

· 临床研究 ·

高氧对发育中人胎儿肺组织分化的影响及地塞米松作用的研究

李娟¹, 韩梅¹, 魏克伦¹, 魏秀清²

(1. 中国医科大学附属二院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 牡丹江市妇产儿童医院, 黑龙江 牡丹江 157000)

[摘要] 目的 高氧可能通过改变未成熟肺组织正常结构发育而导致肺功能异常。该研究通过观察高氧时体外培养胎儿肺组织结构和细胞分化的变化特点及地塞米松对这些肺组织的作用, 旨在了解高氧对胎儿肺组织发育的影响。方法 用培养人假腺体期胎儿肺组织模型分别于高氧(95% O₂, 5% CO₂)及正常氧(21% O₂, 5% CO₂)中培养72 h, 两组又分为地塞米松组(10⁻⁶ M)及无地塞米松组。收获的肺组织以细胞角蛋白(pancytokeratin)确定上皮细胞, Ki-67作为增生性细胞标记物。形态学结果用计算机辅助图像分析系统处理, 分别计算出平均气道厚度, 气道占组织比例(%), 平均气道面积及细胞增生指数。结果 正常氧培养72 h, 肺结构无明显改变, 而高氧组气道明显扩张。高氧组与正常氧组比较, 气道面积6 662 μm² vs 2 728 μm²; 气道厚度7.8 μm vs 8.1 μm; 气道所占比例35.2% vs 23.4%, 差异有显著性(均P<0.05)。高氧并用地塞米松组气道面积(3 174 μm²)及气道所占比例(23.9%)与高氧组比较, 均明显降低, P<0.05; 气道厚度无明显变化。高氧组上皮增生指数(21.8%)明显高于正常氧组(5.1%)及并用地塞米松组(7.4%), P<0.05。结论 高氧促进假腺体期胎儿肺组织分化为类似囊状期样结构, 这种变化与气道上皮细胞异常增生有关; 地塞米松具有抑制高氧对胎儿肺组织的损伤作用。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):105-108]

[关键词] 高氧; 肺发育; 增生; 慢性肺疾病; 婴儿, 早产

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0105-04

Differential response of developing human fetal lung explants to hyperoxia and the effects of dexamethasone on hyperoxia-exposed lungs

LI Juan, HAN Mei, WEI Ke-Lun, WEI Xiu-Qing. Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: lijuan8@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective This study aimed to explore the effects of hyperoxia on the development of fetal lung by investigating the changes of morphological and cell proliferation induced by hyperoxia in cultured fetal lungs as well as the effects of dexamethasone on hyperoxia-exposed lungs. **Methods** Human fetal lung explants at the pseudoglandular stage of development were cultured randomly either in normoxia (21% O₂/5% CO₂) or hyperoxia (95% O₂/5% CO₂) for 72 hrs. Dexamethasone was added into the feeding medium at the concentration of 10⁻⁶ M. Harvested tissues were stained for pancytokeratin to identify epithelial cells, with Ki-67 as a marker of proliferation. The effects of lung morphometry were analyzed using computer assisted image analysis. The mean airway thickness, the proportion of the surface area occupied by airways, the mean airway surface area and the index of the epithelium proliferation were measured. **Results** The lung architectures remained unchanged after 72 hrs normoxia culture, whereas hyperoxia culture resulted in significant dilation of airways and thinning of epithelium, with the surface area of airways of 6 662 μm² vs 2 728 μm² and the thickness of airways of 7.8 μm vs 8.1 μm (P<0.05). Hyperoxia culture also resulted in an increase in the proportion of the surface area occupied by airways than normoxia culture (35.2% vs 23.4%; P<0.05). The surface area of airways (3 174 μm²) and the proportion of the surface area occupied by airways (23.9%) decreased significantly in hyperoxia-cultured lungs after dexamethasone administration (P<0.05). The epithelium proliferation index in hyperoxia-cultured lungs (21.8%) was higher than that in normoxia-cultured lungs (5.1%) and dexamethasone-treated hyperoxia-cultured lungs (7.4%) (P<0.05). **Conclusions** The exposure of pseudoglandular lungs to hyperoxia modulates the lung architecture to resemble saccular lungs with higher epithelium proliferation index. Dexamethasone may inhibit the effects induced by hyperoxia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):105-108]

Key words: Hyperoxia; Lung development; Proliferation; Chronic lung disease; Infants, prematurity

[收稿日期] 2005-09-30; [修回日期] 2006-01-10

[作者简介] 李娟, 女, 博士, 副教授。主攻方向: 新生儿肺损伤。

随着围产医学的进步,早产儿生存率正在不断提高,随之而来的早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease of premature, CLD)亦逐渐成为儿童呼吸系统疾病的主要原因。患儿常表现为氧气依赖,反复呼吸道疾病,甚至发展为支气管哮喘。目前认为,CLD时的肺功能异常与生后肺组织发育异常有关,除感染因素外,高氧是主要介导因素,因为在疾病过程中,患儿均需氧气维持血氧水平^[1,2]。

高氧影响未成熟肺组织发育的机制尚未完全清楚,目前认为,高氧通过形成活性氧形式(reactive oxygen species, ROS)而影响肺细胞生长^[3~6]。调节正常肺发育的因素包括:①上皮-基质互相作用;②细胞因子及转录因子通过调节增生、分化或通过细胞凋亡途径导致细胞死亡而调节肺发育^[7]。Margraf^[2]发现死于CLD的婴儿,肺泡发育明显降低。了解高氧对胎儿肺组织发育的影响,对于深入研究CLD的病理过程及肺功能异常的发生机制有重要指导意义。

地塞米松是合成的糖皮质激素,通过细胞浆受体起作用,因其具有抑制促炎蛋白,介导抗炎蛋白的作用而广泛用于治疗慢性肺疾病。动物实验证实^[8],恒河猴产前使用糖皮质激素,可致肺泡壁变薄,促进气体交换及肺成熟,说明它尚可能通过影响肺发育而改善肺功能。

基于上述研究,我们假设高氧通过破坏细胞生长类型而抑制肺组织生长,通过建立人胎儿肺组织培养模型,将胎儿肺组织分别于正常氧及高氧中培养,并在培养液中加入地塞米松,用免疫组化及图像分析系统分别测定不同条件下气道结构及细胞增生程度,了解高氧后肺组织形态学改变,高氧对肺细胞增生的影响及地塞米松对高氧性肺组织的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 胎儿肺组织的获取 取假腺体期人胎儿肺组织(胎龄10~16周)6例,标本源自药物引产的胎儿,获提供者同意。将其切成2~3 mm³的楔形,按文献^[9]所述,用含有胎牛血清的胶状培养基包被,培养基含有5×Ham's F12, 7.5% NaHCO₂, 0.1M CaCl₂, 1M HCl及蒸馏水。取300 μL培养基加入培养皿中,并将切好的肺组织放于培养基中,组织放于含有5% CO₂的空气培养箱中,37℃ 30 min,组织固定后,于培养皿内分别加入组织培养基

(Ham's F12, 青-链霉素,谷氨酸钠,胎牛血清,氢氧化钠) 2 mL, 37℃ 24 h,通过显微镜观察组织边缘有细胞移行者为成活组织,剔除未成活者,此时计为D0。

1.1.2 组织暴露于高氧及地塞米松 将成活组织随机分为空气组及高氧组,两组又分别分为地塞米松组和无地塞米松组,将组织培养基中加入地塞米松使其浓度为10⁻⁶ M,无地塞米松组以相同浓度乙醇代替。高氧组培养皿置于密封罐内,充入5% CO₂, 95% O₂ 10 L/min, 10 min,连同空气组一同放入37℃培养箱中,于24, 48 h分别更换培养液,72 h收获肺组织,此时为4组组织,分别为:正常氧72 h(N72),正常氧72 h+地塞米松(N72Dex),高氧72 h(H72),高氧72 h+地塞米松(H72Dex),以4%福尔马林固定,石蜡包埋。

1.2 方法

免疫组化染色:将4 μm包埋组织脱蜡后,进行免疫组化染色,一抗抗体(鼠抗人)及稀释度分别为Pancytokeratin (Sigma C2931 Clone C-11 1:200); Ki67 (Dako M7187 1:100),微波及压力锅抗原修复,4℃过夜孵育,二抗(羊抗鼠)稀释度为1:200,室温1 h, DAB染色。Pancytokeratin 抗原位于气道上皮细胞浆内; Ki67 抗原位于细胞核。

图像分析:为保证结果准确,于染色组织边缘按0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°, 315° 8个方向分别取视野,经富士数码相机照相, Qwin 图像分析软件系统分别测定组织总表面积, 气道面积, 气道厚度; 上皮及间质增生性细胞数量。根据上述结果, 分别计算出平均气道厚度, 气道占组织比例(%), 平均气道面积, 单位面积气道数; 细胞增生指数。

1.3 数据处理

计算结果以中间值及四分位数间距(interquartile range, IQR)表示,各组数据比较用非参数检验(Wilcoxon signed rank test), $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织形态学改变

N72肺组织与新鲜组织结构相近,即上皮细胞主要为柱状细胞,仅某些末梢气道扩张,上皮变为立方细胞(图1A); H72气道明显扩大,上皮细胞扁平,间质成分减少(图1B)。H72Dex气道腔小,上皮以柱状细胞为主,间质成分较多(图1C)。

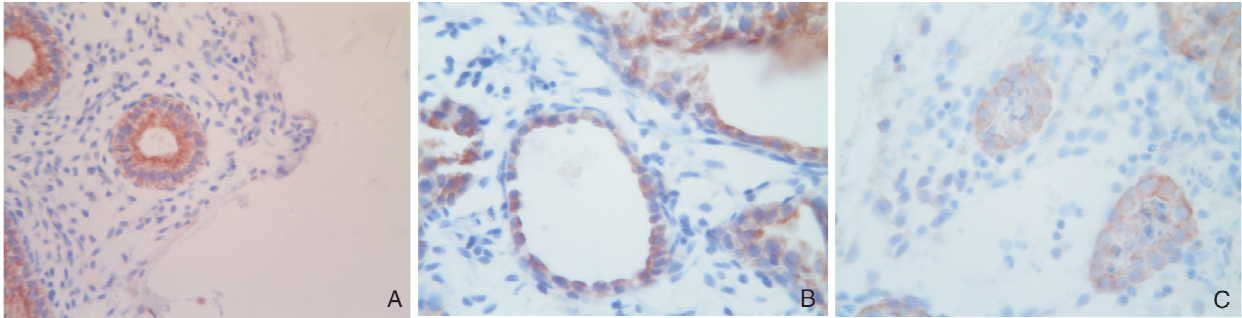


图1 肺组织形态学72 h气道结构改变(×40)。A:正常氧组72 h气道较厚,以柱状上皮为主,腔较小;B:高氧组72 h肺气道上皮变薄,细胞变扁平,气道腔扩大;C:高氧+地塞米松72 h气道较厚,腔较小,上皮细胞形态与正常氧组类似。

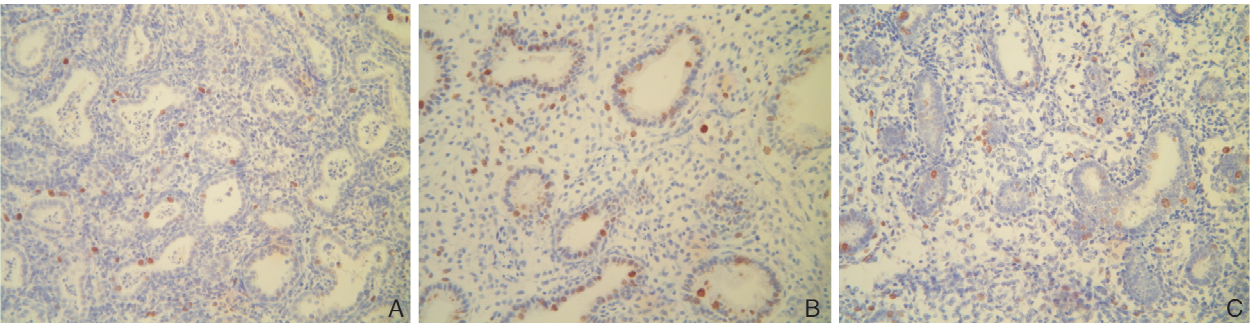


图2 72 h肺组织增生性细胞分布(×25)。A:正常氧72 h胎儿肺组织增生性细胞分布增生性细胞主要位于上皮细胞;B:高氧72 h胎儿肺组织增生性细胞分布增生性细胞主要位于上皮细胞,仅少量位于间质;C:高氧+地塞米松72 h胎儿肺组织增生性细胞数量明显减少,与正常氧组类似。

2.2 图像分析结果

高氧及地塞米松对气道发育的影响如表1所示,N72组平均气道厚度明显大于H72组;H72组气道所占比例和平均气道面积明显大于N72及H72Dex两组。

表1 高氧及地塞米松对气道发育的影响

时间	气道厚度	气道占组织比例	平均气道面积
	μm	%	μm ²
H72	7.8(6.8-9.2)	35.2(31.0-42.5)	6662(4411-9292)
N72	8.1(7.6-11.5) ^a	23.4(14.1-27.4) ^a	2728(2003-3401) ^a
H72Dex	8.1(6.1-10.0)	23.9(15.1-30.6)	3174(2171-4884) ^a
N72Dex	8.9(7.0-10.9)	16.6(14.1-21.7)	2288(1708-2442)

括号内为IQR。a与H72比较均P<0.05

高氧及地塞米松对胎儿肺组织细胞增生的影响:形态学显示,增生性细胞主要位于上皮细胞,间质很少;H72组上皮细胞增生指数明显高于N72及H72Dex组,P<0.05,见表2,图2。

表2 高氧及地塞米松对胎儿肺组织细胞增生的影响

时间	上皮增生指数%	间质增生指数%
H72	21.8(9.6-23.8)	2.3(1.2-3.5)
N72	5.1(4.1-5.8) ^a	2.1(1.5-2.9) ^a
H72Dex	7.4(5.9-10.6) ^a	1.3(0.5-2.7)
N72Dex	6.3(4.1-7.2)	1.5(0.4-3.1)

括号内为IQR。a与H72比较均P<0.05

3 讨论

气道上皮细胞分化是一个复杂过程,人胎儿胎龄10周时开始分化,胎龄24周时,大部分肺上皮细胞发育成熟。假腺体期指胎龄5~17周的肺组织,此期肺组织具有腺体样外观,通过增加细胞数量而生长,特点为气道在分化很差的间质内重复分支,血管在间质内发生^[10]。目前对胚胎肺组织细胞分化机制的研究主要限于动物实验,因动物出生时上皮细胞多不成熟,故动物研究不能客观反映人胚胎发育的过程。在本研究中,通过观察正常氧,高氧及地塞米松对假腺体期人胎儿肺组织结构及细胞增生的影响,我们发现:于空气中培养72 h的肺组织结构与新鲜组织相似,即气道腔较小,主要为柱状上皮,间质所占面积相对多,而于高氧(95%)中培养相同时间(72 h)后,其结构接近囊状期(即肺泡期,24周-出生)肺组织,此时气道扩张,上皮变扁平,以立方细胞为主,间质成分减少。Snyder等(1981)证实,体外培养肺组织可以促进上皮细胞成熟,进一步转化为产生表面活性物质的II型上皮细胞,本研究所见正常氧培养后气道末梢出现立方上皮可能反映了这种改变。在成熟肺组织,II型上皮细胞是I

型细胞的干细胞;在肺损伤时,上皮内增加的Ⅱ型细胞则反映了上皮细胞的修复过程^[11]。本研究发现,高氧时上皮细胞变得更扁平,这种结构改变可能会促进Ⅱ型上皮细胞成熟,并分化为Ⅰ型上皮细胞,进一步增加气道面积。

地塞米松是广泛用于治疗新生儿慢性肺疾病的糖皮质激素,主要是由于其具有抗炎作用,有关它对肺发育的调节作用的研究很少。人胚胎第2个月时,胎儿肺即表达糖皮质激素受体^[8]。动物实验证实,糖皮质激素可降低正常肺组织肺泡间隔,导致肺泡数量减少^[12]。Bunton等(1984)发现,给动物产前提供地塞米松,可加速肺成熟,减少间质数量,促进气体交换。我们的研究发现,高氧+地塞米松组肺气道结构与正常氧组相似;正常氧+地塞米松组肺结构无明显变化,说明地塞米松通过抑制气道上皮的过度分化而抑制高氧对胎儿肺的损伤作用,我们的结果只是从形态学分析得到,地塞米松调节损伤胎儿肺组织发育的分子学机制尚需深入研究。

肺成熟是肺上皮及间质细胞不断增生、分化与成熟相互作用的动态过程,当上皮细胞增生速度降低时,Ⅱ型细胞分化成Ⅰ型细胞速度增加,标志着肺逐渐成熟。Ⅱ型上皮细胞是主要增生性细胞,Ⅱ型细胞增生异常增加,即细胞增生类型改变,可导致肺泡结构及肺功能异常,此即急慢性肺损伤的特点^[11]。Adamson等(1984)发现,妊娠晚期大鼠随胎龄增加,上皮细胞增生降低,内皮细胞增生增加,Ⅱ型细胞向Ⅰ型细胞的分化是肺泡化增加,促进肺组织成熟的结构基础,分化过程与上皮细胞增生程度有关。Ki-67是一种核蛋白,在细胞周期中除G₀期外均有表达,在DNA修复中不表达,因此Ki-67单克隆抗体常作为细胞增生标志物。通过免疫组化染色我们发现,增生性细胞主要位于气道上皮,间质细胞增生程度很低,各组无显著差异;高氧组胎儿肺组织气道上皮细胞增生指数明显高于正常氧及高氧地塞米松组($P < 0.05$),这些现象说明,气道上皮细胞增生是胎儿肺泡发育的基础;高氧破坏上皮细胞,导致其异常增生,这些异常增生的细胞可能是肺泡Ⅱ型细胞的前体细胞,而增生性细胞数量增加可能是高氧损伤后上皮细胞修复、建立正常肺泡结构的重要过程,但这一过程可能同时导致肺泡成熟受抑,肺泡化降低,最终导致肺组织结构异常,进一步做上皮

细胞形态学分型,将会验证此推论;高氧地塞米松组上皮细胞增生指数接近正常氧组,却明显低于高氧组,推测地塞米松可能通过抑制高氧时气道上皮的异常增生,而维持肺结构及肺功能正常。

我们的研究证实,高氧时胎儿肺组织气道上皮细胞形态学改变与上皮细胞增生异常有关,增生指数越高,肺组织发育越不成熟,此为CLD时肺结构及功能异常的病理基础;地塞米松具有抑制高氧对胎儿肺组织的损伤作用。

[参 考 文 献]

- [1] Husain AN, Siddiqui NH, Stocker JT. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia [J]. Hum Pathol, 1998, 29(7):710-717.
- [2] Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MR, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia [J]. Am Rev Respir Dis, 1991, 143(2):391-400.
- [3] Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD? [J]. Acta Paediatr, 1997, 86(12):1277-1282.
- [4] 刘博,刘雪燕,李娟,王伟,魏克伦.持续高氧暴露降低新生小鼠肺组织血管内皮生长因子的表达[J].中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):447-450.
- [5] 刘伟,常立文,李文斌.早产大鼠高氧暴露下肺组织TNF- α , Caspase-3表达时相研究[J].中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):451-454.
- [6] 马丽亚,常立文,全裕凤.高浓度氧对早产鼠一氧化氮合酶表达的影响[J].中国当代儿科杂志, 2001, 3(3):232-235.
- [7] Pandya HC, Snetkov VA, Twort CH, Ward JP, Hirst SJ. Oxygen regulates mitogen-stimulated proliferation of fetal human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(6):L1220-1230.
- [8] Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant [J]. Pediatr Pulmonol, 2001, 32(1):76-91.
- [9] McCray PB Jr, Bettencourt JD, Bastacky J. Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid [J]. Am J Physiol, 1992, 262(3 Pt 1):L270-279.
- [10] Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development [J]. J Anat, 2002, 201(4):325-334.
- [11] Maniscalco WM, Watkins RH, O'Reilly MA, Shea CP. Increased epithelial cell proliferation in very premature baboons with chronic lung disease [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(5):L991-L1001.
- [12] Grier DG, Halliday HL. Corticosteroids in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia [J]. Semi Neonatol, 2003, 8(1):83-91.

(本文编辑:吉耕中)