significant differences at 7 d ($P>0.05$), and began to significantly decreased at 14 d ($P<0.05$). *Conclusion*: Prolonged hyperoxia can inhibit the development of alveolar and the expression of surfactant protein genes indicating that alterations in gene expression, contribute to tissue injury.

【Key words】Hyperoxia; Surfactant protein; Lung injury; Newborn rats

在新生儿期,持续吸入高浓度氧气是一项重要的干预治疗,但也会引起肺的急慢性损伤,甚至导致支气管肺发育不良(Bronchopulmonry dysplasia,BPD)的发生。BPD 是新生儿氧疗最常见的并发症之一,但其发病机制尚未完全清楚。而肺表面活性物质(Pulmonary surfactant,PS)在肺的发育,改善 BPD 患儿的病理生理及减轻高氧肺损伤中的作用越来越受到重视[1]。因此本实验通过新生大鼠吸入高浓度氧气致 BPD 模型,动态观察新生大鼠肺系数,肺组织形态及表面活性蛋白(Surfactant protein,SP)mRNAs 表达水平的变化,探讨高氧对肺组织结构和 SP 基因表达的影响及其机制。

作者介绍:宋纪国(1983-),男,硕士,
研究方向:新生儿肺发育。
通讯作者:陈贻骥,男,教授,E-mail:chenyiji55@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(渝卫科教[2005]31-05-2-81)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

自然分娩的新生 SD 大鼠，性别不限。

1.2 建立高氧环境

自制 25 cm × 20 cm × 15 cm 的容器，设有进气孔和出气孔，进气孔持续通入纯氧，测氧仪（浙江承德仪器厂生产）连续监测箱内氧浓度，使氧浓度维持在 95%左右。箱内置有饲料、水、钠石灰以及垫料。环境温度 22℃～26℃，相对湿度 60%～70%。

1.3 实验动物分组及处理

取孕期满 21 d，出生体重相近的健康新生 SD 大鼠，生后 6 h 内随机分为空气组和高氧组，每组 32 只。高氧组置于上述高氧环境中，空气组饲养于相同体积的容器内，除吸入空气外，其余条件与高氧组相同。每天开箱 1 次，更换垫料、水及饲料，并与空气组更换母鼠，以避免母鼠因氧中毒致护理能力下降，开箱时间不超过 1 h。

1.4 标本采集

将 2 组大鼠分别于实验后 1、4、7、14 d 随机取 8 只，称量体重，10%水合氯醛麻醉，打开胸腔迅速取出肺组织称重，并计算肺系数（肺重/体重 × 100%），分出左肺和右肺，左肺 4%多聚甲醛固定，右肺投入液氮速冻，后移至 -80℃冰箱保存，用于基因检测。

1.5 肺组织病理变化

取出固定好的左肺组织，常规制备石蜡切片，HE 染色。光镜下观察肺的病理变化。

1.6 RT-PCR 检测肺组织 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNAs 表达

用 RNA 提取试剂提取 RNA，并合成 cDNA，随后进行 PCR 检测。引物和内参照均由百瑞公司合成，引物序列见表 1。结果用 Quantity One（user Guide for Version4.4）凝胶定量分析软件分析。RT-PCR 反应体系均为 25 μl，PCR 反应条件为：预变性 94℃3 min，94℃变性 30 s，59℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 30 个循环，72℃延伸 5 min。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件进行分析，计量资料用均数 ± 标准差表示，组间用独立样本 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 方法扩增各基因以及内参照的引物序列

基因名称	引物序列	产物(bp)
SP-A	F:5'-GGAAGCCCTGGGATCCCTGGA-3' R:5'-TGGGTACCAGTTGGTGTAGT-3'	558
SP-B	F:5'-CTGTGCCAAGAGTGTGAGGA-3' R:5'-CAAGCAGCTTCAAGGGTAGG-3'	124
SP-C	F:5'-CACCGGATTACTCGACAGGT-3' R:5'-GCACTAGGTTCCTGGAGCTG-3'	329
SP-D	F:5'-CCAGACAGTGCTGCTCTGAGGC-3' R:5'-ATAACCAGGCGCTGCTCTCCACAAGCC-3'	456
GAPDH	F:5'-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG-3' R:5'-ATTGACAGAGCAATGCCAGC-3'	546

2 结 果

2.1 体重及肺系数

高氧实验组与空气组相比，1 d 新生大鼠体重没有明显差异（$P>0.05$），但在长期高氧暴露下发育迟缓，14 d 新生大鼠体重明显低于空气组（$P<0.01$），而 7 d 和 14 d 新生大鼠的肺系数则高于空气组（$P<0.05$），表明肺部有炎症和水肿，见表 2、表 3。

2.2 肺组织的病理观察

大体观察：空气组两肺色泽红润，富有弹性，质软；而高氧 14 d 新生大鼠的两肺苍白，部分有肺叶出血，肺组织较坚实。光镜下观察：高氧 1、4 d 的新生大鼠，肺组织病理学的改变与空气组相应时间点相似，7 d 时，开始出现肺间隔的变薄，肺泡腔的增大，数目的减少，14 d 时更为明显，肺组织结构紊乱，肺泡大小不一，肺泡腔内有出血，部分还可见中性粒细胞和淋巴细胞浸润。图 1、图 2。

2.3 肺组织 SP mRNAs 表达水平

高氧组 1、4、7 d 新生大鼠 SP-A、SP-D mRNAs 表达较空气组相应时间点上调，$P<0.05$，14 d 新生大鼠表达较空气组下调，$P<0.05$；高氧组 1 d 和 4 d 新生大鼠 SP-B、SP-C mRNAs 表达较空气组上调，$P<0.05$，7 d 时差异无显著统计学意义（$P>0.05$），14 d 时的表达水平较空气组下调，$P<0.05$。见表 4、图 3~6。

3 讨 论

尽管呼吸支持手段有了很大提高，但 BPD 仍然有很高的发病率和病死率，是新生儿重症监护室十分棘手的问题。其发病机制尚未完全阐明。研究发现与肺发育不成熟、肺的容积损伤和炎症等关系密切，在新生大小鼠，单独的高氧就可以引起肺发育阻滞，与 BPD 的病理变化相似，因而高氧导

表 2 2 组新生大鼠体重的比较(g,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	1 d	4 d	7 d	14 d
空气组	8	6.64 ± 0.48	10.43 ± 0.88	15.05 ± 1.58	30.55 ± 1.04
高氧组	8	6.68 ± 0.83	10.67 ± 1.21	14.93 ± 2.17	27.27 ± 1.17*

注:* 高氧组与空气组比较,$P<0.01$

表 3 2 组新生大鼠的肺系数比较(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	1 d	4 d	7 d	14 d
空气组	8	1.90 ± 0.30	1.72 ± 0.12	1.63 ± 0.18	1.49 ± 0.10
高氧组	8	1.84 ± 0.16	1.80 ± 0.10	1.92 ± 0.22*	1.70 ± 0.14*

注:* 高氧组与空气组比较,$P<0.05$

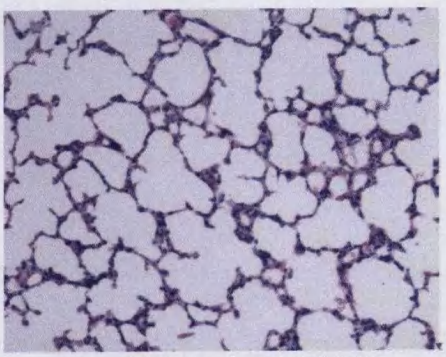


图 1 空气组 14 d(× 100)肺组织整体结构完好,肺泡腔内无渗出

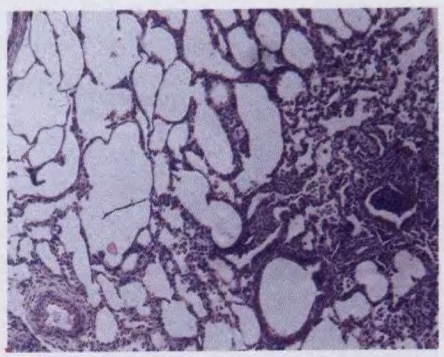
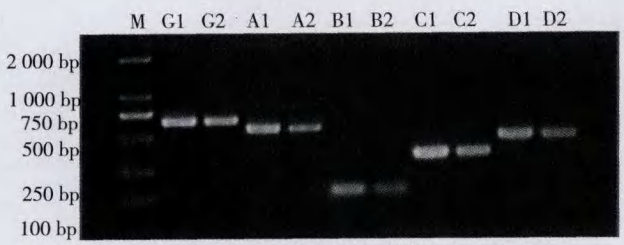
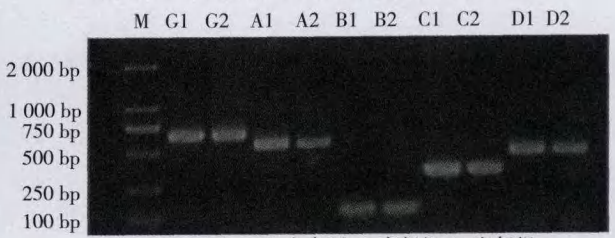


图 2 高氧组 14 d(× 100)肺组织结构紊乱,肺泡大小不一,肺组织和血管内可见较多的炎性细胞



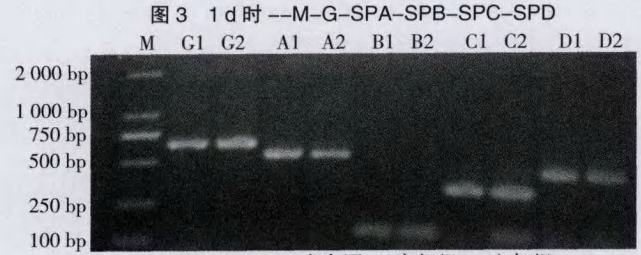
M. Marker;G. 内参照;1. 高氧组;2. 空气组

图 3 1 d 时 --M-G-SPA-SPB-SPC-SPD



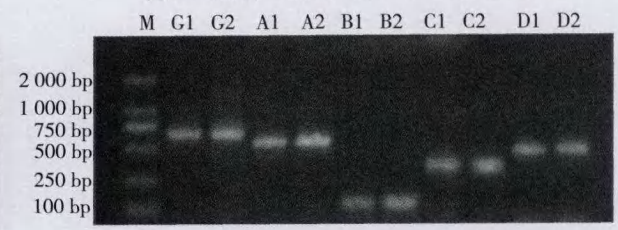
M. Marker;G. 内参照;1. 高氧组;2. 空气组

图 4 4 d 时 --M-G-SPA-SPB-SPC-SPD



M. Marker;G. 内参照;1. 高氧组;2. 空气组

图 5 7 d 时 --M-G-SPA-SPB-SPC-SPD



M. Marker;G. 内参照;1. 高氧组;2. 空气组

图 6 14 d 时 --M-G-SPA-SPB-SPC-SPD

表 4 各组 SP mRNAs 表达的相对量的比较($\bar{x}\pm s$)

		n	1 d	4 d	7 d	14 d
SP-A	空气组	8	0.99 ± 0.13	0.91 ± 0.10	0.96 ± 0.13	0.98 ± 0.12
	高氧组	8	1.17 ± 0.12*	1.08 ± 0.15*	1.14 ± 0.13*	0.84 ± 0.10*
SP-B	空气组	8	0.59 ± 0.09	0.51 ± 0.07	0.58 ± 0.16	0.52 ± 0.08
	高氧组	8	0.72 ± 0.12*	0.62 ± 0.09*	0.62 ± 0.10	0.41 ± 0.05*
SP-C	空气组	8	0.94 ± 0.10	0.93 ± 0.13	0.93 ± 0.14	0.89 ± 0.07
	高氧组	8	1.07 ± 0.12*	1.11 ± 0.11*	0.94 ± 0.17	0.78 ± 0.06*
SP-D	空气组	8	0.69 ± 0.13	0.63 ± 0.10	0.63 ± 0.11	0.66 ± 0.07
	高氧组	8	0.83 ± 0.05*	0.79 ± 0.16*	0.77 ± 0.14*	0.57 ± 0.06*

注:* 高氧组与空气组比较,$P<0.05$

致肺发育阻滞的观点越来越受到重视[2-4]。

本实验病理结果发现:在持续高氧下,出现肺泡数量减少,大小不一,肺组织结构紊乱,肺泡腔有出血,部分还可见中性粒细胞和淋巴细胞的浸润,这些变化表明高氧抑制肺泡的发育,符合 BPD 的病理学特点。同时我们还发现长期高氧致新生大鼠体重增长迟缓,而 7 d 和 14 d 新生大鼠的肺系数增加,可能与高氧肺损伤致肺部的炎症反应和肺水肿有关。

PS 是一种磷脂蛋白复合物,包括卵磷脂、磷脂酰甘油、鞘磷脂及 4 种 SP。4 种 SP 分为两组:亲水性 SP-A 和 SP-D,疏水性 SP-B 和 SP-C。SP 由肺泡Ⅱ型细胞合成和分泌,其主要作用包括维持表面张力,保持肺泡结构的稳定,在肺损伤时参与局部免疫调节作用及防御功能,并且参与抗氧化反应。由于 PS 仅含有磷脂不能明显降低表面张力,只有与 SP 同时存在时,PS 才能产生有效降低表面张力的效果。肺是高氧损伤的主要靶器官,国外研究发现在高氧诱导肺纤维化的新生兔的模型中,95%的高氧暴露 4 d 时 SP-A mRNA 的表达增加,但 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达没有改变[5]。而 White CW 将新生大鼠暴露于 100%的氧气中 8 d,SP-A,SP-B,SP-C,SP-D mRNAs 水平上调[6]。我们将新生 SD 大鼠暴露于 95%的氧气中,并将高氧作用的时间延长为 14 d,观察结果发现高氧 1、4 d 和 7 d 新生大鼠 SP-A、SP-D mRNAs 的表达水平较空气组上调,1 d 和 4 d 新生大鼠 SP-B、SP-C mRNAs 表达水平较空气组上调,7 d 时 SP-B、SP-C mRNAs 的表达无明显差异,而高氧持续作用 14 d 时,SP mRNAs 表达水平均下调。

高氧暴露下 1、4 d 和 7 d 的新生大鼠 SP-A,SP-D mRNAs 表达水平明显上调,这种基因上调的机制尚不清楚,但这种上调可能是重要的,其一,SP-A 和 SP-D 在炎症启动和播散中起重要作用,并且和单核巨噬细胞、中性粒细胞相互作用[7],最新研究表明 SP-D 还可以通过调节促炎症反应因子以保护高氧肺损伤[8],因此其基因上调可能有利于减轻高氧肺损伤;其二,在高氧肺损伤下增加了感染的易感性,而 SP-A 和 SP-D 有预防感染的作用[9];其三,目前有研究表明,SP-A 和 SP-D 在氧化损伤时保护 PS 中的磷脂,还可能通过多种途径,影响抗氧化剂的表达[10]。由于 SP-A 和 SP-D 在高氧肺损伤过程中的重要作用,因此其基因表达水平的上调可能是对高氧的一种适应性反应,增加机体的抗炎和抗氧化功能,有利于机体的防御及修复。

在高氧肺损伤下 SP-B、SP-C 参与维持肺功能,并且在调节炎症反应方面也有重要的作用[11]。在高氧暴露下 1 d 和 4 d,新生大鼠 SP-B 和 SP-C 的基因表达水平上调,这种上调在高氧肺损伤时可能会增加肺泡结构的稳定性,维持肺的容积,调节炎症反应,从而减轻高氧诱导的肺损伤。总之在高浓度氧作用下引起 PS 活性降低[12],为了维持正常的 PS 功能,反馈性地引起 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNAs 表达的增加。但在持续高氧作用下,7 d 新生大鼠 SP-B 和 SP-C mRNAs 的表达与空气组相比已无明显差异,14 d 新生大鼠 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNAs 的表达均下调,表明随着高氧暴露时间的延长,高氧对 SP mRNAs 表达水平上调的作用逐渐下降,原因可能是长期高氧暴露下,Ⅱ型肺泡细胞变性,使其产生或分泌 SP 的功能降低。而 SP 基因表达水平的下调又可能会降低肺的功能和气体交换,促进 BPD 的发生。

在新生儿,尤其是早产儿,因为肺不成熟和 PS 缺乏,更容易引起高氧肺损伤,而高氧肺损伤的生物化学和分子基础尚未完全清楚,因此研究高氧下 SP 基因表达水平的动态变化,可以从一个侧面反应高氧肺损伤、BPD 的发生机制,通过本实验的研究发现短期的高氧可以引起 SP 基因表达的上调,但随着高氧暴露时间的延长,SP 的基因表达随之下调,但对于高氧调节 SP 基因表达的确切的分子机制尚未清楚,是直接作用于 SP 基因还是通过调节其他因子继而作用于 SP 基因还需进一步研究。而对其进行干预试验是我们下一步研究的重点。

参 考 文 献

[1] Engstrom P C, Holm B A, Matalon S. Surfactant replacement attenuates the increase in alveolar permeability in hyperoxia [J]. J Appl Physio, 1989, 67(2): 688-693.

[2] Jobe A J. The new BPD: an arrest of lung development[J]. Pediatr Res, 1999, 46(6): 641-643.

[3] Jobe A H, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.

[4] Coalson J J. Experimental models of bronchopulmonary dysplasia[J]. Biol Neonate, 1997, 71(Suppl 1): 35-38.

[5] D'Angio C T, Finkelstein J N, Lomonaco M B, et al. Changes in surfactant protein gene expression in a neonatal model of hyperoxia-induced fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1997, 16(4 Pt 1): L720-L730.

[6] White C W, Greene K E, Allen C B, et al. Elevated expression of surfactant proteins in newborn rats during adaptation to hyperoxia[J]. Am J Respir Cell Mol Bio, 2001, 25(1): 51-59.

[7] Mason R J, Greene K, Voelker D R. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease[J]. Am. J. Physiol, 1998, 275(1 Pt 1): L1-L13.

[8] Jain D, Atochina-Vasserman EN, Tomer Y, et al. Surfactant protein D protects against acute hyperoxic lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(8): 805-813.

[9] Sherman M P, Condiotti R. Hyperoxia damages phagocytic defenses of neonatal rabbit lung [J]. J. Appl. Physio, 1987, 62(2): 684-690.

[10] Bridges J P, Davis H W, Damodarasamy M, et al. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury[J]. J. Biol. Chem, 2000, 275(49): 38848-38855.

[11] Ikegami M, Weaver T E, Conkright J J, et al. Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen lung injury [J]. J Appl Physiol, 2002, 92(2): 519-526.

[12] Zenri H, Rodriquez-Capote K, McCaig L, et al. Hyperoxia expoure impairs surfactant function and metabolism[J]. Crit Care Med, 2004, 32(5): 1155-1160.

(责任编辑:关蕴良)