

· 论著 ·

CFTR氯离子通道在Ⅱ型肺泡上皮细胞高氧损伤机制的研究*

葛丹丹 刘登礼*

厦门大学附属第一医院儿科, 厦门市儿科重点实验室, 厦门大学医学院儿童医学研究所(福建 厦门 361003)

【摘要】目的 研究囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)氯离子通道在Ⅱ型肺泡上皮细胞(AECⅡ)高氧损伤中的作用。**方法** AECⅡ于密封舱中通入95%O₂+5%CO₂, 持续24h或48h, 构建高氧损伤AECⅡ模型。将实验组AECⅡ随机分为高氧24h组、高氧24h+激动剂(Gen)组、高氧24h+抑制剂(AA)、高氧48h组、高氧48h+Gen组和高氧48h+AA组; 对照组通入空气, 未干预。以膜片钳系统记录CFTR氯离子电流强度。细胞外液中分别加入GEN50μM或AA10μM, 记录GEN激活或AA抑制后氯离子电流强度。采用Clampfit 10.6行数据分析, 应用R4.4.1统计软件对不同组别行Spearman相关性分析。**结果** 1. 高氧24h、48h明显抑制AECⅡ氯离子电流($P<0.01$), 以24h较明显; 2. Gen明显增加高氧24h、48hAECⅡ氯离子电流; AA明显抑制氯离子电流($P<0.01$), 均以48h较明显。**结论** 高氧可能通过影响AECⅡCFTR氯离子外流而发挥作用。

【关键词】 Ⅱ型肺泡上皮细胞; 高氧; 囊性纤维化跨膜传导调节因子; 染料木黄酮; 花生四烯酸

【中图分类号】 R322.3+5

【文献标识码】 A

【基金项目】 福建省自然科学基金(2020J011223)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.1.021

Effects of Hyperoxia on Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel in High Oxygen-induced Injury of Alveolar Epithelial Cells Type II*

GE Dan-dan, LIU Deng-li*

Department of Pediatrics, Pediatric Key Laboratory of Xiamen, Institute of Pediatrics, School of Medicine, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Abstract: Objective To investigate the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel in high oxygen-induced injury of alveolar epithelial cells type II (AECII). **Methods** AECsII were Placed in a sealed chamber containing 95% O₂ and 5% CO₂, and incubated in a culture incubator for 24 hours or 48 hours to establish a model of high oxygen damage in AECsII. In the experimental group, AECsII were randomly divided into the following groups: the hyperoxia group for 24 hours, the hyperoxia group for 24 hours plus the stimulant (Gen), the hyperoxia group for 24 hours plus the inhibitor (AA), the hyperoxia group for 48 hours, the hyperoxia group for 48 hours plus Gen, and the hyperoxia group for 48 hours plus AA. The control group AECsII were cultured in a medium with air and without intervention. The whole-cell Patch-clamp system was used to record the chloride current strength of CFTR which was recorded after Gen at 50μM or AA at 10μM was added in the extracellular fluid. Data was analyzed using Clampfit 10.6, where the current changes under different stimulation voltages were calculated, and the results were presented in the form of a voltage-current trend line. Spearman correlation analysis was conducted on the different groups using R 4.4.1 statistical software. **Results** 1. Compared with the control group, high oxygen exposure for 24 hours and 48 hours significantly inhibited the chloride current of AECII, showing a decrease in the negative value ($P<0.01$), with the 24-hour group showing a more significant inhibition. 2. Compared with the simple hyperoxia group, Gen significantly increased the chloride current of AECII in high oxygen for 24 hours and 48 hours, showing an increase in the negative value ($P<0.01$), with the 48-hour group being more obvious ($P<0.01$); while AA significantly inhibited the chloride current, showing a decrease in the negative value ($P<0.01$), with the 48-hour group being more obvious ($P<0.01$). **Conclusion** Hyperoxia may exert its effects by affecting the chloride current outflow of CFTR in AECII.

Keywords: Alveolar Epithelial Cells type II; Hyperoxia; Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; Genistein; Arachidonic Acid

全世界每年出生的早产儿达1500万, 占活产婴儿的10%^[1]。支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysPlasia, BPD)是早产儿唯一发病率仍在增加的并发症^[2], 是早产儿死亡的主要原因^[3]。BPD发病机制尚未完全阐明, 主要与早产、氧中毒、气压伤、容量伤、感染和基因易感性等有关^[4-6]。囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是囊性纤维化的致病基因^[7], 其缺失、突变等导致CF的发生^[8-9]。本课题组既往研究发现, CFTR对BPD大鼠有保护作用^[10], 但其确切机制尚不明确。本课题拟通过CFTR激动剂染料木黄酮^[10]或抑制剂花生四烯酸^[10]对高氧小鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell II, AECⅡ)CFTR氯离子通道的影响, 探讨CFTR氯离子通道在AECⅡ高氧损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 细胞和试剂 小鼠AECⅡ及完全培养基, 购自武汉尚恩生

物技术有限公司。染料木黄酮(genistein, Gen)和花生四烯酸(arachidonic acid, AA), 购自Sigma- Aldrich公司。

1.1.2 实验仪器 密封舱, Billups-rothenberg公司产品; 膜片钳仪, Bio-rad公司产品。

1.2 高氧损伤模型及分组

1.2.1 AECⅡ细胞培养 小鼠AECⅡ置于显微镜下, 观察无异常后, 于超净台上严格无菌操作, 将细胞用0.25%含EDTA的胰酶消化3min, 收集细胞于离心管内离心, 900r/min离心5min, 1mL培养基重悬, 细胞浓度约 5×10^5 /L, 取 1×10^6 个细胞种于培养瓶中, 剩余细胞冻存。1d换液1次, 3d传代1次。从第3代开始用于实验研究, 用小鼠AECⅡ完全培养基, 将AECⅡ置于37℃、5%CO₂培养箱内培养。

1.2.2 构建AECⅡ高氧细胞损伤模型及分组 实验组AECⅡ于密封舱中通入95%O₂+5%CO₂, 然后置于培养箱中, 持续24h或48h。对照组AECⅡ完全培养基中通入空气(21%O₂)。将实验组高氧损伤AECⅡ随机分为高氧组24h组、高氧24h+激动剂(Gen)组、高氧

【第一作者】葛丹丹, 女, 助理研究员, 主要研究方向: 儿科呼吸系统疾病。E-mail: gedandan0412@163.com

【通讯作者】刘登礼, 男, 主任医师, 主要研究方向: 新生儿疾病。E-Mail: 460873092@qq.com

24h+抑制剂(AA)、高氧48h组、高氧48h+Gen组和高氧48h+AA组;对照组AEC II未干预。共7组。

1.3 以全细胞记录的膜片钳系统记录CFTR氯离子电流强度

1.3.1 所需溶液 细胞外液: Na·gluconate 150mM, MgCl₂ 2mM, TES 10mM; 电极内液: K·gluconate 140mM, MgCl₂: 6H₂O 2mM, CaCl₂ 0.1mM, HEPES 10mM, EGTA 1.1mM, Mg-ATP 2.5mM, Na₂-GTP 0.3mM; 均用1mM NaOH调整至PH 7.4。

1.3.2 玻璃微电极 选用细玻璃, 经玻璃微电极拉制mM仪, 采用两步法拉制。拉制后尖端直 <1MΩ, 充灌电极内液后阻抗为4-7MΩ。

1.3.3 基础膜电位 AEC II 细胞静息电位为-40mV^[11]。

1.3.4 数据采集 采用Clampex 10.6进行记录, 记录模式为不同刺激电压下的电流变化。细胞外液中分别加入GEN50μM或AA10μM, 记录GEN激活或AA抑制后氯离子电流强度。

1.3.5 数据分析 采用Clampfit 10.6进行数据分析, 计算不同刺激电压下电流变化, 以电压-电流的趋势线展示结果。横坐标代表刺激电压, 单位为mV; 纵坐标代表电流, 单位为1/pA。

1.4 统计分析 应用Graphpad Prism8软件, 对不同组别不同刺激电压下的电流变化的均值, 以电压-电流趋势线展示结果。应用R4.4.1统计软件对不同组别进行Spearman相关性分析。R值越大, 相关性越强; P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧对AEC II CFTR氯离子电流的影响 与对照组比较, 高氧24h明显抑制CFTR氯离子电流, 表现为负值减少($r=0.99$, $P<0.01$); 高氧48h对氯离子电流抑制程度降低, 表现为负值增加(与高氧24h组比较, $r=0.99$, $P<0.01$), 但仍明显低于对照组($r=1$, $P<0.01$)。见图1。

2.2 Gen或AA对高氧24h AEC II CFTR氯离子电流的影响 与单纯高氧组比较, CFTR激动剂Gen明显增加氯离子电流, 表现为负值增加($r=1$, $P<0.01$); 而抑制剂AA明显抑制氯离子电流, 表现为负值减少($r=0.99$, $P<0.01$)。见图1。

2.3 Gen或AA对高氧48h AEC II CFTR氯离子电流的影响 单纯高氧组比较, Gen明显增加氯离子电流, 表现为负值增加($r=1$, $P<0.01$); 而AA明显抑制氯离子电流, 表现为负值减少($r=1$, $P<0.01$)。见图1。

2.4 高氧对CFTR氯离子电流影响的综合分析 高氧抑制CFTR氯离子电流外流, 高氧24h抑制效应较明显, 48h减低; Gen可拮抗高氧对氯离子电流的抑制作用, 以48h较明显; 而AA可加重高氧对氯离子电流的抑制作用, 亦以48h较明显。见图1。

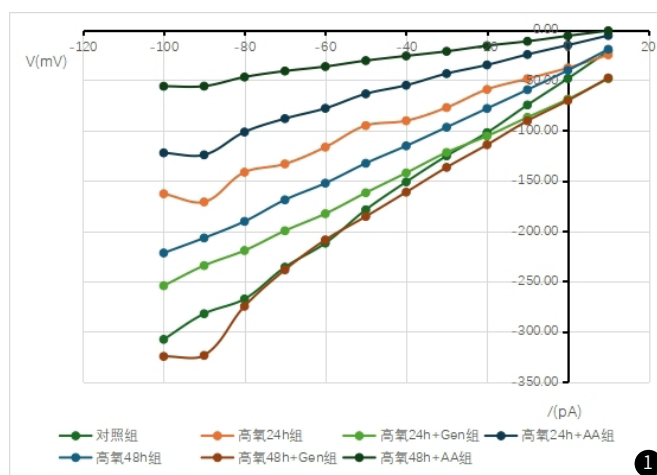


图1 高氧对CFTR氯离子电流影响的综合分析(各组间, 两两比较, 均 $P<0.01$)

3 讨论

极低出生体重/胎龄新生儿BPD生后28天的累积发病率为35%, 纠正胎龄36周的累积发病率为21%^[12]。在美国, 50%以上早产儿纠正胎龄36周前死亡或发生BPD, BPD越严重, 新生儿主要疾病发生率、院内死亡率及出院时呼吸支持率越高^[13]。

BPD发病机制复杂, 基因易感性是其发病重要内在因素。目前已知多种基因参与BPD的发生和发展。Wagenaar等^[14]应用高氧肺损伤模型, 通过基因芯片等技术证实氧化应激影响大量基因的表达, 涉及炎症、凝血、纤溶、细胞外基质转换、细胞周期、信号转导和肺泡增大。全基因组多态性研究显示, 约100种基因涉及BPD患儿肺发育、炎症和抗氧化反应, 全外显子测序显示SFTPB、SFTPC、ABCA3和等涉及肺泡表面活性物质产生和代谢的基因缺陷, 引起新生儿期起病的严重间质性肺病, 可能会影响BPD的进程^[15]。

众所周知, CFTR是囊性纤维化的致病基因, 其缺失、突变导致囊性纤维化的发生^[8-9]。Holmgren等曾报道3例BPD伴囊性纤维化的病例^[16]; Shi等研究显示成人慢性阻塞性肺病时CFTR功能异常^[17]。前期研究发现, 高氧时CFTR表达明显降低^[10], 但其在BPD发病中的具体机制并不清楚。由于CFTR是氯离子通道, 推测高氧可能是通过影响CFTR氯离子外流, 从而降低氯离子电流而发挥作

用。Gen为CFTR激动剂, 通过抑制酪氨酸激酶活化CFTR氯离子通道^[18]。AA为CFTR抑制剂, 通过静电与CFTR氯离子通道胞内部分带正电的氨基酸侧链相互作用, 以阻断CFTR氯离子通道^[19]。本研究显示: 高氧对CFTR氯离子电流有明显的抑制作用, CFTR激动剂Gen可拮抗该抑制作用, 而抑制剂AA则加重该抑制作用。高氧持续时间不同, 对CFTR氯离子电流抑制程度不同, 激动剂或拮抗剂拮抗或加重该抑制程度的作用也不同, 以48h效应较明显。

综上所述, 高氧可能是通过影响AEC II CFTR氯离子外流而发挥作用。

参考文献

- [1] Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of Preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications [J]. Lancet, 2012, 379 (9832): 2162-2172.
- [2] Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012 [J]. JAMA, 2015, 314 (10): 1039-1051.
- [3] 尹成俊, 鲁国卫, 章宏, 等. 先天性支气管发育不良的多层螺旋CT表现分析 [J]. 中国CT和MRI杂志, 2016, 14 (4): 52-54. 1672-5131. 2016. 04. 016.
- [4] Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Lancet, 2006, 29 (367): 1421-1431.

(收稿日期: 2024-10-25) (校对编辑: 韩敏求)

(上接第53页)

异,但良性结节也存在较高的阳性表达情况。在甲状腺结节的良恶性诊断鉴别中,单独应用的价值不高。本研究经ROC曲线分析还发现,TG、TPOAb、TgAb、CEA单项检测具有一定诊断价值,但敏感度、特异度并不理想,而联合检测的灵敏度、特异度分别为91.89%、94.92%,联合检测的诊断鉴别效能明显高于单项检测($P<0.05$),提示临床可通过TG、TPOAb、TgAb、CEA联合检测方式对甲状腺结节良恶性进行诊断鉴别,能减少误诊、漏诊情况,提高诊断鉴别的准确性。不过本次研究的样本量较少,血清学指标在灵敏度、特异度、标准化等方面也有一定局限性,后续还需完善研究,以科学、客观地评价TG、TPOAb、TgAb、CEA联合检测在甲状腺良恶性诊断鉴别中的价值。

综上所述, TG、TPOAb、TGAb、CEA均在甲状腺结节的发生发展过程中发挥了重要作用, TG、TPOAb、TGAb、CEA联合检测对甲状腺结节良恶性的诊断鉴别价值较高, 临床可采取该联合检测方式对甲状腺结节良恶性进行诊断鉴别, 为临床治疗提供可靠依据。

参考文献

- [1] 马姣姣, 孙脉, 田艳, 等. 超声造影定量参数在甲状腺良恶性结节鉴别诊断中的价值[J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42 (1): 80-85.
- [2] 刘明雨, 陈然, 王伟. 彩色多普勒超声对甲状腺结节良恶性的鉴别诊断价值及不同性质甲状腺结节的超声表现[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2020, 17 (6): 125-128.
- [3] 石灿, 彭松, 梁琛. 能谱CT及其联合甲状腺球蛋白检测对良性甲状腺结节的诊断价值[J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30 (11): 1359-1366.
- [4] 韩鹏, 胡桂芹, 王树艳. FT4、TPOAb及TgAb联合超声弹性成像鉴别良恶性甲状腺结节的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14 (8): 1367-1370.
- [5] 师旭, 肖保军, 乔向彬, 等. 超声引导下甲状腺细针穿刺活检联合血清降钙素、CEA、TSH对甲状腺癌的诊断价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15 (2): 339-343.
- [6] 中华医学会内分泌学分会, 中华医学会儿科学分会内分泌学组, 中国抗糖协会头颈

- [16] Holmgren NL, Faro A, Gondor MI, et al. Cystic fibrosis in three children with bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2001, 31(6): 474-477.
- [17] Shi J, Li H, Yuan C, et al. Cigarette smoke-induced acquired dysfunction of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 23: 6567578.
- [18] French PJ, Bijman J, Bot AG, et al. Genistein activates CFTR Cl⁻ channels via a tyrosine kinase- and protein phosphatase-independent mechanism[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2Pt1): C747-753.
- [19] Zhou JJ, Linsdell P. Molecular mechanism of arachidonic acid inhibition of the CFTR chloride channel[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 563(1-3): 88-91.

肿瘤专业委员会,等. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(2): 96-115.

- [7] 孙丽文, 凌丰宇, 郑泰浩, 等. 超声弹性成像联合血清TSH、TT3、TT4在甲状腺结节良性恶性诊断的临床价值研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(5): 941-944.
- [8] 刘鹏, 石宝刚, 贺志强. 血清促甲状腺素与甲状腺球蛋白比值对甲状腺功能正常者甲状腺结节良性恶性的评估价值[J]. 中国地方病防治杂志, 2020, 35(6): 688-690, 694.
- [9] 柯淑丽, 胡兵, 车鹏飞, 等. 剪切波弹性成像参数联合血清中期因子、胸苷激酶1、促甲状腺素与甲状腺球蛋白比值鉴别诊断甲状腺结节的临床价值[J]. 临床超声医学杂志, 2023, 25(8): 654-658.
- [10] 丁智慧. 血清甲状腺球蛋白抗体甲状腺过氧化物酶抗体促甲状腺激素检测在良性甲状腺结节鉴别诊断中的研究[J]. 山西医药杂志, 2023, 52(3): 225-228.
- [11] 李玉平, 王伦善. 血清TSH、TPOAb和TGAb水平在良性甲状腺结节中的鉴别诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 93-97.
- [12] 司红敏, 闫磊, 赵慧敏. 超声检查联合TSH和Tg评估甲状腺结节良恶性的价值[J]. 中国现代普通外科进展, 2023, 26(9): 719-721.
- [13] 方高洁, 刘秀萍, 胡恒贵, 等. 血清Tg-Ab、TPO-Ab、Tg水平与甲状腺结节恶性病变的相关性及临床意义[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(6): 142-143.
- [14] 苑丽丽, 朱亚丽, 段崇玲, 等. 甲状腺结节术前检查对其良性诊断的预测价值[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2020, 44(4): 217-224.
- [15] 吕永燕, 杨增娣, 杨茹, 等. TI-RADS分类联合血清TSH、TPOAb、TgAb检测对甲状腺良恶性结节的诊断价值[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(11): 2073-2077.

(收稿日期：2024-07-25)

(校对编辑：韩敏求)