

·论著·

# 高氧诱导早产鼠慢性肺疾病肺超微结构变化 及氧化应激反应的研究

富建华,薛辛东

(中国医科大学附属第二医院儿科,辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** 目的 慢性肺疾病(CLD)是早产儿吸入高浓度氧治疗后最常见的并发症,目前认为肺部氧化应激反应与CLD的发生密切相关。该文探讨高氧致早产鼠CLD发生中肺组织超微结构及氧化应激反应的动态变化。方法 高浓度氧致早产鼠CLD模型(实验组)和正常对照组各40例为研究对象,应用分光光度计比色法在实验后1,3,7,14,21 d动态测定肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,并同步观察肺组织超微结构的变化。结果 吸高氧后初期(1~3 d),型肺泡上皮细胞(AEC<sub>Ⅱ</sub>)即出现线粒体、板层小体等细胞器的损伤;7 d后,除细胞器结构破坏外,开始出现细胞核的异常,且随吸氧时间的延长上述改变逐渐加重。实验组肺组织SOD的活性虽逐渐增高,但与对照组比较,其差异无显著性( $P > 0.05$ );实验组MDA水平从吸高氧第3天起即明显高于对照组( $55.9 \pm 5.5$  nmol/mg vs  $22.5 \pm 4.4$  nmol/mg) ( $P < 0.01$ ),7 d达高峰 $94.3 \pm 12.4$  nmol/mg,持续1周后逐渐下降,21 d时仍高于对照组( $48.0 \pm 7.5$  nmol/mg vs  $23.6 \pm 5.7$  nmol/mg) ( $P < 0.01$ )。结论 AEC<sub>Ⅱ</sub>损伤是高氧诱导CLD的早期特征;肺部氧化应激反应与AEC<sub>Ⅱ</sub>损伤密切相关。

[中国当代儿科杂志,2004,6(1):23-26]

**[关键词]** 慢性肺疾病; 型肺泡上皮细胞;氧化应激反应;鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)-0023-04

## Changes of ultrastructure and oxidative stress reaction of lungs in premature rats with chronic lung disease induced by hyperoxia

Jian-Hua FU, Xin-Dong XUE. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: fu-jianhua@163.com)

**Abstract:** **Objective** Oxygen therapy is a common means in the treatment of lung disease in premature infants. However, long time inhalation of high concentration of oxygen can induce lung injury, even chronic lung disease (CLD). This paper aims at studying the dynamic changes of lung ultrastructure and oxidative stress reaction in premature rats with hyperoxia-induced CLD and in exploring the role of lung oxidative stress reaction in pathogenesis of CLD. **Methods** Eighty premature rats were randomly assigned into a Hyperoxia group and a Control group ( $n = 40$  each). The Hyperoxia group was given a high concentration of oxygen ( $FiO_2 > 0.90$ ) and developed CLD. The Control group received oxygen with the  $FiO_2$  of 0.21. The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentration of the lung were assayed with a spectrophotometer and the lung ultrastructure in the two groups was observed under a transmission electronmicroscope. **Results** The structures of mitochondria and lamellar bodies in alveolar epithelial cell (AEC<sub>Ⅱ</sub>) were partly damaged on the 3rd day of hyperoxia induction. The abnormal nuclei developed in addition to the damaged mitochondria and lamellar bodies in AEC<sub>Ⅱ</sub> after the 7th day. Compared with the Control group, the MDA level in the Hyperoxia group was increased significantly on the 3rd day ( $55.9 \pm 5.5$  nmol/mg vs  $22.5 \pm 4.4$  nmol/mg) ( $P < 0.01$ ), and it reached a peak on the 7th day ( $94.3 \pm 12.4$  nmol/mg). After 7 days the MDA level in the Hyperoxia group decreased gradually but still remained at a higher level on the 21st day than that of the Control group ( $48.0 \pm 7.5$  nmol/g vs  $23.6 \pm 5.7$  nmol/g) ( $P < 0.01$ ). The SOD activity in the Hyperoxia group did not differ from the Control

[收稿日期] 2003-04-22; [修回日期] 2003-07-15  
[基金项目] 辽宁省科委资助项目(No. 20022071)  
[作者简介] 富建华(1966-),女,博士,讲师。主攻方向:新生儿疾病。  
[通讯作者] 富建华,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

group. **Conclusions** AEC<sup>-</sup> injury is early manifestation of hyperoxia-induced CLD. The lung oxidative stress reaction is closely related to the AEC<sup>-</sup> injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(1): 23-26]

**Key words:** Chronic lung disease; Alveolar epithelial cell; Oxidative stress reaction; Rat

慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)是早产儿吸入高浓度氧治疗后最常见的并发症。近年来,随着极低体重儿存活率的提高,CLD发病率有逐渐增加的趋势,已成为影响早产儿生存质量的主要疾病之一。目前认为肺部氧化应激反应与CLD的发生密切相关,但有关其在高氧致CLD发生发展中动态变化以及与肺组织超微结构改变相互关系的研究报道甚少。本研究通过测定肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量变化,并同步观察肺组织的超微结构,以探讨肺部氧化应激反应在高氧致早产儿CLD发生发展中作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

将孕21 d的SD大鼠(由中国医科大学实验动物部提供)行剖宫产,新生的早产鼠(足月22~23 d),随机分为实验组和对照组,每组均为40只。

### 1.2 动物模型建立<sup>[1]</sup>

实验组:将早产的SD大鼠生后即置于氧箱中,持续输入氧气,维持 $FiO_2 > 0.90$ (用测氧仪监测), $CO_2$ 浓度 $< 0.5\%$ (用钠石灰吸收 $CO_2$ ),温度 $25 \sim 27^\circ C$ ,湿度 $50\% \sim 70\%$ ,每天定时开箱1 h,添加水、饲料及更换垫料,并与对照组交换母鼠以避免因氧中毒致喂养能力下降;对照组: $FiO_2$ 为0.21(空气),具体方法及实验控制因素同实验组。

### 1.3 实验方法

每组分别于实验后的1, 3, 7, 14和21 d随机处死8只,分离肺组织。

1.3.1 光镜观察 10%甲醛固定右肺上叶后石蜡包埋,制成 $4 \mu m$ 切片,乙醇梯度脱水,HE染色后在光镜下观察肺组织的形态学改变。

1.3.2 电镜观察 2.5%戊二醛固定右肺下叶后再用1%锇酸固定,丙酮脱水,环氧树脂包埋,制成超薄切片,醋酸双氧铀及硝酸铅双重染色后,在JEM-1200Ex80 Kv透色电镜下观察肺组织的超微结构。

1.3.3 SOD和MDA含量测定 用预冷的生理盐水洗净左肺组织残血,吸干水分,称1 g湿重肺组织剪碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成10%的组织匀浆,低温离心后取上清液,分别按照SOD和MDA测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)要求,

应用紫外/可见分光光度计(法国500-P型),测定SOD活性及MDA含量。

### 1.4 统计学分析

应用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用Dunnett  $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 肺组织形态学改变(光镜)

实验组早产鼠吸高氧1 d,肺组织形态学无明显改变;3 d时,肺内小血管充血,肺泡腔内少量炎性细胞渗出;7 d时,肺泡体积增大,肺泡间隔变薄;14 d时,肺泡数量减少,少数肺泡融合,肺间质细胞增加;21 d时,正常肺泡结构消失,数量明显减少,肺泡腔直径明显增大,且大量肺泡融合,肺泡间隔菲薄,肺间质细胞明显增加。

### 2.2 肺组织超微结构改变(电镜)

正常对照组型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AEC<sup>-</sup>)的表面有微绒毛(Mv),细胞浆内含有线粒体(Mi)和板层小体(LB),AEC基底膜及气血屏障较薄,肺间质内无胶原沉积(图1)。实验组早产鼠吸高氧后1 d,AEC<sup>-</sup>中少数Mi肿胀(图2)。3 d时LB开始排空(图3)。7 d时除Mi和LB改变外,Mv减少,细胞核异染质增加(图4)。随时间延长,上述改变逐渐加重,21 d时细胞核固缩、溶解,Mi, LB及Mv均消失,肺间质伴有大量的纤维组织增生(图5)。吸高氧后14 d AEC基底膜及气血屏障亦明显增厚。见表1。



图1 正常AEC-II(8000×)

Figure 1 Normal AEC<sup>-</sup> (8000×)



图 2 Mi 肿胀 ,LB 部分排空(吸高氧 1 d)

Figure 2 Mitochondria swelled and some of LB were emptied 1 day after hyperoxia induction (2000 ×)

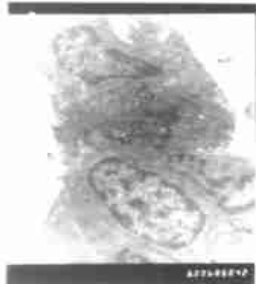


图 4 细胞核异染质增多(吸高氧 7 d)

Figure 4 Matachromatic granules of nuclei increased 7 days after hyperoxia induction (8000 ×)

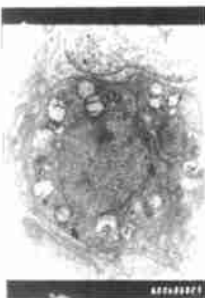


图 3 LB 大部分排空(吸高氧 3 d)

Figure 3 Most of LB were emptied 3 days after hyperoxia induction (12000 ×)



图 5 细胞器消失 ,核溶解 ,纤维组织增生(吸高氧 21 d)

Figure 5 Organelle disappeared , nuclei dissolved and fibrous tissues hyperplasia 21 days after hyperoxia induction (8000 ×)

表 1 实验组肺组织超微结构变化

Table 1 Changes of lung ultrastructure in the hyperoxia group

吸氧时间 (d)	AEC <sup>-</sup>				肺间质	AEC 基底膜	气血屏障
	Mv	Mi	LB	细胞核			
1	-	少数肿胀	-	-	-	-	-
3	-	部分肿胀	少数排空	-	-	-	-
7	减少	大多数肿胀、脊排列紊乱	大多数排空	异染质增多	少量胶原沉积	轻度增厚	轻度增厚
14	断裂、明显减少	少数溶解	基本排空	核固缩	胶原沉积	增厚	增厚
21	消失	全部溶解	消失	核溶解	大量胶原沉积	明显增厚	明显增厚

注：“-”与对照组比较无变化

2.3 肺组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化

随吸氧时间的延长 ,实验组肺组织 SOD 的活性虽有逐渐增高的趋势 ,但与对照组比较差异无显著性 (  $P > 0.05$  ) ;而 MDA 的含量 ,吸入高氧第 3 天起

即明显高于对照组 (  $P < 0.01$  ) ,7 d 达高峰 ,并持续至 14 d ,21 d 时虽有下降 ,但仍高于对照组 (  $P < 0.01$  ) 。见表 2。

表 2 肺组织 SOD 活性和 MDA 含量的动态变化

Table 2 Dynamic changes of lung SOD activity and MDA level (n = 8 ,  $\bar{x} \pm s$  )

组别	SOD (NU/ mg)					MDA (nmol/ mg)				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	1	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	28.6 ±4.8	29.9 ±2.6	70.2 ±10.6	72.6 ±5.6	82.8 ±5.6	26.6 ±5.7	22.52 ±4.4	24.3 ±5.5	24.5 ±3.6	23.6 ±5.7
实验组	27.4 ±3.1	30.4 ±3.2	69.4 ±9.3	74.1 ±10.6	84.4 ±7.3	33.8 ±4.8	55.9 ±5.5 <sup>a,b</sup>	94.3 ±12.4 <sup>a,b</sup>	86.8 ±10.2 <sup>a,b</sup>	48.0 ±7.5 <sup>a,b</sup>

注：a 与对照组比较  $P < 0.01$ ； b 与同组前一时间点比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

以往有关高氧诱导 CLD 肺组织形态学改变的研究多集中于肺泡发育延迟(即肺泡数量的减少、体积增大等)及晚期肺间质的纤维化,我们的研究结果也与之相似。但由于Ⅱ型肺泡上皮细胞(AECⅡ)结构的特殊性和功能的特异性,近年来有关其在肺损伤发生中的作用已逐渐引起学者的关注。已有研究发现,高氧可诱导成鼠 AECⅡ的凋亡及其 DNA 的损伤<sup>[2]</sup>,并推测诱导 AECⅡ损伤而引发的修复功能障碍可能是 CLD 肺泡发育延迟的重要原因<sup>[3]</sup>。但有关 AECⅡ在高氧致 CLD 发生发展中形态学的动态演变过程,目前尚未见报道。

AECⅡ是肺泡上皮的重要组成部分,呈立方体状,含有特异性的 LB,并能分泌表面活性蛋白,其 LB 数目和形态的相对稳定是 AECⅡ发挥正常生理功能的重要基础。若肺泡上皮损伤,Ⅱ型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AECⅡ)无再生能力,其修复完全依赖于 AECⅡ向 AECⅠ转化。本研究通过观察 CLD 早产鼠肺组织超微结构的动态变化发现,吸高氧后初期(1~3 d),AECⅡ即出现 Mi、LB 等细胞器的损伤,7 d 后,除细胞器结构破坏外,开始出现细胞核的异常,且随吸氧时间的延长逐渐加重,我们的结果提示,AECⅡ损伤是高氧诱导早产鼠 CLD 的早期特征。因此,AECⅡ损伤后,其分泌及转化功能的异常、晚期 AEC 基底膜及气血屏障增厚而导致的肺泡通气/换气功能障碍可能是 CLD 患儿长期对氧气依赖的重要原因。

近年来,有关氧自由基及其介导的脂质过氧化反应在组织损伤中的作用倍受关注。氧自由基作用于细胞膜的多价不饱和脂肪酸,使其脂质发生过氧化反应,生成大量的 MDA 进一步损伤细胞;SOD 主要作用是清除氧自由基,若其活性不足或大量消耗,则可降低组织的抗氧化能力。因此,组织 SOD 活性下降及 MDA 含量增高可作为评价氧自由基损伤组织程度的重要指标。

虽然高氧诱导早产儿 CLD 的发生机制尚不清楚,但氧化应激反应在其发生中的作用一直是研究的热点。有研究认为,肺组织抗氧化酶(AOE)功能

不足是早产儿易发生氧化应激反应性肺损伤的重要原因<sup>[4]</sup>,但也有研究发现,早产鼠高氧应激后,其 AOE 的活性仍能迅速增加<sup>[5]</sup>,应用重组人 SOD(rhSOD)预防早产儿 CLD, rhSOD 组和安慰剂组 CLD 的发生率无差异<sup>[6]</sup>;尽管早产儿支气管肺泡灌洗液中 MDA 含量明显升高,但其水平与最终能否发生 CLD 并无相关性<sup>[7]</sup>,因此,氧化应激反应在 CLD 发生中的作用尚存争议。我们的结果表明,吸高氧后,SOD 的活性虽有逐渐增高的趋势,但与对照组无差异,而 MDA 水平早期即明显升高,7 d 达高峰,持续 1 w 后逐渐下降,21 d 时仍高于正常水平,且发现 MDA 含量的动态变化与 ATⅡ结构破坏先后顺序在时间上恰是一致的,该结论提示我们氧化应激反应与 AECⅡ损伤密切相关。因此,早产儿吸入高浓度氧后,因其肺组织内 MDA 大量生成,而 SOD 等抗氧化酶的活性不能随之相应增加而介导的 AECⅡ损伤可能是 CLD 发生的原因之一,但其确切机制还有待于进一步深入研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Xu F, Fok TF, Yin J. Hyperoxia-induced lung injury in premature rat: description of a suitable model for the study of lung disease in newborns [J]. Chin Med J, 1998, 111(7): 619-624.
- [2] Uhal. Apoptosis in lung fibrosis and repair [J]. Chest, 2002, 122(6): 293S.
- [3] Richard L. Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): L336-L344.
- [4] 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.
- [5] 许峰,霍泰辉,翁颂铭. 高氧对早产鼠和成熟鼠肺损伤的研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2001, 16(2): 69-70.
- [6] Davis J, Rosenfeld W, Parad R. Improved pulmonary outcome at one year corrected age in premature neonates treated with recombinant human superoxide dismutase [J]. Pediatr Res, 2000, 47(3): 395A.
- [7] Winterbourn CC, Chan T, Buss IH, Inder TE, Mogridge N, Darlow BA. Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in premature infants plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation [J]. Pediatr Res, 2000, 48(1): 84-90.

(本文编辑:谢岷)