

caspase-3 基因在高氧致早产鼠慢性肺疾病中的表达及其作用

富建华, 于凤英, 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 *caspase-3* 在高氧致早产鼠慢性肺疾病(CLD)中的表达及其对肺上皮细胞(AEC)凋亡的影响。方法:将 60 例早产鼠随机分为模型组和对照组,分别于建立模型后 1,3,7,14,21 d 应用 TUNEL 和 RT-PCR 技术,动态检测 AEC 的凋亡指数(AI)和肺组织 *caspase-3* 基因表达。结果:暴露于高氧后 3 d AEC 的 AI 及肺组织的 *caspase-3* mRNA 水平开始升高($P < 0.05$),7~21 d 维持高水平($P < 0.01$),且肺组织 *caspase-3* mRNA 表达与 AEC 的 AI 呈显著相关性($\gamma = 0.69, P < 0.01$)。结论:高氧诱导的肺组织 *caspase-3* 基因过度表达可能是 CLD 早产鼠肺上皮细胞凋亡的重要机制之一。

[关键词] 半胱氨酸蛋白酶-3;凋亡;高氧;慢性肺疾病;早产鼠

[中图分类号] R722.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)06-0628-03

Expression and effect of *caspase-3* mRNA in premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease

FU Jian-hua, YU Feng-ying, XUE Xin-dong[△]

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the dynamic changes of *Caspase-3* mRNA expression and their effect on apoptosis of alveolar epithelial cell (AEC) in premature rat with hyperoxia-induced chronic lung disease (CLD). **Methods:** Sixty premature rats were randomly exposed to hyperoxia (model group) and to room air (Control group) ($n=30$ each). CLD was induced by hyperoxia exposure. The apoptotic AEC was detected by in situ nick end-labeling (TUNEL), and expression of *Caspase-3* mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at 1,3,7,14 and 21 days after exposure. **Results:** In the model group, the apoptotic index (AI) of AEC and expression level of *Caspase-3* mRNA increased 3 days after the exposure ($P < 0.05$), which reached the peak from 7th to 21st day ($P < 0.01$). The expression of *Caspase-3* mRNA was positively correlated with AI of AEC ($\gamma = 0.69, P < 0.01$). **Conclusion:** The *Caspase-3* expression increased with the time of hyperoxia exposure. The over-expression of *Caspase-3* in lung tissues induced by hyperoxia might be one of the underlying mechanisms of apoptosis of AEC in premature rats with CLD.

[Key words] *Caspase-3*; apoptosis; hyperoxia; chronic lung disease; premature rat

尽管早产儿慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD) 的发生机制仍未阐明,但因肺上皮细胞坏死或凋亡而导致的肺发育障碍已被研究证实。我们前期研究表明,在 CLD 早产鼠模型随高氧暴露时间延长,肺上皮细胞的凋亡逐渐增加^[1],但其机制尚不清楚。近年来,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (*caspase*) 家族已成为当今研究细胞凋亡信号通路的中心环节,而 *Caspase-3* 则被认为是该途径最重要的效应分子^[2]。本文以高氧诱导早产鼠 CLD 模型为对象,研究肺组织 *caspase-3* 基因的动态表达规律及其对肺上皮细胞凋亡的影响,旨在阐明高氧致 CLD 肺上皮细胞 (alveolar epithelial cell, AEC) 凋亡时 *caspase-3* 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672253)

[作者简介] 富建华(1965-),女,副教授,博士。

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

孕 21 d SD 大鼠 (由中国医科大学实验动物部提供) 剖宫取出的鼠仔即为早产鼠。依据吸氧浓度 (fraction of inspiratory, FiO_2) 随机分为模型组 (FiO_2 为 90%) 和对照组 (FiO_2 为 21%), 每组均为 30 只。平均体质量分别为 $(4.84 \pm 0.13)g$ 、 $(4.83 \pm 0.12)g$, 雌雄不限。

1.2 动物模型

实验组将早产 SD 大鼠 (连同母鼠) 生后即置于氧箱中,持续输入氧气,维持 FiO_2 为 90% (用测氧仪监测), CO_2 浓度 $< 0.5\%$ (用钠石灰吸收 CO_2), 温度 $25 \sim 27^\circ C$, 湿度 $50\% \sim 70\%$, 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因氧中毒致喂养能力下降。对照组 FiO_2 为 21%, 具体方法及实验控制因素同实验组^[3]。

1.3 标本采集

每组分别于实验后的 1、3、7、14 和 21 d 随机选取 6 只麻醉后处死。将左肺组织完整取出后置于 4% 多聚甲醛中固定,制备切片用于细胞凋亡的检测,其余肺组织于 $-80^\circ C$ 冰箱中冻存待测肺组织

caspase-3 mRNA 表达。

1.4 肺上皮细胞凋亡检测

采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的末端标记法 (in situ nick end-labeling, TUNEL), TUNEL 分析试剂盒购自北京中山生物制品公司。常规脱腊、复水, 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 蛋白酶 K 消化, PBS 洗 2 min×3 次后, 加入 TUNEL 反应物, 37℃ 孵育 60 min, PBS 洗 2 min×3 次, 滴加转化物 POD, 37℃ 孵育 30 min 后, 进行 DAB 显色, 再经苏木素复染, 透明封片。结果判定以细胞核染成棕黄色即为凋亡细胞。计算方法: 每例选择 5 个以上具有代表性高倍视野 (×400), 计数 200 个 AEC 中阳性细胞数, 即凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

$$AI = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

1.5 肺组织 caspase-3 mRNA 检测

采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术。以 Trizol 提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增。引物序列如下: caspase-3 上游: 5'-GGT

ATTGAGACAGACAGT GG-3', 下游: 5'-CATGGG ATCTGTTTCTTTGC-3 (280 bp); β -actin (内参照) 上游: 5'-GATTGCCTCAGGACA TTT CTG-3', 下游: 5'-GATTGCTCAGGACATTTC TG-3' (690 bp)。PCR 条件: 94℃ 变性 4 min, 94℃ 30s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 紫外灯下观察结果。用 caspase-3 及 β -actin 扩增产物的吸光度比值表示每个标本的相对 mRNA 水平。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计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 两组 AEC 的 AI 比较

1 d 两组无差异 ($P > 0.05$), 3 d 模型组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 7 d 和 14 d 继续升高, 21 d 达高峰 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 两组肺泡上皮细胞 AI 及肺组织 caspase-3 mRNA 表达 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)
Tab.1 Changes of AI in AEC and expression of caspase-3 mRNA in both groups ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	AI					caspase-3 mRNA				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
模型组	0.45 ± 0.36	3.50 ± 1.38 ¹⁾	20.05 ± 3.98 ²⁾	37.26 ± 5.73 ²⁾	46.38 ± 7.35 ²⁾	0.82 ± 0.07	1.12 ± 0.17 ¹⁾	1.24 ± 0.15 ²⁾	1.32 ± 0.28 ²⁾	1.44 ± 0.26 ²⁾
对照组	0.50 ± 0.26	0.75 ± 0.25	2.76 ± 1.02	4.62 ± 1.44	6.17 ± 2.07	0.81 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.83 ± 0.15	0.84 ± 0.12	0.88 ± 0.20

注: 与对照组比较, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

2.2 两组肺组织 caspase-3 mRNA 表达水平

1 d 两组无差异 ($P > 0.05$), 3 d 模型组高于对照组 ($P < 0.05$), 7 d 和 14 d 继续升高, 21 d 达高峰 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 实验组 caspase-3 mRNA 与 AEC 的 AI 相关性

肺组织 caspase-3 mRNA 水平与 AEC 的 AI 呈明显的正相关 ($\gamma = 0.69, P < 0.01$)。

3 讨论

随着早产儿管理技术的日益完善、机械通气的广泛开展及肺表面活性物质的普遍应用, 使得超低出生体重儿 (出生体质量 < 1 000 g) 的存活率有了明显改善, 但早产儿 CLD 的发生率也在逐年上升, 重者多于生后 1 年内死于呼吸衰竭, 幸存者也因高氧肺损伤而导致肺功能障碍需长期 (数月/数年) 依赖氧气或反复机械通气治疗, 严重影响了早产儿的生活质量, 是目前导致小儿致残的主要疾病之一。尽管早产儿 CLD 发生机制尚不清楚, 但许多研究表明, 肺上皮细胞凋亡与肺损伤的发生密切相关, 如

DANAN 等报道, 95% 高氧可诱导体外培养的胚胎大鼠 II 型肺泡上皮细胞大量凋亡^[3], MCGRATH-MORROW 等也报道, 暴露于高氧中新生足月小鼠, 肺细胞的凋亡信号增加, 其程度与氧作用时间成正比^[4], 我们研究也发现, 高氧诱导的早产鼠 CLD 模型, 3 d AEC 的凋亡数量开始增加, 继之持续上升, 21 d 达高峰^[1]。由此可见, 高氧可诱导肺上皮的凋亡, 且随暴露时间的延长, 凋亡逐渐加重。因此, 高氧可能在肺发育关键阶段诱导肺上皮细胞的凋亡, 从而引起肺生长延迟或停滞及重塑异常, 最终导致 CLD 肺发育障碍, 但有关高氧肺上皮凋亡的发生机制, 目前尚不清楚。

近年来, Caspase 家族已成为当今研究细胞凋亡信号通路的中心环节。Caspase 属含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶, 能特异性剪切天冬氨酸残基的肽键 (Asp-x), 通过下游效应因子切断细胞间的信号传递, 重组细胞骨架, 关闭 DNA 的复制与修复, 发挥其破坏 DNA 和细胞核结构的作用, 从而诱导细胞凋亡。目前已发现 Caspase 家族成员中至少有 14 个,

按其发现顺序依次为 Caspase 1~14, 而其中的 Caspase-3 为执行凋亡过程中最重要的效应分子, 并认为 Caspase-3 一旦激活, 凋亡则难以避免, 故又称之为细胞凋亡的终末剪切酶^[2]。在高氧致 CLD 发生中, 虽高氧可诱导肺上皮细胞的凋亡, 但其机制尚未清楚。但有研究发现, 将小鼠暴露于高氧中($\text{FiO}_2 > 98\%$) 24 h, 肺泡上皮细胞的凋亡指数明显增加, 72h 达高峰, 且发现肺组织 caspase-3 mRNA 表达也于 72 h 达高峰^[5]。还有研究与我们建立的 CLD 模型类似, 将早产鼠置于高氧中($\text{FiO}_2 = 85\%$), 于暴露后 4 d, 7 d 和 14 d 肺组织 caspase-3 水平明显增高, 且与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量呈正相关^[6]。上述研究结果表明高氧可诱导肺组织 caspase-3 的表达, 但前者仅阐明高氧所致急性肺损伤(72 h 内)肺上皮凋亡与 caspase-3 表达密切相关, 而后者阐明早产鼠 CLD 发生中肺组织 TNF- α 诱导 caspase-3 过度表达, 但并未阐明 caspase-3 与细胞凋亡的相互关系。那么高氧致 CLD 模型中肺组织 caspase-3 表达的动态规律以及对肺上皮细胞凋亡的影响如何, 目前尚不清楚。因此阐明该问题, 可能对完善 CLD 的发生机制及探索肺发育障碍的有效防治途径可能具有一定的指导意义。

既然 Caspase-3 被认为是细胞凋亡的终末剪切酶, 那么高氧诱导早产鼠 CLD 模型中肺上皮细胞凋亡与肺组织 Caspase-3 表达有何关系目前尚不清楚。因此, 我们在建立该早产鼠 CLD 模型的基础上, 不仅观察肺上皮细胞的凋亡, 还测定肺组织 caspase-3 mRNA 水平; 结果发现, 两者呈同步变化趋势, 即

暴露于高氧后的 3 d 开始上升, 继之持续增加, 21 d 达高峰, 且肺组织 caspase-3 mRNA 水平与 AEC 的 AI 呈明显的正相关。该结果提示我们, 高氧可能通过诱导肺组织 caspase-3 mRNA 的过度表达, 最终促发肺上皮细胞的程序性死亡过程(即凋亡), 从而导致 CLD 肺泡发育障碍, 故应用 caspase-3 的拮抗剂可能是探索 CLD 肺发育障碍有效防治途径之一, 但有关 caspase-3 mRNA 诱导肺上皮细胞凋亡的详尽机制尚有待进一步深入研究和证实。

参考文献:

- [1] 富建华, 薛辛东. 高氧致 CLD 早产鼠肺上皮细胞凋亡及相关基因表达的动态研究 [J]. 中国医科大学学报, 2005, 34(2): 100-104.
- [2] COHEN GM. Caspase: the executioners of apoptosis [J]. Biochem J, 1997, 326(pt 1): 1-16.
- [3] DANAN C, FRANCO ML, JARREAU PH, et al. High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(10): 1384-1387.
- [4] MCGRATH-MORROW SA, STAHL J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(2): 150-155.
- [5] 张向峰, HUSSEIN D. FODA. 高氧所致急性肺损伤小鼠肺组织细胞凋亡和坏死的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(7): 465-468.
- [6] 刘伟, 常立文, 李文斌. 早产大鼠高氧暴露下肺组织 TNF- α Caspase-3 表达时相研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(5): 451-454.

[收稿日期] 2006-11-14

(编辑 裴孝琦)