

高氧暴露对新生大鼠肺 SP-C 表达的影响

邱其周¹, 肖毅¹, 杨永玲¹, 陈春芳²

摘要:目的 探讨高氧暴露对新生大鼠肺组织表面活性蛋白 C(SP-C)表达的影响。方法 将新生的 72 只 SD 大鼠随机分为空气组、高氧组, 每组 36 只。每组又分为 3、7、14d 三个亚组。于空气或高氧暴露后 3、7、14d 取肺组织, 采用免疫组化方法观察肺组织中 SP-C 表达的变化。结果 高氧组 3d SP-C 表达强度较空气组增强($P<0.05$), 高氧组 7d SP-C 表达强度与空气组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 高氧组 14d SP-C 表达强度较空气组减弱, 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 高氧暴露可导致新生大鼠肺 SP-C 表达减弱或功能缺失, SP-C 表达异常可能是高氧肺损伤的重要因素。

关键词: 表面活性蛋白 C 肺损伤 肺泡 型上皮细胞

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)2-185-03

Effect of hyperoxia on the expression of surfactant protein C in newborn rats. QIU Qi-zhou, XIAO Yi, YANG Yong-ling et al. (① Department of Pediatrics, Shaolin, The Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Shenzhen, 518104; ② Department of Pediatrics, The Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, 510282, Guangdong P. R. China)

Abstract: Objectives To explore the effect of hyperoxia on expression of surfactant protein C (SP-C) in newborn rats. Methods The 72 newborn SD rats were randomly divided into air group and hyperoxia group. Each group has 36 rats. The rats in every group were randomly into the 3rd, 7th, 14th day subgroups respectively. The sub-groups of 3rd, 7th and 14th were cut lung tissue in the corresponding of time, expression of SP-C protein was detected by immunohistochemistry. Results The expression of SP-C in hyperoxia group was stronger than air group in 3rd day ($P<0.05$), The expression of SP-C showed no significant difference between hyperoxia group and air group in 7th day ($P>0.05$). Significant difference was noticed between hyperoxia group and air group in 14th day ($P<0.01$). Conclusion Hyperoxia exposure lead to a down regulation or functional impairment of the SP-C expression, this may be an important factor for hyperoxia lung injury.

Key words: Surfactant protein C Lung injury Alveolar epithelial type cells

支气管肺发育不良 (Bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是慢性肺部疾病 (Chronic lung disease, CLD) 最常见的形式, 其发病机理与高氧损伤密切相关。既往研究也证明, 高氧性肺损伤与肺表面活性蛋白 (Surfactant protein, SP) 表达异常密切相关。SP 由肺泡 型上皮细胞 (Alveolar epithelial type cells, AEC) 合成和分泌, 在肺表面活性物质 (Pulmonary surfactant, PS) 发挥正常生理功能中起着极其重要的作用, SP 缺失或分泌不足是引起新生儿呼吸窘迫综合征和肺损伤的重要因素^[1]。SP-C 是 AEC 的特异标志蛋白^[2]。既往有动物实验证明 SP-C 在早产大鼠高氧肺损伤中扮演了重要的角色, 但足月新生大鼠高氧肺损伤后肺 SP-C 表达如何, 研究甚少, 本实验研究空气及高氧暴露下新生大鼠肺组织 SP-C 表达的变化, 探讨 SP-C 与新生大鼠高氧肺损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 购进足月新生清洁级健康 SD

大鼠 72 只 (购自南方医科大学动物实验中心), 随机分为空气组和高氧组。空气组 36 只, 平均体重 (5.79 ± 0.57)g, 高氧组 36 只, 平均体重 (5.67 ± 0.58)g。雌雄不限, 各组又随机分为 3d, 7d, 14d 三个亚组, 每组 12 只, 两组体重经统计学处理差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.2 动物模型制备 高氧组大鼠于新生当天置入自制氧箱中, 持续暴露于氧体积分数 $>950\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 中至实验结束, 内置氧浓度仪 (德国 ENVIPEC OXIQUNANT M 数字测氧仪) 测箱内氧体积分数, 保证氧体积分数 $>950\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。空气组大鼠呼吸空气。箱内及室内温度控制为 $22^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $65\% \sim 75\%$, 氢氧化钡吸收箱内 CO_2 。动物可自由进食及饮水。二组每天开箱 1h, 更换垫料, 并与空气组轮换母鼠以避免母鼠因氧中毒致哺乳能力下降。空气组置于同一室内常压空气中, 饲养条件同高氧组。每日记录新生大鼠的存活情况, 实验过程中如有新生鼠死亡, 即从相应对照组减

基金项目 深圳市宝安区科学技术局资助项目 (No.20110515)

作者单位 ①广州医学院附属深圳沙井医院儿科, 广东 深圳 518104; ②南方医科大学珠江医院儿科中心, 广东 广州 510282

作者简介 邱其周 (1980~), 男, 医学硕士, 主治医师, 主要从事新生儿疾病临床工作。E-mail: qqzmo3@126.com

去相同数目的幼鼠 ,以保证各组实验动物数相等。

1.3 肺组织标本留取 每组分别于实验开始后的 3、7、14d 随机选取 8 只大鼠 ,腹腔注射 $100\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水合氯醛($8\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)处死 ,固定在蜡盘上 ,迅速剪开胸腔无菌下取出肺组织、用 $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐水冲洗后滤纸吸去表面的液体 ,右肺下叶浸于 $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛中固定 ,石蜡包埋 ,常规 $5\mu\text{m}$ 切片。石蜡切片用于免疫组织化学染色。

1.4 SP- C 免疫组织化学染色 按 SP 法免疫组化标准程序操作 ,羊抗鼠 SP- C 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司 ,工作浓度为 1 :150 ,利用 Image- pro plus6.0 图象分析仪进行分析 ,检测 SP- C 表达的积分光密度 (OD)值进行分析。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理 ,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用析因设计的方差分析 ,若有交互效应 ,则进行单独效应分析。单独效应分析时 ,若方差齐性时 ,用 LSD 法进行多重比较。若方差不齐 ,用 Games- Howel 法进行多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生大鼠存活情况及一般状态观察 空气组在生后各时间点反应良好 ,体重增长迅速 ,未出现死亡病例。高氧组在 3d 前反应尚好 ,7d、14d 时反应变迟钝 ,活动明显减少 ,体重增长缓慢 ,离开氧环境后出现呼吸困难表现 ,在第 7d、14d 分别死亡 3 只、4 只。

2.2 新生大鼠肺组织 SP- C 表达强度 免疫组织化学染色结果 ,新生大鼠肺内 SP- C 表达丰富 ,主要分布于 AEC ,呈棕黄色颗粒 ,细支气管上皮细胞内也有微量表达。见图 1~3。

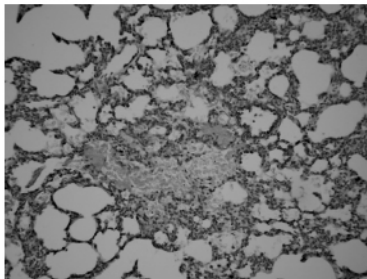


图 1 空气组 7d SP- C 的阳性表达(免疫组织化学染色× 100)
Fig 1 The expression of SP- C in Air group in 7th day(× 100)

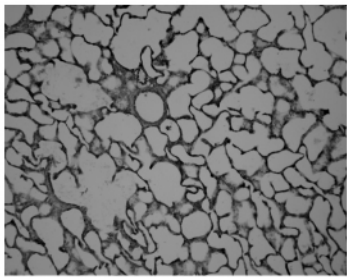


图 2 空气组 14d SP- C 的阳性表达(免疫组织化学染色× 100)
Fig 2 The expression of SP- C in Air group in 14th day(× 100)

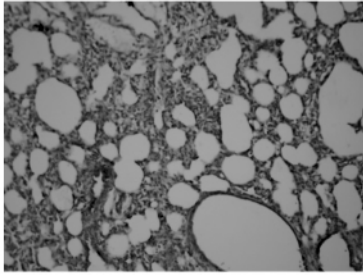


图 3 高氧组 14d SP- C 的阳性表达(免疫组织化学染色× 100)
Fig 3 The expression of SP- C in the hyperoxia group in 14th day (× 100)

2.3 两组新生大鼠肺组织的 SP- C 蛋白表达的比较 :主效应分析 :空气组与高氧组间差异有统计学意义 ($F=9.144$ $P=0.004$)。不同时间点差异具有统计学意义 ($F=8.204$ $P=0.001$) ,时间与组别之间有交互效应 ($F=25.702$ $P=0.000$)。LSD 单独效应分析 ,在固定时间 3d 条件下 ,空气组和高氧组间比较差异有统计学意义 , $P<0.05$,高氧组 SP- C 蛋白表达比空气组强 ,固定在时间 7d 条件下 ,空气组和高氧组间比较差异无统计学意义 $P>0.05$,固定时间 14d 条件下 ,空气组与高氧组比较 ,差异有统计学意义 $P<0.01$,在固定高氧组条件下 ,14d 与 3d 比较 ,差异有统计学意义 $P<0.05$ 。(见表 1)。

3 讨论

PS 是促进肺泡发育成熟的主要成分 ,SP- C 是由 AEC 合成的完整膜前体蛋白 ,SP- C 经棕榈酸酯的翻译后修饰和蛋白水解加工为成熟的 SP- C ,贮存在板层体并分泌进入肺泡表面 ,促进磷脂在肺泡表面形成稳定的单分子层 ,从而降低肺泡表面张力、防止呼气末肺泡塌陷、增加肺顺应性、促进肺间质液体回流 ,在正常肺发育中及肺损伤时维持正常的呼吸功能起到

表 1 肺组织免疫组化 SP- C 表达(IOD)($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Tab 1 The expression of SP- C in different groups($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

分组 Groups	时间 Time			合计 Total	F 值 F value	P 值 P value
	3d	7d	14d			
空气组 Air	0.28 ± 0.10	0.48 ± 0.11	0.84 ± 0.26	0.53 ± 0.29	21.274	0.000
高氧组 Hyperoxia	0.43 ± 0.14	0.50 ± 0.08	0.29 ± 0.12	0.40 ± 0.14	6.970	0.005
合计 Total	0.35 ± 0.14	0.49 ± 0.10	0.56 ± 0.35	0.47 ± 0.24	8.204*	0.001*
F 值 F value	2.466	0.416	5.433	9.144*	25.702 [#]	0.000 [#]
P 值 P value	0.027	0.684	0.000	0.004*		

注 * :主效应 ;# 交互效应 ;Note* :Principal effect ;#Reciprocal effect

重要作用。SP-C 是由肺泡 II 型上皮细胞单独分泌,因此检测 SP-C 可评估 AEC 产生表面活性物质的能力^[2]。本研究显示空气组及高氧组均出现 SP-C 的动态表达,与文献报道类似^[3],提示 SP-C 与新生大鼠正常肺发育及高氧肺损伤密切相关。肺细胞的生长发育在肺成熟过程中起重要作用,其中 AEC II 作为肺泡干细胞参与肺生长发育、损伤和修复的过程^[4]。AEC II 是氧化损伤的主要靶细胞之一,高氧肺损伤影响了肺泡发育的关键过程——AEC II 的增殖和分化,使受损上皮不能得到充分的修复^[5],阻碍其向成熟生长、分化,诱导凋亡或坏死,肺囊泡分裂和肺泡化不能完成^[6]。因此,高氧对新生肺 AEC II 的破坏,必然导致 SP-C 表达的异常。Zenri H 报道^[7],高氧吸入可导致 PS 不足或功能缺失,与早产儿高氧肺损伤的发生有密切关系。本研究显示,空气组 14d 内 SP-C 表达呈逐渐增强趋势,考虑与新生大鼠肺泡发育的完善过程有关,提示肺泡的发育与 SP-C 密切相关。高氧暴露 3d 时,SP-C 表达较空气组增强,其可能原因是高氧暴露早期 AEC II 损伤较轻及炎症介质等作用,刺激 AEC II “保护性”分泌,导致 SP-C 表达增加,以减轻高氧对肺组织的损伤,但早期其功能是否存在缺失,尚有待进一步研究。高氧暴露 7d 时 AEC II 结构破坏加重,SP-C 表达较前减弱,高氧暴露 14d 时 SP-C 表达明显减弱,考虑新生大鼠在长时间高氧暴露下,AEC II 的凋亡、变性、坏死,使其产生和分泌 SP 的功能衰竭,抑或肺损伤后大量的炎性细胞破坏或降解 SP,并使其功能缺失,从而进一步加重肺损伤^[8]。推测高氧导致 SP-C 表达下调或功能缺失是高氧肺损伤发生发展的重要因素,但其调控机理尚有待进一步研究。

新生大鼠肺泡的发育与 SP-C 密切相关。新生大鼠长时间暴露于高氧环境,导致 AEC II 的变性、破坏,

以及肺损伤时炎症介质的作用,使其产生和分泌 SP-C 的功能逐渐降低或丧失,导致或加重高氧性肺损伤。

参考文献:

- [1] HALLMAN M, GLUMOFF V, RAMET M. Surfactant in respiratory distress syndrome and lung injury [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, 129(1): 287–294.
- [2] Mason RJ, Kalina M, Nielsen LD, et al. Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors [J]. *Am J Pathol* 2000, 156(1): 175–182.
- [3] Lu HY, Chang LW, Li WB, et al. Effect of hyperoxia on the expression of surfactant protein C in premature rats [J]. *The Journal of Clinical Pediatrics* 2007, 25(5): 386–388. (In Chinese)
(卢红艳, 常立文, 李文斌, 等. 高氧对早产大鼠肺表面活性蛋白 C 表达的影响 [J]. *临床儿科杂志* 2007, 25(5): 386–388.)
- [4] Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. *Chest* 2002, 122(6 Suppl): 293S–298S.
- [5] Li DM. Apoptosis, proliferation and differentiation of alveolar epithelial cells and protective effects of KGF on premature rats with hyperoxia-induced CLD [D]. Beijing: China Medical University, 2005. (In Chinese)
(李东梅. 高氧致 CLD 早产鼠肺泡上皮细胞凋亡、增殖和分化的动态变化及 KGF 对其调节作用研究 [D]. 北京: 中国医科大学, 2005.)
- [6] Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 25(2): 150.
- [7] Zenri H, Rodriguez-Capote K, McCaig L. Hyperoxia exposure impairs surfactant function and metabolism [J]. *Crit Care Med* 2004, 32(5): 1155–1160.
- [8] Cai XX, Dan Y, Han XH, et al. Changes of Surfactant Proteins A and B After Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Rats [N]. *Journal of China Medical University* 2003, 32(2): 110–114. (In Chinese)
(蔡栩栩, 单莹, 韩晓华, 等. 肺表面活性蛋白 AB 在内毒素急性肺损伤时变化的研究 [N]. *中国医科大学学报* 2003, 32(2): 110–114.)

收稿日期: 2011-10-17 编辑: 谢永慧