

· 实验研究 ·

早产大鼠高氧暴露下肺组织 TNF- α Caspase-3 表达时相研究

刘伟, 常立文, 李文斌

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)在早产大鼠高氧肺损伤中的动态表达及其意义。方法 孕21 d的SD早产大鼠生后第2天,随机分为空气组和高氧组(均 $n=40$)。高氧组大鼠予以85%高氧持续暴露,空气组大鼠置于空气中。于高氧暴露1 d、4 d、7 d、14 d和21 d每组各处死8只大鼠,收集肺组织标本,苏木精-伊红染色观察肺组织病理形态学变化,双抗夹心ELISA法检测TNF- α 含量,免疫组化和Western blot检测Caspase-3表达。结果 高氧暴露4 d、7 d和14 d肺组织TNF- α 和Caspase-3含量明显增高(均 $P<0.01$),且两者之间具有显著相关性($r=0.93, P<0.01$)。结论 TNF- α 诱导Caspase-3过度表达导致细胞凋亡可能是早产大鼠高氧肺损伤的发病机制之一。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):451-454]

[关键词] 肿瘤坏死因子- α ;半胱氨酸蛋白酶-3;高氧;肺损伤;早产;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)05-0451-04

Temporal expression of tumor necrosis factor- α and Caspase-3 in lungs of preterm rats exposed to hyperoxia

Wei LIU, Li-Wen CHANG, Wen-Bin LI. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Email: lvchang@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To explore the temporal expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Caspase-3 in hyperoxia-induced lung injury in preterm rats. **Methods** Two-day-old Sprague-Dawley preterm rats were randomly divided into Air group and Hyperoxia group (both $n=40$). Rats in the Hyperoxia group were exposed to 85% O_2 , while rats in the Air group were exposed to air. The rats in each group were sacrificed at 1, 4, 7, 14 and 21 days after exposure (8 rats at each time point), and lung tissues were collected. Pathomorphology of the lungs was observed by hematoxylin-eosin staining. The contents of TNF- α in the homogenate of lungs were detected using ELISA. The expression of Caspase-3 was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The contents of TNF- α in the homogenate of lungs increased significantly at 4, 7 and 14 days after exposure, and the expressions of Caspase-3 were also enhanced, as compared with those of the Air group ($P<0.01$). The expression of Caspase-3 positively correlated with the contents of TNF- α ($r=0.93, P<0.01$). **Conclusions** Over-expression of Caspase-3 induced by TNF- α might be one of the underlying mechanisms of hyperoxia-induced lung injury in preterm rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(5):451-454]

Key words: Tumor necrosis factor- α ; Caspase-3; Hyperoxia; Lung injury; Preterm birth; Rats

氧疗是治疗新生儿疾病的一个重要措施,但长时间高浓度氧可导致不同程度肺损伤。迄今,高氧肺损伤的发病机制仍未阐明,研究证实,肺泡过度炎症反应所致细胞大量坏死、凋亡在高氧肺损伤发病过程中扮演重要角色。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)是凋亡发生多条路径的最终执行者,它的活化可直接导致细胞凋亡发生^[1];肿瘤坏死因子- α (TNF- α)能通过受体特异性活化Caspase家族从而介导细胞凋亡^[2]。本实验建立早产新生大鼠高氧肺损伤动物模型,研究不同时间点

肺组织TNF- α 和Caspase-3的动态表达规律及其相关性,以探讨高氧肺损伤的发病机制及其可能的防治方案。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SD大鼠(同济医学院实验动物中心提供)雌100只(200~220 g),雄34只(220~250 g),雌雄按3:1合笼交配,次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片,镜检

[收稿日期] 2005-04-18, [修回日期] 2005-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:30471824),国家“十五”科技攻关项目(编号:2004BA720A11)

[作者简介] 刘伟(1976-),男,硕士研究生,主治医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯简介] 常立文,华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,邮编:430030。

见精子记为妊娠第1天。孕21 d时母鼠行剖宫产(预产期为22 d),提前娩出的新生大鼠作为早产鼠。复苏后存活的早产鼠平均分配给近日已分娩的母鼠(作为代母鼠),每只母鼠带8~10只早产鼠。早产鼠适应性饲养1 d,于生后第2天随机分为空气组和高氧组,每组40只早产鼠。高氧组置于氧箱中,氧浓度维持在85%左右,温度25~26℃,湿度60%~70%,二氧化碳浓度<0.5%,每天定时开箱1 h,添加水、饲料及更换垫料。空气组置于同一室内常压空气中。每日两组互换母鼠以避免因氧中毒所致喂养能力下降^[3]。

1.2 标本采集

分别于暴露1、4、7、14和21 d,每组每个时点共取8只早产鼠(每窝各取1只)腹腔注射20%乌拉坦麻醉后,大动脉放血处死。取左肺液氮速冻后存放于-70℃以供蛋白检测;右肺固定脱水后石蜡包埋,制成5 μm厚组织切片。

1.3 肺组织病理形态学观察

苏木精-伊红染色后在200倍光镜下观察。

1.4 TNF-α检测

采用双抗夹心ELISA法检测。TNF-α检测试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 Caspase-3免疫组织化学法检测

采用免疫组化SP法。Caspase-3多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,工作浓度1:100。SP及DAB试剂盒均购自北京中山公司。PBS代替一抗作为阴性对照。染色结果采取半定量分析:高倍镜下(×400)每张切片随机选择5个视野,采用同济HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统检测吸光度值,计算平均值。

1.6 Caspase-3 Western blot检测

肺组织匀浆提取蛋白,按每泳道加总蛋白50 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳,半干式电转移至硝酸纤维素滤膜上,室温封闭2 h,加入相应的Caspase-3多克隆抗体(1:400, Santa Cruz公司)4℃孵育过夜, TBST洗膜4次,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000), ECL增强化学发光显色系统(Pierce)显色5 s~5 min。以β-actin(1:400, Santa Cruz公司)表达水平作为内参照。应用GDS-8000型凝胶成像分析系统(UVP, England)进行扫描并进行半定量分析。

1.7 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件进行t检验和直线相关性分析。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

生后1 d肺组织基本结构单位为终末囊泡,腔大壁厚,有嵴突向腔内;生后4~14 d,肺泡迅速发育,原始囊泡再次分隔,嵴明显增多,肺泡壁变薄,可见肺泡上皮细胞与毛细血管网组成肺泡-血液屏障,典型小直径的肺泡数目显著增加,但肺泡壁较厚,仍有较多间质细胞,至21 d时,肺泡壁变薄,间质细胞显著减少。高氧暴露后1 d时无明显改变;4 d、7 d时,可见明显肺泡炎性改变:肺泡腔内可见有死亡脱落细胞、炎症细胞渗出增多、间质水肿;14 d、21 d时,肺组织结构紊乱,肺泡形成明显滞后,典型小直径的肺泡数目较空气组显著减少,肺泡结构简单化和囊泡化(图1)。

2.2 肺组织匀浆 TNF-α含量变化

高氧暴露1 d,肺组织匀浆 TNF-α含量无明显变化,4 d、7 d和14 d时其含量较空气组显著增加($P<0.01$),至21 d时,其含量又明显减低,与空气组相比无显著差异(图2)。

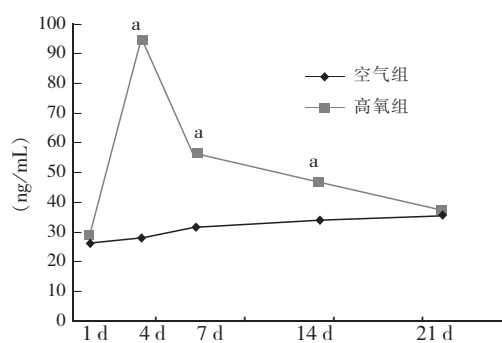


图2 各组肺组织 TNF-α含量的时序变化

a 与空气组比较, $P<0.01$

2.3 肺组织 Caspase-3表达

免疫组化染色后可见Caspase-3广泛表达于肺泡上皮细胞和血管内皮细胞胞浆中,阴性对照无阳性染色。与空气组比较,高氧暴露1 d,其表达强度无明显变化;4 d、7 d和14 d时,其表达强度明显增加($P<0.01$),4 d时为表达高峰。至21 d时,表达明显下降,与空气组相比无显著差异(图3,4)。Western blot检测肺组织Caspase-3表达的结果与免疫组织化学检测结果基本一致(图5,6)。

2.4 肺组织 TNF-α含量与 Caspase-3表达相关性

各时间点肺组织匀浆中 TNF-α平均含量与Caspase-3表达(Western法)水平呈显著正相关($r=0.93, P<0.01$)。

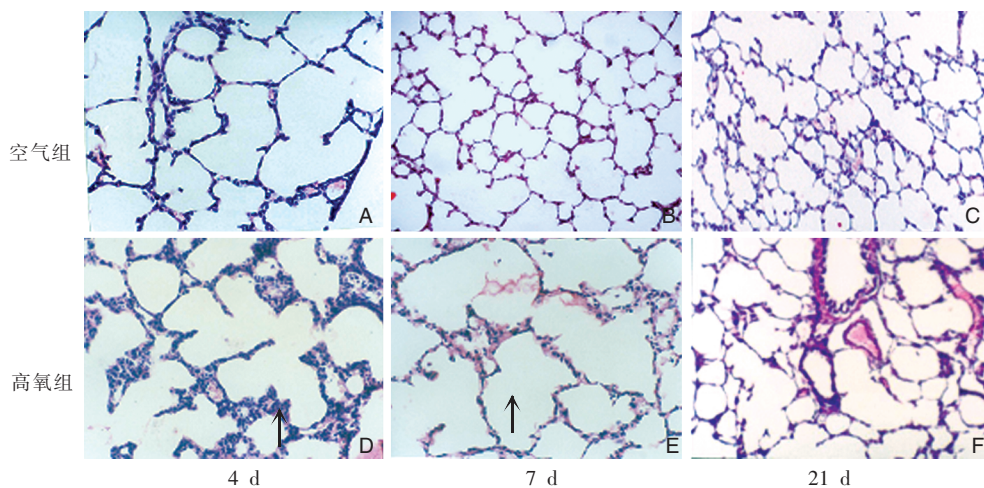


图1 肺组织形态学变化 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)。空气组大鼠4 d时肺组织腔大壁厚, 肺泡数目少(A), 7 d时肺泡峰增多, 突向肺泡腔(B), 21 d时肺泡数目多, 腔小壁薄(C)。高氧组大鼠4 d时肺组织细胞增生水肿, 肺泡壁增厚(箭头所示), 分隔少(D), 7 d时肺泡数目少, 峰少, 见炎性渗出及死亡细胞(E, 箭头所示), 21 d时肺泡壁增厚, 数目少, 结构简单化和囊泡化(F)。

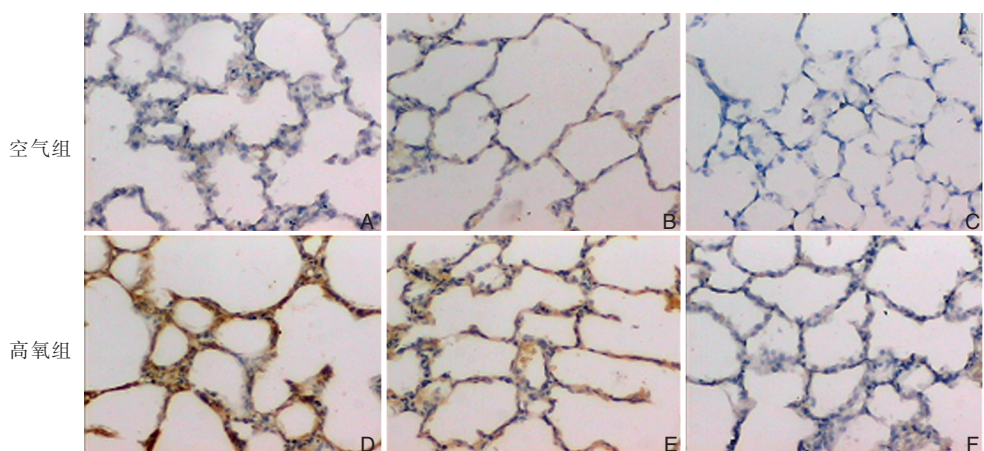


图3 免疫组织化学法检测肺组织 Caspase-3 表达 (SP显色, $\times 400$)。Caspase-3 广泛表达于肺泡上皮细胞和血管内皮细胞胞浆中。与空气组比较, 高氧暴露4 d, 7 d时Caspase-3 表达明显增强(D, E), 21 d时表达明显下降(F), 与空气组比较无显著差异(A, B, C)。

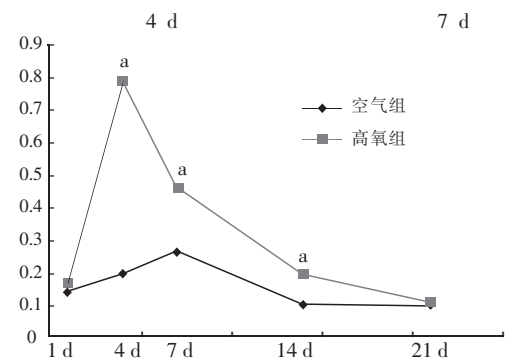


图4 各组肺组织 Caspase-3 表达的时序变化 (免疫组化法)。a 与空气组比较, $P < 0.01$

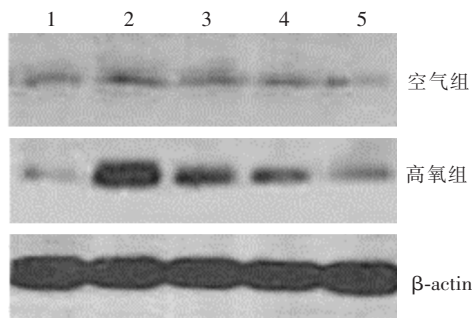


图5 Western blot 检测肺组织 Caspase-3 时序表达。 1, 2, 3, 4, 5 泳道分别代表高氧暴露1, 4, 7, 14 和 21 d。高氧暴露4 d、7 d 和 14 d, 肺组织 Caspase-3 的表达明显强于空气对照组, 其中4 d 表达最强。

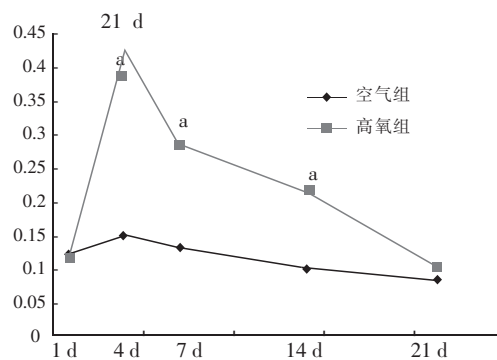


图6 各组肺组织 Caspase-3 表达的时序变化 (Western 法)。a 与空气组比较, $P < 0.01$

3 讨论

生后 21 d 内是新生大鼠肺发育的关键时期, 在此时期Ⅱ型肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞的增殖、移行、分化以及间质细胞数量减少, 使肺组织逐渐由囊泡期过渡到肺泡期, 肺泡体积变小, 数目增多, 肺泡壁变薄, 有效气体交换面积显著增大, 肺发育逐渐成熟。本研究病理形态学检查表明高氧暴露 4 d、7 d, 肺组织即出现明显炎症改变, 间质水肿, 肺泡腔可见大量死亡脱落细胞。至 14 d、21 d 时, 炎症

反应有所减轻,但出现了明显的修复异常和肺发育受阻现象。可见,早期肺部炎症反应和肺细胞大量死亡是高氧肺损伤的关键因素。

凋亡作为重要的细胞死亡方式之一,在高氧肺损伤中的作用倍受关注。Caspase-3 是多种凋亡途径的共同下游效应部分,一旦被激活,凋亡常难以避免,因此该酶是否被激活可作为鉴别凋亡发生与否的重要标志之一^[4]。张向峰^[5]将小鼠暴露于 98% 的高氧环境 48 h, Caspase-3 mRNA 表达显著增加,同时支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞凋亡指数也显著增加。本实验也证实 85% 高氧暴露 4~14 d, 早产大鼠肺组织 Caspase-3 表达显著升高,且阳性表达主要定位于肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞胞浆中。提示高氧暴露早期,由 Caspase-3 介导的肺细胞大量凋亡参与了高氧肺损伤的发病过程。

本实验室前期研究表明,高氧肺损伤与众多炎症因子关系密切,认为高氧暴露下肺部过度的炎症反应介导了肺损伤的发生、发展^[6]。早产肺组织由于生理性抗氧化功能不成熟,高氧暴露可导致活性氧(ROS)大量产生。ROS 可刺激肺泡巨噬细胞分泌大量 TNF- α ^[7]。TNF- α 释放后能特异性地与广泛分布于各种细胞膜表面的受体结合,激活 Caspase-3 导致细胞凋亡^[8]。Nong 等^[9]实验证实,在体外培养的牛肺动脉内皮细胞中加入外源性 TNF- α 可显著增加其细胞凋亡,而预先给予 TNF- α 的单克隆抗体则可明显阻断细胞凋亡发生。那么在高氧暴露下, TNF- α 是否也导致了细胞凋亡呢? 本研究检测了 TNF- α 在高氧肺损伤动物肺组织中的动态表达,并探讨了其与 Caspase-3 之间的相关性。结果表明:高氧暴露早期(4d、7d),肺组织 TNF- α 蛋白表达显著

升高,且其动态变化规律与 Caspase-3 基本一致;而且 Caspase-3 表达与 TNF- α 含量呈显著正相关。提示 TNF- α 可能通过其受体介导 Caspase-3 活化和细胞过度凋亡,参与了高氧肺损伤的发生。因此如果能在高氧暴露的早期阶段(4 d 以内),应用基因干预或特异性 Caspase-3、TNF- α 抑制剂治疗有可能减轻早产儿高氧肺损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Zhivotovsky B, Burgess DH, Orrenius S. Proteases in apoptosis [J]. *Experientia*, 1996, 52(10-11):968-978.
- [2] Poher JS. Activation and injury of endothelial cells by cytokines [J]. *Pathol Biol*, 1998, 46(3):159-163.
- [3] 钱莉玲,常立文,张谦慎,容志惠. 85% 高浓度氧长期暴露诱发早产大鼠肺损伤[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(2):95-99.
- [4] Cohen GM. Caspase: the executioners of apoptosis[J]. *Biochem J*, 1997, 326(pt 1):1-16.
- [5] 张向峰, Foda HD. 高氧所致急性肺损伤小鼠肺组织细胞凋亡和坏死的研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27(7):465-468.
- [6] 常立文,容志惠,张晓惠,陈晔. 肺灌洗液中细胞因子水平动态变化在诊断早产儿慢性肺疾病中的意义[J]. *中华围产医学杂志*, 2004, 7(5):286-289.
- [7] Johnston CJ, Wright TW, Reed CK, Finkelstein JN. Comparison of adult and newborn pulmonary cytokine mRNA expression after hyperoxia[J]. *Exp Lung Res*, 1997, 23(6):537-552.
- [8] Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles[J]. *Immunity*, 2004, 21(3):415-428.
- [9] 农凌波,肖正伦. 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 对牛肺动脉内皮细胞凋亡的影响及意义[J]. 2003, 26(11):668-670.

(本文编辑:钟乐)