

蘇州大學
SOOCHOW UNIVERSITY

硕士学位论文



论文题目 高氧肺损伤新生大鼠肺组织中肺表面活性物质相关蛋白

-A (SP-A) 的 mRNA 和蛋白表达及布地奈德的干预作用

研究生姓名 何 蓉

指导教师姓名 肖志辉

专业名称 儿科学

研究方向 新生儿

论文提交日期 2013 年 3 月

高氧肺损伤新生大鼠肺组织中肺表面活性物质相关蛋白-A (SP-A) 的 mRNA 和蛋白表达及布地奈德的干预作用

中文摘要

目的:

1. 建立新生大鼠高氧肺损伤的动物模型;
2. 观察与比较高氧性损伤时新生大鼠肺组织的病理组织学改变, 以及肺表面活性物质相关蛋白-A (pulmonary surfactant protein-A, SP-A) 的 mRNA 及其蛋白的表达变化, 从而探讨 SP-A 在新生大鼠高氧肺损伤发生、发展中可能的作用;
3. 探讨吸入性糖皮质激素布地奈德 (budesonide, BUD) 是否通过调控 SP-A 的表达从而发挥对高氧肺损伤的保护作用, 为临床防治高氧肺损伤提供理论依据。

方法:

取 108 只出生 1 天内的新生 Sprague Dawley (SD) 大鼠 (雌雄不限) 随机分成三组: 即 I 组: 空气组 (对照组), II 组: 高氧+生理盐水组 (高氧组), III 组: 高氧+布地奈德组 (干预组), 每组 36 只。

I 组置于空气中; 将 II、III 组实验动物持续暴露于 90%~95% 氧箱中, 直至实验结束。II 组于每日雾化吸入 NS 10ml, III 组每日同一时间点吸入溶解 BUD 的等量的 NS (含 BUD 2mg)。

设立实验后 3、7 和 14 天 3 个时间观测点, 处死动物, 行支气管肺泡灌洗, 测定灌洗液中蛋白含量; 取肺组织, 计算肺湿/干重比; HE 染色观察组织病理学变化; Western Blot 方法检测 SP-A 蛋白含量、RT-PCR 方法检测 SP-A mRNA 表达水平。

结果:

1. 各组实验动物一般情况: I 组 (空气组) 中的实验动物在实验期间精神状态佳、活动灵活, 进食正常。II 组 (高氧组) 中的实验动物逐渐出现症状, 表现皮毛无光泽、精神萎靡、活动少, 脱氧后烦躁不安, 呼吸困难明显, 鼻尖发绀, 恢复供氧可逐

渐缓解；III组（干预组）中的实验动物情况介于前两者之间。

2. 肺组织病理切片：I组（空气组）实验动物肺组织病理切片见肺组织结构规整，无炎症反应，肺泡大小、形态均一；II组（高氧组）高氧暴露3d后可见肺血管扩张充血，肺泡腔内出现红细胞及炎性细胞，肺间隔断裂，肺泡腔扩大；高氧7天时，炎性渗出、肺水肿、肺出血较前更加明显，部分肺间隔增宽变形，肺组织结构紊乱；14天时更为明显，肺组织结构紊乱，肺间隔重度增厚，出现明显纤维化改变，肺泡发育受阻，肺泡数量明显减少、大小不一，肺泡腔明显增大，部分肺泡融合，可见肺大泡或肺不张。III组（干预组）肺组织形态与结构改变较II组有明显减轻。

3. 肺组织湿/干重比值（W/D）：实验3天、7天时，II组（高氧组）实验动物肺组织湿/干重比值（W/D）较I组（空气组）增高（ $P<0.01$ ），实验14天时，II组较I组升高更明显（ $P<0.01$ ），而III组（干预组）与II组相比，3天、7天、14天的比值均有明显下降（ $P<0.01$ ）。

4. 支气管肺泡灌洗液（BLAF）中蛋白含量（TP）测定：实验3天、7天和14天时II组（高氧组）BLAF中TP均高于I组（空气组），差异有显著性意义（ $P<0.01$ ）；III组3天时BLAF中TP较II组降低（ $P<0.05$ ），7天、14天时明显降低（ $P<0.01$ ）。

5. 肺组织中SP-A蛋白表达水平的变化：Western Blot检查测定结果表明：与I组动物比较，II组（高氧组）实验3天时SP-A蛋白表达明显增高（ $P<0.01$ ）；7天、14天SP-A蛋白表达下降，14天时下降更明显（ $P<0.01$ ）。III组（干预组）实验3天时SP-A蛋白表达介于I组与II组之间（ $P<0.05$ ），7天、14天SP-A蛋白的表达均较高氧组显著升高（ $P<0.05$ ）。

6. 肺组织中SP-A mRNA表达水平的变化：RT-PCR检查测定结果表明：与I组动物比较，II组实验3天时SP-A mRNA表达水平明显增高，差异有显著性意义（ $P<0.05$ ）；7天时可见表达下降，14天时下降更明显（ $P<0.01$ ）。III组的SP-A mRNA表达水平接近于I组SP-A mRNA的表达趋势；实验3天时SP-A mRNA表达水平介于I组与II组之间，与II组比较有显著性意义（ $P<0.05$ ）；7天、14天时表达水平较II组显著升高（ $P<0.05$ ）。

结论：

1. 高氧对新生大鼠肺组织有损伤作用，并随吸氧时间的延长而加重。主要病理变化为肺组织局部水肿和出血、炎症渗出、结构组织紊乱、肺泡发育障碍、肺泡数目

减少和肺间质纤维化。

2. 高氧性肺损伤时, SP-A 的 mRNA 和蛋白在肺组织中的表达规律呈现先增高后降低的趋势, 随着高氧暴露时间的延长与肺损伤程度相平行, 提示高氧肺损伤发生过程中机体具有一定的自我保护机制, 而肺表面活性物质相关蛋白分泌减少或功能缺陷, 是高氧肺损伤的重要因素。

3. 吸入糖皮质激素布地奈德可能通过抗氧化、减轻炎症反应, 进而上调 SP-A 的 mRNA 和蛋白的表达与活化, 从而减轻肺损伤, 对高氧肺损伤的发生具有一定保护作用。

关键词: 肺表面活性物质相关蛋白-A, 高氧肺损伤, 新生鼠, 布地奈德

作者: 何 蓉

指导老师: 肖志辉

Budesonide Impact on the Expression of Pulmonary Surfactant Protein-A (SP-A) in Hyperoxia - induced Lung Injury in Neonatal Rats

Abstract

Objectives:

1. To establish a model of hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats;
2. To observe the histopathological changes in neonatal rat lung of hyperoxia-induced injury as well as its affecting the expression of SP-A mRNA and protein by comparing with control group, and to study the role of SP-A in the development of hyperoxia-induced lung injury;
3. To observe whether the inhaled corticosteroids, budesonide, has a protective effect to hyperoxia-induced injury and affects the expression of SP-A, and in order to provide a theoretical evident for clinical treatments of hyperoxia-induced lung injury.

Method:

The 108 neonatal SD rats (less than 1 day after birth, no male or female) were randomly divided into 3 groups: Group I, Air Group (Control Group); Group II, Hyperoxygen and Saline Group (Hyperoxia Group); Group III, Hyperoxygen and Budesonide Group (Interfering Group). Each group had 36 rats.

Group I was incubated in normal air. Group II and III were both exposed in special oxygen boxes, and the oxygen concentration was continuously to 90%-95%. In daily Group II was inhaled 10ml of saline. And at the same time, Group III was inhaled 10ml of dissolved BUD saline (with BUD 2mg).

The rats were executed on the 3th, 7th and 14th day. Using bronchoalveolar lavaging to measure the protein level in lavaging fluid; Taking the lung tissue to weight, afterwise dry, and calculate the wet/dry proportion; Using HE to observe the histopathological changes; Using Westen Blot to measure the level of SP-A protein in lungs; Using RT-PCR to detect the expression level of SP-A mRNA.

Result:

1. The general condition: Group I (Air Group) was viable and fed well. Group II (Hyperoxia Group) was dull, apathetic, less active, even dyspnea after hyperoxygen abortion. The situation of Group III (Interfering Group) was between the former two.

2. Lung histopathology: In Group I (Air Group), the size, shape and distribution of alveoli were normal. No inflammation can be found. In Group II (Hyperoxia Group), after 3 days of hyperoxygen, the small blood vessels expanded congestion, alveolar cavity enlarged and appeared red blood and inflammatory cells, pulmonary septal area fractured. After 7 days of hyperoxygen, inflammation, pulmonary edema, pulmonary hemorrhage were more obvious, the pulmonary septal area got wider and the structure of lung tissue was arranged disorder. After 14 days of hyperoxygen, the changes were more obvious, the structure of lung tissue was more disorder, the pulmonary septal area got severe wider, significant fibrosis could be seen, the numbers of alveoli reduced evidently, alveolar cavity enlarged obviously. In Group III (Interfering Group), comparing with Group II, the structure and morphology in the lung tissue were milder.

3. The wet/dry proportion (W/D) of lung tissue: on the 3th and 7th day of this study, the W/D in Group II is higher than Group I ($P<0.01$). And on the 14th day, it is more significantly higher than Group I ($P<0.01$). However, comparing with Group II, the W/D on the 3th, 7th and 14th day is obviously reduced in Group III ($P<0.01$).

4. The level of the protein in bronchoalveolar lavage fluid (BLAF): on the 3th, 7th and 14th day, the BLAF protein level in Group II is higher than Group I, the differences are statistically significant ($P<0.01$). However, on the 3th day the protein in Group III is decreased comparing with Group II ($P<0.05$), and on the 7th and 14th day the protein level is significantly lower ($P<0.01$).

5. The variation of the expression level of SP-A protein in lung tissue: the Western Blot shows that on the 3th day, the expression level of SP-A protein in Group II is higher than Group I ($P<0.01$), and on the 7th and 14th day the expression level is significantly lower ($P<0.01$). On the 3th day, the expression level of SP-A protein in Group III is between Group I and Group II ($P<0.05$), and on the 7th and 14th day the expression level is significantly increased comparing with Group II ($P<0.05$).

6. The variation of the expression level of SP-A mRNA in lung tissue: the RT-PCR shows that on the 3th day, the expression level of SP-A mRNA in Group II is higher than

Group I ($P<0.05$), on the 7th day the expression level is lower and on the 14th day the expression level is significantly lower ($P<0.01$). On the 3th day, the expression level of SP-A mRNA in Group III is between Group I and Group II ($P<0.05$), and on the 7th and 14th day the expression level is significantly increased comparing with Group II ($P<0.05$).

Conclusion:

1. The hyperoxygen treatment will cause lung injury in rats, and the injury will increase with the extension of oxygen time. The main histopathological changes of lung tissue are local hyperemia, hemorrhage, inflammatory exudate, structure disorder, development disturbance, decrease in the number of alveolar and interstitial pulmonary fibrosis.

2. In the hyperoxia-induced lung injury, the expression level of SP-A mRNA and protein is increased firstly and then decreased. The level is parallel with the degree of lung injury. These findings suggest that there is a certain protective mechanism of the body in the process of hyperoxia-induced lung injury, and the decrease or dysfunction of pulmonary surfactant protein is an important factor.

3. The inhaled corticosteroids, budesonide may promote the expression of SP-A mRNA and protein by enhancing antioxidation and antiinflammation, alleviate the lung injury, and play a protective effect to hyperoxia-induced lung injury.

Key words: Pulmonary surfactant protein-A, hyperoxia-induced lung injury, neonatal rat, budesonide

Written by He Rong

Supervised by Xiao Zhihui

目 录

前 言	1
材料与amp;方法	3
结 果	13
讨 论	18
结 论	24
参考文献	25
附 录	30
综 述	35
英文缩略词表	46
攻读硕士学位期间发表的论文	47
致 谢	48

前 言

随着新生儿重症监护技术迅速发展,通过氧疗、辅助机械通气等干预措施,越来越多的早产儿和极低出生体重儿(very low birth weight infants ,VLBWI)得以存活,支气管肺发育不良(bronchopulmonarydysplasia, BPD)又称慢性肺疾病(chronic lung disease, CLD),成为引起早产儿疾病和死亡的重要原因。据统计,北美地区每年有超出 1 万名新生儿患 BPD^[1],我国 BPD 发病率也有逐年上升的趋势。由于该病需辅助用氧时间长,病死率高,存活者常遗留高反应性气道疾病、反复下呼吸道感染、喂养困难、生长发育迟缓,因此一直是新生儿重症监护室(neonatal intensive care unit, NICU)最为棘手的问题之一,并为婴幼儿时期最常见的慢性肺疾病的病因。

BPD 的临床定义为在生后至少用氧 28d,胎龄小于 32 周的早产儿在纠正胎龄 36 周或已出院时评估(胎龄>32 周新生儿,评估时间生后 56d 或已出院时),轻度 BPD 为不需要氧气,中度为仍需氧气且浓度<30%,重度为需要氧且浓度≥30%或机械通气^[2]。其病因和发病机制仍不清楚,随着认识提高,目前多数学者认为其本质是在基因易感性的基础上,宫内和出生后的多重打击(呼吸机容量伤、氧毒性、肺水肿、脓毒血症等)引起促炎抗炎因子的级联反应,对发育不成熟的肺引起损伤,以及损伤后血管化失调和肺组织异常修复^[3]。其中 PS 缺乏的肺发育不成熟、肺损伤、损伤后异常修复是导致 BPD 的关键环节。因此,提示我们高氧损伤机制不应局限于氧化应激作用,应进一步大力开展有关肺损伤和发育的关键基因及生物通道的更基础研究。

肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)是一种十分重要的生物活性物质,在肺泡的发育和功能完善、改善 BPD 患儿的病理生理及防治 BPD 方面具有无可替代的生理作用^[4],且各种病理因素所导致的肺组织损伤往往都伴有 PS 的不足。化学结构上,PS 属于磷脂蛋白复合物,其主要化学成分包括卵磷脂、磷脂酰甘油、鞘磷脂等,以及少量的蛋白质成分,即 4 种肺表面活性物质相关蛋白(pulmonary surfactant protein, SP)。根据其物理特性可将 SP 分为两组:亲水性 SP-A 和 SP-D;疏水性 SP-B 和 SP-C。其中 SP-A 是最早被发现且在肺泡 II 型上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AECII)中强烈表达、信号最为丰富的蛋白,它是 PS 的重要组成部分之一,约占蛋白

总量的 50% 以上，意义也尤其重要，其主要作用包括维持表面张力，保持肺泡结构的稳定，在肺损伤时参与免疫调节作用及防御功能，并且参与抗氧化反应^[5]，在协助和维持 PS 的生理功能方面起到至关重要的调节作用。研究发现在高氧肺损伤下增加了感染的易感性，而 SP-A 有预防感染的作用，同时在氧化损伤时保护 PS 中的磷脂，还可能通过多种途径，影响抗氧化剂的表达^[6]。以上研究均证明 SP-A 在 BPD 的发生发展过程中具有重要作用，故如何提高早产儿不成熟肺内 SP-A 的表达是改善 BPD 预后的重要环节。SP-A 的合成及分泌调控复杂，受各种调节因子、生长因子及激素的调控。在肺的发生发展期，SP-A 基因的调控是一个由环腺苷酸 (cAMP) 和糖皮质激素触发的过程^[7]。

糖皮质激素是最早用于预防和治疗 BPD 的药物，目前临床上常用于防治 BPD 的糖皮质激素有地塞米松和倍他米松^[8]。糖皮质激素在动物实验和临床研究中都已证实：其具有强大的抗炎作用，可抑制炎症反应，减轻支气管及肺水肿，促进肺抗氧化酶及表面活性物质生成，迅速改善肺功能，有助于撤离呼吸机，因此已广泛用于 BPD 的预防和治疗^[9]。近年来，对 BPD 患儿激素应用进行回顾性研究发现，激素会影响体格发育神经运动发育和加重视网膜病变，并且易造成高血糖高血压肠穿孔以及增加感染机会^[10]。2002 年美国儿科学会发表联合声明，呼吁限制在临床上生后全身应用糖皮质激素^[11]。布地奈德 (budesonide, BUD) 是一种临床常用的具有高效局部抗炎作用吸入糖皮质激素，常用于哮喘的治疗和预防。理论上吸入糖皮质激素可抑制肺部炎症反应而不引起全身不良反应，BUD 的全身作用如体重下降、淋巴组织及肾上腺皮质萎缩，比其他糖皮质激素弱或相当^[12]。至此，我们有理由推测早期预防性应用布地奈德可能通过抑制炎症反应增加 PS 的合成与分泌促进 SP-A 的表达，从而促进肺成熟。

本研究通过建立新生大鼠高氧性肺损伤的模型，同时观察高氧条件下肺组织的病理变化，并探讨肺损伤时组织中 SP-A mRNA 及其蛋白表达的变化规律，以及吸入性糖皮质激素布地奈德的干预作用，为临床防治新生儿慢性肺疾病，提高危重新生儿救治水平及远期预后开辟新途径。

材料与方法

实验材料

一、实验动物

出生 1 天内的无病原体的新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 108 只, 体重 9~10g, 雌雄不限, 由苏州大学医学院实验动物中心提供。

二、主要试剂

1. 吸入用布地奈德混悬液(BUD, 1mg / 2ml): AstraZeneca 公司产品
2. 医用氧气: 苏州金宏气体有限公司提供
3. 兔抗大鼠 SP-A 抗体(一抗): Santa Cruz Biotechnology 公司产品
4. 过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗): 美国 Serotec 公司产品
5. SP-A 及内参引物: 上海 Invitrogen 生物有限公司合成
6. 总蛋白试剂盒: 南京建成生物工程研究所产品
7. 蛋白试剂提取盒: BIPEC BIOPHARMA 公司产品

三、主要实验仪器

1. 实验用氧箱: 自制, 大小为 35cm×35cm×25cm
2. 雾化吸入玻璃箱: 自制, 大小为 10cm×10cm×20cm
3. 便携式 PARIBOY 雾化吸入空气压缩泵: 德国 PARI 公司
4. CY-100 数字测氧仪: 浙江省建德市利达仪器厂
5. 超净工作台: Air Tech 苏净集团
6. Satorius BS224S 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司
7. 台式低温高速离心机: 瑞典 HERAEUS 公司
8. 低温冰箱: 韩国三星公司
9. -80℃超低温冰箱: 日本 SANYO 公司
10. 电烤箱: 上海跃进医疗器械一厂
11. 电热恒温水温箱: 上海医疗器械七厂
12. Ploytron 匀浆机: 瑞士 KINEMATICA 公司

13. 电泳仪, 电泳槽, 转印槽: 美国 Bio-Rad 产品
14. ZD-9550 摇床: 太仓市华利达实验设备有限公司
15. BioMate 3S 分光光度计: 美国赛默飞世尔科技有限公司
16. BMJ-III型包埋机: 常州中威电子仪器厂
17. BMJ-III型病理组织包埋冷冻台: 常州中威电子仪器厂
18. PHY-III型病理组织漂烘仪: 常州中威电子仪器厂
19. YL3-A 型迴转式切片机: 上海仪表厂
20. 莱卡显微镜: 德国 LEICA 公司
21. ROACH-480PCR 仪: 瑞士罗氏公司
22. Q550CW 计算机图像分析系统: 德国 LEICA 公司
23. 日立 760 全自动生化分析仪: 日本日立公司

其他常规试剂及仪器均由苏州大学附属儿童医院儿童研究所提供。

实验步骤及方法:

一、实验分组

自然分娩后 24 小时内的新生 SD 大鼠 108 只 (雌雄不限) 随机编号、称重、标记, 编号原则是先左后右, 从前到后, 用黄色表示个位数, 红色表示十位数, 黑色代表百位数。然后通过 SAS17.0 统计软件的 PLAN 过程步进行完全随机化分组, 将体表编号标记的新生 SD 大鼠随机分为 3 组, 即 I 组: 空气组 (对照组), II 组: 高氧+生理盐水组 (高氧组), III 组: 高氧+布地奈德组 (干预组), 每组 36 只, 所有子鼠均由最近顺娩的母鼠代喂养。设定三个时间点 (实验 3 天、7 天、14 天) 观测相应的实验指标。

二、建立高氧肺损伤模型的建立

参照文献^[13]的方法, 自制 35cm×35cm×25cm 大小的有机玻璃容器, 有等大的进气孔和排气孔, 自顶部进气孔持续输入 100% 医用氧气, 以达到每小时通气量为容器容积的 5~7 倍流量 (实验中取 2.5ml/min), 以测氧仪监测箱内氧浓度, 保持氧浓度为 95% 左右。容器内放置垫料、饲料、水和钠石灰以吸收水和 CO₂ (CO₂ 浓度 < 0.5%)。实验环境温度为 25~27℃, 湿度为 50%~70%。每天开箱一次, 添加饲料及水, 并更换钠石灰及垫料, 时间控制在 1 小时内。同时将干预组、高氧组及空气组母鼠交换, 以避免干预组、高氧组母鼠因氧气中毒而影响其对新生鼠的护理能力。每

日记录新生大鼠的存活情况, 实验过程中如有新生鼠死亡, 即从相应对照组减去相同数目的幼鼠, 以保证各组实验动物数相等。

三、实验处理

1. I 组置于空气中; 将 II 组、III 组实验动物置于自制氧箱中, 保持箱内氧浓度为 90%~95%。

3. 高氧+生理盐水组 (II 组): 实验当日起每日同一时间吸入 NS 10ml, 每日一次, 每次 30 分钟, 吸入 14 天。

4. 高氧+布地奈德组 (III 组): 参照文献^[14]的方法, 实验当日起每日同一时间置于自制大小为 10cm×10cm×20cm 雾化吸入玻璃箱中, 吸入 NS 溶解的 BUD 雾化液 10ml(含 BUD 2mg), 每日一次, 每次 30 分钟, 吸入 14 天。

四、标本的留取

将实验开始时记为 0 天, 实验满 24 小时为 1 天。在实验 3 天、7 天和 14 天每组各处死 12 只大鼠, 采集标本, 完成各种指标的检测。

1. 留取支气管肺泡灌洗

在设定时间点, 随机取每组的 6 只大鼠用 10%水合氯醛 (4ml/Kg) 腹腔注射麻醉, 置于解剖台固定, 行气管灌洗, 灌入生理盐水 0.05ml/g, 重复操作 3 次, 精确回收支气管肺泡灌洗液 (BALF), 回收量不少于 80%。将 BALF 于 4℃、3000r/min 离心 10 分钟去除细胞碎片, 吸取上清液, 立即予日立 760 全自动生化分析仪测定 BALF 中蛋白含量。

2. 留取肺组织

于设定的时间点, 随机取每组的 6 只大鼠称量体重后, 10%水合氯醛深度麻醉, 打开胸腔迅速取出双肺, 剔除多余结缔组织, 置于 4℃生理盐水中漂洗后轻擦干表面。取左肺组织行湿/干重比 (W/D), 右上肺组织放于 4%多聚甲醛中固定, 余下右肺组织置于洁净的无 Rnase 的 Eppendorf 管中, 经液态氮转至 -80℃冻存。

五、实验指标的检测和操作步骤:

1. 肺 W/D 的测定

取左肺组织, 轻擦干表面, 电子天平称重, 计为肺湿重, 再置于 60℃烤箱内, 每日称重至重量恒定 2 天, 计为肺干重, 计算湿/干重比值 (W/D)。

2. 肺组织 HE 染色

(1)将 4%甲醛固定 48 小时后的肺部组织块，依次经过 70%、80%、90%、95% 酒精和无水酒精脱水。

(2)经脱水后的组织块浸入二甲苯后，由二甲苯置换出酒精，组织块逐渐变得透明。

(3)将透明的组织块置入已融化的石蜡内，放置适当时间，使石蜡浸入阻止并替换出二甲苯。

(4)在包埋器的内壁涂一层甘油，倾入融化的石蜡，将浸透蜡的组织块放入包埋器，摆好间距和方位，待蜡液表面凝固后，将包埋器投入 4℃冰箱中过夜，使石蜡冷却凝固。

(5) 轮转式切片机切片，切出蜡片约 5um 厚，展平后固定在多聚赖氨酸防脱片处理的载玻片上。

(6)置入 60℃烤箱内 30min，至石蜡溶化。

(7)入二甲苯 (I) 中脱蜡 5 分钟，用吸水纸吸干液体；入二甲苯 (II) 中脱蜡 10 分钟 (切片透明) ，用吸水纸吸干液体。

(8)入 100%乙醇 (I) 中 5 分钟，用吸水纸吸干液体；入 100%乙醇 (II) 中 5 分钟，用吸水纸吸干液体；入 95%乙醇中 3 分钟；入流水 2 分钟，用吸水纸吸干水分。

(10) Harris 苏木素染色 4-8 分钟，水洗。

(11) 1% 盐酸水溶液分化 5-10 秒 (切片由蓝变红) ；自来水洗返蓝 15-30 分钟。

(12) 0.5% 水溶性伊红染色 30 秒-1 分钟，水洗。

(13) 95% 乙醇 (I) 脱水 5 分钟，用吸水纸吸干液体；95% 乙醇 (II) 脱水 5 分钟，用吸水纸吸干液体；入 100% 乙醇 (I) 中 5 分钟，用吸水纸吸干液体；入 100% 乙醇 (II) 中 5 分钟，用吸水纸吸干液体。

(14)入二甲苯 (I) 中透明 2-3 分钟，用吸水纸吸干液体；入二甲苯 (II) 中透明 5 分钟。

(15)中性树脂封片。

(16)光镜下观察肺组织病理变化。

3. 肺组织中 SP-A 蛋白检测 (Western Blot)

3.1 试剂准备

(1) 6×样品缓冲液：2.5g/L 溴酚蓝，2.5g/L 二甲苯青 FF，30%甘油，用于 DNA 上样。

(2) 50×TAE 贮存液: 242g Tris base, 57.1ml 冰乙酸, 100ml 0.5mol/L EDTA。

(3) pH8.3 Tris-Gly 电泳缓冲液: 母液: 取 30.3g Tris, 144g Gly, 10.0g SDS 用双蒸水溶解, 调 pH 至 8.3, 最后定容至 1000ml。工作液: 取母液 100ml 加双蒸水定容至 1000ml。

(4) pH8.8 2mol/L Tris-HCL Buffer: 称取 Tris 24.22g 加水至 85mL 溶解, 同时加入 100mg SDS 100, 全部溶解后用 HCL 调 pH 至 8.8, 最后用双蒸水定容至 100ml, 4℃ 避光保存。

(5) pH6.8 0.5mol/L Tris-HCL Buffer: 称取 Tris 6.04g 加水至 85mL 溶解, 用浓 HCL 调 pH 至 6.8, 再加入 100mg SDS 100, 最后用双蒸水定容至 100ml, 4℃ 避光保存。

(6) 30% Acr-0.8% Bis: 取 29g Acr 与 1g Bis, 加双蒸水至 100ml, 搅拌, 使其全部溶解, 4℃ 避光保存。

(7) AP(10%): 取 0.1g 过硫酸胺加双蒸水 1ml 置于 Eppendorf 管中, 4℃ 保存

(8) 裂解液: 50mmol/L Tris-HCL, pH7.4 (缓冲体系)

150mmol/L NaCl (等渗体系)

1mmol/L PMSF (蛋白酶抑制剂)

1mmol/L EDTA (变性剂和稳定剂)

5ug/mL Aprotinin (蛋白酶抑制剂)

1% Triton X-100 (裂解细胞)

1% 去氧胆酸钠 (中性变性剂和蛋白溶解剂)

0.1% SDS (强变性剂和蛋白溶解剂)

其中 PMSF、Aprotinin 蛋白酶抑制剂最好另外配制, -20℃ 保存, 用前混合。

(9) 转移缓冲液: 甘氨酸 (pH8.3) 2.9g (终浓度 39mmol/L), Tris 5.8g (终浓度 48mmol/L), SDS 0.37g (终浓度 0.037%), 甲醇 200ml (终浓度 20%), 加入双蒸水定容至 1000ml。

(10) TBS 缓冲液: 50mmol/L Tris, 0.5mmol/L NaCl, pH7.4。

(11) Tween20/TBS (TTBS 缓冲液): 50mmol/L Tris, 0.5mmol/L NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4, 4℃ 保存。

(12) 封闭液: 5% 脱脂牛奶, TTBS。

3.2 操作步骤

(一) 蛋白样品制备

(1) 把冷冻的肺组织取出置于碾钵中，按照组织的量加入适量裂解液后碾碎，移至 1.5ml 离心管中。

(2) 离心管摇匀置于冰上，裂解 30min。

(3) 提前开离心机预冷，4℃ 下 12000rpm 离心 5min。

(4) 将离心后的上清分装转移倒 0.5ml 的离心管中放于 -80℃ 保存。

(二) 蛋白含量的测定 (Bio-Rad 试剂盒)

(1) 从 -80℃ 冰箱中取出 1.5mg/ml 的标准品，室温融化后，备用。

(2) 取 1.5mg/ml 的标准品进行倍比稀释，稀释后的浓度分别为 1.5mg/ml, 0.75mg/ml, 0.375mg/ml, 0.1875mg/ml 四个浓度的样品，加上空白 0mg/ml 后进行标准曲线的绘制。

(3) 取试剂盒中的 S 液和 A 液按 1:50 进行混合，得到 A' 液。

(4) 把 5ul 的标准液和待测样品加入酶标板中。

(5) 加入 25ulA' 液于上述孔中混匀，再加入 200ulB 液混匀。

(6) 混匀后，室温放置 15min。在多标记分析仪器上测吸光度，波长为 650-750nm。根据标准曲线得样品浓度。

(三) SDS-PAGE 电泳

(1) SDS-PAGE 凝胶的配制：根据实验检测抗原的分子量大小配置一定体积浓度为 10% 的丙烯酰胺溶液作为分离胶。迅速在两玻璃板的间隙中灌注丙烯酰胺溶液，不能有气泡，留出灌注积层胶所需空间。然后小心的在分离胶溶液上覆盖一层 1-5mm 的无水乙醇，这使凝胶表面变的平整。等待 30-60min，使凝胶聚合。当凝胶聚合后，在分离胶和水层之间会出现一个清晰的界面，可以微微倾斜模具，检测凝胶是否聚合。用去离子水洗涤凝胶顶部数次以除去未聚合的凝胶，尽可能除去凝胶上的液体，再用滤纸吸净残留液体，注意不要接触胶面。制备一定体积浓度为 5% 的丙烯酰胺溶液作为浓缩胶。在已聚合的分离胶上直接灌注浓缩胶。立即在浓缩胶溶液中插入干净的实验预设计的梳子，小心避免混入气泡，将凝胶垂直放置于室温下。浓缩胶聚合完全后，小心移出梳子，预电泳 (10-20V, 30mins) 除去未聚合的丙烯酰胺。把凝胶固定于电泳装置上，上下槽各加入 Tris 甘氨酸电泳缓冲液。

(2) SDS-PAGE 电泳: 将样品与 SDS-PAGE 加样缓冲液混合, 在 100℃加热 3—5min 使蛋白质变性。设计加样顺序, 作好实验记录, 按预定顺序加样。把电泳装置与电源连接好, 恒压 100V, 电流应流向阳极, 待溴酚蓝迁移到分离胶底部 0.5cm 处, 关闭电源。从电泳装置上卸下凝胶玻璃板, 用去离子水冲洗干净。准备进行免疫印操作。

(四) 转膜

准备 6 张滤纸和 1 张 PVDF 膜, 将切好的 PVDF 膜置于甲醇中浸 10 秒后和滤纸一起在转移缓冲液中浸泡。在一块夹板上放一层海棉, 上铺 3 张浸泡过的滤纸, 逐张叠放, 精确对齐, 然后用玻璃试管作滚筒挤出气泡, 放置漂洗过的凝胶。把 PVDF 膜放在凝胶上, 精确对齐, 再放置 3 张滤纸, 放上层海棉, 赶尽气泡, 夹紧夹板。将凝胶一侧靠近阴极, 滤膜一侧靠近阳极, 100V 电转移 60 min。转移结束后用丽春红染色, 以检查蛋白转移是否完全。

(五) 杂交

PVDF 用 TBST 漂洗 4 次, 15 min/次, 洗去红色条带。置于封闭液中, 室温摇床上缓慢摇动 1 h。取出 PVDF, 置于含有 10 ml 用封闭液稀释的 SP-A 一抗 (1:1000) 杂交袋中, 封口, 4℃摇床上缓慢摇动过夜。弃去带有一抗的封闭液, 用 TBST 漂洗 PVDF 4 次, 15 min/次。将膜放入含有 10 ml 用封闭液稀释的过氧化物酶标记的相应二抗 (1:2000) 的杂交袋内, 封口, 室温摇床上缓慢摇动 1h。弃去带有二抗的封闭液, 用 TBST 漂洗 PVDF 膜 4 次, 15 min/次。

(六) 化学发光、显影、定影

在暗室中, 取等体积的 ECL 试剂 A 液、B 液混合 (按每平方厘米膜 0.125 ml ECL 混合液计算)。用滤纸将膜轻轻吸干, 有蛋白质的一面向上放在保鲜膜上。将 ECL 混合液均匀加到膜上, 反应 1 min, 提起膜, 用滤纸轻轻吸干液体。用保鲜膜覆盖 PVDF 膜, 注意表面要平整, 不存有气泡。覆盖 X 光胶片, 曝光。根据信号的强弱适当调整曝光时间, 一般为 1min 或 5min, 也可选择不同时间多次压片, 以达最佳效果; 曝光完成后, 打开 X-光片夹, 取出 X-光片, 迅速浸入显影液中显影, 待出现明显条带后, 即刻终止显影。显影时间一般为 1~2min (20~25℃), 温度过低时 (低于 16℃) 需适当延长显影时间; 显影结束后, 马上把 X-光片浸入定影液中, 定影时间一般为 5~10min, 以胶片透明为止; 用自来水冲去残留的定影液后, 室温下晾干。观察结果。

(七) 图像扫描分析

图象分析将胶片进行扫描、拍照，用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

4. RT-PCR 技术测定肺组织中 SP-A mRNA 的表达

4.1 待测肺组织总 RNA 的提取

- (1) 取出冻存肺组织约 100mg 置于冰上碾钵中碾碎，移至 1.5ml EP 管中。
- (2) 加入 1ml Trizol 充分匀浆，室温放置 5 分钟。
- (3) 加入氯仿 200ul，震荡 15 秒，室温静置 5 分钟。
- (4) 4℃ 12000rpm 离心 10 分钟。
- (5) 从离心机中小心取出 EP 管，此时匀浆液分为三层，即：无色的上清液，中间的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相，小心转移上清液(约 500ul)至一新的 EP 管(1.5ml)。
- (6) 加入等体积异丙醇约 500ul 上下颠倒离心管充分混匀后，在冰上静置 10 分钟。
- (7) 4℃ 12000rpm 离心 10 分钟，弃上清，RNA 沉于管底。
- (8) 加入 75% 的乙醇(DEPC 水配制)1ml，温和震荡离心管，悬浮沉淀。
- (9) 4℃ 12000rpm 离心 5 分钟，弃上清。
- (10) 无水乙醇 1ml 清洗沉淀，温和震荡离心管，悬浮沉淀。
- (11) 4℃ 12000rpm 离心 5 分钟，弃上清，室温晾干。

4.2 RNA 定量

DEPC 处理液 30ul 溶解沉淀，55-60℃ 10min，取 2ul 稀释 50 倍，用 BioMate 3S 分光光度计测量 260nm 和 280nm 波长处的 OD 值及 OD_{260nm} / OD_{280nm} 值，比值在 1.8-2.0 时为 RNA 样品的纯度满意 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值确定 RNA 的完整性与纯度，以 OD₂₆₀ 的值确定 RNA 的量并稀释到浓度为 1ug/1ul。

4.3 cDNA 反转录

(1) PCR 引物设计与合成

从 GenBank 中检索大鼠 SP-A 基因序列，应用 Primer5.0 引物设计软件，按照引物设计的基本原则，优选跨不同外显子的一对引物。设计好的引物由上海 Invitrogen 生物有限公司合成。

SP-A 引物序列为:

上游: 5'-TAAGTGCTGCCCTCTGACCT-3'

下游: 5'-AGGAGCCATACATGCCAAAC-3'

β -actin 引物序列为

上游: 5'- CCCATCTATGAGGGTTACGC -3'

下游: 5'- TTTAATGTCACGCACGATTTC -3'。

(2) 总 RNA	2 ul
dNTPs	1 ul
DEPC 水	12 ul

上下颠倒混匀(可稍许离心), 70°C 温育 5min 后, 迅速置于冰上。

(3) 依照以下顺序加入下列试剂建立反应体系:

反转录缓冲液	5 ul
10Mm dNTP 混合物	1.25 ul
DEPC 水	1.75 ul
RNasin 核糖核酸酶抑制剂	1 ul
反转录酶	1 ul

以上反应体系置于 37°C 温育 60min, 95°C 5min。

4.4 实时 PCR 反应

(1) PCR 反应体系

2×PCR buffer	5 ul
Forward primer	1 ul
Reverse primer	1 ul
Deionized water	6 ul
cDNA	2 ul

(2) PCR 反应条件

SP-A 的 PCR 条件为: 95°C 预变性, 10min; 95°C 变性, 15s; 退火 55°C 30s; 延伸 72°C 30s, 共 40 个循环。

β -actin 的 PCR 条件为: 95°C 预变性, 10min; 95°C 变性, 15s; 退火 55°C 30s; 延伸 72°C 30s, 共 40 个循环。

4.5 RT-PCR 产物定量分析

标准曲线法定量：取标准品按 4 倍稀释，连续置备 5 个浓度梯度，标准品浓度关系已知，通过 RT-PCR 可测得样品对应的 Ct 值，由此样品的浓度与 Ct 值产生线性关系，结合 PCR 仪内置的 Roter gene6.0 软件，可得出每个样品的浓度。随后用同一样本内参基因 β -actin 通过 RT-PCR 标准曲线法定量测得的浓度，进行规一化，得到样本目的基因的相对表达量。

统计学处理

所有实验数据均用 SPSS17.0 统计分析软件进行统计学分析处理，数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素或多因素方差分析，两组均数比较行独立样本 t 检验(independent-samples t Test)， $P < 0.05$ 为有显著性差异， $P < 0.01$ 为有高度显著性差异。

结 果

一、实验动物一般情况观察结果

I 组（空气组）中的实验动物实验期间精神状态佳、活动灵活，进食正常，体重增长稳定。II 组（高氧组）中的实验动物随着实验时间的延长，逐渐出现症状，表现皮毛无光泽、精神萎靡、活动少，脱氧后烦躁不安，呼吸困难明显，鼻尖发绀，恢复供氧可逐渐缓解。III 组（BUD 干预组）中实验动物随着实验时间的延长，状态可、体重持续增长、活动灵活。

二、HE 染色光镜下观察肺组织病理表现

I 组（空气组）3 时光镜下可见肺组织尚处于囊泡期，终末气腔缩小，数量渐增多，肺泡间隔较厚；7 天时出现肺泡化，肺泡数量逐渐增多，形态较规则，大小较均匀，肺泡间隔渐薄；14 天时肺泡化成熟，肺泡大小均匀，肺泡间隔明显变薄。II 组（高氧组）高氧暴露 3 时光镜下可见肺组织水肿，毛细血管扩张、充血，炎症细胞浸润，部分肺泡腔可见红细胞，肺间隔断裂，肺泡腔扩大；高氧 7 天时，肺水肿、炎性渗出、肺出血较前更加明显，部分肺间隔增宽变形，肺组织结构紊乱；14 天时更为明显，肺组织结构紊乱，肺间隔重度增厚，肺泡大小不一，肺泡腔明显增大，部分肺泡融合、肺泡数量减少，可见肺大泡或肺不张。III 组（干预组）BUD 干预后 3 天时，局部仍可见部分水肿，炎性渗出较高氧组有所减轻；干预 7 天，炎性渗出、肺出血、肺间隔增厚及肺结构破坏程度均较高氧组减轻，但损伤仍存在；干预 14 天，肺组织结构大致正常，肺泡较均匀，肺间隔仍有少量的炎症细胞浸润，肺纤维化程度较高氧组明显减轻，但是肺损伤仍存在。

三、肺组织湿/干重比 (W/D)

实验 3 天、7 天，II 组（高氧组）实验动物肺组织湿/干重比值 (W/D) 较 I 组（空气组）增高 ($P < 0.01$)，实验 14 天时，II 组较 I 组升高更明显 ($P < 0.01$)。而 III 组（干预组）与 II 组相比，3 天、7 天、14 天的比值均有明显下降 ($P < 0.01$)。（见表 1）

表 1 不同组别肺组织湿干重比值的比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3d	7d	14d
I 组 (空气组)	5.4985±0.2247	5.6588±0.3557	5.8010±0.5512
II 组 (高氧组)	6.5018±0.3119 ^a	7.0069±0.3492 ^a	8.1244±0.6729 ^a
III 组 (干预组)	5.6325±0.3751 ^b	6.0781±0.3372 ^b	6.1759±0.5549 ^b

注: a 表示 II 组与同列 I 组比较, p<0.01; b 表示 III 组与同列 II 组比较, p<0.01。

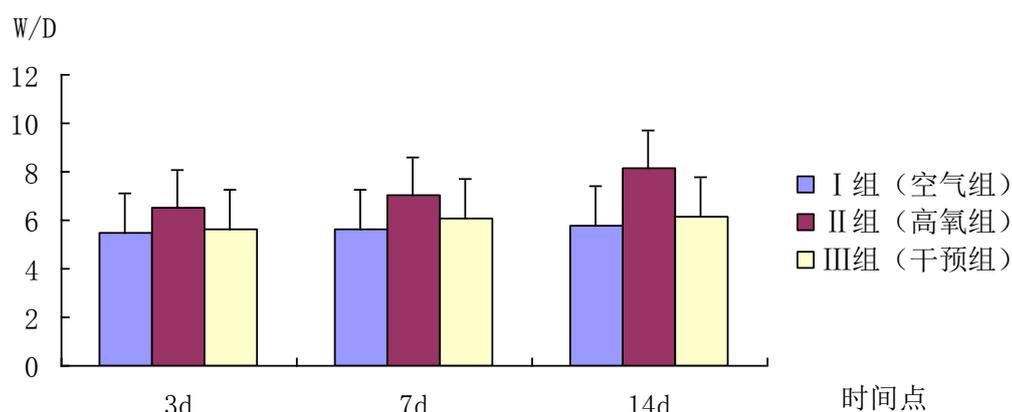


图1 肺组织湿干重比值

四、支气管肺泡灌洗液 (BLAF) 中总蛋白含量 (g/L)

II 组 BLAF 中总蛋白含量 (TP) 在三个时间点均较 I 组明显升高 (P<0.01)。III 组 3 天时 BLAF 中 TP 较 II 组降低 (P<0.05), 7 天、14 天时明显降低 (P<0.01), 但与 I 组比较, 各时间点 BLAF 中总蛋白含量 (TP) 均无明显差异。(见表 2)

表 2 不同组别 BALF 中 TP 含量的比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3d	7d	14d
I 组 (空气组)	0.68875±0.1587	0.7455±0.3008	0.8228±0.2868
II 组 (高氧组)	1.2116±0.2170 ^a	1.5595±0.3050 ^a	1.6346±0.2943 ^a
III 组 (干预组)	0.9097±0.2482 ^b	1.0072±0.2706 ^c	1.1269±0.2245 ^c

注: a 表示 II 组与同列 I 组比较, p<0.01; b 表示 III 组与同列 II 组比较, p<0.05,

c 表示 III 组与同列 II 组比较, p<0.01。

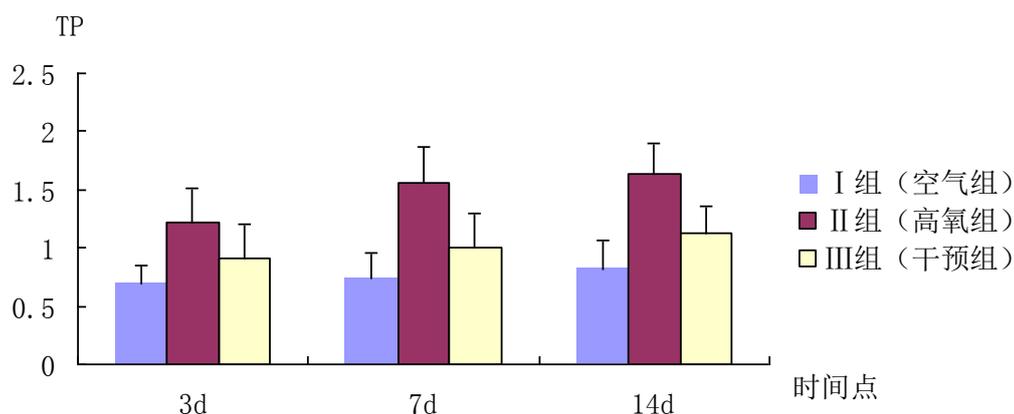


图2 支气管肺泡灌洗液中总蛋白含量(g/L)

五、肺组织中 SP-A 蛋白表达水平变化:

与 I 组比较, II 组实验 3 天时 SP-A 表达蛋白明显增高, 差异有高度显著性意义 ($P < 0.01$); 7 天、14 天时表达较 I 组下降, 有高度显著性意义 ($P < 0.01$)。III 组的 SP-A 蛋白表达接近于 I 组 SP-A 的表达趋势; 实验 3 天时表达介于 I 组与 II 组之间, 与 II 组比较有显著性意义 ($P < 0.05$); 7 天时表达均较 II 组显著升高 ($P < 0.05$), 14 天时升高更明显 ($P < 0.01$)。(见表 3)

表 3 不同组别肺组织中 SP-A 蛋白表达水平的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	3d	7d	14d
I 组 (空气组)	0.6210 \pm 0.0882	1.4952 \pm 0.1963	1.6047 \pm 0.1878
II 组 (高氧组)	0.9114 \pm 0.1787 ^a	1.1831 \pm 0.1765 ^b	1.2229 \pm 0.1682 ^a
III 组 (干预组)	0.6976 \pm 0.1486 ^c	1.4078 \pm 0.1699 ^c	1.5402 \pm 0.1743 ^d

注: a 表示 II 组与同列 I 组比较, $p < 0.01$; b 表示 II 组与同列 I 组比较, $p < 0.05$,

c 表示 III 组与同列 II 组比较, $p < 0.05$; d 表示 III 组与同列 II 组比较, $p < 0.01$ 。

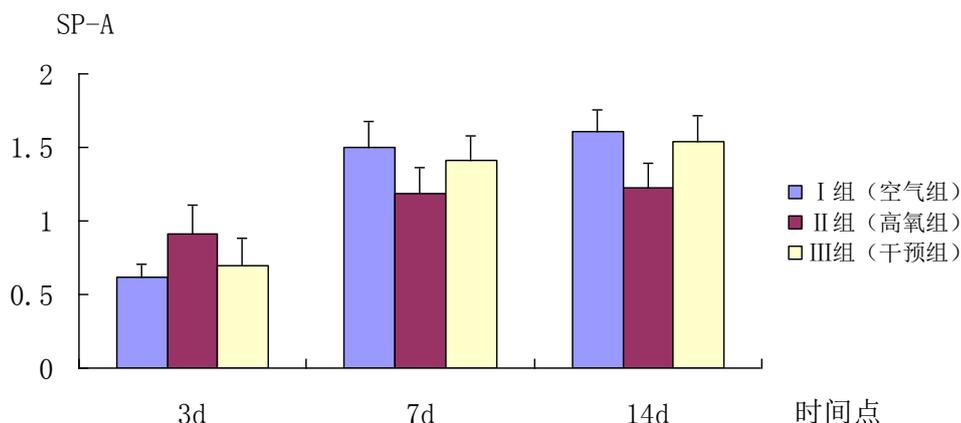
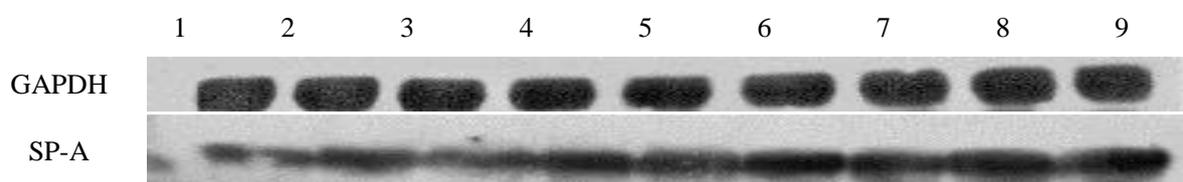


图3-1 肺组织SP-A蛋白表达水平的变化



- 1、2、3: 空气组 3 天、高氧组 3 天、干预组 3 天
- 4、5、6: 空气组 7 天、高氧组 7 天、干预组 7 天
- 7、8、9: 空气组 14 天、高氧组 14 天、干预组 14 天

图 3-2 SP-A 蛋白表达的胶片图

六、肺组织中 SP-A mRNA 表达水平的变化:

II 组实验 3 天时 SP-A mRNA 表达增高与 I 组比较有显著性意义($P < 0.05$); 7 天时可见表达下降, 14 天时下降更明显, 与 I 组比较有显著性意义($P < 0.01$)。III 组的 SP-A mRNA 表达接近于 I 组 SP-A mRNA 的表达趋势; 实验 3 天时 SP-A mRNA 表达介于 I 组与 II 组之间, 与 II 组比较有显著性意义($P < 0.05$); 7 天、14 天时表达较 II 组显著升高($P < 0.05$)。(见表 4)

表 4 不同组别肺组织中 SP-A mRNA 表达水平的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	3d	7d	14d
I 组 (空气组)	0.4442±0.1084	0.7646±0.0966	0.8682±0.0890
II 组 (高氧组)	0.5688±0.0636 ^a	0.6105±0.1231 ^a	0.6705±0.1173 ^b
III 组 (干预组)	0.4512±0.1064 ^c	0.7560±0.0920 ^c	0.8455±0.0889 ^c

注: a 表示 II 组与同列 I 组比较, $p < 0.05$; b 表示 II 组与同列 I 组比较, $p < 0.01$;

c 表示 III 组与同列 II 组比较, $p < 0.05$ 。

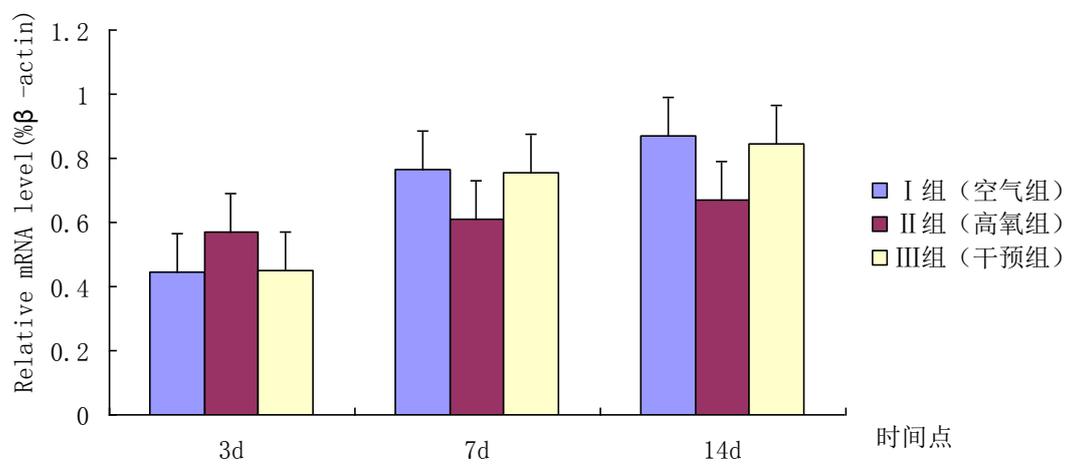


图4 肺组织SP-A mRNA水平的变化

讨 论

一、高氧性肺损伤模型的建立和评价

BPD 是一个多因素相关性疾病, 比如早产、机械通气、气道感染、氧中毒和营养不良等国内外都有报道。其发病机制尚未完全阐明, 目前多数学者公认 PS 缺乏的不成熟肺与氧中毒和气压伤起的肺损伤的相互作用是关键环节^[3]。研究表明新生尤其是早产儿长期吸入高浓度氧肺部出现的急慢性损伤是致新生儿 CLD 的主要因素之一^[15]。

人呼吸系统的形态在孕 8~16 周进入假腺体期、孕 17~24 周进入小管期、孕 25~35 周进入囊泡期、孕 36 周到生后 18 月进入肺泡期^[16]。与人类相似, 大鼠肺发育也经历了腺体发育和生后发育两过程, 通常可据此分为 5 期: 假腺体期(胎龄 11d~18d)、小管期(胎龄 19d~20d)、囊泡期(胎龄 21d~生后 3d)、肺泡期(4d~21d)和成熟期(21d 以后), 其中, 出生后 4d~14d 是肺泡化形成关键时期, 这种发育顺序和比较准时的肺泡化过程与人类肺发育相似^[17]。在新生大鼠, 单独的高氧足以引起肺的发育阻滞, 这与 BPD 的特征相似, 而有报道在早产儿给予氧气治疗, 而不是机械通气, 也会引起类似的影响。因此认为, 新生大鼠的发育特点与早产儿所处的肺形态发生阶段相似, 受到高浓度氧刺激后的临床表现、发病过程、肺形态学改变与早产儿 CLD 非常相似^[18]。另外, 新生大鼠的体形较小, 饲养繁殖以及药物使用成本低, 这些特性使得新生大鼠非常适合成为 BPD 研究的动物模型^[19]。

对于高氧肺损伤动物模型的制备一般有以下两种方法: 一是将动物气管插管, 然后呼吸机辅助呼吸, 使动物被动吸高氧^[20]。二是动物不做气管插管, 而是置于一个密闭空间, 通入高氧使动物主动吸入^[21]。两种方法各有优缺点。第一种方法适合大型灵长类动物如狒狒或羊, 其发育与人类相似, 有较高的研究价值, 但是价格昂贵, 需较高的监护技术及设备。第二种方法优点在于动物有一定的自主活动空间, 喂养方便, 不需要气管插管, 便于研究较小的新生动物高氧肺损伤, 其缺点为吸入氧浓度易受影响, 难以精确控制动物吸入氧浓度。

我科在新生大鼠高氧肺损伤动物模型制作方面有比较成熟的经验。本实验中, 将新生鼠置于自制封闭氧箱中, 经进气口持续输入医用纯氧, 出气口排出二氧化碳, 测

氧仪监测维持 FiO_2 维持在 95% 左右。每日添加水、饲料、更换垫料, 对实验鼠进行操作, 并将高氧组、干预组母鼠与空气组母鼠对调, 避免因氧中毒导致喂养能力下降。但此操作易降低箱内氧浓度, 故在操作同时需调高输入氧流量, 因此, 在实验中需要尽可能缩短操作时间, 维持箱内氧浓度的稳定。

本实验表明: 高氧组大鼠出现精神萎靡、活动减少、离氧后发绀、呼吸急促费力, 病理检查显示肺组织结构紊乱, 肺泡数量减少, 肺泡腔可见红细胞, 肺间隔增宽, 有炎症细胞浸润。这些变化表明高氧抑制肺泡的发育, 符合高氧所致的 BPD 的病理改变^[22, 23], 证实高氧肺损伤模型建立成功。同时我们还发现高氧组 W/D 比值和 BLAF 中总蛋白含量均较空气组显著升高($P < 0.01$), 提示高氧肺损伤可致肺部的炎症反应和肺水肿。

三、SP-A 在肺发育时期的表达

肺表面活性物质相关蛋白(surfactant protein, SP), 是一类特异性的综合蛋白。SP 包括 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D, 其中 SP-A 约占总量的 50%, 为最先发现且强烈表达信号最丰富的蛋白, 在调节肺的免疫防御和炎症反应过程中发挥关键作用^[24]。SP-A 主要由 AEC II 表达, 也可以通过呼吸道细胞合成包括克拉拉细胞 (Clara cells) 和粘膜下层细胞表达, 是可溶性的 C-型凝集素的蛋白质, 为胶原凝集家族的一员^[25]。

SP-A 的生理作用主要是参与 PS 的形成和代谢, 可稳定细胞内外 PS 水平, 同时发挥调理素作用, 参与局部防御、调节免疫和炎症反应, 具有维护肺泡结构和功能的作用。即主要有以下三方面: ①参与 PS 的形成、代谢。SP-A 促进 PS 板层状小体转化为管髓体^[26], 并增加 PS 单分子层中的 DPPC 含量, 促进 PS 的表面活性动态变化, 由单层向多层转变^[27]。SP-A 能够通过肺泡 II 型上皮细胞表面 SP-A 受体的介导作用调节肺泡内 PS 水平的平衡^[28]。②SP-A 参与机体的免疫防御功能。在先天免疫反应中, SP-A 作为广谱调理素, 通过结合细菌和病毒等病原体表面特异的碳水化合物上, 实现增强肺泡巨噬细胞和中性粒细胞的趋化性及吞噬能力, 抑制多种细胞因子和炎症介质的合成与释放, 并以此调控肺泡水平的免疫反应^[29]。SP-A 可以调理巨噬细胞的功能, 促进其趋化活性, 增强其吞噬作用^[30]。SP-A 通过影响淋巴细胞的功能进而调节和加强适应性免疫功能。研究表明, 根据不同强度的激活信号, SP-A 可调节不同的 T 细胞活性。在高信号强度时抑制 T 细胞激活, 而在弱信号强度时增强他们的活化和增殖^[31]。③参与机体的防御和肺的炎症反应过程。SP-A 能对抗和清除某些炎症因子、蛋白水解酶

和过氧化物,对肺组织具有保护作用^[32]。此外,在体外和体内感染模型中都证实了 SP-A在预防和治疗肺部细菌、病毒、真菌感染中均发挥了重要作用。

对人的胎肺组织研究表明,胎龄25周以后,SP-A开始在AEC II及其前体细胞胞浆内表达,32周以后开始逐渐增强,生后表达明显增强,SP-A生前多以储存状态为主,因此,胎龄在32周以前,肺表面活性蛋白水平低下^[33]。当胎儿出生后AEC II受到肺泡充气、牵拉等动力学因素的刺激,促使其快速分泌SP-A。出生后,随着新生儿肺组织继续发育至完全成熟,AEC II合成分泌SP-A蛋白进入一个稳定上升阶段。以上研究均表明SP-A与肺发育成熟正相关,因此SP-A的含量可作为新生儿肺发育的指标。在本实验中测定空气组中新生大鼠肺组织的SP-A mRNA和蛋白的表达,观察结果发现3、7和14天时新生大鼠肺组织中均可见SP-A mRNA和蛋白的表达,且有逐渐上升的趋势,证实了SP-A参与新生大鼠早期肺发育过程。

四、SP-A与BPD的关系

BPD的病因和发病机制一直是新生儿领域关注的热点。虽然对于BPD病因及发病机制仍不是很清楚,但是随着围产医学的兴起,新生儿重症监护技术和治疗手段的改进以及基础生物学的进展,对BPD的认识也在不断深入,并取得了很大的进展。目前多数学者认为其机制极其复杂,涉及以下多个方面:早产、高氧、感染、机械通气、基因易感性等。尤其是胎龄越小肺发育越不成熟,ACE II合成分泌PS能力不足,肺组织中SP低水平表达,不成熟的肺长期暴露于高氧、机械通气、炎性损伤等刺激之中,肺损伤重,修复困难,发育停滞,导致BPD的发生^[34]。其中肺发育不成熟、急性肺损伤和损伤后异常修复是引起BPD的三个关键环节。肺是氧化应激反应的重要靶器官,高氧肺损伤是造成BPD或CLD的重要因素之一,至今仍是研究热点^[35]。动物实验证明,高氧导致动物肺部病理改变同BPD,提示高氧是BPD发病的独立因素,临床研究也发现将胎龄32周持续需氧患儿置于高氧环境中可提高BPD的发病率,短期将极不成熟早产儿置于高氧环境中也可诱发BPD^[36]。

SP-A是70年代末才被认识的一种特异性蛋白,国内外对此做了一系列研究,以往认为其主要作用为预防和治疗肺部细菌、病毒、真菌感染^[37]。近年来发现不同病因所致急慢性肺损伤中均伴有SP-A表达的改变。Greene等研究发现:在可能发生急性肺损伤的高危患者BALF中SP-A明显下降,而SP-A异常低下的均发展成为急性肺损伤,相反,其浓度高于1.2mg/dl的均未发展成急性肺损伤^[38]。另外Bae研究发现,未

患RDS早产儿气道抽吸物中SP-A水平比患有RDS的早产儿高八至九倍^[39]。刘冬云的研究表明,与对照组相比BPD患儿的支气管肺泡灌洗液中SP-A的水平显著降低^[40]。动物实验也证明,早产CLD狒狒肺组织及BALF中SP-A水平均明显下降^[41]。另外一项研究进一步表明若新生儿缺乏SP-A,则对感染因素敏感,CLD发病率升高,动物实验表明若用SP-A替代疗法则改善早产动物的免疫状况,提高存活率^[42]。

本研究采用高氧诱导的方式,成功建立了高氧肺损伤的动物模型,并证实和复制了长期高浓度氧气吸入可以诱发新生大鼠慢性肺组织损伤。结果显示,在新生大鼠高氧暴露至14d,无论是在mRNA还是在蛋白表达水平,SP-A的表达均呈明显下降趋势,与之前的文献报道一致。我们认为其下降的趋势与高氧肺损伤机制有关,这涉及氧化/抗氧化失衡、炎性水肿、肺泡微血管破坏及新生血管生成、细胞外基质重建、组织异常修复、细胞凋亡和信号传导系统异常等诸多因素。这些机制相互作用,相互促进,构成错综复杂的网络体系,其中SP扮演了重要角色。正常情况下机体氧自由基的产生和抗氧化酶的清除能力处于平衡状态,当暴露于高氧环境下,机体产生大量自由基,超过机体正常抗氧化能力,系统清除能力,从而导致肺损伤^[43]。高氧还可引起肺水肿炎性反应纤维蛋白沉积以及PS活性降低,同时在体内形成高活性的氧自由基,诱导产生过量炎症介质,加重炎性反应,损伤上皮细胞,导致的AEC II凋亡^[44, 45],使得PS尤其是SP-A分泌进一步减少,使肺功能恶化,导致肺泡化降低,最终产生BPD。

本研究结果还显示,在新生大鼠高氧暴露3d时,SP-A表达较空气组增强,可能是机体在受到有害刺激时的一种自我保护机制,防止机体产生进一步的损害。这一自我保护机制的作用是:高氧暴露早期AEC II损伤较轻及炎症介质等作用,刺激AEC II保护性分泌,导致SP-A mRNA表达水平升高,SP-A合成增多,故肺组织中SP-A含量增加;同时AEC II对SP-A的再摄取和利用增加,使得肺组织中SP-A的含量维持在较高水平,这种高水平的SP-A可以增加机体的抗炎和抗氧化功能,以减轻高氧对肺组织的损伤,有利于机体的防御及修复^[46]。但随着高氧暴露时间延长,这种保护机制的作用将逐渐丧失,组织损害明显加重。本实验中,高氧暴露至7到14天,无论是在mRNA还是在蛋白表达水平,SP-A的表达均呈明显下降趋势,提示机体自我保护机制的失代偿状态。显然,它们转录和转录后水平的这种动态变化规律与其在高氧肺损伤进程中的作用密不可分。基于本实验的研究结果,我们认为:高氧暴露3d时,SP-A表达较空气组增强,随着高氧暴露时间延长至7到14d时SP-A表达较前明显减弱,均低于

空气组, 考虑到新生大鼠在长时间高氧暴露下, AEC II 结构破坏逐渐加重、凋亡变性坏死, 使其产生和分泌 SP-A 的功能衰竭, 肺组织中 SP-A 含量逐渐下降; SP-A 在发挥其抗氧化、免疫防御和减少慢性炎症作用后大量消耗。同时高氧肺损伤时的炎症反应破坏肺泡毛细血管单位及肺组织完整性^[47], 大量的炎症细胞代谢产物及漏出的血浆蛋白均可降解 SP-A, 并使其功能缺陷。功能缺失的 SP-A 无法发挥其介导的免疫防御功能, 此时呼吸系统更易发生严重的炎症和感染, 进一步促发炎症因子的级联反应。这时机体的低水平及功能缺陷状态的 SP-A 无法更好的发挥其抗氧化、抗炎作用, 脆弱的不成熟的肺组织在暴露于高氧、炎性损伤等刺激之中, 进一步加重肺损伤, 肺修复困难, 发育停滞, 导致 BPD 的发生。故我们推测高氧导致 SP-A 表达下调或功能缺失是高氧肺损伤发生发展的重要因素。

五、布地奈德对 BPD 模型中的保护作用

以上研究显示, SP-A 具有维持肺泡表面张力和免疫调节作用, 保证对侵入肺部病原体的快速有效清除, 避免过度炎症反应造成组织损伤, 故 SP-A 含量下降及功能缺陷可加剧肺组织炎症反应, 从而形成恶性循环。由于 BPD 的患儿存在较低的 SP-A 水平, 使其无法很好的清除外源性致病物, 因此其不光表现在肺功能的缺失, 还表现在易于发生多种炎症及感染。

因此, 上调 SP-A 的表达, 促进 PS 的合成, 对 BPD 的防治具有重要意义。目前对于高氧损伤时肺表面活性物质相关蛋白的研究越来越多, 但是如何更好的提高 SP-A 表达水平的研究仍极少。我们可以给予 BPD 患儿外源性 PS, 以直接刺激 AEC II 分泌进而提高肺组织中 SP-A 的水平^[48], 但是目前应用于替代治疗的外源性 PS 制剂缺乏 SP-A, 且外源性 PS 价格昂贵限制了临床应用。故我们可以通过深入研究 SP-A 的调控机制来搜寻上调 SP-A 基因表达的分子。

SP-A 的合成及分泌调控复杂, 受各种调节因子、生长因子及激素的调控。特别是由 AEC II 相邻的细胞、细胞外基质及局部体液因素所构成的复杂微环境在 SP-A 合成分泌及稳态的调控中起重要作用。在肺的发生发展期, SP-A 基因的调控是一个由环腺苷酸 (cAMP) 和糖皮质激素触发的过程^[7], 提示糖皮质激素可以促发 SP-A 基因的表达。其次糖皮质激素可促进肺抗氧化酶及表面活性物质生成, 改善了肺的换气功能, 进一步刺激 AEC II 分泌富含 SP-A 的内源性 PS, 提高肺内的 SP-A 水平。再次糖皮质激素具有强大的抗炎作用, 可抑制炎症反应, 减轻支气管及肺水肿, 使 SP-A 的

消耗减少, 维持 SP-A 在一定的功能水平^[9]。但是糖皮质激素会影响体格发育神经运动发育和加重视网膜病变, 现临床上使用地塞米松预防 BPD 时采取谨慎态度, 仅应作为严重病情的营救措施。而理论上吸入糖皮质激素可抑制肺部炎症反应而不引起全身不良反应, 布地奈德 (budesonide, BUD) 是一种临床常用的具有高效局部抗炎作用吸入糖皮质激素, 常用于哮喘的治疗和预防。其全身作用, 如体重下降、淋巴组织及肾上腺皮质萎缩, 比其他糖皮质激素弱或相当^[12]。动物及临床研究均证实: 在吸入 BUD 后, BALF 中炎症细胞、蛋白、细胞因子均显著下降^[49, 50]。

综上所述, 理论上提示早期预防性应用 BUD 可通过抗氧化、抑制炎症反应增加 PS 的合成与分泌, 促进 SP-A 的表达, 从而促进肺成熟。目前 Cole 等报道的随机对照多中心临床试验表明吸入糖皮质激素疗程 4 周, 虽未减少 BPD 的发生率, 但减少了 50% 婴儿以后需全身糖皮质激素的治疗、40% 婴儿需支气管扩张剂的治疗和 26% 婴儿在 1 个月时仍需机械通气的治疗^[51]。Yeh 等的研究表明生后使用 BUD 联合 PS (作为载体) 雾化吸入, 能显著改善肺功能, 降低 VLBWI 纠正胎龄 36 周需用氧的发生率及死亡率, 且无明显短期副作用^[52]。而 Mass 等对德国的 223 家新生儿科调查显示: 46% 的医院在其他方法不奏效时一般采用吸入糖皮质激素预防和治疗 BPD, 但普遍关心的问题是效益和风险的比例^[53]。故需进一步研究证明: 吸入吸入糖皮质激素是否有预防 BPD 的作用及其作用机制, 以此我们设计了本次实验。

我们的实验结果显示: 在高氧暴露条件下, BUD 干预组与同时间点高氧模型组相比, 肺损伤所致的病理改变、肺组织湿干重比、支气管肺泡内总蛋白含量均有明显改善。上述结果表明, BUD 在一定程度上能抑制新生大鼠高氧肺损伤过程的发生发展。高氧暴露 3d 时, 治疗组肺组织 SP-A 表达介于高氧组与空气组, 其可能原因是糖皮质激素的抗炎抗氧化作用强于其直接促发 SP-A 表达的作用, 使得炎症介质的分泌少于高氧组, 对 AEC II 的刺激减少, 导致 SP-A 表达低于高氧组, 这样有利于 SP-A 的储备。随着高氧暴露时间延续至 7d、14d, 高氧肺组织内 SP-A 表达强度较空气组均明显下降, 而治疗组在这两个时间点都可有效提高 SP-A 的表达, 提示 BUD 可以加强 SP-A 表达, 从而减轻炎症反应和肺损伤, 对新生大鼠的高氧性肺损伤有一定保护作用, 但临床应用还需进一步积累资料和研究。

结 论

通过上述研究结果，我们可得出以下结论：

1. 高浓度氧对新生大鼠肺组织有损伤作用，并随吸氧时间的延长而加重。主要病理变化为肺组织局部充血和出血、炎症渗出、结构组织紊乱、肺泡发育障碍、肺泡数目减少和肺间质纤维化。

2. 在新生大鼠高氧性肺损伤模型中，SP-A 的 m-RNA 和蛋白在肺组织中的表达规律呈现先增高后降低的趋势，随着高氧暴露时间的延长与肺损伤程度相平行，提示高氧肺损伤发生过程中机体具有一定的自我保护机制，而肺表面活性物质相关蛋白分泌减少或功能缺陷，是高氧肺损伤的重要因素。

3. 吸入糖皮质激素布地奈德可能通过抗氧化、减轻炎症反应的作用，进而上调 SP-A 的 m-RNA 和蛋白的表达与活化，从而减轻肺损伤，对高氧肺损伤的发生具有一定保护作用。

参考文献

- [1] Lavoie PM, Dub é MP. Genetics of bronchopulmonary dysplasia in the age of genomics [J] . Cur Opin Pediatr, 2010, 22(2): 134-138.
- [2] Bhandari A, Bhandari V. Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia [J] . Pediatrics, 2009, 123(6): 1562-1573.
- [3] Jason G, Kinsella JP. Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia [J] . Cur Opin Pediatr, 2011, 23 (3): 305-313.
- [4] 乔萍, 严越秀, 莫伟雄, 等. 肺表面活性物质防治支气管肺发育不良的临床研究 [J] . 热带医学杂志, 2006, 16(4): 436-437.
- [5] Rouch EW. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense [J] . Ann Rev Physiol, 2001, 63:521-554.
- [6] Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, et al. Pulmonary Surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury [J] . J Bio Chem, 2000, 275(49):38848-38855.
- [7] Kegami T, Tsuda A, Karube A, et al. Effects of intrauterine IL-6 and IL-8 on the expression of surfactant apoprotein mRNAs in the fetal rat lung [J] . Eur J Obst Gyne Reprod Bio, 2000, 93(1):97-103.
- [8] Watterberg KL, American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn. Policy statement-postnatal corticosteroids to prevent or treat bronchopulmonary dysplasia [J] . Pediatrics, 2010, 126(4): 800-808.
- [9] 常立文.新生儿慢性肺部疾病的诊治和预防 [J] .中国实用儿科杂志, 2003, 18(11): 641-642.
- [10] Grier DG, Hallidy HL. Corticosteroids in the prevention and management of bronchopulmonary dysplasia [J] . Sem Neonat , 2003 ,8 (1) : 83-91.
- [11] Committee on Fetus and Newborn. Postnatal corticosteroids to treat or prevent chronic lung disease in preterm infants [J] . APP Policy, 2002, 109(2):330- 338.
- [12] Shah SS, Ohlsson A, Halliday H, et al. Inhaled versus systemic corticosteroids for preventing chronic lung disease in ventilated very low birth weight preterm neonates

- [J] . Cochrane Database Systematic Rev, 2003, (1):CD002058.
- [13] Frank L . Protective effect of Kerationocyte Growth Factor against Lung Abnormalities Associated with Hyperoxia in Prematurely Born Rats[J]. Bio Neonate, 2003, 83(4):263-272.
- [14] GongPH, GaoZC, Hu P, et al. Investigation of the measurement of routine airway hyperresponsiveness and the therapeutic effects of budesonide on ovalbumin sensitized and challenged mice[J].Chin Med J (Engl), 2005, 118(23):1959-1964.
- [15] Chess PR, Dangio CT, Pryhuber GS, et al. Pathogenesis of brochopulmonary dysplasia [J].Semin Perinatol, 2006, 30(4):171-178.
- [16] Burri PH.Structural aspects of postnatal lung development-alveolar formation and growth [J].Bio Neonate, 2006, 89(4):313-322.
- [17] Wallen LD, Han VK. Spatial and temporal distribution of insulin-like growth factors I and II during development of rats lung [J]. Am J Physiol, 1994, 267(5):531-542.
- [18] McGrathMorrow SA, Stahl J.Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia [J].Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25:150-155.
- [19] 陈华, 李春海, 贺苏兰, 等. SPF清洁级普通大鼠部分生物学特性比较[J]. 实验动物科学与管理, 1998, 15(3): 57.
- [20] Yokoyama T, Tomiguchi S, Nishi J, et al. Hyperoxia-induced acute lung injury using a pig model: correlation between MR imaging and histologic results[J]. Radiat Med, 2001, 19(3):131-143.
- [21] Ramsay PL, Piedboeuf B, Gamache M, et al. Dexamethasone enhances P-selection mRNA expression in hyperoxic rat lungs [J]. Inflamm Res, 2000, 49(12):655-865.
- [22] Cherft A, Marrakehi Z, Chaouachi S, et al. Brenehopulmonary dysplasia and cotricosteroid therapy[J]. Arch Pediatr, 2002, 9(2):159-168.
- [23] Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia[J]. Semin Neonatal, 2003, 8(1):73-81.
- [24] Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D : structure function and receptors [J]. Mol Imm, 2006,43(9):1293-1315.
- [25] 胡明耀,张亚霏.小牛肺表面活性物质的提取及化学成分理化特性的测定[J].第二军医大学学报, 1986, 7(5):327- 331.

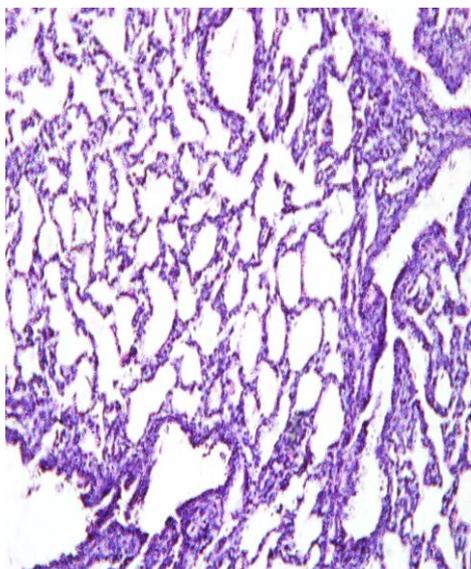
- [26] McCormack FX, Whitsett JA. The Pulmonary Collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung[J]. *J Clin Inv*, 2002, 109(6):707-712.
- [27] Zuo YY, Tadayyon SM, Keating E, et al. Atomic force microscopy studies of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films, II: albumin-inhibited pulmonary surfactant films and the effect of SP-A[J]. *Bio J*, 2008, 95(6): 2779-2791.
- [28] Strayer DS, Yang S, Jerry HH. Surfactant protein A-binding proteins: characterization and structures[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(25):18679-18684.
- [29] Haagsman HP, Hogenkamp A, Eijk M, et al. Surfactant collectins and innate immunity [J]. *Neonatology*, 2008, 93(4): 288-294.
- [30] Pasula R, Wright JR, Kachel DL, et al. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Inv*, 1999, 103(4): 483-490.
- [31] Mukherjee S, Giamberardino C, Thomas J, et al. Surfactant protein A integrates activation signal strength to differentially modulate T cell proliferation[J]. *Immunology*, 2012, 188(3):957-967.
- [32] Hallman M, Merritt TA, Akino T, et al. Surfactant protein A, phosphatidylcholine, and surfactant inhibitors in epithelial lining fluid correlation with surface activity, severity of respiratory distress syndrome and outcome in small premature infants [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144(6):1376-1384.
- [33] 孔祥永,杜江,封志纯. 肺表面活性物质相关蛋白 A 在人胎肺发育中的表达及意义 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2005, 13(6):472-474.
- [34] 孔令凯,章晟,封志纯.支气管肺发育不良的研究进展[J].*实用儿科临床杂志*, 2012, 27(14):1122-1126.
- [35] Visser YP, Walther FJ, Houari EI, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition attenuates persistent heart and lung injury by neonatal hyperoxia in rats [J]. *AJP-Lung Physiol*, 2012, 302(1):L56-L67.
- [36] Jobe AH. The new bronchopulmonary dysplasia[J].*Curr Opin Pediatr*, 2011, 23(2): 167-172.
- [37] 朱光发. 肺表面活性物质相关蛋白A与肺疾病[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 1998, 18(3): 150-153.
- [38] Greene KE, Ke S, Mason RJ, et al. Surum surfactant protein-A levels predict

- development of ARDS in at-risk patients [J] . Chest, 1999,116 (1s): 90s-91s .
- [39] Bae YM, Bae CW, Oh MH, et al. Effect of exogenous surfactant therapy on levels of pulmonary surfactant proteins A and D in preterm infants with respiratory distress syndrome [J]. J Peri Med, 2009, 37(5), 561-564.
- [40] 刘冬云, 吴静, 张小英. 支气管肺发育不良新生儿支气管肺泡灌洗液IL-8, SP-A和 TGF- β 1 的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(6),444-446.
- [41] Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, et al. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(2):389-397.
- [42] Mason RJ, Williams MC, Moses HL, et al. Stem cells in lung development, disease and therapy[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 16(4):355-363.
- [43] Collard KJ, Godec kS, Holley JE, et al. Pulmonary antioxidant concentrations and oxidatite damage in ventilated premature babies [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004, 89(5):F412-F416.
- [44] Wang X, Wang Y, Kim HP, et al. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygenspecies formation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(3):1718-1726.
- [45] James MB, Angela MP, Steven EW, et al. Critical roles of inflammation and apoptosis in improved survival in a model of hyperoxia-induced acute lung injury in pneumocystis murina-infected mice[J]. Inf Imm, 2009, 77(3): 1053 -1060.
- [46] Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant [J]. FASEBJ, 1994, 8(12): 957-967.
- [47] Ryan RM, Amhed Q, Lakshminrusimha S, et al. Inflammatory mediators in the immunobiology of bronchopulmonary dysplasia [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2008, 34:174-190.
- [48] Wright JR, Dobbs LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance [J]. Ann Rev Physiol, 1991, 53:395-414.
- [49] Hvizdos KM, Jarvis B. Budesonide inhalation suspension: a review of its use in infants, children and adults with inflam-matory respiratory disorders [J]. Drugs, 2000, 60(5): 1141-1178.

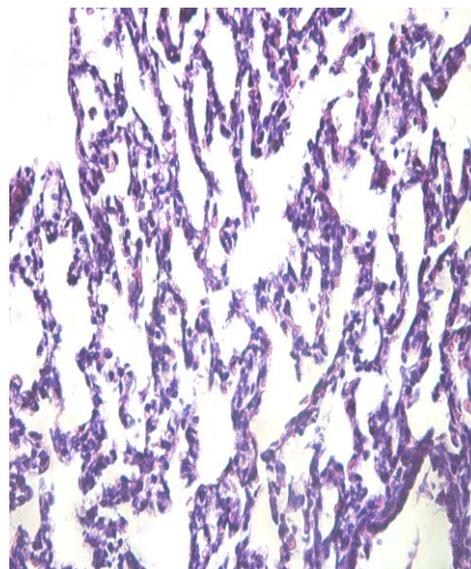
- [50] Chen CM, Fang CL, Chang CH. Surfactant and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2001, 29(11):2169-2175.
- [51] Cole CH, Cotten T, Shah BL, et al. Early inhaled glucocorticoid therapy to prevent bronchopulmonary dysplasia [J]. N Engl J Med, 1999, 340(13):1005-1010.
- [52] Yeh TF, Lin HC, Chang CH, et al. Early Intratracheal Instillation of Budesonide Using Surfactant as a Vehicle to Prevent Chronic Lung Disease in Preterm Infants: A Pilot Study [J]. Pediatrics, 2008, 121(5):1310-1318.
- [53] Maas C, Poets CF, Bassler D. Survey of practices regarding utilization of inhaled steroids in 223 German neonatal units [J]. Neonatology, 2010, 98(4):404-408.

附录

一、肺组织 HE 图片：

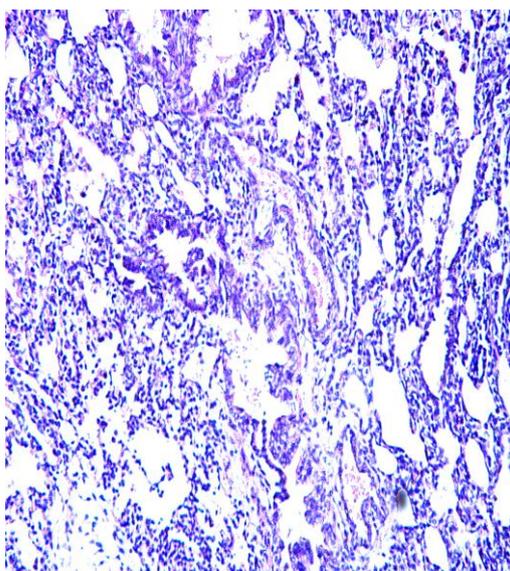


(1) HEx200

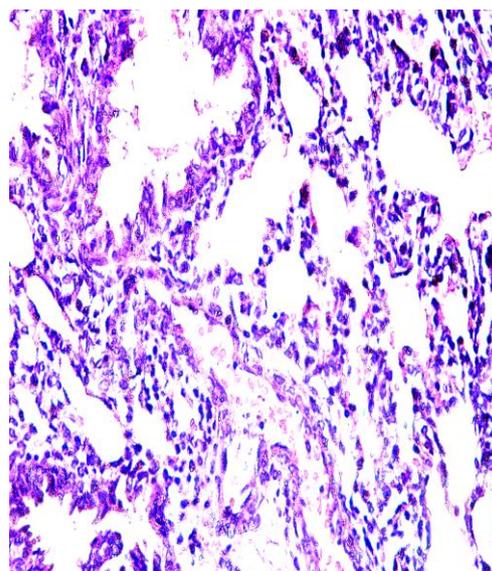


(2) HEx400

(1) (2) 空气组第 3 天肺组织形态：肺组织尚处于囊泡期，终末气腔缩小，数量渐增多，肺泡间隔较厚，肺泡内无炎性细胞渗出，肺泡大小均一。

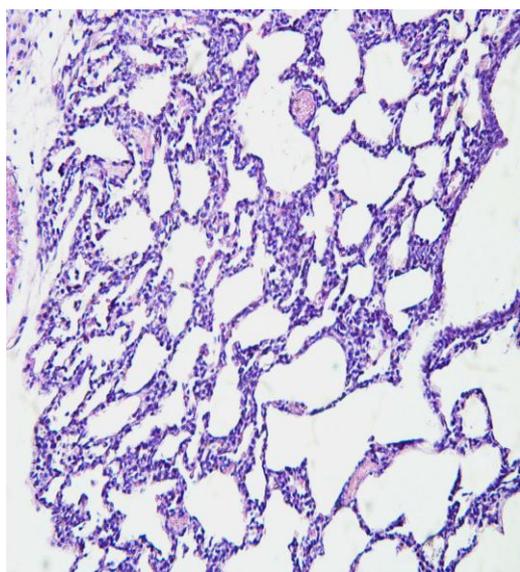


(3) HEx200

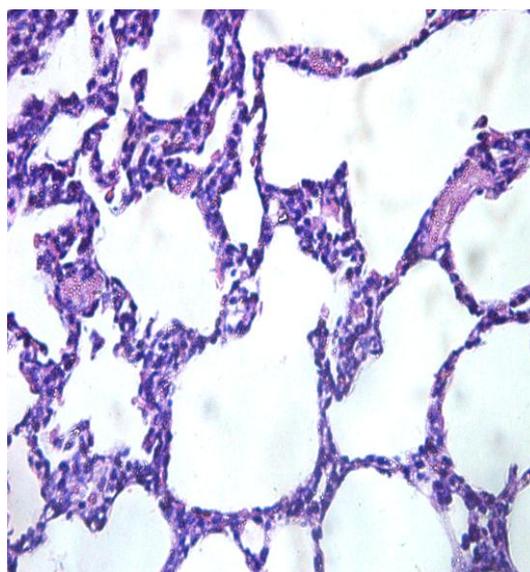


(4) HEx400

(3) (4) 高氧组第 3 天肺组织形态：肺组织水肿，毛细血管扩张、充血，炎症细胞浸润，部分肺泡腔可见红细胞，肺间隔断裂，肺泡腔扩大。

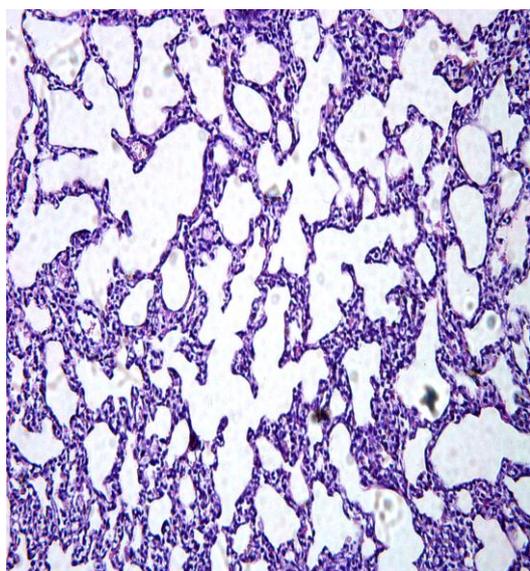


(5) HEx200

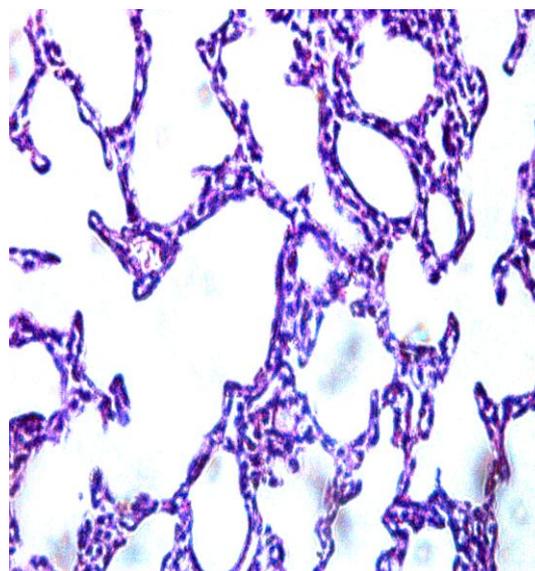


(6) HEx400

(5) (6) 治疗组第 3 天肺组织形态：肺泡间隔完整，肺间隔无局部仍可见部分水肿、充血，炎性渗出较高氧组有所减轻。

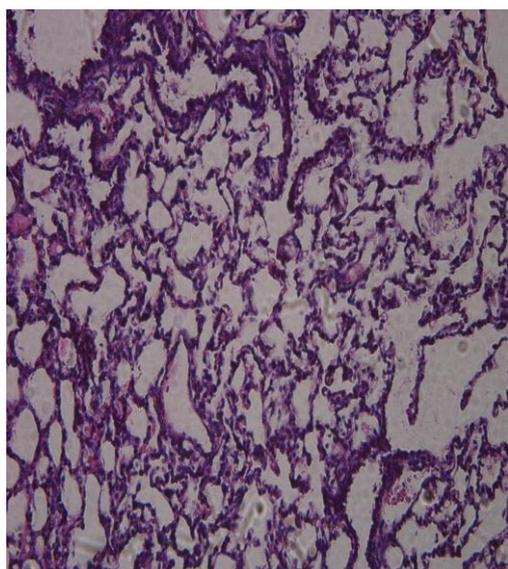


(7) HEx200

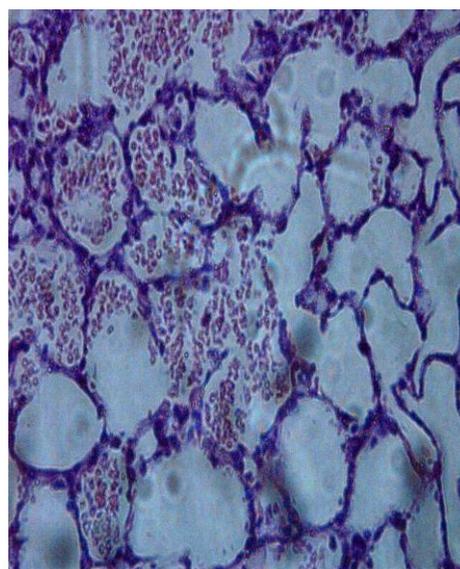


(8) HEx400

(7) (8) 空气组第 7 天肺组织形态：出现肺泡化，肺泡数量逐渐增多，形态较规则，大小较均匀，肺泡间隔渐薄。

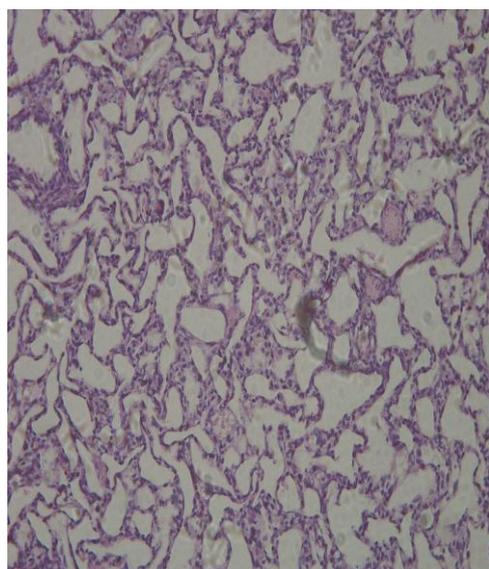


(9) HEx200

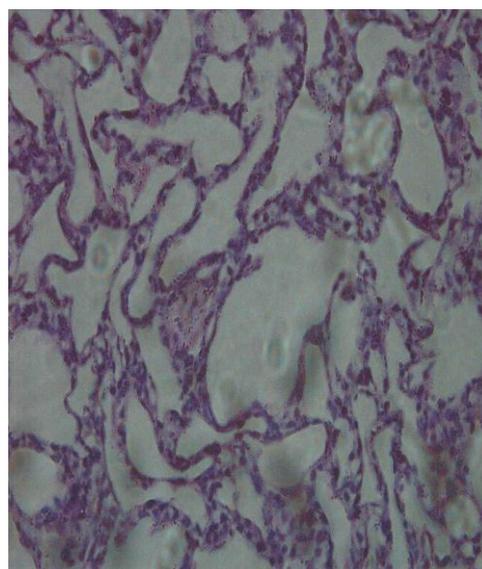


(10) HEx400

(9) (10) 高氧组第 7 天肺组织形态：肺水肿、炎性渗出、肺出血较前更加明显，部分肺间隔增宽变形，肺组织结构紊乱。

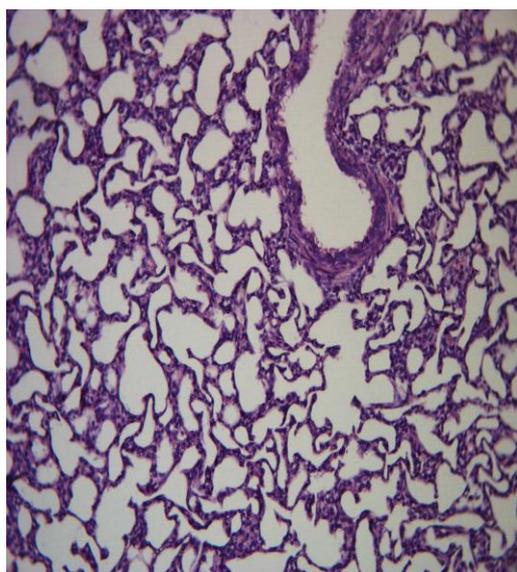


(11) HEx200

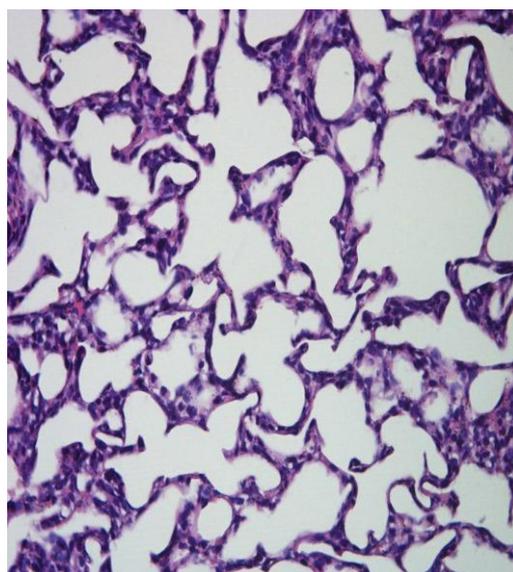


(12) HEx400

(11) (12) 治疗组第 7 天肺组织形态：肺组织结构较正常，但是仍可见肺泡间隔水肿增宽，可见炎症细胞、和少量红细胞，但改变较高氧组有所改善。

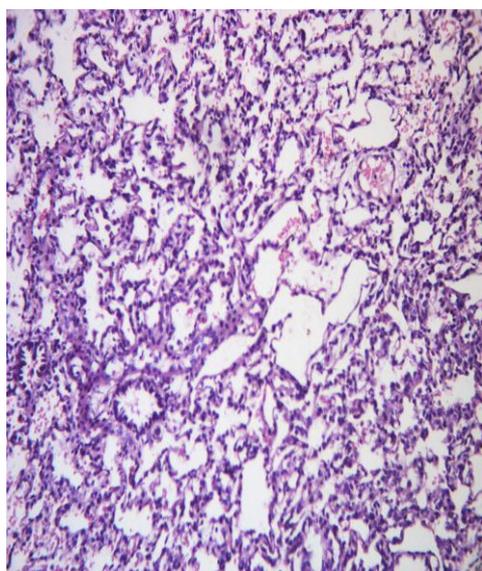


(13) HEx200

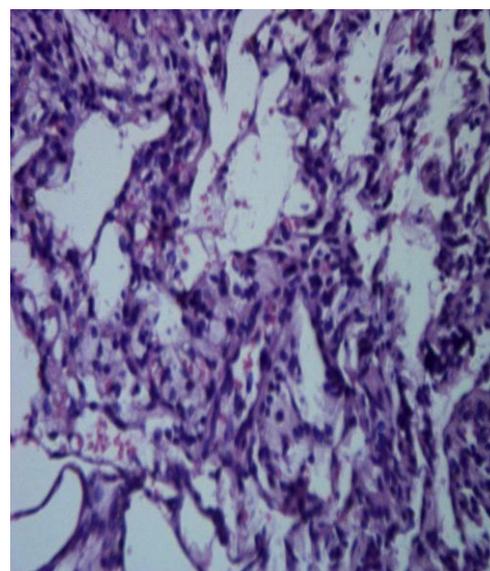


(14) HEx400

(13) (14) 空气组第 14 天肺组织形态：肺泡化成熟，肺泡大小均匀，肺泡间隔明显变薄。肺泡充气良好，无渗出。

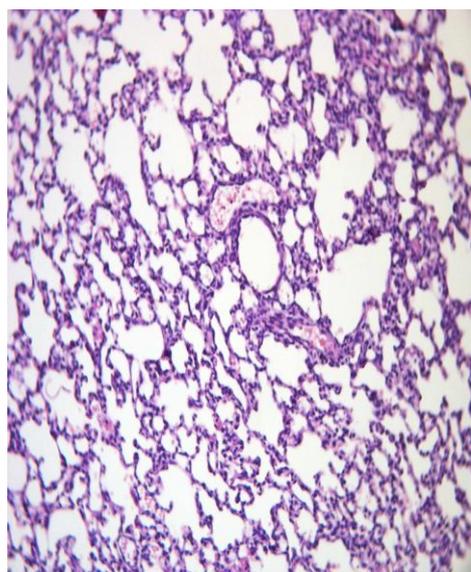


(15) HEx200

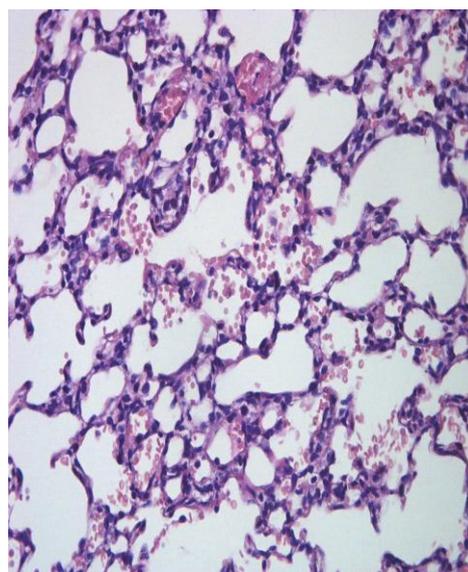


(16) HEx400

(15) (16) 高氧组第 14 天肺组织形态：肺组织结构紊乱，肺泡大小不一，可见肺大泡，肺泡间隔重度增厚、纤维化，肺泡腔内有出血，部分还可见炎症细胞浸润。



(17) HEx200



(18) HEx400

(17) (18) 治疗组第 14 天肺组织形态: 肺泡形态较规则, 肺泡间隔稍厚, 仍可见肺出血及炎性细胞浸润, 但改变较高氧组有所改善。

综述：肺表面活性物质相关蛋白 A 与早产儿肺疾病的相关性研究

苏州大学附属儿童医院 何蓉综述 肖志辉指导

【摘要】 肺表面活性物质相关蛋白 A (pulmonary surfactant protein-A, SP-A) 是肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 的重要组成成分之一, 它在调节 PS 的新陈代谢、维持呼吸系统的内环境稳定和增强机体的先天性及适应性免疫防御中发挥关键性作用。低水平的 SP-A 表达与许多早产儿肺疾病如新生儿呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome, RDS)、肺部感染和支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 密切相关, 研究如何提高早产儿的肺组织中的 SP-A 水平将是一个很有希望的新靶点, 在临床研究早产儿肺疾病诊断和治疗中的应用中提供更为广泛的前景。

【关键词】 早产儿、肺表面活性物质相关蛋白、免疫应答、新生儿呼吸窘迫综合征、支气管肺发育不良

呼吸系统是炎症发生发展的高危区。呼吸系统通过不断吸入病原体、颗粒物、污染物和过敏原, 其承受着持续不断的免疫应激反应压力。由具有清除功能的粘液纤毛、屏障功能的肺上皮细胞、抗氧化能力的肺泡表面黏液层、树突状细胞 (dendritic cells, DC) 和巨噬细胞组成的防御机制属于先天免疫系统, 和由淋巴细胞为主的适应性免疫系统共同增强呼吸系统的防御能力。先天和适应性免疫系统可保护呼吸系统避免感染和炎症介导的损伤。然而, 新生儿特别是早产儿免疫系统发育不完善, 这导致机体对感染性刺激发生不完整或异常的免疫反应, 可影响以后整个生命过程的免疫反应能力^[1]。

肺表面活性物质 (PS) 是覆盖于肺泡上皮内侧的脂质-蛋白-糖类混合物, 由肺泡 II 型上皮细胞 (type II alveolar epithelial cell, AEC II) 合成和分泌。它能降低肺泡的液-气界面表面张力, 防止肺泡在呼气阶段时塌陷, 对维持肺的正常功能至关重要^[2]。

外源性表面活性剂替代治疗可改善新生儿呼吸窘迫综合征 (RDS)、显著降低急性肺损伤的发病率和新生儿尤其是早产儿的死亡率, 是全世界医疗史的一个重要里程碑^[3]。最近研究表明, RDS 的发生和严重程度除了主要与肺发育不成熟有关外, 还与产前胎儿肺或全身性炎症反应有关。事实上, 宫内炎症可以影响胎儿肺部, 导致对 PS 治疗效果欠佳^[4]。此外, 一系列的产前和产后的早期危险因素: 如肺发育不成熟、氧中毒、机械通气和感染, 可提高呼吸衰竭发生率、延长甚至放大炎症反应^[5]。PS 在肺的先天和适应性免疫系统中发挥着至关重要的作用。PS 中 90% 为磷脂, 8% 是与脂质特异性结合的蛋白质即肺表面活性物质相关蛋白 (surfactant protein, SP), 约 2% 是糖类。SP 包括 SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D, 其中 SP-A 约占总量的 50%, 为最先发现且强烈表达信号最丰富的蛋白, 在调节肺的免疫防御和炎症反应过程中发挥关键作用^[6]。因此有关 SP-A 在不同新生儿疾病如感染、RDS 和 BPD 中作用的研究已越来越受到重视。

一、SP-A 的结构和遗传背景

PS 是 ACE II 合成和分泌的一个复杂的脂蛋白复合物, 约 90% 为脂质, 其中磷脂 (90%)—主要活性成分为二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)—和胆固醇 (10%)。SP 约占总量的 8%, 其中 SP-A、SP-D 是亲水性蛋白, SP-B、SP-C 是疏水性蛋白^[6]。SP-A 主要由 AEC II 表达, 也可以通过呼吸道细胞合成包括克拉拉细胞 (Clara cells) 和粘膜下层细胞表达。SP-A 单位由 248 个氨基酸组成, 分子量范围 28~36kDa, 是可溶性的 C-型凝集素的蛋白质, 为胶原凝集家族的一员^[7]。SP-A 的化学结构主要由富含半胱氨酸的 N 端、重复表达的 Gly-X-Y 的胶原样区、螺旋状的颈区及 Ca²⁺ 依赖的 C 型糖基识别区 (carbohydrate recognition domain, CRD) 4 个部分组成。其四级结构变化较大, 一般多以三聚体形式存在, 各亚基在茎部相互平行排列, 花冠部相互对称, 形成“郁金香束”排列。

在人类, 编码 SP-A 的基因位于 10 号染色体长臂, 由两个功能基因 SP-A1、SP-A2 与 1 个假基因组成。SP-A1 和 SP-A2 在核苷酸的序列上有 94% 的同源性, 而在氨基酸的序列上的同源性高达 96%, 这种高度的同源性避免了在原位中出现差异性分析^[8]。但是 SP-A1 和 SP-A2 基因序列的 5' 端有大量的非翻译外显子, 这些外显子可连接成不同的构型, 生成大量可供选择的功能变体。

二、SP-A 的生理作用

SP-A 参与 PS 的形成和代谢, 可稳定细胞内外 PS 水平, 同时发挥调理素作用, 参与局部防御、调节免疫和炎性反应, 具有维护肺泡结构和功能的作用。

1. 调节 PS 的代谢和稳定

SP-A 既是 ACE II 的分泌物又是 AEC II 细胞功能的调节物, 是一个自分泌细胞因子, 其可通过负反馈作用调节 SP-A, SP-B 和 SP-C 基因的转录, 其可通过与 Ca^{2+} 结合而发生变构, 协同 SP-B 和 SP-C 促进 PS 板层状小体转化为管髓体^[9]。SP-A 在管髓体中有优先定位作用, 因此, 对管鞘(PS 的一种细胞外形态) 的形成至关重要。研究表明, SP-A 发挥 PS 降低表面张力的作用, 在 PS 的其他成分不在最适浓度时尤为重要。当与 PS 相结合时, SP-A 能显著加强吸附, 并增加 PS 单分子层中的 DPPC 含量, 促进 PS 的表面活性动态变化, 由单层向多层转变^[10]。在体外实验中, 将 SP-A 加入含 SP-B 的二棕榈酰卵磷脂和磷脂酰甘油混合物中, 可见类似管髓体结构形成。去除 SP-A 或 SP-B, 均不能形成此结构, 表明 SP-A 和 SP-B 是管髓体形成的必须成分。SP-A 可限制血浆蛋白进入肺泡腔, 避免血浆抑制因子对 PS 的降解, 保证其生理功能的发挥。因此, SP-A 在一定程度上维持了 AEC II 内的 PS 水平, 从而起到了重要的自身调节作用。

2. SP-A 在先天性免疫应答中的作用

呼吸系统时刻处于炎症、感染、氧化应激等危险内环境因素之下, 但由于呼吸道缺乏甘露聚糖结合蛋白和补体系统, 最初的宿主防御功能主要通过 SP-A 及 SP-D 共同介导。SP-A 是凝集素家族中 C 型凝集素中的一员, 参与机体的免疫防御功能。在先天免疫反应中, SP-A 作为广谱调理素, 通过结合细菌和病毒等病原体表面特异的碳水化合物, 如革兰阴性菌的内毒素(脂多糖, LPS) 或革兰阳性菌脂磷壁酸和肽多糖, 实现增强肺泡巨噬细胞和中性粒细胞的趋化性及吞噬能力, 抑制多种细胞因子和炎症介质的合成与释放, 并以此调控肺泡水平的免疫反应^[11]。SP-A 能够协同 IgG 直接激活细胞的配体, 并增强 IgG 介导的中性粒细胞和巨噬细胞的细胞吞噬功能^[12]。SP-A 也上调肺泡巨噬细胞表面的细胞受体如清道夫受体和甘露糖受体, 增强这些细胞的吞噬性能。SP-A 可增强早产胎儿犊肺 DC 细胞的吞噬活性, 诱导或抑制炎症分子的产生, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。这些明显对比的效果取决于 SP-A 与受体的相互作用, 即存在或不存在的外源性病原体^[13]。SP-A 可阻止脆弱的肺泡上皮细

胞 C1q 介导的补体活化和炎症反应,并直接绑定到代表先天免疫的关键组成部分 Toll-样受体(TLRs),特别是 TLR 2 和 TLR4。此外,SP-A 抑制正常肺中分离出的肺泡巨噬细胞中脂多糖刺激后 NO 的产量,但能增加免疫反应性纤维结合素激活的巨噬细胞中 NO 的产量。因此,SP-A 可以调理巨噬细胞的功能,促进其趋化活性,增强其吞噬作用,并刺激其产生氧自由基^[14]。SP-A 通过调理素作用清除凋亡细胞及 DNA 也有助于调节炎症反应。有实验发现 SP-A 缺失的鼠肺的呼吸功能没有明显异常,但其易于感染 B 族链球菌、铜绿假单胞菌、呼吸道合胞病毒和肺支原体,对尿素支原体的炎症反应延长^[15]。

3.SP-A 在适应性免疫应答中的作用

SP-A 通过影响淋巴细胞的功能进而调节和加强适应性免疫功能。SP-A 从旁路途径通路抑制 T 淋巴细胞的增殖,降低 IL-2 的产生和淋巴细胞活性。研究表明,根据不同强度的激活信号,SP-A 可调节不同的 T 细胞活性。在高信号强度时抑制 T 细胞激活,而在弱信号强度时增强他们的活化和增殖^[16]。近期研究提示,SP-A 介导的抑制 T 细胞增殖可能与转化生长因子在 SP-A 合成时出现有关^[17]。此外,在肺部变应性炎症时,SP-A 影响 T 淋巴细胞的传播、类型和功能,当 T 淋巴细胞缺乏时变态反应性炎症将加重甚至发展至过敏性疾病如哮喘。这些数据表明,通过与 SP-A 的结合,低反应状态的肺泡淋巴细胞保护肺实质避免炎症引起的损伤^[18]。事实上,SP-A 通过调节肺泡中 T 淋巴细胞的激活阈值从而影响适应性免疫应答反应和 DC 功能,能够建立直接或间接的与病原体、过敏原、细胞因子如转化生长因子- β (TGF- β) 和参与调节促炎症反应阶段的分子如脂多糖相互作用。SP-A 是通过结合 TGF- β 进而调节炎症反应和气道重塑的过程。事实上,SP-A 直接绑定无活性的 TGF- β ,它们水平之间的相关性和 TGF- β 抑制 CD4+T 淋巴细胞增殖的能力有关。研究提示,在非感染状态下,无活性的 TGF- β 与 SP-A 绑定,而当发生肺损伤时,TGF- β 脱离 SP-A 发挥作用。激活的 TGF- β 抑制炎症级联反应,开始重塑结缔组织^[17]。由于 SP-A 有影响先天和适应性免疫应答的成员的成员的能力,从而证实了,SP-A 是肺的器官特异性免疫调节的至关重要的调节器。

三、SP-A 在早产儿肺疾病中的作用

1. SP-A 与肺部感染

在体外和体内研究均表明 SP-A 在 PS 的新陈代谢和防御病原体的第一条防线中

发挥了关键作用。因此，免疫系统和 PS 体系尚未发育成熟的早产儿可能出现相应的临床并发症，例如，比其他足月新生儿更高的肺部及全身感染率^[19]。在新生儿期早发性败血症的一个主要病因就是大量广谱的细菌、病毒和真菌感染。早发性败血症在足月新生儿期最常见的病原体是 B 组链球菌（43%），其次是大肠杆菌（29%），而在极低出生体重儿大肠杆菌败血症的发病率则高于 B 组链球菌败血症的^[20]。最近的研究证实 SP-A 缺陷的小鼠对 B 组链球菌感染高度敏感，提示 SP-A 通过增强细胞吞噬功能从而在加强 B 组链球菌的肺部清除和抑制全身播散中发挥重要作用^[21]。LPS 是大多数革兰氏阴性细菌（如大肠杆菌）外面的一个重要的组成部分，它是由磷脂 A、一个核心寡糖和高度可变的 O-抗原多聚糖组成。除了其结构功能，LPS 是针对病原体的炎症反应的一个关键调节器^[21]。SP-A 可绑定 LPS 的磷脂 A 进而纯化 LPS，进而加强肺泡巨噬细胞对大肠杆菌的 LPS 的结合和脱酰基作用，以及通过与 CD14 的直接相互作用影响用特定类型的 LPS 细胞反应^[23]。SP-A 可直接绑定 TLR 2 和 TLR4，它们是调节 LPS 诱导炎症过程的先天免疫的关键组成部分。如果气管内滴入 LPS，SP-A 基因缺失的小鼠的肺泡灌洗液比野生型小鼠表现出更高的 TNF- α 和 NO 代谢产物水平，而气管内滴入外源性 SP-A 可以恢复 TNF- α 和 NO 的水平^[24]。

此外，在体外和体内感染模型中都证实了 SP-A 在预防和治疗肺部病毒感染中发挥了重要作用。不同于细菌，病毒必须感染宿主的细胞才能复制繁殖。作为胶原凝集素的 SP-A 存在于肺泡上皮细胞上的黏液层，可结合病毒进而保护肺泡免于病毒感染，这类病毒包括包膜病毒，如艾滋病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒，流感病毒或无包膜病毒，如腺病毒^[25]。所以非常不成熟的早产儿在生后几个月中往往因为呼吸道合胞病毒性肺炎需再次入院治疗^[26]。SP-A 基因缺失的小鼠比野生型小鼠更易感染呼吸道合胞病毒，且感染后炎症反应也较重。若 SP-A 基因缺失的小鼠在呼吸道合胞病毒感染的同时给予外源性 SP-A 可降低其肺内病毒抗体的滴度和炎症细胞。

真菌通过呼吸道可以进入到宿主体内，在正常情况下，肺部真菌感染非常罕见，这表明机体一定存在非常有效的针对真菌的防御机制，其中 SP-A 发挥着重要作用。SP-A 可干扰真菌和酵母，阻碍真菌感染，如白色念珠菌，曲霉菌，新型隐球菌，卡氏肺囊虫和酿酒酵母菌。这一机制包括：加强抑制真菌生长作用、减少菌丝生长、降低血清受体病原菌的吞噬能力、下调肺泡巨噬细胞的促炎性细胞因子产生和增强病原体的聚集作用^[27]。而在早产儿中，真菌感染也是新生儿败血症的一种常见的病原菌

[28]。研究表明这些患病早产儿的肺泡灌洗液中 SP-A 的水平是明显低于正常足月新生儿的。

2.SP-A 与 RDS

RDS 是新生儿期危重症之一,有较高的发病率,虽然早产是 RDS 最重要的原因,但许多早产儿并不发生 RDS,故 RDS 患儿的基因表达特点已成为 RDS 发病机制的研究热点。研究发现,控制表面活性蛋白合成的基因因素在 RDS 发病中起重要作用^[29]。目前导致 RDS 易感的特殊基因还不完全清楚,最可能的候选基因是编码肺脏所特有的表面活性蛋白基因,特别是编码 SP-A、SP-B 基因,不同的 SP-A 等位基因对 RDS 具有保护性或易感性作用^[30]。对人的胎肺组织研究表明,胎龄 25 周以后,SP-A 开始在 II 型上皮细胞及其前体细胞胞浆内表达,32 周以后开始逐渐增强,生后表达明显增强,SP-A 生前多以储存状态为主,因此,胎龄在 32 周以前,肺表面活性蛋白水平低下,这是<32 周的早产儿易感 RDS 的生理基础^[31]。目前只有少数的研究侧重于早产儿生后最初几天的气道分泌物中 SP-A 浓度的改变,需机械通气的 RDS 患儿相较于因为其他原因需机械通气的新生儿,其气道抽吸物中 SP-A 的浓度明显下降^[32]。相似的情况,未患 RDS 早产儿出生后不久的气道抽吸物中 SP-A 水平比患有 RDS 早产儿高八至九倍^[33]。在早产生后第一周内给予不含 SP-A 的外源性 PS 后,其支气管肺泡灌洗液中 SP-A 的浓度明显增加^[34]。这一发现也被其他研究进一步证实,给予患有 RDS 早产儿外源性 PS 治疗后,其支气管肺泡灌洗液中 SP-A 的浓度立即显著增加。一个可能的重要原因在于给予外源性 PS 后改善了肺的换气功能,刺激 ACE II 分泌富含 SP-A 的内源性 PS。总之,患有 RDS 早产儿肺部 SP-A 浓度较低,在给予外源性 PS 后可刺激内源性 PS 的合成,分泌和回收,进而可提高 SP-A 的水平^[35]。因此,SP-A 可以作为内源性 PS 分泌功能的指标。

3.SP-A 与 BPD

BPD 是早产儿的严重呼吸系统疾病,已经成为新生儿重症监护病房最棘手的问题之一。其发病机制主要是在基因易感性的基础上,宫内和出生后的多重打击如:感染、炎症、氧毒性等,引起促炎抗炎因子的级联反应,对发育不成熟的肺引起损伤,以及损伤后血管化失调和肺组织异常修复^[36]。SP-A 对于炎症反应中的因子有保护作用,事实上,SP-A 通过其抗氧化性质减少慢性炎症、促进清除呼吸道的凋亡细胞并通过存储 TGF- β , 提高正常肺泡在急性肺损伤后修复能力。此外, BPD 的发病可能存

在个体差异,与基因易感性有关,目前研究的重点是这类基因,其生成的蛋白有调节免疫和肺重建等作用。迄今为止,讨论具有以上功能的多态性基因 SP-A 在 BPD 中作用的研究越来越多,但是取得的进展较少。早期的研究表明,BPD 的一个重要的高危因素是极其不成熟的早产儿暴露于院内感染和各种产后因素加剧炎症反应,细菌、真菌和病毒感染均能够恶化 BPD^[37]。根据国外最新资料,中度和重度 BPD 病死率为 25%,引起死亡的主要原因为反复下呼吸道感染(尤其是呼吸道合胞病毒),幸存者第一年再住院率高达 50%,反复下呼吸道感染是再入院的主要原因。最近的一项对那些出生体重小于 1000 克的早产儿的生后一周内气管抽吸物的研究表明:最终死亡或发展为 BPD 的早产儿其气管抽吸物中 SP-A /磷脂酰胆碱值显著低于那些幸存的无 BPD 的早产儿,提示生后早期低水平的 SP-A 可作为一个 BPD 发展的可能危险因素^[38]。另外一项研究也表明,与对照组相比 BPD 患儿的支气管肺泡灌洗液中 SP-A 的水平显著降低^[39]。同时不同的 BPD 动物模型也证实了这种低 SP-A 水平的改变。在动物模型中,其组织病理、微生物培养和败血症的临床症状均提示存在高感染率的狒狒模型中肺泡灌洗液的 SP-A 水平较低^[40]。基于以上研究,可推测由于缺乏 SP-A 的抗菌作用,低表达的 SP-A 蛋白可能会影响患儿的临床过程,即生后前几天的肺泡灌洗液中 SP-A 水平较低的早产儿可能更易发生感染或 BPD。总之,SP-A 影响肺的免疫功能,在 BPD 的发展中也可发挥重要作用^[41]。

四、前景与展望

目前,国内外研究均表明 SP-A 是一个有着复杂调控的分子,对于肺部疾病的发生发展结构及功能是非常重要的,既能保证对侵入肺部病原体的快速有效清除,又可避免过度炎症反应造成组织损伤,即平衡局部的免疫稳态,尤其是在早产儿肺疾病的发生发展中起着重要作用。因此,研究如何提高早产儿的肺内的 SP-A 水平将是一个很有希望的新靶点,在临床研究早产儿肺疾病诊断和治疗中的应用提供更为广泛的前景。

参考文献

- [1] Strunk T, Currie A, Richmond P, et al. Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011, 24(1), 25-31.
- [2] Halliday HL. Surfactants: past, present and future [J]. *J Perinatol*, 2008,28(1):S47-S56.
- [3] Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, et al. European Association of Perinatal Medicine. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants 2010 update [J]. *Neonatology*, 2010, 97(4):402-417.
- [4] Speer CP. Neonatal respiratory distress syndrome: an inflammatory disease? [J]. *Neonatology*, 2011, 99(4):316-319.
- [5] Speer CP. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Neonatology*, 2009, 95(4): 353-361.
- [6] Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D : structure function and receptors [J].*Mol Immunol*, 2006,43(9):1293-1315.
- [7] 胡明耀,张亚霏.小牛肺表面活性物质的提取及化学成分理化特性的测定[J].*第二军医大学学报*,1986,7(5):327- 331.
- [8] McCormick SM, Boggaram V, Mendelson CR.Characterization of mRNA transcripts and organization of human SP- A1 and SP-A2 genes[J].*Am J Physiol*, 1994, 266(4):354- 366.
- [9] McCormack FX, Whitsett JA. The Pulmonary Collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(6):707-712.
- [10] Zuo YY, Tadayyon SM, Keating E, et al. Atomic force microscopy studies of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films, II: albumin-inhibited pulmonary surfactant films and the effect of SP-A[J]. *Bio J*, 2008, 95(6): 2779-2791.
- [11] Haagsman HP, Hogenkamp A, Eijk M, et al. Surfactant collectins and innate immunity [J]. *Neonatology*, 2008, 93(4): 288-294.
- [12] Tenner AJ, Robinson SL, Borchelt J, et al. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and

- CR1-mediated phagocytosis[J]. *J Bio Chem*, 1989, 264(23):13923-13928.
- [13] Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, et al. By binding SIRP alpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation[J]. *CELL*, 2003, 115(1): 13-23.
- [14] Pasula R, Wright JR, Kachel DL, et al. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Inv*, 1999, 103(4):483-490.
- [15] Famuyide ME, Hasday JD, Carter HC, et al. Surfactant protein-A limits *Ureaplasma*-mediated lung inflammation in a murine pneumonia model[J]. *Pediatr Res*, 2009, 66(2):162-167.
- [16] Mukherjee S, Giamberardino C, Thomas J, et al. Surfactant protein A integrates activation signal strength to differentially modulate T cell proliferation[J]. *Immunol*, 2012, 188(3):957-967.
- [17] Kunzmann S, Wright JR, Steinhilber W, et al. TGF-beta 1 in SP-A preparations influence immune suppressive properties of SP-A on human CD4+T lymphocytes[J]. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(4):L747-L756.
- [18] Pastva AM, Mukherjee S, Giamberardino C, et al. Lung effector memory and activated CD4+T cells display enhanced proliferation in surfactant protein A-deficient mice during allergen-mediated inflammation[J]. *Immunol*, 2011, 186(5):2842-2849.
- [19] Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants[J]. *N Eng J Med*, 2002, 347(4):240-247.
- [20] Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B *Streptococcal* and *E. coli* disease continues[J]. *Pediatrics*, 2011, 127(5): 817-826.
- [21] LeVine AM, Kurak KE, Wright JR et al. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice[J]. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*, 1999, 20(2), 279-286.
- [22] Kramer BW. Chorioamnionitis - new ideas from experimental models[J]. *Neonatology*, 2011, 99(4):320-325.
- [23] Sano H, Sohma H, Muta T, et al. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with

- CD14[J]. *Immunol*, 1999, 163(1):387-395.
- [24] Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, et al. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo [J]. *Am J Physiol:Lung Cell Mol Physiol*, 2000,278(4):L840-L847.
- [25] Hartshorn KL. Role of surfactant protein A and D (SP-A and SP-D) in human antiviral host defense[J].*Front Biosci (Schol Ed)*2010, 2(1):527-546.
- [26] LeVine AM, Gwozdz J, Stark J, et al. Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(7): 1015-1021.
- [27] Brummer E, Stevens DA. Collectins and fungal pathogens: roles of surfactant proteins and mannose binding lectin in host resistance[J]. *Med Mycol* ,2010,48(1):16-28.
- [28] Manzoni P, Monstert M, Agriesti G, et al. Neonatal fungal infections: the state of the art[J]. *J Chemother*, 2007, 19(Suppl 2):42-45.
- [29] Hallman M, Haataja R. Genetic basis of respiratory distress syndrome [J]. *Front Biosci* , 2007, 12:2670-2682.
- [30] Ramet M, Haataja R, Marttila R, et al. Association between the surfactant protein A(SP-A) gene locus and respiratory distress syndrome in the Finnish population[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(5):1569-1579.
- [31] 孔祥永,杜江,封志纯. 肺表面活性物质相关蛋白 A 在人胎肺发育中的表达及意义 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2005, 13(6):472-474.
- [32] Bae YM, Bae CW, Oh MH, et al. Effect of exogenous surfactant therapy on levels of pulmonary surfactant proteins A and D in preterm infants with respiratory distress syndrome[J]. *J Perinat Med*, 2009, 37(5),561-564.
- [33] Moya FR, Montes HF, Thomas VL, et al. Surfactant protein A and saturated phosphatidylcholine in respiratory distress syndrome[J].*Am J Respir Crit Care Med*, 1994,150(6):1672-1677.
- [34] Beresford MW, Shaw NJ. Bronchoalveolar lavage surfactant protein A, B, and D concentrations in preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome receiving natural and synthetic surfactants[J].*Pediatr Res*, 2003, 53(4):663-670.
- [35] Wright JR, Dobbs LG. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance[J]. *Ann Rev Physiol*, 1991, 53:395-414.
- [36] Jason G , Kinsella JP. Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia [J] .*Curr Opin Pediatr*, 2011, 23(3): 305 - 313.

- [37] Li YH, Tullus K. Microbial infection and inflammation in the development of chronic lung disease of prematurity[J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(7):723-732.
- [38] Hallman M, Merritt TA, Akino T, et al. Surfactant protein A, phosphatidylcholine, and surfactant inhibitors in epithelial lining fluid. Correlation with surface activity, severity of respiratory distress syndrome, and outcome in small premature infants[J]. *Am Rev Resp Dis*, 1991, 144(6):1376-1384.
- [39] 刘冬云, 吴静, 张小英. 支气管肺发育不良新生儿支气管肺泡灌洗液 IL-8, SP-A 和 TGF- β 1 的表达[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(6):444-446.
- [40] Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, et al. Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons [J]. *Amn J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(2):389-397.
- [41] Rova M, Haataja R, Marttila R, et al. Data mining and multiparameter analysis of lung surfactant protein genes in bronchopulmonary dysplasia[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(11), 1095-1104.

英文缩略词表

英文缩略	英文名称	中文名称
PS	pulmonary surfactant	肺表面活性物质
SP-A	pulmonary surfactant protein-A	肺表面活性物质相关蛋白-A
W/D	wet/dry	湿干重比
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	支气管肺泡灌洗液
BUD	budesonide	布地奈德
CLD	chronic lung disease	慢性肺疾病
BPD	bronchopulmonary dysplasia	支气管肺发育不良
AEC II	type II alveolar epithelial cell	II 型肺泡上皮细胞
VLBWI	very low birth weight infants	极低出生体重儿
NICU	neonatal intensive care unit	新生儿重症监护室
RDS	respiratory distress syndrome	新生儿呼吸窘迫综合症
DC	dendritic cells	树突状细胞
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine	二棕榈酰磷脂酰胆碱
CRD	carbohydrate recognition domain	C 型糖基识别区
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TLRs	toll-like receptors	Toll-样受体

攻读硕士学位期间发表的论文

1. 何蓉, 肖志辉 . 早期微量喂养对极低出生体重早产儿营养和并发症的影响。
中华临床医师杂志 (电子版) 已录用.

致 谢

在此，我衷心感谢我的导师肖志辉教授，感谢您三年来在学习、科研和生活中对我的关心鼓励、谆谆教导和支持帮助。在您悉心指导下，不仅使我的专业技能和科研素质得到了长足的进步，同时我也从您身上学到了更多书本上无法学到的品质。您严谨的治学态度、创新的思维、渊博的知识、精湛的医术以及高尚的医德将会永远影响着我！

感谢新生儿科全体老师在临床和科研上对我的理解和帮助！

感谢儿科研究所的朱雪明、金美芳老师和病理科王兴东老师在实验中对我的指导和帮助！

感谢我的家人对我的支持、关怀和鼓励！

感谢我所有的朋友和同学对我的支持和帮助！

何 蓉

2013年 3月