

· 实验研究 ·

高氧致慢性肺疾病早产鼠肺组织 CDK4 p21 的表达及意义

高英¹, 薛辛东¹, 李津阳², 王妮²

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳市妇婴医院儿科, 辽宁 沈阳 110014)

[摘 要] 目的 早产儿慢性肺疾病(CLD)的发病机制目前研究还不十分清楚,但 CLD 的最终病理变化与肺细胞增殖有关。该文采用高氧诱导早产鼠 CLD 模型为对象,探讨 CDK4 和 p21 基因动态表达与肺细胞增殖调控的关系。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,每组分别于实验后的 1, 3, 7, 14 和 21 d 随机选取 8 只大鼠处死,取出肺组织,常规制成 5 μm 切片。检测观察:①肺组织形态学;②肺组织纤维化评分;③采用免疫组化检测肺组织内 PCNA 表达;④采用原位杂交检测肺组织 CDK4 mRNA 和 p21 mRNA 的表达。结果 两组肺组织细胞 PCNA 指数:与对照组比较,实验组 1 d, 3 d PCNA 表达均减弱($P < 0.05$), 7 d 开始表达增强($P < 0.01$), 14 d 和 21 d 明显高于对照组($P < 0.01$)。两组肺组织细胞 CDK4 mRNA 表达强度:从 7 d 开始实验组高于对照组($P < 0.05$), 14 d, 21 d 明显高于对照组($P < 0.01$)。两组肺组织细胞 p21 mRNA 表达强度:实验组 1 d, 3 d 表达明显高于对照组($P < 0.01$), 7 d 后持续下降,但也高于对照组($P < 0.05$)。7~21 d 肺组织细胞 CDK4 mRNA, p21 mRNA 表达分别与 PCNA 呈显著正、负相关(r 分别为 0.83 和 -0.81, $P < 0.05$)。结论 高氧可诱导早产鼠肺细胞增殖。肺组织细胞 CDK4 基因的过度表达、p21 基因的表达下降,可能是高氧诱导肺细胞增殖的机制之一。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(6):595-600]

[关键词] 高氧;慢性肺疾病;早产;肺细胞;细胞增殖;大鼠
[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)06-0595-05

Expression and roles of CDK4 and p21 in lung tissues of premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease

GAO Ying, XUE Xin-Dong, LI Jin-Yang, WANG Ni. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: e_gaoying@163.com)

Abstract: Objective The pathogenic mechanisms of chronic lung disease (CLD) of premature infants are not fully understood. Its final pathological changes have been shown to relate with lung cell proliferation. The aim of the study was to explore the relationship of the expression of cyclin dependent kinase 4 (CDK4) mRNA and cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) p21 mRNA with lung cell proliferation. **Methods** Eighty premature rats were randomly assigned to a hyperoxia group and a control group ($n = 40$ each). The hyperoxia group was exposed to high concentration of oxygen ($FiO_2 > 0.90$) and developed CLD. The control group was exposed to room air ($FiO_2 = 0.21$). The rats were randomly subdivided into groups sacrificed at 1, 3, 7, 14 and 21 days of exposure. Lung tissues were collected and made into 5 μm sections. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in lung tissues was detected by immunohistochemistry. Dynamic expression of CDK4 mRNA and p21 mRNA were detected by *in situ* hybridization. Lung histomorphology and fibrosis were observed by microscopy. **Results** Expression of PCNA and CDK4 mRNA of lung cells in the hyperoxia group increased significantly after 7 days of exposure, and further increased after 14 and 21 days compared with controls. p21 mRNA expression in the hyperoxia group significantly increased after 1 and 3 days of exposure. After 7 days, p21 mRNA expression progressively decreased, but remained at a higher level than control through 21 days of exposure. PCNA expression was positively correlated to CDK4 mRNA expression ($r = 0.83$, $P < 0.05$) and negatively correlated to p21 mRNA expression ($r = -0.81$, $P < 0.05$) in the hyperoxia group between 7 and 21 days of exposure. **Conclusions** Hyperoxia can induce lung cell proliferation in premature rats. The over-expression of CDK4 gene and the decreased expression of p21 gene in lung tissues may be associated with lung cell proliferation induced by hyperoxia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6):595-600]

Key words: Hyperoxia; Chronic lung disease; Lung cell; Cell proliferation; Premature rats

早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD) 的发生近年来有逐渐上升趋势,早产儿患 CLD 后由

[收稿日期] 2006-12-30; [修回日期] 2007-03-05
[作者简介] 高英,女,硕士,主任医师。主攻方向:新生儿疾病。
[通讯作者] 薛辛东,教授,博士生导师,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

于肺上皮的重构障碍或异常,肺组织发生纤维化,严重影响了患儿的呼吸功能,因此探寻 CLD 的发病机制对降低早产儿的死亡率改善早产儿的预后有着积极的意义。CLD 的病理过程为在各种致病因素下(如高氧、机械通气及感染等)肺上皮细胞受损、损伤后组织重塑和肺间质细胞增殖^[1]。O'Reilly 等^[2]提出支气管、肺泡上皮细胞在高氧损伤导致 CLD 中 p21 mRNA 表达增加,参与细胞增殖的调节、DNA 修复和细胞坏死;Radomsk 等^[3]在高氧致肺损伤的动物模型实验中观察暴露在高氧中的新生鼠,结果发现 7~14 d 后肺组织 CDK 水平增高调节肺细胞增殖。那么在高氧下肺细胞增殖的发生机制究竟如何?目前国内研究较少。本研究采用高氧诱导早产鼠 CLD 模型为对象动态观察肺细胞增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinase,CDK CDK4)和周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制物(cyclin dependent kinases inhibitor,CDKI p21)的动态表达规律,旨在探讨 CDK4 和 p21 基因表达变化与 CLD 中肺细胞增殖调控的关系。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠由中国医科大学实验动物部提供。小鼠抗 PCNA,CDK4,p21 原位杂交检测试剂盒、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色剂均购自武汉博士得生物工程有限公司。

1.2 实验动物及分组

大鼠雌雄交配(4:1)夜间合笼,次日取阴道内分泌物涂片,如镜下检测发现精子,则以当日确定为妊娠第 1 天。待孕 21 d 时行剖宫术取出的新生鼠即为早产鼠^[4]。随机分为实验组和对照组,每组均为 40 只。

1.3 动物模型的制备

实验组:将早产的 SD 大鼠连同代母鼠生后即置于氧箱中,持续输入氧气,维持 $FiO_2 > 0.90$ (美国 OM-25ME 型测氧仪监测),用钠石灰吸收 CO_2 ,使 CO_2 的浓度 $< 0.5\%$ (Dapex 气体分析仪),温度 $22^\circ C \sim 25^\circ C$,湿度 $50\% \sim 70\%$,每天定时开箱 $0.5 \sim 1$ 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其喂养能力的下降^[5];对照组 FiO_2 为 0.21 (即空气),具体方法及实验控制因素同实验组。

1.4 实验方法及检测的指标

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

1.4.1 肺组织形态学改变(光镜下) 肺组织切片行苏木精-伊红染色后光镜下观察,每组动物各时间点随机选取切片 8 张,每张切片随机选取 5 个视野,观察肺组织形态学变化。

1.4.2 肺纤维化评分 采用 Tashcroft^[6]评分方法通过双盲方式进行评分,每组动物各时间点随机选取 8 张苏木精-伊红染色切片,每张切片随机选取 5 个视野,在光镜下观察肺组织纤维化情况,并进行纤维化评分总分共 8 分。

1.4.3 免疫组化技术(SABC 法)检测肺组织内 PCNA 表达

①肺组织切片常规脱蜡至水;②3% H_2O_2 溶液封闭过氧化物酶,反应 10 min,蒸馏水洗 2 min $\times$ 3 次,以消除内源性过氧化物酶的活性;③微波热修复以暴露抗原:将切片浸于 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)进行微波修复抗原,沸腾 5 min 后断电,间隔 5 min,重新加热至沸腾再持续 2 min,蒸馏水洗 2 min $\times$ 3 次;④滴加山羊血清封闭液或即用型 5% BSA 封闭液,37℃ 孵育 20 min,甩去多余液体不洗,以减少非特异性染色;⑤加小鼠抗大鼠 PCNA(工作浓度 1:160),37℃ 孵育 2 h,也可 4℃ 过夜。0.02 M PBS 2 min $\times$ 3 次;⑥滴加生物素标记的羊抗小鼠 IgG,37℃ 孵育 20 min,0.01 M PBS 2 min $\times$ 3 次;⑦滴加 SABC,37℃ 孵育 20 min,0.011 M PBS 5 min $\times$ 4 次;⑧滴加 DAB,镜下控制反应时间,一般反应时间在 5~30 min,显色后充分水洗;⑨苏木素复染,脱水、透明封片镜检,于光镜下观察结果。

阴性对照:除用 PBS 替代小鼠抗大鼠 PCNA 外,其他步骤同上。

结果判定:以细胞核染成棕黄色为阳性细胞。结果观察:每例在低倍镜下观察 PCNA 染色分布均匀区域,随机选取 5 个以上具有代表性的高倍视野($\times 400$)计数 500 个细胞中阳性细胞数,并以百分数表示作为 PCNA 指数。

$PCNA \text{ 指数} = \frac{\text{阳性细胞数}}{500 \text{ 个细胞总数}} \times 100\%$ 。

1.4.4 原位杂交方法检测肺组织 CDK4 mRNA 和 p21 mRNA 的表达

①肺组织切片常规脱蜡至水;②3% H_2O_2 溶液封闭过氧化物酶,以消除内源性过氧化物酶活性,反应 10 min,蒸馏水洗 2 min $\times$ 3 次;③暴露 mRNA 核酸片段:于切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,室温消化肺组织暴露 CDK4 mRNA 需 20 min,

p21 mRNA 需 30 min,原位杂交用的 PBS 洗 5 min × 3 次,蒸馏水洗 1 次;④预杂交:湿盒的准备:干的杂交盒底部加 20% 甘油 20 mL 以保持湿润,于每张切片滴加 20 μL 预杂交液,37℃ 孵育 4 h,吸去多余液体,不洗;⑤杂交:于每张切片滴加 5 μL(约稀释 8 ~ 10 倍) CDK4 或 p21 寡核苷酸探针杂交液,加盖玻片(原位杂交专用),于湿盒中 37℃ 恒温箱杂交过夜;⑥杂交后洗涤:揭掉盖玻片,37℃ 2 × SSC 洗 5 min × 2 次,37℃ 0.5 × SSC 洗 15 min × 1 次,37℃ 0.2 × SSC 洗 15 min × 1 次,必要时重复 0.2 × SSC 1 次,以减少非特异性染色;⑦滴加封闭液:37℃ 30 min,吸去多余液体,不洗;⑧滴加生物素化兔抗地高辛:37℃ 孵育 60 min,原位杂交用的 PBS 洗 5 min × 4 次;⑨滴加 SABC:37℃ 孵育 20 min,原位杂交用的 PBS 洗 5 min × 3 次;⑩滴加生物素化的过氧化物酶:37℃ 孵育 20 min,原位杂交用的 PBS 洗 5 min × 4 次;⑪DAB 显色:滴加新配制的 DAB 试剂,显色大约 10 ~ 15 min,显色后充分水洗;⑫苏木素复染,脱水、透明封片镜检,于光镜下观察结果。

阴性对照:除用 PBS 替代 CDK4 或 p21 寡核苷酸探针杂交液外,其他步骤同上。

结果判定:以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。

结果表明:CDK4 mRNA,p21 mRNA 表达的半定量测定:每组每个时间点随机抽取染色清晰的切片 8 张,每张切片于光镜下(×400)随机抽取 5 个视野,经日本产的 OLIMPUSBX56 数码相机采样后用美国图像分析系统分析,应用 Meta Morph 4.6 版软件测定平均光密度值以表示阳性产物的强度。平均光密度值越大,其阳性反应产物表达强度越强,表明蛋白的含量越高。

1.5 统计学分析

应用 SPSS11.5 统计软件进行统计学处理,数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较结果的差异显著性以 $P < 0.05$ 为标准。

2 结果

2.1 肺组织的病理变化(光镜)

实验组 1 d 无明显改变;3 d 肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞有破坏,肺泡腔内有少许红细胞渗出,肺泡及肺间质中有炎性细胞的浸润;7 d 肺泡腔增大,炎性细胞浸润明显,间质细胞增加,肺间隔增宽、增厚;14 d 少数肺泡融合,肺间隔更宽,小灶或多灶实变;21 d 正常肺泡结构消失,局部肺间质细胞明显增加,呈局灶性团块状实变。而对照组 1 d、3 d 均表现为肺泡样结构不规则,7 ~ 21 d 肺泡化逐渐明显。见图 1。

2.2 肺组织纤维化评分(光镜)

光镜下对两组肺组织进行 Tashcroft 氏肺纤维化评分,结果显示:1 d,3 d 两组评分差异无显著性($P > 0.05$),7 d 实验组高于对照组($P < 0.01$),14 d 和 21 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 两组肺组织细胞 PCNA 指数

肺组织细胞增殖细胞核抗原 PCNA 指数:与对照组比较,实验组 1 d、3 d PCNA 表达均减弱($P < 0.05$),7 d 开始表达增强,实验组高于对照组($P < 0.01$),14 d 和 21 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 1。对照组 1 ~ 21 d 均有阳性细胞表达但较少,主要分布于肺泡上皮细胞,偶见于肺间质细胞,实验组 1 d、3 d 阳性细胞表达受抑,从 7 d 开始间质中表达增多,14 d 和 21 d 主要分布在肺间质细胞中。见图 2。

2.4 两组肺组织细胞 CDK4 mRNA 和 p21 mRNA 表达强度

2.4.1 两组肺组织细胞 CDK4 mRNA 表达强度

两组 CDK4 mRNA 表达强度 1 d、3 d 无差异($P > 0.05$),7 d 实验组高于对照组($P < 0.05$),14 d、21 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 1 和图 3。

表 1 两组肺组织纤维化评分及 PCNA 指数、CDK4、p21 mRNA 的动态变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

日龄(d)	肺纤维化评分		PCNA 指数		CDK4 mRNA		p21 mRNA	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
1	0.7 ± 0.27	0.8 ± 0.27	6.84 ± 0.24	5.28 ± 0.96 ^a	9.43 ± 0.52	9.66 ± 0.89	11.3 ± 0.32	48.57 ± 2.70 ^b
3	0.6 ± 0.22	0.9 ± 0.42	7.20 ± 0.20	6.28 ± 0.71 ^a	9.57 ± 1.18	9.34 ± 0.69	10.40 ± 0.57	46.97 ± 2.34 ^b
7	0.9 ± 0.42	1.8 ± 0.27 ^b	7.56 ± 0.87	13.12 ± 1.38 ^b	10.71 ± 0.51	17.68 ± 3.18 ^a	10.37 ± 1.16	32.69 ± 2.62 ^b
14	0.8 ± 0.37	3.2 ± 0.84 ^b	7.58 ± 0.44	20.28 ± 3.67 ^b	11.99 ± 1.61	28.90 ± 2.36 ^b	9.51 ± 0.61	17.15 ± 2.21 ^a
21	0.8 ± 0.27	3.6 ± 0.89 ^b	7.34 ± 0.53	25.18 ± 1.50 ^b	11.39 ± 0.95	47.68 ± 2.36 ^b	9.54 ± 1.02	14.89 ± 1.99 ^a

与对照组比较, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$

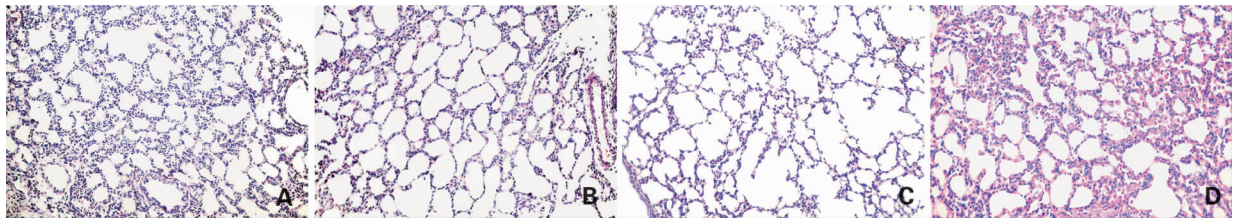


图1 肺组织形态(苏木精-伊红染色×200)。A:对照组3 d肺组织形态;B:实验组3 d肺组织形态,肺泡间隔渐增厚,肺泡间隔有炎性细胞浸润;C:对照组21 d肺组织形态,随着日龄增加,逐渐肺泡化;D:实验组21 d肺组织形态,肺泡结构消失,肺间质细胞明显增加。

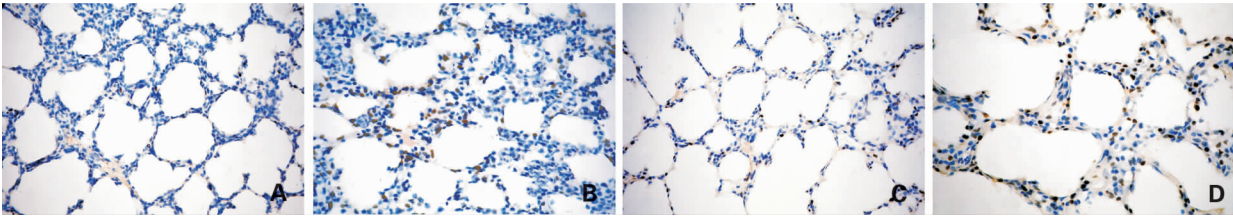


图2 肺组织PCNA量的表达(免疫组化×400)。A:对照组7 d肺组织PCNA蛋白表达;B:实验组7 d肺组织PCNA蛋白表达,细胞核染成棕黄色为阳性细胞,和对照组相比,阳性细胞增多;C:对照组21 d肺组织PCNA蛋白表达;D:实验组21 d肺组织PCNA蛋白表达,细胞核染成棕黄色为阳性细胞,实验组随日龄增加,肺间质阳性细胞明显增多,说明细胞增殖明显。

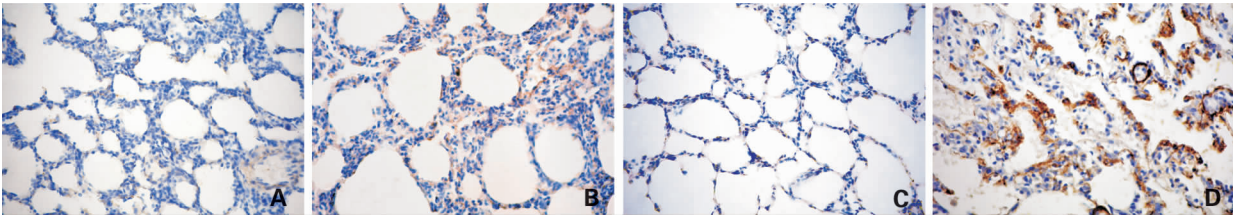


图3 肺组织CDK4基因的表达式(原位杂交×400)。A:对照组7 d肺组织CDK4基因的表达式;B:实验组7 d肺组织CDK4基因的表达式,细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞,说明CDK4表达开始增强;C:对照组21 d肺组织CDK4基因的表达式;D:实验组21 d肺组织CDK4基因的表达式,细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞,说明随着日龄增加,CDK4表达明显增强,促进细胞增殖。

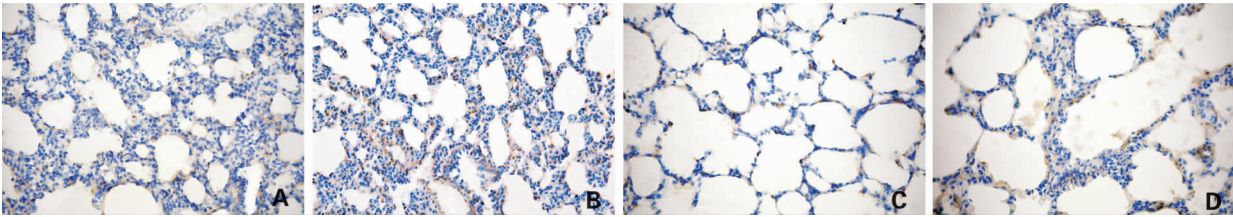


图4 肺组织p21基因的表达式(原位杂交×400)。A:对照组3 d肺组织p21基因表达式;B:实验组3 d肺组织p21基因表达式,细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞;C:对照组21 d肺组织p21基因表达式;D:实验组21 d肺组织p21基因表达式,细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞,说明随着日龄增加,p21基因表达下降,对细胞的增殖有抑制作用。

2.4.2 两组肺组织细胞 p21 mRNA 表达强度

实验组 1 d,3 d p21 mRNA 表达明显高于对照组($P < 0.01$),7 d 实验组高于对照组($P < 0.01$)后持续下降,14 d,21 d 仍高于对照组($P < 0.05$)。见表 1 和图 4。

2.5 肺组织细胞 CDK4 mRNA、p21 mRNA 表达

肺组织细胞 CDK4 mRNA, p21mRNA 表达分别与 PCNA 呈显著正、负相关(r 分别为 0.83 和 -0.81, $P < 0.05$)。

3 讨论

氧疗是早产儿最常见的临床治疗手段,现研究认为持续吸入高浓度氧(如浓度为 0.4 ~ 1.0)、高气压或容量伤、早产和感染是 CLD 发生的高危因素,目前将 CLD 定义为生后 28 d 或矫正胎龄 36 周仍需吸氧者^[7],近年来,曾有学者研究证实^[8]:暴露于高浓度氧 14 d 的早产大鼠,其病理生理过程和肺组织形态学改变为纤维化与早产儿 CLD 相似。

本实验观察早产大鼠持续吸入高浓度氧肺组织的病理变化,结果发现随着吸氧时间的增加,肺间质呈局灶性团块状实变发生增生性改变即肺组织纤维化,同期肺纤维化评分和肺组织的病理改变相一致,说明随着高氧暴露时间的延长,肺组织的增生性改变逐渐加重。这与以往的报道相类似^[9]。

细胞增殖在器官的生长发育、损伤后的组织重建中发挥重要的作用,细胞增殖能力的判定指标是PCNA,它出现在增殖细胞中为DNA复制和修复所必需,PCNA是判定细胞增殖状态的最有效的标志物之一^[10]。目前有关高氧对细胞增殖影响的研究较多,但研究的结果各异,大多数学者的研究结果证实高氧抑制肺细胞的增殖^[11,12],然而亦有相反观点^[13]。

本实验建立在高氧致CLD的动物模型基础上采用免疫组化的方法,动态观察肺细胞增殖指数PCNA,结果发现1 d、3 d表达降低,7 d后持续上升。该结果提示肺细胞早期增殖受抑,晚期增殖活跃且以肺间质细胞为主。说明高氧致CLD中随着吸氧时间的延长存在肺组织间质细胞的过度增殖。

细胞增殖是由细胞周期调控的。在细胞周期中G₁期是决定细胞增殖状态的关键时期。在G₁期CyclinD与CDK4结合导致CDK4的活化水平增高,CDK4是决定细胞增殖进程的关键分子^[14]。p21是周期蛋白依赖性蛋白激酶的抑制物之一,p21控制CDK酶活性影响细胞周期^[15],由此可见在细胞周期的调控中CDK4和p21对细胞的相互作用决定细胞的增殖进程。细胞周期调控细胞增殖同样见于新生大鼠肺细胞增殖情况,这在以往的实验中已得到证实^[16,17]。

近年来关于细胞增殖研究多用于肿瘤的发生、发展中。有关高氧致CLD肺细胞过度增殖与细胞周期调控蛋白的关系目前研究较少。近年来,Gaben等^[18]发现在体外培养的细胞中CDK4有促进成纤维细胞的增殖作用。在动物实验中Das等^[19]给予早产狒狒暴露高氧环境后,CDK4和CDK1的表达均有异常,暴露于高氧6~14 d后抑制肺上皮细胞的增殖。而在早产125 d狒狒给予高氧发展成CLD模型中,早期2~6 d p21的表达较14~21 d增加3倍抑制肺上皮细胞的增殖导致肺泡的发育不全,而且在14~21 d在间质细胞中有p21表达,与间质细胞的增生有关^[20]。另有研究^[21]指出:在AxCap21转染的鼠(给予博莱霉素诱导致肺纤维化)中肺组织炎性细胞和肺纤维化程度较对照组明显减低,而且同期肺组织羟脯氨酸的含量也明显降低,Zhou

等^[22]的研究的结果也类似。然而有学者提出相反的观点,Blundell等^[23]研究表明在博莱霉素诱导的肺纤维化的模型中p21 mRNA的表达水平在7 d和对照组相比虽有增高但无统计学差异,在14 d p21 mRNA在发生纤维化的肺组织中表达明显增加,有统计学上的意义。

我们应用原位杂交技术,观察CDK4 mRNA和p21 mRNA在CLD肺组织细胞中的表达规律,结果发现:肺组织细胞CDK4 mRNA的表达1 d、3 d两组无差异,7 d后持续上升,而且7~21 d CDK4 mRNA的表达与PCNA之间呈显著正相关。说明CDK4 mRNA的表达增强促进肺细胞的增殖。而肺组织细胞p21 mRNA的表达1 d、3 d明显高于对照组,7 d后持续下降,实验组7~21 d P21 mRNA的表达与PCNA之间呈显著负相关。说明P21 mRNA对肺细胞的增殖有抑制作用。

本实验结果提示在高氧致CLD肺细胞的过度增殖中存在的CDK4、p21的动态变化。肺组织细胞中CDK4基因表达增强,p21基因表达水平下降可能使Rb蛋白磷酸化增强,加速细胞周期G₁/S进展,最终导致肺细胞的增殖。有关CDK4、p21是如何使Rb蛋白磷酸化加速细胞周期的运转有待于我们进一步的研究证实。本实验从细胞周期蛋白水平上阐明了高氧致CLD中肺细胞增殖的发生机制,并随着吸氧时间的延长,肺细胞增殖活跃以间质为主,肺纤维化也逐渐明显,由此说明肺组织细胞CDK4、p21的动态变化与肺细胞增殖、肺纤维化有关,然而在高氧中CDK4、p21导致肺细胞增殖同时是如何影响肺纤维化的发生发展还有待于进一步深入的研究。

[参 考 文 献]

[1]

Cederqvist K, Sorsa T, Tervahartiala T, Maisi P, Reunanen K, Lassus P, et al. Matrix metalloproteinases-2, -8, and-9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress [J]. *Pediatrics*, 2001, 108(3):686-692.

[2]

O'Reilly MA, Stavensky RJ, Watkins RH, Reed CK, de Mesy Jensen KL, Finkelstein JN, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(6):703-710.

[3]

Radomski A, Sawicki G, Olson DM, Radomski MW. The role of nitric oxide and metalloproteinases in the pathogenesis of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 125(7):1455-1465.

[4]

Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, Last JA. TGF-β₁ causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice [J]. *Thorax*, 2003, 58(9):772-777.

[5]

富建华,薛辛东.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[J].*中国当代儿科杂志*, 2004, 6(1):

23-25.

[6] Tashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. J Clin Pathol, 1988, 41(2):467-470.

[7] Jobe AH, Banealari E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7):1723-1729.

[8] American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn. Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants [J]. Pediatrics, 2002, 109(2):330-338.

[9] 刘雪雁, 赵小东, 薛辛东. 持续吸入高浓度氧对新生大鼠肺的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12():78-84.

[10] Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yucc, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin in section; an index of cell proliferation with evidence de-regulated expression in some neoplasms[J]. J Pathol, 1990, 162(4):285-293.

[11] Staversky RJ, Watkins RH, Wright TW, Hemady E, LoMonaco MB, D'Angio CT, et al. Normal remodeling of the oxygen-injured lung requires the cyclin- dependent kinase inhibitor p21 (Cip1/WAF1/Sdi1) [J]. Am J Pathol, 2002, 161(3):1383-1393.

[12] Rancourt RC, Keng PC, Helt CE, O'Reilly MA. The role of p21 (Cip1/WAF1) in growth of epithelial cells exposed to hyperoxia [J]. Am J Physiol, 2001, 280(4):L617-L626.

[13] 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.

[14] Wahl SM, McCartney-Francis N, Mengenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta [J]. Immunol Today, 1989, 10(8):258-261.

[15] 王恒梁. p21 研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1996, 23(4):141-143.

[16] O'Reilly MA, Vitiello PF, Gchen SC, Staversky RJ. p21 (Cip1/WAF1/Sdi1) does not affect expression of base excision DNA repair enzymes during chronic oxidative stress [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(5-6):719-725.

[17] Helt CE, Staversky RJ, LeeYJ, Bambara RA, Keng PC, O'Reilly MA. The Cdk and PCNA domains on p21Cip1 both function to inhibit G₁/S progression during hyperoxia[J]. Am J Physiol, 2004, 286(3):L506-513.

[18] Gaben AM, Sancier C, Bedin M, Barbu V, Mester J. Rapamycin inhibits cdk4 activation, p21 (WAF1/Cip1) expression and G₁-phase progression in transformed mouse fibroblasts [J]. Cancer, 2004, 108(2):200-206.

[19] Das KC, Ravi D. Altered expression of cyclins and cdks in premature infant baboon model of bronchopulmonary dysplasia[J]. Antioxid Redox Signal, 2004, 6(1):117-127.

[20] O'Reilly MA, Watkins RH, Staversky RJ, Maniscalco WM. Induced p21 Cip1 in premature baboons with CLD: implications for alveolar hypoplasia[J]. Am J Physiol, 2003, 285(4):L964-971.

[21] Inoshima, Kuwano K, Hamada N, Yoshimi M, Maeyama T, Hagimoto N, et al. Induction of CDK inhibitor p21 gene as a new therapeutic strategy against pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol, 2004, 286(2):L727-733.

[22] Zhou Z, Song R, Fattman CL, Greenhill S, Albers, Oury TD. Carbon monoxide suppresses bleomycin-induced lung fibrosis[J]. Am J Pathol, 2005, 166(1):27-37.

[23] Blundell R, Kaminski N, Harrison D. Increase in p21 expression independent of the p53 pathway in bleomycin-induced lung fibrosis [J]. Exp Mol Pathol, 2004, 77(3):231-237.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 594 页)

[3] Wang R, Zagariya A, Ibarra-Sunga O, Gidea C, Ang E, Deshmukh S, et al. Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol, 1999, 276(5 Pt 1):L885-L889.

[4] 李玖军, 俞志凌, 薛辛东. 卡托普利在高氧肺损伤模型中的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(1):41-44.

[5] Cherukupalli K, Larson JE, Rotschild A, Thurlbeck WM. Biochemical, clinical, and morphologic studies on lungs of infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. Pediatr Pulmonol, 1996, 22(4):215-29.

[6] Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist [J]. Thorax, 2004, 59(1):31-38.

[7] Mancini GB, Khalil N. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits pulmonary injury[J]. Clin Invest Med, 2005, 28(3):118-126.

[8] Yao HW, Zhu JP, Zhao MH, Lu Y. Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Respiration, 2006, 73(2):236-242.

[9] Inder TE, Graham P, Sanderson K, Taylor BJ. Lipid peroxidation as a measure of oxygen free radical damage in the very low birth-weight infant [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1994, 70(2):F107-111.

[10] Varsila E, Pesonen E, Andersson S. Early protein oxidation in the neonatal lung is related to development of chronic lung disease [J]. Acta Paediatr, 1995, 84(11):1296-1299.

[11] 富建华, 薛辛东. 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 [J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(1):23-26.

[12] Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: Is there a role for extracellular superoxide dismutase [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(12 Pt 2):S38-43.

[13] Davis J, Rosenfeld W, Parod R, Richter S, Gewolb L, Couser R, et al. Improved pulmonary outcome at one year corrected age in premature neonates treated with recombinant human superoxide dismutase[J]. Pediatr Res, 2000, 47(3):395 A.

[14] Gatsura SV, Zinchuk VV. Effect of enalapril maleate and losartan on the size of experimental myocardial infarction hemoglobin affinity to oxygen and various parameters of lipid peroxidation[J]. Eksp Klin Farmakol, 2004, 67(1):19-21.

(本文编辑:吉耕中)