

# SOX9 及 WNT 信号通路分子 在高氧暴露致早产大鼠肺损伤中的表达及意义

严隆丽, 全裕凤, 张 华, 柳秋菊, 赵日红, 刘 曼

**摘要** 目的 观察 SOX9 及 WNT 信号通路分子在高氧暴露早产鼠肺组织中的表达, 探讨高氧暴露早产大鼠肺组织损伤的发病机制。方法 将 72 只 1 日龄早产 SD 大鼠随机均分为高氧组和空气组, 每组 36 只, 各组再随机均分为生后 3 d 组、5 d 组、9 d 组, 每组 12 只。高氧组早产鼠置于氧体积分数为 95% 的氧箱中。各组分别在相应的时间处死动物后收集肺组织标本。采用苏木精 - 伊红 (HE) 染色法观察肺组织的病理改变, 采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测 SOX 9 及 WNT 信号通路中关键因子  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 及下游因子淋巴增强因子 (LEF-1)、肺泡表面活性蛋白 C (SPC)、 $\alpha$ -平滑肌激动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 在早产大鼠肺组织中的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 空气各组肺组织结构基本正常, 高氧 3 d 组肺组织见明显渗出、大量炎症细胞浸润、出血性改变及肺泡压缩, 高氧 5 d 组和 9 d 组可见肺间隔增宽及肺泡结构紊乱。与空气组比, 高氧组  $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC 及  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达均增加 ( $P < 0.05$ ), 且随着高氧暴露天数的增加而增加; SOX9 因子在高氧暴露 3 d 和 5 d 时 mRNA 和蛋白表达均高于空气组 ( $P < 0.01$ ), 且高氧暴露 3 d 组核酸

及蛋白表达量高于高氧暴露 5 d 组, 高氧暴露 9 d 时与空气组无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 且表达量低于高氧 5 d 组。结论

高氧暴露通过激活 WNT 信号通路致早产大鼠肺组织损伤; SOX 9 基因在高氧暴露早产大鼠肺组织中可能通过抑制 WNT 信号通路来参与高氧肺损伤。

**关键词** SOX9; WNT 信号通路; 高氧肺损伤; 早产大鼠  
**中图分类号** R 722

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2018)04 - 0552 - 06  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.04.012

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是新生儿常见的慢性呼吸系统疾病, 其发病率随着胎龄及出生体质量的减少而增加, 严重威胁到了新生儿的生命及生存质量。研究<sup>[1]</sup>显示早产儿肺发育不成熟、长期吸入高浓度氧、感染等是 BPD 发生的常见原因, 但其发病机制仍不明确。目前, 越来越多研究<sup>[2]</sup>表明遗传因素在 BPD 的发病中起着重要作用, 同时, 与高氧肺损伤相关的分子机制也有了较多的研究, 但仍然不太完善。WNT 信号通路是一条在进化上高度保守的信号传导通路, 对胚胎动物各器官的发育起着关键作用, 近年来研究<sup>[3]</sup>证实其在胚胎肺发育过程中起着必不可少的作用, 贯穿了整个鼠胚胎肺发育过程。SOX9 因子属于 SOX 转录因子家族, 是细胞核内 WNT 信号通路的

2017 - 12 - 14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81360105)

作者单位: 桂林医学院附属医院新生儿科 桂林 541001

作者简介: 严隆丽, 女, 硕士研究生;

全裕凤, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Qyfxse@163.com

mice were then randomly divided into 4 groups: normal saline control group was group A, gemcitabine chemotherapy group was group B, gemcitabine combined with megakaryocytes group was group C, gemcitabine combined with tumstatin transgenic megakaryocytes group was group D, and the latter three groups were the treatment group. The mice in each group were administered for 24 days, and the tumor volume was measured every 3 days. Blood samples were taken from the 15th day, blood cell values were measured by blood cell analyzer. On day 24, the tumor was dissected and the size and quality were measured. The microvessel density (MVD) was tested by immunohistochemistry. Tumor necrosis was detected by hematoxylin and eosin staining. Survival of mice was recorded during treatment. **Results** The tumor volume growth curve of the treatment group was significantly slower than that of the normal saline group. The survival rate of the tumstatin transgenic megakaryocytic cells was the slowest. The survival rate was significantly improved compared with the chemotherapy group (group B). Compared with the normal saline group and other treatment groups, group D significantly inhibited tumor MVD and caused severe necrosis of tumor tissue, and the corresponding mice maintained a normal blood cell level. **Conclusion** The combination of tumstatin monocyte megakaryocytosis can enhance the survival rate of lung adenocarcinoma mice and inhibit the MVD of lung adenocarcinoma significantly.

**Key words** tumstatin; megakaryocytes; platelet; chemotherapy; lung adenocarcinoma

调控因子<sup>[4]</sup>,而有关于高氧暴露后肺组织 SOX9 表达的变化以及它与 WNT 信号通路在高氧暴露早产大鼠肺组织中的作用尚未见文献报道。该研究旨在通过观察 SOX9 因子、WNT 通路关键因子  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)、淋巴增强因子(LEF-1)以及肺泡表面活性蛋白 C(SPC)、 $\alpha$ -平滑肌激动蛋白( $\alpha$ -SMA)因子在高氧暴露后肺组织中的表达,以了解 WNT 信号通路是否参与 BPD 以及 SOX9 在高氧暴露后肺组织中的表达变化,探讨 BPD 的发病机制,为高氧致 BPD 的治疗提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** 用于 RT-PCR 的试剂主要有 TRIzol、逆转录试剂盒(北京康为世纪有限公司),SOX9 引物、 $\beta$ -catenin 引物、GAPDH 引物、LEF-1 引物、SPC 引物、 $\alpha$ -SMA 引物(苏州泓迅生物科技有限公司);用于 Western blot 的试剂和仪器主要有 RIPA 组织细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司),BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),SDS-PAGE 凝胶试剂盒(北京索来宝科技有限公司),PVDF 膜(美国密理博公司),兔抗鼠  $\beta$ -catenin 单克隆一抗(美国 CST 公司),兔抗鼠 SOX9 单克隆一抗、兔抗鼠  $\alpha$ -SMA 单克隆一抗(美国 ABCAM 公司),兔抗鼠 LEF-1 单克隆一抗、兔抗鼠 SPC 单克隆一抗(北京 ORIGENE 公司),鼠抗 GAPDH 单克隆一抗、山羊抗兔及兔抗鼠单克隆二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),ECL 发光液(北京全品速生物科技有限公司)。

**1.1.2 主要仪器** PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),JS780 SensiAnsys 凝胶图像分析系统(上海培清科技有限公司),Tanon4100 全自动数码凝胶成像分析系统(上海天能公司),ChemiDo-cXRS 图像采集系统(美国 Bio-Rad 公司),CYC 氧浓度检测仪及空氧混合器(广东鸽子公司)。

**1.2 实验动物分组和模型制备** SPF 级健康 SD 大鼠(8~10 周龄)购自桂林医学院实验动物中心,雌鼠 60 只(220~250 g),雄鼠 20 只(250~300 g),雌雄按 3:1 夜间合笼交配,次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片镜检精子记为受孕第 1 天,将受孕 21 d 的大鼠剖宫后取出新生鼠即为早产鼠。早产鼠 24 h 内随机分为高氧组( $F_{iO_2} = 95\%$ )和空气组( $F_{iO_2} = 21\%$ ),每组 36 只,各组再随机分为 3、5、9 d 三个亚组,每组 12 只,高氧组置于 60 cm × 50 cm × 40 cm

的自制氧箱中,持续输入氧气,每天 3 次检测氧箱内氧浓度,维持氧浓度在 95% 以上,钠石灰和无水碳酸钙分别吸收  $CO_2$  和水分,每 24 h 定时开箱 0.5 h,添加水、饲料及更换垫料,并与空气组交换母鼠以避免其因氧中毒致喂养能力下降。

**1.3 标本收集及处理** 各组早产大鼠分别于实验 3、5、9 d 时用 5% 水合氯醛按 0.006 ml/g 进行腹腔注射麻醉。开胸,结扎右支气管,迅速取下右肺,液氮速冻,-80 °C 冰箱保存。从主支气管注入 4% 多聚甲醛维持 15 min 并置于 4% 多聚甲醛中过夜固定,逐级乙醇脱水,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,用于检测肺组织病理变化。

**1.4 RT-PCR 法检测肺组织 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达** 将肺组织取出 50~100 mg 置于用液氮预冷的研钵中,研磨成粉末后加入 TRIzol 提取总 RNA,取 5  $\mu$ l RNA 置于含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测其完整性,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度,取肺组织总 RNA 1  $\mu$ g 逆转录成相应的 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系包括 cDNA 2  $\mu$ l,上下游引物各 1  $\mu$ l,无 RNA 酶水 14  $\mu$ l,PCR 预混合物 2  $\mu$ l,共 20  $\mu$ l 反应体系。SOX9 上游引物 5'-TCTACTC-CACCTTCACCTACAT-3',下游引物 5'-CTGTGTG-TAGACGGGTTGTT-3'(扩增产物长度为 131 bp); $\beta$ -catenin 上游引物 5'-CAAGCCACAGGACTA-CAAGAA-3',下游引物 5'-CAATGTCCAGTC-CGAGATCAG-3'(扩增产物长度为 107 bp);LEF-1 上游引物 5'-GGCGACTTAGCAGACATCAA-3',下游引物 5'-CCTGAGAGGACTGTGTTTGTGTC-3'(扩增产物长度为 100 bp);SPC 上游引物 5'-GGGTAG-CAAAGAGGTACTGATG-3',下游引物 5'-ACCA-CAACCACGATGAGAAG-3'(扩增产物长度为 117 bp); $\alpha$ -SMA 上游引物 5'-AGGGAGTGATGGTTG-GAATG-3',下游引物 5'-GGTGATGATGCCGTGTTC-TA-3'(扩增产物长度为 110 bp);GAPDH 上游引物 5'-GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG-3',下游引物 5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGATG-3'(扩增产物长度为 98 bp)。反应步骤如下:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 45 s;58.3 °C 退火 1 min;72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环,72 °C 终末延伸 5 min。反应结束后,分别取 10  $\mu$ l 扩增产物加至含有 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,结果通过自动凝胶图像分析仪显示并拍照,分别测定条带光密度值,以 GAPDH mRNA 的基因表达为内参照,计算 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、 $\alpha$ -SMA

与 GAPDH 灰度值比,以此值来代表目的基因 mRNA 的相对表达水平。

**1.5 Western blot 法检测肺组织 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达** 取冻存肺组织 50 mg 于冰上 1.5 ml EP 管中,剪碎,加入 500  $\mu$ l 的 RIPA 裂解液,超声 3~4 次,放置 10 min,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min,取出上清液即为总蛋白,参考 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书进行蛋白浓度定量,设定浓度最低管为标准,把样品调成同一浓度,加入样品溶液,沸水浴加热 15 min 后置于冰上冷却,每孔加 40  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h 后分别加入 SOX9 一抗、 $\beta$ -catenin 一抗、LEF-1 一抗、SPC 一抗、 $\alpha$ -SMA 一抗(均按 1:1 000 稀释)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000 稀释)室温摇动孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,用 ECL 化学试剂发光,曝光 1 min,用 Chemi-Do-cXRS 图像采集系统采集图像。以 GAPDH(1:1 000)作为内参照,Image J 软件检测条带灰度值,计算 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 与内参 GAPDH 的灰度值比值,该比值代表目的蛋白的相对表达水平。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织病理学改变** 空气 3 d 组、5 d 组、9 d 组在低倍镜( $\times 100$ )下观察,可见肺组织结构基本

正常,肺泡丰富,大小均一,并且随着出生天数的增加肺泡数量增多。高氧 3 d 组肺组织见明显渗出、大量炎症细胞浸润、出血性改变及肺泡压缩,高氧 5 d 组可见肺组织结构紊乱,肺间质增宽,9 d 组可见肺泡炎症细胞明显减少,肺间隔明显增宽,小肺泡减少,肺泡腔增大,肺组织结构紊乱且肺泡结构简单,见图 1。

**2.2 肺组织 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表达** 高氧组早产大鼠肺组织  $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 在 3、5、9 d 的 mRNA 表达均高于空气组( $F = 7.705、14.549、9.444、7.974, P < 0.05$ )并且高氧组 mRNA 相对表达量随氧暴露时间的增加而增加,SOX9 在高氧 3、5、9 d mRNA 相对表达量呈递减趋势,但仍高于空气组,在 3 d 和 5 d 时,SOX9 mRNA 表达与空气组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),在 9 d 时,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

**2.3 肺组织 SOX9、 $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 的蛋白表达** 高氧组早产大鼠肺组织  $\beta$ -catenin、LEF-1、SPC、 $\alpha$ -SMA 的蛋白表达均高于对应时间点的空气组( $F = 18.747、87.959、9.281、13.886, P < 0.05$ ),SOX9 在高氧 3 d、5 d 的蛋白表达高于对应时间点的空气组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),在 9 d 时,高氧组与空气组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3。

## 3 讨论

WNT 信号通路是一类控制细胞生长、增殖、传递细胞间相互调控信息的信号通路,它主要由经典

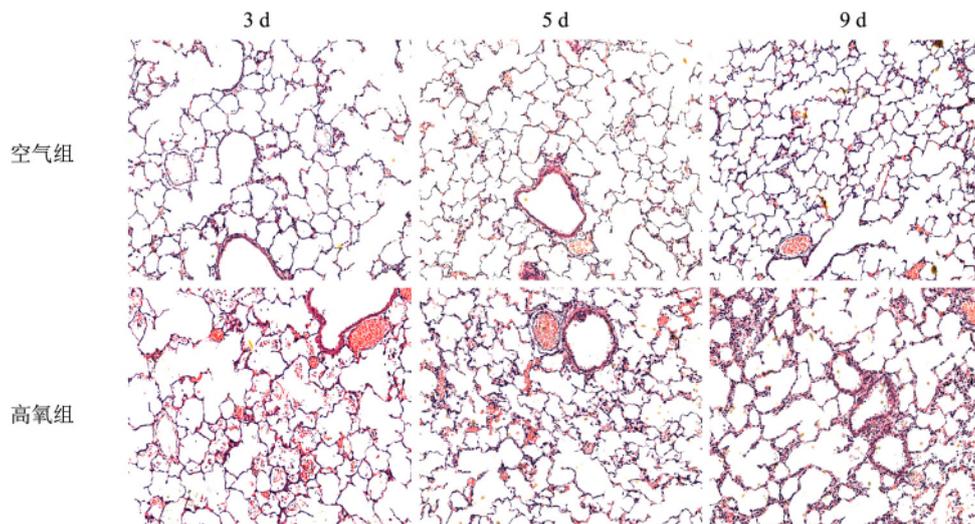


图 1 空气组和高氧组早产鼠在各时间点的肺组织病理改变 HE  $\times 100$

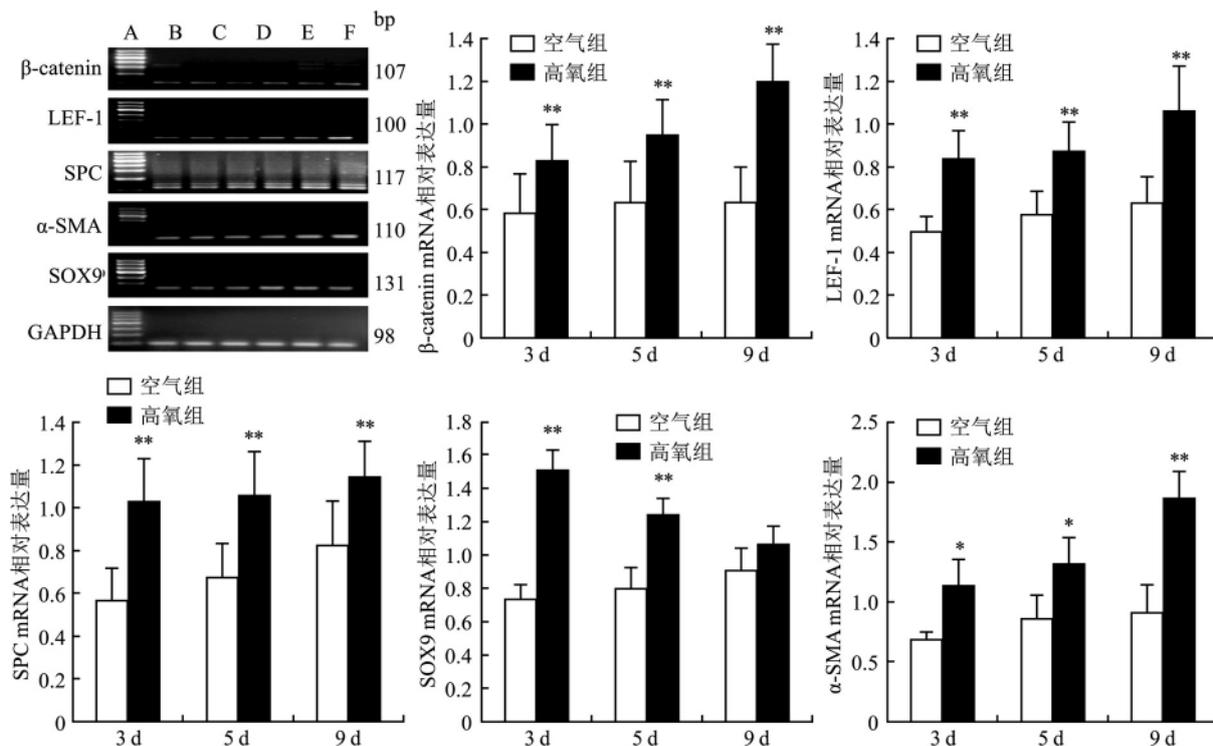


图2 空气组和高氧组在各时间点 SOX9、β-catenin、LEF-1、SPC、α-SMA mRNA 的相对表达

M: marker; A: 空气 3 d 组; B: 空气 5 d 组; C: 空气 9 d 组; D: 高氧 3 d 组; E: 高氧 5 d 组; F: 高氧 9 d 组; 与同时间点空气组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

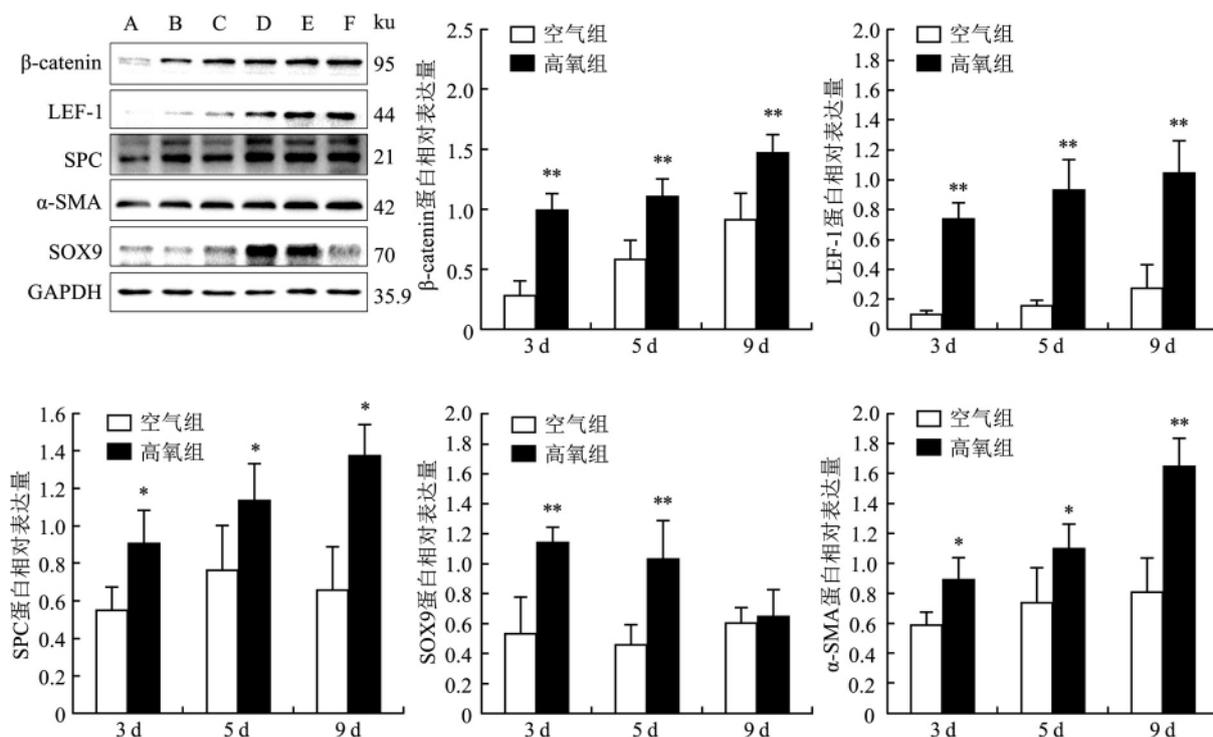


图3 空气组和高氧组在各时间点 SOX9、β-catenin、LEF-1、SPC、α-SMA 蛋白的相对表达

A: 空气 3 d 组; B: 空气 5 d 组; C: 空气 9 d 组; D: 高氧 3 d 组; E: 高氧 5 d 组; F: 高氧 9 d 组; 与同时间点空气组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

WNT 信号途径和非经典 WNT 信号途径组成。经典 WNT 信号通路即 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路,是目前研究最为广泛的,也是与肺发育密切相关的信号通路,它不仅在肺的早期发育阶段调节细胞的增殖和分化,对后期肺结构的维持也是起着重要作用,近年来人们也逐渐认识到它在肺部疾病的发生发展过程中起的重要作用<sup>[5]</sup>,包括特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病、肺癌、BPD 等。目前,已有较多关于经典 WNT 信号通路与特发性肺纤维化之间关系的研究<sup>[6]</sup>,而研究 WNT 信号通路在高氧肺损伤中的作用才刚刚开始。

在 WNT/ $\beta$ -catenin 途径中,当细胞外 WNT 信号分子蛋白与 Fz 和低密度脂蛋白相关蛋白 5/6 结合使胞内蓬乱蛋白发生磷酸化而激活,活化的蓬乱蛋白抑制糖原合成酶 3 $\beta$  活性,使  $\beta$ -catenin 无法磷酸化,从而避免被泛素-蛋白酶体系降解, $\beta$ -catenin 在胞内富集并进入胞核与 T 淋巴细胞因子/淋巴样增强因子 (TCF/LEF) 结合,启动靶基因转录,因此 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路信号活化必然会使  $\beta$ -catenin 的表达增加<sup>[7]</sup>。LEF-1 和  $\beta$ -catenin 作为经典 WNT 信号通路中的关键转录因子,在高氧 3、5、9 d 组的 mRNA 和蛋白表达量均高于空气 3、5、9 d 组,表明经典 WNT 信号通路在高氧致 BPD 模型中是处于激活状态,提示 WNT 信号通路参与了高氧肺损伤。

本研究中空气各组肺组织结构基本正常,高氧 3 d 组肺组织见明显渗出、大量炎症细胞浸润、出血性改变及肺泡压缩,高氧 5 d 组和 9 d 组可见肺间隔增宽及肺泡结构紊乱,表明成功建立了高氧肺损伤模型。经检测发现,高氧组肺组织 SPC、 $\alpha$ -SMA 和蛋白表达均高于空气组,且随着高氧暴露天数的增加表达量也增加,而空气各组 SPC 和  $\alpha$ -SMA 表达量未见明显差异。由于 SPC 是由 II 型肺泡上皮细胞产生的特异性表面活性蛋白<sup>[8]</sup>,对肺泡结构的完整起着重要作用,因此它的高氧组表达增高提示在高氧情况下 II 型肺泡上皮细胞不断的增殖,但是向 I 型肺泡上皮细胞分化受阻,导致肺泡的修复受损,代之以纤维细胞的增生来修复, $\alpha$ -SMA 是间叶细胞的标志,表达在肌成纤维细胞中<sup>[9]</sup>,因此,高氧组  $\alpha$ -SMA 表达高于空气组,且  $\alpha$ -SMA 在高氧 3、5、9 d 的表达呈逐渐增高的趋势,提示随着高氧暴露时间的增加,肺组织纤维化越来越重,这与病理切片结果相一致。

SOX(SRY-related HMG-box) 基因家族是一类编码转录因子的基因,参与多种组织早期胚胎发育过程,对多种组织器官的发育具有重要作用<sup>[10]</sup>,

SOX9 是 SOXE 亚族的一个成员,有研究<sup>[11]</sup>显示它表达在呼吸道外周上皮祖细胞中,对肺分支形态的形成起着重要作用,也有研究认为它在呼吸道上皮细胞的表达没有意义<sup>[12]</sup>。而有关 SOX9 与 WNT 信号通路的关联在不同的实验研究中有着不同的结论,在肺腺癌中发现 SOX9 表达增加与 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路激活有关<sup>[13]</sup>;在肠的发育过程中,SOX9 被认为是 WNT 信号通路的直接调控因子<sup>[14]</sup>;在肺的发育过程中,Rockich et al<sup>[11]</sup>认为 WNT/ $\beta$ -catenin 并不调节 SOX9 的表达;Ustiyani et al<sup>[15]</sup>在实验中发现 WNT/ $\beta$ -catenin 在呼吸道上皮祖细胞中既可促进 SOX9 的表达,又可抑制 SOX9 的表达,可见 SOX9 与 WNT 信号通路的相互作用非常复杂,而有关 SOX9 基因功能改变与早产 BPD 的关系,目前国内尚未开展这方面的研究。

本研究显示高氧组 SOX9 的核酸和蛋白表达量均高于空气组,以高氧 3 d 和高氧 5 d 最为明显,而高氧 3 d 组的表达量又高于高氧 5 d 组,因此推测在高氧致急性肺损伤时,SOX9 表达增加可能是应激性增加,是为了抑制 WNT 信号通路的激活来保护肺不受损害,但是随着高氧暴露时间的增加,SOX9 的表达逐渐降低,也许与 SOX9 无法抑制 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活反而被 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制有关。

综上所述,本研究显示高氧暴露通过激活 WNT 信号通路致早产大鼠肺组织损伤,同时 WNT 信号通路的激活可能是通过抑制 II 型肺泡上皮细胞向 I 型肺泡上皮细胞分化,因此肺泡上皮不能正常修复,从而导致肺组织最后纤维化,而 SOX9 则可能是通过抑制 WNT 信号通路来参与高氧肺损伤。而有关 SOX9 及 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路在高氧肺损伤中的具体机制仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Kesler M, Sant'Anna G. Mechanical ventilation and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Clin Perinatol*, 2015, 42(4): 781-96.
- [2] Lal C V, Ambalavanan N. Genetic predisposition to bronchopulmonary dysplasia[J]. *Semin Perinatol*, 2015, 39(8): 584-91.
- [3] Kadzik R S, Cohen E D, Morley M P, et al. Wnt ligand/frizzled 2 receptor signaling regulates tube shape and branch-point formation in the lung through control of epithelial cell shape[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(34): 12444-9.
- [4] Kornish J D, Sinner D, Zorn A M. Interaction between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(1): 56-68.
- [5] Konigshoff M, Eickelberg O. WNT signaling in lung disease: a

- failure or a regeneration signal? [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(1): 21–31.
- [6] Wang X, Dai W, Wang Y, et al. Blocking the wnt/beta-catenin pathway by lentivirus-mediated short hairpin RNA targeting beta-catenin gene suppresses silica-induced lung fibrosis in mice [J]. *Int J Environ Res Public Health* 2015, 12(9): 10739–54.
- [7] Waisberg J, Saba G T. Wnt/beta-catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(26): 2631–5.
- [8] Akella A, Deshpande S B. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders [J]. *Indian J Exp Biol*, 2013, 51(1): 5–22.
- [9] Tan Z X, Chen Y H, Xu S, et al. Calcitriol inhibits bleomycin-induced early pulmonary inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 240(1): 161–71.
- [10] Monjo F, Romero R. Embryonic development of the nervous system in the planaria *Schmidtea polychroa* [J]. *Dev Biol*, 2015, 397(2): 305–19.
- [11] Rockich B E, Hrycaj S M, Shih H P, et al. Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(47): E4456–64.
- [12] Perl A K, Kist R, Shan Z, et al. Normal lung development and function after Sox9 inactivation in the respiratory epithelium [J]. *Genesis*, 2005, 41(1): 23–32.
- [13] Capaccione K M, Hong X, Morgan K M. Sox9 mediates Notch1-induced mesenchymal features in lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11): 3636–50.
- [14] Bastide P, Darido C, Pannequin J, et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(4): 635–48.
- [15] Ustiyani V, Zhang Y, Perl A K, et al. beta-catenin and Kras/Foxm1 signaling pathway are critical to restrict Sox9 in basal cells during pulmonary branching morphogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2016, 245(5): 590–604.

## The expression and significance of SOX9 and molecules of WNT signaling pathway in lung tissues of preterm rats after hyperoxia exposure

Yan Longli, Quan Yufeng, Zhang Hua, et al

(Dept of Newborn, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

**Abstract Objective** To study the expression of SOX9 and molecules of WNT signaling pathway in lung tissues of preterm rats after hyperoxia exposure, and to explore the pathogenesis of lung injury after hyperoxia exposure. **Methods** Seventy-two one-day-old Sprague Dawley preterm rats were randomly divided into hyperoxia group and air group, with 36 rats in each group. Each group was further divided into 3-day, 5-day and 9-day subgroup, with 12 rats in each subgroup. Rats of hyperoxia group were exposed to 95% oxygen. The rats in each group were sacrificed at each time and gathered lung tissue samples. Hematoxylin and eosin staining was used to observe the pathological changes in lung tissues. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of SOX9,  $\beta$ -catenin, LEF-1, SPC and  $\alpha$ -SMA in lung tissues. **Results** The inflammatory cells seepage and infiltration, hyperaemia and alveolar compression was detected in hyperoxia group at 3 d. The hyperoxia group at 5 d and 9 d showed the broadening alveoli septas and disorganized lung tissues. Compared with the air group, the expression of  $\beta$ -catenin, LEF-1, SPC and  $\alpha$ -SMA were increased in hyperoxia group ( $P < 0.05$ ), and their expressions were gradually increased over the time of hyperoxia exposure. The hyperoxia group had higher mRNA and protein of SOX9 at 3 and 5 days, compared with the air group at the same time ( $P < 0.01$ ), and hyperoxia group had the highest expression of SOX9 at 3 days, had the same level of SOX9 expression in air group and hyperoxia group at 9 days ( $P > 0.05$ ). The expression of SOX9 in hyperoxia group at 3 days were lower than the hyperoxia group at 5 days. **Conclusion** High concentration of oxygen exposure through activate WNT signaling pathway to cause preterm rats lung injury, and SOX9 in hyperoxia-induced lung tissues may suppress WNT signaling pathway to take part in the hyperoxic lung injury.

**Key words** SOX9; WNT signaling pathway; hyperoxia-induced lung injury; preterm rats