

FN 及 HA 在高氧致新生鼠肺损伤中动态变化及其意义

富建华, 薛辛东[△]

(中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:探讨纤维连接蛋白(FN)及透明质酸(HA)在高氧诱导新生鼠肺损伤发生中动态变化及意义。方法:将 160 只新生鼠随机分为实验组和对照组,每组 80 只,采用高浓度氧诱导的肺损伤模型,于实验后 1,3,7,14,21 d,观察支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜中性粒细胞及肺组织含水量的变化,并应用酶联免疫吸附法测定肺组织 FN 及 HA 的含量。结果:与对照组比较,在实验组肺组织含水量 1 d 增加 ($P < 0.05$),3 d 达高峰 ($P < 0.01$),7 d 仍高于正常 ($P < 0.05$);BALF 中嗜中性粒细胞的水平 7,14,21 d 均明显升高 ($P < 0.01$);而 FN 含量 3 d 开始升高 ($P < 0.05$),7 d 达高峰 ($P < 0.01$),14 d 仍高于正常 ($P < 0.05$);HA 含量 1 d 开始升高 ($P < 0.05$),3 d 达高峰 ($P < 0.01$),7 d 仍高于正常 ($P < 0.05$)。结论:暴露高氧环境中新生鼠的肺组织 FN 及 HA 水平增加可能与早期肺泡炎性反应和肺间质水肿密切相关。

[关键词] 高氧;肺损伤;纤维连接蛋白;透明质酸;新生鼠

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)01-0012-03

Dynamic change of fibronectin and hyaluronic acid in newborn rats with hyperoxia-induced lung injury

FU Jian-hua, XUE Xin-dong[△]

(Department of Pediatrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the dynamic change of fibronectin and hyaluronic acid in newborn rats with hyperoxia-induced lung injury and its significance. **Methods:** A total of 160 newborn rats were randomly and equally divided into experimental group and control group. The rat model of hyperoxia-induced lung injury was established in the experimental group. The changes of the number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the lung water content were observed, and the levels of fibronectin and hyaluronic acid were determined with enzyme-linked immunosorbent assay on days 1, 3, 7, 14, and 21. **Results:** Compared with the control group, in experimental group, the lung water content, i.e. the lung dry to wet weight ratio, increased from day 1 ($P < 0.05$), reached the peak on day 3 ($P < 0.01$), and remained high on day 7. The number of neutrophils in BALF in experimental group was significantly higher than that in control group from day 7 to day 21 ($P < 0.01$). The level of fibronectin increased from day 3 ($P < 0.05$), reached the peak on day 7 ($P < 0.01$), and remained high on day 14 ($P < 0.05$). The level of hyaluronic acid increased from day 1 ($P < 0.05$), reached the peak on day 3 ($P < 0.01$), and remained high on day 7 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The levels of fibronectin and hyaluronic acid increase in newborn rats exposed to hyperoxia, which may play an important role in the alveolar inflammation and interstitial edema.

[Key words] hyperoxia; lung injury; fibronectin; hyaluronic; newborn rat

低氧血症是危重新生儿最常见的临床表现,也是导致新生儿中枢神经系统不可逆性损害的重要原因之一。氧属于气体药物,若长时间吸入高浓度氧仍可导致不同程度的肺损伤。本文以高氧诱导新生鼠肺损伤模型为对象,动态测定肺组织纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及透明质酸(hyaluronan, HA)含量,并同步观察支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中嗜中性粒细胞及肺组织含水量的变化,旨在探讨 FN 及 HA 在高氧致新生鼠肺损伤中变化及意义。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

将孕 22~23 d 的 SD 大鼠(由中国医科大学实验动物部提供)自然分娩后产出的新生鼠 160 只,依吸氧浓度(fraction of inspiratory, FiO₂)随机分为实验组(FiO₂ 为 90%)和对照组(FiO₂ 为 21%),每组均为 80 只。平均体重分别为(6.13 ± 0.12)g、(6.19 ± 0.14)g,雌雄不限。

1.2 动物模型

实验组将新生 SD 大鼠(连同母鼠)生后即置于氧箱中,持续输入氧气,维持 FiO₂ 为 90%(用测氧仪监测),CO₂ 浓度 <0.5%(用钠石灰吸收 CO₂),温度 25~27℃,湿度 50%~70%,每 24 h 定时开箱 30 min,添加水、饲料及更换垫料,并与对照组交换母鼠以避免其因氧中毒致喂养能力下降^[1]。对照组 FiO₂

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30440056)

[作者简介] 富建华(1965-),女,博士,副教授。

[△]Corresponding Author's E-mail: xdxue@163.com

为 21%,具体方法及实验控制因素同实验组。

1.3 标本采集

每组分别于实验后的 1、3、7、14、21 d 随机选取 16 只麻醉后处死。其中 8 只,将左肺组织完整取出后用于测定肺组织含水量,右肺上叶置于 4%多聚甲醛中固定,用于观察肺组织的形态(光镜),其余肺组织于 -80°C 冰箱中冻存待测 FN 及 HA。另 8 只行支气管肺泡灌洗后收集 BALF。

1.4 检测指标及方法

(1)肺组织含水率的测定:采用质量分析法。将左肺组织轻擦表面后立即称重(其质量为肺湿重),继之将其置于 75°C 烤箱中,72 h 后再进行称重(其质量为肺干重)。肺组织含水率 = $1 - \text{肺干重} / \text{肺湿重}$ 。(2)支气管肺泡灌洗:动物麻醉后,切开颈部皮肤,气管暴露后,将自制的导管插入气管并固定,继之向肺内缓慢注入冷生理盐水 0.3~0.5 ml,然后回抽,反复操作 5 次,将收集的 BALF,1 500 r/min,离心 10 min,取沉淀加生理盐水悬浮后进行细胞计数。(3)肺组织 FN 及 HA 含量的测定:采用酶联免疫吸附法检测。用预冷的生理盐水洗净残血,吸干水分,称 1 g 湿重肺组织煎碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成 10%的组织匀浆,低温离心后取上清液,分别按照 I 型胶原、FN 及 HA 测定试剂盒(上海森雄生物制品公司提供)要求按步骤进行,结果以每 mg 肺组织 FN 及 HA 的含量表示(ng/mg)。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 肺组织的形态学变化 对照组生后 1 d 表现为肺泡腔略大,肺泡间隔稍厚,3~21 d,肺泡腔大小基本一致,肺间隔薄,个别肺泡腔内可见肺泡巨噬细胞;实验组生后 1 d 同对照组,3 d 时肺泡壁毛细血管扩张,肺间隔水肿,肺间隔及肺泡腔内有中性粒细

胞浸润,7 d 时部分肺泡腔变小,肺间隔增宽,并可见大量肺中性粒细胞,14 d 肺泡腔小,肺泡数量减少,肺间隔明显增厚,肺间质细胞增加,21 d 正常肺泡结构消失,残留肺泡腔直径明显减小,肺间质内可见大量成纤维细胞。

2.2 两组肺组织含水量的变化 1 d 实验组即高于对照组($P < 0.05$),3 d 达高峰($P < 0.01$),7 d 仍高于正常($P < 0.05$),14 d、21 d 与对照组无差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组肺组织含水率比较($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{mg}$)

Tab.1 Water content in lung ($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{mg}$)

日龄(d)	实验组	对照组
1	$0.80 \pm 0.02^{1)}$	0.73 ± 0.05
3	$0.84 \pm 0.05^{2)}$	0.73 ± 0.06
7	$0.79 \pm 0.04^{1)}$	0.73 ± 0.08
14	0.77 ± 0.02	0.76 ± 0.03
21	0.74 ± 0.04	0.76 ± 0.05

注:与对照组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

2.3 两组 BALF 中嗜中性粒细胞的水平 1 d、3 d 时两组无差异($P > 0.05$),于 7、14、21 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$),见表 2。

表 2 两组 BALF 中嗜中性粒细胞的比较($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Level of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

日龄(d)	实验组	对照组
1	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
3	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
7	$0.15 \pm 0.05^{1)}$	0.03 ± 0.00
14	$0.30 \pm 0.08^{1)}$	0.05 ± 0.02
21	$0.19 \pm 0.07^{1)}$	0.05 ± 0.03

注:1)与对照组比较 $P < 0.01$

2.4 两组肺组织 FN 及 HA 水平的变化 FN 含量 1 d 实验组与对照组比较无差异 ($P > 0.05$),3 d 开始升高($P < 0.05$),7 d 达高峰($P < 0.01$),14 d 虽有降低,但仍高于正常($P < 0.05$),21 d 降至正常;HA 含量实验组 1 d 开始升高 ($P < 0.05$),3 d 达高峰($P < 0.01$),7 d 仍高于正常 ($P < 0.05$),14 d 恢复至正常水平,见表 3。

表 3 两组肺组织 FN 及 HA 水平($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Levels of fibronectin and hyaluronic acid in lung ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

吸氧时间 (d)	FN (ng/mg)		HA (ng/mg)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
1	60.19 ± 9.98	62.16 ± 18.44	$5.52 \pm 1.12^{1)}$	4.17 ± 0.08
3	$89.75 \pm 13.09^{1)}$	62.65 ± 20.40	$6.96 \pm 1.57^{2)}$	4.55 ± 0.83
7	$107.79 \pm 15.30^{2)}$	64.58 ± 16.41	$5.50 \pm 1.09^{1)}$	4.13 ± 0.10
14	$92.98 \pm 13.21^{1)}$	66.70 ± 16.25	3.88 ± 1.01	3.56 ± 1.57
21	65.13 ± 11.03	67.09 ± 15.21	3.46 ± 1.05	3.42 ± 1.27

注:与对照组比较 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

3 讨论

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是存在于细胞之间结构和功能高度复杂的生命大分子,肺内的ECM主要由胶原蛋白、糖蛋白(如FN)和蛋白聚糖(如HA)组成。以往人们一直认为ECM仅为细胞或组织提供力学支持及物理强度的物质,而近年来发现,ECM对细胞增殖、分化、代谢及在损伤后组织修复中均发挥重要作用。目前有关ECM在肺疾病发生中作用的研究多集中于中胶原蛋白,且大量结果已证实,肺间质胶原的过量沉积是成人特发性肺间质纤维化及博莱霉素诱导大鼠肺纤维化的重要原因。

长时间吸入高浓度氧是早产儿慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD)的最常见原因和最危险因素,CLD的主要病理变化为不可逆的肺间质纤维化。我们结果证实,暴露高氧的新生鼠,肺组织的形态学早期以肺泡炎症为主,继之肺间质水肿,且随暴露时间延长,肺损伤逐渐加重,最终发生肺纤维化。有许多研究发现,在高氧致肺损伤的动物模型中,BALF及肺组织中胶原水平明显增高^[2];尸检结果也证实,CLD肺组织病灶内胶原蛋白沉积水平与纤维化程度呈正相关^[3],因此,肺内胶原沉积是高氧肺损伤最终病理结局。

FN是一具有高度黏附活性的大分子糖蛋白,主要来源于巨噬细胞。有研究发现,经大鼠气管注入博莱霉素后1d,肺内FN含量迅速而持续增高,而I型胶原的含量则于1周后开始增加,且免疫组化证实两者的沉积部位基本一致^[4],因此认为,FN沉积与肺组织纤维化的发生密切相关,但其确切机制尚不清楚,可能与下列因素有关:(1)FN有类生长因子作用,对间质细胞有趋化作用,能促进肺成纤维细胞(LF)的分裂、增殖;(2)FN与其受体整合素 $\alpha_5\beta_1$ 结合,可能在转录水平上增强LF前胶原mRNA的表达。然而有实验发现,在博莱霉素致大鼠肺纤维

化的晚期阶段BALF中FN的水平已恢复正常^[5]。有结果表明,在CLD患儿早期BALF中,FN含量已明显增高^[6]。我们研究发现,肺组织FN含量初始增加及峰值时间略先于BALF中性粒细胞的增加,但其持续时间两者相一致,该结果提示肺组织FN的增加不仅与肺纤维化发生有关,可能还参与了早期的肺泡炎性反应,但其机制尚不清楚。

HA是肺内糖胺聚糖的主要成分之一,可来源于II型肺上皮细胞、内皮细胞及肺成纤维细胞。具有高度的亲水性,在细胞外形成水化胶质填充于纤维网架间隙。CLD患儿BALF中HA水平也明显升高,但其作用及意义尚不清楚。本研究结果显示,新生鼠暴露于高氧环境中,其肺组织HA水平与含水量的动态变化时相及趋势完全一致,且其高峰期也恰是肺组织呈现出明显肺泡炎症及肺间质水肿的病理变化阶段。该结果提示,HA可能通过固定水的作用参与或加重高氧肺损伤早期肺炎性反应,但其确切机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 富建华,薛辛东.高氧诱导早产鼠慢性肺疾病肺超微结构变化及氧化应激反应的研究[J].中国当代儿科杂志,2004,6(1):23-26.
- [2] WARNER BB,STUART LA,PAPES RA,et al. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1998, 275(1):L110-L117.
- [3] CHERUKUPALLI K, LARSON JE, ROTSCCHILD A, et al. Biochemical, clinical and morphologic studies on lung of infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. Pediatr Pulmonol, 1996, 22(1): 215-229.
- [4] 吴浩,许祖德,张月娥,等.纤维连接蛋白在大鼠肺纤维化中的作用[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(1):40-42.
- [5] 姜莉,陈伯义,侯显明.肺纤维化大鼠细胞外基质蛋白的变化[J].中国医科大学学报,1998,27(1):26-28.
- [6] 富建华,薛辛东.转化生长因子 β 与早产儿慢性肺疾病[J].中华儿科杂志,2003,41(4):313-315.

[收稿日期] 2005-12-22