

【基础研究】

通信作者:薛辛东(1956-),男,辽宁大连人,硕士,教授,研究方向:新生儿急救;E-mail: xindongxue1@163.com

nificantly lower than that in air control group($P<0.05$). The SPB mRNA level of lung tissues of newborn rats at 7,14 d after experiment in group 1 was significantly higher than that in air control group($P<0.05$). The SPB mRNA level of lung tissues of newborn rats at 14 d after experiment in group 1 was significantly higher than that in group 3($P<0.05$). There was no significant difference in SPC mRNA of lung tissues of newborn rats at 1,5 d after experiment in each group($P>0.05$). The SPC mRNA level of lung tissues of newborn rats at 3 d after experiment in group 1 and group 3 was significantly lower than that in air control group($P<0.05$). The SPC mRNA level of lung tissues of newborn rats at 7,14 d after experiment in group 1 and at 14 d in group 2 was significantly lower than that in air control group($P<0.05$). The SPC mRNA level of lung tissues of newborn rats at 7 d after experiment in group 1 was significantly lower than that in group 2 and at 14 d was significantly lower than that in group 3($P<0.05$). **Conclusion** The expression of SPA,SPB and SPC mRNA decreases at the early stage of hyperoxia induced lung injury,which may be one of the main reasons leading to pulmonary edema.

Key words: hyperoxia;epithelial cells;lung injury;pulmonary edema;surfactant associated protein

在高氧作用下,肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells,AEC)损伤势必导致由肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar epithelial cells type Ⅱ,AECⅡ)合成并分泌的肺表面活性物质相关蛋白(surfactant associated protein,SP)减少;SP具有降低肺泡表面张力、保持呼气末肺泡的扩张状态,防止肺泡发生萎陷,促进肺内液体的吸收,减少肺水肿等重要作用。为了探讨高氧肺损伤早期是否存在肺泡上皮SP(即SPA、SPB、SPC)分泌的异常,其动态表达规律如何,在支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia,BPD)早期对肺水肿的影响作用如何,本研究通过建立新生大鼠BPD模型,观察高氧肺损伤时SPA mRNA、SPB mRNA、SPC mRNA表达的变化规律,为临床防治新生儿BPD开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 Wistar大鼠雌雄交配(4:1),将孕21~23 d自然分娩的新生大鼠160只于生后12 h内(0 d)依据吸氧浓度(fraction of inspired oxygen,FiO₂)随机分为研究组1(FiO₂ 80%)、研究组2(FiO₂ 60%)、研究组3(FiO₂ 40%)和空气对照组(FiO₂ 21%),每组40只。

1.2 动物模型制作 研究组1~3(高氧组)分别置于含体积分数80%、60%、40%的氧箱中,持续吸入氧气,每日用OM-25ME数字式测氧仪(美国OMEGA公司)监测,用钠石灰吸收CO₂使其体积分数<0.5%,温度25℃左右,湿度60%~70%,每日开箱0.5 h,添加水、饲料及更换垫料,每日将研究组母鼠与空气对照组母鼠互换以避免代母鼠因氧中毒而致护理能力降低;空气对照组置于空气中(氧浓度为21%),饲养条件与高氧组相同^[1]。

1.3 标本采集 每组新生大鼠分别于实验后1、3、5、7、14 d随机选取8只,100 g·L⁻¹水合氯醛麻醉,无菌取肺组织,以无菌生理盐水洗净残血、吸干水分,左肺置于无Rnase的Eppendorf管中于-80℃保存,用

于SPA、SPB、SPC反转录聚合酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction,RT-PCR)检测。

1.4 RT-PCR方法检测肺组织SPA、SPB、SPC mRNA表达水平

1.4.1 总RNA提取 取肺组织0.1 g,Trizol法提取细胞总RNA,反转录合成cDNA,依据试剂盒说明书行SPA、SPB、SPC基因的PCR扩增。引物序列如下:SPA上游:5'-TGGGCAGTCAGTCAACTT-3',下游:5'-TGAATCATCAGGATAGAGG-3',PCR条件:94℃、40 s,51.3℃、40 s,72℃、1 min,72℃、10 min,30个循环后72℃延伸10 min;SPB上游:5'-GAGGATATTGTCCACCTCCT-3',下游:5'-ATAGCCTGTTCAGTG-3',PCR条件:94℃、40 s,54.0℃、40 s,72℃、1 min,72℃、10 min,28个循环后72℃延伸10 min;SPC上游:5'-GAAACTCAGAAACGCCCTCG-3',下游:5'-CTCGCCCAAGAATCAGAATCGG-3',PCR条件:94℃、40 s,55.5℃、40 s,72℃、1 min,72℃、10 min,28个循环后72℃延伸10 min;β-actin上游:5'-GCCAACCGTGAAGAGATG-3',下游:5'-CCAGGATAGAGCCACAAT-3',PCR条件:94℃、40 s,53.5℃、40 s,72℃、1 min,72℃、10 min,30个循环后72℃延伸10 min。

1.4.2 RT-PCR产物分析 RT-PCR扩增产物经20 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳、染色,紫外灯下观察结果、拍照,采用Fluochem凝胶成像分析系统进行电泳条带结果分析。SPA、SPB、SPC引物的表达水平分别与β-actin扩增产物的吸光度比值来表达其相对mRNA水平。

1.5 统计学处理 应用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内多水平比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间各组新生大鼠肺组织内SPA mRNA表达水平比较 结果见表1、图1。各组新生大鼠肺

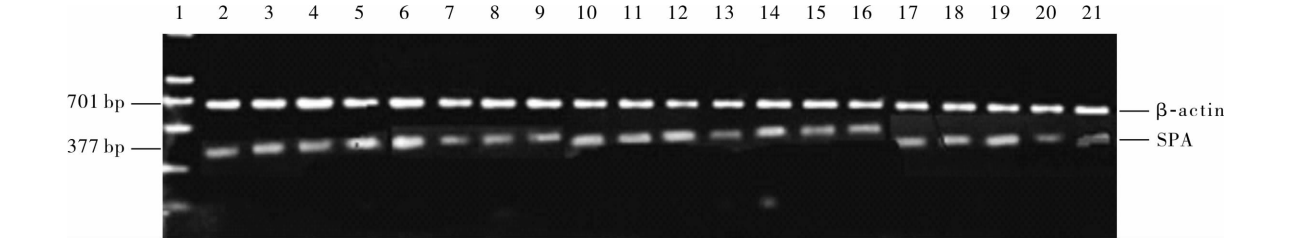
组织内 SPA mRNA 水平在实验后 1、3 d 时比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 研究组 1 和研究组 2 新生大鼠肺组织内 SPA mRNA 水平在实验后 5、7 d 时均较空气对照组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 研究组 1 在实验后 5、7 d 时和研究组 2 在实

表 1 不同时间各组新生大鼠肺组织 SPA mRNA 表达水平比较

Tab.1 Comparison of expression of SPA mRNA in lung tissues of newborn rats at different time point in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SPA mRNA					
		1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	
空气对照组	8	0.85 ± 0.25	0.94 ± 0.23	1.13 ± 0.37	1.07 ± 0.09	1.18 ± 0.32	
研究组 1	8	0.71 ± 0.23	0.96 ± 0.21	0.75 ± 0.06 ^{ab}	0.81 ± 0.20 ^{ab}	1.43 ± 0.15 ^a	
研究组 2	8	0.77 ± 0.20	0.86 ± 0.18	0.88 ± 0.32 ^a	0.95 ± 0.14 ^{ab}	1.26 ± 0.27	
研究组 3	8	0.83 ± 0.42	0.79 ± 0.19	0.94 ± 0.10	1.14 ± 0.25	1.22 ± 0.18	

注:与空气对照组比较^a $P < 0.05$;与研究组 3 比较^b $P < 0.05$ 。



1:Marker;2~6:研究组 1 1、3、5、7、14 d;7~11:研究组 2 1、3、5、7、14 d;12~16:研究组 3 1、3、5、7、14 d;17~21:对照组 1、3、5、7、14 d。

图 1 各组新生大鼠肺组织 SPA mRNA 表达

Fig.1 Expression of SPA mRNA in lung tissue of newborn rats in the groups

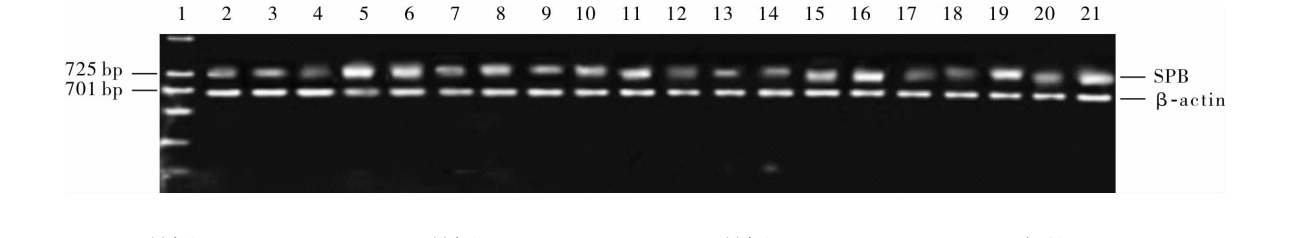
2.2 不同时间各组新生大鼠肺组织 SPB mRNA 表达水平比较 结果见表 2、图 2。各组新生大鼠肺组织内 SPB mRNA 水平在实验后 1、3 d 时比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 研究组 1 和研究组 2 在

表 2 不同时间各组新生大鼠肺组织 SPB mRNA 表达水平比较

Tab.2 Comparison of expression of SPB mRNA in lung tissues of newborn rats at different time point in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SPB mRNA					
		1 d	3 d	5 d	7 d	14 d	
空气对照组	8	0.72 ± 0.28	0.81 ± 0.22	1.24 ± 0.41	1.05 ± 0.08	1.23 ± 0.27	
研究组 1	8	0.95 ± 0.26	0.71 ± 0.18	0.86 ± 0.15 ^a	1.33 ± 0.18 ^a	1.53 ± 0.19 ^{ab}	
研究组 2	8	0.81 ± 0.23	0.77 ± 0.19	0.79 ± 0.30 ^a	1.21 ± 0.32	1.37 ± 0.10	
研究组 3	8	0.77 ± 0.39	0.86 ± 0.16	1.10 ± 0.13	1.15 ± 0.24	1.26 ± 0.16	

注:与空气对照组比较^a $P < 0.05$;与研究组 3 比较^b $P < 0.05$ 。



1:Marker;2~6:研究组 1 1、3、5、7、14 d;7~11:研究组 2 1、3、5、7、14 d;12~16:研究组 3 1、3、5、7、14 d;17~21:对照组 1、3、5、7、14 d。

图 2 各组新生大鼠肺组织 SPB mRNA 的表达

Fig.2 Expression of SPB mRNA in lung tissue of newborn rats in the groups

2.3 不同时间各组新生大鼠肺组织 SPC mRNA 表达水平比较 结果见表 3、图 3。各组新生大鼠肺组织内 SPC mRNA 水平在实验后 1、5 d 时比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 研究组 1、研究组 3 新

验后 7 d 时新生大鼠肺组织内 SPA mRNA 水平均较实验组 3 低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 研究组 1 新生大鼠肺组织内 SPA mRNA 水平在实验后 14 d 时高表达, 较空气对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

实验后 5 d 时新生大鼠肺组织内 SPB mRNA 水平显著低于空气对照组, 研究组 1 在实验后 7、14 d 时均较空气对照组明显升高, 且 14 d 时较研究组 3 也明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

生大鼠肺组织内 SPC mRNA 水平在实验后 3 d 时较空气对照组显著降低 ($P > 0.05$), 研究组 1 在实验后 7、14 d 和研究组 2 在实验后 14 d 时新生大鼠肺组织内 SPC mRNA 水平虽有升高趋势, 但仍显著低

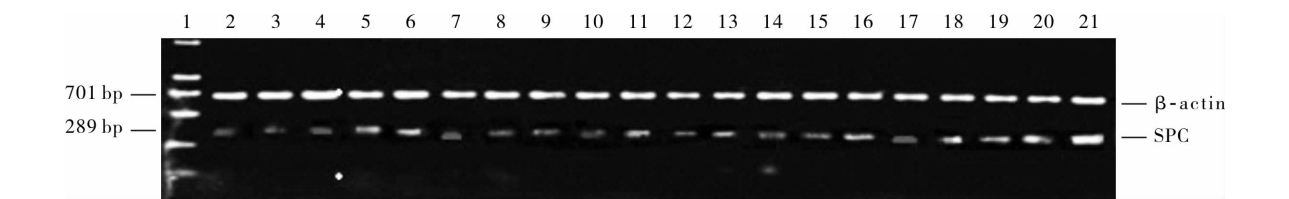
于空气对照组 ($P < 0.05$), 研究组 1 新生大鼠肺组织内 SPC mRNA 水平在实验后 7 d 时较研究组 2 低, 14 d 时较研究组 3 低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 不同时间各组新生大鼠肺组织 SPC mRNA 表达水平比较

Tab.3 Comparison of expression of SPC mRNA in lung tissues of newborn rats at different time point in each group

组别	n	SPC mRNA				
		1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
空气对照组	8	0.70 ± 0.12	1.06 ± 0.18	0.90 ± 0.30	1.18 ± 0.19	1.36 ± 0.12
研究组 1	8	0.59 ± 0.23	0.79 ± 0.13 ^a	0.72 ± 0.26	0.82 ± 0.13 ^{ac}	1.09 ± 0.14 ^{ab}
研究组 2	8	0.74 ± 0.29	0.95 ± 0.31	0.79 ± 0.24	1.08 ± 0.15	1.19 ± 0.12 ^a
研究组 3	8	0.65 ± 0.08	0.80 ± 0.23 ^a	0.99 ± 0.31	0.93 ± 0.18	1.24 ± 0.15

注:与空气对照组比较^a $P < 0.05$;与研究组 3 比较^b $P < 0.05$;与研究组 2 比较^c $P < 0.05$ 。



1:Marker;2~6:研究组 1 1、3、5、7、14 d;7~11:研究组 2 1、3、5、7、14 d;12~16:研究组 3 1、3、5、7、14 d;17~21:对照组 1、3、5、7、14 d。

图 3 各组新生大鼠肺组织 SPC mRNA 的表达

Fig.3 Expression of SPC mRNA in lung tissue of newborn rats in the groups

3 讨论

作者在既往研究中采用肺干湿质量比值、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolarlavage fluid, BALF) 中蛋白含量测定、Evans 蓝的浓度检测证实:随着高氧暴露浓度的增高、暴露时间的延长,肺水肿逐渐加重^[2-4]。高氧暴露 1、3、5、7 d,肺组织湿/干质量比值、BALF 中蛋白总量、肺组织 Evans 蓝含量均随高氧暴露时间延长及暴露氧浓度的增高,肺组织肺泡通透性明显增加,并揭示高氧暴露的 3~7 d 肺水肿逐渐达到高峰。

在肺泡液体转运过程中,SPA、SPB、SPC 发挥着不可忽视的作用。首先,机体合成的肺表面活性物质贮存在细胞板层小体内,然后分泌至肺泡腔形成管状体,管状体是形成肺表面膜的前体,分泌至肺泡上皮内层的表面形成单分子的表面薄膜,能够显著降低肺表面张力,促进肺内液体吸收,防止肺水肿的发生;同时,维持呼气末肺泡的扩张状态,保持肺泡正常大小,防止肺泡发生萎陷发挥着重要作用^[5-6]。

在本研究中,新生大鼠高氧暴露初期 SP 表达明显下调,可能参与了高氧肺损伤早期的发病过程,SPA、SPC 表达下调介导了肺水肿的发生、发展。暴露于高氧环境导致 II 型肺泡上皮细胞增殖抑制、细胞损伤,这些因素直接或间接导致内源性 SP 合成减少,进一步加重了肺损伤。为了维持正常的 SP 功能,机体通过一些反馈性调节机制刺激肺泡 II 型细胞,导致 SP mRNA 水平增加,从而增加机体的预防

功能^[7-10]。在本研究中,SPA mRNA 在实验后 1、3 d 各组间差异无统计学意义,5、7 d 研究组表达明显减低,随高氧暴露氧浓度的增高对 SPA mRNA 影响越严重,之后研究组 SPA mRNA 表达逐渐升高。其可能原因之一是高氧导致肺泡血管屏障受损进而血浆蛋白漏出,SPA、SPB、SPC 被灭活消耗,机体为了维持正常的肺泡功能,肺泡 II 型细胞反馈性地导致 SPA mRNA 水平增加;另一种可能是 SPA 对肺泡炎症免疫应答反应,通过抑制核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 的活性进而抑制炎症介质的释放,具有免疫和抗炎作用。此外,SPA 能够降低肺泡血管通透性,达到对肺组织的保护作用^[11-14]。

SPB 的主要功效有降低肺泡表面张力,防止肺泡呼吸末肺泡萎陷,抗炎保护肺组织免受损伤,维持正常呼吸功能等。本研究结果显示,高氧肺损伤后 1、3 d SPB mRNA 的表达各组间比较差异无统计学意义,5 d 时显著降低,7 d 后表达逐渐升高一直持续到 14 d,与空气对照组比较差异有统计学意义,并且随氧暴露浓度增高变异程度加重,预示肺损伤后 SPB mRNA 反应性地高表达,提示其在肺损伤后在保护肺的呼吸功能方面起着极其重要的作用^[15-20]。

SPC 在肺组织中只有 AEC II 才能合成和分泌,因此,SPC 可作为 AEC II 的特异性分化标志物,其表达水平能较好地反映 AEC II 的功能^[21-24]。本研究结果显示,高氧肺损伤后实验各组在实验后 1 d 比较差异无统计学意义,3 d 时较空气对照组明显降低,7、14 d 时有升高趋势,但其表达仍显著低于

空气对照组,差异有统计学意义,并且随氧暴露浓度提高 SPC 表达减低加重,其原因可能是 AEC II 损伤后导致合成 SPC 能力下降。

当肺脏直接暴露于高氧环境时,引起肺上皮组织通透性明显增高,肺泡渗出增多,肺泡发生瀑布性炎症反应,导致纤维蛋白沉积及肺表面活性物质消耗性减少、活性降低等改变。SP 降低肺泡表面张力的特性可以增加组织间隙静水压,维持肺泡微循环灌注,减少微静脉跨膜静水压压差,促使液体由肺泡腔向组织间隙的移动,防止肺泡内积液,进而有效防止肺水肿的发生。本研究结果提示,高氧肺损伤大鼠 SP mRNA 减低,进而导致肺泡通透性增加,肺内液体聚积,可能与高氧肺损伤早期肺水肿严重程度密切相关。

通过本研究推测 BPD 患儿早期肺泡上皮屏障功能的改变导致肺水肿可能与 SP 分泌减少密切相关,其具体发生机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] BEN-ARI J, MAKHOUL I R, DORIO R J, *et al.* Cytokine response during hyperoxia: sequential production of pulmonary tumor necrosis factor and interleukin-6 in neonatal rats[J]. *Isr Med Assoc J*, 2000, 2 (5): 365-369.

[2] 岳冬梅, 薛辛东. 水通道蛋白 1、5 与新生鼠高氧肺损伤肺水肿的关系研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 147-149.

[3] 岳冬梅, 薛辛东. 高氧致慢性肺疾病新生鼠肺泡上皮细胞 AQP 和 AQP 表达及其意义[J]. 中国新生儿科杂志, 2007, 22(3): 149-152.

[4] 岳冬梅, 佟雅杰, 薛辛东. 高氧致 CLD 新生鼠肺组织水通道蛋白 1、5 的表达及其调控作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(2): 10-14.

[5] BHATTACHARYA J, MATTAY M A. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury[J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75(1): 593-615.

[6] BACKER C S, EVANS T W. Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 1999, 353 (9160): 1232-1237.

[7] URAKOVA M A, BRYNDINA I G. Surfactant and water balance of lung in intracerebral hemorrhage at conditions of capsaicin blockade of vagus nerve[J]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2015, 101 (3): 308-315.

[8] SAPRU A, FLORI H, QUASNEY M W, *et al.* Pathobiology of acute respiratory distress syndrome[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2015, 16 (5 Suppl 1): S6-S22.

[9] DOYLE I R, BERSTEN A D, NICHOLAS T E. Surfactant protein-A and -B are elevated in plasma of patients with acute respiratory

failure[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(4 Pt1): 1217-1229.

[10] 毕仲江. 盐酸氨溴索气管内滴入在新生儿机械通气中的临床应用[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(1): 15-20.

[11] WEAVER T E, WHITSETT J A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins[J]. *Biochem J*, 1991, 273(2): 249-264.

[12] REIDY M F, WRIGHT J R. Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF- β 1 release by inflammatory alveolar macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285 (4): 854-861.

[13] WHITE M K, BAIREDDY V, STRAYER D S. Natural protein from apoptosis by surfactant protein A in type II pneumocytes[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 263(2): 181-192.

[14] 索丹. 慢性阻塞性肺疾病大鼠肺表面活性蛋白 A 表达的变化[J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(18): 277-278.

[15] EMRIE P A, SHANNON J M, MASON R J, *et al.* cDNA and deduced amino acid sequence for the rat hydrophobic pulmonary surfactant associated protein, SPB [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 994(3): 215-221.

[16] WOODS E, OHASHI T, POLK D, *et al.* Surfactant treatment and ventilation effects on surfactant SPA, SPB, and SPC mRNA levels in preterm lamb lungs [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269 (2 Pt1): L209-L214.

[17] TOKIEDA K, IWAMOTO H S, BACHURSKI C, *et al.* Surfactant protein-B-deficient mice are susceptible to hyperoxic lung injury [J]. *Respir Cell Mol Bio*, 1999, 21(4): 463-472.

[18] 冯继峰, 庞登戈, 王晓夏. 机械通气诱导肺损伤大鼠肺组织白细胞介素-8 及表面活性蛋白 B 表达的变化[J]. 临床麻醉学杂志, 2015, 31(3): 282-285.

[19] 胡蓉, 谭秋. 肺表面活性蛋白 B 在足月新生儿呼吸窘迫综合征中的作用[J]. 中国药业, 2014, 23(8): 91-93.

[20] 高阳, 刘冬云, 孙祥斌, 等. 环氧合酶 2 抑制剂对高氧环境下新生大鼠肺组织肺表面活性物质相关蛋白 B、转化生长因子- β 1 表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(14): 1081-1085.

[21] MASON R J, KALINA M, NIELSEN L D, *et al.* Surfactant protein C expression in urethane-induced murine pulmonary tumors [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 175-182.

[22] SEIFART C, CLOSTERMANN U, SEIFART U, *et al.* Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203(1): 27-35.

[23] GLASSER S W, BURHANS M S, KORFHAGEN T R, *et al.* Altered stability of pulmonary surfactant in SPC-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(11): 6366-6371.

[24] 刘玉琪, 谭国良, 孙旭日, 等. RDS 大鼠肺组织氧化应激的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(19): 15-20.

(本文编辑: 徐刚珍 英文编辑: 孟 月)