

论著·实验研究

汉防己甲素对先天性膈疝大鼠的保护作用

吉毅¹ 刘文英¹ 陈思源^{1,2} 王学军¹ 杨纲¹ 徐冰¹ 曹李明¹

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院儿童医学中心小儿外科, 四川 成都 610072;

2. 复旦大学附属儿科医院儿科研究所, 上海 201102)

[摘要] **目的** 探讨汉防己甲素(TET)产前干预对先天性膈疝(CDH)大鼠的保护作用及机制。**方法** 将妊娠 Sprague-Dawley 大鼠随机分为对照组、除草醚组与 TET 治疗组。后两组孕 9.5 d 时采用除草醚灌胃法建立 CDH 大鼠模型;治疗组自孕 18.5 d 起给予 TET 灌胃(每日 30 mg/kg,连续 3 d);21 d 对部分孕鼠行剖腹并抽取羊水,观察胎鼠膈疝形成情况。采用 ELISA 法、免疫组化染色法检测羊水和胎肺中 TNF- α 的表达情况。余孕鼠自然分娩,观察各组仔鼠出生后情况。**结果** 除草醚组胎鼠无论有无膈疝形成均存在肺发育不良,肺及羊水中 TNF- α 的表达均明显升高;TET 治疗组胎鼠巨大膈疝的发生率低于除草醚组,肺与羊水中 TNF- α 的含量明显较除草醚组少($P < 0.01$)。在自然分娩的仔鼠中,TET 治疗组仔鼠的 24 h 存活率明显高于除草醚组($P < 0.01$)。**结论** 产前应用 TET 能降低 CDH 大鼠模型胎肺与羊水中 TNF- α 的含量,改善因除草醚诱导的胎鼠肺发育不良,减少巨大膈疝的发生,提高仔鼠的存活率。
[中国当代儿科杂志,2011,13(5):401-405]

[关键词] 先天性膈疝; 汉防己甲素; 产前干预; 肺发育不良; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0401-05

Protective effects of tetrandrine against congenital diaphragmatic hernia in rats

Ji Yi, Liu Wen-Ying, Chen Si-Yuan, Wang Xue-Jun, Yang Gang, Xu Bing, Cao Li-Ming. Department of Pediatric Surgery & Center of Children Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China (Liu W-Y, Email: wenyinl@126.com)

Abstract: Objective To study the protective effect of the prenatal use of tetrandrine (TET) against congenital diaphragmatic hernia (CDH) in rats and possible mechanisms. **Methods** Pregnant female Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: control, nitrofen and TET treatment. The later two groups were administered with nitrofen by gavage on day 9.5 of gestation. On day 18.5 of gestation, TET (30 mg/kg) was given by gavage (once a day, for three days) in the TET treatment group. On day 21 of gestation, parts of pregnant rats were delivered by cesarean section and amniotic fluid was collected. The fetal rats were examined for a diaphragmatic hernia. Lung histologic evaluations with microscope and immunohistochemistry staining of TNF- α were performed. TNF- α in amniotic fluid was detected using ELISA. The remaining pregnant rats were allowed to deliver spontaneously at term. The survival of pup rats was observed until 24 hrs of age. **Results** In the nitrofen group, significant lung hypoplasia was presented not only in fetuses with CDH but also in those without CDH. Stronger expression of TNF- α was observed in fetal lungs and amniotic fluid in the nitrofen group, even when CDH was absent. The TET treatment group showed improved lung development compared with the nitrofen group. The incidence of large diaphragmatic hernia in the TET treatment group was lower than that in the nitrofen group ($P < 0.05$), and the expression of TNF- α in fetal lungs and amniotic fluid in the TET treatment group was also lower than in the nitrofen group ($P < 0.01$). The 24-hr survival rate of pup rats in the TET group was higher than that in the nitrofen group ($P < 0.01$). **Conclusions** Prenatal use of TET can improve nitrofen-induced pulmonary hypoplasia, decrease the incidence of large diaphragmatic hernia and increase the survival rate of pup rats, possibly through a reduction in the production of TNF- α in fetal lungs and amniotic fluid in rats with CDH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):401-405]

Key words: Congenital diaphragmatic hernia; Tetrandrine; Prenatal therapy; Pulmonary hypoplasia; Rats

[收稿日期]2010-09-08;[修回日期]2010-12-13

[作者简介]吉毅,男,博士研究生。

[通信作者]刘文英,教授。

先天性膈疝 (congenital diaphragmatic hernia, CDH) 是由于单侧或双侧膈肌发育缺损, 导致腹腔内脏器疝入胸腔的一种先天性疾病, 其发病率约为 1/2000 ~ 2500^[1]。CDH 的病因及分子生物学机制尚未明了, 目前仍无有效的治疗手段从根本上改变其合并的肺发育不良。临床上, 尽管对 CDH 患儿进行了积极的对症支持及相应的外科手术治疗, 但重症病例的死亡率仍达 50% ~ 60%, 而双侧 CDH 患儿的死亡率高达 100%^[2]。新近研究证实, 产前给与汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 灌胃, 能显著地改善因除草醚导致的胎鼠肺发育不良与肺动脉高压, 促进 CDH 胎肺的分化与成熟, 其途径可能为调节胎肺中一些生长因子的水平^[3-4]。但大量的临床研究却发现, 生长因子水平的异常并不是 CDH 胎肺发育异常唯一的病因学因素, 也不是关系患儿预后的决定性因素^[5-7]。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α) 是由激活的单核/巨噬细胞等产生的一种可溶性多功能细胞因子, 异常表达的 TNF- α 可介导胎肺肺泡上皮细胞凋亡和坏死, 使肺泡上皮细胞不断坏死、脱落、再生^[8]。同时, TNF- α 能刺激胎肺肺内成纤维细胞增殖, 促进胶原生成, 并隔离人 II 型肺泡细胞, 抑制肺表面活性物质生成^[9]。存在呼吸功能异常的早产儿与支气管肺发育不良的患儿, 羊水与气道分泌物中 TNF- α 水平的异常增高常常提示预后不良^[10-11]。本研究拟通过除草醚诱导的 CDH 大鼠模型, 以 TET 为干预措施, 观察胎肺及羊水中 TNF- α 的变化, 进一步探讨产前给予 TET 对 CDH 胎鼠的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及设备

除草醚由浙江化工二厂生产提供; TET 购自陕西惠科植物开发有限公司。免疫组化一抗为兔抗鼠 TNF- α 抗体 (美国 Dako Cytomation 公司); 二抗为山羊抗兔 IgG 抗体, 酶底物显色剂购自武汉博士德生物工程公司。大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。电子天平由四川省医学科学院/四川省人民医院动物实验中心提供; Olympus 光学显微镜 (Olympus BX51)、图像采集系统 (DP Manager) 和 Image-Pro Plus V5.1 专业图像分析软件由四川省医学科学院/四川省人民医院细胞移植中心提供。

1.2 动物模型的建立和分组

Sprague-Dawley (SD) 大鼠由四川省医学科学院/四川省人民医院实验动物研究所提供, 雌鼠 34

只, 雄鼠 17 只, 雌雄鼠按照 2:1 分笼, 进行定时配种, 12 h 后取雌鼠阴道分泌物于显微镜下观察, 以镜下看到精子为怀孕 0.5 d。孕 9.5 d 时将孕鼠随机分为对照组 (10 只)、除草醚组 (12 只) 及 TET 治疗组 (治疗组, 12 只), 采用除草醚灌胃法^[3]建立 CDH 大鼠模型, 即: 除草醚组与治疗组灌胃给予除草醚 (100 mg/只, 溶于 2.5 mL 橄榄油中), 对照组灌胃给予等量橄榄油。孕 18.5 d, 治疗组给予 TET 灌胃 (每日 30 mg/kg, 1 次/日, 连续 3 d), 对照组和除草醚组给予等量生理盐水。再根据胎鼠有无膈疝形成, 将除草醚组中形成膈疝的胎鼠划分为膈疝组, 无膈疝的胎鼠为无膈疝组; 将治疗组中形成膈疝的胎鼠划分为膈疝治疗组, 无膈疝的为无膈疝治疗组。

1.3 羊水与肺组织标本的采集及膈疝的确定

雌鼠妊娠达到第 21 天, 随机选取对照组 4 只、除草醚组及治疗组各 6 只, 用戊巴比妥钠 0.03 mg/g 对其行腹腔注射麻醉剖宫取胎鼠。剖宫取出胎鼠前, 按胎鼠于宫内排列顺序, 用 1.0 mL 注射器收集每个羊膜囊内羊水各 0.5 mL 置于 -20℃ 冷藏。取出胎鼠称重后立即断头处死, 经胸骨正中切口剖开胸腔, 剪除两侧肋软骨至脊柱, 完整取出两侧肺组织, 注意尽量避免损伤其他组织器官。将取出的肺从支气管分叉处分开左右两肺, 称重后即刻置于体积分数为 10% 的中性福尔马林中固定。将去除肺组织的胚胎放在放大镜 (4 倍) 下, 观察记录胎鼠有无膈疝、膈疝的位置、疝孔的大小 (膈肌缺损大于 50% 为巨大膈疝) 及疝内容物。

1.4 羊水中 TNF- α 含量的测定

采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定各组大鼠羊水中 TNF- α 的含量, 其操作方法按照试剂盒说明进行。

1.5 肺组织病理形态学和免疫组织化学检查

将固定在 10% 中性福尔马林中的肺组织于 24 h 内作石蜡包埋。苏木精-伊红染色观察肺组织发育情况; 应用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件测定每个视野肺组织灰度值百分比, 反映肺泡与肺泡腔面积的百分比——肺泡面积比 (PAA%)。免疫组织化学染色采用 LsAB 法 (SP 法), 以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 代替一抗作为空白对照。1:100 anti-TNF- α 为兔抗鼠单克隆抗体, 细胞膜和胞浆中出现棕黄色染色为阳性。观察 TNF- α 在各组胎肺中的分布及测定其表达强度: 采用 Olympus 图像采集仪, 在 400 倍视野下, 采取 2 个不重叠的视野采集肺组织图像, 计算阳性染色颗粒在同一视野中的总积分光密度值 (IOD)。

1.6 新生仔鼠一般情况的观察

每组各6只孕鼠任其自然分娩,比较各组孕鼠的妊娠时限、产仔数及死胎的数目;将仔鼠进行称重,比较各组仔鼠出生体重的差异。观察仔鼠生后24 h内情况,比较各组仔鼠24 h存活率。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析;计数资料用百分数表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胎鼠膈疝发生情况

21 d时,对照组4只孕鼠剖宫产出胎仔47只,均无膈疝形成。其他2组12只孕鼠,共生产胎仔143只,其中,除草醚组69只,治疗组74只,有膈疝形成者97只,致畸率67.8%。膈疝发生于左侧者86只,占膈疝总数的89%;形成巨大膈疝者33只,占左侧膈疝总数的38%,疝内容物主要为胃、小肠,

其次是肝。膈疝发生于右侧者11只,无巨大膈疝形成。除草醚组与治疗组中胎鼠形成膈疝分别为47只(68.1%)和50只(67.6%),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.005, P = 0.944$);其中,形成巨大膈疝的胎仔数分别为21只(44.7%)与12只(24.0%),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.616, P = 0.032$)。

2.2 形态学检测与免疫组织化学结果

光镜下观察,对照组肺组织发育良好,肺泡结构明显,肺泡大而多,肺泡间隔薄而均匀,呼吸性支气管末端呈囊泡状;除草醚组中,无论有无膈疝形成,肺组织发育均差,细胞密度大,肺泡少而小,肺泡间隔厚,肺泡、肺泡管及肺泡囊呈假腺体样改变,有明显肺发育不良的表现;治疗组肺组织发育好于除草醚组,肺泡面积大,肺泡隔变薄,肺内见较多囊泡状呼吸性细支气管,形态特点接近正常肺组织。

对照组胎肺中,肺巨噬细胞及支气管上皮细胞内有少量的TNF- α 表达;除草醚组中无论有无膈疝形成,均可见肺巨噬细胞、支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及肺间质内大量棕黄色TNF- α 表达,治疗组中TNF- α 表达降低,接近于对照组。见表1,图1。

表1 各组胎鼠生物学情况及胎肺中TNF- α 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	肺重(mg)	肺重/体重比(mg/g)	肺泡面积比(%)	胎肺TNF- α (IOD值 $\times 10^3$)
对照组	47	5.18 $\pm$ 0.29	179 $\pm$ 13	35 $\pm$ 5	60 $\pm$ 8	10.4 $\pm$ 0.4
膈疝组	47	4.41 $\pm$ 0.33 ^a	114 $\pm$ 8 ^a	26 $\pm$ 5 ^a	38 $\pm$ 6 ^a	54.5 $\pm$ 5.7 ^a
无膈疝组	22	4.36 $\pm$ 0.41 ^a	108 $\pm$ 9 ^a	25 $\pm$ 5 ^a	42 $\pm$ 5 ^a	49.8 $\pm$ 6.3 ^a
膈疝治疗组	50	4.33 $\pm$ 0.35	130 $\pm$ 10 ^b	30 $\pm$ 4 ^b	52 $\pm$ 8 ^b	30.7 $\pm$ 4.9 ^b
无膈疝治疗组	24	4.49 $\pm$ 0.48	138 $\pm$ 10 ^c	30 $\pm$ 5 ^c	54 $\pm$ 7 ^c	32.8 $\pm$ 5.3 ^c
F值		16.544	98.617	19.975	59.148	147.283
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与膈疝组比较, $P < 0.05$; c:与无膈疝组比较, $P < 0.05$

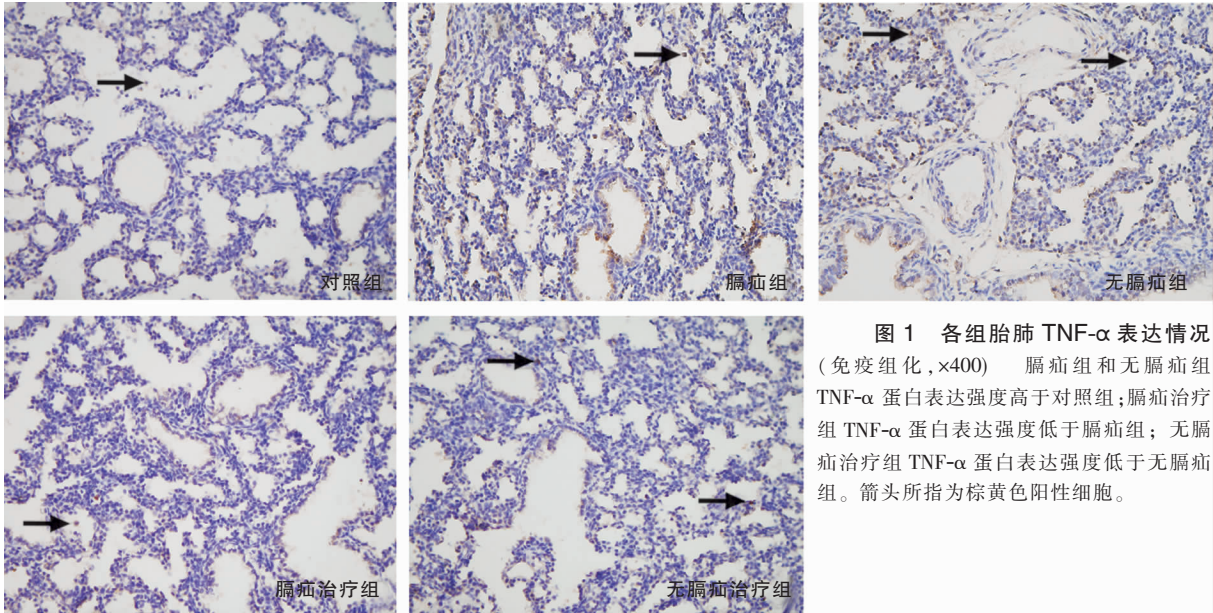


图1 各组胎肺TNF- α 表达情况(免疫组化, $\times 400$) 膈疝组和无膈疝组TNF- α 蛋白表达强度高于对照组;膈疝治疗组TNF- α 蛋白表达强度低于膈疝组;无膈疝治疗组TNF- α 蛋白表达强度低于无膈疝组。箭头所指为棕黄色阳性细胞。

2.3 ELISA 检测结果

图2显示各组羊水中TNF- α 的含量。5组间羊水中TNF- α 的含量差异有统计学意义($F=57.349$, $P<0.01$)。给予除草醚灌胃的孕鼠,其胎鼠无论有无膈疝形成,羊水中TNF- α 的含量显著升高($P<0.01$);治疗组孕鼠羊水中TNF- α 的含量较除草醚组明显降低($P<0.01$),但仍高于对照组($P<0.01$)。

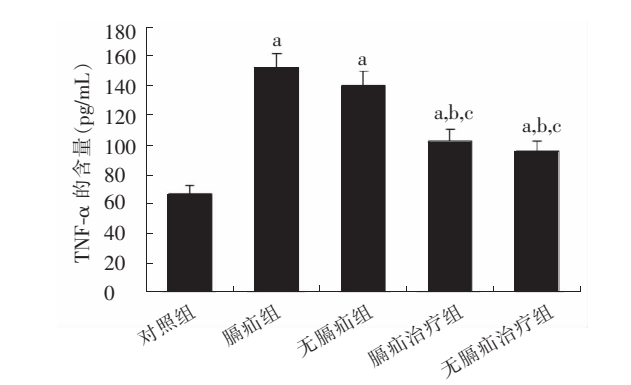


图2 各组胎鼠羊水中TNF- α 含量比较 a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与膈疝组比较, $P<0.01$;c:与无膈疝组比较, $P<0.01$

2.4 TET 对仔鼠生存情况的影响

3组18只孕鼠均于妊娠22d自然分娩,未见有早产现象。除草醚组与治疗组新生仔鼠体重分别为 5.0 ± 0.5 及 5.2 ± 0.6 g,低于对照组的 6.0 ± 0.6 g,差异具有统计学意义($F=13.92$, $P<0.01$)。除草醚组总体死胎率达到54%,仔鼠24h存活率为 $(24\pm7)\%$,显著低于对照组的 $(96\pm4)\%$;治疗组仔鼠24h存活率为 $(39\pm6)\%$,较除草醚组提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图3。

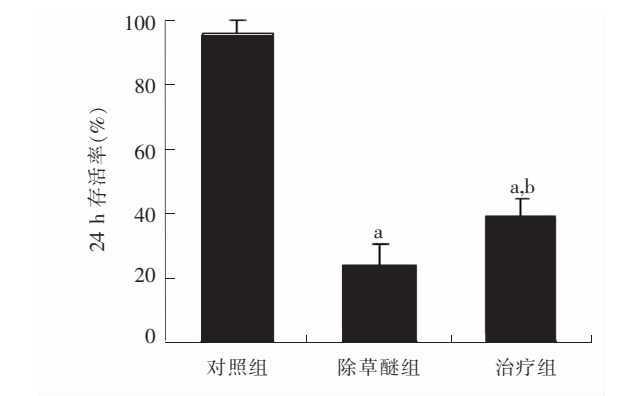


图3 各组鼠仔24h存活情况比较 a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与除草醚组比较, $P<0.01$

3 讨论

部分学者认为,除草醚有强氧化作用,能引起细

胞内氧化应激,从而干扰胎儿体内物质代谢过程而导致CDH和肺发育不良,因而用维生素A、C、E等抗氧化剂也能治疗CDH^[12-13]。但有研究显示,在给予除草醚灌胃的同时予以孕鼠维生素类药物,虽能降低膈疝的发生率,却并不能改善胎肺的发育与功能^[14];且大量的临床实践与实验研究已证实,糖皮质激素等药物能显著促进CDH胎肺的分化与成熟,其机制却并不是基于抗氧化作用^[15]。

TET是一种从防己科植物粉防己根中提取的双苄基异喹啉类生物碱,是粉防己的主要有效成分。具有调节血管舒缩、抗纤维化、清除自由基、减轻自由基所致的损伤等功能^[16]。此外,TET还能抑制多种炎性细胞的活化,减少包括TNF- α 在内的多种细胞因子的产生,改善因TNF- α 增多引起呼吸功能损伤的大鼠的预后^[17]。因TET毒副作用较小,临床上已用于治疗肝纤维化、缺氧性肺动脉高压及矽肺等^[18]。Lin等^[3]发现TET能显著地改善因除草醚导致的胎鼠肺发育不良与肺动脉高压。本课题组前期研究也发现,TET能促进胎肺内SP-B的合成,促进CDH胎肺的分化与成熟,其机制可能是通过维持细胞内环境稳定来实现^[3,19]。

在胎鼠膈肌闭合(妊娠16.5d)后给予孕鼠药物干预已不能逆转胎鼠存在的膈肌缺损^[12]。本研究显示,除草醚导致的胎鼠肺发育不良并不依赖于膈肌缺损的发生,肺发育不良可单独存在,这与文献报道一致^[6]。而无论胎鼠有无膈疝,TET均能显著提高肺重/体重比,降低胎鼠的肺泡间隔厚度,增加肺泡面积比,促进肺泡发育。但与妊娠较早时期(9.5~11d)给予维生素A或E干预不同,妊娠中晚期给予TET灌胃虽然不能降低膈疝的发生率,却能在促进肺发育的同时显著降低巨大膈疝的发生率,说明肺的发育与膈肌的缺损存在着重要的联系,膈肌缺损可能是并发甚至继发于肺发育不良^[20]。

正常情况下,TNF- α 在羊水与胎肺中含量较低,当TNF- α 过度表达时对肺组织的发育具有抑制作用。其不仅能促进肺内胶原生成,导致肺泡间隔及血管壁增厚,还能抑制SP-A及SP-B等肺内活性物质的生成^[9]。已经证实,TNF- α 参与新生儿呼吸窘迫综合症、支气管肺发育不良及肺纤维化等多种肺部疾病的病理过程^[11]。而在CDH胎鼠肺组织中,TNF- α 表达也增多,提示其可能与CDH的形成有关。此外,研究发现即使极低量的除草醚摄入也可引起TNF- α 等因子参与的变应性反应,从而导致生长发育异常^[21]。本研究发现妊娠9.5d时予以除草醚灌胃,膈疝组与无膈疝组胎鼠羊水与胎肺

中的 TNF- α 含量均显著增高,这说明 TNF- α 在肺内表达的增多主要是由于外源性除草醚刺激直接导致的,并非由膈肌的缺损引起的。而在膈肌闭合以后给予 TET 干预,无论胎鼠是否有膈疝形成,其羊水及胎肺中 TNF- α 蛋白表达均下降,表明 TET 对 TNF- α 表达的影响不是基于对膈肌发育的影响。TET 之所以能起到改善肺发育的作用,主要原因在于 TET 能调节 CDH 肺发育过程中 TNF- α 等因子的表达水平,这说明 TNF- α 可能是导致 CDH 肺发育不良的重要因子之一。

本研究同时还发现在妊娠中晚期给予 TET 干预,能提高仔鼠的 24 h 存活率,与文献中报道的维生素类药物有相似的作用,但 TET 作用的机制可能为改善胎肺的发育与功能,而不是降低膈疝的发生率。此外,由于异常增多的 TNF- α 能导致肺内的促炎症反应并引起毛细血管漏等损伤,减低肺的正常功能^[22];合并肺功能异常的早产儿与支气管肺发育不良的患儿,降低其羊水及气道分泌物中异常增高的 TNF- α 等炎性因子的含量,患儿的远期存活率可得到显著提高。

本研究证实产前给予 TET 干预除草醚诱导的 CDH 大鼠模型,能降低巨大膈疝的发生率,在促进肺发育与成熟的同时提高仔鼠的存活率。抑制胎肺与羊水中 TNF- α 异常的表达,可能是 TET 作用的机制之一。

〔参 考 文 献〕

[1] Stege G, Fenton A, Jaffray B. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia [J]. *Pediatrics*, 2004, 113(4): 917.

[2] Brownlee EM, Howatson AG, Davis CF, Sabharwal AJ. The hidden mortality of congenital diaphragmatic hernia: a 20-year review [J]. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(2): 317-320.

[3] Lin H, Wang Y, Xiong Z, Tang Y, Liu W. Effect of antenatal tetrandrine administration on endothelin-1 and epidermal growth factor levels in the lungs of rats with experimental diaphragmatic hernia[J]. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(10): 1644-1651.

[4] Xu C, Liu W, Chen Z, Wang Y, Xiong Z, Ji Y. Effect of prenatal tetrandrine administration on transforming growth factor-beta 1 level in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model[J]. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(8): 1611-1620.

[5] Harrison MR, Keller RL, Hawgood SB, Kitterman JA, Sandberg PL, Farmer DL, et al. A randomized trial of fetal endoscopic tracheal occlusion for severe fetal congenital diaphragmatic hernia [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(20): 1916-1924.

[6] Boucherat O, Benachi A, Chailley-Heu B, Franco-Montoya ML, Elie C, Martinovic J, et al. Surfactant maturation is not delayed in human fetuses with diaphragmatic hernia [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(7): e237.

[7] Clugston RD, Zhang W, Greer JJ. Gene expression in the developing diaphragm: significance for congenital diaphragmatic hernia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(4): L665-L675.

[8] Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families[J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(26): 1717-1725.

[9] Väyrynen O, Glumoff V, Hallman M. Regulation of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(4): L803-L810.

[10] Gitto E, Reiter RJ, Sabatino G, Buonocore G, Romeo C, Gitto P, et al. Correlation among cytokines, bronchopulmonary dysplasia and modality of ventilation in preterm newborns: improvement with melatonin treatment[J]. *J Pineal Res*, 2005, 39(3): 287-293.

[11] Mahieu LM, De Dooy JJ, Ieven MM, Bridts CH, Stevens WJ. Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and decreased levels of interleukin-12 p70 in tracheal aspirates, within 2 hrs after birth, are associated with mortality among ventilated preterm infants[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2005, 6(6): 682-689.

[12] Montedonico S, Sugimoto K, Felle P, Bannigan J, Puri P. Prenatal treatment with retinoic acid promotes pulmonary alveologenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia[J]. *J Pediatr Surg*, 2008, 43(3): 500-507.

[13] Stinchcombe SV, Maden M. Retinoic acid induced alveolar regeneration: critical differences in strain sensitivity[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(2): 185-191.

[14] Thébaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, et al. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(2 Pt 1): L423-L429.

[15] Lally KP, Bagolan P, Hosie S, Lally PA, Stewart M, Cotton CM, et al. Corticosteroids for fetuses with congenital diaphragmatic hernia: can we show benefit? [J]. *J Pediatr Surg*, 2006, 41(4): 668-674.

[16] Xie QM, Tang HF, Chen JQ, Bian RL. Pharmacological actions of tetrandrine in inflammatory pulmonary diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(12): 1107-1113.

[17] Lin TY, Tseng SH, Li SJ, Chen JC, Shieh JS, Chen Y. Tetrandrine increased the survival rate of mice with lipopolysaccharide-induced endotoxemia[J]. *J Trauma*, 2009, 66(2): 411-417.

[18] Oh SH, Lee BH. Induction of apoptosis in human hepatoblastoma cells by tetrandrine via caspase-dependent Bid cleavage and cytochrome c release[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(5): 725-731.

[19] 吉毅, 刘文英, 徐畅, 王元祥, 覃道锐, 罗森. 汉防己甲素对先天性膈疝大鼠模型胎仔肺发育不良的影响及意义[J]. *中华小儿外科杂志*, 2010, 31(2): 123-127.

[20] Beckman DL, Cummings JJ, Katwa LC, Whitehurst ME. Can maternal vitamin e supplementation prevent lung hypoplasia in the nitrofen-induced rat model of congenital diaphragmatic hernia? [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(3): 392-395.

[21] Teshima R, Nakamura R, Nakajima O, Hachisuka, Sawada J. Effect of two nitrogenous diphenyl ether pesticides on mast cell activation[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 150(3): 277-283.

[22] 蔡栩栩, 吴文斌, 杜悦, 刘春峰, 张红, 卢岩, 等. TNF2 α 和 IkB α 在内毒素致新生大鼠肺出血中的作用研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5(4): 301-305.

(本文编辑:王 霞)