

不同氧浓度暴露对早产鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤及 CGRP 的保护效应

王少华, 许峰, 党红星

(重庆医科大学附属儿童医院 PICU, 重庆 400014)

摘要: **目的** 观察不同氧浓度对早产鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)的影响以及降钙素基因相关肽(CGRP)对AECⅡ的保护作用。**方法** 将原代分离培养的孕19天早产鼠AECⅡ接种至6孔培养板,随机分为空气组、40%氧组、60%氧组、80%氧组及相关浓度氧CGRP组与相关浓度氧CGRP受体拮抗剂组。空气组和高氧组分别置于体积分数为21%的空气或40%、60%、80%的氧气中暴露24h;CGRP组在暴露前加入CGRP;CGRP拮抗剂组在CGRP组基础上加入CGRP受体拮抗剂(CGRP8-37)。培养24h后,用分光光度计测定各组丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(TAOC)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;用流式细胞仪检测活性氧(ROS)和细胞凋亡率;用逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)测定表面活性蛋白C(SP-C)的mRNA表达。**结果** 与空气组比较,40%、60%、80%氧组MDA、ROS及细胞凋亡率均显著增高,TAOC、SOD水平及SP-C mRNA表达均显著降低(P 均 <0.01)。与氧气组比较,高氧CGRP组细胞MDA、ROS水平及细胞凋亡率均显著下降;而TAOC、SOD水平及SP-C mRNA表达均明显增高($P < 0.01$)。高氧CGRP拮抗剂组与高氧组各指标比较差异均无显著性。**结论** 高于40%氧暴露24h可导致早产鼠AECⅡ发生氧化损伤,诱导细胞凋亡及SP-C mRNA表达下降;随着氧浓度增加,损伤加重;而CGRP可部分减轻AECⅡ的氧化损伤,减少凋亡,促进SP-C mRNA表达,对高氧损伤的AECⅡ起保护作用。

关键词: 氧浓度; 肺损伤; 肺泡Ⅱ型上皮细胞; 降钙素基因相关肽

中图分类号: R722 文献标识码: A

Protection of Calcitonin Gene-Related Peptide From Damage Induced by Hyperoxia on Premature Rat Type II Alveolar Epithelial Cells

WANG Shaohua, XU Feng, DANG Hongxing

(*Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China*)

Abstract: Objective To explore the influence of different oxygen concentrations and the effects of calcitonin gene-related peptide(CGRP) on type II alveolar epithelial cells(AEC II) isolated from premature rat lung in vitro. **Methods**

AEC II were isolated from 19d fetal rat lung and cultured for 12h to attach. Then AEC II were randomly divided into ten groups: air group, 40% oxygen concentration group, 60% oxygen concentration group, 80% oxygen concentration group, hyperoxia (40%, 60%, 80%) plus CGRP group, hyperoxia (40%, 60%, 80%) plus CGRP and CGRP8-37 group. AEC II of air group and hyperoxia group were exposed to 21%, 40%, 60%, 80% oxygen respectively for 24h while hyperoxia plus CGRP group were added with CGRP and hyperoxia plus CGRP and CGRP8-37 group with CGRP and CGRP8-37 (CGRP receptor antagonist) before placed into 40%, 60%, 80% oxygen concentration. Concentrations of maleic dialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) and total antioxidant capacity (TAOC) in culture cells were detected by ultraviolet spectrophotometer. Reactive oxygen species (ROS) and apoptosis rate of AEC II were analyzed by flow cytometry and the mRNA level

of surfactant associated protein C (SP-C) was measured by RT-PCR. **Results** The levels of MDA, ROS and apoptosis cell number were increased whereas TAOC, SOD and SP-C mRNA expression declined in hyperoxia group compared with those in air group ($P < 0.01$). Reversely, MDA, ROS and apoptosis rate

were significantly lower and levels of TAOC, SOD and SP-C mRNA expression were significantly higher in group hyperoxia plus CGRP group than in hyperoxia group or hyperoxia plus CGRP and CGRP8-37 group. **Conclusions** Exposure to 40%, 60%, 80% oxygen for 24h could cause oxidative injury, induce apoptosis and decrease SP-C mRNA level of AEC II in vitro in premature rats, while CGRP may play a protective role against hyperoxic lung injury by antioxidant, inhibition of AEC apoptosis and promotion of the SP-C mRNA expression.

Key words: different oxygen concentrations; lung injury; type II alveolar epithelial cell; calcitonin gene-related peptide

氧疗是治疗危重新生儿低氧血症的常见方法,但长期吸入高浓度氧可产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),引起细胞内氧化/抗氧化体系失衡而导致氧化应激性肺损伤^[1-2]。在新生儿特别是早产儿,由于肺发育不成熟,肺间质和肺泡分化不全,肺弹力纤维和结缔组织发育不良,各种致病因素可诱发肺部过度炎症反应,肺泡化过程受抑制,使肺泡数目减少,肺泡增大,间质纤维化,形成支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD), BPD 是一组由多种原因引起的肺部慢性疾患,是影响早产儿生长发育和和生活质量甚至导致早产儿死亡的重要原因之一。

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种由 37 个氨基酸残基组成的感觉神经肽,它广泛分布于肺、心、脑等组织,具有广泛的生理作用,与肺的许多生理功能及病理变化有关。近年的研究显示 CGRP 尚有抑制氧自由基生成、抑制炎症扩散的作用,并参与了呼吸道的自我修复等过程^[3-4]。

本研究拟以原代培养的早产鼠肺泡 II 型上皮细胞(alveolar epithelial cell type II, AEC II)为研究对象,分别予以 40%、60%、80% 氧处理 24 h,并以 CGRP 进行干预,通过测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等氧化与抗氧化能力指标、流式细胞仪了解细胞凋亡情况、RT-PCR 测定表面活性物质蛋白 C(surfactant Protein C, SP-C) mRNA 的表达,以了解不同浓度的氧对 AEC II 的影响以及 CGRP 的作用,进一步阐明 CGRP 在肺部的生物学效应,以寻找防治高氧肺损伤的新措施。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级成年 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),MTT(美国 Sigma 公司),EDTA(北京鼎国生物技术有限责任公

司),AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),CGRP、CGRP 抑制剂 hCGRP8-37(美国 AnaSpec 公司),SOD 检测试剂盒,总抗氧化能力检测试剂盒,丙二醛检测试剂盒(南京建成生物研究所),ROS 试剂盒(上海碧云天生物技术研究所),TRNZOL、DEPC 水(天根生化),DNA Ladder DL2000(凯基生物),RT 试剂盒、PCR 试剂盒(Fermentas 公司)等。

1.2 早产鼠 AEC II 分离及原代培养^[5]

健康成年 SD 大鼠,按雌:雄 1:1 合笼交配,第 2 日查见阴栓计为孕第 1 天,将孕 19 天(足月 22 天)大鼠行剖宫产取出胎鼠,分离 AEC II,经改良巴氏染色及台盼蓝拒染法证实纯度及存活率均为 90% 以上,备用。

1.3 高氧损伤模型制备及分组

6 孔板内的细胞培养 24 h 后,倾掉孔内培养基, PBS 轻轻洗 2 次,加入 DMEM/F12 培养基,1.5 mL/孔。采用随机分组,将细胞分为空气组、40% 氧组、40% 氧 CGRP 组和 40% 氧 CGRP 拮抗剂组;60% 氧组、60% 氧 CGRP 组和 60% 氧 CGRP 拮抗剂组,80% 氧组、80% 氧 CGRP 组和 80% 氧 CGRP 拮抗剂组共 10 组。

空气组:直接将换好液的细胞(6 孔板)置于孵箱中继续培养 24 h。

氧气组:首先将 6 孔板置于氧仓中,放入测氧仪,各组分别通入 40%、60%、80% 的氧,当浓度平衡时,测氧仪读数分别为 40%、60%、80%,立即密闭氧仓,置于孵箱中培养 24 h 后取出,并使 24 h 氧仓中的氧浓度波动 $\pm 2\%$ 。

氧气 CGRP 组:先将 CGRP 加入细胞培养基中,终浓度为 10^{-7} mol/L,然后将 6 孔板置于氧仓内,其余同氧气组。

氧气 CGRP 拮抗剂组:将 CGRP 和 CGRP 受体拮抗剂 hCGRP8-37 同时加入细胞培养基中,终浓度分别为 10^{-8} mol/L 和 $0.1 \mu\text{mol/L}$,置于氧仓内,其余同氧气组。各组细胞均置于 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后取标本检测。

1.4 细胞形态学观察

AEC II 细胞经过不同处理后,在倒置显微镜下观察细胞形态、大小和贴壁情况,并拍照记录。

1.5 丙二醛、总抗氧化能力、超氧化物歧化酶测定

24 h 后取出各组细胞,胰酶消化,3 000 rpm 离心,弃上清,留下层细胞,用生理盐水制备成 10^7 /mL 的悬液,超声仪破碎细胞,取匀浆液 0.2 mL,按说明书步骤上样。蒸馏水调零,分别于 532 nm、520 nm、550 nm 处在紫外分光光度仪上测定各管 OD 值,按与对照管或标准品 OD 的比值计算细胞 MDA、TAOC 及 SOD 的含量。

1.6 MTT 法检测 AEC II 增殖率

将原代分离的 AEC II 以 1×10^4 /mL 浓度、100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板,DMEM/F12 10% FBS 培养生长至细胞 80% 左右融合后,随机进行上述实验分组,各组设 6 个复孔,于处理后 24 h 行 MTT 检测。加入 20 μ L/孔 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h,小心去除上清,加入 DMSO 150 μ L/孔,振荡 10 min 紫色结晶完全溶解后,酶标仪检测 490 nm 波长处各孔 OD 值。

1.7 Annexin V/PI 双标记法检测 AEC II 死亡

AEC II 以 1×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板,细胞生长至 80% 融合时进行高氧干预,24 h 后 0.25% 胰酶消化收集各组细胞,Annexin V-FITC/PI 双标记法进行流式细胞仪检测,具体操作严格按试剂盒说明书进行。结果判断:左下象限代表正常细胞(Annexin V -/PI -),左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞(Annexin V -/PI +),右下象限代表早期凋亡细胞(Annexin V +/PI -),右上象限代表晚期凋亡和坏死细胞(Annexin V +/PI +)。计算右上及右下象限细胞比例总和即早期凋亡细胞、晚期凋亡及坏死细胞的总和作为死亡细胞数。

1.8 RT-PCR 检测 SP-C mRNA 的表达

1.8.1 引物合成 从 Pubmed nucleotide 数据库搜索 SP-C mRNA 的 ID 号,采用 Primer primer 5.0 软件自动设计引物序列,并交由上海鼎安生物科技公司合成。扩增 SP-C 基因正义链的引物序列为:5'-CAG ACA CCA TCG CTA CCT-3';反义链序列为:5'-AGC ACT GTG CCC TTC TTC-3',产物片段 248 bp。 β -actin 正义链引物序列:5'-CAC ACT GTG CCC AECC TAC GA-3';反义链引物序列:5'-TAC AGG TCT TTG CGG AECG TC-3'。扩增片段 400 bp。

1.8.2 细胞 RNA 的提取 采用 TRizol 一步法提取

AEC II 的总 RNA。

1.8.3 RT-PCR 反应 采用 2 步法进行 RT-PCR 反应。

1.8.4 琼脂糖凝胶电泳 配制成 1.5% 凝胶,取 PCR 产物每孔 6 μ L,与上样缓冲液混匀后,加入泳道,当溴酚蓝迁移至超过凝胶的 1/2 时,停止电泳,时间约 30 ~ 45 min。

1.8.5 显色、照相 电泳结束后,将凝胶放入 EB 显色液中 10 ~ 30 min,用凝胶成像系统观察并拍照。Quantity one 软件分析扩增产物条带,测定各扩增带吸光度,以 SP-C 与 β -actin 条带的吸光度比值作为 SP-C mRNA 的相对含量。

1.9 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,多样本均数比较用单因素方差分析,组间两样本均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 不同氧气浓度暴露 24 h 后 AEC II 的形态学变化

倒置相差显微镜观察显示,空气组细胞呈圆形或立方形岛状生长,透亮度高,紧贴于瓶底,细胞之间连接紧密,细胞质内颗粒较多(图 1A);40% 氧组细胞收缩轻,外形变化不大,间隙稍增宽,胞浆中见空泡,部分板层小体排出,脱壁细胞减少(图 1B);60% 氧组 AEC II 变得细长,细胞收缩,体积减小,胞内颗粒(板层小体)数目减少,间隙增大,颜色灰暗,表现为生长不良状态,且见部分细胞脱壁(图 1C);而 80% 氧组细胞收缩,间隙增宽,生长不良(图 1D)。

2.2 氧气暴露及 CGRP 干预对 AEC II 氧化损伤的影响

与空气组相比,40%、60%、80% 氧组 AEC II 细胞 ROS 及 MDA 水平逐渐升高,差异有显著性($P < 0.01$);而 TAOC、SOD 含量逐渐下降($P < 0.01$),60%、80% 氧组与前 2 组差异有显著性($P < 0.01$);60%、80% 氧组两组比较差异亦有显著性;表明大于 60% 氧暴露 24 h 后削弱了细胞的抗氧化能力,导致细胞的氧化抗氧化功能失衡,引起了细胞膜的氧化损伤;当在高氧组细胞中加入 CGRP 后,细胞的 TAOC、SOD 水平明显得到了恢复,而 ROS、MDA 降低,与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组相比差异有显著性意义($P < 0.01$)(表 1、2、3)。

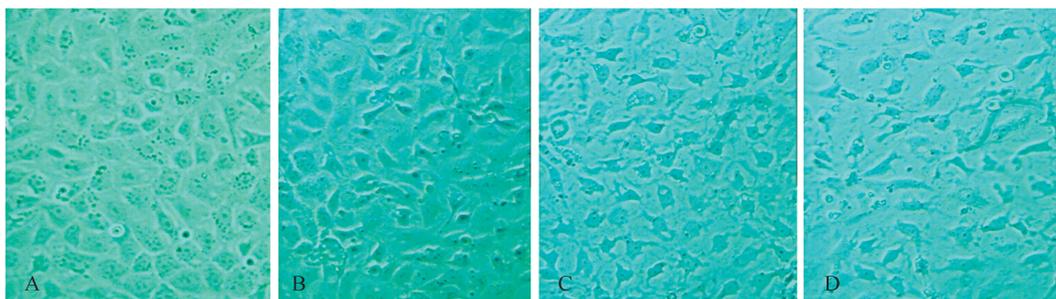


图 1 AEC II 形态学变化(倒置相差显微镜 ×250)。A:正常早产鼠细胞,呈岛状生长;B:40% O₂ 氧组细胞收缩轻,间隙较窄,贴壁紧,生长情况较高氧组好;C:60% O₂ 组细胞变得细长,间隙增宽,呈生长不良状况;D:80% 氧组细胞收缩,间隙增宽,生长不良

Fig. 1 The change in morphology of AEC II exposed to different oxygen concentrations(×250)

表 1 40% 氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II 氧化损伤的影响 (n = 6)

Table 1 The oxidative injury of 40% oxygen and the protective effects of CGRP on AEC II (n = 6)

组 别	ROS 荧光强度	MDA (nmol/mL)	TOAC (u/mL)	SOD (u/mL)
空气组	24.95 ± 2.44	1.21 ± 0.14	14.14 ± 1.77	39.87 ± 4.98
40% 氧组	33.22 ± 4.71 ^a	1.68 ± 0.18 ^a	11.06 ± 2.56 ^a	30.03 ± 2.64 ^a
40% 氧 CGRP 组	28.46 ± 2.30 ^b	1.42 ± 0.06 ^b	12.34 ± 2.13 ^b	34.04 ± 2.97 ^b
40% 氧 CGRP 拮抗剂组	32.91 ± 3.63	1.71 ± 0.14	10.78 ± 2.56	35.77 ± 2.98
<i>F</i>	12.143	9.579	8.126	6.478
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.001

a:与空气组比较,*P* < 0.01; b:与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组比较,*P* < 0.01

表 2 60% 氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II 氧化损伤的影响 (n = 6)

Table 1 The oxidative injury of 60% oxygen and the protective effects of CGRP on AEC II (n = 6)

组 别	ROS 荧光强度	MDA (nmol/mL)	TOAC (u/mL)	SOD (u/mL)
空气组	24.95 ± 2.44	1.21 ± 0.14	14.14 ± 1.77	39.87 ± 4.98
60% 氧组	47.67 ± 5.31 ^a	2.22 ± 0.18 ^a	9.87 ± 2.45 ^a	25.23 ± 2.61 ^a
60% 氧 CGRP 组	34.57 ± 3.30 ^b	1.36 ± 0.05 ^b	14.78 ± 2.24 ^b	35.87 ± 3.28 ^b
60% 氧 CGRP 拮抗剂组	45.91 ± 3.49	1.95 ± 0.13	10.71 ± 2.89	26.73 ± 3.41
<i>F</i>	60.345	71.234	9.155	25.192
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

a:与空气组比较,*P* < 0.01; b:与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组比较,*P* < 0.01

表 3 80% 氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II 氧化损伤的影响 (n = 6)

Table 1 The oxidative injury of 80% oxygen and the protective effects of CGRP on AEC II (n = 6)

组 别	ROS 荧光强度	MDA (nmol/mL)	TOAC (u/mL)	SOD (u/mL)
空气组	24.95 ± 2.44	1.21 ± 0.14	14.14 ± 1.77	39.87 ± 4.98
80% 氧组	58.79 ± 5.60 ^a	3.11 ± 0.21 ^a	6.16 ± 1.79 ^a	16.01 ± 3.14 ^a
80% 氧 CGRP 组	42.43 ± 5.54 ^b	2.41 ± 0.11 ^b	9.81 ± 2.34 ^b	25.14 ± 4.10 ^b
80% 氧 CGRP 拮抗剂组	59.22 ± 4.13	3.75 ± 0.12	5.71 ± 1.88	14.42 ± 2.47
<i>F</i>	81.442	87.479	12.321	29.799
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

a:与空气组比较,*P* < 0.01; b:与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组比较,*P* < 0.01

2.3 不同浓度氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II 凋亡的影响

60% 氧作用 24 h 后细胞的凋亡率较空气对照组显著增高,而预先加入 CGRP 后,细胞的凋亡数目

下降,当同时加入 CGRP 的受体拮抗剂 CGRP8-37 后,细胞的凋亡率又升高。各组间差异有统计学意义(*P* < 0.01)(图 2,表 4)。

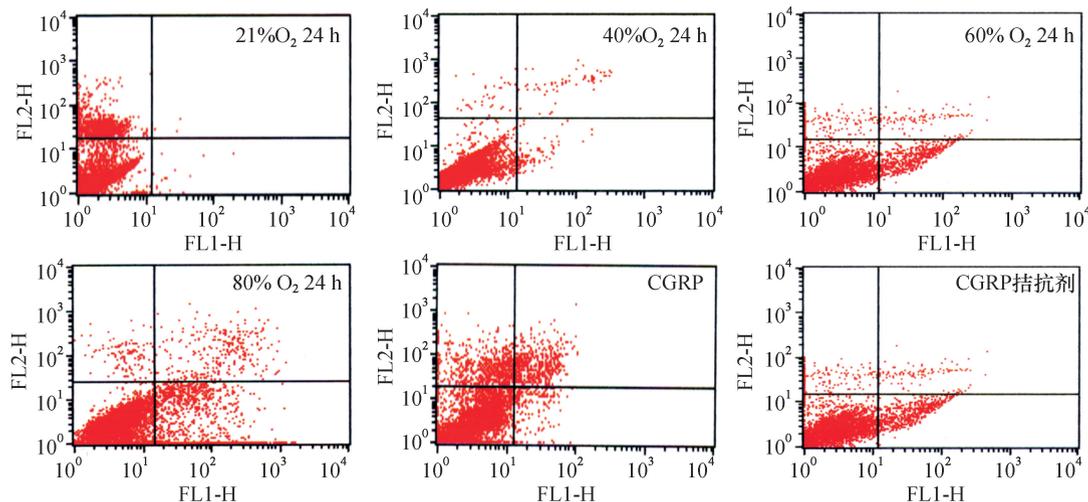


图2 不同浓度氧暴露及 CGRP 干预 AEC II 凋亡的影响

Fig. 2 The influence of CGRP on apoptosis of AEC II exposed to different oxygen concentrations

表4 不同浓度氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II 凋亡的影响 ($n=6$)

Table 4 The influence of CGRP on apoptosis of AEC II exposed to different oxygen concentrations ($n=6$)

组别	凋亡率 (%)
空气组	0.53 ± 0.17
40% 氧组	5.99 ± 0.22 ^a
60% 氧组	11.24 ± 1.46 ^a
80% 氧组	16.02 ± 1.87 ^a
80% 氧 CGRP 组	12.11 ± 1.29 ^b
80% 氧 CGRP 拮抗剂组	18.47 ± 2.60
<i>F</i>	41.001
<i>P</i>	0.000

a: 与空气组比较, $P < 0.01$; b: 与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组比较, $P < 0.01$

表5 不同浓度氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II SP-C mRNA 表达的影响 ($n=6$)

Table 5 The influence of CGRP on SP-C mRNA expression of AEC II exposed to different oxygen concentrations ($n=6$)

组别	SP-C/ β -actin mRNA
空气组	0.74 ± 0.02
40% 氧组	0.55 ± 0.03 ^a
60% 氧组	0.48 ± 0.02 ^a
80% 氧组	0.41 ± 0.02 ^a
高氧 CGRP 组	0.64 ± 0.03 ^b
高氧 CGRP 拮抗剂组	0.39 ± 0.02
<i>F</i>	65.372
<i>P</i>	0.000

a: 与空气组比较, $P < 0.01$; b: 与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组比较, $P < 0.01$

2.4 不同浓度氧暴露及 CGRP 干预对 AEC II SP-C mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 不同浓度氧处理 24 h 后, AEC II 细胞的 SP-C mRNA 表达水平明显低于空气对照组 ($P < 0.01$); 但高氧 CGRP 组细胞的 SP-C mRNA 表达明显增高, 与高氧组和高氧 CGRP8-37 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$) (表 5, 图 3)。

3 讨论

3.1 不同浓度氧对早产鼠 AEC II 的影响

高氧性肺损伤的严重程度与吸入气氧浓度及吸氧时间密切相关。在 FiO_2 为 80% 以上时, 主要引起

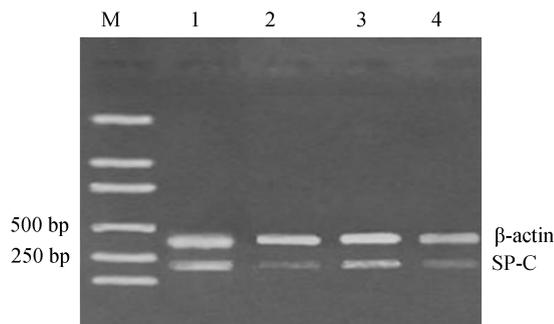


图3 各组细胞 SP-C mRNA 表达水平。M: Marker; 1: 空气组; 2: 80% 高氧组; 3: 高氧 CGRP 组; 4: 高氧 CGRP 拮抗剂组

Fig. 3 The SP-C mRNA expression of AEC II in four groups by RT-PCR

肺结构的严重破坏,如严重的肺上皮损伤、平滑肌增生、肺不张/肺气肿、间质广泛纤维化以及严重的肺血管阻力增高^[6]。当 FiO_2 在 60% 以下时,肺损伤的程度虽明显减轻,但却会引起肺泡化受阻,肺发育不良等病理表现^[7]。在临床上常规氧浓度的使用 >80% 不超过 12 h, >60% 不超过 24 h,谨防高氧肺损伤的发生;而对 <60% 的氧浓度认为是相对安全的。本研究从贴近临床的角度考虑,选用了 40%、60%、80% 的氧,暴露 24 h,结果显示,≥40% 浓度的氧对早产鼠 AEC II 均有不同程度的损伤,与空气组对照均有显著性差异,说明临床常用的低于 60% 氧浓度在早产儿中并不是很安全的。

目前研究已广泛证实,高氧损伤的根本原因是由于活性氧增多所致。ROS 包括超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、单线态氧等,是化学活性远高于基态氧的特殊氧化学状态,具有很强的组织细胞毒性^[8-9]。ROS 对细胞的损害首先是攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,产生脂氢过氧化物如 MDA,因此检测血清中 MDA 是反应脂氢过氧化物速度和强度的依据^[10]。ROS 的损害程度取决于细胞的氧化/抗氧化系统的功能平衡,若氧化/抗氧化失衡,则会引起氧化应激性肺损伤。SOD 是细胞抗氧化系统的主要成份之一,能清除中性粒细胞等释放的氧自由基,其高低间接反映机体清除氧自由基的能力^[11]。

本课题将原代培养的早产鼠 AEC II 暴露于 40%、60%、80% 氧 24 h 后,发现细胞的 ROS 及 MDA 水平均显著高于空气对照组,而 SOD 及总抗氧化酶活性明显降低。Annexin V/PI 双染法检测细胞的调亡数目明显增高,SP-C 基因转录受抑。形态学观察发现高氧作用后细胞由椭圆形变得不规则,胞浆中空泡增多,细胞呈生长不良状况。高于 60% 以上的两组损伤更为明显。以上结果表明高于 40% 的氧作用 24 h 引起了早产鼠 AEC II 的氧化应激损伤,促进了 AEC II 调亡,削弱了 AEC II 的生理功能,可能导致各种并发症,提示临床上对早产儿用氧尤其要慎重,尽量使用低氧。

许多资料已经证实,早产儿更容易受高氧的影响,且会发生 BPD 等严重的后遗症。一些研究对这种现象作了推测,认为这是由于早产儿出生时其内生性抗氧化酶的活性相对较弱和肺表面活性物质(PS)系统发育不成熟所致^[12]。但有人提出,动物是否对氧耐受,并不在于其本身抗氧化酶基础水平

的高低,而在于高氧应激时,机体能否迅速增加抗氧化酶(AOE)活性及其 mRNA 的表达^[13]。动物实验发现,胎鼠和胎兔体内的 AOE 活性及 mRNA 表达均在接近妊娠末期时迅速增加 150% ~ 200%,但在暴露于高氧环境中,早产鼠与足月鼠比较,不能诱导其肺组织内 AOE 的生成。因而,临床上可看到早产儿较足月儿对高氧更不耐受而易发生肺损伤及 BPD。

由于 ROS 增高是高氧一系列损伤的病理基础,因此减少 ROS 生成、提高机体 AOE 的活性和增加 AOE 的表达,使氧化和抗氧化失衡状态得到纠正,将有助于减轻和耐受高氧肺损伤。研究显示,给予自由基清除剂如 N-乙酰半胱氨酸可提高 SOD 水平,减少线粒体内 ROS 生成,明显减轻新生鼠高氧肺损伤^[14]。通过超声雾化吸入含锰的重组人超氧化物歧化酶,提高了抗氧化能力,减轻了狒狒在 100% 氧中的肺损伤,提高了存活率^[15]。过度表达超氧化物歧化酶的转基因新生小鼠与野生型小鼠同时置于高氧中一段时间后,其肺组织氧化反应较轻,中性粒细胞浸润显著减少,肺泡发育亦明显较野生型小鼠好,这些均表明抗氧化系统能力在对抗高氧肺损伤中的地位和作用^[16]。

3.2 CGRP 减轻了高氧所致的损伤作用

CGRP 是一种由 37 个氨基酸残基组成的感觉神经肽,主要由感觉神经末梢和神经内分泌细胞释放,肺部的 CGRP 及其受体含量丰富,在肺的生理及病理过程发挥了重要作用^[17]。最早发现 CGRP 是一种强大的扩血管物质,主要起介导神经源性炎症的作用,但目前有研究认为 CGRP 有抗氧化损伤的作用^[18]。将装载有 CGRP 基因的质粒导入糖尿病小鼠体内,发现可提高小鼠 AOE 活性,减少 ROS 的产生,从而减轻氧化应激性损伤^[19];将连接有 CGRP cDNA 的质粒转染到人肺上皮细胞株 A549 细胞中,使其过表达 CGRP,可显著降低 IL-1 β 诱导的 IL-8 分泌及细胞内 ROS 生成,对高氧肺损伤起到保护作用^[20-21]。Monneret 等^[22]发现,外源性 CGRP 可抑制中型粒细胞和单核细胞的趋化能力,而阻止内毒素引致的炎症放大反应,因此也被认为是一种内源性的抗炎因子。

本研究结果显示在高氧组细胞培养基中加入 CGRP 后,细胞的 ROS、MDA 明显低于对照组,而 TAOC、SOD 明显高于对照组,显微镜下观察也发现细胞损伤的程度明显较轻。通过检测细胞的调亡情况和 SP-C 表达水平发现,CGRP 干预后 AEC II 调亡率明显降低,而 SP-C mRNA 表达增加。当用其受体

拮抗剂 CGRP8-37 阻断 CGRP 与受体的结合时,上述保护作用明显减轻。以上结果提示 CGRP 可以减轻 AEC II 的氧化损伤,维持其正常生理功能,其作用可能是通过提高细胞内抗氧化酶水平、抑制 ROS 生成来实现的。

综上所述,高于 40% 氧作用 24 h 即可以导致早产鼠 AEC II 损伤,且胎龄愈小对氧愈不耐受,低于 60% 氧对早产鼠并不是安全的,提示对早产儿要慎用高氧。CGRP 可以减轻氧化损伤,可能是机体的内源性保护因子,在高氧肺损伤的防治中具有重要作用。

参考文献:

- [1] 符跃强,许峰,卢仲毅,等. 氧化应激对肺泡 II 型上皮细胞的损伤作用及 JNK 信号转导机制[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(11):1150-1153.
- [2] 徐洪涛,李华强,余健,等. 高氧致新生鼠急性肺损伤及氧化应激反应的动态研究[J]. 中国小儿急救医学,2006,13(3):224-226.
- [3] Dakhama A, Park JW, Taube C, et al. Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory syncytial virus infection[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(4):761-770.
- [4] Dakhama A, Larsen GL, Gelfand EW. Calcitonin gene-related peptide: role in airway homeostasis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(3):215-220.
- [5] 祝华平,常立文,李文斌,等. 胎鼠肺细胞的分离纯化及原代培养[J]. 华中科技大学学报·医学版,2003,32(6):597-600.
- [6] Warner B, Stuart L, Papes R, et al. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1998, 275:110-117.
- [7] Han R, Buch S, Tseu I, et al. Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen[J]. *Pediatr Res*, 1996, 39:921-929.
- [8] Altmeier WA, Sinclair SE. Hyperoxia in the intensive care unit: why more is not always better[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2007, 13(1):73-78.
- [9] Zhang X, Shan P, Sasidhar M, et al. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(3):305-315.
- [10] Wang Y, Feinstein SI, Manevich Y, et al. Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(11):1736-1743.
- [11] Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB. Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(7):1055-1066.
- [12] 许峰,霍泰辉,翁颂铭,等. 早产鼠高氧肺损伤中肺表面活性物质的代谢变化[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(12):745-747.
- [13] Russell GA. Antioxidants and neonatal lung diseases[J]. *Eur J Pediatr*, 1994, 153:S36~S41.
- [14] Nagata K, Iwasaki Y, Yamada T, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury[J]. *Respir Med*, 2007, 101(4):800-807.
- [15] Simonson SG, Welty-Wolf KE, Huang YC, et al. Aemsolized manganese SOD decreases hyperoxic pulmonary injury in primates physiology and biochemistry[J]. *J Appl Physiol*, 1997, 83(2):550-558.
- [16] Ahmed MN, Suliman HB, Folz RJ, et al. Extracellular superoxide dismutase protects lung development in hyperoxia-exposed newborn mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(3):400-405.
- [17] 秦旭平,李元建. 降钙素基因相关肽受体重构及其信号跨膜转导[J]. 中南医学科学杂志,2011,39(02):121-126.
- [18] Springer J, Geppetti P, Fischer A, et al. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2003, 16(3):121-130.
- [19] 余飞,孙威,毛节明,等. 降钙素基因相关肽转基因预防小鼠自身免疫性糖尿病发病及其抗氧化应激机制[J]. 生理学报,2003,55(6):625-632.
- [20] Li WJ, Wang TK. Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin-1 β -induced interleukin-8 secretion in human type II alveolar epithelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(10):1340-1345.
- [21] Ao X, Fang F, Xu F. Vasoactive intestinal peptide protects alveolar epithelial cells against hyperoxia via promoting the activation of STAT3[J]. *Regul Pept*, 2011, 168(1-3):1-4.
- [22] Monneret G, Arpin M, Venet F, et al. Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b up-regulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils[J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(6):923-928.