

论著·实验研究

## 促红细胞生成素对新生大鼠高氧肺损伤 细胞凋亡的影响

丁璐 吴本清 黄进洁 刘智屏 陈丽

(暨南大学第二临床学院深圳市人民医院新生儿科,广东 深圳 518020)

**[摘要]** 目的 探讨人重组促红细胞生成素(rhEPO)对新生大鼠高氧肺损伤细胞凋亡的影响。方法 96只新生 Sprague-Dawley 大鼠随机分为4组:空气+生理盐水(NS)组,空气+rhEPO组,高氧+NS组,高氧+rhEPO组。后两组暴露于95%氧气中,高氧+rhEPO组于高氧暴露后2 d、4 d、6 d给予 rhEPO 800 U/kg皮下注射,空气+rhEPO组于同样时间点给予等量 rhEPO。各组氧暴露后第3、7、14天随机抽取8只大鼠处死并取肺组织,苏木精-伊红染色观察病理变化,蛋白印迹法测定 p-JNK 水平,TUNEL法测定细胞凋亡。结果 与空气+NS组比较,高氧+NS组3 d出现肺泡炎性反应渗出,7 d更为明显,14 d出现肺泡数量减少,大小不均,肺大泡形成,高氧+rhEPO组的病理改变减轻,炎性反应细胞浸润减少。高氧+rhEPO组肺组织 p-JNK 水平较高氧+NS组有所减少,细胞凋亡减轻。结论 促红细胞生成素能通过减少细胞凋亡对新生大鼠高氧肺损伤起保护作用,其作用可能是通过 JNK 途径所介导。  
[中国当代儿科杂志,2010,12(7):576-579]

**[关键词]** 支气管肺发育不良;促红细胞生成素;凋亡;新生大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)07-0576-04

### Effect of erythropoietin on apoptosis following hyperoxic lung injury in neonatal rats

DING Lu, WU Ben-Qing, HUANG Jin-Jie, LIU Zhi-Ping, CHEN Li. Department of Neonatology, Second Affiliated Hospital of Jinan University/Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China (Wu B-Q, Email: wubenqing783@126.com)

**Abstract: Objective** To study the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on apoptosis following hyperoxic lung injury in neonatal rats. **Methods** Ninety-six neonatal Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: air-exposed control, air-exposed rhEPO-treated, hyperoxia-exposed placebo (95% oxygen), and hyperoxia-exposed rhEPO-treated. rhEPO (800 U/kg) was administered 2, 4, and 6 days after air or hyperoxia exposure. The rats were sacrificed 3, 7 and 14 days after air or hyperoxia exposure for the assessment of lung histological changes by hematoxylin and eosin staining ( $n=8$  each time point). p-JNK levels were measured by Western blot. Lung cell apoptosis was evaluated by TUNEL assay. **Results** Compared with the air-exposed control group, inflammatory cell infiltration was found at 3 days and increased obviously at 7 days, and widening of the alveolar septa was observed, the number of alveoli decreased and normal alveolarization disappeared at 14 days after hyperoxia exposure in the hyperoxia-exposed placebo group. rhEPO treatment alleviated significantly the hyperoxia-induced alterations in lung pathology. p-JNK protein levels and the number of apoptosis cells decreased significantly in the hyperoxia-exposed rhEPO-treated compared with those in the hyperoxia-exposed placebo group. **Conclusions** rhEPO may reduce apoptosis and thus provide a protective effect against hyperoxic lung injury in neonatal rats. JNK signal pathway may be involved in the protective mechanism.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7):576-579]

**Key words:** Bronchopulmonary dysplasia; Recombinant human erythropoietin; Apoptosis; Neonatal rats

早产儿支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿较为常见的肺部疾病,有较高的死亡率和再入院率。病因尚不明确,目前认为是由多因素所引起,在遗传易感性的基础上,由肺

发育不成熟、肺损伤和损伤后的异常修复所致。其中,吸入高体积分数氧(高浓度氧)被大量实验证明与 BPD 发生相关。现阶段的治疗以综合管理为主,尚缺乏有效的治疗手段。促红细胞生成素的抗氧

[收稿日期]2009-12-24;[修回日期]2010-02-02

[作者简介]丁璐,女,硕士,主治医师。

[通信作者]吴本清,主任医师。

化、抗凋亡、抗炎性反应作用近年来被关注,本研究旨在探讨促红细胞生成素对高氧肺损伤时细胞凋亡的影响及作用机制,为临床治疗 BPD 提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

足月新生 Sprague-Dawley 大鼠(出生 12 h 内),雌雄不限,平均出生体质量 6.8 g,由广东省中医药大学提供,重组人促红素注射液(rhEPO),由沈阳三生制药有限责任公司生产,剂型为 10 000 U/支(1 mL),批准文号:S20010001。

### 1.2 动物模型制备

新生大鼠被分为 4 组,每组共 24 只,即空气 + 生理盐水(NS)组,空气 + rhEPO 组,高氧 + NS 组,高氧 + rhEPO 组。前两组置于空气中,后两组于生后 12 h 内(连母鼠)置于玻璃氧箱内,持续输入氧气,维持吸入氧体积分数在 950 mL/L 左右(Pigeon I 测氧仪)。用钠石灰吸收二氧化碳,使其体积分数 < 5 mL/L,温度 20 ~ 25℃,湿度 50 ~ 70%,高氧 + rhEPO 组于高氧暴露后 2 d、4 d、6 d 给 rhEPO 800 U/kg 腹部皮下注射,空气 + rhEPO 组于同样时间点给予等量 rhEPO 腹部皮下注射,空气 + NS 组及高氧 + NS 组于同样时间点给予等量 9 g/L NS 注射。每天定时开箱 30 min,添水、饲料及更换垫料,并与空气对照组交换母鼠以免因氧中毒而致喂养能力下降。

### 1.3 标本的采集及处理

于高氧暴露后第 3、7、14 天各组随机抽取 8 只(空气 + rhEPO 组及高氧 + rhEPO 组由于第 6 天才给药结束,未取第 3 天标本),称重后,以 20 g/L 戊巴比妥那 5 mL/kg 腹腔注射麻醉,打开胸腔,暴露心肺,分离双肺,左肺放入 40 g/L 甲醛中固定,石蜡包埋,制作成 5  $\mu$ m 组织切片,行形态学检查和凋亡测定。右肺放入液氮,转入 -80℃ 冰箱,用于 Western blot 测定。

### 1.4 检测指标和方法

1.4.1 肺病理形态学观察 组织切片经苏木素-伊红(HE)染色后,于光学显微镜下( $\times 200$ )观察肺组织的病理形态学变化。

1.4.2 肺组织 p-JNK Western blot 测定 肺组织于冰上匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,测定蛋白浓度,各孔加入 100  $\mu$ g 蛋白电泳,半干法转膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗为兔抗 p-JNK 多

克隆抗体,购自 CST 公司,1:1 000 稀释,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,ECL 显影,胶片曝光,利用 Quantity One 软件测光密度做统计学分析,以  $\beta$ -actin 为内参照,p-JNK 蛋白水平用 p-JNK 光密度值/ $\beta$ -actin 光密度值表示。

1.4.3 TUNEL 凋亡测定 TUNEL 检测试剂盒购自北京中杉金桥公司。切片常规脱蜡,30 g/L 过氧化氢( $H_2O_2$ )阻断内源性过氧化物酶,蛋白酶 K 消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 min  $\times$  3 次,加入 TUNEL 反应物,37℃ 孵育 60 min, PBS 洗 2 min  $\times$  3 次,滴加转化物过氧化物酶(POD),37℃ 孵育 30 min 后,进行 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,经苏木素复染,透明封片。结果判定以细胞核染成棕黄色为凋亡细胞。每张切片选择 5 个以上具有代表性高倍视野( $\times 400$ ),计算凋亡指数。凋亡指数 = 凋亡细胞数/细胞总数  $\times$  100%。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行处理,数据以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ),多组比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用  $q$  检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组新生大鼠肺组织形态学改变

光镜下 HE 染色观察:空气 + NS 组及空气 + rhEPO 组肺泡大小均匀一致,肺泡间隔较薄,肺泡毛细血管丰富,高氧 + NS 组 3 d 肺泡可见明显渗出、出血,间质水肿,7 d 仍可见渗出,14 d 肺泡数量减少,部分肺泡壁扩张、溶合,形成肺大泡,肺泡毛细血管数量减少,部分肺泡间隔增厚,高氧 + rhEPO 组病理改变较高氧 + NS 组有所减轻,肺泡毛细血管有所增多,肺泡间隔增厚不明显。

### 2.2 各组肺组织凋亡的变化

空气 + NS 组及空气 + rhEPO 组肺组织中可见少量 TUNEL 阳性细胞,而高氧 + NS 组 3 d、7 d、14 d 肺组织中可见大量的 TUNEL 阳性细胞,其凋亡指数均显著高于空气对照组, $P < 0.05$ 。凋亡细胞以肺泡上皮细胞、小气道上皮细胞及血管内皮细胞为主。高氧 + rhEPO 组凋亡细胞较高氧 + NS 组有所减少, $P < 0.05$ 。见图 1。

### 2.3 肺组织 p-JNK 蛋白表达含量的变化

Western blot 结果显示空气 + NS 组仅有少量 p-JNK 蛋白表达,高氧 + NS 组 3 d、7 d、14 d 时 p-JNK 蛋白表达含量均较空气对照组有所增加( $P < 0.05$ ),

7 d 时最高。高氧 + rhEPO 组 7 d 时表达较高氧 + NS 有所下降,14 d 时两组表达差异无统计学意义 ( $P=0.09$ ) (图 2、图 3)。

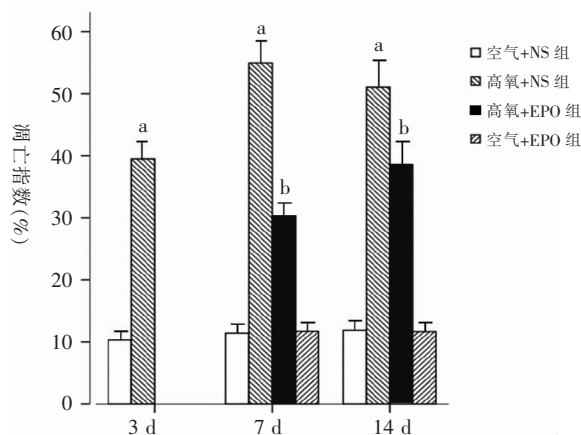


图 1 高氧、rhEPO 对肺组织凋亡指数的影响 ( $n=8$ )

a: 与空气 + NS 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与高氧 + NS 组比较,  $P < 0.05$

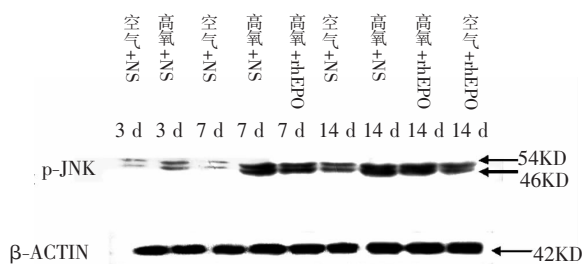


图 2 肺组织 p-JNK 蛋白表达含量

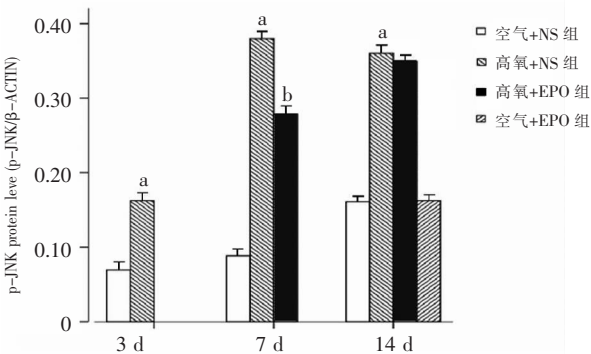


图 3 高氧、rhEPO 对新生大鼠肺组织 p-JNK 含量的影响 ( $n=8$ )

a: 与空气 + NS 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与高氧 + NS 组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

近年来由于围产医学的不断发展,特别是产前糖皮质激素应用、肺表面活性物质治疗及改良的机械通气等,早产儿的成活率明显提高,但 BPD 发病

率也不断上升。BPD 的病理改变以肺泡减少、末端肺泡结构简单化、毛细血管减少、间质重构为主要特征,最终表现为肺纤维化<sup>[1]</sup>。成年大鼠吸入 100% 高氧是致死性的,而新生大鼠可以存活,但出现肺泡结构的明显改变,3 d 发生肺部炎症反应,7 d 出现明显的渗出、水肿,14 d 肺泡腔数量减少,间质增厚、成纤维细胞增生<sup>[2]</sup>。

高氧可以通过产生过量的氧自由基、肺部炎症反应、细胞凋亡及后期的组织异常修复等途径导致肺部组织结构和功能的异常。本研究中,随高氧暴露时间延长,大鼠肺组织早期出现间质水肿,充血,渗出增多,伴炎症细胞浸润,7 d 达高峰,后出现肺泡大小不均,肺泡数量减少,部分肺泡间隔增厚,说明已成功建立高氧肺损伤模型。

高氧肺损伤以过度的炎症反应及血管内皮细胞、肺泡上皮细胞死亡为主要特征。在高氧暴露期间产生的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 被广泛认为是导致高氧肺损伤和细胞死亡的主要原因。高氧下过量产生的 ROS 可作为第二信使触发凋亡信号转导途径,从而通过调节细胞凋亡相关基因的表达和核转录因子的活化,使细胞发生凋亡。在 BPD 的研究中,凋亡细胞增加已被证实。成年小鼠暴露于 100% 氧气中 3 d 或 4 d 死于广泛的肺泡损害和肺水肿,电镜发现细胞凋亡增多<sup>[3]</sup>。新生小鼠暴露于 92% 氧气中 3 ~ 5 d,肺组织细胞凋亡率较正常空气组增加,暴露于高氧中的时间越长,凋亡细胞增加越多<sup>[4]</sup>。

本研究通过末端标记法,原位测定肺组织切片中的 DNA 片断对肺组织中细胞凋亡的程度进行评价,发现新生大鼠暴露于 95% 的高氧中,3 d、7 d、14 d 凋亡指数均较同龄空气对照组明显增加,凋亡细胞以肺泡上皮细胞、血管内皮细胞和小气道上皮细胞为主,表明细胞凋亡是高氧肺损伤的重要病理改变特点。使用 rhEPO 干预后,细胞凋亡指数较高氧组有所下降,表明 rhEPO 可以通过减少细胞凋亡而减轻肺损伤。

高氧诱导的细胞凋亡可能包含内源性和外源性两种通路,多种分子参与细胞凋亡及其调控过程,其中 MAPKs 家族可能发挥作用。JNK 又称为应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK),在氧化应激、炎症因子、紫外线等刺激下可被激活。JNK 通过其氨基酸残基双磷酸化而激活,一旦被激活,就从细胞质移位至细胞核内,通过调节转录因子 AP-1、c-jun、ATF-2、ELK-1 等的活性,对细胞的形态发生、细胞分化和凋亡的调节等方面均发挥着重要

作用。人类 JNK 蛋白激酶由 JNK1、JNK2、JNK3 3 组基因编码组成。JNK1 和 JNK2 蛋白分子量分别为 46 KD 和 54 KD,广泛表达于各种组织。JNK3 仅在大脑、心脏和睾丸中表达。用脱氧胆酸刺激肝细胞,显示出 JNK 被激活,促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。将 MLE-12 细胞暴露于 95% 的氧气中,1 h 后 JNK 的活性开始升高,16 h 明显增高,至 72 h 仍较空气对照组高,而使用 JNK 抑制剂,则可以降低 JNK 的表达,减少细胞的死亡。此外,用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于 MLE-12 细胞时,也观察到细胞的死亡是通过 JNK 途径介导的<sup>[6]</sup>。这显示出,在氧应激所致细胞死亡促进阶段有着 JNK 的激活。与体外实验相反,Morse 等<sup>[7]</sup>用 JNK 基因缺失的小鼠暴露于高氧,发现基因缺失的小鼠生存率较普通型下降,肺损伤程度更重,肺组织细胞的凋亡增加,提示 JNK 对高氧所致凋亡起抑制作用,JNK 通路参与了肺损伤保护的机制。但也有实验表明,暴露于高氧中,小鼠肺组织的 JNK 含量明显升高,细胞凋亡也随之增高<sup>[8]</sup>。给小鼠进行高潮气量机械通气 4 h,JNK 含量明显升高,在肺泡上皮细胞用 TUNEL 法测定凋亡细胞也明显增多,显示在肺泡上皮细胞中 JNK 的表达促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。

在本研究中,新生大鼠高氧暴露 3 d,可见 p-JNK 较空气组有所升高,7 d 时升高更明显,至 14 d 仍无明显下降,表明 JNK 在高氧下被激活,可能参与了细胞凋亡的过程。由于 rhEPO 干预的给药时间是实验第 2、4、6 天,故干预组只检测了 7 d 和 14 d 的凋亡指数和 p-JNK,显示 7 d 和 14 d 的细胞凋亡指数均较高氧组有所下降,而 7 d 时 p-JNK 的表达也较高氧组有所降低,提示 rhEPO 早期可能通过作用 JNK 而影响细胞凋亡。在脑外伤的动物模型中,使用 rhEPO 可以通过增加 Bcl-2 的表达而抑制凋亡<sup>[10]</sup>。在体外建立肝脏缺血再灌注模型,使用 rhEPO 干预,可减少 caspase-3 活性和 JNK 的表达,降低肝细胞凋亡,提示 rhEPO 抑制凋亡可能与 JNK 有关<sup>[11]</sup>。本研究在 7 d 组时也观察到相似的改变。但 14 d 时 rhEPO 干预组的细胞凋亡也较高氧组减少,但 JNK 下降不明显(0.35 ± 0.01 vs 0.36 ± 0.01, P > 0.05),提示在高氧后期 rhEPO 抗凋亡作用可能

并不通过 JNK 途径,而是通过其他途径来实现的。关于 rhEPO 抗凋亡机制的研究有待进一步完善。

### [参 考 文 献]

- [1] Cutz E, Chiasson D. Chronic lung disease after premature birth [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(7):743-745.
- [2] Thébaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization [J]. *Circulation*, 2005, 112(16):2477-2486.
- [3] Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF. Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death [J]. *Am J Respir Cell Mo Biol*, 1998, 19(4):573-581.
- [4] McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(2):150-155.
- [5] Usechak P, Gates A, Webster CR. Activation of focal adhesion kinase and JNK contributes to the extracellular matrix and cAMP-GEF mediated survival from bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(2):251-261.
- [6] Romashko J 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, et al. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(8):978-993.
- [7] Morse D, Otterbein LE, Watkins S, Alber S, Zhou Z, Flavell RA, et al. Deficiency in the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway confers susceptibility to hyperoxic lung injury in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(1):250-257.
- [8] Yang G, Abate A, George AG, Weng YH, Dennery PA. Maturation differences in lung NF-kappaB activation and their role in tolerance to hyperoxia [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(5):669-678.
- [9] Sakashita A, Nishimura Y, Nishiuma T, Takenaka K, Kobayashi K, Kotani Y, et al. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) attenuates subsequent ventilator-induced lung injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 571(1):62-71.
- [10] Liao ZB, Zhi XG, Shi QH, He ZH. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats [J]. *Eur J Neurol*, 2008, 15(2):140-149.
- [11] Hochhauser E, Pappo O, Ribakovskiy E, Ravid A, Kurtzswald E, Cheporko Y, et al. Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model [J]. *Apoptosis*, 2008, 13(1):77-86.

(本文编辑:黄 榕)