

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.02.017

论著·实验研究

高氧诱导肺损伤新生小鼠肺组织中长链非编码 RNA Nanci 的表达及对 NKX2.1 的调控作用

张媛 程怀平 包天平 王秀桂 田兆方

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA Nanci 在高氧诱导肺损伤新生小鼠肺组织中的表达变化及对 NKX2.1 的调控作用。**方法** 采用随机分组法将 48 只 C57BL/6J 新生小鼠随机分为空气组和高氧组, 每组 24 只, 各组再随机分为生后 7 d 组、14 d 组、21 d 组, 每组 8 只。空气组置于室内环境 ($\text{FiO}_2=21\%$) 中饲养, 高氧组置于高氧箱 (保持氧浓度 $>95\%$) 中饲养, 在各时间点分别处死两组动物后收集肺组织标本。采用苏木精-伊红染色法观察小鼠肺组织病理变化; 采用 RT-qPCR 及 Western blot 技术分别检测 Nanci、NKX2.1 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 空气组新生小鼠肺组织 Nanci 和 NKX2.1 的 mRNA 表达水平 7 d 最高 ($P<0.05$), 14 d 与 21 d 呈同水平表达。与空气组比较, 高氧组肺组织肺泡化程度降低, 辐射状肺泡计数 (RAC) 减少 ($P<0.05$), 且高氧组 RAC 值随高氧处理时间延长逐渐降低 ($P<0.05$)。各时间点高氧组 Nanci mRNA、NKX2.1 mRNA 及其蛋白表达水平均低于空气组 ($P<0.05$), 且随高氧处理时间延长逐渐降低 ($P<0.05$)。NKX2.1 与 Nanci 表达呈正相关 ($r=0.585$, $P=0.003$); 两者与高氧组 RAC 水平均呈正相关 (分别 $r=0.655$ 、 0.541 , $P<0.05$)。**结论** Nanci 可能主要参与未成熟肺组织发育; 肺组织损伤程度随高氧暴露时间的延长逐渐加重, 且 Nanci 及 NKX2.1 水平与肺损伤程度相关, 提示 Nanci/NKX2.1 靶基因信号通路可能参与新生小鼠高氧肺损伤过程。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(2): 215-221]

[关键词] 高氧肺损伤; 长链非编码 RNA; Nanci; NKX2.1; 小鼠

Expression of long non-coding RNA Nanci in lung tissues of neonatal mice with hyperoxia-induced lung injury and its regulatory effect on NKX2.1

ZHANG Yuan, CHENG Huai-Ping, BAO Tian-Ping, WANG Xiu-Gui, TIAN Zhao-Fang. Department of Neonatology, Huai'an First Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223300, China (Tian Z-F, Email: lyh0729@163.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of long non-coding RNA Nanci in lung tissues of neonatal mice with hyperoxia-induced lung injury and its regulatory effect on NKX2.1. **Methods** A total of 48 neonatal C57BL/6J mice were randomly divided into an air group and a hyperoxia group, with 24 mice in each group. Each group was further divided into 7-day, 14-day, and 21-day subgroups, with 8 mice in each subgroup. The mice in the air group were fed in the indoor environment ($\text{FiO}_2=21\%$) and those in the hyperoxia group were fed in a high-oxygen box (oxygen concentration: $>95\%$). The mice were sacrificed at each time point and lung tissue samples were collected. Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological changes in lung tissues. RT-qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of Nanci and NKX2.1. **Results** The air group had the highest mRNA expression of Nanci and NKX2.1 at 7 days and the same level of mRNA expression at 14 and 21 days. Compared with the air group, the hyperoxia group had significant reductions in the degree of alveolarization and radial alveolar count (RAC) in lung tissues ($P<0.05$), and in the hyperoxia group, RAC gradually decreased over the time of hyperoxia exposure ($P<0.05$). The hyperoxia group had significantly lower mRNA and protein expression of Nanci and NKX2.1 than the air group at all time points ($P<0.05$). In both groups, the relative mRNA and protein expression

[收稿日期] 2016-08-16; [接受日期] 2016-12-12

[基金项目] 江苏省临床医学专项 (BL2014063); 淮安市科技攻关项目 (HAS2014010)。

[作者简介] 张媛, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 田兆方, 男, 副教授。

of Nanci and NKX2.1 gradually decreased over the time of hyperoxia exposure ($P<0.05$). The expression of NKX2 was positively correlated with that of Nanci ($r=0.585$, $P=0.003$), and the expression of NKX2 and Nanci was positively correlated with RAC in the hyperoxia group ($r=0.655$ and 0.541 respectively, $P<0.05$). **Conclusions** Nanci may be involved in the development of immature lung tissues. Lung injury is gradually aggravated over the time of hyperoxia exposure. The levels of Nanci and NKX2.1 are associated with the severity of lung injury, suggesting that the Nanci/NKX2.1 target gene signaling pathway might be involved in the development of hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(2): 215-221]

Key words: Hyperoxia-induced lung injury; Long non-coding RNA; Nanci; NKX2.1; Mice

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是发生于早产儿长期应用高浓度氧气和辅助机械通气后的一种慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD), 是由生后感染、气压伤和容量伤导致的纤维化以及氧毒性等多因素诱发形成^[1], 其发病率随胎龄和出生体重的减少而增高^[2], 其发生机制仍不甚清楚。近些年来, 对长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 的研究已成为生命医学多领域研究热点, 同时也成为我们探索高氧肺损伤发病机制的新方向。Nanci (NKX2.1-associated long noncoding intergenic RNA) 是 Herriges 等^[3]新发现的与肺发育相关的 lncRNA, 它在胚肺及成熟肺中持续表达, 并通过调控下游临近的转录因子 NKX2.1/ 甲状腺转录因子 1 (TTF-1) 的表达, 对肺组织分化、维持肺泡稳定性及增强宿主防御力等起重要作用。本课题组前期研究中也发现 Nanci 的差异性表达^[4]。故本实验进一步研究了高氧诱导小鼠肺损伤后, 肺组织中 lncRNA Nanci 的表达变化及对 NKX2.1 的调控作用, 从而探究 Nanci $\rightarrow$ NKX2.1 $\rightarrow$ target genes 信号通路在高氧肺损伤中可能的作用机制, 而目前国内外均无该信号通路与高氧诱导肺损伤相关的研究报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

6~8 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠 10 只, 雄性小鼠 3 只, 购自南京玄武区森堡生物制品中心, 以雌雄比 1 : 3 或 1 : 4 合笼受孕。

实验中, 用于 Western blot 实验的主要试剂、材料包括: SDS-PAGE 凝胶试剂盒、ECL 试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), 电泳和转膜缓冲液 (含 Tris、Gly、SDS)、PVDF 膜、兔抗鼠 NKX2.1 单克隆抗体一抗 (美国 Proteintech 公司), 兔抗鼠 β -Tubulin 多克隆抗体一抗 (美国 Bioworld

公司), 山羊抗兔多克隆抗体二抗 (徐州微科曼得生物工程公司); 用于 RT-qPCR 实验的主要试剂、材料包括: TRIzol、逆转录试剂盒 (徐州微科曼得生物工程公司), SYBR Green 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 数字式测氧仪购自 Farstar 医学设备有限公司; 氧气由南京医科大学附属淮安第一医院中心实验室提供。

1.2 实验分组与处理

选取母鼠产下的新生小鼠 48 只, 于生后 24 h 内随机分为空气组和高氧组, 每组 24 只, 各组再随机分 3 小组, 分别于实验 7、14、21 d 后处死, 每组 8 只。分组后称体重, 空气组 ($\text{FiO}_2=21\%$) 置于空气中喂养, 高氧组置于 $60\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 大小自制氧箱, 氧流量 6~7 L/min, 氧浓度维持在 95% 以上, 由数字式氧浓度仪监测, 维持室温 $22\sim 26^\circ\text{C}$ ^[4]。实验期间, 每日 8:00~8:30 开箱更换垫料、补充饲料和水, 并将空气组与高氧组母鼠互换, 防止氧中毒而影响母鼠对仔鼠的哺乳能力。

1.3 标本采集

分别于出生后 7、14、21 d 处死各组小鼠并采集肺组织。处死前称体重, 然后以 3.5% 水合氯醛按照 0.01 mL/g 进行腹腔注射麻醉, 解剖所用器械均无菌处理。开胸腔分离右上肺浸入 4% 多聚甲醛中, 作苏木精-伊红染色制作病理切片, 用于观察肺组织形态; 其余肺组织用 4°C PBS 清洗后置于无酶 EP 管中经液氮转存 -80°C 冰箱, 用于 Western blot 和 RT-qPCR 检测。

1.4 肺组织形态分析

肺泡化程度用辐射状肺泡计数 (RAC) 来评估, 即呼吸性细支气管中心至最近纤维隔或胸膜垂直线上的肺泡数目^[5], 反映终末呼吸单位所含肺泡数目。每个标本随机选取 4 张切片, 100 倍光学显微镜下进行观察, 每张切片随机选取 5 个视野测量 RAC, 取平均值。

1.5 RT-qPCR 检测 Nanci 及 NKX2.1 RNA 表达

取 50~100 mg 肺组织, TRIzol 抽提肺组织总 RNA, 使用 Vic qRT Super Kit 试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA。

用 SYBR Green 试剂盒, 根据两步法反应程序采用 RT-qPCR 检测 Nanci 及 NKX2.1 mRNA 的相对表达量。所有引物由上海生工生物工程公司合成。Nanci 的引物序列: 上游引物 5'-AGGAACGCCTCAATCTGCATCTCA-3', 下游引物 5'-CCATTGACTGAATTGTCCACGGCA-3'; NKX2.1 的引物序列: 上游引物 5'-ACCAAACTGCTGGACG-ACTT-3', 下游引物 5'-GGAGGAGGAGGAGGAGAA-GA-3'; GAPDH 的引物序列: 上游引物 5'-TGCACC-ACCAACTGCTTAGC-3', 下游引物 5'-GGCATGGACT-GTGGTCATGAG-3'。反应体系 (20 μ L): 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase-free ddH₂O 7.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 64 $^{\circ}$ C (Nanci) / 60 $^{\circ}$ C (NKX2.1) 20 s, 40 个循环。每样本平行设 3 个样本, 取其 CT 值平均数, 以目的基因 CT 值 -GAPDH 的 CT 值记为 Δ CT 值, 计算目的基因 mRNA 相对表达量, 结果以 $2^{-\Delta CT}$ 表示。

1.6 Western blot 法检测 NKX2.1 蛋白表达

取 50~100 mg 肺组织, 加入 RIPA 裂解液和 PMSF 试剂以 100 : 1 手动匀浆裂解肺组织, 12000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min 取上清, -80 $^{\circ}$ C 冻存或留用测蛋白浓度; 用 BCA 法 (碧云天试剂盒) 测量蛋白浓度; 以每孔 10 μ g 总蛋白量上样, 加上样缓冲液并于沸水中煮沸 5 min 后以 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 然后把胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上, 5% 无脂奶粉封闭, 与待测蛋白的特异性抗体 (稀释度均为 1 : 2000) 孵育杂交,

4 $^{\circ}$ C 过夜洗膜后, 再加辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1.5 h, 洗膜后进行显色, 曝光于 X 线胶片上, 在图像分析系统计算目的蛋白条带灰度值与内参灰度值的比值, 即 NKX2.1/ β -Tubulin 灰度比值, 代表 NKX2.1 蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料用均数 $\pm$ 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, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验; 组间相关分析采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

空气组小鼠出生时体重与高氧组比较差异无统计学意义 (P=0.441), 空气组小鼠反应良好, 体重增长迅速; 高氧组小鼠于生后 3 d 开始出现反应差、自主活动减少, 呼吸困难表现逐渐加重; 高氧组小鼠于生后 7、14、21 d 体重增长缓慢, 与空气组比较差异均有统计学意义 (P<0.05) (表 1)。高氧组 7 d 无死亡, 14 d 时死亡 1 只, 21 d 时死亡 2 只, 后续实验各组补足实验动物例数至 8 只。

2.2 两组小鼠肺组织病理变化

苏木精-伊红结果显示, 高氧组较空气组肺泡间隔变薄、肺泡腔增大、肺泡数目减少 (图 1); 生后各时间点高氧组 RAC 值显著低于空气组 (P<0.05), 且空气组 RAC 值随生长时间延长逐渐增大, 而高氧组 RAC 值随生长时间延长逐渐减小 (P<0.05), 见表 2。

表 1 两组小鼠不同时间点体重比较 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	n	出生时	7 d 组	14 d 组	21 d 组
空气组	8	1.30 $\pm$ 0.03	4.23 $\pm$ 0.31	6.07 $\pm$ 0.72	7.73 $\pm$ 0.53
高氧组	8	1.29 $\pm$ 0.04	2.86 $\pm$ 0.31	3.77 $\pm$ 0.15	4.53 $\pm$ 0.33
<i>t</i> 值		0.776	9.722	9.909	14.931
<i>P</i> 值		0.441	<0.001	<0.001	<0.001

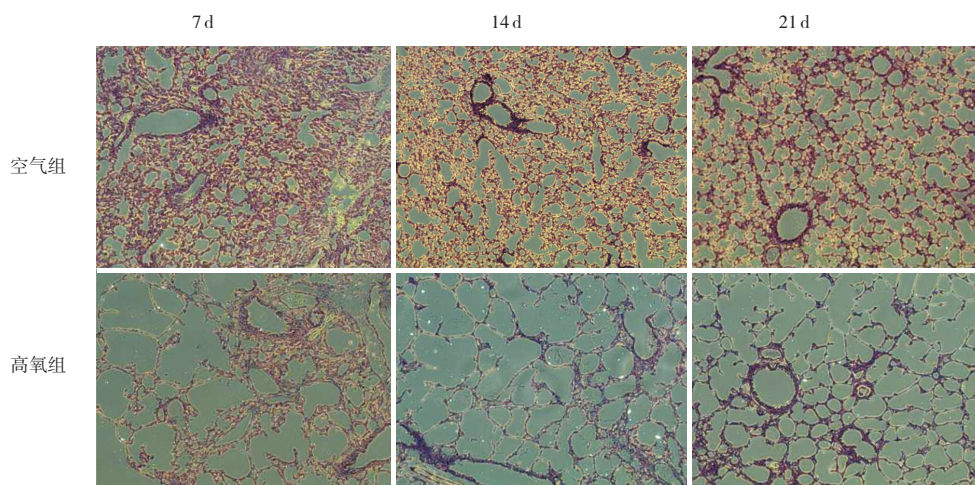


图 1 不同时间点两组小鼠肺组织病理变化 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) 与空气组相比, 高氧组肺泡腔增大, 肺泡间隔断裂、变薄。

表 2 不同时间点两组小鼠肺组织 RAC 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	RAC			<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		7 d 组	14 d 组	21 d 组		
空气组	8	7.22 $\pm$ 0.28	8.75 $\pm$ 0.37 ^a	9.32 $\pm$ 0.11 ^a	103.831	<0.001
高氧组	8	4.98 $\pm$ 0.42	4.47 $\pm$ 0.63 ^a	4.09 $\pm$ 0.16 ^a	6.792	0.005
<i>t</i> 值		8.694	16.426	16.527		
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001		

注: [RAC] 辐射状肺泡计数。a 示与同组 7 d 时比较, $P < 0.05$ 。

2.3 两组小鼠肺组织 NANC1 mRNA 表达水平变化

生后各时间点高氧组 NANC1 mRNA 相对表达量显著低于空气组 ($P < 0.05$), 且两组 NANC1

mRNA 的相对表达量均随高氧时间延长逐渐降低, 但仅 7 d 组分别与 14 d、21 d 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 14 d 组和 21 d 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 不同时间点两组小鼠肺组织 NANC1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NANC1 mRNA			<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		7 d 组	14 d 组	21 d 组		
空气组	8	0.1982 $\pm$ 0.0837	0.0644 $\pm$ 0.0468 ^a	0.0330 $\pm$ 0.0159 ^a	19.540	<0.001
高氧组	8	0.0574 $\pm$ 0.0399	0.0177 $\pm$ 0.0121 ^a	0.0023 $\pm$ 0.0013 ^a	11.084	<0.001
<i>t</i> 值		4.295	2.728	5.453		
<i>P</i> 值		0.002	0.026	0.001		

注: a 示与同组 7 d 时比较, $P < 0.05$ 。

2.4 两组小鼠肺组织 NKX2.1 mRNA 及其蛋白表达水平变化

生后各时间点高氧组 NKX2.1 mRNA 表达水平均低于空气组 ($P < 0.05$), 且两组 NKX2.1 mRNA 相对表达量随高氧处理时间延长逐渐降低

($P < 0.05$), 但仅 7 d 组分别与 14 d、21 d 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 14 d 组和 21 d 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 4)。生后各时间点两组肺组织的 NKX2.1 蛋白表达变化趋势与 NKX2.1 mRNA 的表达相似, 见图 2, 表 5。

表 4 不同时间点两组小鼠肺组织 NKX2.1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	7 d 组	14 d 组	21 d 组	F 值	P 值
空气组	8	0.493 ± 0.125	0.204 ± 0.090 ^a	0.138 ± 0.064 ^a	30.808	<0.001
高氧组	8	0.322 ± 0.127	0.047 ± 0.024 ^a	0.034 ± 0.020 ^a	37.003	<0.001
t 值		2.711	4.761	4.149		
P 值		0.017	0.001	0.002		

注: a 示与同组 7 d 时比较, $P < 0.05$ 。

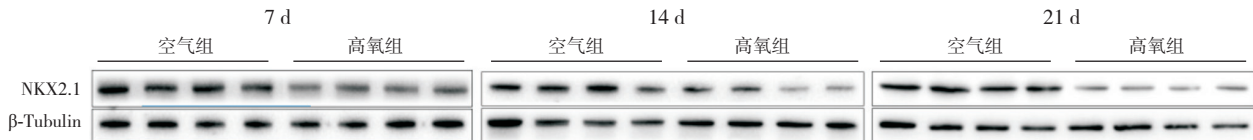


图 2 Western blot 检测不同时间点两组小鼠肺组织 NKX2.1 蛋白表达电泳图

表 5 不同时间点两组小鼠肺组织 NKX2.1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	7 d 组	14 d 组	21 d 组	F 值	P 值
空气组	4	1.58 ± 0.14	1.02 ± 0.21 ^a	0.93 ± 0.08 ^a	21.009	<0.001
高氧组	4	0.87 ± 0.23	0.61 ± 0.07 ^a	0.55 ± 0.08 ^a	5.142	0.032
t 值		5.269	3.707	6.831		
P 值		0.002	0.010	0.001		

注: a 示与同组 7 d 时比较, $P < 0.05$ 。

2.5 相关性分析

高氧作用下, NKX2.1 mRNA 与 NAC1 mRNA 表达呈正相关 ($r=0.585$, $P=0.003$) (图 3); 两者与高氧组 RAC 水平均呈正相关 (分别 $r=0.655$ 、 0.541 , $P < 0.05$) (图 4~5)。

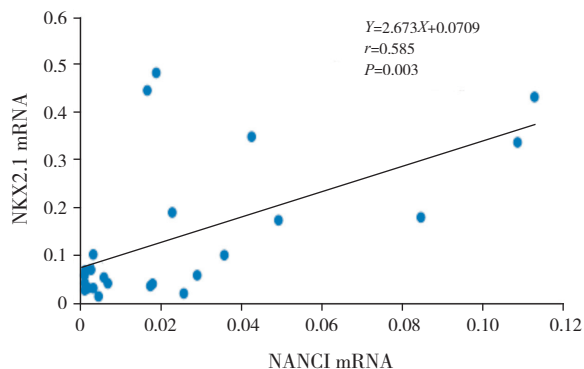


图 3 高氧组 NAC1 mRNA 与 NKX2.1 mRNA 的相关分析图

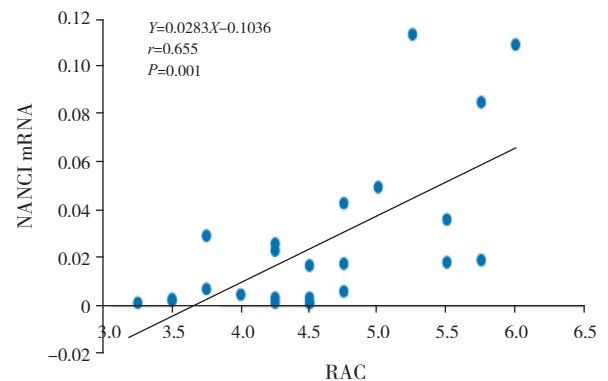


图 4 高氧组 NAC1 mRNA 与 RAC 的相关分析图

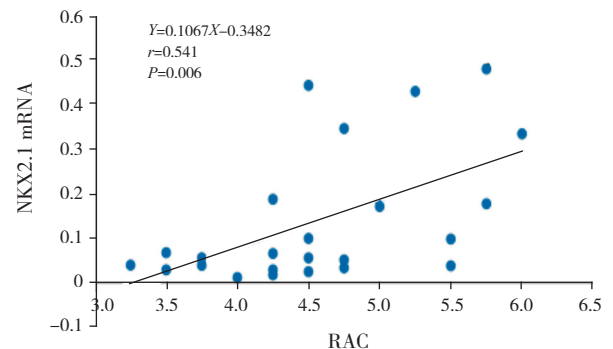


图 5 高氧组 NKX2.1 mRNA 与 RAC 的相关分析图

3 讨论

随着新一代测序技术与基因芯片技术的广泛应用,许多学者们在人和模型动物中筛选出大量与肺相关基因,其中 lncRNA 备受关注,已成为近些年生命医学多学科研究的热点,同时也成为我们探索高氧肺损伤发病机制的新方向。

LncRNA 是一类转录长度超过 200 nt、不具备编码蛋白功能的转录体^[6],在哺乳动物基因组普遍被转录,起初被认为是基因组转录的“噪音”。根据其转录位置可分为正义转录体、反义转录体、双向转录体、内含子 RNA 及基因间的 RNA。近些年的研究表明 LncRNA 的功能涉及到调控一系列的生物学过程,包括剂量补偿作用^[7]、基因组印记^[8]、转录激活与干扰^[9]、染色质修饰^[10]、组织发育^[3]及疾病形成过程等。例如在本课题组前期研究中筛选出了与 BPD 相关的差异性表达的 LncRNA,如 1010001N08Rik^[11]。LncRNA Nanci 是 Herriges 等^[3]首次发现的与肺发育相关的基因间 lncRNA,位于 Wnt/b-catenin 信号通路下游、NKX2.1 的上游,调节肺内胚层基因的表达和形态形成。当敲除 Nanci 时 NKX2.1 无表达, rescue 实验显示 NKX2.1 的靶基因上调,包括 Abca3、Sftpc、Aqp5,尤其是 Aqp1 上调尤为明显;当过表达 Nanci 时, NKX2.1 及其靶基因表达水平上调,而 Nanci 的表达却不受 NKX2.1 的影响。在本研究中发现,新生小鼠空气组 Nanci 和 NKX2.1 的 mRNA 表达水平 7 d 最高,14 d 与 21 d 呈同水平表达;高氧 7 d 后作为肺泡发育评价指标的 RAC^[5]开始降低,继而持续下降,到 21 d 达最低水平,同时发现 Nanci 和 NKX2.1 的 mRNA 表达变化趋势基本一致,即 7 d 开始下降,14 d 继续减少,21 d 降至最低,呈正相关, NKX2.1 蛋白表达也有类似的趋势。该现象表明:高氧诱导肺损伤时,肺组织 Nanci 和 NKX2.1 基因表达下降,并与肺泡损伤程度呈正相关;另外,正常小鼠出生 14 d 肺发育成熟^[11], Nanci 的表达逐渐下降,至 21 d 稳定在低水平,则进一步阐明了 Nanci 在小鼠出生后的表达特点。因此,我们认为 Nanci 可能主要参与未成熟肺组织发育;而高氧肺损伤时 Nanci 表达明显下调并下调下游 NKX2.1 及其靶基因的表达,从而影响肺泡成熟,即 Nanci → NKX2.1 → Target

genes 信号通路在肺发育和分化过程中起着至关重要的作用,也是参与高氧肺损伤形成的重要分子生物学机制。

NKX2.1 是位于染色体 14q13 区带的一个核转录因子,特异性表达于肺组织、甲状腺上皮细胞并广泛分布于前脑腹侧,是最早发现的肺内胚层祖细胞的标记物^[12]。它通过调节分枝化形态形成参与肺正常发育^[13],调控其靶基因如肺表面活性蛋白 (surfactant associated protein, SP),包括 SP-A、B、C、D 的表达以维持肺泡稳定性及增强宿主防御力,调控水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 稳定肺泡间隔液体平衡^[14]等。既往研究表明,高氧 7 d 诱导肺损伤时, AQP1,5 表达水平下降,此时是肺水肿高峰期,之后 AQP1 表达有所上升^[15]; SP 主要生理作用包括:降低肺泡表面张力,保持肺顺应性,预防肺水肿,以及免疫调节和防御作用,在高氧肺损伤中, SP-A、B、C、D 均显著下降^[16]。

本实验研究 Nanci 和 NKX2.1 在空气和高氧中的表达趋势,证实了 Nanci → NKX2.1 → Target genes 信号通路可能参与高氧肺损伤诱导的肺泡发育障碍。本实验不足在于缺乏数据说明 Nanci 在 0~7 d 的表达特点,故下一步本课题组将深入探讨该时间段的表达特点以及该信号通路在肺损伤中的保护作用,并有可能使得 Nanci 成为临床 BPD 患儿早期诊断、预防及预后的分子标志物或治疗靶点,为 BPD 的诊治提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Lavoie PM, Dubé MP. Genetics of bronchopulmonary dysplasia in the age of genomics[J]. Curr Opin Pediatr, 2010, 22(2): 134-138.
- [2] Jobe AH. The new bronchopulmonary dysplasia[J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(2): 167-172.
- [3] Herriges MJ, Swarr DT, Morley MP, et al. Long noncoding RNAs are spatially correlated with transcription factors and regulate lung development[J]. Genes Dev, 2014, 28(12): 1363-1379.
- [4] 包天平, 赵赛, 杨丽娟, 等. 高氧诱导支气管肺发育不良新生小鼠肺组织中 lncRNA 表达谱的变化 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2016, 36(3): 318-322.
- [5] Balasubramaniam V, Tang JR, Maxey A, et al. Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L964-L971.
- [6] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.

- [7] Zhao J, Sun BK, Erwin JA, et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome[J]. Science, 2008, 322(5902): 750-756.
- [8] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene[J]. Nature, 1991, 351(6322): 153-155.
- [9] Kwek KY, Murphy S, Furger A, et al. U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(11): 800-805.
- [10] Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation[J]. Science, 2003, 300(5616): 131-135.
- [11] Mund SI, Stambanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung[J]. Dev Dyn, 2008, 237(8): 2108-2116.
- [12] Kimura S, Hara Y, Pineau T, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary[J]. Genes Dev, 1996, 10(1): 60-69.
- [13] Minoo P, Hamdan H, Bu D, et al. TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis[J]. Dev Biol, 1995, 172(2): 694-698.
- [14] Kim JG, Son YJ, Yun CH, et al. Thyroid transcription factor-1 facilitates cerebrospinal fluid formation by regulating aquaporin-1 synthesis in the brain[J]. J Biol Chem, 2007, 282(20):14923-14931.
- [15] 岳冬梅, 薛辛东. 水通道蛋白 1, 5 与新生鼠高氧肺损伤肺水肿的关系研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 147-150.
- [16] Pavlovic J, Papagaroufalis C, Xanthou M, et al. Genetic variants of surfactant proteins A, B, C, and D in bronchopulmonary dysplasia[J]. Dis Markers, 2006, 22(5-6): 277-291.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

本刊关于实验动物样本数的规定

为了提高杂志的学术质量,《中国当代儿科杂志》决定从 2016 年 8 月起,对凡是在本刊刊出的动物实验研究论文中实验动物样本数做出如下规定,请广大作者注意并严格执行。对于未达到以下要求的动物实验性文章投稿,本刊则一律不再接收。

(1) 活体动物实验每组动物数不得少于 8 只;

(2) 对于细胞或分子水平检测方法,可适当放宽对样本数的要求,如:PCR 法检测 mRNA 水平,每个单元组的样本数不得少于 6 例;Western blot 法检测蛋白水平,每个单元组的样本数不得少于 3 例;

(3) 组织切片,要求每个样本组织的切片数不得少于 3 张,每张切片随机观察视野不得少于 5 个。

《中国当代儿科杂志》编辑部
2016 年 8 月