

· 实验研究 ·

高氧致早产鼠 AEC II 凋亡及其信号机制

李冬梅¹, 薛辛东¹, 闫丽娟², 张宏伟², 郑菲², 南春红², 岳志军²

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032)

【摘要】目的 吸入高浓度氧气是导致新生早产儿肺发育障碍, 并最终发展为慢性肺疾病 (CLD) 的主要原因, 但其详细机制尚不清楚。本文旨在确定肺泡 II 型上皮细胞 (AEC II) 凋亡在高氧诱导的早产鼠 CLD 形成中的作用及其主要信号机制。**方法** 93 只新生早产大鼠随机分为两组: 对照组 ($n = 45$) 吸入空气, 模型组 ($n = 48$) 吸入 $\geq 95\%$ 氧气。分别采用原位末端标记技术 (TUNEL)、电镜及逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测特定时间点各组大鼠肺组织细胞凋亡及其相关因子的表达。**结果** 模型组凋亡指数 (AI) 自 7 d 起明显高于对照组 ($P < 0.05$), 发生凋亡的细胞是 AEC II; 模型组 Bax mRNA 3 d 起高于对照组 ($P < 0.05$), Bcl-2 自 7 d 起低于对照组 ($P < 0.05$); 两组 Fas mRNA 表达无差异 ($P > 0.05$)。**结论** 早产大鼠 CLD 过程中存在 AEC II 凋亡, 这可能是导致高氧诱导的 CLD 早产大鼠肺泡发育障碍的主要因素之一; 凋亡信号的启动可能有 Bax 与 Bcl-2 比值变化的参与, 而与 Fas 的转录表达无关。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 154-158]

【关键词】 慢性肺疾病; Bax 蛋白; 早产; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2005)02-0154-05

Hyperoxia-induced apoptosis of AEC II in premature rats and its signaling pathways

Dong-Mei LI, Xin-Dong XUE, Li-Juan YAN, Hong-Wei ZHANG, Fei ZHENG, Chun-Hong NAN, et al. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Xue X-D, Email: amei888@126.com)

Abstract: Objective Exposure to high concentrations of oxygen may impair the pulmonary development in premature neonates and ultimately result in chronic lung disease (CLD). But its precise mechanism has not been identified. This study aimed to investigate the role of alveolar epithelial type II cells (AEC II) apoptosis and its signaling pathways in the development of hyperoxia-induced CLD in premature rats. **Methods** Ninety-three premature newborn rats were randomly assigned into a Control group (exposed to air, $n = 45$) and a Model group (exposed to $\geq 95\% O_2$, $n = 48$). Apoptosis and relative factor expression were determined with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labelling (TUNEL), electron microscopy, and reverse transcriptase PCR (RT-PCR). **Results** The apoptotic index increased in the Model group from day 7 to day 21 of hyperoxia inducement ($P < 0.05$). The apoptotic cells were AEC II. Bax mRNA levels in the Model group were higher than those in the Control group after the 3rd day ($P < 0.05$), while Bcl-2 expression in the Model group was lower on the 7th, 14th and 21st days than that in the Control group ($P < 0.05$). There was no difference in the Fas mRNA expression between the two groups. **Conclusions** Apoptosis of AEC II is present in the process of hyperoxia-induced CLD and may be one of major causes of poor alveoli development related to hyperoxia-induced CLD. The changes in the Bax and Bcl-2 ratio may be involved in the initiation of the signaling pathway of AEC II apoptosis, while Fas transcriptional expression may be irrelevant. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2): 154-158]

Key words: Chronic lung disease; Bax protein; Pmature birth; Rat

新生儿慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD) 与早产密切相关, 是新生儿监护病房内最严重也是最棘手的临床问题。目前认为吸入高浓度氧气是引起 CLD 最主要的原因, 肺发育障碍是 CLD 的主要病理形态学改变^[1]。

凋亡参与了机体许多重要的病理生理过程。虽然目前还没有关于凋亡是否参与 CLD 形成的证据,

但是已经有实验证实高氧在体内外均能引起肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar epithelial type II cell, AEC II) 凋亡^[2,3]。AEC II 是肺内表面活性物质合成的场所, 并能按需求增殖并分化为肺泡 I 型上皮细胞, 在肺的生长、发育、损伤及修复过程中发挥重要作用。探索早产儿 CLD 过程中 AEC II 凋亡的规律及其调控机制, 不仅可以完善 CLD 肺泡发育障碍的发生机

[收稿日期] 2005-01-08; [修回日期] 2005-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号 30440056), 辽宁省自然科学基金 (编号 20022071), 辽宁省教育厅攻关计划 (编号 202013127)

[作者简介] 李冬梅 (1973-), 女, 博士研究生, 主治医师。主攻方向: 新生儿专业。

[通讯作者] 薛辛东, 中国医科大学附属第二医院儿科, 邮编 110004。

制,并可为寻求新的防治途径提供理论依据和奠定实验基础。本研究以高氧致早产鼠 CLD 模型为对象,动态观察肺内细胞凋亡及 AEC II 的超微结构变化,并同时研究 Bax、Bcl-2 及 Fas 基因表达的动态变化,旨在探讨 AEC II 凋亡在 CLD 过程中的作用及其信号机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

原位细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司);RNA 提取液(Invitrogen);逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒及所需引物(Takara 大连生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验对象及分组 20 只妊娠 21 d 的 SD 大鼠(由陆军总院实验动物中心提供,足月为 22 d),经剖宫产获得仔鼠 160 只,迅速复苏(存活率 58%)后转交与代母鼠喂养,随机分为两组,对照组: $n = 45$,平均体重 4.76 ± 0.08 g;模型组: $n = 48$,平均体重 4.73 ± 0.07 g。

1.2.2 动物模型的建立 模型组仔鼠连同代母鼠置密闭透明氧箱内,持续给予纯氧,保持氧箱内氧气浓度 $\geq 95\%$ [4],每天定时开箱 30 min 添加食水,更换垫料,与对照组交换代母鼠;对照组置空气中饲养。

1.2.3 标本采集 每组分别于实验开始后的 1 d、3 d、7 d、14 d 和 21 d 随机选取 5 只鼠,称重,10% 水合氯醛腹腔麻醉,无菌取完整肺组织,左肺以 4% 多聚甲醛(1% DEPC)固定,常规制备石蜡切片,右肺上叶以 2.5% 戊二醛固定制备电镜超薄切片,其余肺组织置 Eppondorf 管(Rnase Free)内 -80°C 保存。实验过程中非取材原因死亡的仔鼠(对照组自然死亡 4 只,模型组因高氧等多种原因死亡 19 只)及 21 d 实验结束后仍存活的仔鼠(对照组 16 只,模型组 4 只)均被剔除,不记入实验结果统计之内。

1.2.4 肺组织病理观察 常规苏木素-伊红染色,光镜下观察($\times 400$),放射性肺泡计数(radical alveolar count, RAC,从呼气性细支气管中心至远端胸膜引一垂直线,计数该直线上的肺泡数量)。

1.2.5 原位细胞凋亡检测 采用原位末端标记技术(TUNEL)技术,随机选取 3 个视野,光镜下($\times 400$)计数 500 个细胞内凋亡细胞数,计算凋亡指数(apoptotic index, AI, $\text{AI} = \text{凋亡细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$)。

1.2.6 细胞超微结构观察 铀铅双重染色,透射电镜(JEM-1200Ex80Kv)下观察 AEC II 超微结构($\times 8000$)。

1.2.7 肺组织 Bax、Bcl-2、Fas mRNA 表达: 采用 RT-PCR 方法。PCR 扩增引物: Bax 上游: 5'-TGC TAC AGG GTT TCA TCC A-3', 下游: 5'-AGG ACT CCA GCC ACA AAG A-3' (共 352bp); Bcl-2 上游: 5'-TAG AGG AGG TGA CCA AGA TCG-3', 下游: 5'-CAC AAT AAC ATC ACG GCA ACC-3' (共 237 bp); Fas 上游: 5'-ACC TCC AGT CGT GAA ACC-3', 下游: 5'-ATA ACA GAA GCA GTC CCT-3' (共 647 bp); GAPDH 上游: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 下游: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (共 528 bp)。以 GAPDH 为内参照,灰度值半定量分析。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素多水平比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验,相关分析采用 Spearman 分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 高氧诱导的 CLD 早产大鼠肺组织病理改变

2.1.1 组织学改变 对照组出生后肺泡上皮自不规则结构逐渐发育成熟,至 21 d 肺泡结构规整,肺泡大小均匀一致,肺泡间隔变薄(图 1A)。模型组 3 d 肺间质炎性细胞浸润;7 d 肺泡腔变大,间隔变薄;14 d 肺泡融合,数量减少;21 d 正常肺泡结构消失,大面积肺泡融合,大量肺间质细胞增生(图 1B)。

2.1.2 RAC 变化 吸氧 1 d 和 3 d,两组 RAC 无差异($P > 0.05$),7 d 起模型组低于对照组(7 d $P = 0.013$, 14、21 d $P < 0.001$),并持续下降($F = 18.171$, $P = 0.001$),至 21 天降至最低,不及 A 组的一半(表 1)。

表 1 对照组和模型组 RAC 的比较

($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	4.69 ± 0.49	6.18 ± 0.52	7.66 ± 0.42	9.10 ± 0.48	9.88 ± 0.52
模型组	4.73 ± 0.56	6.21 ± 0.25	6.48 ± 0.53^a	5.09 ± 0.47^b	4.71 ± 0.26^b

与对照组比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.001$

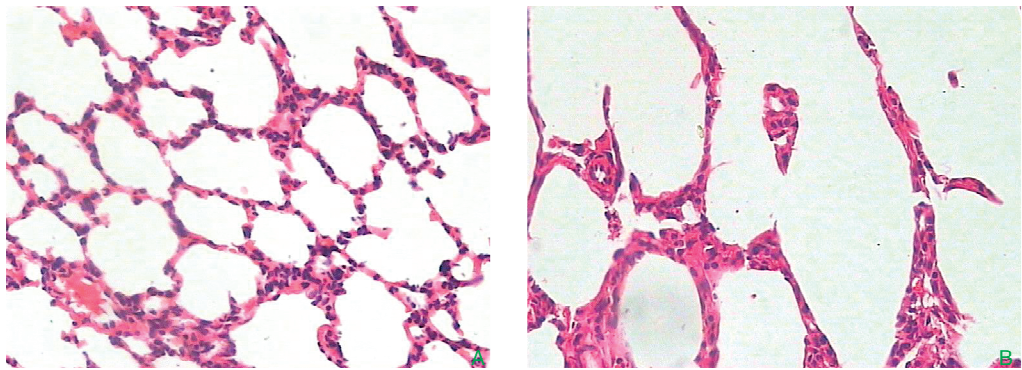


图1 高氧诱导的CLD早产大鼠肺组织病理改变(HE×400)

A 对照组21d肺泡结构规整,肺泡大小均匀一致,肺泡间隔变薄。B 模型组21d正常肺泡结构消失,大面积肺泡融合,大量肺间质细胞增生。

2.2 高氧诱导的CLD早产大鼠AECⅡ凋亡

2.2.1 AI的变化 两组AI在吸氧1、3d时没有差异(1d $P=0.738$, 3d $P=0.067$), 7d起模型组高于对照组(7d $P=0.004$, 14d、21d $P<0.001$), 并随着吸氧时间的延长逐渐升高($F=138.284$, $P<0.001$), 21d达最大值(图2A, 表2)。

表2 对照组和模型组AI的比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	0.75 ± 0.26	0.93 ± 0.19	7.74 ± 1.64	5.71 ± 1.18	7.83 ± 1.73
模型组	0.72 ± 0.19	1.27 ± 0.31	9.25 ± 3.22 ^c	33.80 ± 4.55 ^b	41.83 ± 5.94 ^b

与对照组比较 b $P<0.001$, c $P<0.01$

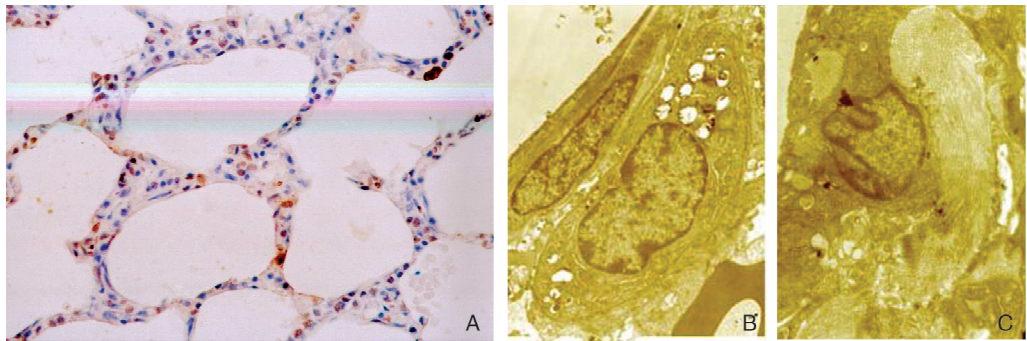


图2 高氧诱导的CLD早产大鼠AECⅡ凋亡改变(A×400;B,C×8000)

A 模型组21d TUNEL检测结果。B 电镜下模型组AECⅡ7d开始出现凋亡的特征性改变,即:微绒毛减少,染色质浓缩,沿着核膜排列,形成不同形状和大小的块状。C 电镜下模型组AECⅡ21d时细胞核固缩、融解,线粒体、微绒毛消失,板层小体完全排空,肺间质有大量纤维组织增生。

2.2.2 AI与RAC的相关性 模型组AI与RAC变化呈负相关($r=-0.466$, $P=0.02$)。

2.2.3 电镜结果 对照组AECⅡ表面微绒毛(microvilli, Mv)完整,胞浆内可见线粒体(mitochondria, Mi)和板层小体(lamellar bodies, LB),质膜连续完整,气血屏障正常完整,肺间质内无胶原沉积。模型组吸氧1d, AECⅡ中可见少量线粒体肿胀;3d开始出现板层小体排空;7d除上述改变外,出现凋亡的特征性改变,即:微绒毛减少,染色质浓缩,沿着核

膜排列,形成不同形状和大小的块状(图2B)。14d上述变化明显加重,并伴有气血屏障明显增厚;至21d时细胞核固缩、融解,线粒体、微绒毛消失,板层小体完全排空,肺间质有大量纤维组织增生(图2C)。

2.3 高氧诱导的CLD早产大鼠肺内Bax、Bcl-2、Fas mRNA表达变化

2.3.1 Bax与Bcl-2表达变化 实验1d两组肺组织Bax表达强度无差异($P>0.05$), 3d以后模型

组高于对照组(3 d $P=0.02$;7 d $P=0.001$,14、21 d $P<0.001$),并随着吸氧时间的延长逐渐升高($F=27.685,P<0.001$),21 d 最高(图3A,表3)。实验1、3 d 两组肺组织 Bcl-2 表达强度无差异($P>0.05$),7 d 以后模型组低于对照组(7 d $P=0.047$,14、21 d $P<0.001$),并随着吸氧时间的延长逐渐降低($F=38.499,P<0.001$),21d 最低(图3B,表3)。

模型组 Bax 与 Bcl-2 的比值(Bax/Bcl-2)自3 d 起高于对照组(3 d $P=0.003$,7,14,21 d $P<0.001$),并持续升高($F=86.792,P<0.001$),至21 d 达峰值。

2.3.2 Bax/Bcl-2 与 AI 相关性分析 模型组 Bax/Bcl-2 与 AI 呈正相关($\gamma=0.511,P=0.005$)。

2.3.3 Fas 表达变化 两组各个时间点 Fas 表达无显著性差异($P>0.05$)(表4)。

表3 对照组和模型组 Bax、Bcl-2mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

		1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Bax	对照组	25.89 ± 2.31	25.84 ± 2.69	25.99 ± 2.61	26.02 ± 2.81	25.72 ± 2.61
	模型组	26.43 ± 2.88	32.61 ± 4.47 ^a	42.59 ± 5.21 ^c	51.43 ± 5.98 ^b	64.70 ± 4.42 ^b
Bcl-2	对照组	25.88 ± 3.07	26.95 ± 3.13	24.83 ± 3.11	24.46 ± 2.45	24.25 ± 3.16
	模型组	26.56 ± 1.93	27.17 ± 2.82	18.94 ± 3.27 ^a	10.31 ± 3.79 ^b	8.95 ± 2.78 ^b

与对照组比较,a $P<0.05$,b $P<0.001$,c $P<0.01$

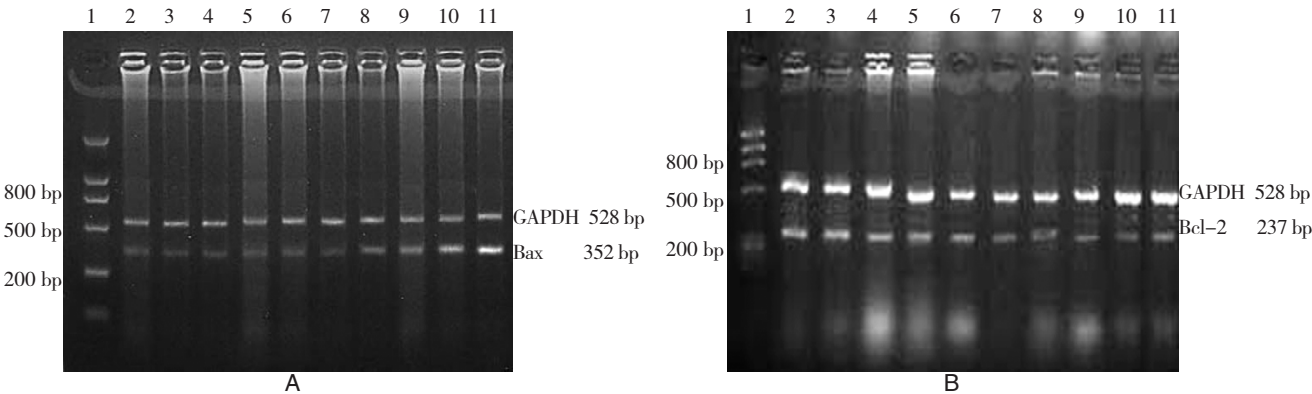


图3 高氧诱导的 CLD 早产大鼠肺内 Bax、Bcl-2mRNA 表达变化

A 两组肺组织 Bax mRNA 表达。B 两组肺组织 Bcl-2 mRNA 表达。(1: Marker, 2~6: 分别为对照组1 d,3 d,7 d,14 d,21 d;7~11: 分别为模型组1 d,3 d,7 d,14 d,21 d)。

表4 对照组和模型组 Fas mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	19.69 ± 2.35	20.18 ± 3.17	18.16 ± 9.14	22.16 ± 1.46	21.19 ± 1.16
模型组	18.91 ± 5.00	19.87 ± 4.71	18.91 ± 3.36	19.80 ± 2.12	19.96 ± 1.08

3 讨论

合并有心肺疾病的早产儿接受高浓度氧气和机械通气治疗,发生 CLD 的危险增加。近期报道证实肺发育不足是 CLD 的主要病理形态学改变^[1,4]。当损伤干扰了肺泡发育的关键过程--肺泡上皮细胞的增殖和分化,使受损肺泡上皮不能得到充分的修复就会进一步引起 CLD 的发生^[6]。目前,肺发育异常已经成为国际上关于 CLD 研究的新焦点,但其主要

机制还不十分清楚。
近期体内外研究提示凋亡可能在肺泡上皮损伤的病理过程中发挥重要作用。发生肺损伤的人肺泡上皮细胞出现了凋亡的特征性改变^[7],及凋亡特异蛋白 Bax 表达的增加^[8]。经 90% 高氧处理 48 h 的成年大鼠 AEC II,在体外表现出明显的凋亡信号及 DNA 损伤^[9]。95% 高氧能引起体外培养的胚胎大鼠 AEC II 大量凋亡^[6]。Mcgrath-Morrow 等^[5]发现高浓度氧能引起新生的足月小鼠肺内凋亡信号的增加,并与氧作用时间成正比^[5]。其他研究者在成年

鼠肺内也观察到了类似的结果^[3,10]。因此有人认为凋亡可能是高浓度氧在肺发育关键阶段引起肺的生长和重塑异常的重要因素。本研究也显示在 CLD 形成过程中 AI 明显升高,而且 AI 与 RAC 的变化呈负相关。出现凋亡特征性改变的细胞是 AECII,并随着吸氧时间的延长而逐渐加重。凋亡可能是机体对高氧刺激的一种应激反应,通过这种方式清除受损后不能恢复的细胞,维持机体内环境的稳定,限制炎症反应。然而肺发育成熟主要发生在出生前后,在这个关键时期由于高氧的影响 AECII 凋亡数量过多,使肺泡不能维持正常的形态结构,从而影响了肺泡的发育成熟。本研究提示 AECII 的凋亡参与了 CLD 的发生、发展过程,这可能是导致高氧致 CLD 早产大鼠肺泡发育障碍的主要原因之一。

已有研究证实在高氧性肺损伤过程中, Bax/Bcl-2 的变化是导致肺细胞凋亡决定性的关键^[5,11]。本研究中,在高氧诱导的新生早产大鼠 CLD 损伤过程中 Bax mRNA 在吸氧 3 d 时升高,而 Bcl-2 在 7 d 降低,进而导致 Bax/Bcl-2 持续升高并且与 AI 的变化呈正相关,提示 Bax 与 Bcl-2 比值的变化可能参与了高氧诱导的 CLD 早产鼠 AEC II 凋亡的线粒体途径的启动。

近期的证据提示通过 Fas 表达上调介导的过度凋亡是肺损伤与纤维化的主要病理机制之一^[12]。体外实验也发现 Fas 配体能引起 AECII 源的培养细胞凋亡^[13]。但是 Aoshiba 等^[14]的研究得出了相反的结论,即: Fas 系统不是博莱霉素引起的小鼠肺组织内细胞凋亡的必须途径。而且在高氧引起的 A549 培养细胞凋亡过程中没有出现 Fas 途径的下游信号--Caspase8 的变化^[15]。与本研究结果一致。这说明 Fas 的转录表达可能没有参与介导高氧致早产大鼠 CLD 过程中肺细胞的凋亡。

综上所述,本研究提示 AECII 的凋亡可能参与了 CLD 的发生、发展过程,并可能是高氧致早产大鼠 CLD 肺泡发育障碍的主要因素之一。在 CLD 过程中 Bax 与 Bcl-2 比值的变化可能参与了凋亡信号的启动,而传统的凋亡诱导基因 Fas 的转录表达可能与此无关。

[参 考 文 献]

[1] Frank L. Protective effect of keratinocyte growth factor against lung

- abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats [J]. *Biol Neonate*, 2003, 83(4): 263-272.
- [2] Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide: modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline[J]. *Cytokine*, 2002, 20(6): 247-255.
- [3] Ray P, Devaux Y, Stolz DB, Yarlagadda M, Watkins SC, Lu Y, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(10): 6098-6103.
- [4] 富建华,薛辛东. 高氧诱导早产鼠慢性肺疾病肺超微结构变化及氧化应激反应的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(1): 23-26.
- [5] McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(2): 150-155.
- [6] Danan C, Franco ML, Jarreau PH, Dassieu G, Chailley-Heu B, Bourbon J, et al. High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(10): 1384-1387.
- [7] Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(3): 845-852.
- [8] Guinea D Jr, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, et al. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage[J]. *Am J Pathol*, 1997, 51(4): 999-1007.
- [9] Buckley S, Barsky L, Driscoll B, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D. Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(5 Pt 1): L714-L720.
- [10] Barazzone C, Donati YR, Rochat AF, Vesin C, Kan CD, Pache JC, et al. Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(5): 1479-1487.
- [11] Budinger GR, Tso M, McClintock DS, Dean DA, Sznajder JI, Chandel NS. Hyperoxia-induced apoptosis does not require mitochondrial reactive oxygen species and is regulated by Bcl-2 proteins [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 15654-15660.
- [12] Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(2): L328-L335.
- [13] Fine A, Anderson NL, Rothstein TL, Williams MC, Gochoico BR. Fas expression in pulmonary alveolar type II cells[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(1 Pt 1): L64-L71.
- [14] Aoshiba K, Yasui S, Tamaoki J, Nagai A. The Fas/Fas-ligand system is not required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(2 Pt 1): 695-700.
- [15] Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AM, et al. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(3): 305-315.

(本文编辑:王霞)