

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002029

重组人 Elafin 对慢性高氧诱导新生小鼠支气管肺发育不良中炎症因子及 NF- κ B 信号通路的影响张凤梅¹, 李可欣¹, 刘旭薇², 陈飞兰¹, 潘永全¹, 韩文莉¹

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨重组人 Elafin 对慢性高氧致新生小鼠支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)中炎症因子和核因子- κ B p65(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白的影响。**方法:**将 30 只 C57BL/6J 新生 24 h 内小鼠随机分成空气组、高氧+L/R 组及高氧+Elafin 组($n=10$)。高氧+L/R 组、高氧+Elafin 组暴露于 85% 氧气中。21 d 时进行基础肺功能测定, 采用 HE 染色观察小鼠肺组织形态学改变, RT-PCR 检测肺组织炎症因子的表达, Western blot 检测 NF- κ B p65 蛋白表达情况。**结果:**与空气组[(7.85 $\pm$ 0.24) g]比较, 高氧+L/R 组小鼠体质量[(5.33 $\pm$ 0.63) g]显著下降($P=0.000$), 肺发育受阻; TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA ($P=0.000$) 和 NF- κ B p65 蛋白($P=0.001$)表达增加, 抗炎因子 IL-4、IL-13 mRNA ($P=0.000$)表达降低。与高氧+L/R 组比较, 高氧+Elafin 组小鼠体质量升高($P=0.014$), 肺泡形态趋于正常; TNF- α ($P=0.011$)、IL-1 β ($P=0.000$) mRNA 和 NF- κ B p65 蛋白($P=0.001$)表达降低, IL-4 ($P=0.047$)、IL-13 ($P=0.000$) mRNA 表达增加。**结论:**Elafin 能有效减轻高氧诱导的小鼠肺损伤, 其作用机制可能与抑制 NF- κ B 活化及炎症因子释放密切相关。

【关键词】支气管肺发育不良; 炎症因子; 核转录因子- κ B; 重组人 Elafin; 肺功能

【中图分类号】R322.35

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-03

Effects of recombinant human elafin on the expression of inflammatory factors and NF- κ B p65 protein in neonatal mice with bronchopulmonary dysplasia induced by chronic hyperoxiaZhang Fengmei¹, Li Kexin¹, Liu Xuwei², Chen Feilan¹, Pan Yongquan¹, Han Wenli¹

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University; 2. Department of Pediatrics, Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of recombinant human elafin on the expression of inflammatory factors and nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 protein in neonatal mice with bronchopulmonary dysplasia (BPD) induced by chronic hyperoxia. **Methods:** A total of 30 C57BL/6J neonatal mice within postnatal 24 hours were equally and randomly divided into three groups: air group, hyperoxia+Lactated-Ringer (L/R)-treated group (O_2 +L/R group, L/R solution as vehicle), and hyperoxia+elafin-treated group (O_2 +elafin group). The O_2 +L/R group and the O_2 +elafin group were exposed to 85% oxygen, while the air group was exposed to 21% oxygen (room air). At 21 days of treatment, the baseline lung function was determined; HE staining was used to observe the morphological changes of the lung tissue; the mRNA expression of inflammatory factors was determined by real-time polymerase chain reaction and the expression of NF- κ B p65 protein was determined by Western blot. **Results:** Compared with the air group, the O_2 +L/R group had a significantly lower body weight [(7.85 $\pm$ 0.24) g vs. (5.33 $\pm$ 0.63) g, $P=0.000$] and delayed lung development; in addition, the O_2 +L/R group had significantly higher expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA ($P=0.000$), interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA ($P=0.000$), and NF- κ B p65 protein ($P=0.001$), but significantly lower expression of interleukin-4 (IL-4) mRNA ($P=0.000$) and interleukin-13 (IL-13) mRNA ($P=0.000$). Compared with the O_2 +L/R group, the O_2 +elafin group had a significantly higher body weight ($P=0.014$) and relatively normal alveolar morphology; in addition, the O_2 +elafin group had significantly lower expression of TNF- α

mRNA ($P=0.011$), IL-1 β mRNA ($P=0.000$), and NF- κ B p65 protein ($P=0.001$), but significantly higher expression of IL-4 mRNA ($P=0.047$) and IL-13 mRNA ($P=0.000$). **Conclusion:** Elafin can effectively alleviate hyperoxia-induced lung injury in mice. The mechanism of action may be related to the inhibition of NF- κ B activation and the release of inflammatory factors.

【Key words】 bronchopulmonary dysplasia; inflammatory factor; nuclear factor- κ B; recombinant human elafin; lung function

作者介绍: 张凤梅, Email: 1140278695@qq.com,

研究方向: 实验动物管理与研究。

通信作者: 韩文莉, Email: 0904hanwenli@163.com。

基金项目: 重庆市渝中区科技计划项目 (编号: 20170414); 重庆市发

展和改革委员会项目 (编号: 渝发改技[2015]1650); 重庆

市社会民生科技创新专项 (编号: cstc2015shmszx120031)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1612.008.html>

(2019-03-22)

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是一种早产儿常见的慢性呼吸系统疾病,1967年由 Northway^[1]首次提出。BPD 可损害肺功能,还可引起远期生长发育迟缓和智力发育障碍等后遗症,严重威胁着患儿的生命和生活质量^[2-3]。

近年来,随着糖皮质激素和肺表面活性物质的广泛应用、氧疗技术、新生儿管理技术改进和新的通气策略实施,早产儿存活率得以显著提高,但同时 BPD 的发病率呈逐年上升趋势^[4-6]。目前 BPD 的病因及发病机制尚不完全明确,已有的动物实验和临床研究证实,炎症反应在 BPD 的发生发展中起着重要作用^[7-9]。不成熟肺暴露于高氧后,释放大炎症信号,炎性细胞聚集和炎性因子的释放,进而引起肺组织的损伤和发育障碍^[10]。核因子- κ B p65 (nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为关键的转录因子家族,参与多种炎症基因的转录调控,在炎症反应中发挥着重要作用^[11-12]。

Elafin 是内源性弹性蛋白酶抑制剂,可减轻动脉粥样硬化和肺动脉高血压导致的肺损伤^[13-14]。本课题组前期研究发现,气道滴注 Elafin 后,通过抑制高氧诱导的新生小鼠肺中增强的中性粒细胞弹性蛋白酶活性,减轻细胞外基质中弹性纤维的过度沉积,促进肺泡再分化,从而发挥对新生小鼠 BPD 的保护作用^[15]。研究证实,Elafin 可通过抑制 NF- κ B 的活性,减少支气管肺泡灌洗液中的炎症细胞,从而减轻机械通气诱导的急性肺损伤^[16-17]。那么,Elafin 对慢性高氧诱导的 BPD 中的炎症反应有无抑制作用,以及是否通过 NF- κ B 信号通路发挥作用尚未见报道。因此,本研究拟通过将新生小鼠暴露于 85% 高氧建立中建立 BPD 动物模型,探讨 Elafin 对 BPD 中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及抗炎因子白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-13 (interleukin-13, IL-13)和 NF- κ B 信号通路的影响,为阐明新生儿 BPD 的发病机制、寻求有效的防治策略奠定可靠的实验依据和重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

人重组 Elafin(瑞士 Enzo 公司);乳酸钠林格氏液(lactated ringer's solution, L/R;山东威高药业有限公司);多聚甲醛(上海麦克林生化科技有限公司);Trizol (Ambion);BCA 蛋白检测试剂盒(凯基生物制品有限公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究);核蛋白与胞浆蛋白提取试剂

盒(凯基生物制品有限公司);蛋白预染 Maker(Bio-Rad);PVDF 膜(Immobilon®-PSQ);苏木素染色液(珠海贝索生物技术有限公司);伊红染色液(温州市康泰生物科技有限公司);兔抗小鼠 NF- κ B p65 抗体(Cell Signaling Technology);小鼠 IgG kappa 结合蛋白偶联辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, Santa Cruz Biotechnology)。

1.2 仪器与设备

100%医用氧气(重庆朝阳气体有限公司);CY100 型数字测氧仪(杭州立华仪器有限公司);手术器械(上海手术器械);小鼠肺功能仪(FinePoint™ NAM);Western blot 电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);Western blot 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);微量核酸定量仪(美国 Bio-Rad 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物

SPF 级 C57BL/6J 新生小鼠,购于重庆医科大学实验动物中心,动物生产许可证号为 SCXK(渝)2017-0001。本研究通过实验动物福利伦理委员会批准,实验操作于重庆医科大学实验动物中心,动物使用许可证号为 SYXK(渝)2017-0023。

1.4 实验动物的分组和建模

将 30 只 SPF 级生后 24 h 内 C57BL/6J 小鼠随机分为空气组、高氧+L/R 组和高氧+Elafin 组,每组 10 只。高氧+L/R 组、高氧+Elafin 组置于自制密闭氧箱中(40 cm × 30 cm × 25 cm),持续缓慢输入 100%氧气(2 L/min),维持 FIO₂ 在 85%左右(测氧仪监测)。每天更换空气组与高氧组中的母鼠,以免母鼠因为持续吸入高浓度氧气而中毒,使喂养能力下降。在氧箱底部铺垫钠石灰,以吸附 CO₂,维持氧箱内 CO₂ 浓度<0.5%,相对湿度 50%~60%,温度 24 ℃~26 ℃,空气组置于同一室内。每日开箱 1 h,进行称重,添加水和饲料,更换垫料以及对高氧组进行干预。高氧+Elafin 组:首次高氧暴露前 30 min 给予 Elafin 8 ng/μL, 5 μL/g 腹腔注射,随后每日 1 次连续 21 d,高氧+L/R 组及空气组注射等体积 L/R。取第 21 d 新生鼠进行肺功能检测,然后取左肺固定于 4%多聚甲醛,将右肺保存于-80 ℃中。

1.5 小鼠基础肺功能测定

在新生小鼠日龄 21 d 时,每组随机取出 5 只小鼠,采用 FinePoint™ NAM 动物肺功能仪检测小鼠基础肺功能。将清醒、自由活动状态下的小鼠置于全身体积描计箱内,待小鼠稳定后,连续监测 5 min 肺功能各项指标的变化,计算其平均值。

1.6 肺组织形态学分析

将左肺于 4%多聚甲醛固定 24 h 后,经脱水透明和石蜡包埋,切片为 4~5 μm,脱蜡水化后制成苏木精-伊红染色切片,光镜下观察组织病理形态学变化并拍照。

1.6.1 放射状肺泡计数(radial alveolar counts, RAC) 每组选 3 个样本,每个样本任选一张切片,每个切片选取 5 个不重叠视野(200 ×),取肺泡平均数作为每视野下肺泡计数。

1.6.2 平均肺泡截距 在显微镜视野(200 ×)中央画十字交叉线,计算与交叉线相交的所有肺泡间隔数(NS),测出十字线总长度(L),计算每个视野的平均内衬间隔(MLI=L/NS);取

其平均数作为每视野下 MLI, 以表示肺泡平均内径。

1.7 qPCR 检测炎症因子的 mRNA 的表达情况

利用 Trizol 试剂提取肺组织总 RNA, 根据总 RNA 浓度进行逆转录, 以 β -actin 作为内参对照。所用引物序列如下: IL-1 β : 上游引物序列: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3', 下游引物序列: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'; TNF- α : 上游引物序列: 5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3', 下游引物序列: 5'-CGATCACCCTGAAGTTCAGTAG-3'; IL-4: 上游引物序列: 5'-GGTCTCAACCCCGAGCTAGT-3', 下游引物序列: 5'-GCCGATGA TCTCTCTCAAGTGAT-3'; IL-13: 上游引物序列: 5'-TGAGCAACATCACACAAGACC-3', 下游引物序列: 5'-GGCCTTGCGGTACAGAGG-3'; β -actin: 上游引物序列: 5'-CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT-3', 下游引物序列: 5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTA-3'。PCR 反应体系包括 SYBR 5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.25 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 2.5 μ L 无酶水, 总体积 10 μ L。反应条件: 两步法 PCR 扩增, 第一步, 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性; 第二步, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。采用相对定量法测定目的基因 PC 产物和 β -actin PCR 产物的 C_t 值。相对定量公式: $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 100\%$, 其中 $\Delta C_t = C_{t(\text{目的基因})} - C_{t(\beta\text{-actin})}$ 。

1.8 Western blot 测定肺组织胞核 NF- κ B p65 蛋白表达

取肺组织 50 mg, 用核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒提取蛋白。以 BCA 蛋白质定量法检测蛋白质含量, 确定蛋白质上样总量 40 μ g, 取蛋白样品与 1/3 量的 4 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液混合, 煮沸变性 10 min。SDS-PAGE 电泳分离, 100 mV 恒压 100 min 湿转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液封闭 1 h, PBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min。再分别与兔抗小鼠 GAPDH 抗体 (1:1 000)、兔抗小鼠 NF- κ B p65 抗体 (1:1 000) 溶液 3 ml 混合, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, PBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min。然后与 HRP 标记的二抗 (1:3 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次。取增强型 ECL 底物显色试剂盒进行显影, Image Pro-Plug 6.0 图像分析软件测定目的条带的 IOD, 以 GAPDH 为内参照, 以目的条带的 IOD 值与 GAPDH 条带的 IOD 值的比值作为该目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学分析

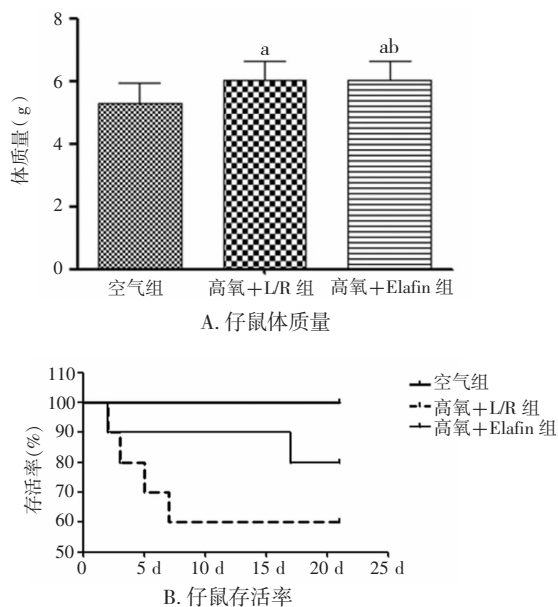
采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间的比较采用单因素方差分析, 其两两比较采用 LSD- t 法, 生存率采用 Fisher's 确切检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同组 21 d 龄小鼠的体质量及死亡率的比较

空气组小鼠状态良好, 小鼠体质量逐渐增加。21 d 时空气组、高氧+L/R 组、高氧+Elafin 组小鼠体质量分别为 (7.85 ± 0.24)、(5.33 ± 0.63)、(6.06 ± 0.63) g, $F=55.657$, $P=0.000$ 。空气组与高氧+L/R 组、高氧+Elafin 组比较, P 值分别为 0.000、0.000。高氧+Elafin 组与高氧+L/R 组相比, 高氧+Elafin 组小

鼠生长状况好转, 21 d 的体质量明显增加 ($P=0.013$)。空气组、高氧+L/R 组和高氧+Elafin 组 21 d 龄小鼠的存活率分别为 100%、60% 和 80%, 3 个组间无显著差异 ($P=0.122$), 如图 1 所示。



注: a, 与空气组比较, $P<0.05$; b: 与高氧+L/R 组比较, $P<0.05$

图 1 Elafin 对新生小鼠体质量及存活率的保护作用

2.2 Elafin 对慢性高氧小鼠肺组织病理形态改变的影响

与空气组比较, 高氧+L/R 组表现为肺泡间隔增厚或断裂, 肺泡腔扩大, 炎性浸润, 肺泡数量明显降低; 与高氧+L/R 组相比, 高氧+Elafin 组肺泡腔减少, 肺泡数量增加, 肺泡结构趋于正常。结果如图 2 所示。高氧+L/R 组 MLI 值较空气组明显增加 ($P=0.000$), RAC 值显著, 而高氧+Elafin 组较高氧+L/R 组显著减少 ($P=0.000$), 见表 1。RAC 值用于衡量肺泡数目多少, 高氧+L/R 组较空气组明显减少, 而高氧+Elafin 组较高氧+L/R 组明显增加 ($P=0.006$), 见表 2。

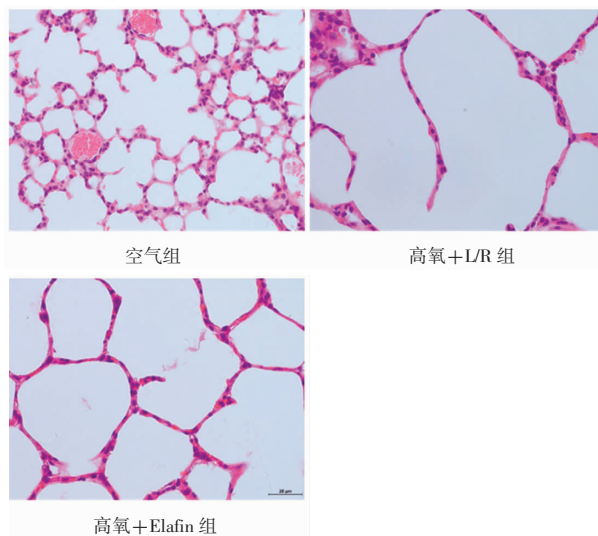


图 2 小鼠肺组织病理形态改变 (HE, 400 $\times$)

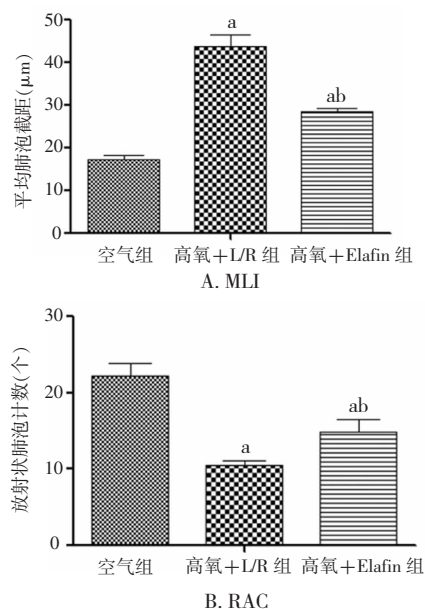


图3 各组小鼠肺组织 MLI 与 RAC 值比较

表1 各组小鼠 21 d 肺组织的 RAC 和 MLI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MLI(μm)	RAC(个)
空气组	17.19 $\pm$ 1.06	22.22 $\pm$ 1.68
高氧+L/R 组	43.69 $\pm$ 2.74 ^a	10.56 $\pm$ 0.51 ^a
高氧+Elafin 组	28.50 $\pm$ 0.69 ^{ab}	15.00 $\pm$ 1.46 ^{ab}
F 值	174.732	60.088
P 值	0.000	0.000

注:a,与空气组比较, $P<0.05$;b:与高氧+L/R 组比较, $P<0.05$

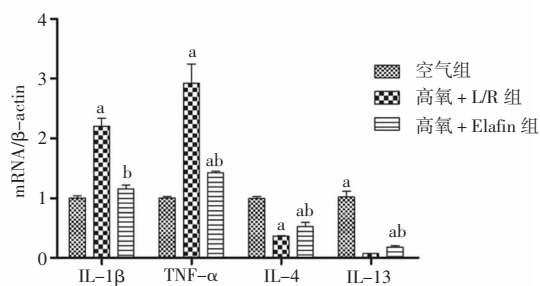
2.3 小鼠的肺功能变化

慢性高氧可导致肺发育障碍,进而影响小鼠的肺功能。呼吸频率(frequency of breathing, F),潮气量(tidal volume, TV),肺通气量(minute volume, MV)和气道阻力(airway resistance, Raw)是基础肺功能的重要指标。与空气组相比,高

氧+L/R 组 F、MV、TV 值均明显下降(P 值依次为 0.003、0.000、0.000)。高氧+Elafin 与空气组相比, F、MV、TV 值均明显下降(P 值依次为 0.008、0.000、0.000)。与空气组相比,高氧+L/R 组的 Raw 值明显增高($P=0.006$),而高氧+Elafin 组的 Raw 明显低于高氧+L/R 组($P=0.027$)。结果表明 Elafin 能有效减小 BPD 小鼠的气道阻力,改善小鼠基础肺功能。

2.4 肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-13 mRNA 表达水平的检测

与空气+L/R 对照组相比,高氧+L/R 组的炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达水平明显升高($P=0.000$),抗炎因子 IL-4、IL-13 mRNA 表达水平明显降低($P=0.000$);与高氧+L/R 组比较,高氧+Elafin 组中 TNF- α ($P=0.002$)、IL-1 β ($P=0.000$) mRNA 表达水平均明显降低,IL-4 ($P=0.047$)、IL-13 ($P=0.028$) mRNA 表达水平均明显升高,如表 3 和图 4 所示。

图4 各组肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 及 IL-13 mRNA 表达量比较

2.5 Western blot 检测肺组织 NF- κ B p65 蛋白表达

空气组、高氧+L/R 组、高氧+Elafin 组细胞核 NF- κ B p65 蛋白灰度值依次为 1.57 $\pm$ 0.06、1.96 $\pm$ 0.11、1.04 $\pm$ 0.05 ($F=117.135$, $P=0.000$)。与空气组比较,高氧+L/R 组细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显增加($P=0.001$)。与高氧+L/R 组相比,高氧+Elafin 组细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P=0.001$),如图 5 所示。

表2 各组基础肺功能值比较 ($n=3$)

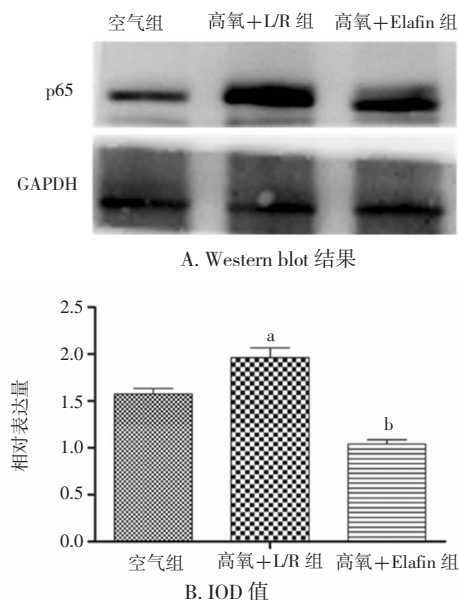
	F 值	MV	TV	Raw
Air	347.98 $\pm$ 7.95	67.18 $\pm$ 2.43	0.20 $\pm$ 0.01	2.47 $\pm$ 0.09
高氧+L/R 组	208.02 $\pm$ 30.31 ^a	13.32 $\pm$ 3.36 ^a	0.06 $\pm$ 0.01 ^a	17.77 $\pm$ 7.11 ^a
高氧+Elafin 组	233.39 $\pm$ 53.11 ^a	17.27 $\pm$ 2.11 ^a	0.08 $\pm$ 0.02 ^a	7.07 $\pm$ 3.25 ^b
F 值	13.164	374.574	66.719	9.079
P 值	0.006	0.000	0.000	0.015

注:a,与空气组比较, $P<0.05$;b:与高氧+L/R 组比较, $P<0.05$

表3 各组肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 及 IL-13 mRNA 表达量

	TNF- α	IL-1 β	IL-4	IL-13
空气组	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.16
高氧+L/R 组	2.20 $\pm$ 0.22 ^a	2.92 $\pm$ 0.56 ^a	0.36 $\pm$ 0.01 ^a	0.07 $\pm$ 0.01 ^a
高氧+Elafin 组	1.15 $\pm$ 0.11 ^{ab}	1.46 $\pm$ 0.06 ^b	0.52 $\pm$ 0.13 ^{ab}	0.18 $\pm$ 0.04 ^{ab}
F 值	27.936	58.797	52.764	82.256
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000

注:a,与空气组比较, $P<0.05$;b:与高氧+L/R 组比较, $P<0.05$



注: a, 与空气组比较, $P < 0.05$; b: 与高氧 + L/R 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组 NF- κ B p65 蛋白表达

3 讨论

BPD 是一种与早产儿相关的由机械通气(气压伤)和氧疗导致的慢性肺部疾病, 有较高的病死率和再入院率。氧疗是在消除导致缺氧的因素后, 应对缺氧的治疗重要措施, 同时也是引起 BPD 的高危因素。高浓度氧在体内易形成高活性氧自由基造成肺损伤, 并对患儿的神经系统、体格发育造成影响^[18-19]。

在 BPD 的发病机制研究中, 炎症反应是目前的研究热点之一^[20]。原始肺泡分化受阻和中性粒细胞浸润为主的炎症反应是高氧导致的肺损伤的主要特征。中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)主要由中性粒细胞分泌, 丝氨酸蛋白酶超家族成员之一, 可降解细胞外基质。多项研究证实, NE 在 BPD 中的活性增强^[15, 21-22]。NE 的活性增加, 不仅导致肺部的直接损伤, 还可通过诱导肺部炎症和细胞凋亡, 导致肺泡腔扩大, 肺发育受阻。Elafin 是内源性低分子量弹性蛋白酶特异性抑制剂, 表达于人体多个器官组织。当机体处于炎症浸润状态时, 肺组织上皮细胞分泌 Elafin, 抑制 NE 的活性, 从而保护机体^[23]。本课题组前期研究证实, Elafin 可通过抑制 BPD 小鼠肺组织中的 NE 活性, 促进弹性纤维的正常沉积, 从而促进肺泡分化和肺发育^[15, 24-25]。

本研究将新生小鼠暴露于 85% 高氧中, 建立 BPD 动物模型, 每日腹腔注射人重组 Elafin 进行干预。实验结果表明, 高氧+Elafin 组较高氧+L/R 组的

MLI 和 RAC 值明显增加, 肺泡结构规则, 肺泡间隔变薄, 肺功能得到改善, Elafin 促进了肺发育。

中性粒细胞在受损肺组织的微血管蓄积, 释放多种炎症因子, 如 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α ^[26-27]。IL-1 β 可与 TNF- α 协同作用, 增加血管内皮通透性, 并加重肺损伤^[28]。本研究结果显示, 高氧+L/R 组中较空气组 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达均升高, 而高氧+L/R 组中抗炎因子 IL-4、IL-13 mRNA 表达均降低, 与文献报道一致^[29-30]。提示慢性高氧刺激可导致炎症因子的表达增加, 而抗炎因子表达降低。高氧+Elafin 组 IL-1 β 、TNF- α 的基因水平较高氧+L/R 组显著下降, 抗炎因子 IL-4、IL-13 基因水平较高氧+L/R 组显著上升, 表明 Elafin 可通过调控多种炎症因子和抗炎因子的表达, 从而抑制高氧刺激引起的炎症反应。

NF- κ B 信号通路可介导炎症反应, 在 BPD 的发生发展中起着重要作用^[31-32]。正常情况下 NF- κ B 被 I κ B 抑制, 以非活性形式存在于细胞质。当机体受到外界刺激时, I κ B 发生磷酸化, 进而失去了对 NF- κ B 的抑制作用, 活化的磷酸化 NF- κ B 转位至细胞核, 促进基因转录, 继而增加炎症细胞因子表达, 从而导致 BPD 的发生发展。

本研究结果显示, 与空气中相比, 高氧+L/R 组肺组织的核蛋白中 p65 蛋白表达明显增加, 表明 NF- κ B 通路过度激活, 参与了炎症反应调控。另有多项研究也证实 BPD 中 NF- κ B 信号通路的活性高于正常组^[33-35], 与本研究结果一致。与高氧+L/R 组相比, 高氧+Elafin 组的核蛋白中 p65 蛋白减少, 说明 NF- κ B 核转位减少, 表明 Elafin 可抑制 BPD 中过度激活的 NF- κ B 信号通路。推测 Elafin 抑制炎症细胞因子表达的作用可能与抑制 NF- κ B 信号通路的过度激活有关。

综上所述, 重组人 Elafin 能有效减轻慢性高氧致新生小鼠支气管肺发育不良的肺组织的损伤, 抑制炎症介质释放和改善小鼠基础肺功能, 从而促进肺发育。其可能的机制是通过抑制 NF- κ B 信号通路的过度激活来调控多个炎症因子的表达, 为 Elafin 临床治疗 BPD 的应用奠定可靠的实验依据和重要的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Northway WH, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease: bronchopulmonary dysplasia[J]. N Engl J Med, 1967, 276(7): 357-368.
- [2] 尹玲玲, 叶贞志, 唐丽君, 等. 大黄对高氧致新生大鼠支气管肺

- 发育不良的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(5): 410-415.
- [3] 王 刚. 支气管肺发育不良早产儿血清 IL-8 和 TNF- α 水平变化的临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(6): 1210-1212.
- [4] Chen X, Walther FJ, Laghmani EH, et al. Adult lysophosphatidic acid receptor 1-deficient rats with hyperoxia-induced neonatal chronic lung disease are protected against lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 155.
- [5] Li C, Fu J, Liu H, et al. Hyperoxia arrests pulmonary development in newborn rats via disruption of endothelial tight junctions and down-regulation of Cx40[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 61-67.
- [6] Tang JR, Karumanchi SA, Seedorf G, et al. Excess soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in amniotic fluid impairs lung growth in rats; linking preeclampsia with bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(1): L36-46.
- [7] 冯 洁, 邓 春, 余加林, 等. 高迁移率族蛋白 B1 在高氧致支气管肺发育不良的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(3): 219-223.
- [8] 李 文, 谈 珍, 刘成博, 等. 黄芪多糖 APS-II-2 对脂多糖所致绒毛膜羊膜炎诱发的肺泡化阻滞的改善作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(4): 374-379.
- [9] Rudloff I, Steven XC, Christine BB, et al. Refining anti-inflammatory therapy strategies for bronchopulmonary dysplasia[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(6): 1128-1138.
- [10] Balany J, Bhandari V. Understanding the impact of infection, inflammation, and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 90.
- [11] 黄小平, 卢金冬, 丁 煌, 等. 黄芪和三七的主要有效成分配伍对脑缺血/再灌注小鼠 NF- κ B 信号通路及炎症因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1): 141-146.
- [12] Ahmed AU, Sarvestani ST, Gantier MP, et al. Integrin-linked kinase modulates lipopolysaccharide- and *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor κ B-activated tumor necrosis factor- α production via regulation of p65 serine 536 phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(40): 27776-27793.
- [13] Peter AH, Mary H, Zhou X, et al. Adenoviral gene delivery of e-lafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF- κ B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli[J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 172(7): 4535-4544.
- [14] Nickel NP, Spiekerkoetter E, Gu M, et al. Elafin reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent bone morphogenetic protein signaling[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2015, 191(11): 1273-1286.
- [15] Han W, Li X, Zhang H, et al. Recombinant human elafin promotes alveologenesis in newborn mice exposed to chronic hyperoxia[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 92: 173-182.
- [16] Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, et al. Neonatal mice genetically modified to express the elastase inhibitor elafin are protected against the adverse effects of mechanical ventilation on lung growth[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(3): L215-227.
- [17] Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, et al. Inhibiting lung elastase activity enables lung growth in mechanically ventilated newborn mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 184(5): 537-546.
- [18] 郑雁芮, 韦 红. 支气管肺发育不良研究进展[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(14): 2141-2143.
- [19] 周文浩, 陈燕琳. 早产儿支气管肺发育不良远期结局[J]. 中国实用儿科杂志, 2014, 29(1): 18-24.
- [20] 冯志成, 吴湘兰, 齐利峰, 等. 早产儿羊水、脐血中 IL-6、IL-8、TNF- α 水平与支气管肺发育不良的关系[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(10): 1646-1649.
- [21] Han W, Guo C, Liu Q, et al. Aberrant elastin remodeling in the lungs of O₂-exposed newborn mice; primarily results from perturbed interaction between integrins and elastin[J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 359(2): 589-603.
- [22] Bland RD, Ertsey R, Mokres LM, et al. Mechanical ventilation uncouples synthesis and assembly of elastin and increases apoptosis in lungs of newborn mice. Prelude to defective alveolar septation during lung development?[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(1): L3-14.
- [23] Reid PT, Marsden ME, Cunningham GA, et al. Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells[J]. *FEBS Lett*, 1999, 457(1): 33-37.
- [24] 韩文莉. 弹性蛋白系统在高氧致新生鼠支气管肺发育不良中的作用及干预研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [25] 余本莉. 重组人 Elafin 对慢性高氧致新生鼠支气管肺发育不良中的保护作用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [26] Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(4): 1800-1807.
- [27] Kawabata K, Suzuki M, Sugitani M, et al. ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177(2): 814-820.
- [28] 冯志成. 血清及支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在急性呼吸窘迫综合症中的变化及意义[J]. 现代预防医学, 2011, 38(18): 3804-3805.
- [29] Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants[J]. *Pediatrics*, 2009, 123(4): 1132-1141.
- [30] Pan J, Zhan C, Yuan T, et al. Effects and molecular mechanisms of intrauterine infection/inflammation on lung development[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 93.
- [31] Wright CJ, Kirpalani H. Targeting inflammation to prevent bronchopulmonary dysplasia; can new insights be translated into therapies?[J]. *Pediatrics*, 2011, 128(1): 111-126.
- [32] 王金磊, 李承德, 孙宏伟, 等. 黄芪多糖抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 489-493.
- [33] Iosef C, Alastalo TP, Hou Y, et al. Inhibiting NF- κ B in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(10): L1023-1036.
- [34] McKenna S, Michaelis KA, Agboke F, et al. Sustained hyperoxia-induced NF- κ B activation improves survival and preserves lung development in neonatal mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(12): L1078-1089.
- [35] Yang G, Abate A, George AG, et al. Maturation differences in lung NF- κ B activation and their role in tolerance to hyperoxia[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(5): 669-678.

(责任编辑: 唐秋姗)