

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.01.018

论著·实验研究

糖皮质激素对高氧诱导新生大鼠肺组织 RAGE-NF- κ B 通路的影响

胡剑 俞敏 唐云 田兆方

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] **目的** 探讨 RAGE-NF- κ B 信号通路在新生大鼠高氧肺损伤过程中的变化, 以及糖皮质激素对其的影响。**方法** 24 只新生大鼠随机分为空气对照组、高氧模型组和激素干预组。模型组新生大鼠于生后即暴露于 95% 氧气浓度环境中 1 周, 空气对照组大鼠生后仅暴露于同室内空气饲养 7 d, 激素干预组于造模后行尾静脉注射地塞米松 (1 mg/kg), 隔天 1 次, 共 3 次。日龄 13 d 时处死全部大鼠, RT-PCR 检测各组肺组织 RAGE mRNA 及 NF- κ B mRNA 的表达; Western blot 检测 RAGE 及 NF- κ B 蛋白水平; ELISA 法检测血清及肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF- α 和 sRAGE 含量; 苏木精-伊红染色后行肺组织病理学评估。**结果** 与对照组和激素干预组相比, 高氧模型组肺组织 RAGE、NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显增高 (均 $P < 0.05$), 血清中 sRAGE 含量明显升高 ($P < 0.01$), BALF 中 sRAGE 含量下降 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 激素干预组肺组织 RAGE、NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 血清中 sRAGE 含量明显升高 ($P < 0.05$), 而 BALF 中 sRAGE 含量明显下降 ($P < 0.05$)。**结论** RAGE-NF- κ B 通路在高氧诱导的新生大鼠肺损伤中活化增强, 糖皮质激素可能通过下调 RAGE-NF- κ B 信号通路对高氧肺损伤发挥保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 81-85]

[关键词] 糖皮质激素; 晚期糖基化终末产物受体; 肺损伤; 新生大鼠

Effects of glucocorticoid on RAGE-NF- κ B pathway in hyperoxia-induced lung tissues of neonatal rats

HU Jian, YU Min, TANG Yun, TIAN Zhao-Fang. Department of Neonatology, Huai'an First Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China (Tian Z-F, Email: lyh0729@163.com)

Abstract: Objective To explore the change of RAGE-NF- κ B signaling pathway during the course of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats, and the effect of glucocorticoid on this pathway. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley neonatal rats were randomly divided into three groups ($n=8$ each): sham control (control group), hyperoxia-induced acute lung injury (model group) and glucocorticoid-treated acute lung injury (glucocorticoid group). Rats were sacrificed at 13 days after birth. RAGE and NF- κ B expression levels in lung tissues were detected by reverse transcription polymerase chain reaction, Western blot and immunohistochemistry analysis. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and sRAGE in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were measured using ELISA. Lung damage was evaluated by histological examinations. **Results** RAGE and NF- κ B mRNA and protein expression levels in lung tissues were significantly increased in the model and glucocorticoid groups compared with the control group ($P < 0.05$). Serum RAGE concentrations were significantly increased but RAGE concentrations in BALF were significantly reduced in the model and glucocorticoid groups compared with the control group ($P < 0.05$). RAGE and NF- κ B expression at both mRNA and protein levels in lung tissues was significantly lower in the glucocorticoid group than in the model group ($P < 0.05$). RAGE concentrations were significantly lower in serum ($P < 0.05$), but were higher in BALF ($P < 0.05$) in the glucocorticoid group than in the model group. **Conclusions** RAGE-NF- κ B pathway plays an important role in hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats, and glucocorticoid administration may play a protective role against the lung injury by down-regulating RAGE-NF- κ B signaling pathway. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 81-85]

Key words: Glucocorticoid; Receptor for advanced glycation end-products; Lung injury; Neonatal rats

[收稿日期] 2014-06-06; [接受日期] 2014-08-21
[基金项目] 江苏省临床医学专项 (BL2014063)。
[作者简介] 胡剑, 男, 硕士研究生, 主治医师。
[通信作者] 田兆方, 男, 主任医师。

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿最常见的并发症, 已经成为新生儿重症监护病房最棘手的问题之一。虽然 BPD 的发病机制不完全清楚, 但新生肺暴露在高氧环境中通过氧毒作用所致的肺损伤是重要的原因之一^[1]。国内外研究表明高浓度氧所致的氧化应激损伤在 BPD 的发生和发展中起着极其重要的作用^[2-3]。目前缺乏有效的治疗方法。

近年来发现 I 型肺泡上皮细胞参与肺水肿形成、肺泡及间质纤维蛋白沉积, 并影响急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征的转归^[4]。晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 是一种多配体受体, 属于细胞表面分子免疫球蛋白超家族成员, RAGE 位于 I 型肺泡上皮细胞基底侧细胞膜, 是其损伤标志物^[4]。RAGE 有两种形式: 第一种为全长 RAGE, 又称膜 RAGE, 包括膜外域、跨膜域和膜内域; 第二种是可溶性 RAGE (sRAGE), 缺乏跨膜域, 被释放到细胞外和血浆中, 可作为潜在的 I 型肺泡上皮细胞损伤标志物, 循环中 sRAGE 水平增高与急性肺损伤及急性呼吸窘迫综合征的严重程度相关^[5]。本课题组前期研究表明 RAGE-NF- κ B 通路在高氧诱导的肺损伤中具有重要作用, 通过下调 RAGE-NF- κ B 通路对肺损伤产生保护作用^[6]。因此, RAGE-NF- κ B 通路在 BPD 的发病机制中逐渐受到关注。

临床上糖皮质激素广泛应用于新生儿 BPD 的治疗, 系统激素治疗虽可改善不能撤机患儿肺功能、降低对氧的依赖性、促进拔管和缩短机械通气时间, 但因其作用机制仍不明确, 目前仍存在较多争议。本研究将在前期研究基础上, 研究糖皮质激素对高氧诱导肺损伤时 RAGE-NF- κ B 信号通路的影响, 从而探讨激素治疗 BPD 相关机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司); 抗 RAGE 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 抗 NF- κ B 抗体及抗 β -肌动蛋白抗体 (美国 Sigma 公司); ELISA 试剂盒 (武汉博士德公司); CY-100 数字测氧仪 (浙江省建德市利达仪器厂)。所

有引物由上海生物工程公司合成。

1.2 新生大鼠高氧肺损伤模型制备与样本收集

日龄 1 d 新生 Sprague-Dawley 大鼠 24 只, 雌雄不限, 体重 10~15 g, 由南京医科大学动物实验中心提供。按随机数字表法将 24 只新生大鼠随机分为空气对照组、高氧模型组和激素干预组, 各组 8 只。按本实验室方法新生大鼠于生后即置于 95% 氧浓度下暴露 7 d 制成模型^[7], 空气对照组仅生后暴露于同室内空气饲养 7 d, 激素干预组于造模后尾静脉注射地塞米松 1 mg/kg, 隔天 1 次, 共 3 次, 高氧模型组及空气对照组动物均同时尾静脉注射相同体积的生理盐水。3 组喂养新生大鼠的母鼠每 24 h 互换, 以避免母鼠因氧中毒影响新生鼠的哺乳, 记录大鼠生长情况。

各组大鼠均于实验第 13 天称重后, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (8 mL/kg) 处死; 采用眼球放血法留取血 1~2 mL; 切断腹主动脉进一步放血。颈正中暴露气管, 剪开一小口插入导管并固定, 向导管内缓缓注入 1 mL 预冷生理盐水反复回抽 3 次, 回收率 80%~90%, 留取支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。快速剪开胸腔, 取出双侧肺脏, 肉眼观察后, 生理盐水冲洗; 左上肺制成肺组织匀浆, 右上肺组织以 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋后连续切片, 厚度为 6 μ m, 供免疫组化和组织学检查用。

1.3 ELISA 法测定血清及 BALF 中 TNF- α 、sRAGE 含量

采血后室温下静置 2 h, 再置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 3~4 h, 待血液凝固血块收缩后, 4000 rpm 离心 10 min, 取上清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。取 BALF 于 1 h 内 4000 rpm 离心 10 min, 取上清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。采用 ELISA 法完全按试剂盒说明书检测血清及 BALF 中 TNF- α 和 sRAGE 含量。

1.4 RT-PCR 法检测肺组织匀浆 RAGE mRNA、NF- κ B mRNA 的表达

应用 TRIzol 试剂常规一步法提取肺组织标本总 mRNA。RAGE 引物序列: 上游: 5'-GGTGCTGGTTCTTGCTC-3', 下游: 5'-TCCCTCG-CCTGTTAGTT-3', 扩增产物长度为 235 bp; NF- κ B 引物序列: 上游 5'-GAAGAAGCGAGACCTGGAG-3', 下游 5'-TCCGGAACACAATGGCCAC-3', 扩增产物长度 398 bp; 内参 β -actin 引物序列: 上

游: 5'-GATGACAAGCAGCCCTAT-3', 下游: 5'-TCCATGCCAATTTACAAC-3', 扩增产物长度450 bp。取 PCR 产物 5 μ L 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 在凝胶成像系统中分别计算 RAGE mRNA、NF- κ B mRNA 与 β -actin 的灰度值比值即代表 RAGE mRNA 和 NF- κ B mRNA 相对表达量。

1.5 Western blot 检测 RAGE 蛋白和 NF- κ B 蛋白的表达

肺组织匀浆 10000 rpm 离心 10 min 后, 取上清测蛋白浓度, 加上样缓冲液并于沸水中煮沸 5 min 后以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 然后把胶上的蛋白电转移到醋酸纤维膜上, 5% 无脂奶粉封闭, 与待测蛋白的特异性抗体(稀释度均为 1:500) 孵育杂交, 4 $^{\circ}$ C 过夜洗膜后, 再加辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜后进行显色, 曝光于 X 线胶片上, 在图像分析系统分别计算目的蛋白条带灰度值与内参灰度值的比值代表目的蛋白的相对表达量。

1.6 肺组织病理检查

苏木精-伊红染色后检测肺组织病理学改变, 按文献^[8]的方法, 光镜下依据肺泡间隔水肿、肺泡出血、肺泡内纤维蛋白沉积和肺泡内细胞浸润 4 方面进行肺损伤病理学评分, 每个方面分别计 0~3 分; 每只大鼠分别切取 4 张切片, 每张切片观察不重叠的 10 个视野, 分别记录病理学评分的值, 4 张切片的平均值即代表该大鼠的病理学评分。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件对所有数据进行统计学比较分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠生长情况

高氧模型组和激素干预组新生鼠活动逐渐减少, 反应迟钝, 但全部成活; 激素干预组较高氧模型组上述情况有所改善。

2.2 大鼠肺组织损伤评分

空气对照组大鼠肺组织结构完整, 基本无炎性细胞渗出; 高氧模型组可见炎性细胞渗出、肺泡间隔水肿增厚; 而激素干预组水肿、炎性细胞浸润以及出血等病理情况均较高氧模型组减轻(图 1)。3 组肺组织损伤评分差异有统计学意义 ($F=37.68, P < 0.01$), 其中高氧模型组肺组织损伤评分 (3.3 ± 0.7) 高于空气对照组 (0.7 ± 0.4) 和激素干预组 (1.1 ± 0.4), 且激素干预组肺组织损伤评分亦高于空气对照组 (均 $P < 0.05$)。

2.3 血清和 BALF 中 TNF- α 和 sRAGE 含量

ELISA 检测结果显示 3 组间血清中 TNF- α 和 sRAGE 水平的差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 高氧模型组和激素干预组明显高于对照组, 而激素干预组明显低于高氧模型组 (均 $P < 0.05$)。

同时 3 组大鼠间 BALF 中 TNF- α 、sRAGE 水平的差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 高氧模型组和激素干预组 TNF- α 明显高于对照组, sRAGE 低于对照组, 而激素干预组 TNF- α 明显低于模型组, sRAGE 高于模型组 (均 $P < 0.05$)。见表 1。

2.4 肺组织 RAGE mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达

RT-PCR 检测结果显示, 3 组间肺组织 RAGE mRNA、NF- κ B mRNA 表达差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高氧模型组和激素干预组明显高于对照组, 而激素干预组明显低于高氧模型组 (均 $P < 0.05$)。见表 2。

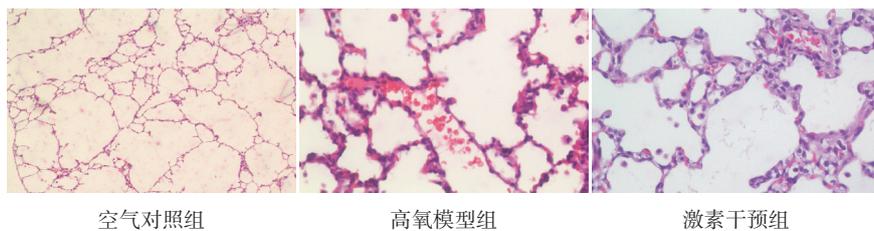


图 1 各组大鼠肺组织病理切片(苏木精-伊红染色, $\times 100$) 对照组大鼠肺组织结构完整, 基本无炎性细胞渗出; 高氧模型组可见大量炎性细胞浸润、出血和肺泡壁水肿增厚; 激素干预组上述病理情况均较高氧模型组有所减轻。

表1 各组新生大鼠血清和BALF中TNF-α和sRAGE水平比较 (x̄ ± s)

组别	例数	TNF-α (ng/L)		sRAGE (ng/L)	
		血清	BALF	血清	BALF
空气对照组	8	73 ± 18	50 ± 8	88 ± 12	113 ± 11
高氧模型组	8	385 ± 10 ^a	199 ± 13 ^a	257 ± 13 ^a	91 ± 10 ^a
激素干预组	8	128 ± 10 ^{ab}	77 ± 11 ^{ab}	146 ± 14 ^{ab}	110 ± 15 ^{ab}
F 值		1.35	428.27	345.85	7.91
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.003

注: a 示与空气对照组相比, P<0.05; b 示与高氧模型组相比, P<0.05。

表2 各组新生大鼠肺组织 RAGE mRNA 和 NF-κB mRNA 的表达比较 (x̄ ± s)

组别	例数	RAGE mRNA	NF-κB mRNA
空气对照组	8	0.15 ± 0.03	0.50 ± 0.17
高氧模型组	8	0.39 ± 0.09 ^a	0.90 ± 0.36 ^a
激素干预组	8	0.24 ± 0.07 ^{ab}	0.63 ± 0.31 ^{ab}
F 值		24.84	3.85
P 值		<0.001	0.038

注: a 示与空气对照组相比, P<0.05; b 示与高氧模型组相比, P<0.05。

2.5 肺组织 RAGE 和 NF-κB 蛋白表达

Western blot 结果显示, 3 组间肺组织 RAGE、NF-κB (NF-κB p65) 蛋白表达差异均有统计学意

义 (均 P<0.01), 高氧模型组和激素干预组明显高于对照组, 而激素干预组明显低于高氧模型组 (均 P<0.05), 见图 2。

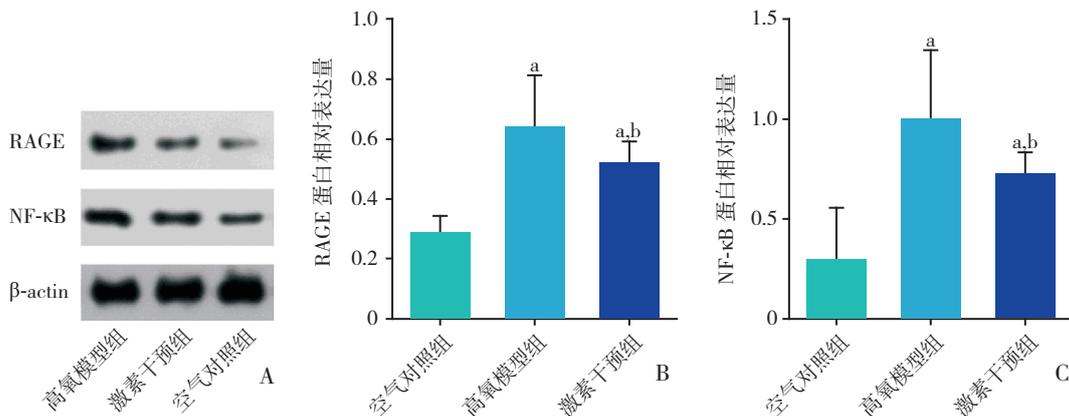


图2 各组大鼠肺组织 RAGE 和 NF-κB 蛋白水平表达 A 为 Western blot 电泳条带图; B-C 为蛋白相对表达量统计图, a 示与空气对照组相比, P<0.05; b 示与高氧模型组相比, P<0.05。

3 讨论

随着辅助机械通气的广泛应用及肺表面活性物质的问世, 早产儿, 特别是超低出生体重儿的存活率明显得到了提高, 随之 BPD 的发病率也逐年增加。研究认为肺泡发育障碍是其主要的病理改变, 其发病机制与肺发育不成熟、高浓度氧、感染、呼吸机相关性肺损伤和细胞凋亡等有关^[9-10]。

RAGE 的生理作用与肺泡气体交换、细胞铺展、细胞增殖以及细胞外基质黏附等有关^[11]。病理状态下, 细胞膜上的 RAGE 与配体结合后可启动多条信号通路, 其中以 NF-κB 通路最为重要。RAGE-NF-κB 通路激活及随后多种促炎症因子的转录是一种正反馈环, 它通过一种正向的对基因

启动子的直接调控增加 RAGE 基因在细胞表面的表达, 使细胞持续活化, 最终导致组织细胞的损害^[12]。研究表明肺泡中 sRAGE 水平可作为 I 型肺泡上皮细胞损伤的标志, 评价肺损伤的严重性和评估疗效^[13]。Lizotte 等^[14]发现肺组织中 RAGE 含量随肺组织成熟度增加而逐渐升高, 高氧可抑制 RAGE 表达; 并认为这可能与高氧抑制肺泡发育致 I 型肺泡上皮细胞数量下降有关, 而支气管肺发育不良的病理损伤程度可能与 sRAGE 的丧失或 sRAGE/RAGE 的比例失衡有关。

系统激素治疗 BPD, 可改善不能撤机患儿肺功能、降低对氧的依赖性、促进拔管和缩短机械通气时间, 对治疗 BPD 有较好的疗效。此外, 糖皮质激素能促进肺表面活性物质的合成及肺抗氧

化酶的生成,能减少肺水肿和炎症反应,减少炎症细胞的浸润,抑制纤维细胞的增生^[15-16],但其机制仍不明确。

本研究发现,应用糖皮质激素干预后,肺组织 RAGE、sRAGE、NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达明显降低,血清中 sRAGE 含量明显升高。由此,我们认为高氧可启动 RAGE-NF- κ B 信号通路,从而引起肺的损伤,而糖皮质激素治疗后可抑制 RAGE 及其可溶性形式,减少促炎症因子的表达,从而破坏 RAGE-NF- κ B 通路的正反馈环,下调这一信号通路从而发挥肺保护作用。sRAGE 具有阻断 RAGE 信号、保护组织和细胞免受配体相关性损伤的能力,其发挥诱饵受体作用,与肺损伤密切相关。有实验研究发现,肺泡中 sRAGE 水平可作为 I 型肺泡上皮细胞损伤的标志物,评价损伤的严重性和疗效评估^[17]。而在成人研究中 sRAGE 与慢性肺疾病肺功能密切相关^[18]。故我们推测 sRAGE 的水平亦可能作为监测 BPD 肺损伤程度及评价预后的指标。

综上所述,糖皮质激素可通过下调 RAGE-NF- κ B 通路,从而发挥保护肺组织,治疗 BPD 的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 侯伟,刘海燕,李丹,等. 新生大鼠高氧肺损伤血管内皮生长因子蛋白及其 mRNA 表达变化研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(2): 207-210.
- [2] Britton JR. Altitude, oxygen and the definition of bronchopulmonary dysplasia[J]. J Perinatol, 2012, 32(11): 880-885.
- [3] 党红星. 氧化应激与支气管肺发育不良研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2012, 39(5): 433-437.
- [4] Guo WA, Knight PR, Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(10): 1588-1598.
- [5] Christie JD, Shah CV, Kawut SM, et al. Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(10): 1010-1015.
- [6] Tian Z, Li Y, Ji P, et al. Mesenchymal stem cells protects hyperoxia-induced lung injury in newborn rats via inhibiting receptor for advanced glycation end-products/nuclear factor kappaB signaling[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2013, 238(2): 242-247.
- [7] 田兆方, 张志敏, 李玉红. GM-CSF 对高氧暴露新生大鼠肺组织 RAGE-NF- κ B 通路的影响[J]. 中华医学杂志, 2011, 30(8): 2143-2147.
- [8] Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, et al. Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation[J]. Am J Pathol, 2001, 158(1): 153-161.
- [9] 轩哲, 薛辛东, 富建华. 早产儿支气管肺发育不良的防治新进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(5): 412-416.
- [10] Ambalavanan N, Mourani P. Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2014, 100(3): 240-246.
- [11] Yatime L, Andersen GR. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products[J]. FEBS J, 2013, 280(24): 6556-6568.
- [12] Reynolds PR, Wasley KM, Allison CH. Diesel particulate matter induces receptor for advanced glycation end-products(RAGE) expression in pulmonary epithelial cells, and RAGE signaling influences NF-kappaB-mediated inflammation[J]. Environ Health Perspect, 2011, 119(3): 332-336.
- [13] 吉萍, 俞敏. 晚期糖基化终末产物受体与肺发育及肺损伤[J]. 国际儿科学杂志, 2013, 40(5): 454-457.
- [14] Lizotte PP, Hanford LE, Enghild JJ, et al. Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung[J]. BMC Dev Biol, 2007, 7: 15.
- [15] THOMAS W, SPEER CP, 钱莉玲, 等. 支气管肺发育不良的防治—证据及临床应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(3): 276-277.
- [16] 齐骥. 糖皮质激素防治早产儿支气管肺发育不良的进展及争议[J]. 中国循证儿科杂志, 2011, 6(3): 237-240.
- [17] Su X, Looney MR, Gupta N, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(1): L1-L5.
- [18] Iwamoto H, Gao J, Pulkkinen V, et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products and progression of airway disease[J]. BMC Pulm Med, 2014, 14: 68.

(本文编辑: 周勇)