

CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在大鼠肺发育过程中的动态表达

祝华平 常立文 李文斌

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 细胞周期素 D1 (CyclinD1)、p21^{CIP1} 是主要的肺细胞增殖调控蛋白,参与肺发育、肺损伤修复过程。本研究观察大鼠肺发育过程中小管期、囊泡期、肺泡期等不同阶段 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 的表达特征。**方法** 分别于孕 20 d、21 d、生后 0 d、3 d、7 d、14 d、21 d 取胎鼠或新生鼠肺组织标本 ($n=6$),用免疫组织化学技术检测 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在大鼠肺发育各期定位表达,免疫印迹半定量检测大鼠肺发育过程中 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 蛋白的表达。**结果** 在大鼠肺发育各期中,小管期 CyclinD1 蛋白表达最强,肺泡期 CyclinD1 蛋白表达最弱。而 p21^{CIP1} 蛋白表达在小管期最弱,肺泡期最强。在小管期 CyclinD1 阳性表达主要定位于上皮细胞,p21^{CIP1} 表达阴性。囊泡期 CyclinD1 表达强度明显减弱,CyclinD1 和 p21^{CIP1} 阳性表达主要定位于上皮细胞和间质细胞。肺泡期 p21^{CIP1} 表达最强,CyclinD1 阳性表达主要定位于间质细胞,p21^{CIP1} 阳性表达主要定位于上皮细胞。**结论** 大鼠肺发育过程中 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在各期表达部位及数量有差异,在小管期, CyclinD1 表达最强,细胞增殖活动明显较囊泡期和肺泡期旺盛,肺泡期 p21^{CIP1} 表达最强与肺泡分隔及成熟有关。 [中国当代儿科杂志,2011,13(5):396-400]

[关键词] 肺发育;细胞周期素 D1; p21^{CIP1}; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0396-05

Dynamic expression of CyclinD1 and p21^{CIP1} during lung development in rats

ZHU Hua-Ping, CHANG Li-Wen, LI Wen-Bin. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Chang L-W, Email:lwchang@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective CyclinD1 and p21^{CIP1} are major proteins to regulate lung cell proliferation and involved in lung development and lung injury repair. This study aimed to explore the expression manners of CyclinD1 and p21^{CIP1} at canalicular, saccular and alveolar stages during lung development in Sprague-Dawley rats. **Methods** Lung tissues were obtained from fetal rats of 20 and 21 days gestational ages, and neonatal rats at 0, 3, 7, 14 and 21 days ($n=6$). Lung tissues were used for histopathology and the protein analysis of CyclinD1 and p21^{CIP1} (immunohistochemistry and Western blot). **Results** The strongest expression of CyclinD1 and the weakest expression of p21^{CIP1} occurred at 20-21 days gestation (canalicular stage). At the canalicular stage, CyclinD1 was mainly expressed in epithelial cells, and the expression of p21^{CIP1} was negative. At the saccular stage, the expression of CyclinD1 decreased significantly and the p21^{CIP1} expression increased significantly. Positive expression of CyclinD1 and p21^{CIP1} was found in epithelial cells and interstitial cells. At the alveolar stage, the CyclinD1 expression was the lowest and the p21^{CIP1} expression was the highest. The positive expression of CyclinD1 was found in interstitial cells and that of p21^{CIP1} was found in epithelial cells. **Conclusions** The location and quantity of CyclinD1 and p21^{CIP1} expression are different at various stages during lung development in rats. A strongest CyclinD1 expression found in the canalicular stage may be associated a high lung cell proliferation. A strongest p21^{CIP1} expression found in the alveolar stage may be associated with alveolar maturity.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):396-400]

Key words: Lung development; CyclinD1; p21^{CIP1}; Rats

胎儿及新生儿的肺发育与呼吸系统疾病密切相关。肺发育过程中,细胞的增殖受细胞周期调控蛋白的调节,G1/S期的转换点是决定细胞增殖的前提条件,周期素 D1 (CyclinD1)、p21^{CIP1} 是 G1 期的主要

正调控蛋白和负调控蛋白之一,其动态表达规律及相互影响在肺发育过程中起着重要作用,已有研究表明胎鼠及早产大鼠肺组织 p53 mRNA 的表达自出生后随鼠龄增加逐渐下降,至生后 5 d 最低;p21^{CIP1}

[收稿日期]2010-08-29; [修回日期]2010-10-29

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30471824)。

[作者简介]祝华平,女,博士,副主任医师。现在湖北省妇幼保健院新生儿科,邮编 430070。

[通信作者]常立文,教授。

mRNA 的表达水平在胎龄 19 d 至生后 7 d 随鼠龄增加而升高^[1]。60% 的氧暴露可通过调控 p53 及 p21^{CIP1} 途径抑制肺组织细胞增殖,进而导致早产新生鼠支气管肺发育不良的发生;85% 的氧长期暴露,可引起早产新生大鼠亚急性炎症性肺损伤和肺发育受抑^[2]。但足月新生鼠肺发育过程中细胞周期调控蛋白的表达变化尚未见报道,深入研究肺发育过程中细胞周期调控蛋白的表达变化将为新生儿肺部疾病防治提供理论依据。本研究通过对肺发育不同阶段 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 的表达规律进行观察,探讨二者对肺发育的影响及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由本校实验动物中心提供。体重 200 ~ 250 g 的 SD 大鼠雌雄 3:1 同笼过夜,母鼠阴道涂片镜检见精子定为妊娠 0 d,所有孕鼠及母鼠、新生鼠给予自由饮食和饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 肺组织标本留取 分别于孕 20 d、21 d、生后 0 d、3 d、7 d、14 d、21 d 将动物麻醉(苯巴比妥钠 50 mg/kg)处死,每一时间点分别取胎鼠或新生鼠 6 只留取肺标本,部分标本经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片供组织学检查,部分标本置液氮罐中冷冻后于 -70℃ 冰箱保存以备提取肺组织总蛋白。

1.2.2 肺组织形态学检查 取肺石蜡块 5 μm 切片,常规苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织发育情况。

1.2.3 免疫组织化学检测 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在肺组织中的表达 切片常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶活性,微波修复抗原,正常山羊血清封闭,滴加一抗(小鼠单克隆 CyclinD1 抗体,小鼠单克隆 p21^{CIP1} 抗体,均为 Santacruz 产品)。加生物素标记羊抗小鼠 IgG,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液(S-A/HRP),DAB 室温显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片。在高倍镜下观察 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 表达的分布强度。

1.2.4 Western blot 检测肺组织 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 表达强度 冰浴条件下,1 g 肺组织经匀浆器磨碎,PBS 洗涤 2 次后,加 1 mL 三去污剂裂解液冰浴 30 min 裂解细胞;4℃,12000 g 离心 10 min,弃除沉淀,取上清即为肺组织总蛋白,考马斯亮蓝法对所提肺组织总蛋白进行蛋白定量,取样本蛋白 50 μg 泳

道上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,半干式电转移将蛋白转移到硝酸纤维素膜,用封闭液(1 × TBS,5% 牛奶,0.05% Tween-20)室温封闭 1 h,洗膜后分别用工作浓度 1:400 的小鼠抗大鼠 CyclinD1、p21^{CIP1}、β-actin 单克隆抗体为一抗,工作浓度 1:200 的羊抗小鼠 IgG 为二抗与 NC 膜进行免疫反应,最后用化学发光法显色,按增强化学发光法说明加入 ECL 试剂,室温下温育 2 ~ 4 min 后对 X 光片曝光。用 GDS-8000 型医学彩色图象分析系统扫描曝光后显示 X 光片上的显影条带,测定各显色条带的 A 值,并进行光密度扫描分析,以 p21^{CIP1}/β-actin、CyclinD1/β-actin 曝光后显影条带 A 值比值分别代表 p21^{CIP1}、PCNA、CyclinD1 蛋白表达的相对含量。

1.3 统计学分析

采用 SAS 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,组间比较采用单因素方差分析及 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织形态学

大鼠胎龄 20 d 时,肺发育处于小管期,支气管及细支气管的管腔变大,细支气管盲端扩张形成终末囊泡,以后发育成肺泡管,间质中出现毛细血管;生后 3 d 时,肺组织基本结构为终末囊泡,腔大壁厚,有嵴突向腔内,囊泡内可见许多间质细胞,肺泡数目少;7 d 时,嵴明显增多,肺泡数目显著增多;14 d 时,肺泡数目增多更显著,肺组织基本结构单位为肺泡,但肺泡壁较厚,仍有较多间质细胞;21 d 时肺泡数目较 14 d 时无明显增加,但腔小壁薄,间质细胞少或消失。见图 1。

2.2 CyclinD1 和 p21^{CIP1} 在肺组织中的表达

免疫组化结果显示 CyclinD1 阳性表达定位于胞核。胎龄 20、21 d 时,CyclinD1 在所有的肺间隔表现一定程度的阳性核染色,气道和远端上皮表现出强染色,上皮细胞及间质细胞均可见表达,但以上皮细胞表达为主;以后表达强度逐渐减弱,于生后第 21 天最弱,表达部位逐渐变为以间质细胞为主。见图 2。

免疫组化 p21^{CIP1} 阳性表达定位于胞核。在胎龄 20、21 d 时,p21^{CIP1} 呈阴性表达,其后表达逐渐增加,于生后第 21 天时达高峰,但表达强度仍较弱且以上皮细胞为主。见图 3。

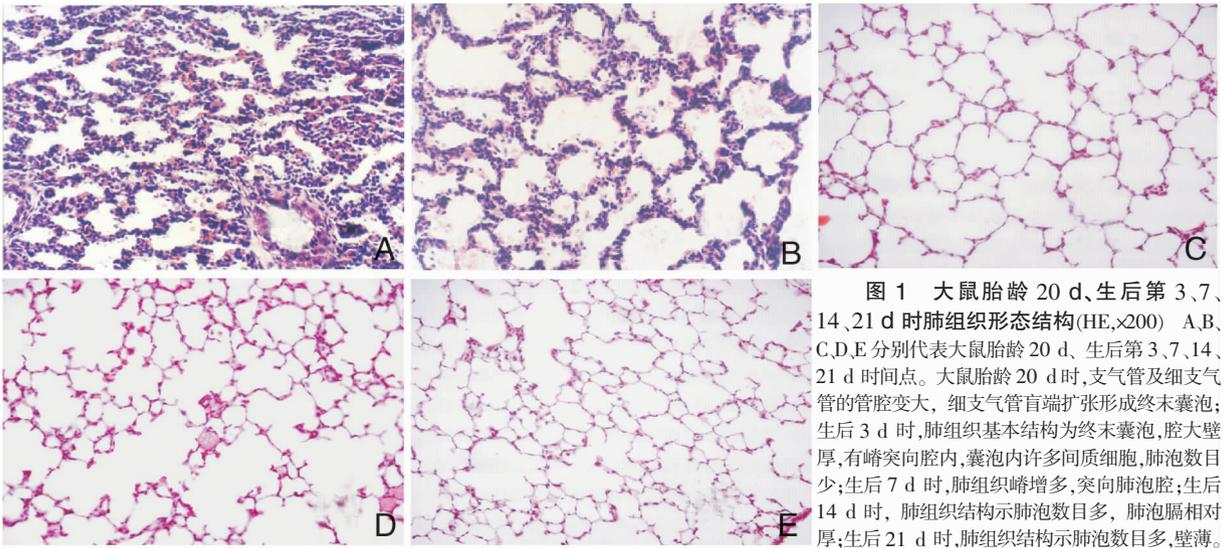


图1 大鼠胎龄20 d、生后第3、7、14、21 d时肺组织形态结构(HE, ×200) A、B、C、D、E分别代表大鼠胎龄20 d、生后第3、7、14、21 d时间点。大鼠胎龄20 d时,支气管及细支气管的管腔变大,细支气管盲端扩张形成终末囊泡;生后3 d时,肺组织基本结构为终末囊泡,腔大壁厚,有嵴突向腔内,囊泡内许多间质细胞,肺泡数目少;生后7 d时,肺组织嵴增多,突向肺泡腔;生后14 d时,肺组织结构示肺泡数目多,肺泡膈相对厚;生后21 d时,肺组织结构示肺泡数目多,壁薄。

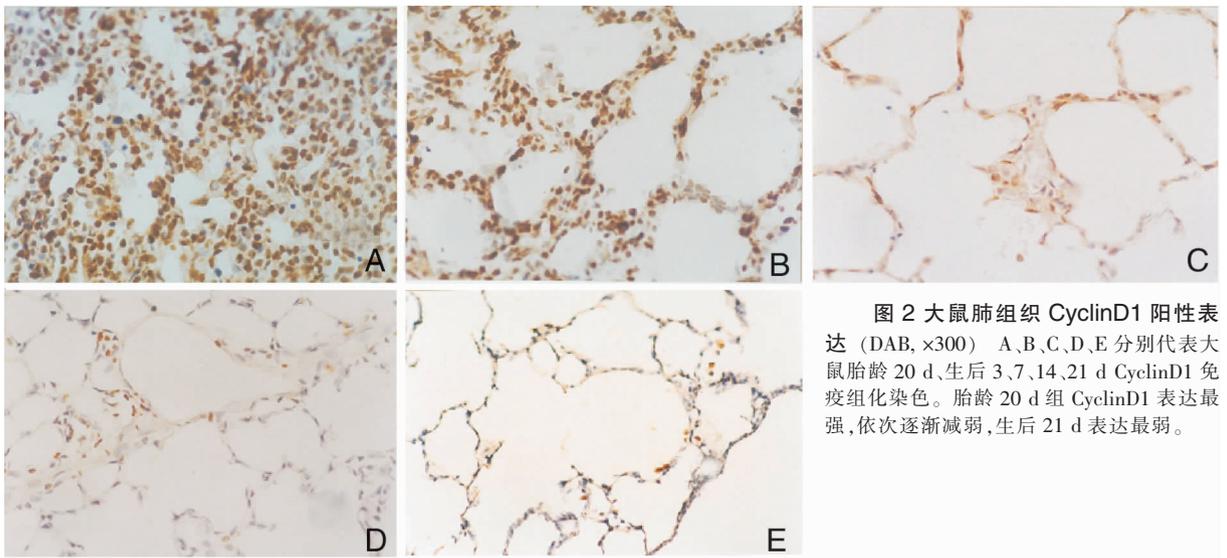


图2 大鼠肺组织 CyclinD1 阳性表达 (DAB, ×300) A、B、C、D、E 分别代表大鼠胎龄20 d、生后3、7、14、21 d CyclinD1 免疫组化染色。胎龄20 d组 CyclinD1 表达最强,依次逐渐减弱,生后21 d表达最弱。

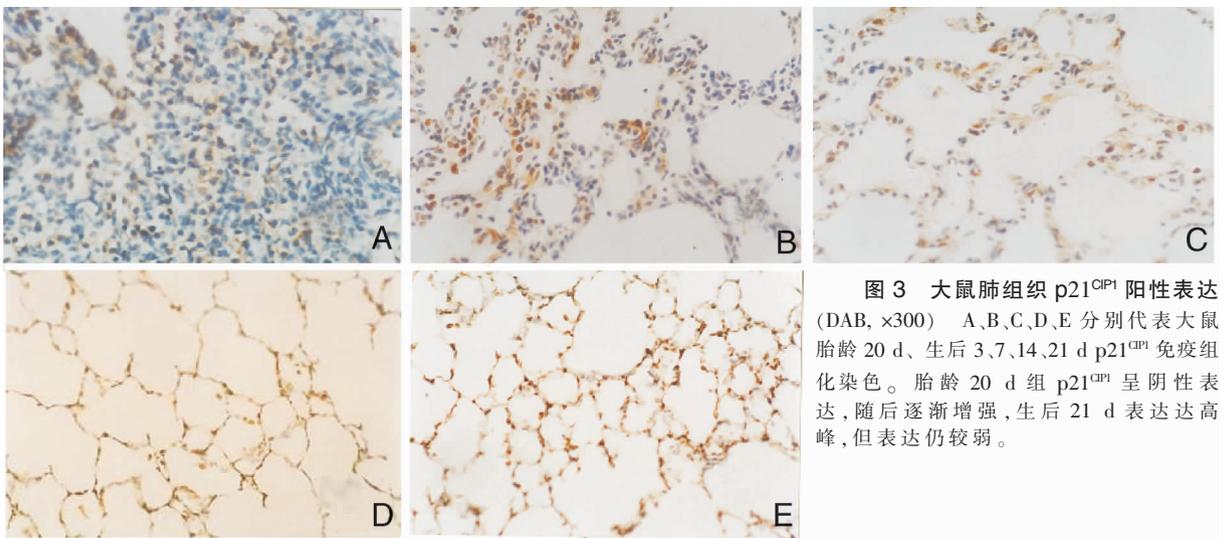


图3 大鼠肺组织 p21^{CIP1} 阳性表达 (DAB, ×300) A、B、C、D、E 分别代表大鼠胎龄20 d、生后3、7、14、21 d p21^{CIP1} 免疫组化染色。胎龄20 d组 p21^{CIP1} 呈阴性表达,随后逐渐增强,生后21 d表达达高峰,但表达仍较弱。

Western blot 结果表明, CyclinD1 在胎龄 20 d 时表达最高(0.42 ± 0.03), 随后逐渐降低, 持续至生后 21 d 最低(0.07 ± 0.02)。在胎龄 20 d 时 p21^{CIP1} 表达水平最低(0.023 ± 0.002), 其后表达逐渐增加, 持续至生后 21 d 最高(0.33 ± 0.03)。见图 4。

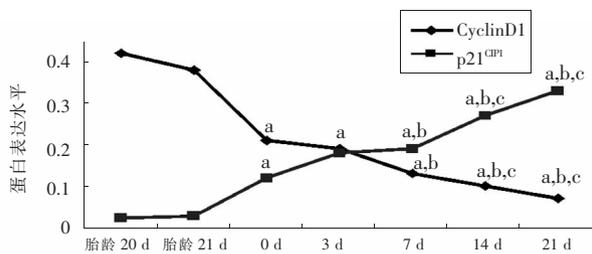


图4 不同时间点大鼠肺组织 CyclinD1、p21^{CIP1} 蛋白表达(Western blot) a: 与胎龄 20 d、21 d 比较, P < 0.01; b: 与 0 d 比较, P < 0.01; c: 与 3 d 比较, P < 0.01

3 讨论

大鼠肺发育分假腺体期、小管期、囊泡期、肺泡期和成熟期等 5 期, 其中肺小管期(胎龄 19 ~ 20 d)、囊泡期(出生至生后 3 d)、肺泡期(生后 5 d 至生后 21 d)是肺发育的关键时期^[3]。研究肺发育过程中增殖相关基因表达的特点, 对探讨肺发育过程中的相关机制有重要意义。

细胞增殖有赖细胞周期活动, 而细胞周期的完成有赖于正、负调控蛋白之间的平衡。G1 后期存在一限制点, G1 期内调控蛋白合成累积到使细胞越过此限制点, 就出现不依赖于胞外刺激生长因子(GF)而完成细胞周期的现象^[4]。与 G1 期有关的周期素有 D、E、C 型, CyclinD(包括 CyclinD1、CyclinD2、CyclinD3)在正常细胞中的功能是促进细胞周期, 与细胞增殖有关。其中 CyclinD1 在进入细胞周期即有表达, G1 后期达高峰, 是控制 G1 期转换到 S 期(G1/S)的关键因子, CyclinD1 决定了 G1 期时间^[5]。p21 的表达与细胞周期的抑制相关, 主要通过以下两个机制抑制细胞周期: ① p21^N 末端与周期素-CDK 复合物结合, 使 PRb 磷酸化不能释出细胞转录活化因子 E2F, 从而使细胞周期停滞; ② 与细胞增殖核抗原(PCNA)结合形成 p21-PCNA-周期素-CDK, 从而 DNA 复制受阻, 使细胞周期停滞于 G1 期^[6]。因此 p21 作为一个可诱导的生长抑制剂, 使细胞脱离细胞周期, 发生分化, 在个体发育中有重要意义。

本研究结果表明在肺发育过程中的不同时期,

CyclinD1 和 p21^{CIP1} 均有不同程度的表达, 其表达部位和表达量在不同时期有差异。在小管期阶段, 细胞的增殖活动明显旺盛, CyclinD1 阳性细胞数量多, 集中分布于支气管黏膜上皮、远端肺泡上皮, 而间质中仅可见少量, 呈散在分布状态, p21^{CIP1} 呈阴性。以后, 随原始肺泡发育, 肺呼吸部逐渐形成, 胎肺处于精细结构的调整阶段, 上皮细胞仍呈现活跃增殖状态, 各级支气管壁散在可见 CyclinD1 阳性细胞的表达, 数量较小管期减少。小管期、囊泡期以 CyclinD1 的表达为主, 可能与主要参与肺泡上皮增殖及支气管、血管等形成有关, 其作用在于增大肺的体积及建立气体交换的表面积。而后 CyclinD1 表达虽然逐渐降低, 但直至生后 21 d 仍有表达, 说明在生后肺持续发育。而 p21^{CIP1} 的表达方式则相反, 小管期 p21^{CIP1} 表达阴性, 囊泡期 p21^{CIP1} 明显升高, 表达部位主要定位在上皮细胞和间质细胞。囊泡期肺上皮和间质细胞 p21^{CIP1} 表达逐渐增多, 其作用可能在于遏制支气管树的继续分支, 减少间质厚度使毛细血管更贴近气道的上皮, 以适应气-血屏障的建立。肺泡期, 肺的形态发育已趋于完成, 进入微细结构的精细调整阶段, 尤其是远端终末囊泡向成熟肺泡的演化, p21^{CIP1} 表达作用可能在于促进细胞分化, 抑制细胞增殖。在肺泡形成及再分的关键时期(肺泡期)浓度达高峰, 且表达越强, 肺泡发育越成熟。此期肺泡分隔频繁, 成纤维细胞凋亡, 使肺泡壁变薄^[7], 故推测 p21^{CIP1} 与肺泡分隔及成熟有关。O'Reilly 等^[8]研究发现 p21 可抑制氧气暴露的肺细胞增殖, 当用氧气和机械通气治疗早产儿慢性肺疾病时, 肺上皮和基质细胞增殖就会发生紊乱, p21 在新生儿慢性肺疾病紊乱的细胞增殖和肺泡增生中发挥重要作用。丁璐等^[9]发现新生大鼠暴露于 95% 的高氧中 3 d、7 d、14 d, 肺细胞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。李玉祥等^[10]研究表明在高浓度供氧下, 肺组织通过暂时上调 p53 基因的表达, 介导细胞周期停滞, 阻止 G0/G1 期细胞进入 S 期, 抑制细胞分裂、增殖, 同时 p53 促进细胞凋亡, 从而导致肺生长发育受阻和肺损伤。王伟等^[11]观察宫内脂多糖炎性预敏及生后 60% 氧暴露对肺增殖性细胞核抗原(PCNA)及肺细胞凋亡影响的动态变化规律及 Bcl-2 家族中 Bax、Bcl-2 基因的表达对肺细胞凋亡的调控作用, 发现宫内炎性预敏及生后高氧暴露可抑制肺细胞增殖, 可能通过提高 Bax/Bcl-2 的表达途径使肺组织细胞过度凋亡, 进而导致 BPD

的发生。

综上所述,肺发育过程中肺细胞增殖和凋亡相关基因在时间和空间上的有序表达使新生肺得以正常发育。一旦某些病理或致畸因素如早产、宫内炎症、高氧暴露等的干扰出现于肺发育的不同时期,则可能导致肺细胞增殖和凋亡平衡紊乱,进而导致肺发育的异常。因此,深入研究肺发育过程中细胞周期调控蛋白的表达变化将为新生儿肺部疾病治疗与预防提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 王伟,余肖,宁琴,罗小平.高体积分数氧暴露对早产大鼠肺p53和细胞周期调节基因表达的影响[J].实用儿科临床杂志,2009,24(14):1058-1060.
[2] 钱莉玲,常立文,张谦慎,容志惠.85%高浓度氧长期暴露诱发早产大鼠肺损伤[J].中国当代儿科杂志,2003,5(2):95-99.
[3] McMurtry IF. Introduction: pre- and postnatal lung development, maturation, and plasticity[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(3): L341-L344.
[4] Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins[J]. Cell, 1993, 73(6): 1059-1065.

[5] Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, et al. P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest [J]. Cell, 1994, 76(5):1013-1023.
[6] Cayrol C, Ducommun B. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21 [J]. Oncogene, 1998, 17(19): 2437-2444.
[7] Luyet C, Burri PH, Schittny JC. Suppression of cell proliferation and programmed cell death by dexamethasone during postnatal lung development [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(3): L477-L483.
[8] O'Reilly MA, Watkins RH, Staversky RJ, Maniscalco WM. Induced p21Cip1 in premature baboons with CLD: implications for alveolar hypoplasia [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(4): L964-L971.
[9] 丁璐,吴本清,黄进洁,刘智屏,陈丽.促红细胞生成素对新生大鼠高氧肺损伤细胞凋亡的影响[J].中国当代儿科杂志,2010,12(7):576-579.
[10] 李玉祥,罗小平,廖玲洁,刘皖君,宁琴.高氧对新生大鼠肺caspase-3和p53基因表达及肺细胞凋亡的影响[J].中华儿科杂志,2005,43(8):585-590.
[11] 王伟,余肖,宁琴,罗小平.宫内炎性预敏和生后高氧暴露对早产大鼠肺Bax和Bcl-2基因表达和肺细胞增殖及凋亡的影响[J].中华儿科杂志,2009,47(10):767-773.

(本文编辑:俞 燕)

· 消息 ·

国家级儿童保健继续医学教育高级学习班通知

2011年第11期卫生部国家级儿童保健继续医学教育高级研修学习班将由重庆医科大学主办。授予学员国家级继教I类学10分。

一、讲授内容

特别邀请上海复旦大学儿科医院徐秀教授、上海儿童医学中心李斐博士副教授、上海复旦大学儿科医院《循证儿科杂志》编辑部张崇凡主任、重庆医科大学儿童医院杨锡强教授、北京和睦家医院 Carlynn Y. Sze 营养师、重庆医科大学儿童医院熊丰教授授课。教学内容包括国内外儿童生长营养指南介绍、儿童体格生长评价与应用、儿童营养研究进展(肠道发育、进食技能发育、益生菌、贫血研究进展、...)、发育行为儿科学的发展、行为发育学的神经学基础、临床营养师在临床疾病中作用、临床科研文章的撰写、以及学科建设与发展等最新知识。

二、报名时间:2011年5月1日~7月2日

三、学习时间:2011年7月3日~6日

四、报名费:600元(住宿、资料回地位报销)

五、联系人:重庆医科大学儿童医院儿保科 胡燕 蒋志阳 刘晓 邮编:400014

电话:023-63622764 Email: jiang_1100@yahoo.com.cn; caretoo@163.com

重庆医科大学儿童医院 儿保科