

地塞米松对先天性膈疝胎鼠肺发育的影响

唐志贤 余家康 王凤华 曾荣新 邹焱 李瑞琼 贾炜 夏慧敏

【摘要】 目的 研究地塞米松对先天性膈疝(Congenital Diaphragmatic Hernia, CDH)胎鼠肺发育的影响,并探讨其可能机制。方法 采用 Nitrofen 法制作胎鼠 CDH 模型并分组,地塞米松组予以产前地塞米松治疗,Nitrofen 组则不予地塞米松治疗,另取正常胎鼠为对照组;采用组织学检查方法评价肺发育情况,免疫组化和图像分析方法检测地塞米松作用前后胰岛素样生长因子- I (Insulin-like Growth Factor, IGF-I) 在胎肺中的表达及相对含量。结果 与 Nitrofen 组相比,地塞米松组肺组织中 IGF- I 的表达明显降低,且肺组织发育明显改善。结论 胎儿期地塞米松通过下调肺组织中 IGF- I 的表达,来改善肺组织的发育。

【关键词】 疝, 横膈;胰岛素样生长因子 I /分析;疾病模型, 动物;地塞米松/药理学;大鼠

Effect of the Antenatal administration Dexamethasone on the lung development. TANG Zhi-xian, YU Jia-kang, WANG Feng-hua, et al. Department of surgery, Children's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, 518000, China.

【Abstract】 Objective To observe the effects of the antenatal administration of dexamethasone on the fetal lung development in congenital diaphragmatic hernia (CDH) rat model and to investigate its role in the pathogenesis of the pulmonary hypoplasia. **Methods** The CDH rat model was constructed by using Nitrofen. The animals in the DXE group were treated by the antenatal administration of dexamethasone and the NIT group were not, and the normal fetal rats were used as normal control. The fetal lung development was evaluated and the expression of the insulin-like growth factor I (IGF- I) in lung was measured. **Results** Compared with the NIT group, the rats in the DEX group had a higher expression of IGF- I and well-developed lung. **Conclusions** Antenatal dexamethasone can downregulate the expression of IGF- I in fetal lung and improve the development of lung.

【Key Words】 Hernia,Diaphragmatic;Insulin-Like Growth Factor I/AN;Disease Models,Animal;Dexamethasone/PD;Rats

糖皮质激素已广泛应用于先天性膈疝(congenital diaphragmatic hernia,CDH)的治疗性实验研究^[1,2],其治疗机制尚未十分清楚,调节细胞因子表达水平是其可能通路之一。国外有研究认为,胰岛素样生长因子- I (insulin-like growth factor- I,IGF- I)可能参与调节胎肺发育^[3],并在 CDH 的发病机制中发挥一定的作用。目前关于糖皮质激素对 CDH 患儿 IGF- I 表达的影响尚未见研究报道,本实验旨在通过免疫组化方法了解糖皮质激素对 CDH 大鼠模型胎肺 IGF- I 表达的影响,以为临床上 CDH 的治疗提供理论上的依据。

材料和方法

一、实验材料

清洁级体重 200 ~ 250 g 成年青春期(Sprague Dawley,SD)大鼠由广州医学院实验动物中心提供。IGF-I 抗体购自美国 Neomarkers 公司(产品编号: Cat.#RB-9240-R7)。即用型第二代免疫组化 Elivision TM plus 广谱试剂盒(产品编号:Kit-9901)和 DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司,地塞米松磷酸钠购自徐州莱恩药业有限公司。图像分析系统由德国 KONTRON IBAS 2.0 图像分析软件、日本 JVC ky-F30B 3-CCD 彩色图像摄录输入仪和德国 ZEISS Axiotron 研究型显微镜组成,由中山大学医学院图像分析中心完成。

作者单位:广州儿童医院外科(510120),通讯作者:夏慧敏,E-mail:huiminxia@hotmail.com,本研究为广东省重点科技攻关课题(项目号 2003C34208)

二、试验方法

1、动物模型制作与分组 根据文献^[4]提供的方法制作动物模型,并于妊娠第 18.5 天和第 19.5 天经腹腔注射地塞米松 0.4 mg / kg。在妊娠第 21 天(自然分娩 22 d)行剖腹产,将胎鼠取出稍作冲洗和拭干后称重,依次置于外科双目解剖显微镜下解剖,检查有无膈疝。完整取出双肺,分别称湿重,然后将胎肺放入 10%中性福尔马林溶液中浸泡固定 24 h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做厚度为 3 μm 的连续切片,常规 HE 染色。根据孕鼠是否施加 Nitrofen 和地塞米松(Dex)分为三大组,具体为对照组($n = 10$,第 1 组),孕鼠未施加 Nitrofen 和地塞米松;Nitrofen 组只施加了 Nitrofen 而无 Dex,根据解剖检查胎鼠有无膈疝分又细为 Nitrofen 膈疝组(CDH, $n = 10$,第 2 组)和 Nitrofen 无膈疝组(noCDH, $n = 8$,第 3 组),Dex 组既施加了 Nitrofen 也施加了 Dex,根据解剖检查胎鼠有无膈疝分为 Dex 膈疝组(CDH, $n = 10$,第 4 组)组和 Dex 无膈疝组(NO CDH, $n = 6$,第 5 组)。

2、免疫组织化学检查:本研究采用 LDP 法(两步法)。以胰腺组织作为阳性对照,PBS 替代一抗作

为阴性对照。

3、组织学检查:对常规 HE 染片在光镜下观察各组胎肺的发育和组织学表现。

4、图像采集和分析:每张切片随机取 3 个 10 × 20 倍视野,编程后分别自动测量 HE 片的肺泡间隔和平均肺泡面积与免疫组化片的阳性部位及背景的平均灰度和面积,根据文献^[5]引入的阳性单位的概念及其计算公式,以阳性单位数值定量表示肺 IGF-I 的含量,数值越小,说明染色越深。

5、统计学处理:实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析,所有数据应用 SPSS 11.5 for windows 软件进行统计分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、体重及其它重量指标

Nitrofen 组和 Dex 组胎鼠体重明显低于对照组。在湿肺总量方面,与对照组相比,Nitrofen 组和 Dex 组均明显下降。各项指标检测结果见表 1。

表 1 各组各项检测指标比较

分组	n	检测指标					
		体重 (g)	肺总重量 (×10 ⁻² g)	肺总重/体重 (mg/g)	IGF	肺泡间隔 (μm)	平均肺泡面积 (μm ²)
对照组	10	5.55±0.37 (*2,3,4,5)	15.11±2.21 (*2,3,4,5)	27.20±3.50 (#5,*2,4)	9.23±1.43 (*2,3,4,5)	16.17±7.26 (*2,3,4,5)	820.28±209.28 (#2)
Nitrofen 组	CDH	4.41±0.51 (*1)	6.83±0.98 (*1,3)	15.70±2.75 (*1,3)	1.75±0.64 (1,4,5)	24.05±10.12 (*1)	321.14±35.23 (#1,4;*5)
	无 CDH	4.26±0.31 (*1)	10.46±2.52 (*1,2,4)	24.55±5.43 (*2,4)	1.90±0.61 (*1,4,5)	21.15±7.34 (*1,4)	553.70±198.30 0
Dex 组	CDH	4.08±0.61 (*1)	6.41±0.94 (*1,3;*5)	16.10±3.65 (*1,3)	5.46±0.89 (1,2,3)	29.26±13.42 (*1,3)	835.10±259.70 (#2)
	无 CDH	4.53±0.30 (*1)	9.12±1.69 (*1;*4)	20.20±3.93 (#1)	5.79±0.81 (*1,2,3)	25.20±10.92 (*1)	880.64±320.89 (#2)

注:括号内数字为组别,1 为对照组,2 为 Nitrofen-CDH 组,3 为 Nitrofen-无 CDH 组,4 为 DEX-CDH 组,5 为 DEX-无 CDH 组;* 为该组与其他组比较, $P < 0.01$,差异有显著统计学意义,# 为该组与其他组比较, $P < 0.05$,差异有统计学意义。

二、组织学检查

正常对照组大鼠肺发育较为成熟,而在 Nitrofen 诱导的胎鼠肺发育明显滞后,呈假腺体样改变,尤以 CDH 组为甚。Dex 组胎肺肺泡已基本扩张,肺泡直径增大,支气管分支较多,无明显假腺体样改变,肺泡间隔肿胀,毛细血管肌层变薄(图 1)。

Nitrofen 组和 Dex 组肺泡间隔与对照组相比,均显著增厚。Nitrofen-CDH 组的平均肺泡面积在各组中最小,与对照组和 Dex 组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。Dex 组内有无 CDH 胎鼠的平均肺泡面积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

三、免疫组化

IGF-I 在正常对照组中呈极低量表达, 在 Nitrofen 组和 Dex 组中表达明显升高, 尤以 Nitrofen 组表达最高, 表达部位位于细支气管上皮细胞(图 2)。Nitrofen-CDH 组与 Nitrofen-无 CDH 组、DEX-

CDH 组与 DEX-无 CDH 组相比较, IGF 的表达水平无差别, 但是 DEX-CDH 组与 Nitrofen-CDH 组、DEX-无 CDH 组与 Nitrofen-无 CDH 组相比, DEX-CDH 组和 DEX-无 CDH 组的 IGF-I 水平分别显著低于 Nitrofen-CDH 组和 Nitrofen-无 CDH 组。

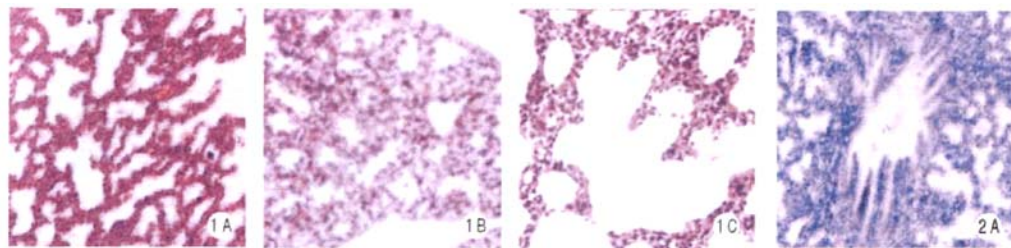


图 1 三组胎肺 HE(10×20)片比较, A 为正常对照组, B 为 CDH 组胎肺, C 为 Dex 组胎肺, 对照组胎肺发育较为成熟, 而膈疝组与非膈疝组发育明显滞后, 肺泡大部分塌陷, 肺泡间隔弥漫性增宽, 肺泡、肺泡管及肺泡囊呈假腺体样改变。

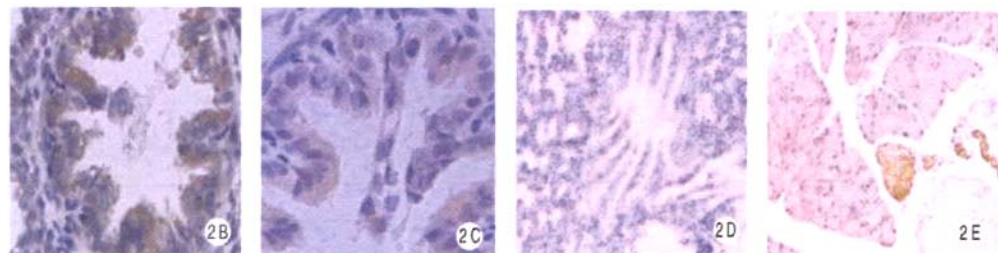


图 2 三组免疫组化(10×40) A 为正常对照组, 显色微弱或缺如。B 为 CDH 组胎肺, IGF-I 表达于细支气管上皮细胞胞浆, 显色较强。C 为 Dex 组胎肺, IGF-I 表达于细支气管上皮细胞胞浆, 显色较弱。D、E、分别为阴性和阳性对照, I 为胎肺组织, J 为胰腺组织。

讨 论

CDH 是小儿外科领域的重要研究课题, 目前对该领域的研究集中于发病机制和治疗方面。肺发育不良是导致 CDH 死亡的主要原因, 也是决定预后的关键因素^[4], 因此, 治疗的重点在于如何阻止肺发育不良的发生和改善增强肺功能, 方向在于产前激素治疗^[2]。在对 CDH 动物模型的研究中发现, 产前使用糖皮质激素能促进肺表面活性蛋白成熟, 增强表面活性蛋白在 II 型肺泡上皮细胞的表达, 提高肺顺应性和降低肺泡表面张力, 改善肺形态结构, 减少肺血管鞘和中层厚度, 增大肺泡直径^[1,2], 因而糖皮质激素被广泛应用于 CDH 的治疗性实验研究。

IGF 系统在肺发育中起关键作用, 目前至少有 3 个证据表明 IGF-I 涉及肺的发育^[3,9]: ①胎肺发育的各个时期均可发现 IGF-I 及 IGF-I 受体存在; ②体外培养的胎肺细胞能够产生 IGFs; ③体外实验表明, IGF-I 能够刺激成人和胎肺细胞进行有丝分裂。IGF-

I 在整个妊娠期均有表达, 在妊娠第 20 周达高峰, 之后逐渐下降, 在新生儿肺中几乎检测不到。有研究显示^[7], IGF 的生物学特点之一是合成与起作用部位不一致。一项使用原位杂交技术检测到 IGF 位于胎肺肺泡巨噬细胞和肺泡 II 型细胞^[8]。Puri 和作者前期的实验研究均证实^[8,9], IGF-I 在正常对照组极少量表达, 但在 Nitrofen 诱导的 CDH 胎肺中, 其表达水平显著增强, 表达在细支气管上皮细胞。作者通过相关研究还发现, IGF-I 的表达量与肺泡面积呈负相关, 据此, 作者认为, CDH 发育不良肺的结构和功能均相对应于胎肺发育的早期阶段。

目前, 关于地塞米松对 IGF-I 表达影响的研究, 各家结论不一。有资料显示, 大剂量地塞米松能够抑制人类和大鼠血浆 IGF 水平, 也能降低大鼠成骨细胞中 IGF 水平^[10], 而小剂量糖皮质激素则能提高人类和大鼠血浆 IGF 水平^[11]。本研究重点是地塞米松对 CDH 胎肺 IGF-I 表达的影响, 结果显示, IGF-I 在正常对照组极低表达, 而在 Nitrofen 诱导的 CDH 发育不良的胎肺中明显升高, 但在地塞米松治疗组中显著降低, 表明地塞米松对 CDH 胎肺 IGF-I 的表达

是抑制作用,可能存在剂量依赖性模式,可能的模式是大剂量时表现为抑制,小剂量时则是增强作用,具体模式需进一步研究。本研究中,地塞米松组即治疗组中胎肺形态结构有明显改变,肺泡直径增大,平均肺泡面积也明显增大,支气管树分支增多,表明发育不良的肺经地塞米松治疗后,IGF-I 的表达水平下降,且随着肺的形态结构改变而改善,进一步说明地塞米松之所以能够促进胎肺结构的成熟,其中的机制很可能是通过下调 IGF-I 表达水平实现的。

本研究中,IGF-I 在 Nitrofen 组和 Dex 组两组之间 CDH 和无 CDH 的表达水平的差异,后者明显低于前者,表明无论在 CDH 组还是无 CDH 组,胎肺 IGF-I 的表达水平在经地塞米松治疗后明显低于治疗前,同时肺形态结构有显著改善,很显然,肺功能也得到了提高,进一步说明了新生儿膈疝应延期手术而非即刻手术治疗新观点的理论基础,该观点认为决定预后的关键因素是肺的发育程度,因此主张新生儿危重膈疝应着力改善循环和呼吸功能,待情况稳定后再行手术。术前使用地塞米松对于增强手术的安全性,提高该病的生存率从理论上分析是成立的。

持续肺动脉高压也是 CDH 的主要死因之一,CDH 大鼠模型的研究提示,肺血管的结构性改变,肌鞘和中层厚度增加,严重影响了肺血管的舒缩能力。有研究^[2]认为,产前使用地塞米松能改善肺血管结构的改变,其机制尚不十分清楚。IGF-I 是一种强有力的促有丝分裂原物质,它在平滑肌细胞和纤维母细胞的生长和分化过程中起重要作用。本研究中,使用地塞米松后,胎肺毛细血管肌层和血管中层厚度变薄。作者推测,糖皮质激素下调 IGF-I 的表达,影响平滑肌细胞和纤维母细胞分化是糖皮质激素改善肺血管结构的可能通路。

至于糖皮质激素通过何种途径影响 IGF-I 的表达,目前仍不清楚,有研究证实,糖皮质激素通过抑制大鼠软骨细胞 IGF-I 受体和 IGF 结合蛋白 (IGF-BP) 的生成来降低 IGF-I^[12],而 IGFBP 是 IGF-I 存在的主要形式。另一可能的途径是影响分泌调控机制^[13],IGF 的表达随生长激素水平变化而呈同步变化,但生长激素与糖皮质激素二者间则表现为拮抗作用。上述两观点为在胎肺细胞中是否存在相同机制的研究提供了线索。

参 考 文 献

- 1 Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, *et al.* Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced CDH rat model[J]. J Pediatr Surg, 1995, 30:420-426.
- 2 Taira Y, Miyazaki E, Puri P. Administration of antenatal glucocorticoids prevents pulmonary artery structural changes in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats[J]. J Pediatr Surg, 1998, 33:1052-1056.
- 3 Lee CI, Goldstein O, Han VK, *et al.* IGF- II and IGF binding protein (IGFBP-1, IGFBP-3) gene expression in fetal rhesus monkey tissues during the second and third trimesters[J]. Pediatr Res, 2001, 49(3):379.
- 4 luth D, Losty P, Donakoe PK, *et al.* Towards understanding the development anatomy of left-sided congenital diaphragmatic hernia[J]. B Assoc Pediatric Surgeons, 1995, 7, 26-28.
- 5 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1):89-91.
- 6 Stiles AD, sosenk IR, Smith BT, *et al.* Rapid rise in pulmonary somatomedin (SMC) levels in the regenerating lung [J]. Pediatr Res, 1993, 17:391.
- 7 Hill DJ, Petrik J, Arany E. Growth factors and the regulation of fetal growth[J]. Diatetes Care, 1998, 21:60-69.
- 8 Eiji Miyazaki, Kiyohiko Ohshiro, Yasuhiko Taira, *et al.* Altered insulin-like growth factor-I mRNA expression in human hypoplastic lung in congenital diaphragmatic hernia [J]. J Pediatr Surg, 1998, 33(10):1476-1479.
- 9 唐志贤, 余家康, 曾荣新, 等. 胰岛素样生长因子-I 在 Nitrofen 诱导的先天性膈疝大鼠模型胎肺中的表达[J]. 中华小儿外科杂志, 2005, 26(7):376-379.
- 10 Inz K, Schmid C, Bouillon R, *et al.* Interaction of insulin-like growth factor-I with dexamethasone on trabecular bone density and mineral metabolism in rats [J]. Eur J Endocrinol, 1994, 130:387-393.
- 11 Luo J, Murphy LJ. Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA in the hypophysectomized rat and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat[J]. Endocrinology, 1989, 125:165-171.
- 12 Canalis E. Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is local insulin-like growth factor I to blame? [J] Endocrinology, 1998, 139: 3041-3042.
- 13 Itagane Y, Inada H, Fujita K, *et al.* Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes[J]. Endocrinology, 1991, 128:1419-1424.

作者: 唐志贤, 余家康, 王风华, 曾荣新, 邹焱, 李瑞琼, 贾炜, 夏慧敏
作者单位: 广州儿童医院外科, 510120
刊名: 临床小儿外科杂志 
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2008, 7(1)
被引用次数: 0次

参考文献(13条)

- 1.Itagane Y;Inada H;Fujita K Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes 1991
- 2.Canalis E Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth.Is local insulin-like growth factor I to blame? 1998(7)
- 3.Luo J;Murphy LJ Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I)mRNA in the hypophysectomized rat and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat 1989
- 4.唐志贤;余家康;曾荣新 胰岛索样生长因子-I 在Nitrofen诱导的先天性膈疝大鼠模型胎肺中的表达[期刊论文]-中华小儿外科杂志 2005(07)
- 5.Eiji Miyazaki;Kiyohiko Ohshiro;Yasuhiko Taira Altered insulin-like growth factor-I mRNA expression in human hypoplastic lung in congenital diaphragmatic hernia 1998(10)
- 6.Hill DJ;Petrik J;Arany E Growth factors and the regulation of fetal growth 1998
- 7.Stiles AD;sosenk IR;Smith BT Rapid rise in pulmonary somatomedin(SMC) levels in the regenerating lung 1993
- 8.申洪 免疫组织化学染色定量方法研究(III) 1995(01)
- 9.luth D;Losty P;Donakoe PK Towards understanding the development anatomy of left-sided congenital diaphragmatic hernia 1995
- 10.Lee CI;Goldstein O;Han VK IGF-II and IGF binding protein(IGFBP-1,IGFBP-3)gene expression in fetal rhesus monkey tissues during the second and third trimesters 2001(03)
- 11.Taira Y;Miyazaki E;Purl P Administration of antenatal glucocorticoids prevents pulmonary artery structural changes in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats 1998
- 12.Losty PD;Suen HC;Manganaro TF Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofeninduced CDH rat model 1995(3)
- 13.Inz K;Schmid C;Bouillon R Interaction of insulin-like growth factor-1 with dexamethasone on trabecular bone density and mineral metabolism in rats 1994

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200801008.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: 974c1561-02c7-457b-8b75-9ed30126179c

下载时间: 2011年4月28日