

# 肺泡形成基因 P311 在支气管肺发育不良中的作用 \*

曾宝梅<sup>1\* \* \* , 王予川<sup>2</sup>, 黄栋<sup>2\* \* \* , 王楠<sup>1</sup></sup></sup>

(1. 贵州医科大学 儿科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院 儿科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 了解肺泡形成基因 P311 在支气管肺发育不良(BPD)中的作用; 方法: 64 只早产昆明小鼠随机均分为空气组和高氧组, 空气组置于室内, 高氧组置于密闭的氧浓度 > 90% 的氧舱中复制 BPD 动物模型; 分别于造模后第 1、3、7 及 14 天取小鼠肺组织, 分别采用苏木精 - 伊红染色观察小鼠肺组织病理改变鉴定造模是否成功, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real - time PCR)法检测 P311 基因 mRNA 表达水平。结果: 早产小鼠肺组织发育不成熟, 高氧组随着吸氧时间的延长, 小鼠表现反应迟钝、体重增长缓慢、毛发发涩无光泽、鼻尖发绀、呼吸急促, 肉眼见肺组织表面有散在甚至弥漫的淤血点、小血管扩张充血, 第 3 天镜下见肺泡腔内有炎性细胞浸润, 第 7 天肺泡腔增大、肺间质增生, 第 14 天肺泡腔内间质增生、少数肺泡融合、肺泡数量减少、肺泡结构简单化, 说明 BPD 模型造模成功; 第 3 天时 2 组 P311 基因 mRNA 表达量最高, 随后下降; 高氧组 P311 基因 mRNA 表达水平均高于同一时点空气组( $P < 0.05$ )。结论: 长时间吸入高浓度氧成功构建支气管肺发育不良的动物模型, P311 基因可能是影响肺损伤修复的调控因子。

**[关键词]** 肺泡; 支气管肺发育不良; 肺泡形成基因; 动物模型; 基因表达

**[中图分类号]** R722.6    **[文献标识码]** A    **[文章编号]** 1000-2707(2015)07-0688-04

## Function of Alveoli Formation Gene – P311 in Bronchial Pulmonary Hypoplasia

ZENG Baomei<sup>1</sup>, WANG Yuchuan<sup>2</sup>, HUANG Dong<sup>2</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pediatrics, People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the function of alveoli formation gene P311 in bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Method:** A total of 64 premature mice were divided into air group and high oxygen group; air group was placed in the normal air, high oxygen group was placed in airtight oxygen chamber with oxygen concentration 90% to make BPD model. All subjects were taken the lung tissue 1, 3, 7 and 14 days after molding. HE staining was used to observe the lung tissue pathological changes and authenticate whether the model building was successful. The P311 gene expression level was detect by real - time quantitative polymerase chain reaction. **Results:** The lung tissue of premature mice did not develop mature; with the extension of time that the high oxygen group mice showed following reactions: slow reaction, slow growth in weight, lackluster hair, cyanotic nasal tip, short breath. The lung tissue surface had congestion points scattered, dilation and congestion of small blood vessels could be observed by naked eyes. 3 days after molding, the alveolar cavity was infiltrated with inflammatory cells, 7 days after molding, alveolar space increased and lung interstitial hyperplasia were found. Alveolar interstitial hyperplasia, some alveolar fusion and alveolar structure simplified 14 days after molding. These explained the model building was successful. The P311 gene levels in high oxygen group and air group increased on the 3<sup>rd</sup> day and then decreased. Compared with the air group, the

\* [基金项目] 贵州省科技厅科研项目[黔科合 J 字(2011)2250 号]

\* \* 贵州医科大学 2012 级硕士研究生

\* \* \* 通信作者 E-mail: hd522523@163.com

网络出版时间: 2015-7-1 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150701.2038.031.html>

P311 gene expression level was higher in high oxygen group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Inhaled high concentration oxygen for a long time can successfully build BPD model. P311 gene may be a regulatory factor of lung injury repair.

[Key words] alveoli; bronchopulmonary dysplasia; alveoli formation gene; animal model; gene expression

随着围产医学的发展和新生儿救治水平的提高,许多危重新生儿尤其是早产儿得以生存。作为主要救治方法中的氧疗,在改善患儿低氧血症,提高机体血氧含量的同时,因长时间高浓度氧气的吸入,造成婴儿高氧相关性支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的发生<sup>[1]</sup>,导致患儿产生氧依赖,临幊上出现反复下呼吸道感染、败血症、持续肺动脉高压及肺心病等并发症,严重影响患儿的生活质量。如何促进肺泡的再发育是治疗该病的关键,肺泡形成基因P311是与肺泡发生相关的一种阶段特异表达基因,在肺泡发育中起着重要作用<sup>[2]</sup>。研究发现,BPD的病理改变主要为肺泡发育阻滞,肺泡体积增大,数目减少<sup>[3]</sup>。本研究通过复制BPD动物模型,观察肺泡形成基因P311的mRNA表达水平变化,探讨P311基因在改善BPD中肺泡发育阻滞,促进肺泡再发育的作用。

## 1 材料及方法

### 1.1 主要材料与试剂

有机玻璃氧舱、医用氧气、氧压表、钠石灰、变色硅胶、4%多聚甲醛、动物组织RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(Invitrogen)、引物(上海生工)、SYBR Mixture(With ROX)、八联管、实时荧光定量PCR仪(Bio-Rod)。

### 1.2 实验动物与分组

普通级成年昆明小鼠30只,购自贵阳医学院动物中心,其中雌鼠20只,雄鼠10只,按雌雄比2:1的比例随机合笼,次日观察阴栓,见阴栓者记为妊娠0.5 d,雌鼠孕第18.5天时行剖宫产,取出的胎鼠,复苏存活后视为早产鼠。取64只早产鼠随机分配给近日已自行分娩的母鼠喂养(代乳鼠),每只代乳鼠带8~10只早产鼠。早产鼠适应性饲养约6 h后随机分为空气组及高氧组,空气组和高氧组根据取肺组织的时间分为第1天组、第3天组、第7天组和第14天组,每组8只。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 BPD动物模型复制 动物模型复制按参考

文献[4]方法进行,高氧组均置于氧舱(自制60 cm×40 cm×40 cm密闭的有机玻璃容器,顶部一进气孔,直径0.5 cm,侧面有1个等大的排气孔,进气孔持续通入医用氧气,容器内置有饲料、水、钠石灰、变色硅胶以及垫料)中喂养,用测氧仪监测氧舱内的氧浓度>90%,氧舱内温度与室内温度约25℃,湿度60%,CO<sub>2</sub>浓度<0.5%。每天定时开舱添加饲料和水,并更换小鼠垫料。每日将高氧组与空气组的代乳鼠互换,以避免高氧组代乳鼠因氧中毒致护理能力降低。空气组置于同一室内空气中饲养。

**1.3.2 肺组织病理学检查** 采用苏木精-伊红染色法,早产鼠分别于空气和高氧环境中饲养第1、3、7及14天后取左肺组织4%多聚甲醛固定,苏木精-伊红染色后,光镜下观察各组肺组织的病理变化。

**1.3.3 P311基因mRNA检测** 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法,根据Genebank提供的P311基因序列构建引物,同时设计GAPDH作为内参,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。P311基因上游引物序列为:3'-ctggactgaaggaaggagaat-5',下游引物序列为3'-ttcggttcaactcccttaggea-5'。取第1、3、7及14天两组小鼠的右肺组织,按照动物组织RNA提取试剂盒的步骤,提取肺组织总RNA,2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,并用核酸蛋白分析仪检测RNA的纯度及浓度。按照逆转录试剂盒的步骤迅速将RNA逆转录合成cDNA,Real-time PCR体系为(With ROX) SYBR Mixture 12.5 μL、Forward Primer 0.5 μL、Reverse Primer 0.5 μL、cDNA 1uL、Free-water 10.5 μL,循环条件为95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,65℃ 5 min;40个循环。最后收集数据进行统计分析。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用重复测量设计资料的方差分析检验和多个样本均数的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

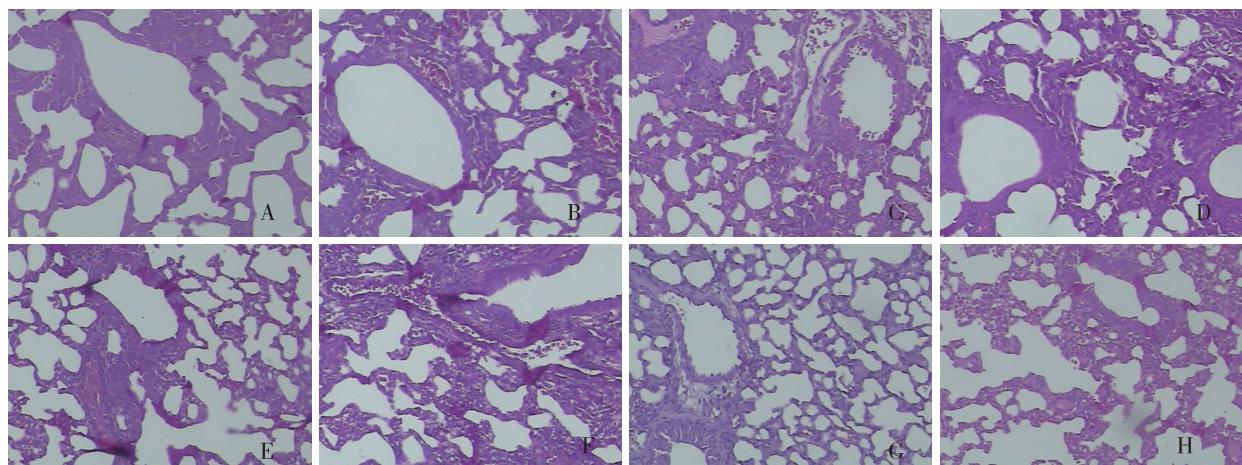
### 2.1 一般状况

空气组反应比较灵敏,鼻尖红润,毛发光泽,呼吸均匀;高氧组随着吸氧时间的延长,逐渐表现为反应迟钝,体重增长缓慢,毛发发涩、无光泽,鼻尖发绀,呼吸急促;停止吸氧后,小鼠表现为呼吸稍困难,鼻尖明显发绀,烦燥,反应差。

### 2.2 肺组织病理变化

肉眼观察:空气组肺组织呈均匀淡红色,包膜

光滑、组织弹性良好;高氧组肺组织表面有散在甚至弥漫的淤血点,小血管扩张、充血。镜下观察发现第1天时,两组肺组织均表现为肺泡结构不规则,肺泡数目少、腔较大,肺泡间隔较厚(见图1A、B);第3天时,两组肺泡体积渐变小,间隔渐变薄,高氧组肺泡腔内有炎性细胞浸润(见图1C、D);第7天时,空气组肺泡体积变小,肺泡数目渐增多;高氧组部分肺泡腔增大,肺间质增生(见图1E、F);第14天时,空气组肺泡数目渐增多,分化良好,逐渐肺泡化。高氧组肺泡腔内间质增生,少数肺泡融合,肺泡数量减少,肺泡结构简单化(见图1G、H)。



注:A、B为空气、高氧第1天组,C、D为空气、高氧第3天组,E、F为空气、高氧第7天组,G、H为空气、高氧第14天组。

图1 早产小鼠肺组织病理变化(HE, ×400)

Fig. 1 The pathological changes of lung tissue of premature mice

### 2.3 P311 基因 mRNA 表达

第3天时两组P311基因mRNA表达量最高,随后下降。高氧组P311基因mRNA表达水平高

于同一时间点空气组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 早产小鼠肺组织P311基因mRNA表达水平

Tab. 1 The P311 gene expression in the lung tissue of premature mice

组别	n	小鼠肺组织P311mRNA表达水平			
		第1天	第3天	第7天	第14天
空气组	8	5.24 ± 1.07 <sup>(1)</sup>	9.79 ± 0.81 <sup>(1)</sup>	4.74 ± 0.37 <sup>(1)</sup>	4.99 ± 0.40
高氧组	8	6.03 ± 0.82 <sup>(1)(2)</sup>	12.84 ± 0.55 <sup>(1)(2)</sup>	5.26 ± 0.41 <sup>(1)(2)</sup>	5.11 ± 0.72

注:<sup>(1)</sup>为组内相邻两组比较, $P < 0.05$ ;<sup>(2)</sup>为与空气组同一时间点比较, $P < 0.05$

## 3 讨论

BPD由Northway等人首次提出,尽管氧气对于生命而言是必须的,但超过生理限线的氧气浓度对于器官、细胞而言都具有危害性。肝脏成为长时间暴露在高氧环境下最易受损的器官<sup>[5]</sup>。研究发

现在肺发育的关键时期长时间吸入氧气会导致肺发育受损,在机体脱离氧气后肺组织可自行修复,但有时易损伤的肺组织并不能完全修复,最终发展为BPD。体积大、数量少的囊泡发展为体积小、数量多的肺泡是肺发育成熟的标志<sup>[6-7]</sup>。将小鼠置于高浓度氧气环境中的第3天均可出现肺组织形态学改变,观察至第14天时可见不同程度的肺泡

发育障碍及肺泡简单化表现。该过程与人类 BPD 病理过程极其相似<sup>[8]</sup>。

P311 是肺泡发生相关阶段特异表达的基因,有多种生物学功能,与本研究相关的是 P311 可导致细胞分化为肌纤维细胞,并增加细胞的增殖及存活率<sup>[9]</sup>,而肌纤维细胞在肺泡隔膜的形成中起着非常重要的作用。在肺组织发育的过程中,从原始肺泡到肺泡的演变,最典型的形态特征就是次级隔膜的发生和生长,隔膜的形成包含隔膜在特定位点的发生、隔膜的延伸以及隔膜上血管内皮细胞、肺上皮细胞和间质细胞的重排等一系列过程。虽然这一过程的机制还不是很清楚,但通常认为新基底膜的生成、上皮细胞和肌成纤维细胞在隔膜顶端的生长以及弹性蛋白的沉积起了重要的作用<sup>[10]</sup>。在这个过程中单独的肺泡壁可能在肺泡开口处形成一些游离“末端”,而这种末端能以一定的角度与其他肺泡壁结合形成“弯曲”,也能在一个所谓“联结点”与两个肺泡壁结合。弹性纤维和肺泡肌成纤维细胞位于呼吸过程中收缩力所在的末端和弯曲,而不是由胶原纤维控制的联结点。肺泡壁上的这些弯曲被认为是新生次级隔膜发生及延伸的位点,当机械力作用于沿弯曲分布的弹性纤维时,弹性纤维被拉离肺泡壁,启动新隔膜的形成<sup>[11]</sup>。次级隔膜发生、重建所必须的弹性蛋白正是由肌纤维细胞产生的<sup>[12]</sup>。因此推测 P311 可能与肺泡的形成密切相关,进而对整个肺组织的发育具有重要作用<sup>[13]</sup>。

本研究成功构建了 BPD 动物模型,然后通过 Real-time PCR 检测 P311 基因在早产小鼠肺组织中的 mRNA 表达水平发现,P311 基因 mRNA 表达水平在早产后第 3 天肺组织中出现高峰,然后下降维持低水平存在,说明 P311 基因可促进早产小鼠发育不成熟的肺组织肺泡的发育,导致 P311 在早产后第 3 天出现高峰,然后维持低水平存在;同时,高氧组 P311 基因 mRNA 表达水平高于同一时间点空气组 ( $P < 0.05$ ),考虑高氧组小鼠肺组织除本身发育不成熟以外,还因长期吸入高浓度氧气而受损,说明 P311 基因可能是影响肺损伤修复的调控因子,可能是通过调节肺泡上皮细胞和肺成纤维间质细胞再生和转分化,促进肺泡分隔膜的形成,抑制肺间质纤维化形成来影响肺的修复<sup>[14]</sup>。

#### 4 参考文献

[1] 陈超,袁琳.早产儿支气管肺发育不良的病因及危险因

素[J].中国实用儿科杂志.2014(1):5-7.

- [2] Zhao LQ, Leung JK, Yamamoto H, et al. Identification of P311 as a potential gene regulating alveolar generation. American Journal of Respiratory [J]. Cell Molecular Biology, 2006(1):48-54.
- [3] 早产儿支气管肺发育不良调查协作组.早产儿支气管肺发育不良发生率及高危因素的多中心回顾调查分析[J].中华儿科杂志,2011(9):655-622.
- [4] Jiang D, Liang F, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan[J]. Nat Med, 2005(11):1173-1179.
- [5] Park HS, kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases[J]. Respirology, 2009(1):27-38.
- [6] Aslam MB, Aveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009(11):1122-1130.
- [7] Van HT, Byrne R, Bonnet S, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009(11):1131-1142.
- [8] Jiunn SJ, Yaw DL, Hsiao CC, et al. Activation of the Renin-Angiotensin System in Hyperoxia Induced Lung Fibrosis in Neonatal Rats[J]. Neonatology, 2011(101):47-54.
- [9] Paliwal S, Shi J, Dhru U, et al. P311 binds to the latency associated protein and downregulates the expression of TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β<sub>2</sub> [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004(4):1104-1109.
- [10] Thurlbeck M. Pathology of the lung[M]. New York: Thieme Medical, 1995:37-87.
- [11] This Official Workshop Report was approved by the ATS Board of Directors December 2003. Mechanisms and Limits of Induced Postnatal Lung Growth [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004(3):319-343.
- [12] Wendel DP, GTaylor D, Albertine KH, et al. Impaired distal airway development in mice lacking elastin [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000(3):320-326.
- [13] 赵立青, Thiennu HV. 抑制差减杂交克隆肺泡发育上游调节基因[J].分子细胞生物学报,2006(6):553-561.
- [14] Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, et al. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway [J]. J Biol Chem, 2007(6):3968-3976.

(2015-04-05 收稿,2015-05-23 修回)

中文编辑:吴昌学; 英文编辑:赵毅