

论著 · 实验研究

维甲酸下调结缔组织生长因子表达 减轻新生大鼠高氧肺损伤的研究

徐雅丽 陈贻骥 张亚维

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心,重庆 400014)

[摘要] 目的 探讨维甲酸(RA)对高氧肺损伤保护作用的机制。方法 90只Sprague-Dawley新生鼠随机平分为空气组、高氧组和高氧+RA组。高氧组、高氧+RA组置于85%氧浓度的氧箱中,高氧+RA组每日腹腔注射RA 500 μg/kg。分别于实验第4天、7天、14天行开胸术取新生鼠肺组织,苏木精-伊红染色光镜下行辐射状肺泡计数,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组化检测肺组织结缔组织生长因子(CTGF)表达。结果 与空气组相比,高氧组和高氧+RA组肺组织随氧暴露时间延长,出现炎性细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺泡数量减少,肺间隔增厚,其中高氧+RA组病理改变明显轻于高氧组;在第7天和第14天,高氧组和高氧+RA组肺组织CTGF的mRNA和蛋白表达比空气组增加($P<0.05$);且高氧+RA组中CTGF的mRNA和蛋白表达在第14d比高氧组减少($P<0.05$)。结论 高氧暴露下新生鼠肺组织CTGF表达增加,RA保护高氧肺损伤可能是通过下调CTGF表达。
[中国当代儿科杂志,2011,13(3):248-251]

[关键词] 维甲酸;高氧;肺损伤;结缔组织生长因子;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0248-04

Retinoic acid protects neonatal rats from hyperoxia-induced lung injury through down-regulating connective tissue growth factor

XU Ya-Li, CHEN Yi-Ji, ZHANG Ya-Wei. Neonatal Diagnosis and Treatment Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Chen Y-J, Email: chenyi55@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To explore the mechanism of retinoic acid (RA) protection against hyperoxia-induced lung injury. **Methods** Ninety Sprague-Dawley rats were randomly assigned into three groups ($n=30$ each): air control group (exposed to air) and hyperoxia groups (exposed to 85% oxygen) with and without RA treatment. The RA-treated hyperoxia group received an intraperitoneal injection of RA (500 μg/kg) daily. Lungs were removed by thoracotomy 4, 7 and 14 days after exposure. Radical alveolar counts (RAC) were observed by hematoxylin and eosin staining under a light microscope. The mRNA level of CTGF in lungs was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of CTGF protein in lungs was detected by immunohistochemistry. **Results** With the prolonged hyperoxia exposure, the lungs developed inflammatory cell infiltration, alveolar structure disorders, a decrease in the number of alveoli, and alveolar interstitial thickening in the hyperoxia groups with and without RA treatment. Pathological changes in the RA-treated hyperoxia group were less severe than the untreated hyperoxia group. The CTGF mRNA and protein expression were up-regulated in the hyperoxia groups with and without RA treatment 7 and 14 days after exposure compared with the air control group. Significantly decreased CTGF mRNA and protein expression were noted in the RA-treated hyperoxia group compared with the untreated hyperoxia group 14 days after exposure. **Conclusions** The expression of CTGF mRNA and protein increases in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury. RA may provide protections against the lung injury possibly through down-regulating CTGF expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):248-251]

Key words: Retinoic acid; Hyperoxia; Lung injury; Connective tissue growth factor; Neonatal rats

氧疗是新生儿疾病治疗的一个重要手段,长期反复吸入高浓度氧所致的急慢性肺损伤是导致支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 的重要原因。维甲酸 (retinoic acid, RA) 是维生素 A 在生物体内的重要活性物质,在动物肺的成熟以及肺损伤后的修复中起着关键作用。研究表明,补充

[收稿日期]2010-06-23;[修回日期]2010-10-23
[基金项目]重庆市卫生局科研项目(渝卫科教[2005]31-05-2-81)。
[作者简介]徐雅丽,女,硕士,医师。
[通信作者]陈贻骥,教授。

维生素 A 可以对高氧肺损伤起保护作用,降低 BPD 的发生率,然而其作用机制不明^[1]。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是 1991 年发现的即刻早期基因家族成员之一,它能促进细胞增殖、迁移、粘附并且促进血管生成^[2]。那么,RA 保护高氧肺损伤的机制是否与调控 CTGF 有关,目前尚不清楚。本研究通过研究高氧暴露下新生鼠肺组织 CTGF 表达的变化及 RA 对其表达的影响,探讨 RA 保护高氧肺损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要药物及试剂 RA 购于山东良福制药有限公司。CYS.1 数字测氧仪产自上海嘉定电子仪器厂。高纯度 RNA 快速提取试剂盒及 RT-PCR 反应试剂盒分别购于百泰克、南京凯基生物技术有限公司。兔抗大鼠 CTGF 抗体、SP 二抗试剂盒均购于北京博奥森生物制品有限公司。

1.1.2 实验动物及分组 由重庆医科大学动物实验中心提供的新生足月 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 90 只,体重 6.6 g 左右,随机分为 3 组:空气组、高氧组、高氧 + RA 组,每组 30 只。高氧组、高氧 + RA 组置于 85% 氧浓度的氧箱中,高氧 + RA 组每日腹腔注射 RA 500 μg/kg,空气组、高氧组每日注入等量生理盐水。自制塑料容器为氧箱,用测氧仪连续检测氧浓度,使氧箱中氧浓度维持在 85% 左右。箱内放入无水氯化钙和生石灰以吸收水分和二氧化碳。每 12 h 在 3 组间更换代母鼠 1 次,以避免母鼠氧中毒。分别于新生鼠实验第 4、7、14 天腹腔注射水合氯醛麻醉后行开胸术取肺组织。迅速取下右肺速冻于液氮中以供 RT-PCR 检测;完整取下左肺存于 4% 多聚甲醛中,24 h 后行二甲苯和乙醇逐级脱水,石蜡包埋,制成 5 μm 厚组织切片,行苏木精-伊红染色和免疫组化检测。

1.2 方法

1.2.1 辐射状肺泡计数(RAC) 光镜检查苏木精-伊红染色切片。RAC 指从呼吸性细支气管中心引垂直线至最近纤维隔,该直线上的肺泡数即为 RAC 值,反映了终末呼吸单位所含肺泡数目,是肺发育程度的检测指标。在 100 倍光镜视野下,每张切片 10 次计数,取平均值^[3]。

1.2.2 RT-PCR 方法检测肺组织 CTGF mRNA 表达 Trizol 一步法提取肺组织总 RNA,反转录后取逆转录产物 3 μL 为模板进 PCR 扩增。大鼠 CTGF

上游引物序列 5-CCGACTGGAAGACACATTTG-3,下游引物序列 5-CCAGCCTGCAGATATTG-3,产物 146 bp。内参照 β-actin 上游引物序列 5-CAC-CCGCGAGTACAACCTTC-3,下游引物序列 5-CCCATACCCACCATCACACC-3,产物 206 bp。PCR 反应条件 95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,循环 30 次。PCR 扩增产物在 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察结果并照相。使用 Quantity One 软件计算 CTGF 电泳条带密度值占 β-actin 密度百分比。

1.2.3 免疫组化方法检测肺 CTGF 蛋白表达 肺组织切片常规脱蜡至水。3% 过氧化氢(H₂O₂) 孵育 15 min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 5 min × 3 次,枸橼酸盐缓冲液微波修复 2 次,冷却到室温。加封闭血清(BSA)封闭 15 min,加入一抗 CTGF (1:100),4℃ 过夜,PBS 缓冲液冲洗。用生物素标记的二抗 37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次,加入辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)孵育 30 min,PBS 冲洗。DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。用 Image-pro plus 专业图像分析软件系统对 CTGF 蛋白的表达进行半定量分析,在 400 倍视野下,每张切片随机选取 5 个视野,测定阳性细胞的积分光密度(IOD)来代表 CTGF 的表达量。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 11.5 软件进行处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间采用 One-Way ANOVA 分析,两两比较采用 SNK(*q*)检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空气组和高氧 + RA 组中无新生鼠死亡,高氧组中有 2 只新生鼠分别于通氧后 11 d 和 14 d 时死亡;高氧组新生鼠随日龄增长体重增长缓慢,形体瘦小,活动减少,于实验第 14 天时测得体重明显低于空气组和高氧 + RA 组,差异有统计学意义,见表 1。

表 1 各组不同时间体重比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	鼠数	体重(g)		
		4 d	7 d	14 d
空气组	8	9.1 ± 0.6	12.6 ± 0.6	22.4 ± 1.2
高氧组	8	8.7 ± 0.7	11.9 ± 1.0	14.2 ± 1.3 ^a
高氧 + RA 组	8	9.0 ± 0.7	11.9 ± 0.7	18.6 ± 1.8 ^{a,b}

a:与空气组比较,*P* < 0.05;b:与高氧组比较,*P* < 0.05

2.2 肺组织病理改变及 RAC

实验第 4 天,空气组肺泡腔无炎性细胞和液体

渗出,高氧组、高氧 + RA 组肺内出现血管扩张充血,肺泡腔内可见少量红细胞及大量炎性细胞;实验第 7 天,空气组肺泡发育正常、分化良好,高氧组、高氧 + RA 组肺泡内仍可见炎性细胞,终末气腔扩张,肺间隔增厚,肺泡体积增大、数目减少;实验第 14 天,空气组肺泡数量增加,分化良好,高氧组肺泡体积增大、数量减少,肺间隔增厚明显,其内可见成纤维细胞及胶原样物质,而高氧 + RA 组的肺泡数量较高氧组多,肺间隔增厚不如高氧组明显。如表 2 所示,在实验第 4 天、7 天和 14 天,高氧组、高氧 + RA 组 RAC 值较空气组减少 ($P < 0.05$);实验第 7 天和 14 天,高氧 + RA 组 RAC 值较高氧组明显增加 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组不同时间 RAC 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RAC 值(个)		
		4 d	7 d	14 d
空气组	8	5.25 ± 0.12	7.02 ± 0.11	9.81 ± 0.34
高氧组	8	4.91 ± 0.31 ^a	6.01 ± 0.33 ^a	7.55 ± 0.21 ^a
高氧 + RA 组	8	4.99 ± 0.13 ^a	6.47 ± 0.27 ^{a,b}	8.79 ± 0.36 ^{a,b}

a:与空气组比较, $P < 0.05$;b:与高氧组比较, $P < 0.05$

2.3 RT-PCR 检测 CTGF mRNA 表达

在实验第 4 天时,CTGF mRNA 表达水平在 3 组间差异无统计学意义;在第 7 天和第 14 天时,高

氧组和高氧 + RA 组 CTGF mRNA 的表达明显高于空气组 ($P < 0.05$),且第 14 天时高氧 + RA 组 CTGF mRNA 的表达低于高氧组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 CTGF mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CTGF mRNA 表达相对丰度(%)		
		4 d	7 d	14 d
空气组	8	57 ± 13	59 ± 12	70 ± 12
高氧组	8	63 ± 15	70 ± 16 ^a	88 ± 10 ^a
高氧 + RA 组	8	59 ± 13	70 ± 16 ^a	72 ± 11 ^{a,b}

a:与空气组比较, $P < 0.05$; b:与高氧组比较, $P < 0.05$

2.4 肺组织 CTGF 蛋白表达

胞浆有棕黄色颗粒沉着即为阳性细胞(如图 2 中箭头所指)。在实验第 4 天,CTGF 在支气管、细支气管上皮细胞表达较多,血管内皮细胞及间隔中偶有表达;实验第 7 天,CTGF 在支气管上皮细胞、细支气管上皮细胞及血管内皮表达明显,另外在增厚的间隔中可见成梭状的成纤维细胞亦有表达;实验第 14 天,肺间隔 CTGF 蛋白表达显著。

实验第 4 天,CTGF 蛋白的表达在 3 组间差异无统计学意义;实验第 7 天和第 14 天,高氧组和高氧 + RA 组 CTGF 蛋白表达较空气组增加 ($P < 0.05$);实验第 14 天高氧 + RA 组 CTGF 表达较高氧组减少 ($P < 0.05$),见图 1,表 4。

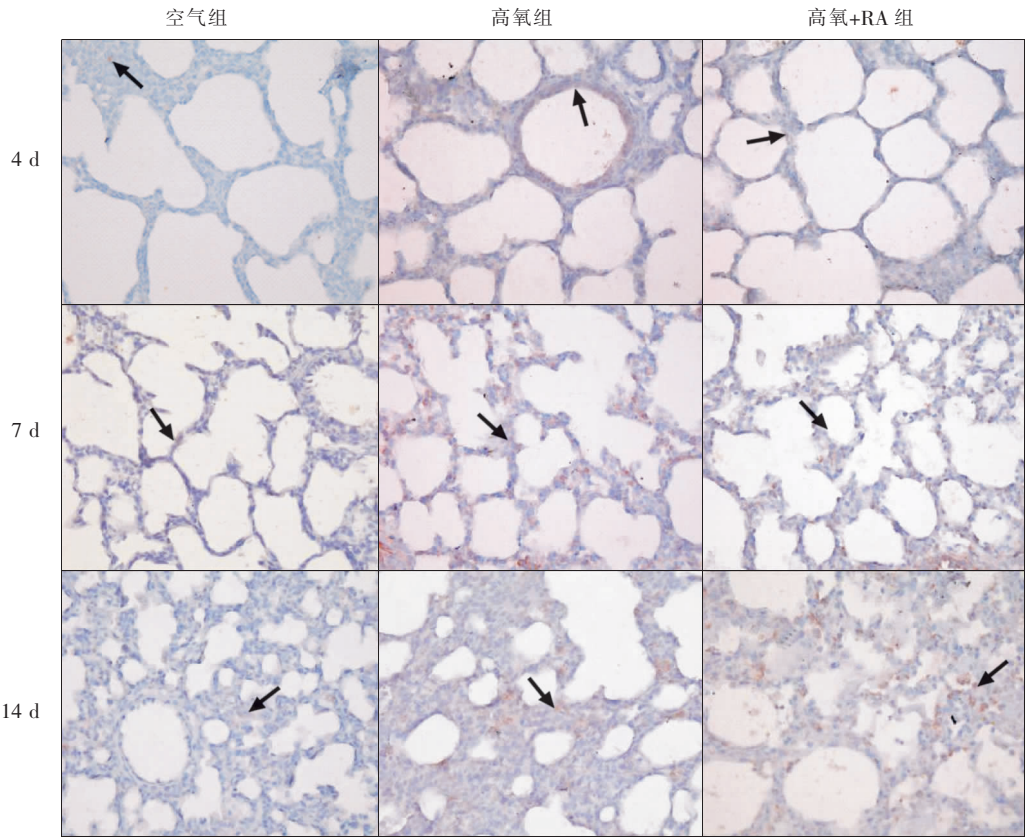


图 1 肺组织 CTGF 蛋白的表达(S-P 法,×400) 空气组中 CTGF 表达微弱,实验后 7 d 和 14 d 高氧组和高氧 + RA 组 CTGF 表达较空气组明显增加;实验后 14 d 高氧 + RA 组 CTGF 表达较高氧组明显减少。箭头所指为阳性表达细胞。

表4 各组 CTGF 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CTGF (IOD)		
		4 d	7 d	14 d
空气组	8	5786 ± 773	7237 ± 1021	11136 ± 2045
高氧组	8	6156 ± 825	31941 ± 5712 ^a	51835 ± 8225 ^a
高氧 + RA 组	8	5894 ± 757	22146 ± 4721 ^a	33563 ± 7443 ^{a,b}

a: 与空气组比较, $P < 0.05$; b: 与高氧组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年来,BPD 的发病率呈逐年上升的趋势。各国学者针对 BPD 的防治措施进行了诸多研究,目前,糖皮质激素、表面活性物质和维生素 A 等的治疗作用已得到证实^[4]。RA 是维生素 A 在生物体内的活性形式,本研究采用高氧肺损伤模型,并用 RA 进行干预,实验结果发现高氧组、高氧 + RA 组中的大鼠随通氧时间延长表现为体重增长缓慢,活动减少,苏木精-伊红染色见肺泡腔红细胞和液体渗出,炎性细胞浸润,继而出现肺泡体积增大,数量减少,肺间隔增厚。这些符合 BPD 的病理改变^[5]。RAC 是衡量肺发育的指标,随着体积大、数量少的囊泡向体积小、数量多的肺泡转化时,RAC 值随之增大。本研究发现,高氧组、高氧 + RA 组 RAC 比空气组明显减少,提示高氧抑制肺泡形成;而高氧 + RA 组在实验第 7 天、第 14 天时 RAC 值比高氧组大,证实 RA 可部分逆转高氧导致的肺发育受阻。

尽管维生素 A 对高氧肺损伤有保护作用这点得到各国学者的共识,然而其作用机制并未明确。早期研究发现 RA 可以通过诱导细胞分化以此拮抗地塞米松导致的肺泡化障碍^[6];另外,RA 调节丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性状态,降低肺泡 II 型细胞凋亡也是其重要机制之一^[7];而最新研究发现 RA 可影响血管生成因子 A(VEGFA)基因的表达及升高肺中维生素 A 酯的浓度来减轻高氧肺损伤^[8-9]。除以上外,RA 保护高氧肺损伤还体现在另一重要方面,即其对细胞外基质(ECM)含量的影响。高氧暴露后,肺组织的损伤、修复过程分为 3 个阶段:炎性反应阶段、肉芽组织形成、细胞外基质的重建。众多细胞因子参与了 ECM 重建的过程,如胰岛素生长因子-1,-2(IGF-1, IGF-2);基质金属蛋白酶(MMPs)及金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs);转化生长因子-β1(TGF-β1)等,RA 通过影响这些因子表达调控 ECM 含量,从而减轻高氧肺损伤后肺纤维化的程度。

CTGF 是一种富含半胱氨酸的多肽,由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞合成与分泌,可诱导成纤维细胞增殖和分泌 ECM^[2]。尽管 CTGF 作用的

信号通路并未完全明确,然而近年来许多研究发现 CTGF 作为 TGF-β1 的下游因子,TGF-β1 的致纤维化作用可能与 CTGF 密切相关。而 RA 降低高氧肺损伤时 TGF-β1 的表达也可能与其下调 CTGF 有关。本研究发现空气组 CTGF 表达微弱,而高氧组较空气组表达明显增加,且随着通氧时间延长,高氧组 CTGF 表达明显增多,这与文献报道一致^[10]。另外,CTGF 的表达部位从最初集中在支气管、细支气管上皮细胞逐渐转为集中在间质的成纤维细胞中表达,这也提示 CTGF 在高氧肺损伤中起促进细胞外基质合成和诱导纤维化发生的作用。随着 RA 使用时间延长,高氧 + RA 组 CTGF 表达在 14 d 时明显低于高氧组,且 RAC 值也大于高氧组,表明 RA 可能通过降低高氧肺损伤 CTGF 的表达,从而部分逆转肺纤维化,有利于肺发育。

综上所述,在高氧状态下,新生鼠肺 CTGF 表达呈时间依赖性增加,RA 能明显下调高氧所诱导的 CTGF 表达,从而部分逆转高氧肺损伤的进程,为临床上应用 RA 治疗高氧肺损伤提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Darlow BA, Graham PJ. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short and long-term morbidity in very low birthweight infants [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, 17(4): CD000501.

[2] Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor; new targets for antifibrotic therapy? [J]. Matrix Biol, 2002, 21(6): 473-482.

[3] Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(3): L600-L607.

[4] Tin W, Wiswell TE. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia; debunking the Myths[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(6): 383-390.

[5] Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2006, 91(2): 132-135.

[6] Veness-Meehan KA, Bottone FG Jr, Stiles AD. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats[J]. Pediatr Res, 2000, 48(4): 434-444.

[7] 李文斌,常立文,容志惠,张谦慎,王华,汪鸿,等. 维甲酸通过调控 MAPK 途径减轻早产大鼠高氧肺损伤[J]. 基础医学及临床,2006,26(2):143-147.

[8] Zimová-Herknerová M, Myslivecek J, Potmesil P. Retinoic acid attenuates the mild hyperoxic lung injury in newborn mice[J]. Physiol Res, 2008, 57(1): 33-40.

[9] Jame ML, Ross AC, Bulger A, Philips JB, Ambalavanan N. Vitamin A and retinoic acid act synergistically to increase lung retinyl esters during normoxia and reduce hyperoxia lung injury in newborn mice[J]. Pediatr Res, 2010, 6(6): 591-597.

[10] 潘丽,富建华,薛辛东. 结缔组织生长因子在高氧致早产鼠慢性肺疾病中的表达及其作用[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(5):417-420.

(本文编辑:王 霞)