

分类号 R722.1

密级 公 开

UDC 610

编号 10299Z1513035

江 苏 大 学

JIANGSU UNIVERSITY

专业学位硕士学位论文

Thesis for Professional Master Degree



硕士类别: 专业学位硕士

论文题目: C/EBP α 对高氧暴露后 AEC II 分泌肺泡表面
 活性蛋白和细胞增殖及凋亡的影响

学科专业: 儿科学

作者姓名: 卢衍敏

指导教师: 卢红艳

答辩日期: 2018 年 06 月 05 日

分类号 R722.1
UDC 610

密级 公 开
编号 10299Z1513035

硕 士 学 位 论 文

**C/EBP α 对高氧暴露后 AEC II 分泌肺泡表面活性蛋白
和细胞增殖及凋亡的影响**

**THE EFFECT OF CEBPA ON ALVEOLAR SURFACTANT
PROTEIN AND CELL PROLIFERATION AND
APOPTOSIS AFTER AEC II EXPOSED TO HYPEROXIA**

作者姓名: 卢衍敏

指导教师: 卢红艳

小组成员: 吕进泉

申请学位: 硕士学位

学科专业: 儿科学

论文提交日期: 2018 年 04 月 23 日

论文答辩日期: 2018 年 06 月 05 日

学位授予单位: 江苏大学

学位授予日期:

答辩委员会主席: 吕剑平

评阅人:

独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容以外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果，也不包含为获得江苏大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：卢衍叙
2018年06月05日

学位论文版权使用授权书

江苏大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致，允许论文被查阅和借阅，同时授权中国科学技术信息研究所将本论文编入《中国学位论文全文数据库》并向社会提供查询，授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本论文编入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》并向社会提供查询。论文的公布（包括刊登）授权江苏大学研究生院办理。

本学位论文属于不保密 。

学位论文作者签名：卢衍叙

指导教师签名：卢红艳

2018年06月05日

2018年06月05日

摘要

目的

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿常见的慢性肺部疾病, BPD 的发生与机械通气及长期吸入高浓度氧密切相关。CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , C/EBP α) 在肺发育及成熟等过程中作为关键转录因子发挥重要作用。本研究首先利用早产大鼠肺泡 II 型上皮细胞 (Alveolar type II Epithelial Cell, AEC II), 探讨高氧暴露对 C/EBP α 、肺泡表面活性蛋白 A (SP-A)、SP-B、SP-C、SP-D 表达及细胞增殖的影响; 同时利用人 AEC II 细胞株, 研究过表达 C/EBP α 对高氧暴露后 AEC II 增殖、凋亡及 SP-C 的影响, 明确 C/EBP α 在高氧肺损伤中的作用。

方法

SD 雌雄大鼠交配, 雌鼠孕 20 d-21 d 时腹腔注射麻醉药后, 剖宫取出胎鼠, 分离纯化 AEC II, 进行原代培养。利用 95% O₂ 构建高氧损伤 AEC II 细胞模型作为高氧组后续实验。将细胞随机分为空气对照组和高氧组。两组细胞分别在培养的 24 h、48 h 及 72 h 进行收集。使用倒置相差显微镜观察各组细胞的形态变化, 实时荧光定量 PCR (Q-PCR) 及 Western blot 法分别检测 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 及蛋白表达, 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 检测 AEC II 细胞增殖。利用人 AEC II 细胞株, 采用 Lipofectamine 2000 脂质体介导法对 AEC II 细胞进行 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒及 pcDNA3.1(+)-空质粒瞬时转染, 将细胞随机分为空气组、空气组 + pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒组、空气组 + pcDNA3.1(+)-空质粒组、高氧组、高氧 + pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒组、高氧 + pcDNA3.1(+)-空质粒组, 采用 Q-PCR 及 Western blot 检测 C/EBP α 和 SP-C mRNA 及蛋白表达, CCK-8 检测各组细胞增殖, PI 染色法流式细胞仪检测细胞周期分布, Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测 AEC II 细胞凋亡。

结果

(1) 空气组 AEC II 细胞随着培养时间的延长, 细胞生长状态良好, 形态基本正常, 未见明显漂浮的死细胞, C/EBP α 表达水平逐渐降低, SP-A、SP-B、SP-C、

SP-D 表达水平及 AEC II 细胞增殖情况逐渐升高；而高氧组 AEC II 细胞形态发生改变，逐渐变为不规则性状，且漂浮的死细胞逐渐增多，C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 表达水平及增殖情况在培养 48 h 达到高峰；且在 48 h 时，高氧组 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 表达水平及增殖情况明显高于空气组。高氧组 AEC II 细胞 C/EBP α 表达情况与肺泡表面活性蛋白及 AEC II 增殖情况呈正相关。

(2) 待 AEC II 细胞培养至融合率达到 50% 以上后进行 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 转染，转染后再次培养 48 h，转染组 C/EBP α mRNA 及蛋白表达水平表达较其它组显著升高 ($P<0.05$)。

(3) 与空气组相比，高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组细胞增殖、SP-C mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)，细胞周期 G₁ 期细胞比例增加，S 期和 G₂ 期细胞明显下降，细胞凋亡率增加 ($P<0.05$)。高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组细胞增殖、SP-C mRNA 及蛋白表达水平较高氧组、高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组显著升高，细胞周期 G₁ 期细胞比例降低，S 期和 G₂ 期细胞增加，细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。与空气组和空气组+ pcDNA3.1(+)-空质粒组相比，在空气组+ pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒组的 AEC II 细胞增殖、凋亡和 SP-C 表达没有显著的差异。

结论

(1) 短期暴露于高氧状态下，C/EBP α 可使肺泡表面活性蛋白分泌增加，参与机体的保护性调节作用，但随高氧暴露时间的延长，将丧失代偿保护作用。

(2) C/EBP α 过表达可促进高氧暴露后 AEC II 细胞 SP-C 表达，促进增殖，抑制凋亡，且使 S 期和 G₂ 期细胞明显增加，提示给予过表达 C/EBP α 可能逆转高氧细胞损伤过程，起到保护作用。

关键词

C/EBP α ，高氧，肺泡 II 型上皮细胞，肺泡表面活性蛋白，增殖，凋亡，大鼠

Abstract

Objective

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is one of the common chronic pulmonary disease in premature infants. The occurrence of Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is closely related to the mechanical ventilation and long-term inhalation of high concentration of oxygen. CCAAT enhancer binding protein alpha (C/EBP α) plays an important role of key transcription factors in lung development and maturation. This study firstly used of Alveolar type II Epithelial Cell (AEC II) in premature rat, to explore the effect of hyperoxia on expression of C/EBP α and pulmonary surfactant protein (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) and their correlations. At the same time, used of AEC II cell lines, to investigate the effects of C/EBP α overexpression on proliferation, apoptosis and surfactant protein-C in AEC II cells after hyperoxia exposure.

Methods

SD male and female rats mated, female rats were pregnant for 20-21 days after the abdominal injection of anaesthesia, dissection of the uterus removed fetal rats, AEC II was isolated and purified, and then primary culture the AEC II. The hyperoxia-induced cell model was constructed using 95% O₂ as a follow-up experiment for the hyperoxia group. The AEC II s were randomly divided into air group and hyperoxia group. The two groups of cells were collected at 24 h, 48 h and 72 h after exposure to air and hyperoxia. Inverted phase contrast microscopy was used to observe the morphological changes of each group of cells, real-time quantitative PCR and Western blot were performed to measure the mRNA and protein expression of C/EBP α and SP-A, SP-B, SP-C and SP-D. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was applied to detect the proliferation of AEC II s. Use of AEC II cell lines, Cultured AEC II cells were transfected with pcDNA3.1(+)-C/EBP α or pcDNA3.1(+)-empty vector plasmid by Lipofectamine2000 transient transfection. The cells were randomly divided into air group, air+pcDNA3.1-C/EBP α group, air-empty vector group, hyperoxia group, hyperoxia+pcDNA3.1-C/EBP α group, and hyperoxia-empty vector

group. Real-time quantitative PCR and Western blot were performed to measure the mRNA and protein expression of C/EBP α and SP-C. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was applied to cell proliferation. PI staining flow cytometry was used as assays for cell cycle, Annexin V/PI double staining flow cytometry was performed to measure cell apoptosis.

Results

(1) In the air group, with the prolongation of the incubation time, the AEC II cells grew well and the morphology was normal, and no dead cells that obviously floated were observed. And then the air group showed a significantly decrease mRNA and protein expression of C/EBP α , and significantly increased mRNA and protein expression of SP-A, SP-B, SP-C, SP-D and proliferation of AEC II s. However, in the hyperoxia group, the morphology of AEC II cells changed, gradually became irregular, and floating dead cells gradually increased. At 48 hours, the expression of C/EBP α and SP-A, SP-B, SP-C, SP-D and proliferation reached a peak. And then compared with the air group, the hyperoxia group showed a significantly increased mRNA and protein expression of C/EBP α and SP-A, SP-B, SP-C, SP-D and proliferation of AEC II s at 48 hours. In the hyperoxia group, the protein expression of C/EBP α was positively correlated with the protein expression of SP-A, SP-B, SP-C, SP-D and proliferation of AEC II s.

(2) After AEC II cells were cultured until the fusion rate was over 50%, the pcDNA3.1(+)-C/EBP α plasmid was transfected into AEC II cells. After transfection for 48 h, the expression mRNA and protein of C/EBP α in the transfection group was significantly higher than that in other groups. ($P<0.05$).

(3) Compared to the air group, decreased cell proliferation, increased apoptosis, decreased SP-C expression, decreased percentage of cells in G₁ phase, and increased percentage of cells in the S and G₂ phase was observed in the hyperoxia group and hyperoxia-empty vector group ($P<0.05$). while opposite effects were observed in the hyperoxia+pcDNA3.1-C/EBP α group as compared to the hyperoxia group and hyperoxia-empty vector group ($P<0.05$). No significant changes were observed in cell proliferation, SP-C expression, and apoptosis rates in the air+pcDNA3.1-C/EBP α

group group as compared to the air group and air-empty vector group.

Conclusion

(1) Under short-term exposure to hyperoxia, C/EBP α can promote the secretion of pulmonary surfactant protein to participate in the body's protective regulation. However, with the prolonged exposure hyperoxia, C/EBP α losed compensatory protection.

(2) C/EBP α overexpression could significantly up-regulates the expression of SP-C, promotes cell proliferation, and inhibits apoptosis in AEC II cells after exposure to hyperoxia. These data suggested that C/EBP α overexpression may reverse the damage and exert a protective role in hyperoxia-induced lung cell injury.

Keywords

C/EBP α , hyperoxia, type II alveolar epithelial cell, pulmonary surfactant protein, proliferation, apoptosis, rat

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
中英文缩写表.....	IX
第一章 前言.....	2
1.1 研究背景	1
1.2 主要研究内容和技术路线图	3
1.2.1 主要研究内容.....	3
1.2.2 技术路线图.....	4
第二章 高氧暴露对早产大鼠肺泡 II 型上皮细胞 CCAAT 增强子结合蛋白 α 和肺泡表面活性蛋白的影响.....	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 实验动物.....	5
2.1.2 主要试剂.....	5
2.1.3 主要试剂的配制.....	6
2.1.4 主要设备和器材.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 AEC II 的分离、纯化与培养	8
2.2.2 AEC II 高氧细胞损伤的模型建立及分组	9
2.2.3 倒置相差显微镜观察 AEC II 状态及改变.....	10
2.2.4 Q-PCR 检测各组细胞中相应 mRNA 的表达.....	10
2.2.5 Western blot 法检测各组细胞中相应蛋白的表达	14
2.2.6 CCK-8 法检测各组细胞的增殖.....	17
2.3 统计学分析	17
2.4 实验结果	18
2.4.1 高氧暴露对 AEC II 细胞生长状况的影响.....	18
2.4.2 高氧暴露对 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA	

表达的影响.....	19
2.4.3 高氧暴露对 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 蛋白表达的影响.....	20
2.4.4 高氧暴露对 AEC II 细胞增殖的影响.....	22
2.4.5 相关性分析.....	22
2.5 讨论.....	24
第三章 过表达 C/EBPα 对高氧暴露后肺泡 II 型上皮细胞增殖、凋亡及肺泡表面活性蛋白 C 的影响.....	26
3.1 实验材料.....	26
3.1.1 实验细胞.....	26
3.1.2 主要试剂.....	26
3.1.3 主要试剂的配制.....	27
3.1.4 主要设备和器材.....	28
3.2 实验方法.....	29
3.2.1 AEC II 细胞培养.....	29
3.2.2 AEC II 细胞分组.....	30
3.2.3 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒瞬时转染和转染效果检测.....	30
3.2.4 Q-PCR 检测各组细胞 C/EBP α 及 SP-C mRNA 表达.....	32
3.2.5 Western blot 检测各组细胞 C/EBP α 及 SP-C 蛋白表达.....	32
3.2.6 CCK-8 检测各组细胞增殖.....	32
3.2.7 流式细胞仪检测各组细胞周期.....	33
3.2.8 流式细胞仪检测各组细胞凋亡.....	33
3.3 统计学分析.....	34
3.4 实验结果.....	34
3.4.1 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 及 pcDNA3.1(+)- 空质粒转染结果.....	34
3.4.2 各组细胞 C/EBP α 和 SP-C mRNA 表达.....	36
3.4.3 各组细胞 C/EBP α 和 SP-C 蛋白表达.....	36
3.4.4 各组细胞增殖情况.....	37

3.4.5 各组细胞周期及凋亡情况.....	38
3.5 讨论.....	42
第四章 结论.....	44
参考文献.....	45
综述.....	51
致谢.....	60
攻读学位期间发表文章	61

中英文缩写表

英文缩写	英文全称	中文名称
C/EBP α	CCAAT enhancer binding protein α	CCAAT/增强子结合蛋白 α
BPD	bronchopulmonary dysplasia	支气管肺发育不良
AEC II	Type II alveolar epithelial cells	肺泡 II 型上皮细胞
AEC I	Type I alveolar epithelial cells	肺泡 I 型上皮细胞
SP	surfactant protein	肺泡表面活性蛋白
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀测定
BCA	bicinchoninic acid	二辛丁酸法
ECL	enhanced chemiluminescence	增强化学发光
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
Q-PCR	Real-Time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethane	三(羟甲基)氨基甲烷
TBS	Tris-buffered saline	Tris 盐缓冲液
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
TEMED	N,N,N,N,-tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺
OD	optical density	光密度

第一章 前言

1.1 研究背景

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 在早产儿常见肺部疾病的发生中占据较高比例, 其发生与遗传和环境之间的相互作用有关, 包括机械通气, 长期氧气治疗, 炎症感染, 败血症等。虽然目前广泛应用肺泡表面活性物质及产前使用激素提高了早产儿存活率, 但最终存活的早产儿常有气道高反应及肺功能异常等表现, 从而使婴幼儿时期出现反复呼吸系统感染, 成年时期慢性阻塞性肺疾病患病率增加, 受影响的婴儿往往有长期和反复发作的住院情况, 可导致终生肺功能改变, 严重影响他们的生活质量, BPD 的最终影响主要包括肺功能改变, 感染易感性增加, 肺部炎症性病变和气道高反应性^[1]。近年随着新生儿重症监护技术及医疗水平的不断提高, 极低及超低出生体重儿存活率明显上升, 从而导致 BPD 发病率逐渐上升。我国流行病学调查研究表明^[2], 胎龄愈小, 体重愈低的早产儿, 发病率越高, 并且胎龄小于 28 周的早产儿 BPD 发生率高达 19.39%。因此, 深入研究 BPD 的发病机制和防治措施, 对提高早产儿存活率和远期生存质量具有较深刻的意义。

多年以来, 关于 BPD 的定义一直在发展。“经典型”BPD 的发生与用氧的浓度及通气支持的时间密切相关, 两种因素均对未成熟且肺泡表面活性物质缺乏的肺造成损伤。这最终导致肺组织发生病理学改变, 表现为气道上皮损伤, 平滑肌增生伴有过度膨胀, 肺膨胀不全, 纤维化和血管性高血压等。然而, 由于产前使用类固醇激素, 积极的医疗干预, 围生期医疗技术的提高以及导致早产儿生存率提高的新生儿通气策略等, 使得这一定义发生了改变。“新型”BPD 并不是通过增加通气和氧化损伤来定义的, 而是通过阻止肺部发育来确定的。但最终肺部也发生一些炎症性病变, 伴有促炎症细胞因子反应和纤维化, 但囊腔内显示出不完全的肺泡和血管发育。总之, BPD 的发病机制和组织学发生了改变, 从之前的出生体重相对较大, 胎龄大于 32 周的新生儿, 病理改变表现为肺纤维化的“经典型”BPD, 逐渐发展成为了出生重小于 1000 g, 胎龄小于 28 周的极不成熟早产儿, 病理改变主要为肺发育停止及肺微血管发育不良的“新型”BPD^[3]。正常孕 24-30

周肺发育进入微细结构的精细调整阶段,是肺发育的关键期,也为易损期,此时肺泡和肺血管快速同步发育,未成熟的肺组织在机械通气、高氧及炎症等多重因素刺激下,肺泡发育极易出现程序化受阻,最终导致 BPD 的发生^[4]。

早产儿 BPD 的主要特征性病理改变为肺发育过程受阻及不成熟肺组织异常修复,早产儿本身各个器官发育不完善,肺部发育欠佳,且肺部表面活性物质分泌不足,生后对氧气高度依赖,极易造成肺组织结构和功能的破坏,通过上皮细胞的损伤程度可间接地了解 BPD 的严重程度。哺乳动物肺泡上皮主要由 AEC II 和肺泡 I 型上皮细胞(Type I alveolar epithelial cells,AEC I)构成。AEC II 在肺发育期间肺泡形成中起重要作用。AEC II 可分化为 AEC I,并且可促进肺泡结构的形成和气血屏障,最终促进肺泡的正常发育。在肺上皮发生损伤时,做出正确的反应,完成正常修复过程,使 AEC II 分化为 AEC I 并增殖以重建气血屏障。AEC II 向 AEC I 的正常分化对于正常的肺泡发育和修复功能是必不可少的。AEC II 是肺内主要干细胞,肺部的正常发育与 AEC II 细胞增殖、分化和凋亡的动态平衡密切相关,且该细胞可分泌肺泡表面活性蛋白,其功能障碍与 BPD 发生发展密切相关^[5]。

目前早产儿肺部疾病的主要治疗措施包括通气策略,肺泡表面活性物质的应用和产前应用皮质类固醇及预防性使用咖啡因等,尽管大大提高了早产儿的存活率,但也使相应疾病的发生率提高。众多研究表明,基因调控在某些疾病的发生及发展过程中起到关键作用。C/EBP α 是一个基本的亮氨酸拉链转录因子,作为 C/EBP 家族的成员之一,其活性被丝氨酸、苏氨酸激酶和 SUMO 化调节,其基因被 RUNX1 和其他转录因子激活,其 mRNA 稳定性被 miRNA 修饰,并且其 mRNA 受到影响 AUG 选择的翻译控制。除了诱导分化以外,C/EBP α 还能抑制细胞周期进程和细胞凋亡,并且在多种组织及器官中通过基因调控参与众多生理机制^[6]。C/EBP α 作为肺发育成熟所必需的转录因子,主要表达于 AEC II 及终末细支气管^[7]。在 C/EBP α 基因缺失胎鼠,发现肺泡表面活性蛋白合成减少,AEC II 分化受损,肺发育成熟障碍,肺泡化过程受阻,其肺部病理改变与 BPD 类似,说明 C/EBP α 可能是肺发育及成熟所必需的转录因子。通过实验研究可能为某些疾病的基因治疗提供科研基础。

氧疗作为早产儿呼吸系统重要治疗手段之一,虽然提高了早产儿的存活率,

但却极易导致 BPD 的发生。且长期吸入高浓度氧或长时间对氧气依赖，引起细胞内氧化/抗氧化体系失衡而导致高氧肺损伤，且肺损伤的严重程度与吸入氧浓度与持续时间明显相关。高氧导致的肺损伤是造成早产儿高死亡率及致残率的主要原因之一，严重影响了患儿的生存质量。

本课题组通过分离培养孕 20 d-21 d 早产大鼠的 AEC II 细胞，构建 AEC II 高氧损伤模型，研究 C/EBP α 与肺泡表面活性蛋白的相关性。然后通过质粒转染人 AEC II 细胞株，转染 C/EBP α ，使细胞过表达 C/EBP α 基因，通过检测肺泡表面活性物质的表达、细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡情况，探讨 C/EBP α 对高氧 AEC II 损伤的保护，从而为研究高氧肺损伤及支气管肺发育不良等肺部疾病提供理论技术支持。

1.2 主要研究内容和技术路线图

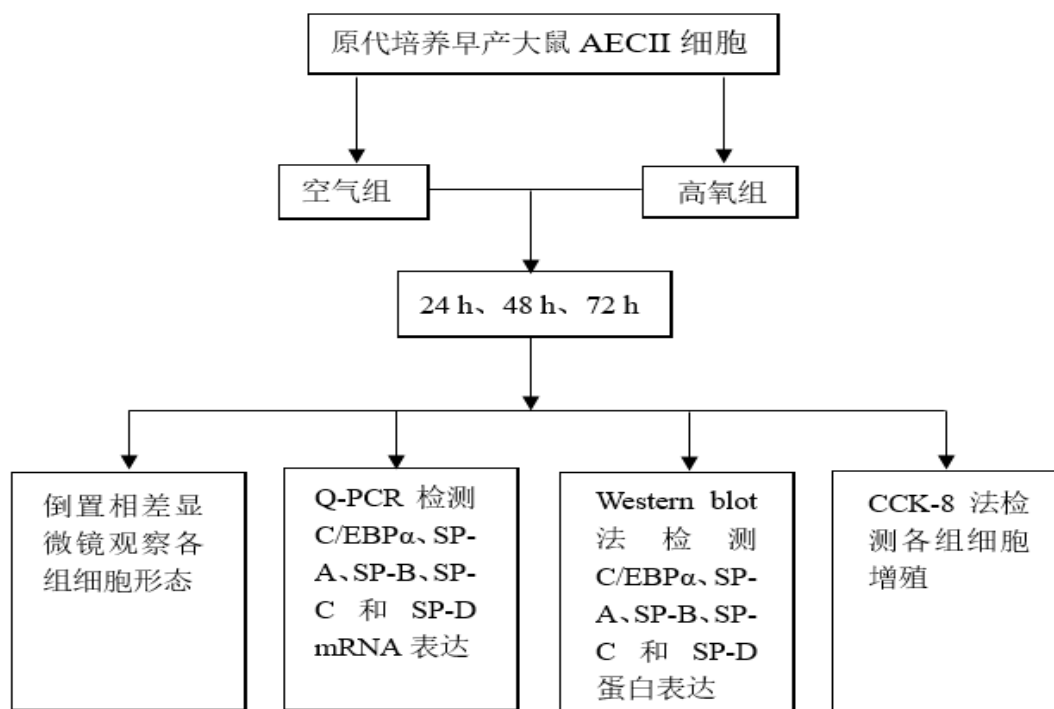
1.2.1 主要研究内容

(1) 剖宫取出早产大鼠，分离纯化 AEC II 细胞，进行原代培养。利用 95% O₂ 构建高氧损伤细胞模型，使用倒置相差显微镜观察各组 AEC II 细胞的形态变化。

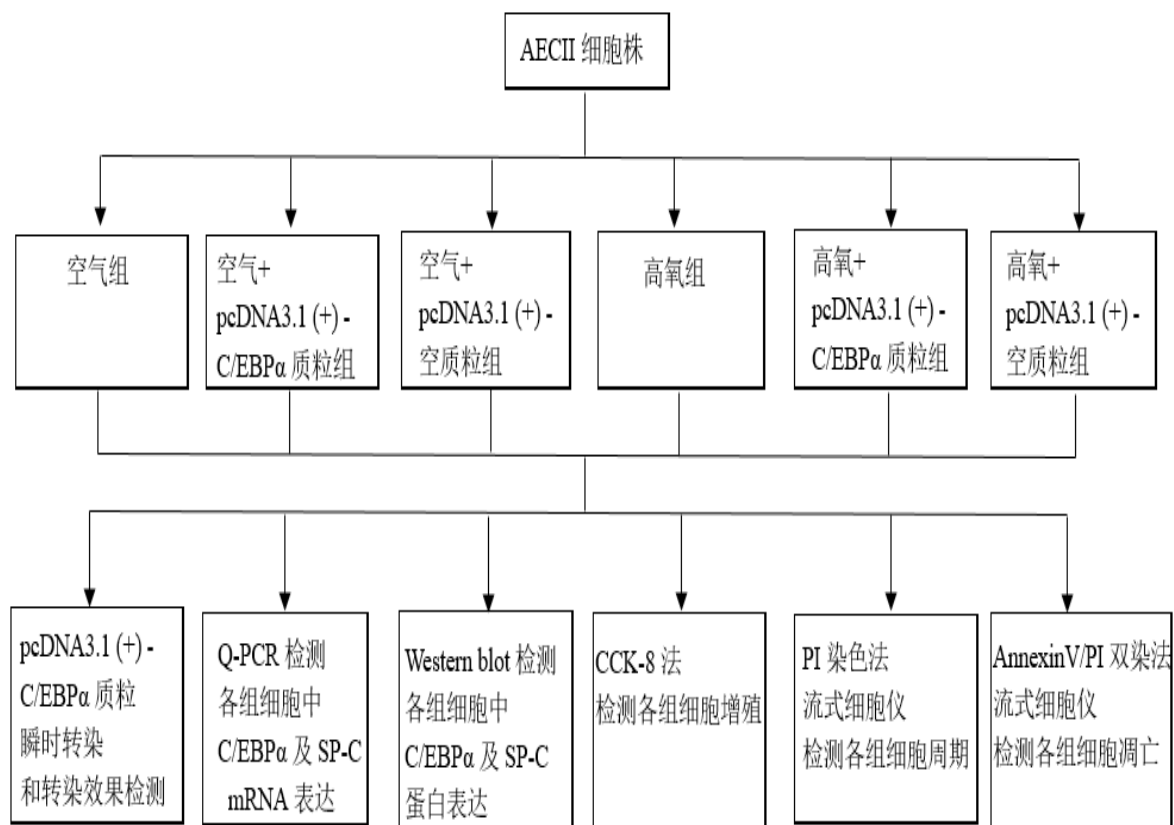
(2) 研究高氧暴露后 AEC II 细胞中 C/EBP α 和 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 的表达及两者相关性。空气及高氧暴露 24 h、48 h、72 h 后，运用 Q-PCR 及 Western blot 法分别检测 C/EBP α 和 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA 及蛋白水平；CCK-8 法检测细胞增殖。

(3) 探讨过表达 C/EBP α 对高氧暴露后 AEC II 细胞增殖、凋亡及 SP-C 表达的影响：采用 Lipofectamine2000 脂质体介导法对 AEC II 细胞进行 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒及 pcDNA3.1(+)-空质粒瞬时转染后，空气或高氧暴露 48 h 后，运用 Q-PCR 及 Western blot 法分别检测 C/EBP α 和 SP-C mRNA 及蛋白水平；CCK-8 检测细胞增殖；流式细胞术检测细胞周期，Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡。

1.2.2 技术路线图



第一部分技术路线图



第二部分技术路线图

第二章 高氧暴露对早产大鼠肺泡 II 型上皮细胞 CCAAT 增强子结合蛋白 α 和肺泡表面活性蛋白的影响

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿常见的慢性肺部疾病^[8]。通过观察肺泡上皮的损伤状况,可判断出 BPD 病情的严重程度,同时为了解 BPD 预后情况提供理论支持^[9,10]。AEC II 细胞在肺发育及损伤修复过程中占据重要地位,其损伤程度与 BPD 严重程度密切相关^[11,12]。近年来研究发现,C/EBP α 作为肺发育及成熟所必需的转录因子,主要表达于 AEC II 及终末细支气管^[13-15]。本研究通过原代培养早产大鼠 AEC II,建立高氧细胞损伤模型,探讨高氧暴露,对 AEC II 的 C/EBP α 表达和肺泡表面活性蛋白分泌情况,C/EBP α 和肺泡表面活性蛋白两者之间的相关性。了解高氧肺损伤中 C/EBP α 可能发挥的作用,为临床中 BPD 患儿的防治提供新的科研思路。

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自于江苏大学实验动物中心 (许可证号: SYXK (苏) 2008-0024, SPF 级别)。雌性 SD 大鼠体质量 200-220 g, 雌性 SD 大鼠体质量 220-250 g。按雌雄 3:1 比例合笼交配, 第 2 d 取雌鼠阴道分泌物涂片, 显微镜下检测到精子, 记为孕第 1 d。在孕 20 d-21 d 时, 行剖宫产术取出胎鼠, 用于实验。

2.1.2 主要试剂

主要试剂	公司
DMEM/F12 培养基	Hyclone 公司
胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)	Sera Pro 公司
胰蛋白酶、Trizol 裂解液	Invitrogen 公司
逆转录试剂盒	TaKaRa 公司
SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒	TaKaRa 公司
C/EBP α , SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 上、下游引物	上海生工生物工程有限公司
β -actin 上、下游引物	上海生工生物工程有限公司
山羊抗大鼠 C/EBP α 多克隆抗体	Santa Cruz 公司
兔抗大鼠 SP-B 多克隆抗体	Santa Cruz 公司
兔抗大鼠 SP-C 多克隆抗体	Santa Cruz 公司
兔抗大鼠 SP-A 多克隆抗体	LifeSpan BioSciences 公司
兔抗大鼠 SP-D 多克隆抗体	Bioss 公司
兔抗大鼠 β -actin 抗体	Cell Signaling Technology 公司
辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊 IgG	南京福麦斯公司
HRP 标记的小鼠抗兔 IgG	南京福麦斯公司
苯甲基磺酰氟 (PMSF)	北京康为世纪公司
SDS-PAGE 配胶试剂盒	北京康为世纪公司
青/链/两性霉素、RIPA 裂解液	北京康为世纪公司
二辛可宁酸(BCA)蛋白质定量试剂盒	北京康为世纪公司
5 \times loading buffer、蛋白酶抑制剂及 Marker	北京康为世纪公司
CCK-8 细胞增殖试剂盒	Biosharp 公司
氯仿、甲醇、氯化钠、异丙醇等试剂	华东器化玻有限公司

2.1.3 主要试剂的配制

2.1.3.1 PBS 溶液: 将称量好的 NaCl: 8 g, KCl: 0.2 g, Na₂HPO₄•12H₂O: 3.49 g, KH₂PO₄: 0.2 g, 倒入盛有 900 ml 双蒸水的烧杯中, 放在磁力搅拌器上搅拌均匀, 后定容至 1 L, 将配好的 PBS 分装至玻璃瓶中, 高压灭菌后放入 4℃ 冰箱保存, 以备后续实验。

2.1.3.2 4%多聚甲醛: 将称取好的多聚甲醛: 40 g, 倒入盛有 900 ml PBS 溶液的容器内, 置于磁力搅拌器上, 设置温度为 60℃, 滴加适量 1.0 mol/l NaOH 溶液, 使溶质完全溶解, 并使溶液变成清晰状态, 继续加入 PBS 溶液定容至 1 L, 置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.3 水合氯醛溶液: 将称取好的水合氯醛: 8 g, 倒入盛有 100 ml 去离子水的烧杯中, 而后使溶质完全溶解, 利用过滤器过滤除菌, 最后分装备用。

2.1.3.4 5×电泳缓冲液: 将称量好的 Tris 碱: 15.15 g, 甘氨酸: 94 g, SDS: 5 g, 倒入清洁的烧杯中, 加入适量的双蒸水, 然后将烧杯放在磁力搅拌器上搅拌, 待溶液完全溶解后, 用双蒸水定容至 1 L, 然后用玻璃瓶分装, 放置在 4℃ 冰箱保存备用。

2.1.3.5 1×电泳缓冲液: 选取合适的量筒, 量取 100 ml 5×电泳缓冲液及 400 ml 双蒸水, 在量筒顶端套上薄膜手套, 上下颠倒量筒使溶液充分混匀, 后置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.6 10×转膜液: 将称取好的 Tris 碱: 30.285 g, 甘氨酸: 144 g, 倒入清洁的烧杯中, 加入适量的双蒸水, 然后将烧杯放在磁力搅拌器上搅拌, 待溶液完全溶解后, 用双蒸水定容至 1 L, 然后用玻璃瓶分装, 放置在 4℃ 冰箱保存备用。

2.1.3.7 1×转膜缓冲液: 在 1 L 的量筒中加入 100 ml 10×转膜液, 再次加入适量加入双蒸水混合, 最后加入 200 ml 甲醇, 最终加入双蒸水定容至 1 L, 在量筒顶端套上薄膜手套, 上下颠倒量筒使溶液充分混匀, 后置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.8 10×TBS 洗脱液: 将称取好的 NaCl: 80 g, KCl: 2 g, Tris 碱: 30 g, 倒入清洁的烧杯中, 加入适量的双蒸水, 然后将烧杯放在磁力搅拌器上搅拌, 待溶液完全溶解后, 在烧杯中滴加适量浓盐酸调节酸碱度, 使 pH 值维持在 7.4, 最后加入双蒸水定容至 1 L 后分装至玻璃瓶中, 置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.9 1×TBST 洗脱液: 选取合适的量筒, 量取 100 ml 10×TBS 洗脱液, 后加入

900 ml 双蒸水定容至 1 L, 加入 1 ml Tween 20, 在量筒顶端套上薄膜手套, 上下颠倒量筒使溶液充分混匀, 配制完毕后分装至玻璃瓶中以备后续实验需要。

2.1.3.10 一抗稀释液: 将称取好的 BSA: 1 g, NaN₃: 0.01 g, 加入 50 ml 1×TBST 洗脱液充分摇匀, 后置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.4 主要设备和器材

设备器材	公司
体式显微镜	上海麦聚瑞电子仪器有限公司
倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司 (Olympus IX50 型)
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司 (型号 21R)
手术剪、手术镊等手术器械	上海手术器械厂
可调式移液器 (各种规格)	德国 Eppendorf 公司
-20℃、-80℃冰箱	美国 Thermo 公司
电子分析天平	中国赛多利斯有限公司 (型号 BSA224S)
超净工作台	苏州长桥净化设备厂
荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
CYS-1 数字测氧仪	上海嘉定学联仪表厂
超纯水分离器	青岛富勒姆公司 (型号 FCR2002-UF)
细胞培养箱	德国 Thermo 公司
多功能酶标仪	美国 Biotek 公司
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
高压灭菌锅	东中泰医疗器械有限公司
电动脱色摇床	金坛市医疗仪器厂
超净台	苏州净化设备厂
漩涡振荡器	常州金坛医疗仪器厂
磁力加热搅拌器	江苏中大仪器厂
电热鼓风干燥箱	重庆试验设备厂
电热隔水式恒温培养箱	上海更发制药设备有限公司
水平凝胶电泳槽	美国 pac-300 Bio-Rad 公司
蛋白电泳转移装置	美国 Bio-Rad 公司

凝胶成像及分析系统	美国 Gene 公司
紫外分光光度计	德国 Beckman 公司
细胞培养板、培养皿、培养瓶	美国 Corning 公司
八连管、枪头、EP 管、96 孔板等	美国 Thermo 公司

2.2 实验方法

2.2.1 AEC II 的分离、纯化与培养

2.2.1.1 AEC II 的分离

选用孕 20 d-21 d 的 SD 大鼠，腹腔注射水合氯醛麻醉，麻醉后，用 75%酒精消毒后，移入超净台。迅速取出胎鼠，将胎鼠置于无菌培养皿中，在冰盒或冰上分离胎肺组织，置于预冷的 PBS 溶液中，尽量剔除非肺组织，清洗 2-3 次，用眼科剪将肺组织剪为 1 mm³ 左右的组织碎块，尽量操作迅速，以免影响细胞活性。并用高压灭菌后的 PBS 溶液清洗剪碎的组织碎块，直至上清液清亮为止。加入 0.25%胰酶溶液清洗剪碎的组织碎块，注意把握时间，在显微镜下观察发现大部分组织碎块被消化为细胞悬液后加入含有血清的 DMEM/F12 完全培养基及时终止消化，然后使用移液器轻轻吹打细胞悬液，最后使用不锈钢筛网过滤细胞悬液。将过滤后的细胞悬液转移至离心管中，旋紧离心管盖子，将离心管转移至提前预冷好的离心机中，4℃ 1500 rpm/min，离心 5 min，用移液器小心吸掉上清，收集沉淀^[16]。

2.2.1.2 AEC II 的纯化

用完全培养基将收集的细胞沉淀重悬起来，用移液器将细胞悬液转移至无菌的离心管中，于 4℃ 1000 rpm/min 离心机下离心 5 min，轻轻吸弃掉上清液，再次收集沉淀。向沉淀中加入约 10-15 ml 的 0.1%胶原酶，约消化 15 min 左右。在离心管内后加入等量含血清的 DMEM/F12 完全培养基终止消化，用移液器将细胞充分混匀后，再次置于离心机内，4℃ 1000 rpm/min 下离心 5 min，小心去掉上清，收集细胞沉淀。将细胞沉淀再次用含血清的 DMEM/F12 完全培养基重悬，注意调整细胞浓度，使 50 ml 的培养瓶中的细胞浓度为 1-2×10⁷/ml，将培养瓶置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 30-40 min 后，用移液器将未贴壁的细胞 (AEC II) 悬液吸出，置于离心机下，800 rpm/min 离心 5 min，吸掉上清液，尽量吸净，将沉淀再次用完全培养基重悬，接种至新的培养瓶中，注意重复该步骤，至少 3-4

次。最后使用细胞计数器，将经过反复多次的细胞悬液浓度调整至 $1.5-2 \times 10^6/\text{ml}$ ，接种至新的培养瓶中，置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 15-18 h 后，此时贴壁的即为纯的 AEC II 细胞。

2.2.1.3 AEC II 的培养

将纯化的 AEC II 细胞置入新的培养瓶中，置于 37°C 5% CO_2 培养箱，每天更换新鲜的完全培养基，或根据情况及时更换培养基，并用显微镜观察细胞形态和基本生长状况，及时了解细胞状态。正常情况下，AEC II 细胞呈多边形或立方形，岛状生长，若细胞发生形态学改变，及时弃掉变异及分化的细胞。将活力良好的 AEC II 细胞作为后续实验材料。

2.2.2 AEC II 高氧细胞损伤的模型建立及分组

将生长状态良好的 AEC II 细胞接种至培养瓶中，大约培养 15 h 后，细胞可贴壁，用移液器轻轻吸掉瓶中培养液。加入含有 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基，5 ml/瓶。尽量使每瓶细胞的数量大致形同。并随机将 AEC II 细胞分为空气组和高氧组。打开通气装置，在高氧组的培养瓶中通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体，使通气的速度保证为 3 L/min，注意保证通入混合气体的时间持续 10 min，而后迅速密封培养瓶。空气组不给予任何刺激。两组细胞均置于 37°C 5% CO_2 培养箱中。分别培养 24 h、48 h、72 h，注意尽量每隔 24 h 更换新鲜培养基，更换完毕培养基后，高氧组再次按照上述方法通入高纯混合气体。高氧组使用 CYS-1 数字式测氧仪检测各个培养瓶中的氧含量，弃去含氧量低于 90% 的培养瓶，收获各组细胞以备后续检测。

2.2.3 倒置相差显微镜观察 AEC II 状态及改变

分别于 24 h、48 h、72 h 各个时间点，将所有培养瓶置于倒置相差显微镜下，观察空气组和高氧组各组 AEC II 细胞的状态及改变。

2.2.4 Q-PCR 检测各组细胞中相应 mRNA 的表达

2.2.4.1 引物合成

各组引物均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 相关引物序列如下：

基因	引物序列	产物大小
C/EBP α	Forward:5'-GGTGGACAAGAACAGCAACG-3'	124bp
	Reverse:5'-GGTCAGCTCCAGCACCTTCT-3'	
SP-A	Forward: 5'-CCCTGGAGAGTGTGGAGAGA-3'	614bp
	Reverse: 5'-TGTCTAAAGTCGTGGAGTGTGG-3'	
SP-B	Forward: 5'-ACGA CTACTTCCCCCTGGTC-3'	298bp
	Reverse: 5'-TCTGACATCCCTGGCTCCT-3'	
SP-C	Forward:5'-TTACCACTGCCACCTTCTCC-3'	139bp
	Reverse:5'-TCAAGACTGGGGATGCTCTC-3'	
SP-D	Forward: 5'-GGACAATGGCTCTG TTGGAG-3'	267bp
	Reverse: 5'-TCCTATG TTCCCCTGCTTCC-3'	
β -actin	Forward:5'-GCAGAAGGAGATTACTGCCCT-3'	136bp
	Reverse:5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'	

2.2.4.2 细胞 RNA 的提取

采用 Trizo1 步法提取 AEC II 的总 RNA。步骤如下:

(1) 用移液器吸掉培养瓶中培养基, 尽量吸净, 用预冷的 PBS 溶液清洗培养瓶至少 2-3 遍, 最后吸净培养瓶中的 PBS 溶液。

(2) 在培养瓶中加入 1 ml Trizol, 用移液器反复抽吸至细胞均从瓶壁上脱落, 匀浆后将悬液转入无 RNA 酶的离心管中, 室温放置 5-10 min, 注意操作过程中做好防护措施。

(3) 在上述离心管中加入氯仿 0.2 ml (0.2 ml 氯仿/1 ml Trizol), 密封离心管, 置于涡旋振荡器剧烈振荡 15-30 s, 室温放置 5-10 min, 然后置于 4℃ 12000 rpm/min 离心机下离心 10-15 min。

(4) 将离心管内上层水溶相转移至新的无 RNA 酶的离心管中, 吸取等体积的异丙醇, 轻轻颠倒离心管, 注意动作要轻柔, 使离心管内的液体充分混合均

匀，室温放置 10 min，然后置于事先预冷好的离心机中，4℃ 12000 rpm/min 下离心 10 min，沉淀于管底的白色物质即为 RNA。

(5) 吸弃离心管中上清液，留取管底的白沉淀 (RNA)，加入预冷的 75% 乙醇 1 ml，漂洗 RNA，用移液器轻柔吹打均匀，于 4℃ 7500 rpm/min 离心机下离心 5 min，重复漂洗一次。

(6) 弃掉清液，用移液器尽量吸尽离心管内液体，将含有 RNA 的离心管转移至超净台内，干燥沉淀。

(7) 用适量 DEPC 水 (约 15-20 ml) 溶解沉淀。

(8) 取上述所提取的 RNA 样本，利用紫外分光光度计测量 RNA 浓度及纯度。首先用移液器取 1 μ L DEPC 水溶液对一起进行调零，调零后用移液器取 1 μ L RNA 待测样本置于仪器中，检测 RNA 浓度，及 A260/A280 nm 值，该值在 1.8-2.0 范围内时，说明该次提取的 RNA 标本纯度合格。每个样本重复检测三次以上，取平均值。检测合格标本以备后续实验。

(9) RNA 保存：取适量 RNA 样品进行逆转录，逆转录为 cDNA。将其余样品置于 -80℃ 冰箱内保存。

注意：整个操作过程需全程佩戴一次性口罩及帽子，及时更换薄膜手套，所需离心管、枪头等均应严格无 RNA 酶，所有操作步骤均应严格规范。所得合格 RNA 样本避免反复冻融。

2.2.4.3 RNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

所有步骤均严格按照试剂盒说明操作。

(1) 去除基因组 DNA:

尽量在冰盒内或冰上配制反应混合液 (避免反应液失效)，为使所量取的反应混合液体积准确。进行各项反应时，首先使混合液混合均匀，并尽量使混合液的量多于反应所需量，然后再依次分装到各个反应管中，最后加入 RNA 样本。

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
Total RNA	*
RNase Free dH ₂ O	定容至 10.0 μl
总反应体系	10.0 μl

注：*10 μl 反应体系中 0.3 μg 的总 RNA。根据检测样本的 RNA 浓度计算质量为 0.3 μg RNA 的体积。

该混合体系室温反应 5 min，最长可以延长至 30 min。

(2) 逆转录反应：

进行各项反应时，尽量在冰盒内或冰上进行，为使所量取的反应混合液体积准确。进行各项反应时，首先使混合液混合均匀，并尽量使混合液量多于反应所需量，然后再依次分装。轻柔混匀后立即进行逆转录反应。

反应试剂	使用量
步骤(1)的反应液	10.0 μl
PrimeScriptRT Enzyme Mix I	1.0 μl
RT Primer Mix	1.0 μl
5×PrimeScriptBuffer2 (for Real Time)	4.0 μl
RNase Free dH ₂ O	4.0 μl
总反应体系	20.0 μl

反应混合液混匀后，短暂离心，后置于逆转录仪器中，设置反应参数为：37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 5 min。反应结束后得到产物进行下一步 PCR 反应或于 -20℃ 冰箱保存备用。

(3) Q-PCR 反应：

按照下表中各试剂的含量配制 PCR 反应液，所有操作冰盒内或冰上进行。

试剂	使用量
SYBR®PremixEx TaqII(Tli RNaseH Plus) (2 \times)	12.5 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
cDNA溶液	2 μ l
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	8.5 μ l
总反应体系	25.0 μ l

注意:

①一般情况下引物终浓度为 0.4 μ M 时可达到较好的实验结果。可以在 0.2-1.0 μ M 范围内调节引物浓度。

②在操作过程中在冰盒内或冰上进行,且尽量避光进行该部分操作。

按照下表中的两步法进行 Q-PCR 反应。所有的操作步骤均按照试剂盒中所提供的说明书进行。反应条件如下:

反应条件		
第一步: 预变性	94 $^{\circ}$ C; 4 s	
第二步: PCR 反应	95 $^{\circ}$ C; 5 s	40 循环
	60 $^{\circ}$ C; 30 s	

(4) Q-PCR 结果分析:

读取 CT 值,每个标本重复至少 3 次以上,求取平均值。以 β -actin 作内参,将所得数据使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法对进行分析。

2.2.5 Western blot 法检测各组细胞中相应蛋白的表达

2.2.5.1 细胞内总蛋白的提取:

(1) 取各组细胞,所有培养瓶均置于冰上,每瓶细胞加约 3 ml 左右预冷的 PBS 溶液轻轻晃动培养瓶,以洗涤细胞。然后弃去洗液,共洗细胞三次以上以洗净培养瓶中培养基,将 PBS 溶液弃尽后(尽量吸净培养瓶内的 PBS 溶液),再次将培养瓶置于冰上,以防蛋白质分解。

(2) 按照 1ml 裂解液(RIPA 裂解液)加 10 μ l PMSF (100 mM),混匀细胞

裂解液，置于冰上预冷。

(3) 用移液器将 400 μl 含 PMSF 的裂解液加至培养瓶内，在冰盒或冰上裂解 20-30 min。注意定期晃动培养瓶。

(4) 待细胞裂解结束后，将培养瓶置于冰盒或冰上，用干净的细胞刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧，然后用移液器将碎片和裂解液转移至离心管内。

(5) 将离心管，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm/min 离心机下离心 5-10 min。

(6) 取出离心后的离心管，将离心上清液分装转移至 0.5 ml 离心管中，并放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

注意：有时为使蛋白质性状更稳性，及在后续 Western blot 实验中便于观察，将每个收集好的蛋白加入适量 Loading Buffer，混匀后并于水浴锅中煮沸 8 min。

2.2.5.2 BCA 法测定蛋白浓度

(1) 稀释BSA标准品：用PBS溶液按照下表稀释BSA标准品。

管号	稀释液用量 (μl)	BSA标准品用量 (μl)	BSA标准品最终浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
A	0	100	2
B	200	200	1
C	200	200 (从B管中取)	0.5
D	200	200 (从B管中取)	0.25
E	200	200 (从B管中取)	0.125
F	200	200 (从B管中取)	0.0625
G	200	0	0 (空白)

(2) 配制BCA工作液：

根据试剂盒的说明书计算出BCA工作液总量。

根据样本数算所需出的BCA工作液总量，按照50:1的比例将BCA-A和BCA-B混匀，配制BCA工作液。

(3) 定量检测

按照上表，将稀释好的BSA标准品和所提取的蛋白样品，用移液器分别吸取 25 μl 分别加至96孔板中，注意在加样过程中尽量避免产生气泡，每个要测定的样本做至少2-3个副孔。

每孔加入200 μ l BCA工作液, 注意尽量避光, 用移液器上下吹打, 充分混匀, 避免气泡, 盖上班盖, 于37 $^{\circ}$ C培养箱内孵育30 min, 再次使温度降至室温, 用酶标仪在540 nm处检测, 测定每个蛋白样品及BSA标准品的吸光值, 根据所绘制的标准曲线, 来计算样品中蛋白的浓度。

注意:

① BCA 蛋白定量法在蛋白定量及测定蛋白浓度中应用较为广泛。注意蛋白浓度取决于混合液颜色的深浅, 可根据酶标仪所得数据的大小来判定所测蛋白的浓度。

②标准品与待检测蛋白样品的稀释液必须保持一致。

③ 酶标仪所得的数值会受到检测时间的影响, 为了使检测结果更准确, 尽量在较短时间内对所有检测样本检测完成。

2.2.5.3 制备 SDS-PAGE 凝胶

所有操作均严格按照说明书进行。

首先清洗玻璃板, 检测两块玻璃板之间漏水程度, 并且准备各种实验试剂、耗材及设备。

SDS-PAGE: 配制 12%分离胶及 5%浓缩胶如下表:

试剂	12%分离胶	5%浓缩胶
去离子水	1.75 ml	1.14 ml
30%Acr-Bis (29:1)	2.0 ml	0.34 ml
SDS-PAGE Stacking Gel Buffer(4 \times)	1.25 ml	0.5 ml
10%APS	0.05 ml	0.02 ml
TEMED	0.002 ml	0.002 ml
总量	5.0 ml	2.0 ml

将分离胶加至两层玻璃板间隙中间, 注意为浓缩胶留取适定的部分空间。分离胶上缓缓加入去离子水压线, 室温静置约 30 min 后发现聚合完成后 (在分离胶与去离子水之间可发现一条清晰的分界线), 轻轻倒掉上层覆盖的去离子水, 并在上层加入 5%浓缩胶。加入浓缩胶后, 立即插入清洗干净的梳子, 避免产生气泡, 在室温下聚合 30 min 左右, 发现梳子的上样孔处与分离胶之间因浓缩出现缝隙后, 将玻璃板放置在电泳槽中, 使用去离子水检测电泳槽是否漏液。

2.2.5.4 蛋白质电泳

(1) 上样：垂直拔出梳子，尽量动作轻柔，避免使胶体破坏。用移液器取蛋白样品 30 μg 及 Marker (3-4 μl)，按照预定顺序，缓慢加样，避免样品漏出，在两端加入 loading buffer 压线。

(2) 电泳：电泳开始时，设置电压为 80 V，待 Marker 跑开数条条带后，再次上调电压至 120 V，继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部后，终止电泳。

(3) 转膜：准备裁剪适量大小的 PVDF 膜，在适当位置做好标记，使用甲醇溶液将 PVDF 膜激活。同时准备滤纸及垫片。并将滤纸及垫片浸入转膜液中。取出电泳完成后的玻璃胶板，轻轻拆开，根据蛋白 Marker 显示的分子量，切取相应的蛋白质胶条，置入转膜液中。安装转膜装置，按照从正极到负极依次为：多孔垫片、滤纸、PVDF 膜、蛋白凝胶、滤纸和多孔垫片的顺序逐层摆放，及时用刮棒驱除滤纸、凝胶、PVDF 膜上的气泡。轻轻合上转膜夹，将转移夹放入转移盒中，装满转膜液，恒流 350 mA，加冰盒，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 转移 120 min。

(4) 蛋白质印迹：转膜结束后，打开转移夹子，尽量小心迅速的取出 PVDF 膜，置于事先用 TBST 溶液配制好的含 5% 奶粉的封闭液中（注意速度，避免膜干燥）。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中，设置转速为 60 转，封闭 1 h。封闭结束后用 TBST 轻摇洗涤 5 min，重复该洗涤步骤 3 次。将封闭好的 PVDF 膜置于相应的一抗中孵育，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育 12 h，取出 PVDF 膜，回收一抗，再次用 TBST 室温洗 PVDF 膜，每次清洗 15 min，重复 3 次。清洗完一抗后，加入相应使用 TBST 稀释好的二抗，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中，设置转速为 60 转，孵育 1 h。待孵育二抗结束后用 TBST 轻摇洗涤 5 min，重复 3 次。用 ECL 显色液显示蛋白条带。

(5) 用 ECL 显色液显示蛋白条带，首先配制 ECL 显色液，按照 1:1 取 A 液及 B 液置于避光的离心管中，混匀备用，将显色液均匀涂抹到 PVDF 膜，使用凝胶分析成像系统扫描并呈像（整个过程需要避光操作）。

(6) 用凝胶分析成像系统扫描并分析，以 β -actin 作内参，将所得图像采用 LANE-ID Analyzer 软件进行相对定量分析。

2.2.6 CCK-8 法检测各组细胞的增殖

CCK-8 试剂盒是广泛应用于细胞增殖的检测。细胞增殖的越多越快，检测试剂的颜色越深，且颜色的深浅和细胞数目呈正相关。

(1) 将各组 AEC II 细胞分别接种于 96 孔板中, 按照每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 每孔约含 5000 个细胞。向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 与此同时并设置空白对照组 (等量的细胞培养基和 CCK-8), 空白对照组不含细胞, 注意用移液器使混合液充分混匀, 注意避免产生气泡。注意: 在 96 孔板最外一圈加入适量 PBS 溶液, 防止在实验操作过程中发生蒸发问题。

(2) 将混匀后 96 孔板置于细胞培养箱内, 注意加入 CCK-8 后尽量避光, 孵育 2 h, 后取出 96 孔板至冷却至室温。

(3) 用酶标仪测定 OD 值, 检测波长为 450 nm。

2.3 统计学分析

将实验所得的数据使用 SPSS17.0 进行统计学分析, 其中计量资料结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较采用 t 检验; 所得结果两者之间的相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.4 实验结果

2.4.1 高氧暴露对 AEC II 细胞生长状况的影响

使用倒置相差显微镜观察所示, 空气组 AEC II 细胞生长状态良好, 且贴壁较牢固, 细胞形态呈多边形或立方形, 岛状生长, 当培养至 72 h, 死亡漂浮细胞无明显增多趋势, 同时细胞之间的连接愈来愈紧密。而高氧组细胞从培养 24 h 后发现, 细胞贴壁能力较空气组下降, 细胞形态呈不规则生长, 细胞变得细长, 于 72 h 时, 细胞形态更加不规则, 可见部分细胞脱壁, 死亡漂浮细胞呈逐渐增多趋势 (图 2.1)。

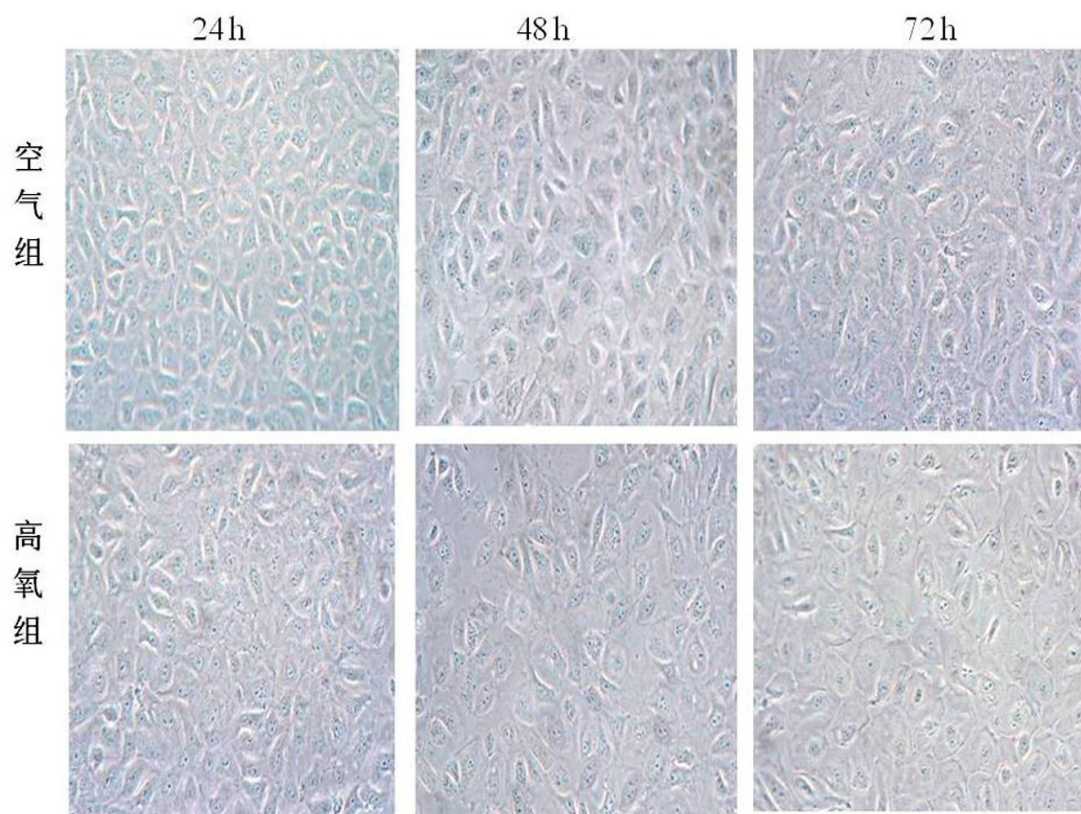


图 2.1 空气组和高氧组 AEC II 形态 (倒置相差显微镜, $\times 100$)

Fig 2.1 morphological changes of the AEC II in air groups and hyperoxia groups (inverted phase contrast microscope, $\times 100$)

2.4.2 高氧暴露对 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA 表达的影响

采用 Q-PCR 法检测高氧暴露后 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA 表达水平的变化。空气组 C/EBP α mRNA 表达随培养时间的延长逐渐降低, 而 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 表达水平逐渐升高; 在培养 24 h 及 72 h, 与同一时间点空气组细胞相比较, 高氧组 AEC II 中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 表达均降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。高氧组 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 表达呈先递增后递减趋势, 在培养 48 h, 高氧组细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 表达水平较同一时间点

空气组细胞均有升高趋势，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图 2.2)。

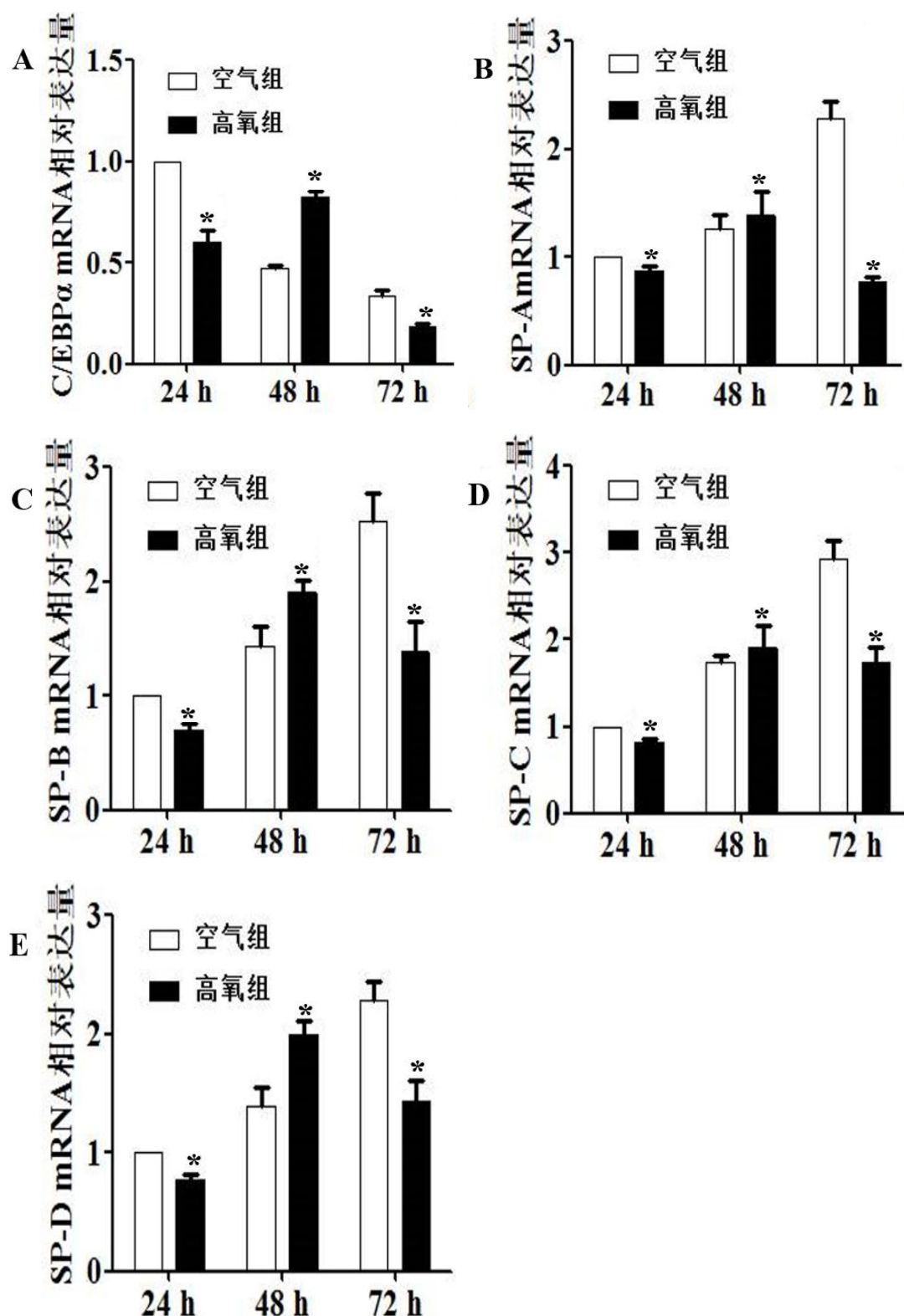


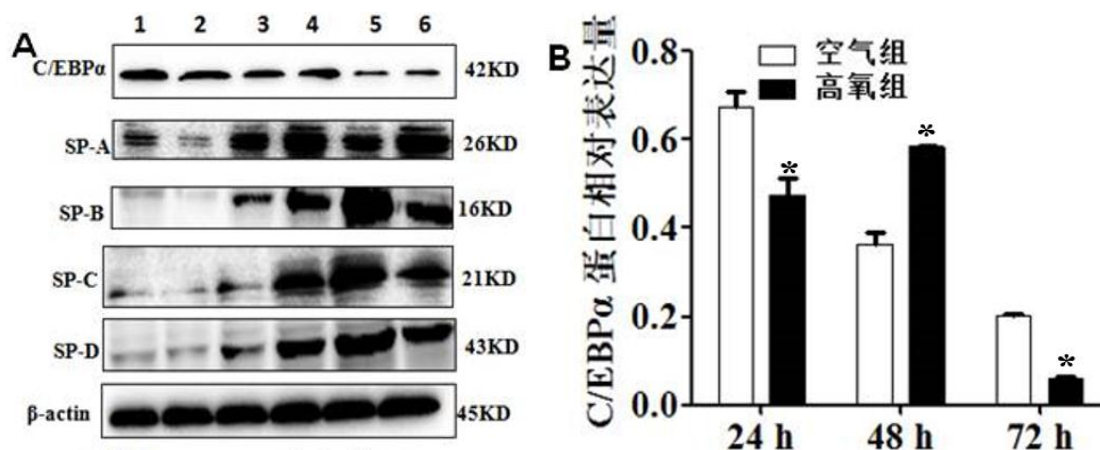
图 2.2 各组 AECII 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 表达

Figure 2.2 Expressions of C/EBP α , SP-A, SP-B, SP-C and SP-D mRNA in AECII s

* $P < 0.05$ vs 同时间点空气组。

2.4.3 高氧暴露对 AEC II 细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法检测高氧暴露后 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D 蛋白表达水平的变化。分别于培养的 24 h、48 h、72 h 提取空气组及高氧组 AEC II 细胞的总蛋白。结果显示随培养时间延长，空气组 C/EBP α 蛋白表达逐渐降低，空气组 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白表达逐渐升高。在培养 24 h 及 72 h，与同时间点空气组细胞相比较，高氧组 AEC II 中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D mRNA 蛋白表达水平均低于空气组，差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。高氧组 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白表达呈先递增后递减趋势。在培养 48 h，高氧组细胞中 C/EBP α 、SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白含量较同一时间点空气组细胞均有增高趋势，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图 2.3)。



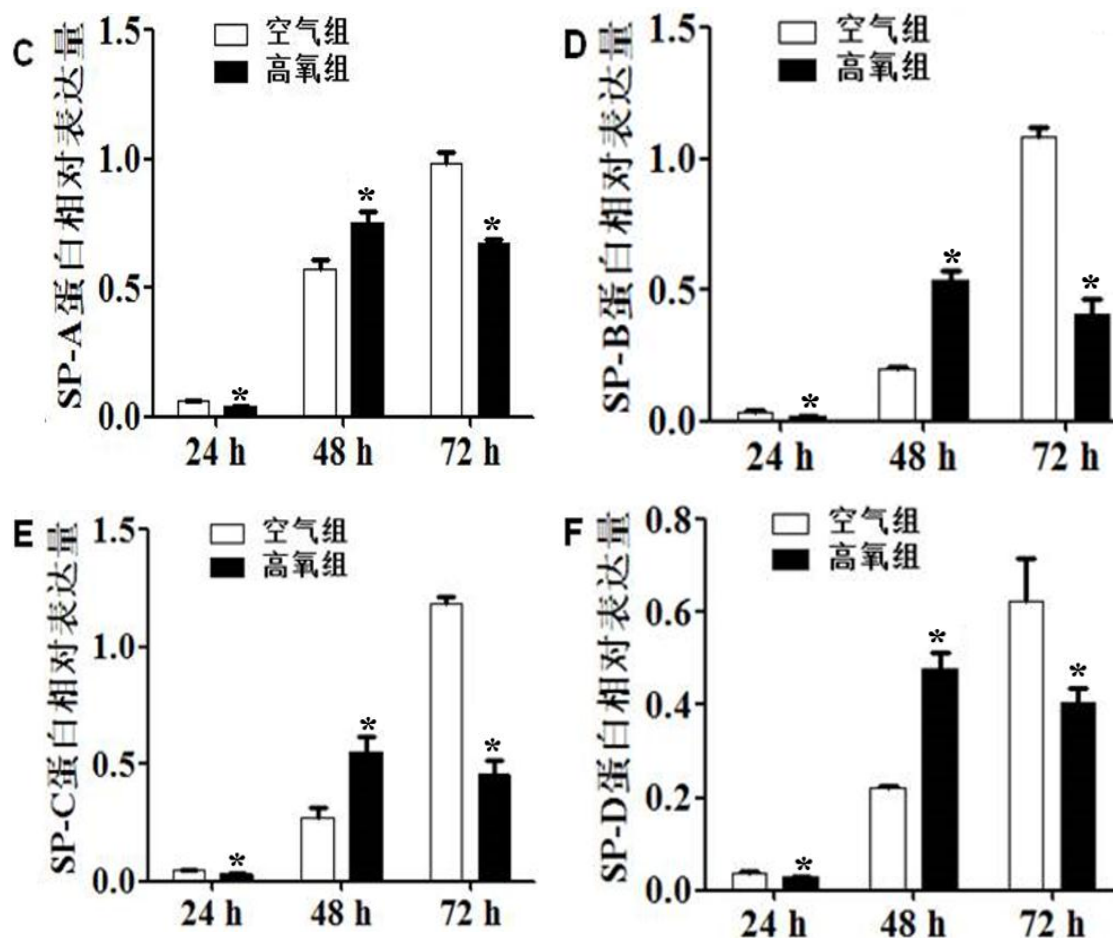


图 2.3 Western blot 法检测各组 AEC II 中 C/EBP α 和 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白表达

Figure 2.3 The expression of C/EBP α , SP-A, SP-B, SP-C and SP-D protein levels in AEC II s

A: Western blot 法检测 AEC II 中 C/EBP α 和 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白表达

各泳道分别为(1: 空气组 24 h; 2: 高氧组 24 h ; 3: 空气组 48 h; 4: 高氧组 48 h; 5: 空气组 72 h; 6: 高氧组 72 h)

B-F: AEC II 中 C/EBP α 和 SP-A、SP-B、SP-C 及 SP-D 蛋白的半定量分析

* $P < 0.01$ vs 同时间点空气组。

2.4.4 高氧暴露对 AEC II 细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法检测 AEC II 细胞增殖。研究发现随着培养时间的延长, 空气组 AEC II 增殖不断增加; 而高氧组 AEC II 增殖呈先递增后递减的趋势, 在培养 24 h 与同时间点空气组相比较, 高氧组 AEC II 增殖略低于空气组, 在 72 h 明显低于同一时间的空气组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。而在 48 h 时细胞增殖能力明显高于同一时间点空气组。差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2.4)。

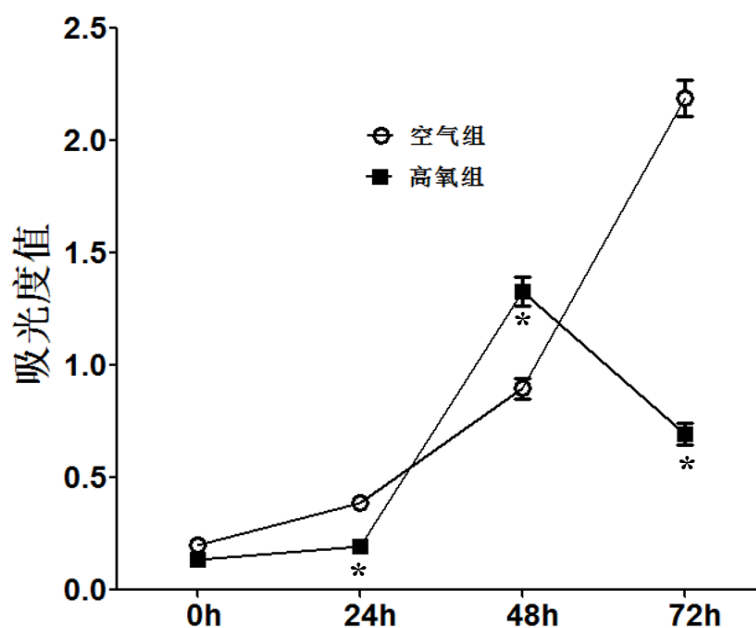


图 2.4 CCK-8 法检测各组 AEC II 增殖情况

Figure 2.4 Detection of proliferation of AEC II in each groups by CCK-8

注：* $P < 0.01$ vs 同时间点空气组。

2.4.5 相关性分析

通过 Pearson 相关分析，对高氧组 AEC II 细胞中 C/EBP α 蛋白表达水平分别与肺泡表面活性的蛋白表达及 AEC II 增殖之间的相关性。两者之间均呈正相关 ($r=0.96$ 、 0.98 、 0.92 、 0.97 、 0.90 ， $P < 0.01$ ，图 2.5)。

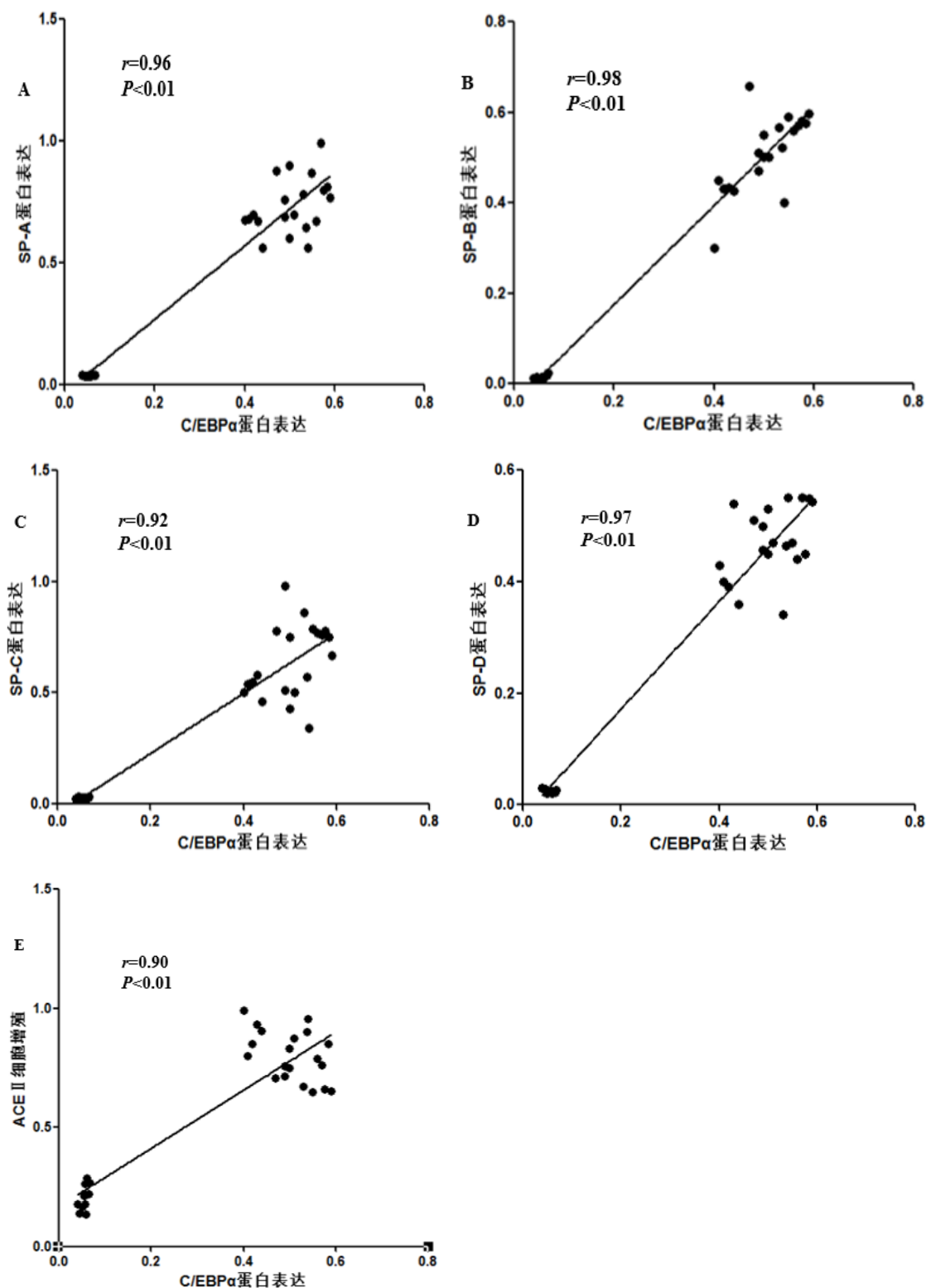


图 2.5 C/EBP α 蛋白表达与肺泡表面活性蛋白及细胞增殖的相关分析图

Figure 2.5 Correlation analysis between C/EBP α and pulmonary surfactant expression

2.5 讨论

ACE II 细胞作为高氧肺损伤的主要靶细胞,在肺发育及损伤修复过程中占据关键地位^[17]。早产儿由于多种脏器发育尚未完善,肺泡表面活性物质分泌不足,生后易合并呼吸窘迫,此时需要通过呼吸机辅助通气,且对氧气依赖明显,而长时间机械通气及用氧致使肺泡损伤和严重的局部炎症,且长期吸入高浓度氧增加 BPD 的发病率^[18-19]。考虑到高浓度氧气吸入及长时间对氧气依赖,极易造成肺损伤。本研究利用早产大鼠模型,构建高氧损伤 ACE II 细胞来模拟肺损伤状态,了解高氧对 C/EBP α 及肺泡表面活性蛋白表达的影响,同时为治疗 BPD 提供新的诊疗思路。

C/EBPs 家族属于碱性区亮氨酸拉链 (basic region-leucine zipper, bZIP) 蛋白家族, C/EBP α 作为重要的转录调控因子,在多种类型细胞有丝分裂的生长停滞和分化中发挥着关键作用^[20-21]。在孕后期肺发育及成熟过程中发挥关键作用,并且影响肺泡上皮细胞的增殖及分化等过程^[22]。许多研究表明, C/EBP α 在肺中高度表达,在许多组织的增殖和分化中发挥至关重要的作用^[23]。本研究发现,随培养时间延长,空气组 C/EBP α 表达呈逐渐递减趋势。在培养 24 h 及 72 h,与同一时间点空气组相比较,高氧组 AEC II 中 C/EBP α 表达水平低于空气组,而在培养 48 h,高氧组细胞中 C/EBP α 表达较同一时间点空气组细胞有增高趋势,随着高氧暴露时间的延长,高氧组 C/EBP α 表达呈先升高后下降的趋势。先前也有研究表明^[24,25],在高氧暴露后某一时间点, C/EBP α 表达显著增多。提示 C/EBP α 可能在生后肺泡上皮细胞损伤后修复过程中发挥保护调节作用,参与调节损伤早期代偿保护机制。

通过肺泡表面活性物质来保证一定的肺表面张力,避免肺泡发生萎缩塌陷,从而保证正常的肺泡通气及换气功能^[26]。本研究表明,随培养时间延长,空气组肺泡表面活性蛋白的表达及 AEC II 增殖逐渐升高;而在高氧组中呈先升高后降低的趋势。有研究表明高氧暴露早期,机体可通过某些途径,介导相关因子的表达,促使肺泡表面活性蛋白表达增加^[27]。早产儿本身肺泡表面活性物质分泌不足,且需要吸入高浓度氧气或长期对氧气依赖,易诱发高氧肺损伤^[28]。在高氧暴露初期,肺泡表面活性蛋白及细胞增殖能力可代偿性增加,提示机体早期对损伤具有一定自我保护机制。

C/EBP α 作为在肺发育关键的转录因子，在妊娠后期呼吸道上皮细胞增殖和分化过程中发挥重要作用^[29]。随着机体的发育成熟，在正常环境下，C/EBP α 基因缺失对机体无明显影响，甚至发现成年后小鼠肺内的C/EBP α 基因无特殊作用，甚至可删除该基因^[30,31]。本研究也有类似发现，提示正常环境下，随着肺组织的不断成熟，C/EBP α 在诱导 ACEII 分泌肺泡表面活性蛋白的能力逐渐减弱，Xu 等^[32]研究发现，删除 C/EBP α 基因，在正常情况下，没有观察到肺组织的异常，而在高氧暴露下，删除该基因的小鼠暴露于 95% 的氧气下，发现出现严重的肺部感染，且影响肺泡表面活性物质的分泌及脂质的代谢等方面。说明在应激状态下，C/EBP α 相关保护机制可能再次被激活而发挥重要作用。

综上所述，正常条件下，出生后 C/EBP α 缺失并不影响肺功能的正常表达。然而，在高氧状态下，C/EBP α 的表达与肺泡表面活性蛋白的分泌呈正相关，说明在高氧引起的肺损伤的期间，C/EBP α 可能对肺组织发挥保护作用。因此通过该研究，进一步了解过表达 C/EBP α 能否逆转高氧肺损伤，需要进一步探讨。

第三章 过表达 C/EBP α 对高氧暴露后肺泡 II 型上皮细胞增殖、 凋亡及肺泡表面活性蛋白 C 的影响

高氧肺损伤是造成早产儿尤其是极低出生体重儿死亡、致残的主要原因之一^[33,34]。高氧肺损伤的具体发病机制目前暂不明确，大多数研究表明氧化应激反应可导致肺损伤的发生^[35]。AEC II 细胞是高氧肺损伤的主要靶细胞，吸入高浓度氧后可引起 AEC II 分泌肺泡表面活性蛋白不足，细胞增殖分化受阻，凋亡增加^[36]。前期有研究发现 C/EBP α 是肺组织细胞增殖及分化中所必需的重要转录因子^[37-39]。目前，过表达 C/EBP α 能否逆转 AEC II 增殖分化等功能，尚未见相关报道。SP-C 是肺泡表面活性蛋白之一，仅表达于 AEC II 细胞中，且在肺部疾病的发生及发展过程中发挥重要作用^[40]。因此本研究观察过表达 C/EBP α 基因对高氧暴露后 AEC II 细胞增殖与凋亡及肺泡表面活性蛋白 C 的影响，为研究高氧肺损伤的发病机制及防治奠定基础。

3.1 实验材料

3.1.1 实验细胞

人来源的 AEC II 细胞株购自于赛百慷生物技术股份有限公司。

3.1.2 主要试剂

主要试剂	公司
RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
OPTI-MEM 培养基	Gibco 公司
胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)	Multicell 公司
胰蛋白酶、转染试剂及 TRIzol	Invitrogen 公司
Lipofectamine2000	Invitrogen 公司
逆转录试剂盒	TaKaRa 公司
SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒	TaKaRa 公司
pcDNA3.1 (+) - C/EBP α 质粒、空质粒	上海生工生物工程有限公司
PCR 引物及质粒提取试剂盒	上海生工生物工程有限公司
C/EBP α 及 SP-C 抗体	Santa Cruz 公司

β -actin 抗体	Cell Signaling Technology 公司
辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊 IgG	南京福麦斯公司
HRP 标记的小鼠抗兔 IgG	南京福麦斯公司
PI 染色液	凯基公司
CCK-8 细胞增殖试剂盒	Biosharp 公司
FITC AnnexinV/PI 流式试剂盒	BD 公司
QuickFreezing-M 哺乳动物细胞冻存液	北京博奥龙免疫有限公司

注：其余部分实验试剂同前一部分。

3.1.3 主要试剂的配制

3.1.3.1 PBS 溶液：具体配制方法同上一部分。

3.1.3.2 10%APS 贮存液：将称取好的 APS: 0.5 g, 加入装有 5 ml 双蒸水的离心管内, 使溶液充分溶解, 然后再次分装至棕色避光的离心管中。最后转移到-20℃冰箱内保存。

3.1.3.3 细菌培养液：将称取好的胰蛋白胨: 1 g, 酵母提取液: 0.5 g, NaCl: 1 g 倒入盛有 100 ml 双蒸水的烧杯中, 放在磁力搅拌器上搅拌均匀, 将配好的细菌培养液高压, 照紫外线消毒后放入 4℃冰箱保存, 以备后续实验。

3.1.3.4 甘油稀释液：将甘油（丙三醇）加入等量的双蒸水混匀, 高压后备用。

3.1.3.5 不含 EDTA 的胰酶：将称取的胰酶粉: 2.5 g, 倒入盛有 100 ml 的 1 × PBS 溶液（高压无菌）中, 充分混匀后, 于 4℃冰箱保存备用。

3.1.3.6 70%乙醇：量取 70 ml 无水乙醇, 加入 100 ml 双蒸水, 充分混匀后备用。

3.1.3.7 1×Binding Buffer：取试剂盒中的 10×Binding Buffer 1 ml, 加入 9 ml 双蒸水充分混匀, 置于 4℃冰箱保存备用。

3.1.3.8 5×电泳缓冲液及 10×转膜液：配制的具体方法同前一部分。

3.1.3.9 5%脱脂奶粉：将称取好的脱脂奶粉: 0.25 g, 加至 5 ml 的 1×TBST 洗脱液中, 充分混合均匀（根据 PVDF 膜的数量及面积, 配置适量的封闭液）。

3.1.3.10 一抗稀释液：将称取好的 BSA: 1 g, NaN₃: 0.01 g, 加入 50 ml 1×TBST 洗脱液充分摇匀, 后置于 4℃冰箱备用。

3.1.4 主要设备和器材

设备器材	公司
细胞培养箱	德国 Thermo 公司
倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司 (Olympus IX50 型)
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司 (型号 21R)
低速离心机	中国白洋医疗器械公司 (型号 BY400C)
可调式移液器 (各种规格)	德国 Eppendorf 公司
恒温摇床、-20℃及-80℃冰箱	美国 Thermo 公司
电子分析天平	中国赛多利斯有限公司 (型号 BSA224S)
超净工作台	苏州长桥净化设备厂
荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
CYS-1 数字测氧仪	上海嘉定学联仪表厂
超纯水分离器	青岛富勒姆公司 (型号 FCR2002-UF)
多功能酶标仪	美国 Biotek 公司
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
高压灭菌锅	东中泰医疗器械有限公司
电动脱色摇床	金坛市医疗仪器厂
超净台	苏州净化设备厂
漩涡振荡器	常州金坛医疗仪器厂
磁力加热搅拌器	江苏中大仪器厂
电热鼓风干燥箱	重庆试验设备厂
电热隔水式恒温培养箱	上海更发制药设备有限公司
水平凝胶电泳槽	美国 pac-300 Bio-Rad 公司
蛋白电泳转移装置	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像及分析系统	美国 Gene 公司
紫外分光光度计	德国 Beckman 公司
BD CANTO 10C 流式仪	美国 BD 公司
细胞培养板、培养皿、培养瓶	美国 Corning 公司
八连管、摇菌管、流式玻璃管等	美国 Thermo 公司

3.2 实验方法

3.2.1 AEC II 细胞培养

3.2.1.1 AEC II 细胞复苏:

(1) 把盛有 AEC II 细胞的冻存管从液氮罐中取出来 (注意做好防护措施, 防止冻伤), 立即投入 37℃ 水浴锅中, 轻微摇动, 待 AEC II 细胞混悬液都融化后 (约 1-1.5 min), 从水浴锅中取出, 在冻存管周围喷洒 75% 酒精用以消毒冻存管外壁, 最后将冻存管放置事先经紫外线消毒的超净台内。

(2) 用移液器将上述冻存管中融化的 AEC II 细胞悬液转移到装有 10 ml 完全培养基的离心管中 (注意使用完全培养基清洗冻存管, 尽量把吸附在管壁上的细胞洗脱下来), 最后置于低速离心机中, 按照 1000 g/min 的转速, 离心 5 min, 沉淀细胞悬液。

(3) 轻轻倒掉离心管内的上清液, 加入 1ml 完全培养基再次重悬细胞, 用移液器吸取适量的重悬细胞液, 加入装有完全培养基的培养皿中, 然后轻轻晃动培养皿, 使培养皿中的细胞尽量均匀分布, 避免产生细胞团。

(4) 在放到 37℃ 5 % CO₂ 培养箱之前, 用封条固定培养皿, 并在培养皿盖上做好相应的标记。待细胞贴壁, 更换新鲜的培养基 (一般约 8-12 h)。

(5) 再次根据细胞的生长状态, 更换培养基 (一般每日更换新鲜的完全培养基)。

3.2.1.2 AEC II 细胞传代:

(1) 在显微镜下观察 AEC II 细胞的生长状况, 待培养皿中的细胞覆盖率达到 80-90% 时, 且细胞生长状态良好时, 进行传代。

(2) 吸掉原有培养基, 用高压灭菌后的 PBS 溶液清洗培养皿三遍, 洗掉原有的培养基。

(3) 加入适量的胰蛋白酶, 能覆盖培养瓶底部即可, 在显微镜下观察, 待细胞变圆后加入等适量含血清的完全培养基终止消化, 注意把握时间, 防止细胞过度消化, 消化时间大约为 1 min 左右。用移液器轻轻吹打细胞, 使 AEC II 细胞悬浮起来, 尽量使培养瓶壁的细胞消化下来。

(4) 用移液器将上述的 AEC II 细胞悬液移到干净灭菌的离心管内, 置于离心机内, 以 1000 g/min 的转速, 离心 5 min。

(5) 轻轻倒掉上清液，加入 1-2 ml 培养基，重悬细胞，制造单细胞悬液，用细胞计数器计数。

(6) 吸取适量细胞悬液接种于新的培养皿或培养瓶中。

(7) 待细胞状态良好时用于后续实验或冻存细胞。

3.2.1.3 AEC II 细胞冻存：

(1) 待细胞状态良好时进行细胞冻存，吸掉原有培养液，用吸掉原有培养基，用高压灭菌后的 PBS 溶液清洗培养皿三遍，洗掉原有的培养基。加入适量的胰蛋白酶，对细胞进行消化，后加入含血清的完全培养基终止消化，防止细胞过度消化。用移液器轻轻吹打细胞，而后转移至新的离心管中，将离心管置于低速离心机，1000 g/min，离心 5 min。

(2) 轻轻倒掉上清液，尽量吸净，加入适量冻存液，重悬细胞，使细胞悬浮起来，细胞浓度一般为 $1-5 \times 10^6$ 细胞/ml，然后分装至灭菌好的冻存管中，直接放入 -80°C 冰箱中冻存，24 h 后转入液氮罐中冻存（本冻存液无需阶梯式冻存，可直接置于 -80°C 冰箱中，尽管可在 -80°C 环境下保存数周至数月，但最好尽快转移至液氮罐中保存）。

注意：上述所有步骤均应注意无菌环境。

3.2.2 AEC II 细胞分组

将生长状态良好的 AEC II 细胞接种至培养瓶中，培养 15 h 左右，待细胞基本贴壁后，吸掉培养瓶中的培养液，然后用灭菌的 PBS 溶液轻轻洗至少 3 次，再次加入含有 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基，5 ml/瓶。随机分为：空气组、空气组+ pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒组、空气组+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、高氧组、高氧+ pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒组、高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组。打开通气装置，在高氧组的培养瓶中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体，使通气的速度保证为 3 L/min，注意保证通入混合气体的时间持续 10 min，而后迅速密封培养瓶。最后将两组 AEC II 细胞均置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中。并且及时使用 CYS-1 数字式测氧仪检测高氧组各个培养瓶中的氧气含量，剔除含氧量不合格培养瓶，收获符合实验要求的各组 AEC II 以备后续检测。

3.2.3 pcDNA3.1 (+) - C/EBP α 质粒瞬时转染和转染效果检测

3.2.3.1 菌液的培养：

在每个摇菌管中加入 5 ml LB (细菌培养液), 10 μ l 细菌, 5 μ l 氨苄青霉素, 充分混匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床上, 225 rpm/min 培养 16-18 h, 而后进行质粒提取(注: 摇菌过程中, 摇菌管盖子应尽量松一点)。

3.2.3.2 质粒提取:

(1) 准备工作: 检查所有试剂是否合格。准备好质粒提取过程中所需的所有设备。并且提前将 4 $^{\circ}$ C 离心机打开, 预冷离心机。在 Buffer P₁ 中加入 RNase A, 在 Wash Solution 中加入乙醇, 注意观察避免 Buffer P₂ 和 Buffer P₃ 中出现沉淀。

(2) 从摇菌管中用移液器量取上述培养的菌液 1.5-5 ml, 置于离心管中, 用 8000 g/min, 离心 2 min, 收集沉淀至管底的菌体, 尽量弃尽上层液体。

(3) 用移液器将 250 μ l Buffer P₁ 加至上述沉淀的菌体中, 并使 Buffer P₁ 和菌体彻底混匀。

(4) 在上述含有悬浮液的摇菌管中加入 250 μ l Buffer P₂, 尽量沿着管壁缓慢加入, 立即温和缓慢地颠倒离心管数次, 使离心管内的液体充分混匀, 然后室温静置 2-4 min(注意在颠倒离心管的过程中尽量动作轻柔, 为避免使质粒受损)。

(5) 静置之后, 在上述混匀的液体中, 加入 350 μ l Buffer P₃, 再次轻柔颠倒离心管数次, 使离心管中的液体充分混匀。

(6) 将上述充分颠倒混匀的离心管, 置于离心机中, 在尽量最大转速下离心 5-10 min, 然后用移液器将上清液转移到干净的吸附柱中, 避免吸到下层沉淀物, 9000 g/min, 离心 30 s。倒掉收集管中的液体, 暂时无需换新的收集管, 将吸附柱置于收集管之上, 直到离心管中的所有液体均经过吸附柱离心过滤一遍。

(7) 离心后, 在吸附柱中滴加 500 μ l Wash Solution, 尽量使用移液器垂直加入, 置于离心机中, 9000 g/min, 离心 30 s。弃掉收集管中的液体, 不更换收集管, 将吸附柱置于收集管之上。

(8) 注意重复上述步骤, 再次将吸附柱离心, 进行该步骤时无需更换收集管, 直接离心。

(9) 再次使用离心机, 按照 9000 g/min 的转速进行离心, 离心时间大约为 1 min 左右, 尽量将吸附柱中的多余液体弃掉。

(10) 用移液器将 50-100 μ l Elution Buffer 加至吸附柱中吸附膜的中央, 在室温情况下静置大约 1-2 min, 然后将吸附柱置于新的灭菌、灭酶的离心管中,

转移至离心机中，9000 g/min，离心 1 min。将所得到的质粒 DNA 溶液用紫外分光光度计检测浓度及纯度，弃掉不合格的质粒，将符合要求的质粒 DNA 置于 -20℃冰箱中保存或用于后续试验。

3.2.3.3 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 质粒瞬时转染

(1) 在进行转染前 24h，对各组 AEC II 细胞进行重新更换培养基，使各组细胞在不含抗生素的 RPMI1640 完全培养基中继续生长。待细胞融合度为 50% 左右，转染前 2 h 再次对细胞进行换液，更换为 OPTI-MEM 培养基，最后使用 Lipofectamine2000 作为转染介质进行瞬时转染。所有操作步骤均按照 Lipofectamine2000 说明书进行。

(2) 在离心管中加入 8 μ g 的质粒 DNA 和 500 μ l OPTI-MEM 培养基，然后用移液器吹打使两者充分混匀。

(3) 选取一个新的离心管，加入 20 μ l Lipofectamine2000 和 500 μ l OPTI-MEM 培养基，使两者充分混合均匀，在室温情况下静置 5 min。

(4) 将上述混匀的 DNA 混悬液和 Lipofectamine2000 混悬液同时加至新的离心管中，再次充分混匀后，于室温情况下再次静置 20 min。

(5) 静置结束后，将上述所得的混合液分别加至各组细胞的培养瓶中。

(6) 待转染 6-8 h 后，更换为 RPMI 1640 培养基。

(7) 转染 48 h 后，收集各组细胞，注意在转染过程中所有的培养基均不含有抗生素，且转染后根据情况及时更换培养基。

3.2.3.4 转染效果检测

使用 Q-PCR 及 Western blot 检测转染后各组 AEC II 细胞中的 C/EBP α mRNA 及蛋白的表达（具体操作步骤同前）。

3.2.4 Q-PCR 检测各组细胞 C/EBP α 及 SP-C mRNA 表达

具体操作步骤同前。

3.2.5 Western blot 检测各组细胞 C/EBP α 及 SP-C 蛋白表达

具体操作步骤同前。

3.2.6 CCK-8 检测各组细胞增殖

具体操作步骤同前。

3.2.7 流式细胞仪检测各组细胞周期

细胞周期中当细胞处于 S 期及 G₂/M 期的比例越高,说明该细胞的增殖越活跃。碘化丙啶 (Propidium Iodide,PI) 是一种能与 DNA 结合的染料。首先将各组细胞使用 PI 染料进行染色,并利用流式细胞仪对各组 AEC II 细胞进行检测,最后通过 ModFit LT 4.1 软件进行计算并分析结果。

3.2.7.1 弃掉各组培养瓶中的培养基,用高压灭菌后的 PBS 溶液清洗各组 AEC II 细胞,然后用移液器尽量吸净 PBS 溶液,加入适量不含 EDTA 的胰酶消化细胞(胰酶的用量约覆盖培养瓶底部)。在显微镜下观察,待 AEC II 细胞变圆后立即加入等体积含血清的完全培养基终止消化,用移液器轻轻吹打细胞,使细胞从培养瓶壁上洗脱下来,将细胞悬液转移至离心管内,再次置于低速离心机中,按照 1000 g/min 的转速,离心 5 min。

3.2.7.2 用移液器轻轻吸掉离心管中的上清液,用 10 nM PBS 溶液再次重新悬浮沉淀细胞,使细胞再次重悬,置于低速离心机,1000 g/min,离心 5 min,该操作的目的是洗涤细胞,重复三次。再次收集细胞,最终使细胞成为单细胞悬液,使用细胞计数器尽量使细胞浓度维持在 1×10^6 /L 左右。

3.2.7.3 在收集单细胞悬液的离心管中,加入 9 倍体积的 70%乙醇,将离心管转移至 4℃ 冰箱内,进行细胞固定,持续时间为 12 h 以上。

3.2.7.4 固定结束后,再次将离心管转移至低速离心机中,1000 g/min,离心 5 min,离心结束后收集细胞,吸净上层 70%乙醇,并加入 PBS 溶液再次重悬细胞,尽量洗净离心管内的 70%乙醇。置于低速离心机,1000 g/min,离心 5 min,尽量清除掉残留在细胞上的 70%乙醇。用 PBS 溶液清洗数次后,再次离心,弃掉上清液,将细胞沉淀重悬于 500 μ l 即用型 PI 染色液中。

3.2.7.5 在上述用 PI 染色液重悬的细胞悬液中加入适量的 RNase A,使最终浓度调整至 0.25 mg/ml,室温条件下,避光反应 30 min。

3.2.7.6 使用流式细胞仪进行检测。

3.2.8 流式细胞仪检测各组细胞凋亡

用 Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡,最终得到的结果是由四个象限组成的细胞散点图。严格按照 FITC AnnexinV/PI 流式试剂盒的说明书进行如下操作。

3.2.8.1 轻轻弃掉培养瓶内的培养基，用 PBS 溶液洗涤细胞 3 遍，吸净培养瓶中的 PBS 溶液后，加入不含 EDTA 的胰酶消化细胞，待细胞变圆后，加入含有血清的完全培养基中和消化，用移液器轻轻吹打细胞，收集细胞悬液至离心管中（注意控制胰酶的消化时间，若消化时间过长，则易产生假阳性）。

3.2.8.2 将上述所收集的细胞悬液转移至低速离心机中，1000 g/min，离心 5 min，用移液器吸掉上清液。然后用 PBS 溶液使细胞再次重悬后，再次置于低速离心机，按照先前的转速及时间进行离心，重复该操作两次，最终收集 $1-5 \times 10^5$ 细胞。

3.2.8.3 吸取 100 μ l $1 \times$ Binding Buffer 加入离心管中，用移液器轻轻吹打细胞，使细胞呈单细胞悬液。

3.2.8.4 以下操作注意避光进行，在上述细胞悬液中加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 溶液及 5 μ l PI 的溶液，用移液器轻轻吹打，使溶液充分混匀，室温状态下孵育 15min 左右。

3.2.8.5 孵育结束后，在混悬液中加入 400 μ l $1 \times$ Binding Buffer，再次充分混匀。

3.2.8.6 尽量在 1h 内，将上述样品进行流式细胞仪的检测。

3.2.8.7 流式细胞仪的检测结束后，使用 FlowJo 7.6 软件对所得结果进行分析。

3.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件对所有的实验数据进行统计学分析，其中所有计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3.4 实验结果

3.4.1 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 及 pcDNA3.1(+)-空质粒转染结果

通过 Lipofectamine2000 脂质体转染法转染 AEC II 细胞，将 pcDNA3.1(+)-C/EBP α 及 pcDNA3.1(+)-空质粒转入 AEC II 细胞，转染 48 h 后提取 mRNA 及总蛋白，运用 Q-PCR 及 Western blot 法检测 AEC II 细胞中 C/EBP α 的转染效果。与对照组相比，pcDNA3.1(+)-C/EBP α 转染后的 AEC II 细胞 C/EBP α mRNA 及蛋白表达水平显著升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 见图 3.1 所示。

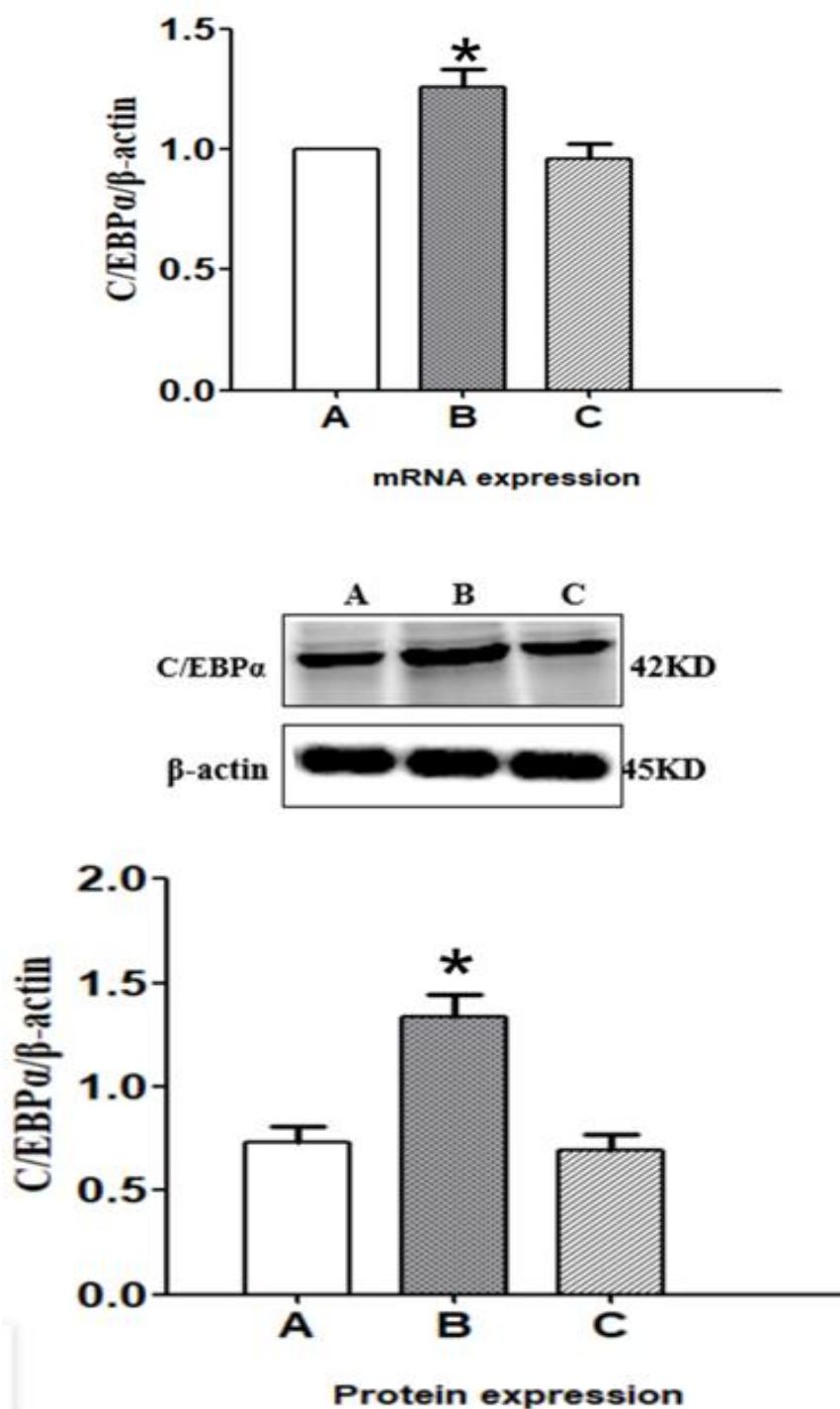


图 3.1 Q-PCR 及 Western blot 法检测转染后 AEC II 细胞中 C/EBP α 的表达

Figure 3.1 Western blot and PCR analysis of C/EBP α protein expression in transfected AEC II cells

A: control group; B: pcDNA3.1(+)-C/EBP α group; C: pcDNA3.1(+)-empty group.

注: * $P < 0.05$ vs 对照组。

3.4.2 各组细胞 C/EBP α 和 SP-C mRNA 表达

如图所示,与空气组相比,高氧组 C/EBP α 表达明显降低,高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组 SP-C mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$),而高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组 SP-C mRNA 表达水平较高氧组、高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组显著升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$) 见图 3.2 所示。然而与空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组相比,空气组和空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组的 SP-C mRNA 表达水平未见明显差异。

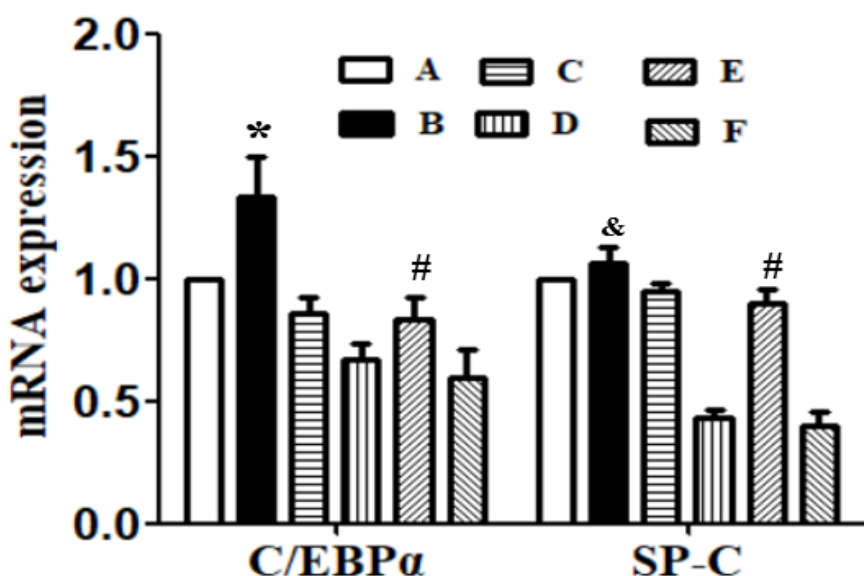


图 3.2 Q-PCR 法检测转染后各组 AEC II 细胞 C/EBP α 及 SP-C mRNA 表达

Figure 3.2 PCR analysis of C/EBP α and SP-C mRNA expression in transfected AEC II cells

A: 空气组; B: 空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组; C: 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组;

D: 高氧组; E: 高氧+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; F: 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组。

注: * $P<0.05$ vs 空气组; # $P<0.05$ vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组;

& $P>0.05$ vs 空气组和空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

3.4.3 各组细胞 C/EBP α 及 SP-C 蛋白表达

如图所示,与空气组相比,高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组 SP-C 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.05$),而高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组 SP-C 蛋白表达水平较高氧组、高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组显著升高,差异具有统计学意义 (P 均 <0.05),然而在空气暴露各组之间 SP-C 蛋白表达水平未见明显差异。见图 3.3。

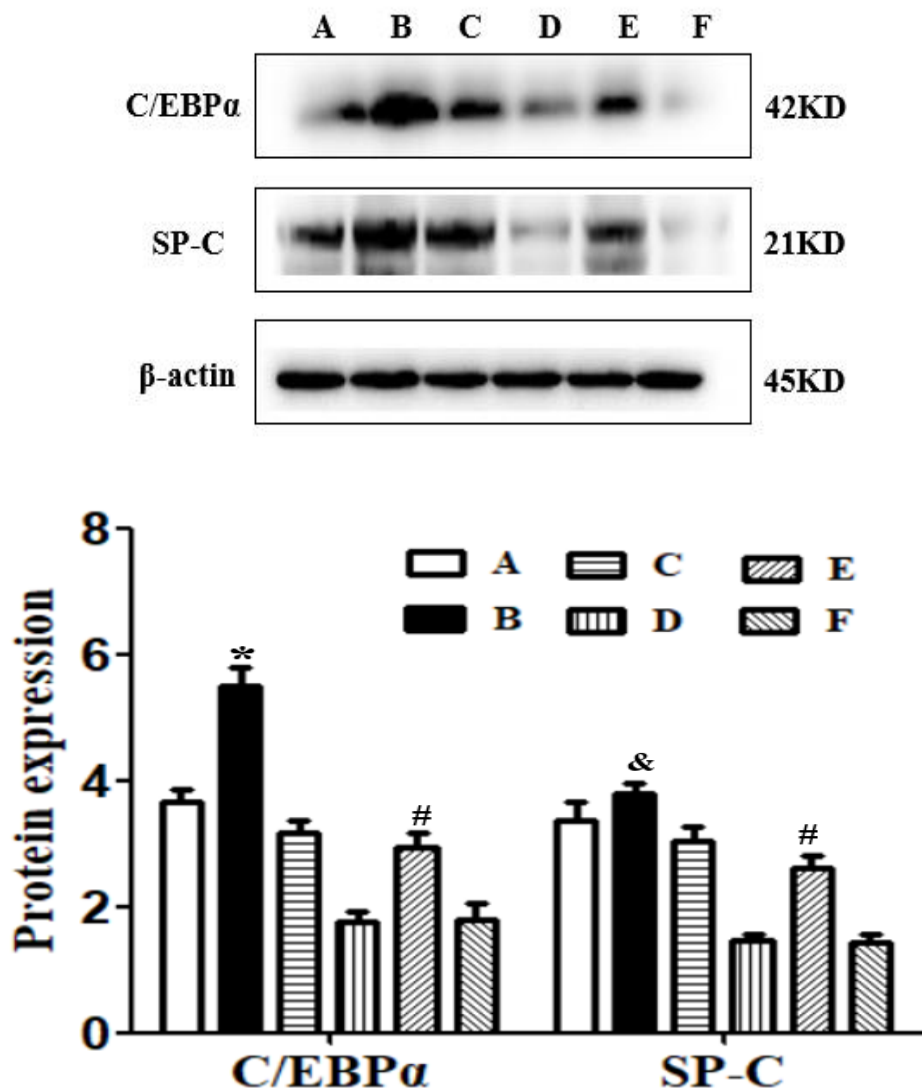


图 3.3 Western blot 法检测转染后各组 AEC II 细胞 C/EBP α 及 SP-C 蛋白表达。

Figure 3.3 Western blot analysis of C/EBP α and SP-C protein expression in transfected AEC II cells

A: 空气组; B: 空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组; C: 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组;

D: 高氧组; E: 高氧+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; F: 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组。

注: * P <0.05 vs 空气组; # P <0.05 vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组;

& P >0.05 vs 空气组和空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

3.4.4 各组细胞增殖情况

与空气组相比, 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组细胞增殖水平显著下降 (P <0.05); 而高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组细胞增殖水平较高氧组、高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组显著升高, 差异具有统计学意义 (P 均<0.05), 见表 3.1。

表 3.1 各组细胞的增殖情况

Table3.1 Conditions of cell proliferation in each group

组别	OD 值
空气组	1.91±0.63
空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组	1.89±0.52 ^{&}
空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组	1.87±0.46
高氧组	0.89±0.44 [*]
高氧+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组	2.43±0.25 [#]
高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组	0.76±0.32 [*]

注: * $P < 0.05$ vs 空气组; # $P < 0.05$ vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组;

[&] $P > 0.05$ vs 空气组和空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组。

3.4.5 各组细胞周期及凋亡情况

为了进一步支持过表达 C/EBP α 对细胞增殖的猜测,我们分析了过表达 48 h 后细胞周期及凋亡的情况。与空气组相比,高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组 G₁ 期细胞比例增加, S 期和 G₂ 期细胞明显下降,细胞凋亡率增加, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义;而高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组 G₁ 期细胞比例较高氧组、高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组降低, S 期和 G₂ 期细胞增加,细胞凋亡率降低,差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05),与空气组相比,空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组和空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组在转染 48 小时后的 G₁、S 和 G₂ 期并没有显示显著的变化。见表 3.2、图 3.4、表 3.3 及图 3.5。

表 3.2 各组 AEC II 细胞周期变化情况

Table3.2 The change of AEC II cell cycle in each group

Cell	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
空气组	68.61±2.68	28.19 ±2.45	4.17±1.87
空气+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组	64.92±3.12 ^{&}	28.11±2.53 ^{&}	7.51±2.98 ^{&}
空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组	67.26±2.56	29.77±1.98	6.02±2.73
高氧组	91.09 ±2.41 [*]	5.95±0.98 [*]	3.00±1.61 [*]
高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组	51.15 ±3.36 [#]	37.61±2.76 [#]	10.29±2.02 [#]
高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组	92.29±1.97 [*]	6.41±3.17 [*]	2.01±1.91 [*]

注: * $P < 0.05$ vs 空气组; # $P < 0.05$ vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组; $^{\Delta}P > 0.05$ vs 空气组
和空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

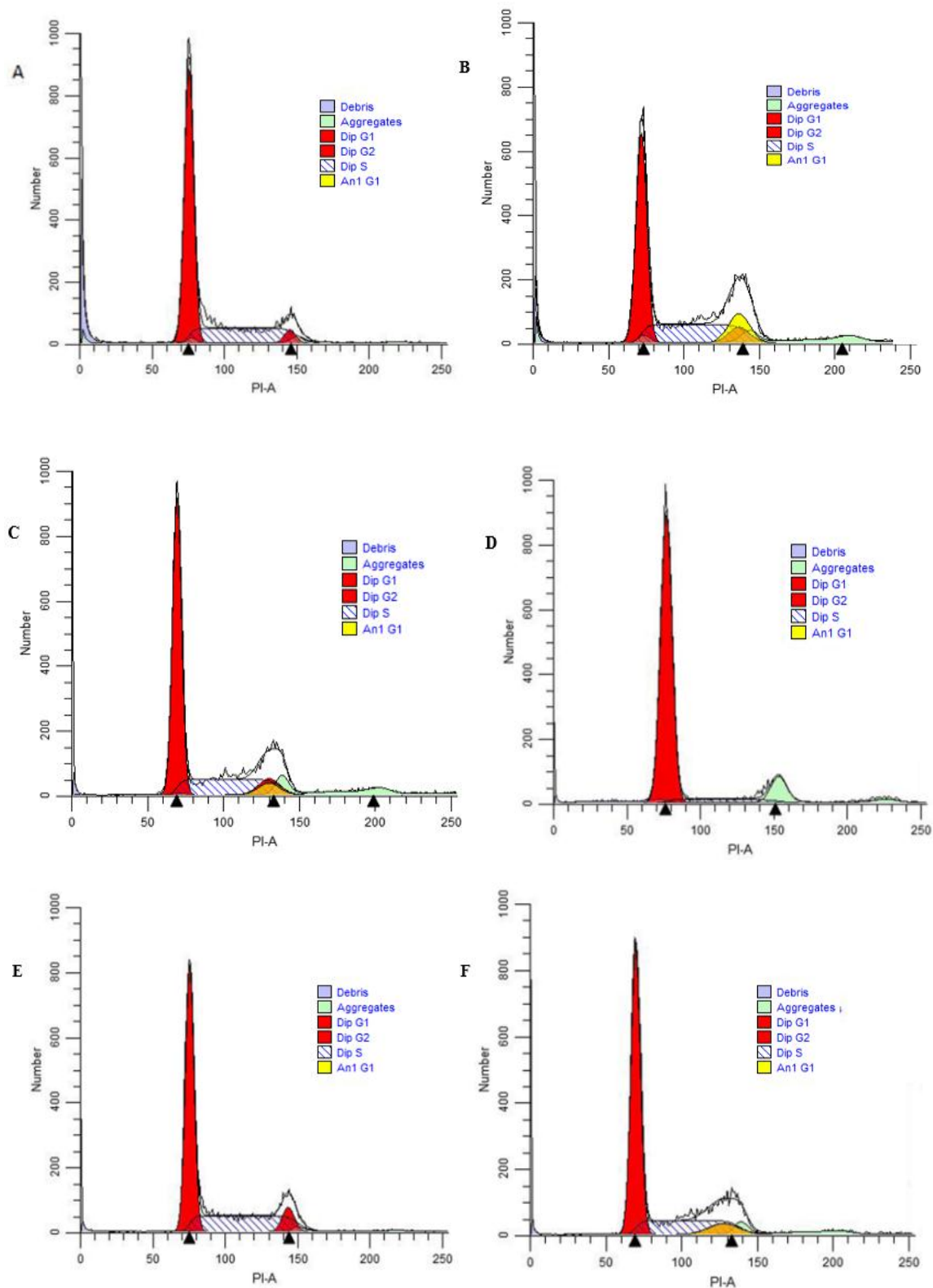


Figure 3.4 各组 AECII 细胞周期变化情况

Figure 3. 4 The change of AEC II cell cycle in each group

A: 空气组; B: 空气+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; C: 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组;
D: 高氧组; E: 高氧+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; F: 高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

表 3.3 各组细胞凋亡情况

Table 3.3 Cell apoptosis in each group

组别	凋亡率
空气组	9.76 \pm 0.67
空气+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组	8.97 \pm 0.46 ^{&}
空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组	9.36 \pm 0.39
高氧组	13.01 \pm 0.86 [*]
高氧+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组	9.51 \pm 0.62 [#]
高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组	13.88 \pm 0.54 [*]

注: ^{*} P <0.05 vs 空气组; [#] P <0.05 vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组; [&] P >0.05 vs 空气组 and 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

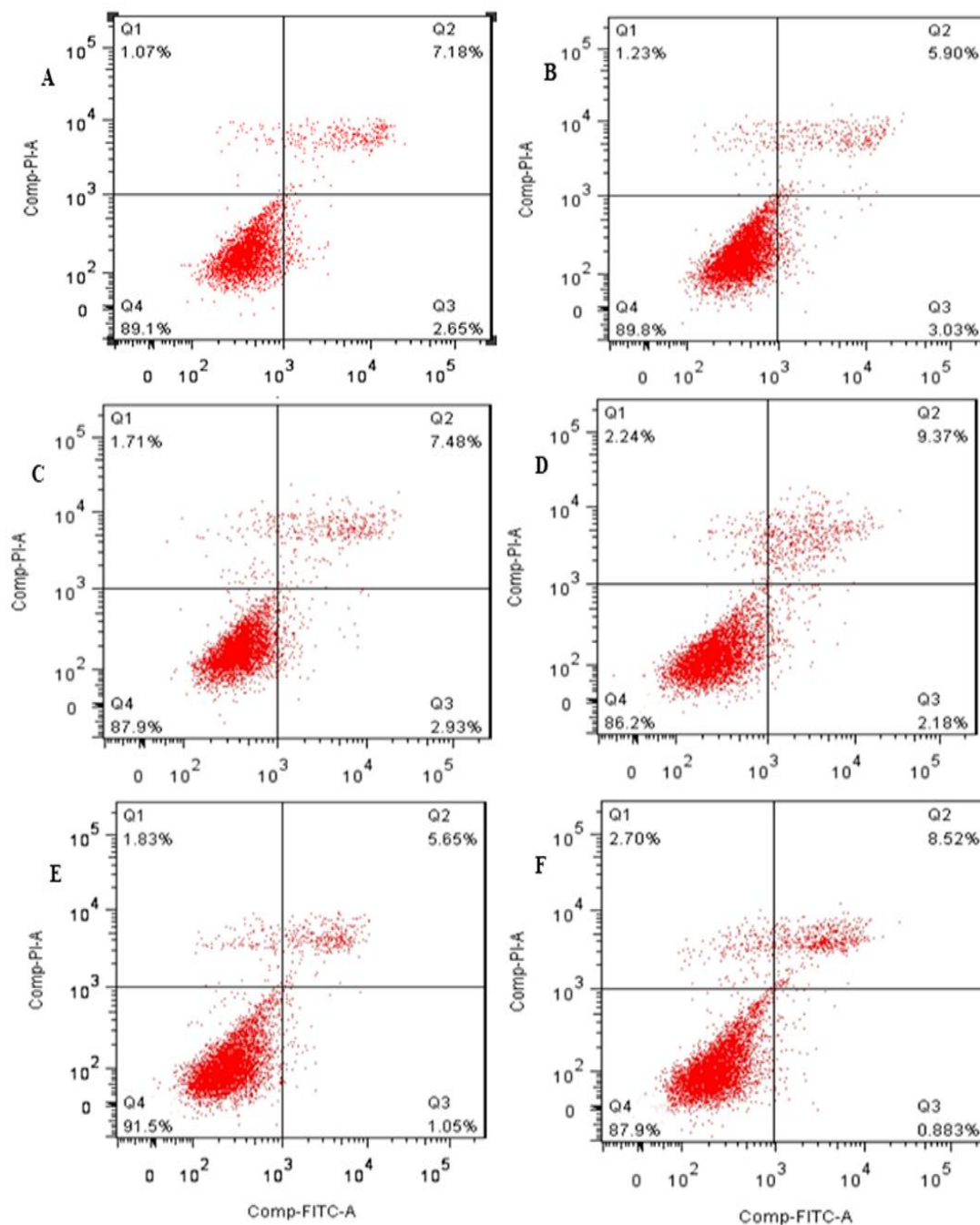


图 3.5. Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 3.5. Effects of hyperoxia on the AEC II s apoptosis was analyzed by Annexin V/PI double staining followed by flow cytometry

Q1: 死亡细胞; Q2:晚期凋亡细胞; Q3: 早期凋亡细胞; Q4: 活细胞。

A: 空气组; B: 空气+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; C: 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组;

D: 高氧组; E: 高氧+pcDNA3.1(+)- C/EBP α 组; F: 高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

注: * $P < 0.05$ vs 空气组; # $P < 0.05$ vs 高氧组和高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组; $^{\&}$ $P > 0.05$ vs 空气组 and 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组。

3.5 讨论

C/EBP α 作为重要的转录调控因子, 是 C/EBPs 家族中最先被发现的成员, 在多种组织及器官内均有广泛表达^[41]。C/EBP α 基因表达及调控在慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺癌、急性髓性白血病及肾脏疾病等均有报道^[42-50]。近年来多个研究表明, C/EBP α 在肺发育及肺损伤等过程中作为重要的转录因子发挥至关重要的作用^[51]。有研究表明 C/EBP α 在肺发育的囊泡期和肺泡期开始表达, 广泛表达于 AEC II 细胞、气道上皮细胞以及肺巨噬细胞, 而当肺细胞中 C/EBP α 异常表达时, 则影响肺发育^[52]。在 C/EBP α 基因缺失的胎鼠中发现, 肺泡表面活性蛋白合成减少及发育过程受损。总之说明 C/EBP α 可能是胎肺发育成熟所必需的转录因子^[53]。

尽管 C/EBP α 在肺发育过程中起重要作用, 但有研究发现, 在非应激状态下, 成年鼠肺的内环境稳态与 C/EBP α 基因表达关系不大。敲除成熟鼠肺 C/EBP α 基因, 肺的形态及功能仍能正常, 然而在高氧暴露状态下, C/EBP α 基因缺陷的成熟鼠出现严重肺部炎症, 存在明显肺损伤, 且发现 C/EBP α 在调节肺泡表面活性蛋白合成、加工及运输, 防御应激反应, 细胞氧化还原稳态及调控氧自由基等过程发挥重要作用。说明 C/EBP α 在高氧肺损伤中可能发挥保护作用^[54,55]。本研究发现, 与空气组相比, 高氧组 C/EBP α 及 SP-C 表达较空气组降低, 细胞周期 G₁ 期细胞比例增加, S 期和 G₂ 期细胞明显下降, 细胞增殖减少, 凋亡增加, 提示高浓度氧可使肺细胞 C/EBP α 基因表达水平发生改变, 细胞周期 G₁ 期阻滞, 细胞延迟进入 S 期, DNA 合成受到阻抑, 并最终导致细胞增殖受抑, 凋亡增加, 严重影响细胞功能, 这结果与之前的研究大致相似^[56-58]。Xu^[59]等通过构建 C/EBP α 基因缺乏小鼠, 研究 C/EBP α 基因在肺损伤发病机制中的作用, 发现高氧暴露后小鼠出现肺顺应性下降, II 型细胞向 I 型细胞分化严重受阻, 且支气管肺泡灌洗液中 SP-B、SP-C 表达明显下降, 表明 C/EBP α 可通过影响肺泡表面活性蛋白分泌及细胞分化等过程广泛参与了高氧肺细胞损伤的发病过程。

长期高氧暴露导致 C/EBP α 减少, 细胞增殖及分化等功能受阻^[60,61], 那么过表达 C/EBP α 能否恢复高氧暴露后肺细胞功能。本研究通过 Lipofectamine2000 脂质体瞬时转染 C/EBP α 重组质粒, 观察过表达 C/EBP α 对高氧暴露后 AEC II 细胞增殖、凋亡及 SP-C 的影响, 研究发现, pcDNA3.1(+)- C/EBP α 质粒瞬时转染

AEC II 细胞, C/EBP α 表达较空质粒组明显增高, 说明转染成功。与高氧组相比, 高氧暴露+pcDNA3.1(+)-C/EBP α 组 SP-C mRNA、蛋白表达及细胞增殖水平升高, G₁ 期细胞减少, S 和 G₂ 期细胞增加, 凋亡率降低, 说明过表达 C/EBP α 可能部分逆转高氧肺细胞损伤过程。Sato 等^[62]通过腹腔注射萘, 烧灼小鼠气道上皮细胞, 模拟气道上皮细胞受损, 发现 C/EBP α 可通过调节蛋白酶/抗蛋白酶的平衡来调节支气管上皮细胞再生, 提示 C/EBP α 可通过多种机制发挥肺保护作用。根据目前的研究, 我们发现过表达 C/EBP α 对空气暴露的 AEC II 中的细胞增殖, 凋亡和 SP-C 表达没有显著影响, 提示 C/EBP α 在正常条件下对成熟肺泡上皮细胞的功能可能起到的作用微乎其微。

综上所述, 高氧暴露可导致 C/EBP α 及 SP-C 表达减少, 细胞周期 G₁ 期阻滞, DNA 合成受抑细胞增殖减少, 凋亡增加, 过表达 C/EBP α 对高氧细胞损伤具有保护作用, 但由于 AEC II 细胞属于细胞株, 不能完全模拟替代机体环境, 因此, C/EBP α 在高氧肺损伤中的保护作用仍需进一步探究。

第四章 结论

(1) 高氧暴露早期, C/EBP α 可促进肺泡表面活性蛋白分泌, 参与机体保护性调节作用, 但随高氧暴露时间延长, 丧失代偿保护作用。

(2) C/EBP α 过表达可促进高氧暴露后 AEC II 细胞 SP-C 表达, 促进增殖, 抑制凋亡, 且使 S 期和 G₂ 期细胞明显增加, 提示给予过表达 C/EBP α 可能逆转高氧细胞损伤过程, 起到保护作用。

参考文献

- [1] Lidys Rivera, Roopa Siddaiah, Christiana Oji-Mmuo, et al. Biomarkers for Bronchopulmonary Dysplasia in the Preterm Infant [J]. *Front Pediatr*, 2016, 4-33.
- [2] 常立文. 早产儿支气管肺发育不良的定义演变及其诊断 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29(1): 1-4.
- [3] Nicola Principi, Giada Maria Di Pietro, and Susanna Esposito. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies [J]. *J Transl Med*, 2018, 16-36.
- [4] Inoue H, Ohgas, Kusuda T, et al. serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants [J]. *Early Human Development*, 2013, 89(6): 425-429.
- [5] Claudio Nardiello, Ivana Mižíková, Diogo M, et al. Standardisation of oxygen exposure in the development of mouse models for bronchopulmonary dysplasia [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(2): 185–196.
- [6] Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, et al. The CCAAT /enhancer (C /EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation [J]. *Cytokine*, 2011, 54(1): 6-19.
- [7] T. Kambara, T. P. McKeivitt, I. Francis, et al. Eosinophilic Inclusions in Rat Clara Cells and the Effect of an Inhaled Corticosteroid [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37(3): 315-323.
- [8] Kolls J K. Commentary: Understanding the impact of infection, inflammation and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2017,4:24.
- [9] Shahzad T, Radajewski S, Chao C M, et al. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development [J]. *Mol Cell Pediatr*, 2016, 3(1):23.
- [10] Iyengar A, Davis JM. Drug therapy for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6-12.
- [11] Zhang L, Zhao S, Yuan L, et al. Hyperoxia-mediated LC3B activation contributes

to the impaired transdifferentiation of type II alveolar epithelial cells (AEC II s) to type I cells (AEC I s) [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(9): 834-843.

[12] Flodby P, Li C, Liu Y, et al. The 78-kD glucose-regulated protein regulates endoplasmic reticulum homeostasis and distal epithelial cell survival during lung development [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(1): 135-149.

[13] Avellino R, Delwel R. Expression and regulation of C/EBP α in normal myelopoiesis and in malignant transformation [J]. *Blood*, 2017, 2(1): 1-8.

[14] Xue M, Li X, Chen W. Hypoxia regulates the expression and localization of CCAAT/enhancer binding protein α by hypoxia inducible factor-1 α in bladder transitional carcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2121-2127.

[15] Roos A B, Berg T, Barton J L, et al. Airway epithelial cell differentiation during lung organogenesis requires C/EBP α and C/EBP β [J]. *Dev Dyn*, 2012, 241(5): 911-923.

[16] Lu H Y, Shao G B, Li W B, et al. Effects of hyperoxia on transdifferentiation of primary cultured type II alveolar epithelial cells from premature rats [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(1): 64-72.

[17] Hou A, Fu J, Yang H, et al. Hyperoxia stimulates the transdifferentiation of type II alveolar epithelial cells in newborn rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(9): 861-872.

[18] Nicola Principi, Giada Maria Di Pietro, Susanna Esposito. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies [J]. *J Transl Med*, 2018,16-36.

[19] Teng R J, Jing X, Michalkiewicz T, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress by caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017,17: 00405.

[20] Zhong F, Wang W, Lee K, et al. Role of C/EBP- α in Adriamycin-induced podocyte injury [J]. *Sci Rep*, 2016 ,6: 33520.

[21] Ramji D P, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation [J]. *Biochem J*, 2002,365(3):561-575.

[22] Sato A, Yamada N, Ogawa Y, et al. CCAAT/enhancer-binding protein- α

suppresses lung tumor development in mice through the p38 α MAP kinase pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): 57013.

[23] Berg T, Didon L, Nord M, et al. Ectopic expression of C/EBP α in the lung epithelium disrupts late lung development [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(4): 683-693.

[24] Yang G, Hinson M D, Bordner J E, et al. Silencing hyperoxia-induced C/EBP α in neonatal mice improves lung architecture via enhanced proliferation of alveolar epithelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(2): 187-196.

[25] 杜志云, 肖志辉. CCAAT 增强子结合蛋白 α 在高氧肺损伤新生大鼠肺组织中的动态表达及其意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.

[26] Chang H Y, Li F, Li F S, et al. Genetic polymorphisms of SP-A, SP-B, and SP-D and risk of respiratory distress syndrome in preterm neonates [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 5091-5100.

[27] Zhang L, Zhao S, et al. Autophagy regulates hyperoxia-induced intracellular accumulation of surfactant protein C in alveolar type II cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 408(2): 181-189.

[28] Yee M, Buczynski B W, O'Reilly M A. Neonatal hyperoxia stimulates the expansion of alveolar epithelial type II cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(4): 757-766.

[29] Martis P C, Whitsett J A, Xu Y, et al. C/EBP α is required for lung maturation at birth. [J]. *Development*, 2006, 133(6): 1155-1164.

[30] Didon L, Roos A B, Elmberger G P, et al. Lung-specific inactivation of CCAAT/enhancer binding protein α causes a pathological pattern characteristic of COPD [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(1): 186-197.

[31] Sato A, Xu Y, Whitsett J A, et al. CCAAT/enhancer binding protein- α regulates the protease/antiprotease balance required for bronchiolar epithelium regeneration [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(4): 454-463.

[32] Xu Y, Saegusa C, Schehr A, et al. C/EBP α is required for pulmonary cytoprotection during hyperoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(2): 286-298.

- [33] F. Dias-Freitas, C. Metelo-Coimbra, R. Roncon-Albuquerque, Jr. Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury [J]. *Respiratory medicine*, 2016: 23-28.
- [34] M.N. Trottier-Boucher, A. Lapointe, J. Malo, et al. Raboisson, B. Martin, A. Moussa, Sildenafil for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension in Infants with Bronchopulmonary Dysplasia[J]. *Pediatric cardiology*, 2015, (36): 1255-1260.
- [35] B.W. Buczynski, E.T. Maduekwe, M.A. O'Reilly. The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD [J]. *Seminars in perinatology*, 2013, (37): 69-78.
- [36] A. Hou, J. Fu, H. Yang, Y. et al. Hyperoxia stimulates the transdifferentiation of type II alveolar epithelial cells in newborn rats[J]. *American journal of physiology, Lung cellular and molecular physiology*, 2015, (308): 861-872.
- [37] A.B. Roos, T. Berg, J.L. Barton, et al. Airway epithelial cell differentiation during lung organogenesis requires C/EBPalpha and C/EBPbeta, *Developmental dynamics* [J]. an official publication of the American Association of Anatomists, 2012, (241): 911-923.
- [38] A. Sato, N. Yamada, Y. Ogawa, et al. CCAAT/enhancer-binding protein-alpha suppresses lung tumor development in mice through the p38alpha MAP kinase pathway [J]. *PloS one*, 2013, (8): e57013.
- [39] H.Y. Lu, J. Zhang, Q.X. Wang, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP in the lungs of rats with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia [J]. *Molecular medicine reports*, 2015, (12): 4494-4500.
- [40] 韩笑, 尹晓娟. 肺表面活性物质蛋白 C 研究新认识 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2015, 23(1): 49-54.
- [41] D.P. Ramji, P. Foka. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation[J]. *The Biochemical journal*. 365 (2002) 561-575.
- [42] R. Avellino, R. Delwel. Expression and regulation of C/EBPalpha in normal myelopoiesis and in malignant transformation [J]. *Blood*, 2017, (129): 2083-2091.
- [43] L. Didon, A.B. Roos, G.P. Elmberger, et al. Lung-specific inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha causes a pathological pattern characteristic of COPD [J]. *The European respiratory journal*, 2010, (35): 186-197.

- [44] P. Borger, N. Miglino, M. Baraket, et al. Impaired translation of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA in bronchial smooth muscle cells of asthmatic patients [J]. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2009(123): 639-645.
- [45] Y. Lin, J. Zhao, X. Hu, et al. Transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha up-regulates microRNA let-7a-1 in lung cancer cells by direct binding [J]. *Cancer cell international*, 2016, (16): 17.
- [46] C. Collins, J. Wang, H. Miao, et al. C/EBPalpha is an essential collaborator in Hoxa9/Meis1-mediated leukemogenesis [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111: 9899-9904.
- [47] M. Xue, X. Li, W. Chen. Hypoxia regulates the expression and localization of CCAAT/enhancer binding protein alpha by hypoxia inducible factor-1alpha in bladder transitional carcinoma cells [J]. *Molecular medicine reports*, 2015, (12): 2121-2127.
- [48] B. Hackanson, K.L. Bennett, R.M. Brena, et al. Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer research*, 2008, (68): 3142-3151.
- [49] J.W. Kim, H. Monila, A. Pandey, et al. Upstream stimulatory factors regulate the C/EBP alpha gene during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 354: 517-521.
- [50] S.H. Liu, C.T. Wu, K.H. Huang, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency ameliorates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease [J]. *Oncotarget*, 2016,7: 21900-21912.
- [51] Y.D. Chen, J.Y. Liu, Y.M. Lu, et al. Functional roles of C/EBPalpha and SUMO modification in lung development [J]. *International journal of molecular medicine*, 2017, 40: 1037-1046.
- [52] T. Berg, L. Didon, M. Nord, Ectopic expression of C/EBPalpha in the lung epithelium disrupts late lung development, *American journal of physiology* [J]. *Lung cellular and molecular physiology*, 2006, 291: 683-693.
- [53] P.C. Martis, J.A. Whitsett, Y. Xu, et al. C/EBPalpha is required for lung maturation at birth [J]. *Development*, 2006,133: 1155-1164.

- [54] A.B. Roos, T. Berg, M. Nord, A Relationship between Epithelial Maturation, Bronchopulmonary Dysplasia, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J]. Pulmonary medicine 2012, 1: 196194.
- [55] K.J. Yong, D.S. Basseres, R.S. Welner, et al. Targeted BMI1 inhibition impairs tumor growth in lung adenocarcinomas with low CEBPalpha expression [J]. Science translational medicine, 2016,8: 350.
- [56] J. Lu, C. Du, J. Yao, et al. C/EBPalpha Suppresses Lung Adenocarcinoma Cell Invasion and Migration by Inhibiting beta -Catenin, Cellular physiology and biochemistry[J]. international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2017, 42: 1779-1788.
- [57] J. Zhang, Y. Ma, S. Wang, et al. C/EBPalpha inhibits proliferation of breast cancer cells via a novel pathway of miR-134/CREB [J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2015, 8: 14472-14478.
- [58] J.R. Mackert, P. Qu, Y. Min, P.F. Johnson, et al. Dual negative roles of C/EBPalpha in the expansion and pro-tumor functions of MDSCs [J]. Scientific reports, 2017, 7: 14048.
- [59] Y. Xu, C. Saegusa, A. Schehr, et al.C/EBP{alpha} is required for pulmonary cytoprotection during hyperoxia, American journal of physiology [J]. Lung cellular and molecular physiology, 2009, 297: 286-298.
- [60] G. Yang, M.D. Hinson, J.E. Bordner, et al. Silencing hyperoxia-induced C/EBPalpha in neonatal mice improves lung architecture via enhanced proliferation of alveolar epithelial cells, American journal of physiology [J]. Lung cellular and molecular physiology, 2011, 301: 187-196.
- [61] 杜志云, CCAAT 增强子结合蛋白 α 在高氧肺损伤新生大鼠肺组织中的动态表达及其意义 [D]. 江苏:苏州大学, 2010.
- [62] A. Sato, Y. Xu, J.A. Whitsett, et al. CCAAT/enhancer binding protein-alpha regulates the protease/antiprotease balance required for bronchiolar epithelium regeneration [J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2012, 47: 454-463.

综 述

CCAAT 增强子结合蛋白 α 与肺发育及相关肺疾病

摘要: CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer-binding protein α , C/EBP α) 是 CCAAT 增强子结合蛋白家族的一员。在大多组织的细胞增殖和分化, 控制代谢、脂质合成、炎症和许多其他的反应中起到重要的作用。该家族属于碱性区亮氨酸拉链 (the basic region-leucine zipper, bZIP) 蛋白家族。该文就 C/EBP α 的与肺部疾病的研究进展作一综述。

关键词: CCAAT 增强子结合蛋白 α , 结构, 功能, 肺发育, 肺部疾病

C/EBP α 最早是在大鼠肝脏中被 McKnight 等人发现, 作为碱性区亮氨酸拉链 (the basic region-leucine zipper, bZIP) 蛋白家族中重要的一员, 在胎儿发育的过程中占据重要的角色。迄今为止, 已有六个 C/EBPs 家族成员被发现并分离出来^[1]。该基因在调节机体的细胞增殖、分化、控制代谢、炎症反应等过程发挥重要作用^[2,3]。

1. C/EBP α 的结构

C/EBP α 是转录因子 C/EBPs 家族中的一个重要成员, 该基因被定位在 7 号染色体上。在人类染色体上, C/EBP α 基因位于 19q13.1, 长 3318 bp, 无内含子, cDNA 长 2385 bp, mRNA 可同时翻译成是 p42 和 p30 两种蛋白亚型^[4]。C/EBP α 作为重要的调控因子, 在多种组织、细胞中表达, 尤其是肝细胞、脂肪细胞和造血细胞、肺组织等高度表达, 同时参与多种系统的调控^[5]。

2. C/EBP α 的功能

C/EBP α 作为重要的转录调控因子, 在多种组织、细胞中均有表达。C/EBP α 在脂肪细胞、骨髓细胞、肝细胞、角质细胞和肺泡细胞等多种类型细胞的增殖及分化过程中发挥着关键作用。C/EBP α 可通过调节多种信号通路来影响细胞增殖的过程。C/EBP α 基因不仅调控细胞的增殖分化^[6,7], 同时在能量代谢的调控中也发挥关键作用^[8]。C/EBP α 作为一种转录因子, 在造血系统和其他肿瘤组织发挥抑制作用, 所以可作为肿瘤的抑制基因^[9,10]。并且有大量研究表明, 当机体发生

肿瘤后,尤其是在急性髓系白血病、肝癌、肺癌、子宫内膜癌、皮肤癌和乳腺癌时^[11], C/EBP α 基因的表达均有明显变化。

3. C/EBP α 在肺部的表达

近来有研究表明,在肺脏中,从妊娠晚期到成年, C/EBP α 主要表达于终末细支气管、肺泡 II 型上皮细胞、克拉拉细胞及肺泡巨噬细胞^[12,13]。妊娠后期, C/EBP α 可调节呼吸道上皮细胞的分泌肺泡表面活性蛋白,并广泛参与了肺发育及肺成熟的众多过程。在小鼠的胎儿时期删除 C/EBP α 基因,发现出生后小鼠极易合并呼吸衰竭,且使肺部结构及成熟受到阻滞。而当肺上皮细胞中 C/EBP α 异常表达则阻碍肺的发育。表面活性蛋白的正常合成,包括 SP-A、SP-B、SP-C、SP-D、ABCA3 和 FAS,依赖于呼吸道上皮细胞中 C/EBP α 的表达。Tgfb2 作为一种抑制肺上皮细胞增殖和分化的生长因子, C/EBP α 可引起 Tgfb2 表达的减少。C/EBP α 正常表达需要 Titf1 和 Foxa2 转录因子,而这两种转录因子在围产期肺发育过程中也发挥重要作用。并且也发现 C/EBP α 基因可通过调节细胞增殖情况及 Tgfb2 的表达,从而促进肺部的发育及成熟^[14,15]。在妊娠的特定时期, C/EBP α 可发挥至关重要的作用,并参与调节肺成熟和表面活性物质的稳态^[16,17]。

C/EBP α 主要表达于肺泡 II 型上皮细胞,而研究发现 C/EBP α 缺乏后致使肺上皮细胞发育障碍,细胞形态异常,且使肺泡 II 型上皮细胞向肺泡 I 型上皮细胞转化的途径受阻,从而表明 C/EBP α 在肺发育过程中发挥至关重要的作用^[18]。

4. C/EBP α 在高氧肺损伤中的作用

有研究^[19]显示,在正常环境下, C/EBP α 缺失并不影响肺功能,而在高氧状态下, C/EBP α 缺失的小鼠,表面活性蛋白水平却发生了显著变化。成年鼠的肺部内环境并不需要 C/EBP α ,而在敲除 C/EBP α 基因的小鼠在高氧状态下,极易出现严重的肺部感染和极高的死亡率。由此可以说明在高氧肺损伤中, C/EBP α 通过参与肺功能和肺泡表面活性蛋白的稳态来发挥保护作用。

肺部相关疾病的患者生存对高浓度的氧气高度依赖,然而长期吸入高浓度氧气,极易导致急性和慢性肺损伤,高氧肺损伤由多种基因共同调控的一个复杂的过程。因为整个肺上皮细胞的表面直接暴露于氧气中,而过多的氧气暴露会导致肺泡上皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞的损伤,最终会影响肺发育的过程。Yan Xu 等^[20]人通过敲除 C/EBP α 基因,构建 C/EBP α 基因缺失的新生小鼠的方法,研究

C/EBP α 基因在高氧肺损伤中的作用以及有何种病理改变。把敲除 C/EBP α 基因的转基因小鼠和同窝出生的正常小鼠均暴露在 95% 的高氧状态下,转基因小鼠非常容易受到损伤,研究示在 4 天后,所有的转基因小鼠均死亡,而正常小鼠均存活下来。通过病理特征发现,对照组正常小鼠仅有轻微的组织学变化。而转基因小鼠表现出严重的肺部炎症,包括肺泡空间扩大,周围血管性水肿,肺泡上皮细胞增厚及坏死等表现,肺组织结构类似于胎肺形成的早期幼稚形态。与此同时,通过支气管肺泡灌洗液发现,在正常情况下,对照组正常小鼠与敲除 C/EBP α 基因的转基因小鼠之间的成熟的 SP-B 和 SP-C 表达未见明显差异。而暴露于高氧状态下 69 小时后,发现成熟 SP-B 及 SP-C 表达水平明显低于对照的正常小鼠,而 pro-SP-B、pro-SP-C 的表达未见明显差异,说明在高氧状态下, C/EBP α 可能影响 pro-SP-B 及 pro-SP-C 向成熟 SP-B 及 SP-C 转化。为进一步了解 C/EBP α 在肺组织中的具体作用机制提供一定的理论支持。

5. C/EBP α 在慢性阻塞性肺疾病中的作用

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续气流受限为特征的肺部疾病,最终可引起多种脏器损伤。目前确切的因素暂不明确,但认为与吸入有害气体或有害颗粒所致的肺部炎症密切相关。环境和个体两大因素是导致 COPD 发生的主要原因^[21]。环境因素包括大气污染,化学气体及粉尘的刺激,长期吸烟及反复的慢性呼吸道感染等。个体因素包括遗传因素, α_1 -抗胰蛋白酶的缺乏,气道的高反应状态,幼时肺脏的发育情况及儿童时期的生长环境等。各种因素会导致慢性支气管炎和肺气肿,最终会刺激机体,从而诱发 COPD 的产生。

CCAAT 增强子结合蛋白(CEBP)作为一种转录因子,在肺发育及肺部相关疾病的调控中发挥重要作用。研究发现^[22]敲除小鼠 C/EBP α 基因后,可使小鼠在表现出肺组织发育不成熟、肺上皮细胞及肺泡细胞的增殖及分化过程受阻。而当小鼠成年后则表现与 COPD 病理改变相类似的特征,从而说明 C/EBP α 在 COPD 发病机制的中发挥重要作用。在 COPD 及肺气肿的发生过程中,香烟烟雾导致了绝对的致病因素。研究发现^[23],将肺部的成纤维细胞暴露在香烟提取物中,发现香烟提取物明显抑制了细胞的增殖。当成纤维细胞不能增生代偿时则促使 COPD 及肺气肿的发生及疾病的发展。COPD 患者中有部分患者是由缺乏 α_1 -抗

胰蛋白酶所致的疾病，肺气肿系由蛋白酶及抗蛋白酶机制失衡所致。在成年后，当肺组织发生损伤时，许多肺发育的转录因子会被再次激活，从而发挥重要作用。Sato Atsuyasu 等人^[24]是通过腹腔注射羰进入小鼠体内，烧灼气道上皮细胞，模拟气道上皮细胞受损中发现，C/EBP α 基因可通过调控终末细支气管上皮细胞的蛋白酶及抗蛋白酶系统的平衡来调节上皮细胞的再生，从而达到预防常见慢性肺部疾病的目的。众多研究均表明 CEBP 家族在 COPD 的发病机制及过程中发挥重要作用。

6. C/EBP α 在哮喘中的作用

哮喘是一种具有复杂性状及多基因遗传倾向的慢性的肺部炎症性疾病。哮喘的主要临床特点包括气道炎症、气道高反应性及气道重塑。增加哮喘患病率的原因众多，主要的危险因素包括先天因素和环境因素，如肥胖及男性哮喘儿童，室内及室外的过敏源（尘螨、狗毛、海产品等），儿童时期的反复呼吸道感染，长期接触烟草等。然而还有其他的非过敏性哮喘的触发，如吸入的冷空气，空气湿度或温度突然变化等。最值得注意的是气道平滑肌细胞数量和规模的增加是哮喘气道重塑的一个重要的病理特征。

近来发现 CEBPs 在调节炎症反应和细胞增殖等方面发挥重要作用。大量研究表明哮喘患者存在明显气道平滑肌增生。研究发现哮喘患者的 C/EBP α 的蛋白表达与气道平滑肌细胞的增殖有密切关系^[25]，最终导致哮喘患者的肺组织中气道平滑肌细胞的增生与肥大。这种气道平滑肌的重塑可能与 C/EBP α 表达的不足和线粒体功能的亢进有关。首先有研究发现 C/EBP α 的表达下降似乎是由于缺乏适当的翻译，因为与此同时也观察到在哮喘病人的气道平滑肌细胞中，真核起始因子-4E (eIF-4E) 的水平也降低了。eIF-4E 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的终点，下调该因子，或其他上游因子，均可导致 C/EBP α 的表达下降。此外 C/EBP α 的不足可能与营养、脂质、维生素、钙剂等代谢相互联系，所有这些都与哮喘有关^[26,27]。当敲除小鼠的 C/EBP α 基因后，发现这些小鼠将缺乏嗜酸性粒细胞。而 CEBP α 表达的增加能使嗜酸性粒细胞表达相继增高。因此，不难发现 C/EBP α 的表达改变合理解释了哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞动态变化。在哮喘病人中对 C/EBP α 的表达进行翻译调控，可能会得到一种新的治疗策略，为治愈该疾病提供理论基础。

7. C/EBP α 在肺癌中的作用

肺癌的发病率及死亡率在世界各地均较高, 严重地威胁了人类健康及生活质量。最初在急性髓系白血病(AML)中发现 C/EBP α 是一个肿瘤的抑制基因^[28], 其通过调节造血干细胞及祖细胞的平衡, 来发挥抑制作用。随后在肝癌、肺癌、皮肤癌等癌症中也有类似的发现^[29-33]。C/EBP α 作为典型的碱性亮氨酸拉链转录因子, 在许多组织均有表达。Atsuyasu Sato^[34]等人通过腹腔注射 p38 抑制剂, 发现小鼠肺泡 II 型细胞的 C/EBP α 表达受到 p38 丝裂原活化蛋白激酶的调控, 下调 p38 α 可影响 C/EBP α 的表达。国内有研究通过收集标本分析肺癌组织及正常肺组织中 C/EBP α 的表达, 进一步了解该基因与肺癌的预后是否有直接关系。发现 C/EBP α 在肺癌患者中表达率不一致, 存在高表达及低表达的差异。而该基因高表达的患者生存率明显高于低表达者, 说明 C/EBP α 可能作为肺癌治疗的药物靶点, 为肺癌的基因治疗提供理论支持。

综上所述, C/EBP α 在肺发育及多种肺疾病过程中均发挥至关重要的作用。因此随着研究的深入和医疗技术的不断提高, C/EBP α 的基因治疗有望给多种肺部疾病患者提供新的治疗方向。

参考文献

- [1] Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation [J]. *Biochem J*, 2002, 365(3): 561-575.
- [2] Jin F1, Li Y, Ren B, et al. PU. 1 and C/EBP α synergistically program distinct response to NF- κ B activation through establishing monocyte specific enhancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(13): 5290-5295.
- [3] Nerlov C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(7) : 318-324.
- [4] Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, et al. The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation [J]. *Cytokine*, 2011, 54(1): 6-19.
- [5] 应霁. 转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白 α 的研究进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(2): 262-267.
- [6] Li HX, Xiao L, Wang C, et al. Review: Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(10): 784-791.
- [7] Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, et al. PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(21): 2941-2952.
- [8] Yang J, Croniger CM, Lekstrom-Himes J, et al. Metabolic response of mice to a postnatal ablation of CCAAT/enhancer-binding protein α [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(46): 38689-38699.
- [9] Harris TE, Albrecht JH, Nakanishi M, et al. CCAAT/enhancer binding protein-cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29200-29209.
- [10] Slomiany BA, D'Arigo KL, Kelly MM, et al. C/EBP α inhibits cell growth via direct repression of E2F-DP-mediated transcription [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(16): 5986-5997.
- [11] Dhawan P, Wieder R, Christakos S. CCAAT enhancer-binding protein alpha is a

molecular target of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(5): 3086-3095.

[12] Cassel TN, Nord M. C/EBP transcription factors in the lung epithelium [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(4): 773-781.

[13] Nord M, Cassel TN, Braun H, et al. Regulation of the Clara cell secretory protein/uteroglobin promoter in lung [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 923(1): 154-165.

[14] Berg T, Didon L, Nord M, et al. Ectopic expression of C/EBP α in the lung epithelium disrupts late lung development [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(4): 683-693.

[15] Martis PC, Whitsett JA, Xu Y, et al. C/EBP α is required for lung maturation at birth [J]. *Development*, 2006, 133(6): 1155-1164.

[16] Berg T, Didon L, Nord M. Ectopic expression of C/EBP α in the lung epithelium disrupts late lung development [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291: 683-693.

[17] Martis PC, Whitsett JA, Xu Y, et al. C/EBP { α } is required for lung maturation at birth [J]. *Development*, 2006, 133: 1155-1164.

[18] Johnson PF. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(12): 2545-2555.

[19] 杜志云. CCAAT 增强子结合蛋白 α 在高氧肺损伤新生大鼠肺组织中的动态表达及其意义 [D]. 江苏: 苏州大学, 2010.

[20] Xu Y, Saegusa C, Schehr A et al. C-EBP{ α } is Required for Pulmonary Cytoprotection During Hyperoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(2): 286-298.

[21] Katja Hueper, Jens Vogel-Claussen, Megha A, et al. Pulmonary Microvascular Blood Flow in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. The MESA COPD Study [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(5): 570-580.

[22] Didon L, Roos AB, Elmberger GP, et al. Lung-specific inactivation of CCAAT/enhancer binding protein α causes a pathological pattern characteristic of COPD [J]. *Eur Respir J*. 2010, 35(1): 186-197.

[23] Pin Guan, Wentao Cai, Huapeng Yu et al. Cigarette smoke extract promotes

proliferation of airway smooth muscle cells through suppressing C/EBP- α expression [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1408-1414.

[24] Sato A, Xu Y, Whitsett JA, Ikegami M. CCAAT/enhancer binding protein- α regulates the protease/antiprotease balance required for bronchiolar epithelium regeneration [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(4): 454-463.

[25] Borger P, Miglino N, Baraket M, et al. Impaired translation of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA in bronchial smooth muscle cells of asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123: 639-645.

[26] Lian J, Yan XH, Peng J, et al. The mammalian target of rapamycin pathway and its role in molecular nutrition regulation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(4): 393-399.

[27] Trian T, Benard G, Begueret H, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(13): 3173-3181.

[28] Hackanson B, Bennett K L, Brena RM. Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(9): 3142-3151.

[29] Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, et al. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(4): 619-628.

[30] Loomis KD, Zhu S, Yoon K, et al. Genetic ablation of CCAAT/enhancer binding protein alpha in epidermis reveals its role in suppression of epithelial tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6768-6776.

[31] Alan D. Friedman. C/EBP α in normal and malignant myelopoiesis [J]. *Int J Hematol*, 2015, 101(4): 330-341.

[32] Halmos B, CS Huettner. Down-regulation and antiproliferative role of C/EBP alpha in lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(2): 528-534.

[33] Lu H, Zhang Yu. CUGBP1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis via down-regulating C/EBP α in human non-small cell lung cancers [J]. *Medical Oncology*, 2015, 32(3): 82.

[34] A Sato, Norishige Yamada, Yuya Ogawa, et al. CCAAT/Enhancer-Binding

Protein- α Suppresses Lung Tumor Development in Mice through the p38 α MAP Kinase Pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57013.

致谢

白驹过隙，转眼间在江苏大学三年的求学生涯即将结束，过去的点点滴滴历历在目，思绪涌入心头，有太多的人需要去感恩，有太多的事需要去铭记，在此表述我心底最诚挚的谢意。

首先，首先感谢我的导师——卢红艳教授。卢老师不仅对我的学业谆谆教导，更对我的生活提供无微不至的关心。您严谨求实的工作作风，一丝不苟的科研态度，都在我心中打下了烙印，是您让我更深刻地体会到“有时，去治愈；常常，去帮助；总是，去安慰”这句话的深层含义，这将深深的影响我的一生。卢老师不仅是我学习的榜样，更是我今后努力的方向和奋斗目标。临近毕业，让我再一次向我敬爱的导师致以崇高的敬意。祝福卢老师身体健康，工作顺心，家庭幸福，天天开心。

感谢江苏大学附属医院儿科的所有带教老师，感谢您在规培期间对我的指导，所有老师都是那么的充满友爱、向上、互助，谦虚和包容，您们在我学习的过程中给予了那么多的帮助，让我走出这个校门时增强了信心，今天虽无以回报，但他们靓丽的身影将会永远留在我的脑海。

感谢江苏大学附属医院心血管国家重点实验室的王中群、邵晨老师对本实验顺利进行提供的帮助，感谢您的接纳使我的实验得以顺利进行。感谢国家自然科学基金（No:81370746）、江苏省自然科学基金面上项目（No: BK20161356）及镇江市社会发展面上项目（No:SH2015038）对本实验提供的支持。

感谢鞠慧敏和张燕雨师姐给我实验技术等方面的指导，感谢我的同门刘姜艳、黄玮玲等在几年的学习生活中给我的帮助和精诚协作，感谢我的师妹万峰云、万雪晴、朱玥、郝晓波给予的无私帮助，感谢我的室友周倩文在生活上给予的帮助，因为有你们，这三年因为有你们，不虚此行，在此一并感谢。

感谢我的父母及亲人对我学业给予的大力支持和默默关怀，你们是我最温暖的港湾，让我有条件安心学习和工作并最终完成学业。衷心的道一声你们辛苦了。最后衷心感谢在百忙之中抽出时间审阅本论文、参加论文答辩的专家教授！

攻读学位期间发表文章

1. 卢衍敏, 卢红艳, 刘姜艳, 常明, 王秋霞, 唐炜. 高氧调节早产大鼠肺泡 II 型上皮细胞 CCAAT 增强子结合蛋白 α 和肺泡表面活性蛋白的表达. 细胞与分子免疫学杂志. 2017, 33(06): 767-771
2. Chen YD, Liu JY, Lu YM, Zhu HT, Tang W, Wang QX. Functional roles of C/EBP α and SUMO- modification in lung development. Int J Mol Med. 2017 Oct; 40(4): 1037-1046.
3. 刘姜艳, 卢红艳, 卢衍敏, 常明, 王秋霞, 唐炜. CCAAT 增强子结合蛋白 A 在大鼠肺发育过程中的动态表达及意义. 中华实用儿科临床杂志. 2017.08
4. Yanmin Lu, Haitao Zhu, Jiangyan Liu, Wei Tang, Qiuxia Wang, Hongyan Lu. Effects of C/EBP α overexpression on alveolar epithelial type II cell proliferation, apoptosis and surfactant protein-C expression after exposure to hyperoxia. (在投)