

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.11.016

论著·实验研究

脂肪型脂肪酸结合蛋白在早产大鼠 高氧肺损伤时的表达

王伟¹ 崔志瑞¹ 蔡丽霞¹ 罗小平²

(1. 郑州大学第三附属医院儿科, 河南 郑州 450052;
2. 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** 观察脂肪型脂肪酸结合蛋白4 (FABP4) 在早产大鼠高氧肺损伤时肺组织及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的表达, 探讨其与新型支气管肺发育不良 (BPD) 发病机制之间的关系。**方法** 早产大鼠出生后6 h内随机分为高氧组和对照组, 对照组置于常压空气中, 高氧组置于浓度为60%的高氧舱中, 两组均于出生后第3天 (P3)、第7天 (P7) 和第14天 (P14) 各随机取8只大鼠, 采用免疫组织化学方法和逆转录-聚合酶链反应技术检测不同时间两组肺组织 FABP4 蛋白及 mRNA 表达水平, 应用 ELISA 方法检测 BALF 中 FABP4 的含量。**结果** FABP4 主要在肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞和血管内皮细胞表达。两组 FABP4 蛋白和 mRNA 在肺组织中的表达以及两组 BALF 中 FABP4 的含量均随鼠龄递增呈逐渐增加的趋势, 至 P14 时最高。高氧组肺组织中 FABP4 mRNA 的表达在 P7、P14, FABP4 蛋白的表达在 P3、P7 及 P14 时均高于对照组 (均 $P < 0.05$); 高氧组 BALF 中 FABP4 的含量在 P7、P14 时均高于对照组 (均 $P < 0.05$)。**结论** 高氧肺损伤时 FABP4 表达升高, 可能是引起肺微血管发育障碍及肺泡化进程受阻, 进而导致新型 BPD 发生的重要因素。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(11): 1149-1153]

[关键词] 高氧; 脂肪型脂肪酸结合蛋白4; 支气管肺发育不良; 大鼠

Increased expression of fatty acid binding protein 4 in lungs of preterm rats after hyperoxic lung injury

WANG Wei, CUI Zhi-Rui, CAI Li-Xia, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) in lungs and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of preterm rats exposed to 60% O₂ and to elucidate the relationship between the changes of FABP4 expression and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** Hyperoxic lung injury was induced by exposing to 60% O₂ in Sprague-Dawley rats within 6 hours after birth. Rats exposed to air were used as the control group. The lungs from groups aged postnatal days 3, 7 and 14 were removed and dissected from the main bronchi for analysis. Eight rats of each group were used to assess expression of FABP4 in lungs by immunohistochemistry and ELISA. Lung FABP4 mRNA levels were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The levels of FABP4 in BALF were measured using ELISA. **Results** FABP4 immunoreactivity was detected in the majority of alveolar macrophages, bronchial epithelial cells and endothelial cells. FABP4 protein levels in lung tissues in the hyperoxic exposure group increased significantly compared with the control group on days 3, 7 and 14 after birth ($P < 0.05$), and FABP4 mRNA levels in lung tissues also increased significantly in the hyperoxic exposure group compared with the control group on days 7 and 14 after birth ($P < 0.05$). The hyperoxic exposure group demonstrated increased FABP4 levels in BALF compared with the control group on days 7 and 14 after birth ($P < 0.05$). **Conclusions** FABP4 levels increase in preterm rat lungs after hyperoxic lung injury, which may contribute to the pathogenesis of BPD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(11): 1149-1153]

Key words: Hyperoxia; Fatty acid binding protein 4; Bronchopulmonary dysplasia; Rats

[收稿日期] 2014-05-26; [接受日期] 2014-07-18

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目 (201303092); 河南省卫生科技创新型人才工程专项经费资助 (豫卫科 201052)。

[作者简介] 王伟, 女, 博士, 副教授。

[通信作者] 罗小平, 男, 教授。

新型支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是常见于早产儿的一种慢性肺疾病。生后高氧暴露引起肺微血管发育障碍, 肺泡化过程受阻可能是其发生发展的重要原因^[1-2]。血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知最有效调控肺微血管生成和发育的血管生成素蛋白^[3]。本课题组前期研究发现 60% 氧暴露时肺组织 VEGF 及其受体表达下降^[4-5]。新近研究发现脂肪型脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4) 是调节支气管微血管循环的重要因子, 为 VEGF 基因下游因子, 受 VEGF 调控^[6]。本实验拟对早产大鼠进行 60% 氧暴露, 观察高氧肺损伤时肺组织及 BALF 中 FABP4 的表达, 进一步探讨高氧暴露对肺血管发育信号传导通路的影响及与 BPD 发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由郑州大学实验动物中心提供。总 RNA 提取试剂 (TRIzol) 购于美国 Gibco 公司; 小鼠抗 FABP4 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 随机引物 Oligo dT12-18、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂 (Rnasin) 及 TaqDNA 聚合酶购于美国 Promega 公司; FABP4 引物由上海英骏公司合成; ELISA 检测试剂盒购自美国 R & D 公司。

1.2 动物模型的制备及分组

清洁级 SD 雌雄大鼠按 3:1 夜间合笼交配, 次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片, 镜检见精子, 当日记为妊娠第 1 天, 早产大鼠于母鼠孕 21 d 剖宫娩出, 由当日分娩的其他母鼠作其代母鼠。早产鼠于生后 6 h 内随机分为对照组和高氧组, 对照组置于常压空气中, 高氧组置于浓度为 60% 的高氧舱中, 氧浓度维持在 60%, 每天开箱约 1 h 用于添加饲料及更换垫料, 并与对照组互换母鼠以避免母鼠氧中毒影响哺乳。当某一组新生鼠发生死亡后, 同时将其其他组去掉相同数目的新生鼠, 以保持各组新生鼠数目相同, 防止因营养因素引起的差异。两组早产鼠分别于出生后第 3 天 (P3)、第 7 天 (P7) 及第 14 天 (P14) 各取 8 只, 以 20% 乌拉坦 0.5 mL 腹腔麻醉, 气管插管保持肺充气状态,

开胸放血, 右支气管结扎, 迅速切取右肺, 用于免疫组织化学检测。用 4℃ 无菌生理盐水对左肺行肺泡灌洗 (2.5 mL × 3 次), 回收率 >85%, 将灌洗液在 4℃ 条件下, 以 4000 r/min 离心 10 min, 取上清, 保存到 -80℃ 冰箱中待测 FABP4 的表达。

1.3 免疫组织化学染色检测 FABP4 蛋白的表达

采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (S-P 法) 检测 FABP4 的表达。石蜡切片常规脱蜡至水, 抗原修复, 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 正常山羊血清封闭, 滴加一抗, 4℃ 过夜, 0.01M PBS 充分洗涤后加入生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 30 min, 加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色、复染封片、镜下观察。结果判定以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。阴性对照为 0.01M PBS 替代一抗。FABP4 抗体稀释度均为 1:100。每例随机抽取染色清晰的切片 5 张, 每张切片于光镜下随机选取 5 个视野, 固定窗口面积, 利用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统, 测定平均吸光度 (A) 以表示阳性产物的强度。

1.4 RT-PCR 检测 FABP4 基因的表达

采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 以此为模板行 PCR 扩增。FABP4 基因及内参基因引物序列见表 1。PCR 反应体系 (25 μL): 2 × MasterMix 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, β-actin 上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, 灭菌水 8.5 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 53.6℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 32 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。然后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min。结果在 MUVB220 凝胶分析系统 (美国 Ultralum 公司) 对扩增产物条带进行分析, 分别测定各扩增带吸光度 (A 值), 将目的基因 FABP4 扩增带分别与内参照 β-actin 扩增带的 A 值比作为其 mRNA 水平的定量指标。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	产物大小 (bp)
FABP4	上游: 5'-TCACCATCCGGTCAGAGAGTA-3'	510
	下游: 5'-GCCATCTAGGGTTATGATGCTC-3'	
β-actin	上游: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	300
	下游: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	

1.5 早产大鼠 BALF 中 FABP4 含量测定

采用双抗体夹心酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测 BALF 中 FABP4 的含量,操作步骤严格按说明书进行。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,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 两组早产大鼠肺组织 FABP4 蛋白检测结果

FABP4 主要在肺巨噬细胞、支气管上皮细胞和血管内皮细胞表达。两组 FABP4 蛋白的表达随

鼠龄递增,呈逐渐升高的趋势,至 P14 时最高。与对照组相比,高氧组 FABP4 蛋白的表达在 P3、P7 及 P14 均高于对照组,且差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 2、图 1。

2.2 两组早产大鼠肺组织 FABP4 mRNA 检测结果

检测发现两组大鼠 FABP4 mRNA 表达均随鼠龄递增,至 P14 时达峰值。与对照组相比,高氧组 FABP4 mRNA 水平在 P7 和 P14 均高于对照组,且差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 3、图 2。

2.3 两组早产大鼠 BALF 中 FABP4 含量的变化

检测发现两组大鼠 BALF 中 FABP4 含量均随鼠龄递增而逐渐增加,至 P14 时达峰值。与对照组相比,高氧组大鼠 BALF 中 FABP4 蛋白的表达在 P7 及 P14 均高于对照组,且差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 4。

表 2 不同时间两组早产大鼠肺组织 FABP4 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	P3	P7	P14	F 值	P 值
对照组	8	7.01 ± 0.16	7.67 ± 0.65	8.13 ± 0.74	1.938	0.288
高氧组	8	9.71 ± 0.86	17.09 ± 0.49 ^a	19.84 ± 1.97 ^{a,b}	33.972	0.009
<i>t</i> 值		4.401	16.297	7.890		
<i>P</i> 值		0.048	0.004	0.016		

注: a 示与同组 P3 时比较, $P < 0.05$; b 示与同组 P7 时比较, $P < 0.05$ 。

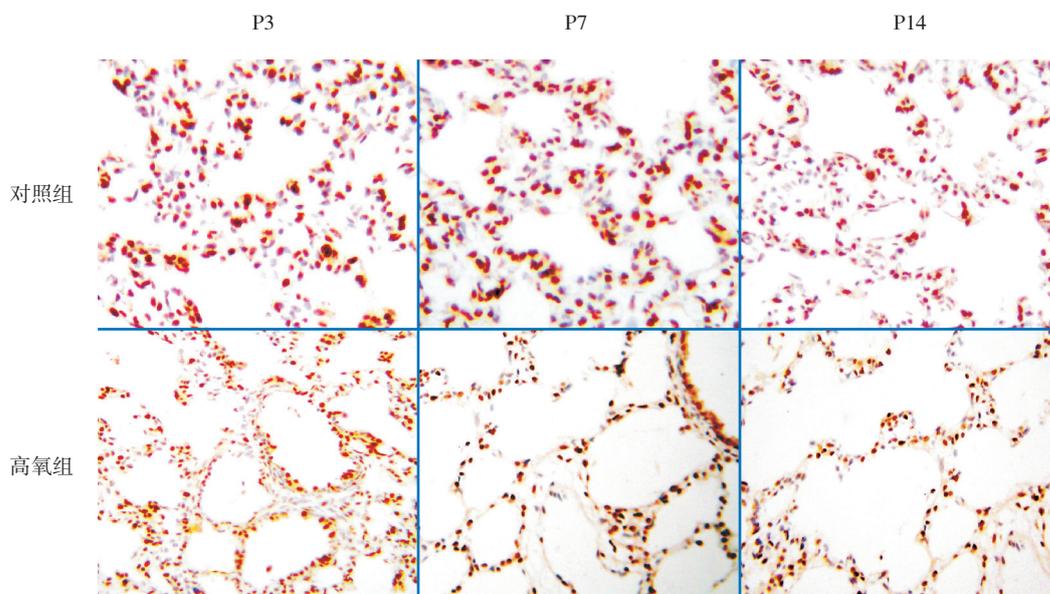


图 1 FABP4 在不同时间点两组早产大鼠肺组织中的表达(S-P 法, ×400) 各时间点对照组 FABP4 均有少量表达,同时点高氧组 FABP4 较对照组明显增多,胞浆有棕黄色颗粒沉着为 FABP4 阳性表达。

表3 不同时间点两组早产大鼠肺组织 FABP4 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	P3	P7	P14	F 值	P 值
对照组	8	0.41 ± 0.06	1.17 ± 0.06	2.16 ± 0.69 ^{ab}	9.485	0.049
高氧组	8	2.71 ± 0.85	4.59 ± 0.21	8.27 ± 1.61 ^{ab}	14.265	0.029
t 值		3.825	22.03	4.924		
P 值		0.062	0.002	0.039		

注: a 示与同组 P3 时比较, $P < 0.05$; b 示与同组 P7 时比较, $P < 0.05$ 。

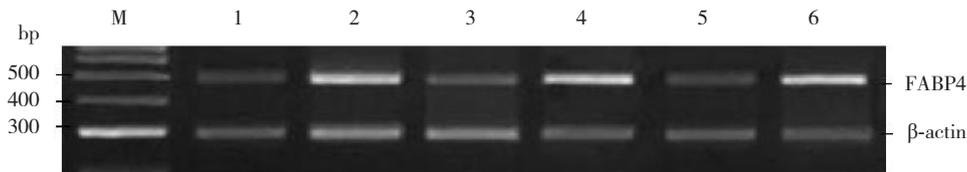


图2 RT-PCR 检测不同时间点两组早产大鼠肺组织 FABP4 mRNA 表达情况 M: Marker, 1000 bp DNA ladder; 1、3 和 5 分别为 P3、P7 和 P14 时对照组; 2、4 和 6 分别为 P3、P7 和 P14 时高氧组。

表4 不同时间两组早产大鼠 BALF 中 FABP4 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	鼠数	P3	P7	P14	F 值	P 值
对照组	8	1.51 ± 0.54	2.35 ± 0.39	3.13 ± 0.74	3.987	0.143
高氧组	8	2.23 ± 0.16	7.08 ± 0.47 ^a	8.27 ± 1.61 ^a	128.411	0.001
t 值		1.792	10.929	8.79		
P 值		0.215	0.008	0.013		

注: a 示与同组 P3 时比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,随着新生儿重症监护水平的提高,越来越多的早产儿得以存活。新型 BPD 发病率也逐年增高^[7]。与以肺纤维化为主要病理特征的传统 BPD 比较,新型 BPD 患者肺泡结构简单化,肺泡数目和表面积减少,肺泡化和肺微血管发育停滞,提示肺发育在管道形成期受到干扰或停滞^[8]。VEGF 是调节肺微血管生成和发育的重要因子。VEGF 及其受体表达减少是引起新型 BPD 发生的重要原因^[4,8-9]。但其具体机制目前不清。本研究从 VEGF 下游因子 FABP4 与微血管发育之间信号传导途径入手,进一步探讨高氧暴露对肺微血管发育信号传导通路的影响,有助于阐明新型 BPD 发生的分子机制,可望带来防治领域的突破。

肺微血管发育主要包括支气管微血管发育和肺泡微血管发育。传统研究多集中在肺泡微血管发育,对支气管微血管发育研究则甚少^[10]。FABP4 是 FABPs 家族的一员,是主要调节支气管微血管发育的重要因子及 VEGF 的下游因子,其表达受 VEGF 调控^[6,11-12]。本研究发现高氧肺损伤

时除肺巨噬细胞有大量 FABP4 表达外,支气管上皮细胞和血管内皮细胞均有表达。这与 Shum 等^[13]研究表达部位一致,而与 Ghelfi 等^[10]研究表达部位略微不同,可能是因为研究对象不同:本研究对象为 SD 大鼠,而 Ghelfi 等^[10]研究对象为狒狒。

本研究发现随鼠龄增加及高氧暴露时间延长,肺组织 FABP4 表达均较对照组增加。这与本课题组前期研究发现高氧暴露肺损伤时 VEGF 及其受体 2 的表达减少正好相反。其可能机制为:

(1) 新近研究认为肺毛细血管发育包括支气管毛细血管网发育和肺泡毛细血管网发育。VEGF 主要由肺泡上皮细胞合成,通过旁分泌途径作用于肺泡毛细血管网。而 FABP4 则主要由肺泡巨噬细胞、支气管血管内皮细胞及支气管血管上皮细胞合成,作用于支气管毛细血管网,因此,高氧肺损伤时,二者由于分泌细胞受损程度不同,反应不同^[6,13]。

(2) 高氧肺损伤时随着高氧暴露时间延长,肺巨噬细胞逐渐流入聚集,引起 FABP4 表达逐渐增加。而目前研究认为 FABP4 在促进支气管毛细血管网生成的同时,又可抑制肺泡上皮细胞分泌 VEGF 及其受体 2, VEGF 及其受体 2 分泌减少可使肺泡

毛细血管网生成障碍^[11]。因此高氧肺损伤时主要是抑制肺泡微血管发育,引起肺微血管病理性重塑,肺泡化合成受阻。

本研究还发现高氧肺损伤时 BALF 中 FABP4 表达增多。这可能与 FABP4 是低分子蛋白 (<14 kd), 在高氧肺损伤时容易从损伤细胞渗漏到 BALF 中有关。也有学者研究发现 BPD 患儿 BALF 中 FABP4 含量增多^[14-15]。提示 BALF 中 FABP4 含量可作为监测 BPD 发生发展的重要指标。

综上所述,高氧肺损伤可能通过调控 FABP4 与 VEGF 信号传导通路,使肺微血管发育障碍,发生病理性重塑,肺泡化合成受阻,进而导致新型 BPD 的发生。同时 BALF 中 FABP4 含量可作为监测新型 BPD 发生发展的临床标志物。

[参 考 文 献]

- [1] Hadchouel A, Delacourt C. Premature infants bronchopulmonary dysplasia: past and present[J]. *Rev Pneumol Clin*, 2013, 69(4): 207-216.
- [2] Madurga A, Mizíková I, Ruiz-Camp J, et al. Recent advances in late lung development and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(12): 893-905.
- [3] Talwar T, Srivastava MV. Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery[J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2014, 17(1): 1-6.
- [4] 王伟, 韦伟, 王安茹, 等. 60%氧暴露对早产大鼠肺血管内皮生长因子及其受体表达的影响[J]. *中华围产杂志*, 2007, 9(3): 153-159.
- [5] 韦伟, 王伟, 宁琴, 等. 早产鼠高氧暴露后肺组织血管内皮生长因子和一氧化氮合酶的动态变化及相互关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(5): 473-478.
- [6] Ghelfi E, Yu CW, Elmasri H, et al. Fatty acid binding protein 4 regulates VEGF-induced airway angiogenesis and inflammation in a transgenic mouse model: implications for asthma[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(4): 1425-1433.
- [7] Ozdemir OM, Gözkeser E, Bir F, et al. The effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats[J]. *Pediatr Neonatol*, 2014, 124(10): 1875-1891.
- [8] Levesque BM, Kalish LA, Winston AB, et al. Low urine vascular endothelial growth factor levels are associated with mechanical ventilation, bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity[J]. *Neonatology*, 2013, 104(1): 56-64.
- [9] Esquibies AE, Karihaloo A, Quaggin SE, et al. Heparin binding VEGF isoforms attenuate hyperoxic embryonic lung growth retardation via FLK1-neuropilin-1-PKC dependent pathway[J]. *Respir Res*, 2014, 15: 32.
- [10] Ghelfi E, Karaaslan C, Berkelhamer S, et al. Fatty acid-binding proteins and peribronchial angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(3): 550-556.
- [11] Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2009, 23(11): 3865-3873.
- [12] Hoo RL, Lee IP, Zhou M, et al. Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(2): 358-364.
- [13] Shum BO, Mackay CR, Gorgun CZ, et al. The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2183-2192.
- [14] Hadchouel A, Franco-Montoya ML, Delacourt C. Altered lung development in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2014, 100(3): 15-17.
- [15] Sun H, Choo-Wing R, Fan J, et al. Small molecular modulation of macrophage migration inhibitory factor in the hyperoxia-induced mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Respir Res*, 2013, 1465(28): 14-27.

(本文编辑: 万静)