

# 汉防己甲素对先天性膈疝大鼠模型肺泡 I 型上皮的影响\*

肖斌, 徐畅<sup>△</sup>, 刘敏, 吉毅, 杨立勋, 李太明, 江君, 何涛贞

四川大学华西医院 小儿外科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨先天性膈疝(CDH)大鼠肺泡 I 型上皮细胞的分化情况及汉防己甲素产前干预对其分化的影响。**方法** 将孕 9.5 d 的 SD 大鼠随机分为 3 组(对照组、膈疝组和治疗组),分别给予膈疝组和治疗组除草醚(以 125 mg/只的剂量一次性灌胃),对照组等量花生油。孕 18.5 d,分别给予治疗组汉防己甲素(灌胃给药 30 mg/kg,1 次/d,连续 3 d),膈疝组和对照组等量生理盐水。孕 21.5 d,剖宫产取出胎肺,分别行 HE 染色并检测各组肺泡面积比,免疫组化检测甲状腺转录因子 1(TTF1)蛋白的表达,实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 RT140、TTF1 mRNA 的表达,电镜检测各组肺内 I 型上皮细胞/II 型上皮细胞百分比(I/II%)。**结果** 光镜和电镜下膈疝组胎肺明显发育不良,I 型上皮减少、II 型上皮增多,治疗组明显改善,且肺泡面积比呈对照组>治疗组>膈疝组( $P<0.01$ );透射电镜提示 I/II%呈对照组>治疗组>膈疝组( $P<0.01$ );免疫组化及 RT-PCR 提示:TTF1 表达呈对照组<治疗组<膈疝组( $P<0.01$ ),RT140 表达呈对照组>治疗组>膈疝组( $P<0.01$ )。**结论** 先天性膈疝大鼠肺内存在肺泡 I 型上皮分化障碍,汉防己甲素产前干预能促进 CDH 胎鼠肺发育。

**【关键词】** 先天性膈疝 肺发育 I 型肺上皮细胞 汉防己甲素

**Effects of Tetrandrine Prenatal Intervention on Alveolar Epithelial Cells Type I Differentiation in Rat Model of Nitrofen-induced Congenital Diaphragmatic Hernia** XIAO Bin, XU Chang<sup>△</sup>, LIU Min, JI Yi, YANG Li-xun, LI Tai-ming, JIANG Jun, HE Tao-zhen. Department of Pediatric Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: xcxcxc52229081@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of Tetrandrine (TET) prenatal intervention on the differentiation of alveolar epithelial cells type I (AEC I) in rat model of Nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia(CDH). **Methods** Timed-pregnant Sprague-Dawley rats were divided into three groups, namely control, CDH and TET group on day 9.5 of gestation. The rats in TET group and CDH group were given 125 mg of Nitrofen by gavage one time, while the rats in control group were given the same dose of seed fat. After that, the rats in TET group was given 30 mg/kg of TET by gavage once a day for three days from day 18.5 of gestation, while the rats in CDH and control group were given the same dose of normal saline. On day 21.5 of gestation, all fetuses were delivered by cesarean, the lungs of fetuses were histologically evaluated by microscope and electron microscope. The expressions of type I cell-specific protein(RT140) and thyroid transcription factor 1(TTF1) in alveolar fluid content were analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry staining. To detect the number of AEC I and AEC II of each group by transmission electron microscopy and calculate the percentage of AEC I and AEC II (I/II%). **Results** The microscope and electron microscope study found the lungs of fetuses in CDH group showed marked hypoplasia, in contrast to the improvement of hypoplasia in TET fetuses. The pulmonary alveolar area had significant difference statistically ( $P<0.01$ ) in each group, which present as control>TET>CDH. I/II% had significant difference statistically ( $P<0.01$ ) in each group, which present as control>TET>CDH. The expression level of TTF1 was up-regulated in both CDH and TET groups, and it was higher in CDH group ( $P<0.01$ ). The expression level of RT140 were down-regulated in CDH and TET groups, which was lower in CDH group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The development of AEC I was interfered in CDH rat model, TET prenatal treatment could improve the lung development of CDH.

**【Key words】** Congenital diaphragmatic hernia Lung development Alveolar epithelial cells type I Tetrandrine

先天性膈疝(CDH)是先天膈肌发育不良导致

的畸形,腹部脏器经缺损膈肌疝入胸腔,引起一系列病理生理变化的疾病,发病率约 1:2 200<sup>[1]</sup>,死亡率达 20%~35%<sup>[2]</sup>。死亡的主要原因为肺发育不良(PH)和新生儿持续性肺动脉高压(PPHN)<sup>[3]</sup>。患

\* 国家青年自然科学基金(No. 31201095)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: xcxcxc52229081@163.com

儿已存在的肺部结构与功能缺陷难以通过产后治疗纠正,同时病因不明,缺乏针对阻断 PH 与 PPHN 形成过程的对因治疗,所以 CDH 的病因学与产前干预研究已成为热点。

PH 包括增殖与分化两方面,增殖障碍表现为 CDH 时肺质量减轻,肺泡减少,肺实质 DNA 减少<sup>[4,5]</sup>等;分化障碍主要表现为肺发育晚期肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)分化为 I 型上皮细胞(AEC I)障碍<sup>[5]</sup>。肺实质主要由 AEC I 和 AEC II 构成,AEC I 构成气-血屏障,与肺气体交换功能密切相关;AEC II 是 AEC I 的前体<sup>[6]</sup>,对正常肺泡形态的维持、肺内免疫调节以及修复等方面具有重要作用。分化障碍时 AEC I 型减少,AEC II 增多,肺泡气体交换面积减少,肺泡壁增厚,弥散距离增加。Takayasu 等<sup>[5]</sup>研究显示:在 CDH 发育不良肺中,肺泡 I 型上皮减少、II 型上皮增加,但并未进一步明确其对肺功能的影响,并未论证分化障碍与肺发育不良的因果关系,还需深入研究。

汉防己甲素(TET)是一种从防己科植物粉防己根中提取的生物碱,药理作用广泛,被看作一种新型钙通道阻滞剂,可促进 CDH 胎鼠肺发育。本课题组前期发现 TET 产前干预能抑制肺内中、小动脉管壁肌化,降低 CDH 肺动脉高压<sup>[7]</sup>;还能促进 CDH 肺发育:表现为胎鼠肺质量增加,肺泡面积增大,肺间隔厚度减小<sup>[8]</sup>。若 CDH 存在肺分化障碍,TET 是否对分化也有促进作用?本研究拟通过建立除草醚诱导的 CDH 大鼠模型,分析和比较 CDH 模型大鼠肺内 I、II 型上皮的分化情况以及产前应用 TET 干预治疗对肺泡上皮细胞分化的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组处理

SD 大鼠(购于四川大学实验动物中心)按雌雄 2:1 分笼定时配种,12 h 后显微镜下见阴道分泌物涂片有精子确定为孕 0.5 d。孕 9.5 d 随机分为对照组、膈疝组和治疗组。膈疝组与治疗组予以除草醚(浙江化工二厂,溶于 2 mL 食用花生油,125 mg/只,一次性灌胃给药),对照组予以等量食用花生油灌胃。孕 18.5 d,治疗组予以 30 mg/kg TET(陕西惠科植物开发有限公司)灌胃(1 次/d,连续 3 d),膈疝组和对照组予以等量生理盐水灌胃。

### 1.2 肺标本采集

孕 21.5 d,乙醚麻醉下剖宫产取出各组胎鼠,观察胎鼠的发育情况,计算致畸率;同时完整取出胎鼠

两侧肺组织并称重,计算肺质量/体质量比;称重后即刻将肺组织分别按照检测要求进行相关处理,分别做好标记。拟做 HE 染色和免疫组化检测的肺标本置于 10%(体积分数)甲醛中固定,24 h 内常规石蜡包埋备检。拟行实时荧光定量 PCR(real-time PCR)的肺标本放入 Trizol 试剂(美国 Invitrogen)中备检,拟行透射电镜的肺标本置于 3%戊二醛中固定。放大镜下观察去除肺组织的胎鼠胸腔,逐一记录有无膈疝、位置、疝孔大小及疝内容物。

### 1.3 HE 染色与免疫组化检测

将置于 10%甲醛中固定的肺标本,24 h 内常规石蜡包埋,每个蜡块切 2 张切片(同一张切片内要包括左、右双侧肺组织),1 张常规 HE 染色,1 张行免疫组化染色。HE 染色光镜下检测各组肺泡面积比(image pro plus 4.50 版本专业图像分析软件,对各组肺切片 HE 染色的 400 倍图像,分别进行肺泡腔面积与总面积大小的分析,然后计算肺泡腔面积与总面积大小的比值即肺泡面积比)。免疫组化染色光镜观察各组肺内甲状腺转录因子 1(TTF1)的表达,TTF1 为 II 型上皮标记物,主要表达于 AEC II 的胞浆,其覆盖的阳性面积反映了 II 型上皮的分布比例和面积。免疫组化采用 LsAB 法(SP 法),以 PBS(pH7.4)代替一抗作空白对照。Anti-TTF1(武汉博士德生物)抗鼠单克隆抗体稀释浓度 1:200,结果以细胞中出现棕黄色染色为阳性。各组染色标本各采集 20 个图像,用 image pro plus 4.50 版本专业图像分析软件对阳性表达图像的光密度值和面积进行测算,计算积分光密度(IOD)值,IOD 与目的蛋白的表达强弱呈正相关。

### 1.4 Real-time PCR 检测

以  $\beta$  肌动蛋白基因( $\beta$ -actin)为内参,real-time PCR 检测各组胎鼠肺组织中 RT140 和 TTF1 mRNA 的相对表达量。引物和探针均由上海生物工程公司设计,各目的基因的引物序列如下: $\beta$ -actin 上游引物:5'-GAAGATCAAGATCATTTGCTCCT-3',下游引物:5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3';RT140 上游引物:5'-GATAAGAAAGATGGC TTGGCT-3',下游引物:5'-CGAGAACCTTCCAG AAATCTT-3';TTF1 上游引物:5'-CCGCCATCT CCCGCTTCAT-3',下游引物:5'-GGCAGCGGGG CCATGTTCTT-3'。提取各肺标本的 mRNA 逆转录成 cDNA,FTC2000 型荧光定量 PCR 仪对 cDNA 进行扩增(20 °C 10 min,42 °C 60 min,70 °C 10 min,置于-20 °C 冰箱保存备用)。并实时记录

每一扩增循环的系统荧光强度, 荧光强度增加与模板量增加呈正比。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *RT140* 和 *TTF1* mRNA 的相对表达量。

### 1.5 透射电镜检测

标本用 1% 四氧化锇再固定, 丙酮逐级脱水, 包埋, 半薄切片光学定位, 超薄切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色, 日立 H-600IV 型透射电镜(四川大学华西基础医学与法医学院电镜室)观察。透射电镜 8 000 倍下观察各组肺组织(每组 8 个标本), 每个标本均随机在 15 个不重叠的视野下对肺上皮细胞进行计数。并计算各组内 I 型上皮/II 型上皮百分比(I/II%)。

### 1.6 统计学方法

组间比较采用秩和检验、 $\chi^2$  检验和方差分析等方法,  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胎鼠膈疝诱导情况

实验组(治疗组和膈疝组)共产胎仔 86 只, 有膈疝形成者 67 只, 致畸率 77.9%; 膈疝组与治疗组致畸率分别为 71.4% 和 82.2%, 差异无统计学意义( $P = 0.597$ )。膈疝多位于左侧, 疝内容物主要为胃和小肠, 其次为肝。见附表。

### 2.2 各组肺质量/体质量比的差异

附表 胎鼠膈疝组与治疗组膈疝形成情况

Table CDH in fetal rats

Group	n	Fetal rat with CDH	CDH location (case)	
			Left	Right
TET	45	37 (82.2%)	32	5
CDH	41	30 (71.4%)	26	4
Total	86	67 (77.9%)	58	9

各组的肺质量/体质量比( $\times 10^{-3}$ )结果: 对照组为  $41.25 \pm 2.86$ , 膈疝组为  $19.20 \pm 1.79$ , 治疗组为  $29.40 \pm 2.89$ , 呈膈疝组  $<$  治疗组  $<$  对照组的趋势( $P < 0.01$ ), 3 组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.3 光镜检测结果

对照组肺组织发育良好, 肺泡大而多, 肺泡间隔薄而均匀, 肺组织发育较成熟, 呼吸性支气管末端呈囊泡状。膈疝组肺组织表现为明显发育不良: 细胞密度大, 肺泡小而少, 肺泡间隔厚, 肺泡、肺泡管及肺泡囊呈假腺样改变; 治疗组肺组织发育好于膈疝组, 其肺泡壁明显变薄, 光镜总体形态与肺泡面积比接近正常肺组织(图 1)。各组肺泡面积比(%): 对照组为  $60.18 \pm 8.04$ 、治疗组为  $49.43 \pm 5.45$ 、膈疝组为  $39.73 \pm 5.55$ , 呈对照组  $>$  治疗组  $>$  膈疝组趋势( $P < 0.01$ ), 3 组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.4 免疫组化结果

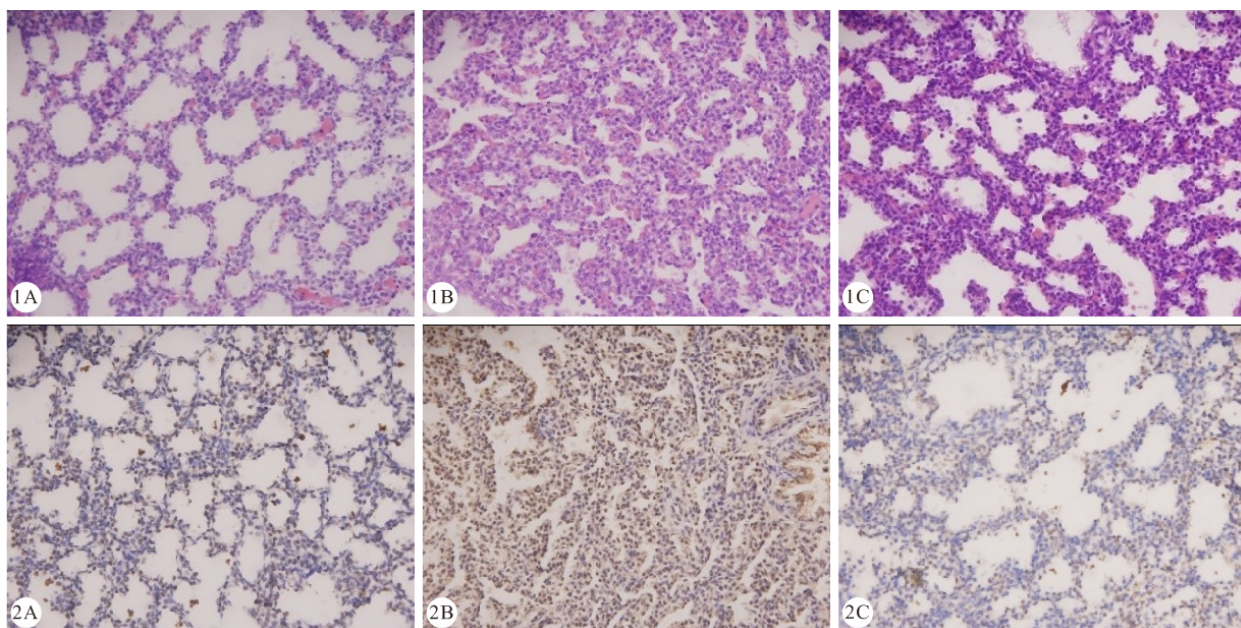


图 1 胎鼠肺切片 HE 染色光学显微镜观察。 $\times 200$

Fig 1 The HE staining of lung tissues in fetal rats.  $\times 200$

图 2 胎鼠肺切片免疫组化染色检测 TTF1 蛋白的表达。SP  $\times 400$

Fig 2 The expression of TTF1 protein in lung tissues of fetal rats. SP  $\times 400$

A: Control group; B: CDH group; C: TET group

在膈疝组,胎肺中 TTF1 的表达明显强于对照组,其分布面积明显变广;治疗组 TTF1 表达较膈疝组低,面积小,接近于正常对照组(图 2)。各组 TTF1 表达的 IOD 值结果:对照组为  $8.58 \pm 0.83$ ,膈疝组为  $54.69 \pm 7.21$ ,治疗组为  $28.58 \pm 2.76$ ,呈对照组 < 治疗组 < 膈疝组趋势( $P < 0.01$ ),3 组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 2.5 Real-time PCR 检测结果

结果显示:RT140 相对表达量,对照组 > 治疗组 > 膈疝组( $P < 0.01$ );TTF1 相对表达量,膈疝组 > 治疗组 > 对照组( $P < 0.01$ )。见图 3。

## 2.6 电镜观察结果

透射电镜观察发现,膈疝组胎肺肺泡腔小,肺泡壁主要由 AEC II (内有特征性板层小体) 构成,肺泡周围血管少,气-血屏障变厚,而治疗组肺形态、气-血屏障接近正常组织(图 4)。各组肺内 I / II % 结果:对照组为  $92.87 \pm 10.68$ ,膈疝组为  $48.35 \pm$

$5.81$ ,治疗组为  $71.51 \pm 8.34$ ,呈现出对照组 > 治疗组 > 膈疝组趋势( $P < 0.01$ ),3 组间两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

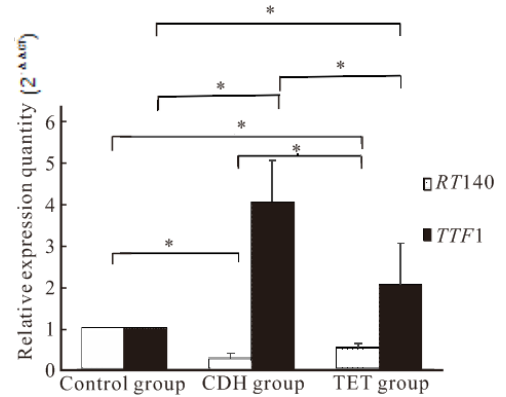


图 3 各组 RT140 和 TTF1 mRNA 相对表达量比较  
Fig 3 The relative expression of RT140 and TTF1 mRNA in each group  
\*  $P < 0.01$

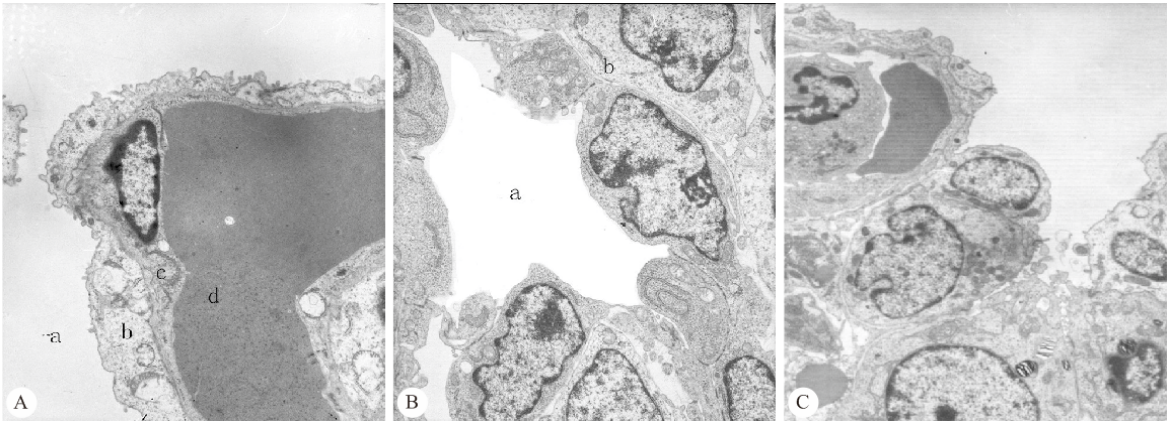


图 4 透射电镜观察结果。×8 000

Fig 4 The observation of transmission electron microscope. ×8 000

A: Control group; B: CDH group; C: TET group; a: Alveolar cavity; b: Alveolar epithelial cell; c: Vascular endothelial cell; d: Intravascular cavity

## 3 讨论

CDH 死亡率高,病因不明,缺乏有效病因治疗。已经证实<sup>[3]</sup>,CDH 患儿存在明确的 PH。PH 包括增殖与分化障碍两方面。本研究中 CDH 胎鼠肺发育较对照组明显延迟,表现为膈疝组胎鼠肺质量/体质量比明显减少,肺泡减少,整肺结构停留在假腺样期,表明其存在增殖障碍。肺实质主要由 AEC I 与 AEC II 构成,肺发育过程中,肺泡 II 型上皮早于 I 型上皮出现,I 型上皮由 II 型上皮分化而来<sup>[9]</sup>。AEC I 为体积较大的扁平状细胞,占肺泡表面积的

95%~97%<sup>[10]</sup>,是构成肺泡的主体,参与形成肺泡表面,是气-血屏障的一层,与肺气体交换功能密切相关;AEC II 为体积小的立方细胞,是 AEC I 的前体细胞,数量约占总肺泡上皮细胞数的 50%,但其分布却只占肺泡表面积的 7%<sup>[11]</sup>,其在正常肺泡形态的维持,肺内免疫调节以及修复等方面具有重要作用。RT140 是 AEC I 的标志物,TTF1 是 AEC II 的标志物。本研究发现,与对照组相比,膈疝组肺泡面积比降低,肺泡小而少;肺内 AEC I 数量减少,AEC II 数量增多;AEC II 标志物 TTF1 的表达增加,AEC I 标志物 RT140 的表达则降低。

因此,由除草醚诱导的先天性膈疝大鼠模型的肺泡上皮细胞存在分化障碍,主要表现为II型上皮分化为I型上皮的障碍,II型上皮增多、I型上皮减少,这导致肺泡结构发生改变(两种细胞形态不一样),使肺泡气体交换面积减小、气体弥散距离增加,而严重影响呼吸功能,这与临床治疗中发现的CDH患儿出生后呼吸功能障碍相符。

CDH的治疗以手术修补为主,但其无法纠正导致PH与PPHN的肺部缺陷,即使手术解除对肺的压迫,也不能逆转已存的PH,患儿通气、换气功能仍低下,严重者导致呼吸、循环衰竭而死亡。产前诊断技术的进步让许多CDH患儿在出生前即被诊断出来,这为产前干预治疗提供前提,目前产前药物干预备受关注。研究发现:地塞米松与抗氧化剂产前干预能促进CDH胎鼠肺发育<sup>[12]</sup>,此外维甲酸产前干预使CDH胎鼠肺泡化增加,肺血管增多<sup>[13]</sup>。但上述药物大多作用机制不明或并发症严重,故尚需一种效果好、副作用小、安全的药物。

课题组前期研究发现:肺发育早期给予TET产前干预可使CDH胎鼠肺泡面积增大,肺间隔厚度减小而改善肺组织发育;同时还可增加腺泡前血管数量和减小血管壁厚度从而缓解胎鼠生后肺动脉高压<sup>[7]</sup>。TET是一种从防己科植物粉防己根中提取的生物碱,主要用于治疗肝纤维化、缺氧性肺动脉高压以及矽肺等,被看作一种新型钙通道阻滞剂<sup>[14]</sup>,也发挥调节血管舒缩、抗氧自由基、抗炎等生物学效应。TET的药理作用广泛,前期研究并未证实其促进肺发育的机制,本实验进一步研究证实:TET可通过促进AEC II向AEC I分化成熟而促进肺发育。

本研究发现,TET产前干预治疗后,治疗组胎鼠肺组织增殖和分化得到改善,与膈疝组相比,治疗组胎鼠肺质量/体质量比增加(促进肺增殖);膈疝时被抑制的AEC II向AEC I分化的情况得到改善,治疗组电镜下AEC I比例较膈疝组明显增高,AEC II比例降低;PCR提示AEC I标志物RT140升高,AEC II标志物TTF1降低;免疫组化提示TTF1分布面积缩小,肺泡AEC II覆盖面积明显减小。以上结果提示TET产前干预可使AEC I增多,AEC II数量降低,至于AEC II仍然高于正常,可能与用药剂量相关。

由于AEC II为AEC I前体,当AEC I增加,AEC II减少时可以认为是AEC II向AEC I的分

化加强所引起的。但是,AEC I数量的增加也可由自身增殖完成,TET是否也能促进AEC I的增殖,患儿生后是否可由AEC I自身增殖代偿肺部缺陷尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Hedrick HL. Management of prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg*,2013;22(1):37-43.
- Van den Hout L, Schaible T, Cohen-Overbeek TE, *et al.* Actual outcome in infants with congenital diaphragmatic hernia: the role of a standardized postnatal treatment protocol. *Fetal Diagn Ther*,2011;29(1):55-63.
- Badillo A, Gingalewski C. Congenital diaphragmatic hernia: treatment and outcomes. *Semin Perinatol*,2014;38(2):92-96.
- Van Tuyl M, Blommaert PJ, Keijzer R, *et al.* Pulmonary surfactant protein A, B, and C mRNA and protein expression in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatr Res*,2003;54(5):641-652.
- Takayasu H, Nakazawa N, Montedonico S, *et al.* Impaired alveolar epithelial cell differentiation in the hypoplastic lung in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*,2007;23(5):405-410.
- Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev Cell*, 2010;18(1):8-23.
- Liu W, Feng J, Jia H, *et al.* Effect of prenatal tetrandrine therapy on pulmonary vascular structural remodeling in the nitrofen-induced CDH rat model. *Chin Med J (Engl)*,2000;113(9):813-816.
- Lin H, Wang Y, Xiong Z, *et al.* Effect of antenatal tetrandrine administration on endothelin-1 and epidermal growth factor levels in the lungs of rats with experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*,2007;42(10):1644-1651.
- Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*, 2003; 65: 669-695. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142446.
- Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, *et al.* Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type I alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*,2008;43(2):367-372.
- Johnston LC, Gonzales LW, Lightfoot RT, *et al.* Opposing regulation of human alveolar type II cell differentiation by nitric oxide and hyperoxia. *Pediatr Res*,2010;67(5):521-525.
- Brownfoot FC, Gagliardi DI, Bain E, *et al.* Different corticosteroids and regimens for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013; 8: CD006764. doi: 10.1002/14651858.CD006764.pub3.
- Schmidt AF, Gonçalves FL, Regis AC, *et al.* Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol*,2012;207(1):76. e25-32.
- Liu B, Wang T, Qian X, *et al.* Anticancer effect of tetrandrine on primary cancer cells isolated from ascites and pleural fluids. *Cancer Lett*,2008;268(1):166-175.

(2015-09-12收稿,2016-01-02修回)

编辑 余琳