

高氧肺损伤中肺泡形成基因 *P311* 的动态变化及意义^{*}

曾宝梅¹, 王予川², 黄 栋^{2**}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨肺泡形成基因 *P311* 在高氧肺损伤中的作用。方法: 成年的昆明小鼠 64 只, 随机分为空气组和高氧组, 空气组置于室内空气中饲养, 高氧组置于同一室内氧舱中持续吸入氧浓度 >90% 的医用氧气复制高氧肺损伤动物模型; 分别于 1 d、3 d、7 d 和 14 d 后取 2 组小鼠肺组织, 苏木精-伊红染色观察肺组织病理变化并鉴定造模是否成功; 免疫组织化学染色和实时定量聚合酶链反应 (real-time PCR) 检测 *P311* 蛋白的分布和基因表达; 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测 *P311* 蛋白含量。结果: 高氧组小鼠随着吸入高浓度氧气时间的延长, 肺组织病理改变逐渐加重, 成功复制高氧肺损伤的动物模型; 免疫组织化学染色显示 *P311* 在肺组织主要定位于肺泡壁及肺泡隔膜生长点处, 在空气组小鼠肺组织中呈弱阳性反应, 而在高氧组小鼠肺组织中呈强阳性反应; 高氧组小鼠 *P311* 基因表达及蛋白含量较空气组小鼠增高, 随吸氧时间的延长, *P311* 基因表达及蛋白含量逐渐增高, 在第 7 天时达高峰 ($P < 0.05$)。结论: 高氧肺损伤后 *P311* 基因表达增加。

[关键词] 肺泡形成基因; 基因表达; 高氧症; 肺损伤; 小鼠

[中图分类号] R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)01-0027-05

The Dynamic Change and Significance of Alveoli-Forming Gene *P311* Expression in Hyperoxia-induced Lung Injury

ZENG Baomei¹, WANG Yuchuan², HUANG Dong²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Provincial
People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore expression and significance of *P311* gene of alveoli forming. **Method:** Sixty days old adult KM mice were divided into air group and hyperoxia group. Mice of air group were fed in the ordinary room air while mice of hyperoxia group were fed in oxygen chamber of the same room and continuously inhaled high concentration medical oxygen (oxygen concentration >90%). After 1, 3, 7 and 14 days, the lung tissues were taken to observe histopathological changes by hematoxylin-eosin staining and check whether the model building was successful or not. The expression of *P311* mRNA level and the *P311* protein location were detected by real-time PCR and immunohistochemistry respectively, and protein content of *P311* was detected by ELISA. **Result:** In hyperoxia group, with extension of time of inhalation of high-concentration oxygen, the lung tissue pathological changes aggravated gradually, which meant hyperoxia-induced lung injury model building was successful. Immunohistochemical staining of lung tissue showed that *P311* was mainly located in the alveolar walls and alveolar septum growing point in the lung tissue, and took on weak positive reaction in air group but strong positive reaction in the high oxygen group. Compared with air group, *P311* gene expression and protein content were significantly higher in hyperoxia group. Besides, with extension of time of inhalation of high-concentration oxygen, *P311* gene expression and protein content increased gradually and reached the peak on 7th day ($P < 0.05$). **Conclusion:** *P311* gene expression is upregu-

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

** 通信作者 E-mail: hd522523@163.com

网络出版时间: 2015-07-01 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150701.2038.031.html>

lated in hyperoxia-induced lung injury.

[**Key words**] alveoli-forming gene; gene expression; hyperoxia; lung injury; mice

氧疗是肺源性及非肺源性疾病所致呼吸衰竭时不可缺少的治疗手段,然而长时间吸入高浓度氧气,机体氧自由基产生增多,可对肺组织造成损伤,甚至导致慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)^[1-2]。高氧肺损伤是一个复杂的过程,有诸多因素、系统共同参与和介导高氧肺损伤的病理过程,高氧导致的肺损伤越来越受到临床医生的重视^[3]。相关高氧诱导肺损伤发生机制及其干预策略的研究报道日渐增多,但收益甚少。通过查阅文献发现,P311 作为肺泡形成过程中的重要基因可调节成纤维细胞的增生及转分化,减轻疤痕组织的增生,但其在高氧肺损伤修复中的作用知之甚少。本研究通过构建小鼠高氧肺损伤动物模型,在组织水平探索 P311 在高氧肺损伤中的变化。

1 材料及方法

1.1 实验动物与分组

普通级昆明小鼠购自贵阳医学院动物中心,将 60 日龄的小鼠随机分为空气组和高氧组,两组又分为 1 d、3 d、7 d 和 14 d 组,每组 8 只小鼠。

1.2 方法

1.2.1 高氧肺损伤动物模型 高氧组小鼠置于氧舱中喂养,用测氧仪监测氧舱内的氧浓度使其维持在 90% 以上,氧舱内温度与室内温度相当,湿度 60% 左右,CO₂ 浓度低于 0.5%。每天定时开舱添加饲料和水,并更换小鼠垫料。空气组均置于同一室内空气中饲养。

1.2.2 肺组织病理学检查 各组小鼠分别于空气和高氧环境中饲养 1 d、3 d、7 d 和 14 d 后取左肺组织固定在 4% 多聚甲醛中,苏木精-伊红染色后,光镜下观察各组小鼠肺组织的病理变化。并参照文献按照充血、水肿、出血、炎性浸润、肺泡结构破坏和组织增生等指标的轻重程度以及病变范围进行评分及分析。

1.2.3 肺组织 P311 蛋白分布 免疫组织化学方法检测肺组织 P311 蛋白的分布,P311 多克隆抗体购自武汉 BOSTER 公司,工作浓度 1:200;二抗及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,实验中以 PBS 液代替一抗做为阴性对照,免疫组织化学染色方法检测肺组织中 P311 蛋白分布。

1.2.4 肺组织 P311mRNA 表达 采用 Real-Time

PCR 方法。从肺组织中提取总 RNA(按照动物组织 RNA 提取试剂盒的步骤操作),然后检测 RNA 的完整性、纯度及浓度。将符合要求的 RNA 逆转录成 cDNA(按照逆转录试剂盒的步骤),然后进行扩增。

1.2.5 肺组织 P311 蛋白表达 ELISA 方法检测 P311 蛋白,肺组织匀浆后采用双抗体夹心 ELISA 法检测,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 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,组间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 各组小鼠的一般状况

空气组小鼠反应比较灵敏,活动良好,毛发光泽,鼻尖红润;高氧组小鼠随着吸氧时间的延长,逐渐表现为反应迟钝,精神萎靡,活动度下降,食量明显减少,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,头颤,站立不稳,反应差。

2.2 肺组织病理变化

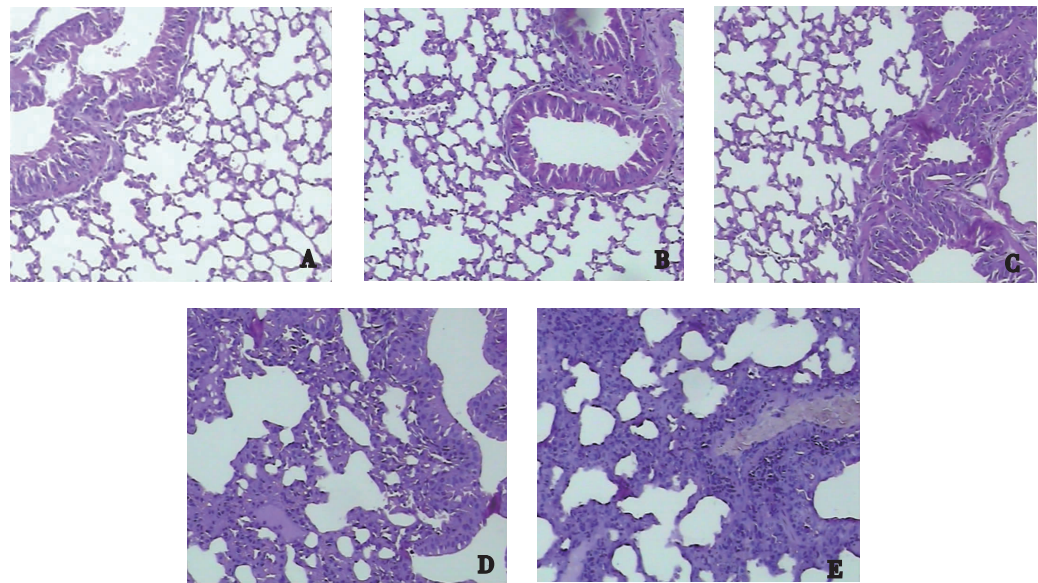
肉眼观察:空气组小鼠肺组织呈均匀淡红色,包膜光滑;高氧组小鼠的肺组织表面苍白,有散在甚至弥漫的出血点。光镜下观察:空气组小鼠肺组织肺泡发育成熟,无充血、水肿、出血、炎性浸润、肺泡结构破坏和组织增生等。高氧 1 d 组小鼠与空气组小鼠比较无明显异常;高氧 3 d 组小鼠与高氧 1 d 组小鼠比较,在肺血管、气管周围有炎性细胞浸润;高氧 7 d 组小鼠与高氧 3 d 组小鼠比较除了有炎性细胞浸润外,可见肺泡充血、水肿;高氧 14 d 组小鼠与高氧 7 d 组小鼠比较可见肺泡腔明显增大,部分肺泡融合、肺泡数量减少,肺间质细胞增生。高氧组小鼠随着吸氧时间延长,肺组织病变逐渐严重,表现为肺泡腔内炎症细胞渗出增多、间质水肿,典型小直径的肺泡数目显著减少,肺泡结构简单化和囊泡化。肺组织病理变化评分结果提示,高氧 7 d、14 d 组小鼠与同时段空气组小鼠比较,肺损伤明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);高氧

组 3 d、7 d、14 d 组内两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1 及表 1。

2.3 肺组织 P311 蛋白的分布

P311 肺组织中主要定位于肺泡壁及肺泡隔膜生长点处, 在空气组小鼠肺组织中呈弱阳性反应,

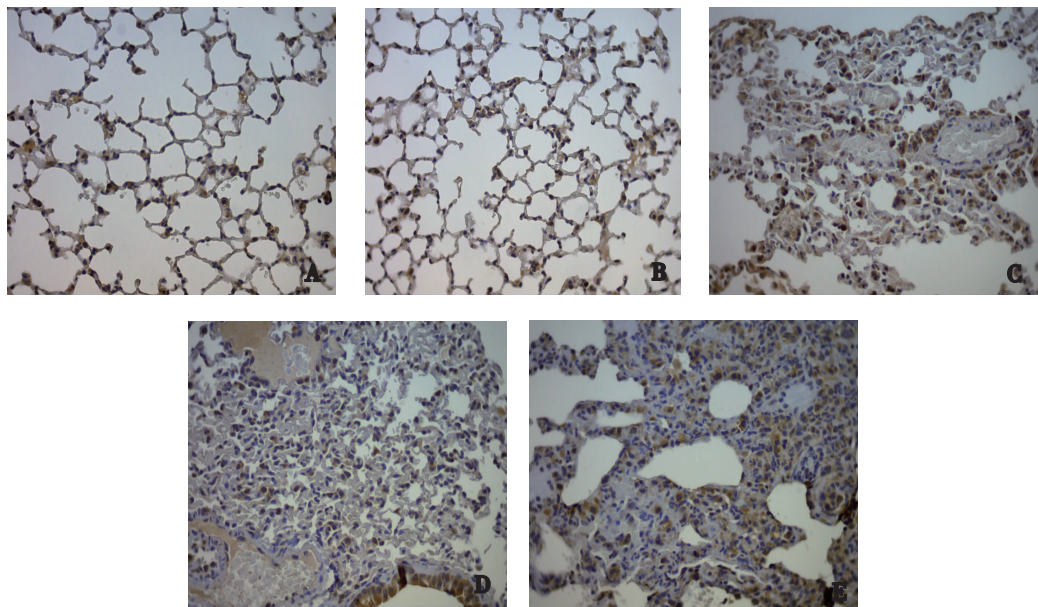
部分细胞质呈浅染色。与空气组小鼠比较, 高氧组小鼠随着吸氧时间的延长肺组织中 P311 逐渐呈强阳性反应, 表现为细胞质中的棕色颗粒; 从吸入高浓度氧后第 3 天, 至第 14 天 P311 均呈强阳性反应, 见图 2。



注: A 为空气组, B 为高氧 1 d 组, C 为高氧 3 d 组, D 为高氧 7 d 组, E 为高氧 14 d 组

图 1 空气组与高氧组小鼠肺组织苏木精 - 伊红染色 (×400)

Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining of lung tissue in air group and hyperoxia group



注: A 为空气组, B 为高氧 1 d 组, C 为高氧 3 d 组, D 为高氧 7 d 组, E 为高氧 14 d 组

图 2 空气组与高氧组小鼠肺组织免疫组织化学染色 (×400)

Fig. 2 Immunohistochemical staining for air group and hyperoxia group

2.4 肺组织 P311 mRNA 的表达

空气组各时段小鼠肺组织中 P311 mRNA 表达无显著变化。高氧组小鼠随着吸氧时间的延长, P311 mRNA 在肺组织里的表达逐渐增高, 至吸氧第 7 天时, P311 表达达高峰, 各时段高氧组小鼠肺组织 P311 mRNA 表达均高于同时段空气组小鼠 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 肺组织 P311 蛋白的含量

酶联免疫吸附测定法检测显示, 空气组小鼠肺组织 P311 蛋白含量无明显变化; 高氧组小鼠肺组织随着吸氧时间的延长, 肺组织中 P311 蛋白含量逐渐增高, 至吸氧第 7 天时, P311 蛋白含量达高峰。各时段高氧组小鼠肺组织中 P311 蛋白含量均高于同时段空气组小鼠 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 两组小鼠肺组织病理变化评分(分)

Tab.1 The change of lung histopathology scores in the adult mice lung tissue

组别	n	实验时间			
		1 d	3 d	7 d	14 d
空气组	8	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
高氧组	8	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.06 ⁽²⁾	1.01 ± 0.41 ⁽¹⁾⁽²⁾	3.50 ± 0.56 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ 与空气组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 高氧组各时段内比较, $P < 0.05$

表 2 两组小鼠肺组织 P311 mRNA 表达及蛋白定量结果 ($n = 8$)

Tab.2 Comparison of gene expression and protein content of P311 between air group and hyperoxia group

实验时间	P311 mRNA 表达		P311 蛋白定量 (ng/L)	
	空气组	高氧组	空气组	高氧组
1 d 组	5.50 ± 0.62	5.62 ± 1.88 ⁽²⁾	693.29 ± 18.55	742.30 ± 24.90 ⁽¹⁾⁽²⁾
3 d 组	5.69 ± 1.29	5.98 ± 1.50 ⁽¹⁾⁽²⁾	697.06 ± 27.50	767.26 ± 26.63 ⁽¹⁾⁽²⁾
7 d 组	5.75 ± 1.10	7.61 ± 1.66 ⁽¹⁾⁽²⁾	690.71 ± 47.67	837.15 ± 23.70 ⁽¹⁾⁽²⁾
14 d 组	5.88 ± 1.36	6.23 ± 1.27 ⁽¹⁾⁽²⁾	709.61 ± 14.83	809.40 ± 15.23 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ 与空气组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 高氧组各时段内比较, $P < 0.05$

3 讨论

尽管氧气对于挽救生命是必须的, 但长时间吸入高浓度的氧气对于细胞、器官而言都具有危害性^[4]。肺脏直接与外界相通, 因此长时间暴露在高浓度氧气环境下最易受损^[5-6]。高氧肺损伤早期病理改变为弥漫性肺泡炎症, 晚期肺泡间质增

生, 肺纤维化。肺纤维化影响患者今后肺功能, 如何减轻高氧肺损伤患者肺纤维化, 改善肺功能, 促进肺损伤的无纤维化修复一直是医学研究者关注的焦点。研究证实通过抑制性差杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 克隆, 在肺泡发生相关阶段特异表达的 P311 基因^[7], 全长 2 025 bp, 编码分子质量 8 kDa、由 68 个氨基酸组成的多肽, 在人和小鼠等物种间高度保守^[8]。P311 广泛表达于多种组织细胞中, 是一种胞内蛋白, 主要存在于胞浆, 在核内亦有少量定位。P311 主要参与受损神经系统的再生^[9-10]、促进成纤维细胞表型转化^[8,11], 并且与肿瘤细胞的迁移、浸润等密切相关^[12-13]。P311 在肺组织中主要定位于肺泡壁及肺泡隔膜生长点处, 相对于成熟肺组织, P311 基因及编码蛋白在原始肺泡期到肺泡形成初期的表达明显升高, 而后在肺泡期达到最高峰, 并在整个肺泡形成阶段保持高水平表达, 这些结果均提示 P311 可能与肺泡形成有关。研究还显示, 高表达 P311 的肺成纤维细胞可转分化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞在肺泡发育及再生过程中及肺泡隔膜的 formed 中起着重要的作用, 如次级隔膜发生及肺泡重建所必需的弹性蛋白均由肌成纤维细胞产生, 提示 P311 在防止肺损伤或对受损肺组织的修复中发挥重要的作用。本研究将小鼠置于高浓度氧气环境中, 小鼠第 3 天开始肺组织形态学发生改变, 至第 14 天时可见不同程度的肺损伤, 随着吸入高浓度氧气时间的延长, 早期为炎性反应, 后期肺泡结构逐渐简单化、纤维化^[14-15]。本实验成功建立高氧肺损伤小鼠模型, 并通过免疫组化、real-time PCR 及 ELISA 方法, 检测到 P311 主要表达于肺泡壁及肺泡隔膜生长点处, 与空气组比较, 随着吸入高浓度氧气时间的延长肺损伤加重, P311 mRNA 和蛋白表达均高于同时段空气对照组, 并于高氧肺损伤发生的第 7~14 天时达高峰。实验提示 P311 基因可能是肺损伤修复的新的调控因子, 可能通过调节肺泡 II 型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。

4 参考文献

- [1] Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury[J]. Respir Care, 2013(1):123-141.
- [2] Berkelhamer SK, Kim GA, Radder JE, et al. Developmen-

- tal differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013(61):51–60.
- [3] 胡良冈,钱燕,龚永生. SPF 级新生大鼠高氧肺损伤模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2008(6):441–443.
- [4] Makena PS, Gorantla VK, Ghosh MC, et al. Lung injury caused by high tidal volume mechanical ventilation and hyperoxia is dependent on oxidant-mediated c-Jun NH2-terminal kinase activation[J]. *J Appl Physiol*, 2011(5):1467–1476.
- [5] Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases[J]. *Respirology*, 2009(1):27–38.
- [6] Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S, et al. Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008(4):739–753.
- [7] Zhao LQ, Leung JK, Yamamoto H, et al. Identification of P311 as a potential gene regulating alveolar generation[J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2006(10):48–54.
- [8] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, et al. P311 induces a TGF-beta 1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype[J]. *J Clin Invest*, 2002(9):1349–1358.
- [9] Fujitani M, Yamagishi S, Che YH, et al. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve[J]. *J Neurochem*, 2004(3):737–744.
- [10] Erhardt JA, Pittman RN. Ectopic p21 WAF 1 expression induces differentiation – specific cell cycle changes in PCI 2 cells characteristic of nerve growth factor treatment[J]. *J Biol Chem*, 1998(7):23517–23523.
- [11] Paliwal S, Shi J, Dhru U, et al. P311 binds to the latency associated protein and downregulates the expression of TGF-beta1 and TGF-beta2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004(4):1104–1109.
- [12] Mariani LW, McDonough S, Hoelzinger DB, et al. Identification and validation of P311 as glioblastoma invasion gene using laser capture micro-dissection[J]. *Cancer Res*, 2001(5):4190–4196.
- [13] Fang MZ, Liu C, Song Y, et al. Overexpression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2004(6):865–871.
- [14] 张向峰,朱光发,刘双,等. 基质金属蛋白酶-2/9 及其组织抑制剂比例失衡在高氧所致急性肺损伤中的作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2008(10):597–600.
- [15] Perkowski S, Scherpereel A, Murciano JC, et al. Dissociation between alveolar transmigration of neutrophils and lung injury in hyperoxia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006(5):1050–1058.

(2015-07-20 收稿, 2015-10-07 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 刘华

(上接第 26 页)

4 参考文献

- [1] 李剑,郑莉莉,王建祯. 脑胶质瘤细胞体外原代培养化疗药物敏感性研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011(6):13–15.
- [2] Hargrave DR, Zacharoulis S. Pediatric CNS tumors: current treatment and future directions[J]. *Expert Rev Neurother*, 2007(8):1029–1042.
- [3] 袁勇,黄晓斌,廉坤,等. 适度低氧微环境对体外培养脑胶质瘤干细胞生长的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2015(6):22–25.
- [4] 方川,檀艳丽,王佳良,等. 人脑胶质瘤原代细胞培养及体外药物敏感度的实验[J]. *肿瘤防治研究*, 2010(12):1380–1383.
- [5] 杨学军. 解读《世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类(2007 年)》[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007(9):513–517.
- [6] 杨继红,张革化,魏燕,等. 酶消化分离法原代培养人鼻黏膜上皮细胞的改进[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009(23):1066–1068.
- [7] 周蓉,滕晓华,曾瑜,等. 星形胶质瘤细胞的分离培养及生物学特性观察[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009(6):495–499.
- [8] 李晓良,孙王伟,张曙光,等. miR-125b 对胶质瘤细胞侵袭能力影响的体内研究[J]. *临床神经外科杂志*, 2014(2):90–93.
- [9] 刘国红,柴玉荣,朱晓燕,等. 连续微量培养液胃癌组织块贴壁培养法[J]. *肿瘤防治研究*, 2008(2):147–148.
- [10] 袁彬,李彤. 转化生长因子 $\beta 1$ 对体外大鼠星形胶质细胞形态及胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2007(16):1456–1458.
- [11] Perng MD, Wen SF, Gibbon T, et al. Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP-delta, but with consequences for filament organization and alphaB-crystallin association[J]. *Mol Biol Cell*, 2008(10):4521–4533.

(2015-09-27 收稿, 2015-11-05 修回)

中文编辑: 周凌; 英文编辑: 刘华