

## E2F1 蛋白在高氧致慢性肺疾病早产鼠肺组织的动态表达及意义

赵诗萌, 张良, 吴红敏

(中国医科大学附属第一医院新生儿科, 沈阳 110001)

**[摘要]** **目的:** 通过检测 E2F1 蛋白在高氧致慢性肺疾病早产鼠肺组织中的动态表达, 初步探讨 E2F1 蛋白与慢性肺疾病肺间质纤维化发生发展的关系。**方法:** 剖宫术取出孕 21 d Wistar 大鼠作为早产鼠, 生后 12 h 随机分为高氧组和对照组, 高氧组持续暴露于 90% 氧气中, 空气组置于同一室内常压空气中。分别于暴露 3, 7, 14 d 时, 每组取动物 10 只, 留取其肺组织标本。应用 HE 染色观察不同时间点其肺组织病理改变, 在光镜下进行肺组织纤维化评分, 并采用免疫组织化学法及 Western 印迹检测不同时间点肺组织 E2F1 蛋白的表达。**结果:** 早产鼠高氧暴露 3 d 后未出现纤维化改变, 7 d 后出现少许纤维化改变, 14 d 后纤维化改变明显; E2F1 在高氧暴露 3 d 在肺组织中 E2F1 蛋白表达虽较同时点空气组有所升高, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 高氧暴露 7 d 及 14 d E2F1 蛋白表达明显高于同时点空气组 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论:** 高氧导致早产鼠肺组织 E2F1 表达持续性增高, 其异常表达可能是导致肺成纤维细胞过度增殖, 最终发生肺间质纤维化的重要原因。

**[关键词]** 高氧; 早产儿; 慢性肺疾病; 肺间质纤维化; E2F1 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.10.007

## Dynamic expression of E2F1 in lung of premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease and its significance

ZHAO Shimeng, ZHANG Liang, WU Hongmin

(Department of Neonates, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To determine the dynamic expression of E2F1 in lung of premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease and the relation between E2F1 and pulmonary fibrosis.

**Methods:** Premature Wistar rats at 21 days gestation were randomly and equally divided into a hyperoxia group and a room air group. The hyperoxia group was continuously exposed to hyperoxia (90%) while the air group in room air. Lung tissues in the 2 groups were obtained at 3, 7 and 14 days after exposing to either room air or hyperoxia. The changes of pulmonary histopathology at different time points were observed by hematoxylin and eosin staining; the severity of pulmonary fibrosis was evaluated; and the expression of E2F1 in lung tissue was detected by immunohistochemistry and Western blot.

**Results:** After 3 days of hyperoxia, no significant interstitial fibrosis was observed; while after 7 days in the hyperoxia group, interstitial fibrosis was observed. These changes became more obvious after 14 days of prolonged hyperoxia exposure. No significant difference in the expressions of

收稿日期 (Date of reception): 2012-01-11

作者简介 (Biography): 赵诗萌, 博士, 副教授, 主要从事早产儿慢性肺疾病发病机制的研究。

通信作者 (Corresponding author): 吴红敏, Email: WHM406@163.com

基金项目 (Foundation item): 辽宁省自然科学基金 (201102262)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province, P. R. China (201102262).

E2F1 protein was found between the hyperoxia group and the room air group 3 days postnatally ( $P>0.05$ ). The expression of E2F1 in the hyperoxia group significantly increased 7 days and 14 days postnatally ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

**Conclusion:** Abnormality of E2F1 expression is involved in the pathological process of the proliferation of lung fibroblasts in hyperoxia-induced chronic lung disease neonatal rats, and it plays an important role in lung fibrosis.

## KEY WORDS

hyperoxia; premature infant; chronic lung disease; interstitial fibrosis; E2F1

氧疗是早产儿低氧性呼吸衰竭最主要的治疗手段和抢救措施, 但用氧不当或长期用氧可导致氧中毒, 引起相关并发症, 早产儿慢性肺疾病 (chronic lung disease, CLD) 是氧疗最常见的肺部并发症。现已证实, CLD 晚期病理结局是不可逆转的肺间质纤维化<sup>[1]</sup>, 表现为肺成纤维细胞的过度增殖<sup>[2-3]</sup>, 其细胞水平的发病机制目前尚不清楚。E2F1 蛋白是细胞周期 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡的重要调控因子, 可通过调节一系列细胞增殖相关基因 (如 PCNA, cdk2, cmy-c, Tx) 在调节细胞周期进程和调节细胞增殖过程中起着关键作用, E2F1 过表达可刺激细胞的增殖。本研究通过制备高氧肺损伤新生大鼠动物模型, 检测其肺间质纤维化不同发展阶段肺组织 E2F1 蛋白的表达, 探讨 E2F1 蛋白在高氧致肺间质纤维化发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康成年 Wistar 大鼠 2~3 月龄, 雌性 40 只, 雄性 10 只, 由中国医科大学动物部提供。鼠抗人 E2F1 蛋白单克隆抗体、兔抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Crus 公司。通用型 SP 系列工作液试剂盒 (SP-9000)、DAB 显色剂及碱性磷酸酶标记的二抗购自北京中杉生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型制备及分组

成年 Wistar 雌性大鼠, 体质量 201~243 g (平均体质量 232 g), 与健康 Wistar 雄性大鼠 (按雌: 雄 = 4:1) 夜间合笼。次日阴道分泌物涂片, 如镜下检测发现精子, 则以当天确定为妊娠第 1 天, 待孕 21 d 行剖宫产, 取出的新生鼠即为早产鼠, 将复苏成功的早产鼠用代母鼠喂养。新生鼠随机分为空气组和高氧组, 高氧组于生后 12 h 内 (连同母鼠) 置于玻璃氧箱 (60 cm×50 cm×40 cm) 中, 持续输入氧

气, 维持吸入氧浓度 (fraction of inspired oxygen, FiO<sub>2</sub>) 90%, 用钠石灰吸收 CO<sub>2</sub>, 使其浓度 <0.5%。温度 22~25 °C, 湿度 50%~70%, 每天定时开箱 30 min, 添加水、饲料及更换垫料, 并与空气组交换母鼠以免因氧中毒而导致喂养能力下降。空气组 FiO<sub>2</sub> 为 21%, 饲养条件与高氧组相同。

#### 1.2.2 HE 染色判定肺组织纤维化程度

石蜡切片经 HE 染色后, 每组动物各时间点随机抽取切片 10 张, 于 10 倍光镜下依肺纤维化程度进行双盲评定, 设为 0~8 分。1 分: 肺泡或细支气管壁少许纤维化; 2~3 分: 中度纤维化, 但无肺泡结构改变; 4~5 分: 有明确的肺泡结构变化 (肺泡壁明显增厚) 和纤维小结形成; 6~7 分: 严重的肺泡结构改变和大片纤维化; 8 分: 完全纤维化。

#### 1.2.3 免疫组织化学检测肺组织中 E2F1 蛋白表达

标本经无菌取材后, 置于 10% 中性福尔马林固定脱水, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 连续切片。实验步骤严格按照试剂盒说明步骤进行, 抗原修复用热修复的方法, E2F1 用 pH=6.0 的柠檬酸缓冲液, 滴加鼠抗人 E2F1 单克隆抗体 (1:100), DAB 显色, PBS 代替一抗作为空白对照。细胞核有黄色或棕黄色颗粒为 E2F1 蛋白阳性表达, 每组动物各时间点随机抽取切片 10 张, 每张切片随机选取 5 个视野, 固定窗口面积, 蛋白半定量应用美国 Universal Imaging Porporation 图像分析系统, 应用 Meta Morph 软件分析阳性细胞的着色强度, 以平均灰度值代表强度。

#### 1.2.4 Western 印迹检测肺组织中 E2F1 蛋白表达

从液氮中取出冻存的标本, 将组织块剪碎, 加入细胞裂解液提取总蛋白, 酚试剂法进行蛋白定量。SDS-PAGE 凝胶电泳并转至 PVDF 膜。一抗为鼠抗人 E2F1 单克隆 IgG 抗体, 4 °C 过夜, 二抗 (抗鼠, IgG-) 37 °C 孵育 2 h, 显色, 观察结果。以  $\beta$ -actin 蛋白表达为内参, 采用 GIS-2020 凝胶成像分析系统扫描分析结果, 对蛋白质含量进行密度分析, 以相对灰度值代表蛋白质表达量。

### 1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学分析, 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两样本比较用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 早产鼠肺组织的病理变化及肺组织纤维化评分

空气组暴露 3, 7, 14 d, 肺组织发育逐渐成熟, 肺泡结构逐渐规整, 大小均匀, 肺泡间隔薄, 各时间点肺组织形态无明显改变。高氧暴露 3 d, 与空气组比较无较大差异; 高氧暴露 7 d, 肺泡壁略增厚, 肺泡或细支气管壁少许纤维化; 高氧暴露 14 d 时纤维化改变明显, 可见纤维束或纤维小结, 肺

表 1 早产鼠肺组织纤维化评分比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 d	7 d	14 d
空气组	0.35 $\pm$ 0.15	0.58 $\pm$ 0.14	0.65 $\pm$ 0.27
高氧组	0.39 $\pm$ 0.09	1.25 $\pm$ 0.22 <sup>*</sup>	4.23 $\pm$ 0.52 <sup>**</sup>

与同时间点空气组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

间质内可见大量肺成纤维细胞 (lung fibroblasts, LFs) 增生。高氧暴露 7, 14 d 组早产鼠肺纤维化评分明显高于同时间点空气组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ; 表 1)。

### 2.2 早产鼠肺组织中 E2F1 蛋白表达

免疫组织化学的结果显示: 生后 3 d 时, 空气组和高氧组 E2F1 蛋白的表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 生后 7, 14 d 时, 高氧组 E2F1 蛋白的表达明显高于同时间点空气组 ( $P < 0.01$ ; 图 1, 表 2)。

Western 印迹结果显示: 生后 3 d 时, 空气组和高氧组 E2F1 蛋白的表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 生后 7, 14 d 时, 高氧组 E2F1 蛋白的表达明显高于同时间点空气组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ; 图 2, 表 3)。

表 2 各组肺组织 E2F1 蛋白表达免疫组织化学半定量分析 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Expressions of E2F1 in lung tissues detected by immunohistochemistry ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 d	7 d	14 d
空气组	90.25 $\pm$ 8.54	95.48 $\pm$ 9.04	102.43 $\pm$ 10.77
高氧组	96.49 $\pm$ 7.41	115.27 $\pm$ 10.13 <sup>**</sup>	142.80 $\pm$ 12.85 <sup>**</sup>

与同时间点空气组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

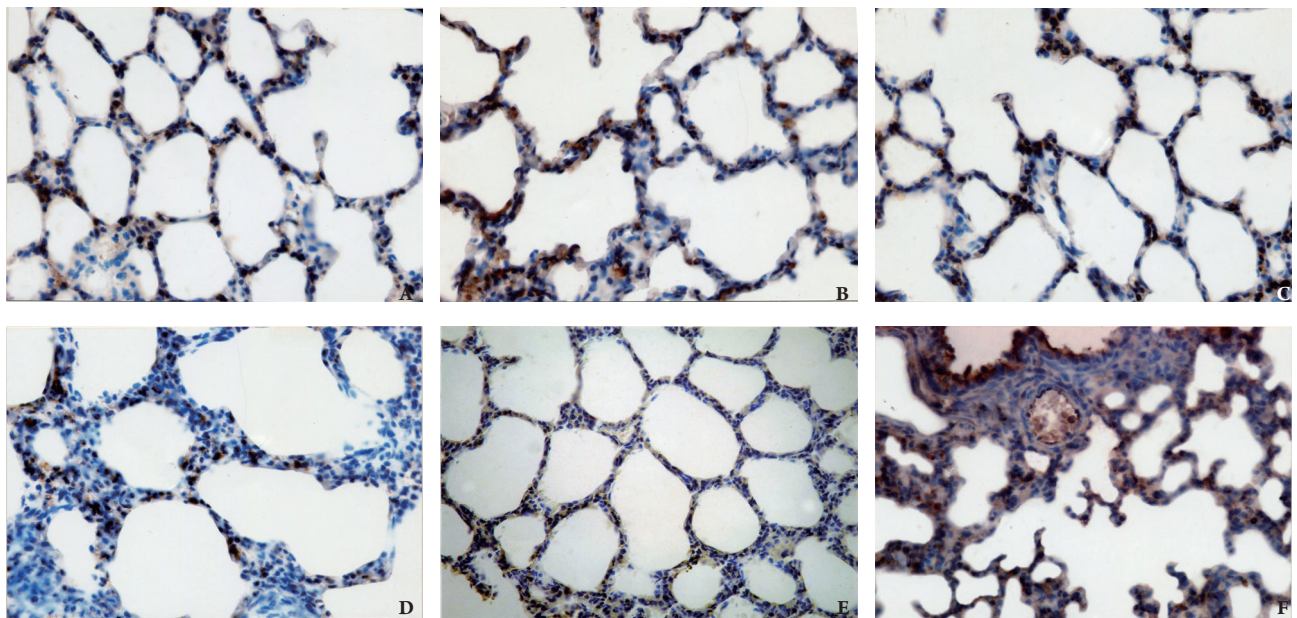


图 1 各组肺组织 E2F1 蛋白表达 (SP,  $\times 200$ )。A: 空气组 3 d; B: 高氧组 3 d; C: 空气组 7 d; D: 高氧组 7 d; E: 空气组 14 d; F: 高氧组 14 d。

Figure 1 Immunohistochemistry showing the E2F1 protein expression in each group (SP,  $\times 200$ ). A: Air group 3 d; B: Hyperoxia group 3 d; C: Air group 7 d; D: Hyperoxia group 7 d; E: Air group 14 d; F: Hyperoxia group 14 d.

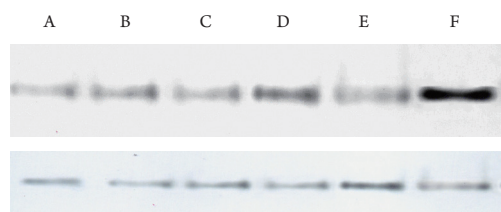


图2 Western 印迹示各组肺组织 E2F1 蛋白表达。A: 空气组 3 d; B: 高氧组 3 d; C: 空气组 7 d; D: 高氧组 7 d; E: 空气组 14 d; F: 高氧组 14 d。

Figure 2 Western blot showing the E2F1 protein expression in each group. A: Air group 3 d; B: Hyperoxia group 3 d; C: Air group 7 d; D: Hyperoxia group 7 d; E: Air group 14 d; F: Hyperoxia group 14 d.

表3 Western 印迹检测各组肺组织的 E2F1 蛋白表达 ( $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Expressions of E2F1 protein in lung tissues detected by Western blot ( $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	3 d	7 d	14 d
空气组	0.75±0.14	0.72±0.09	0.67±0.10
高氧组	0.79±0.11	1.05±0.23 <sup>*</sup>	2.80±0.46 <sup>**</sup>

与同时间点空气组比较, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

### 3 讨论

细胞周期的调控是一个由多基因参与的多步骤过程, 涉及到多种细胞因子。其中, P16-cyclinD1-CDK4/6-RB-E2F 蛋白调控环路是细胞周期调控过程中一条重要的细胞调节通路。正常情况下, CDK4 与 Cyclin D 结合, 促使 Rb 蛋白磷酸化而失活, E2F 转录因子的释放, 正调节细胞增殖周期。P16 蛋白能与 Cyclin D1 竞争性结合 CDK4 并使之灭活, 阻止 Rb 蛋白磷酸化, 从而负调节细胞增殖周期。E2F1 是 E2F 转录因子家族成员之一, 具有促进  $G_0/G_1$  与 S 期转换的作用, 是调节 DNA 合成与修复、细胞分裂和凋亡的关键转录因子。游离 E2F1 具有结合活性, 它与一些细胞周期调控基因启动子上的 E2F 结合位点结合, 从而促进这些基因的表达, 推动细胞周期进展, 引起细胞增殖<sup>[4]</sup>。

研究<sup>[5-6]</sup>表明: E2F1 在非小细胞肺癌和乳腺癌中表达明显增高, 认为 E2F1 是又一新的肿瘤增殖标记物, 而且是影响患者预后的重要因素。此外, E2F1 过表达的食管癌患者预后差<sup>[7]</sup>。因此, E2F1 在肿瘤发生发展中的作用不容置疑。在非肿瘤细胞的异常增殖过程中, E2F1 基因也起着重要的作用。谢庆祥等<sup>[8]</sup>证实, E2F1 基因参与了肾间质细胞增殖过程, 尤其与肾纤维化进程密切相

关。张怀军等<sup>[9]</sup>通过对正常皮肤、正常瘢痕组织和病理性瘢痕组织的 E2F1 的基因水平进行检测发现, E2F1 基因在病理性瘢痕组织中表达增高, 对瘢痕组织中细胞的增殖起着重要的作用。

肺间质纤维化是早产儿慢性肺疾病的晚期最重要的病理结局, 主要表现为过度增殖的肺成纤维细胞沉积于肺间质或替代正常的肺上皮。研究证实, 高氧可导致早产鼠肺组织 p16 基因启动子的甲基化异常, 使 p16 基因表达失活<sup>[10]</sup>, 而 P16 蛋白低表达使得磷酸化的 RB 蛋白表达增加, 导致 RB 蛋白功能障碍, 解除了 RB 蛋白对细胞周期的抑制, 细胞过度增殖<sup>[11]</sup>, 从而促进肺纤维化的发生发展。那么作为 P16 与 RB 的下游基因, E2F1 在肺间质纤维化的发生发展过程中起着怎样的作用, 就是本研究试图弄清的问题。本研究采用高氧致早产鼠 CLD 模型, 发现吸入 90% 的氧 3 d 肺组织尚未出现纤维化改变, 7 d 时肺组织出现肺泡壁略增厚, 肺泡或细支气管壁少许纤维化, 14 d 时纤维化改变明显, 可见纤维束或纤维小结, 肺间质内可见大量 LFs 增生。免疫组织化学及 Western 印迹结果均显示: 持续暴露于 90% 高氧环境中 3 d, 肺组织 E2F1 蛋白表达量与空气对照组无明显差异, 而 7 和 14 d 的肺组织 E2F1 蛋白表达量较空气对照组均明显增高, 表现出明显的时间依赖关系, 且与 CLD 肺间质纤维化的病理改变相一致, 说明 E2F1 的过表达可能促进了肺间质纤维化的发生发展。本研究首次提出细胞周重要的调控因子 E2F1 蛋白在肺纤维化中的作用, 为肺间质纤维化的防治提出新的思路。

### 参考文献

1. Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia[J]. Semin Perinatol, 2006, 30(4): 179-184.
2. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 1723-1729.
3. 赵诗萌, 吴红敏, 刘雪雁, 等. CLD 鼠肺成纤维细胞的原代培养及生物学行为研究[J]. 天津医药, 2009, 19(17): 2561-2564.  
ZHAO Shimeng, WU Hongmin, LIU Xueyan, et al. Primary culture and biological behaviour study of lung fibroblasts from CLD rats[J]. Tianjin Medical Journal, 2009, 19(17): 2561-2564.
4. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 17040-17045.

5. Huang CL, Liu D, Nakano J, et al. E2F1 overexpression correlates with thymidylate synthase and survivin gene expressions and tumor proliferation in non small-cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23): 6938–6946.
6. Kwon MJ, Nam ES, Cho SJ, et al. E2F1 expression predicts outcome in Korean women who undergo surgery for breast carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(2):564–571.
7. Yamazaki K, Hasegawa M, Ohokal, et al. Increased E2F1 expression via tumour cell proliferation and decreased apoptosis are correlated with adverse prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus[J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(9): 904–910.
8. 谢庆祥, 林吓聪, 韩聪祥. 转录因子E2F-1在梗阻性肾组织中的表达及其意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(7): 871–873.  
XIE Qingxiang, LIN Xiacong, HAN Congxiang. Expression of transcription factor E2F-1 in chronic obstructive kidneys[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2007, 17(7): 871–873.
9. 张怀军, 李桑蕾, 张磊, 等. 病理性瘢痕组织中E2F1基因的表达及其意义[J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2007, 17(3):187–189.  
ZHANG Huaijun, LI Sanglei, ZHANG Lei, et al. Expression of E2F1 gene in pathological scar[J]. *Journal of Practical Diagnosis and Therapy*, 2007, 17(3):187–189.
10. Yue X, Fu J, Xue X, et al. Detection of p16 promoter methylation in premature rats with chronic lung disease induced by hyperoxia [J]. *Pediatr Int*, 2010, 52(4): 520–526.
11. 赵诗萌, 魏兵, 吴红敏, 等. 新生大鼠在高氧环境下肺成纤维细胞RB蛋白磷酸化状态的改变[J]. *天津医药*, 2011, 39(8):736–738.  
ZHAO Shimeng, WEI Bing, WU Hongmin, et al. Variation of RB phosphorylation in lung fibroblasts treated with hyperoxia[J]. *Tianjin Medical Journal*, 2011, 39(8):736–738.

(本文编辑 郭征)