维甲酸对高氧暴露下原代培养的胎鼠肺泡 Ⅱ 型 上皮细胞和成纤维细胞增殖与凋亡的影响

李文斌* 常立文 容志惠 王 华 卢红艳 汪 鸿 刘 伟 (华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,武汉 430030)

摘要 探讨高氧暴露对原代培养的胎鼠肺泡 II 型上皮细胞(AECII)、成纤维细胞(LFs)增殖 和凋亡的影响以及维甲酸(RA)的保护作用机制。通过建立高氧暴露原代培养的胎鼠 AECII 和 LFs 模型,以 RA 作为干预方式,采用流式细胞术(膜联蛋白 V-PI 双标记)检测 AECII 和 LFs 凋亡,Western 印迹检测 AECII 增殖细胞核抗原(PCNA)、p53 及 caspase-3 表达和 LFs PCNA 表达。结果发现: (1)与空气对照比较,高氧暴露 12 h,膜联蛋白 V (+) PI (-)和膜联蛋白 V (+) PI (+)标记 AECII 数均 显著升高(14.41±1.15 vs 2.80±0.19, P<0.01; 61.07±3.06 vs 1.49±0.11, P<0.01); RA 对空气暴露下 AECII 坏死、凋亡无明显影响,但明显下调高氧暴露下膜联蛋白 V (+) PI (-)和膜联蛋白 V (+) PI (+)标记 AECII 数(8.04±0.79 vs 14.41±1.15, P<0.01; 27.57±2.32 vs 61.07±3.06, P<0.01)。(2)高氧、 RA 对 LFs 坏死、凋亡无明显影响。(3)高氧暴露 12 h,明显降低 AECII PCNA 表达(P<0.01),显著提 高其 p53 (P<0.01)和 caspase-3 活性片段(P<0.01)表达; RA 显著上调高氧暴露下 AECII PCNA 表达 (P<0.01),下调其 p53 和 caspase-3 活性片段(P<0.01)。(4)高氧、RA 对 LFs PCNA 表达无明显 影响。由此提示,高氧暴露,导致 AECII 大量凋亡、坏死,增殖受到抑制,同时, LFs 所受影响较小, 两种细胞对高氧暴露的差异性行为可能是导致未成熟肺组织异常重构的重要原因; RA 通过降低 AECII 凋亡、坏死从而对高氧肺损伤具有保护作用。

关键词 高氧; 维甲酸; 肺泡 II 型上皮细胞; 肺成纤维细胞; 凋亡; 增殖

高浓度氧是治疗新生儿疾病的常用措施,但长时间高氧暴露可导致新生儿尤其是早产儿支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的发生⁽¹⁾。动物研究表明,高氧暴露可使肺泡间隔形成受阻、肺泡数目减少、肺表面积降低、终末气腔增大,与BPD 患儿肺部病理特征极其相似⁽²⁾。同时,持续高氧暴露可促发肺部广泛炎症反应,导致肺泡毛细血管内皮细胞和上皮细胞坏死、凋亡,肺泡-毛细血管屏障功能受损^(3,4);间质成纤维细胞向肺泡腔迁移、增生,并产生胶原蛋白沉积于肺泡腔,促使肺纤维化的发生⁽⁵⁾。

肺泡上皮细胞主要由 I 型上皮细胞(alveolar epithelial type I cell, AECI)和 II 型上皮细胞(alveolar epithelial type II cell, AECII)组成。AECII 是肺内主要 干细胞, 肺泡上皮细胞损伤修复的唯一途径是 AECII 增殖、迁移并向 AECI 转化, 从而使肺泡壁重新上皮 化以恢复气血屏障。在肺发育和损伤修复过程中, 肺细胞的增殖及凋亡行为受多种因素的精细调控。 研究表明,高氧暴露可导致肺细胞 DNA 损伤,诱导 肿瘤抑制蛋白 p53 及其下游靶基因表达,使细胞周期 阻滞于 G₁/S 期,以利于 DNA 修复,若 DNA 修复不成 功,则诱导细胞发生凋亡^[4,6,7]。

维甲酸(retinoic acid, RA)是 VitA 在生物体内的 重要活性形式。研究证实, RA 不仅能促进发育期大 鼠肺泡形成,还能促进成熟肺组织损伤后的修复过 程^[8,9]。给予外源性 RA 可改善肺泡结构、降低肺纤 维化程度,对新生大鼠高氧肺损伤具有保护作用^[10]。 AECII 和肺成纤维细胞(lung fibroblasts, LFs)是参与 肺损伤应答的两种主要效应细胞,那么, RA 对高氧 肺损伤的保护作用是否与调控两种细胞的凋亡、增 殖行为有关?目前尚不清楚。

本研究通过建立高氧暴露原代培养的胎鼠

* 通讯作者。Tel: 027-83663325, E-mail: lwb717299@163.com

收稿日期: 2006-06-19 接受日期: 2006-10-19

国家自然科学基金(No.30471824)和国家"十五"科技攻关计划 (No.2004BA720A11)资助项目

AECII和LFs模型,采用流式细胞术(膜联蛋白V-PI 双标记)检测AECII和LFs凋亡情况,Western印迹 检测AECII增殖细胞核抗原(PCNA)、p53、caspase-3表达以及LFsPCNA表达,探讨RA对高氧肺损伤 保护作用的可能机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

最低必需培养基(eagle's minimal essential medium, MEM)、胰蛋白酶、DNA 酶 I 为 Gibco 公司产品;胎 牛血清(fetal calf serum, FCS)为浙江三利生物制品有 限公司产品; IV 胶原酶、RA 为 Sigma 公司产品;噻 唑蓝为华美公司产品;小鼠抗大鼠表面活性物质蛋白-C(surfactant protein-C, SP-C)、波形蛋白(vimentin)单 克隆抗体、PCNA 单克隆抗体、caspase-3 单克隆 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗为 Santa Cruz 公司产品;小鼠抗大鼠 p53 和β肌动蛋白单克隆 抗体为 NeoMARKERS 公司产品; SP 和 DAB 试剂盒 为北京中山生物技术有限公司产品; 膜联蛋白V-FITC Kit 和 PI 为 BD 公司产品; ECL 增强化学发光显色系 统为 Pierce 公司产品。

1.2 胎鼠 AECII 和 LFs 原代培养及鉴定

孕19天~20天(足月为22天)胎鼠 AECII 和 LFs 的原代培养按本研究室建立的方法进行^[11]。板层小 体是 AECII 胞浆中标志性结构, SP-C 和波形蛋白分 别是 AECII 和 LFs 胞浆中标志性蛋白。采用免疫细 胞化学 SP 法检测 SP-C 和波形蛋白(工作液浓度均为 1:100)表达。透射电镜检测板层小体存在^[12]。 1.3 噻唑蓝(MTT)实验检测 RA 对正常 AECII 和 LFs 毒性作用及最佳干预浓度选择

经鉴定后,分别将原代胎鼠 AECII 和LFs 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/ml 接种于 96 孔板,待细胞生长至 70% 汇合状态时,分设空白对照组、阴性对照阻和不同 RA 浓度组(10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷和10⁻⁸ mol/L),每组设 4 复孔;于培养 12、24、48 和 72 h时,弃去培养液,每孔加入 10 µl 5 g/L MTT,继续温育 4 h;每孔加入 100 µl 二甲亚砜终止,振荡 15 min; 450 型ELISA-Reader 酶标仪 570 nm 波长检测吸光度;以对照组细胞活力为 100%,按公式:细胞抑制率 =1-(药物组吸光度 - 空白对照组吸光度)/(阴性对照组吸光度-空白对照组吸光度)× 100%,计算不同浓度下细胞生长受抑情况,并选择后续研究最佳 RA 干预浓度。 1.4 实验分组 ·研究论文·

原代胎鼠 AECII 和LFs 生长至亚汇合(约长满瓶 底 80%)时,将培养瓶中培养液换成含 2% FCS 的 MEM,并随机分为 4 组:空气组、空气 + RA 组、高 氧组和高氧 + RA 组。其中,空气 + RA 组和高氧 + RA 组。其中,空气 + RA 组和高氧 + RA 组培养液中加入含有终浓度为 1 × 10⁶ mol/L RA,空 气组和高氧组培养液中加入含有相同终浓度的无水 乙醇。置 37 ℃ 5% CO₂培养箱内静置 30 min 后,空 气组和空气 + RA 组置于空气中;高氧组和高氧 + RA 组通以 95 % O₂-5% CO₂(5 L/min) 10 min,然后密封,置培养箱中培养 12 h。其中给氧组在培养结束时均 用 CYS-1 数字式测氧仪(上海嘉定学联仪表厂)检测 培养瓶中氧浓度,氧浓度低于 90 % 的样本弃去^[12]。

1.5 流式细胞仪检测 AECII 和 LFs 凋亡

分别取空气组、高氧组、空气+RA 组和高氧 +RA 组原代培养 AECII 和 LFs 各 3 瓶, 0.25% 胰蛋白 酶消化 10 min, 10% FCS MEM 终止消化, 1 500 r/min 离心 5 min; 同时收集培养上清液, 1 500 r/min 离心 5 min; 将两部分细胞沉淀混合; PBS 充分洗细胞, 调整 细胞浓度,取(12.5~30)×104个细胞,1500 r/min 离心 5 min; 250 µl 结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞浓度为 (2~5)×10⁴ 个 /ml, 取 195 μl 细胞悬液, 加入 5 μl 膜联 蛋白 V, 室温下避光作用 10 min; 190 µl 结合缓冲液 洗细胞一遍, 1 500 r/min 离心 5 min; 190 µl 结合缓冲 液重悬细胞,加入10 µl PI;上流式细胞仪。结果判 断: 左下象限代表正常细胞[膜联蛋白 V(-)PI(-)], 右 下象限代表早期凋亡细胞[膜联蛋白 V(+)PI(-)], 右上 象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞[膜联蛋白 V(+)PI (+)], 左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞 [膜联蛋白 V(-)PI(+)]。

Western 印迹检测 AECII PCNA、p53、 caspase-3 表达以及 LFs PCNA 表达

裂解 AECII 和 LFs 提取蛋白质, 按每泳道加 50 μg总蛋白进行SDS-PAGE, 半干式电转移至硝酸纤维 素滤膜上, 室温封闭 2 h, 加入相应的小鼠抗大鼠 PCNA、p53、caspase-3 或β肌动蛋白一抗(工作液 浓度均为1:400), 4 ℃温育过夜, TBST 洗膜4次, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000), ECL 增强化学发光显色系统显色 5 s~5 min。每组实 验至少重复 3 次, 利用 GDS 8000 成像分析系统 (Pharmarcia)对胶片条带进行光密度扫描, 以空气组 PCNA、p53、caspase-3 与β肌动蛋白光密度比值 分别作为基数"1", 对各指标数据进行转换后作统 计分析。

1.7 统计学处理

数据以 hes 表示, 采用 SPSS12.0 软件进行方差分 析(ANOVA)、t 检验, P<0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胎鼠 AECII 和 LFs 原代培养、鉴定及一般 观察

经鉴定,AECII和LFs 纯度分别为(94±2)%、 (95±1)%,表明所获细胞适合研究使用(图1)。充氧 前倒置相差显微镜下观察两种细胞,绝大多数细胞胞 体明亮,紧贴瓶底,无悬浮细胞,呈良好生长状态。 随时间延长,高氧组和高氧+RA组镜下观察可见细胞 胞体折光率降低,细胞生长状态不良,悬浮细胞增多, 以高氧组AECII尤为明显,但大多数细胞仍具有活力; 空气组和空气+RA 组细胞则无明显改变。

2.2 不同浓度 RA 对原代胎鼠 AECII 和 LFs 生长影响

MTT 结果显示, 10⁴ mol/L RA 对两种细胞均具 有明显毒性作用, 24 h后两种细胞全部死亡; 10⁻⁵ mol/ L RA 在 12、24、48 和 72 h 各时间点对 LFs 和 AECII 生长抑制率分别 11%、34%、15%、8% 和 25%、 30%、19%、13%; 10⁻⁶、10⁷和10⁸ mol/L RA 对 两种细胞各时间点没有明显抑制作用, 而且 10⁶ mol/ L RA 在 12 和 24 h 时间点对 AECII 似有轻度促进增 殖作用, 其生长抑制率分别 -7% 和 -10%。据此, 我 们选用 10⁶ mol / L RA 作为干预浓度进行后续研究 (图 2, 图 3)。

2.3 高氧、RA 对胎鼠 AECH 和 LFs 凋亡的影响

采用膜联蛋白 V 与 PI 双标记后, 流式细胞检测 表明, 与空气组比较, 高氧暴露 12 h, 膜联蛋白 V(+) PI (-)和膜联蛋白 V(+)PI(+)标记的 AECII 数均显著 升高(14.41±1.15 vs 2.80±0.19, P<0.01; 61.07±3.06 vs 1.49±0.11, P<0.01); RA 对空气暴露下 AECII 坏死、 凋亡无明显影响, 但明显下调高氧暴露下膜联蛋白 V (+)PI(-)和膜联蛋白 V(+)PI(+)标记的 AECII 数(8.04± 0.79 vs 14.41±1.15, P<0.01; 27.57±2.32 vs 61.07±3.06, P<0.01) (图 4)。

高氧、RA对LFs坏死、凋亡无明显影响(图5)。

2.4 高氧、RA 对胎鼠 AECII PCNA、p53、 caspase-3 表达的影响和对 LFs PCNA 表达的影响



Fig.1 The identification of primary fetal rats AECII and LFs

(A) The primary fetal rats AECII (gestation 19-20 d) were cultured *in vitro* for 48 h and confluence (Contrast phase microscope, $100\times$); (B) The primary fetal rats AECII were cultured *in vitro* for 15 h and grew in island-like. The expression of SP-C was positive (DAB staining, $400\times$); (C) The primary fetal rats LFs were cultured *in vitro* for 15 h. The expression of vimentin was positive (DAB staining, $60\times$).







Fig.3 MTT detected the effect of RA on the growth of LFs



Fig.4 The effect of hyperoxia and RA on AECII apoptosis (flow cytometry)

(A) air 12 h; (B) air+RA 12 h; (C) hyperoxia 12 h; (D) hyperoxia+ RA 12 h. Compared with air 12 h, AP<0.01; Compared with hyperoxia 12 h, P<0.01; Compared with air + RA 12 h, P<0.01, P<0.05.

与空气组比较, 高氧暴露 12 h, 明显降低 AECII PCNA 表达(0.27±0.07 vs 1.00, P<0.01), 显著提高 p53(3.79±0.36 vs 1.00, P<0.01)和 caspase-3 活性片 段(21.34±1.80 vs 1.00, P<0.01)表达; RA 对空气暴露 下胎鼠 AECII PCNA、p53 和 caspase-3 活化片段表 达无明显影响(P>0.05), 但明显上调高氧暴露下 AECII PCNA 表达(0.67±0.07 vs 0.27±0.07, P<0.01), 下调其 p53 (1.47±0.45 vs 3.79±0.36, P<0.01)和 caspase-3 活化片段(8.83±0.63 vs 21.34±1.80, P<0.01) 表达(图 6)。高氧、RA 对 LFs PCNA 表达无明显影 响(图 7)。

3 讨论

本研究室前期研究结果表明,早产新生大鼠高氧



Fig.5 The effect of hyperoxia and RA on LFs apoptosis (flow cytometry)

(A) air 12 h; (B) air + RA 12 h; (C) hyperoxia 12 h; (D) hyperoxia+ RA 12 h. Compared with air 12 h, $^{\triangle} P < 0.05$.

暴露后,肺实质TUNEL阳性细胞显著增加,PCNA阳 性细胞明显减少;同时伴有肺泡第二嵴减少和气腔增 大,初步证明,细胞凋亡增加和增殖抑制在高氧所致 肺间隔形成受阻和肺泡化程度降低过程中扮演重要 角色^[13]。

为了进一步阐明细胞凋亡和增殖在高氧肺损伤 中的作用,我们对体外培养的AECII和LFs进行了检 测。膜联蛋白V是检测细胞凋亡的灵敏指标之一, 采用膜联蛋白V-PI双重标记可将早期凋亡细胞与晚 期凋亡及坏死细胞区分开来。结果表明,高氧暴露 12h可导致AECII发生凋亡和坏死,与空气组比较, 高氧暴露后早期凋亡细胞[膜联蛋白V(+)PI(-)]和晚 期凋亡、坏死细胞[膜联蛋白V(+)PI(+)]均显著升 高;但高氧对LFs凋亡、坏死却无明显影响。随后,





1: air 12 h; 2: hyperoxia 12 h; 3: air+RA 12 h; 4: hyperoxia+RA 12 h. Compared with air 12 h, AP<0.01; Compared with hyperoxia 12 h, P<0.01; Compared with air+RA 12 h, P<0.01.



1: air 12 h; 2: hyperoxia 12 h; 3: air+RA 12 h; 4: hyperoxia+RA 12 h.

我们对细胞凋亡的最终执行者 caspase-3 进行了检 测。正常情况下, caspase-3 以酶原(32 kDa)形式存 在于胞浆中, 在凋亡早期阶段, 它被激活, 活化的 caspase-3 由两个大亚基(17 kDa)和两个小亚基(12 kDa)组成,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞 凋亡。本研究结果显示,高氧暴露12 h, AECII caspase-3 活化片段(17 kDa 大亚基)表达水平显著增 高,进一步证实高氧暴露可诱导 AECII 调亡。PCNA 是 DNA 聚合酶 - δ 的一种辅助蛋白, 在 DNA 复制和 修复过程中发挥重要作用,其表达程度可反映细胞 DNA修复情况,并与高氧肺损伤时细胞增殖状况有很 好相关性[14]。Western 印迹结果显示, 高氧暴露 12 h, AECII PCNA表达明显下降, 表明其增殖受到抑制, 而 LFs 则不受影响。在正常肺发育过程中, 细胞凋 亡是必不可少的生物学行为。大鼠胚肺 14~16 天,远 端肺芽周围间质细胞凋亡是末梢支气管分枝形成所 必须[15]; 生后 17 天, 成纤维细胞凋亡显著增加与肺泡 化过程完成和肺间隔变薄有关[16]。兔胚肺 28 天(足 月为31天), AECII 高表达 Fas 配体且凋亡显著增加与 肺发育由小管期向终末囊泡期转变密切关联[17]。正 常肺发育过程中的这种细胞凋亡行为受精细调控,过 多或过少均可破坏其平衡而导致肺发育异常[18]。同 时,AECII 是肺内主要干细胞,肺泡上皮细胞损伤修 复的唯一途径是 AECII 增殖、迁移并向 AECI 转化, 从而使肺泡壁重新上皮化以恢复气血屏障。高氧暴

露,导致大量 AECII 凋亡和坏死,增殖受到抑制;与此同时, LFs 所受影响较小,结合前期研究结果[11.13],我们认为,高氧暴露下,两种细胞的差异性表现是导致未成熟肺组织间隔形成受阻和肺泡化程度降低的关键因素。

120

高氧暴露可产生大量 ROS,这些 ROS 可广泛攻 击靶细胞结构成分,使蛋白质变性、DNA 受损和脂 质过氧化。DNA 损伤可诱导 p53 表达, 后者可调控 与生长调节、DNA 修复和调亡等相关的多种基因表 达^[3]。本研究结果显示, 高氧暴露后, AECII p53 表 达显著升高, 表明 DNA 损伤的存在。p53 调控的一 个主要靶基因是细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 p21, 后者是G₁/S 期检测点蛋白。p21 氨基端可与G₁/S 期 细胞周期蛋白及其依赖性蛋白激酶复合物(cyclins-CDKs)结合使细胞周期阻滞于G₁/S期, 羧基端可与 PCNA结合抑制 DNA 复制[19]。p21 通过抑制细胞增 殖和 DNA 复制、促进受损 DNA 修复,从而对高氧 肺损伤起保护作用^[3]。此外, 高氧暴露后, p53 还可 促进致凋亡Bcl-2家族成员Bax、Bak表达,一旦DNA 修复不成功,则诱导细胞发生凋亡^[20]。有关p21和 cyclins-CDKs 在高氧肺损伤中的作用, 本实验室前期 研究已进行了报道[12]。

据报道, RA 可作为一种有丝分裂原, 刺激无血 清培养的 AECII 增殖^[21]; 促进胎肺毛细血管内皮始祖 细胞增殖^[22]。本研究 MTT 实验也表明, 10⁻⁶ mol/L RA 对正常培养的 AEC II 有轻度促增殖作用。此外, Liu 等^[23]研究发现, 在 p21 启动子区存在 RA 受体 (RAR/RXR)反应元件, 因此其表达可受 RA 调节。 Nabeyrat 等^[24]报道, RA 可降低高氧暴露诱导的 p21 表 达, 拮抗高氧对肺细胞增殖的抑制作用。本研究结 果显示, 高氧暴露下, RA 明显下调 AECII p53 表达和 促进其 PCNA 表达, 同时 AECII 调亡、坏死明显减 少, 提示, RA 对高氧暴露下 AECII 具有保护作用。 而 p21 是 p53 调控的一个主要靶基因, 那么, p53 的表 达下调是否为 RA 降低 p21 表达后的一种反馈作用, 或是 RA 降低 DNA 损伤从而减少 p53 表达,或是 RA 直接下调 p53 表达的结果?目前尚不清楚,有待进一 步研究。

综上所述,高氧暴露,导致 AECII 大量凋亡、坏 死,增殖受到抑制,同时, LFs 所受影响较小,两种细 胞对高氧暴露的差异性行为是导致未成熟肺组织异 常重构的重要原因; RA 通过降低 AECII 凋亡、坏死 从而对高氧肺损伤具有保护作用。

参考文献 (References)

- [1] Rush MG et al. Clin Perinatol, 1992, 19: 563
- [2] Warner BB et al. Am J Physiol, 1998, 275: L110
- [3] Wang X et al. J Biol Chem, 2003, 278: 29184
- [4] McGrath-Morrow SA et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25: 150
- [5] Pardo A et al. Am J Pathol, 1998, 153: 833
- [6] O'Reilly MA et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 18: 43
- [7] McGrath-Morrow SA et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30:
 635
- [8] Massaro GD et al. Am J Physiol, 1996, 270: L305
- [9] Massaro GD et al. Nat Med, 1997, 3: 675
- [10] Ozer EA et al. Pediatr Pulmonol, 2005, 39: 35
- [11] 李文斌等。基础医学与临床, 2005, 25: 47
- [12] 常立文等。中华儿科杂志, 2005, 43: 118
- [13] 李文斌等。基础医学与临床, 2006, 26: 143
- [14] Bui KC et al. Am J Physiol, 1995, 268: L625
- [15] Kresch MJ et al. Pediatr Res, 1998, 43: 426
- [16] Bruce MC et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 20: 228
- [17] De Paepe ME et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279: L967
- [18] Kling DE et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282: L370
- [19] Luo Y et al. Nature, 1995, 375:159
- [20] Buccellato LJ et al. J Biol Chem, 2004, 279: 6753
- [21] Nabeyrat E et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278: L42
- [22] Cho SJ et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33: 622
- [23] Liu M et al. J Biol Chem, 1996, 271: 31723
- [24] Nabeyrat E et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25: 507

Effect of Retinoic Acid on the Primary Rat Embryonic Type II Alveolar Epithelial Cell and Lung Fibroblasts Proliferation and Apoptosis Exposed to Hyperoxia

Wen-Bin Li*, Li-Wen Chang, Zhi-Hui Rong, Hua Wang, Hong-Yan Lu, Hong Wang, Wei Liu (Department of Pediatrics, Togji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

To explore the effect of hyperoxia exposure on proliferation and apoptosis of the primary rat Abstract embryonic type II alveolar epithelial cells (AECII) and lung fibroblasts (LFs), and the protective effect of retinoic acid (RA) on hyperoxia lung injury. The primary rat embryonic AECII and LFs (gestation 19-20 d) were cultured in vitro. For the study of RA effects, AECII and LFs were exposed to hyperoxia in the presence or absence of RA for 12 h. Their apoptosis were analyzed by annexin V/propidium iodide (PI) double Staining and flow cytometry. The expression of PCNA, p53 and caspase-3 in AECII and that of PCNA in LFs were determined by Western blot. Results showed that: (1) Quantitative data from flow cytometry analyses (PI/annexin V double staining) demonstrated that there was a significant increase in positive cells of both annexin V (+) PI (-) and annexin V (+) PI (+) after 12 h of hyperoxia in AECII (14.41±1.15 vs 2.80±0.19, P<0.01; 61.07±3.06 vs 1.49±0.11, P<0.01). RA had no effect on apoptosis and necrosis of AECII exposed in room air, but markedly decreased hyperoxia-induced AECII apoptosis and necrosis(8.04±0.79 vs 14.41±1.15, P<0.01; 27.57±2.32 vs 61.07±3.06, P<0.01). (2) The apoptosis and necrosis of LFs were not changed by hyperoxia exposure and/or RA treatment. (3) Western blot analyses showed that, after 12 h of hyperoxia, PCNA was reduced markedly (P < 0.01), p53 and active fragment of caspase-3 (17 kDa) were increased in AECII (P<0.01). In hyperoxia exposure, RA decreased the expression of p53 and active fragment of caspase-3 markedly (P < 0.01), improved the expression of PCNA (P < 0.01). (4) Hyperoxia exposure and/or RA treatment had no effect on the expression of PCNA in LFs. It was concluded that, hyperoxia exposure lead to numerous AECII apoptosis and necrosis and inhibited AECII proliferation, but did not change LFs survival, both of which were involved in abnormal lung remodeling; RA had a protective effect on hyperoxia lung injury by which declined AECII apoptosis and necrosis.

Key words hyperoxia; retinoic acid; type II alveolar epithelial cells; lung fibroblasts; apoptosis; proliferation

This work was supported by the National Key Technology Program of China during the 10th Five-Years-Plan Period (No. 2004BA720A11) and the National Natural Sciences Foundation of China (No.30471824)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83663325, E-mail: lwb717299@163.com

Received: June 19, 2006 Accepted: October 19, 2006