

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.020.html>

## C-8 神经酰胺对肺泡Ⅱ型上皮细胞通透性及紧密连接蛋白的影响

汪影<sup>1</sup>, 杨进<sup>1</sup>, 刘辉<sup>1</sup>, 毕继蕊<sup>1</sup>, 卫园园<sup>1</sup>, 操基玉<sup>2</sup>, 陆友金<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究外源性 C-8 神经酰胺对肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)单层通透性的影响,探讨其作用机制。方法 将体外分离培养的 AECⅡ通过差速贴壁法纯化,在 Transwell 上构建单层,待细胞融合后给予不同浓度的 C-8 神经酰胺(0、25、50、100 μmol/L)继续培养 24 h,应用伏欧计测定跨上皮电阻值(TEER)及辣根过氧化物酶(HRP)标记法检测吸光度(OD)值;分别提取细胞总蛋白及总 RNA,采用 Western blot 和实时定量聚合酶链式反应方法检测不同浓度的 C-8 神经酰胺对 AECⅡ紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 蛋白水平和 mRNA 水平表达的影响。结果 不同浓度的 C-8 神经酰胺刺激融合的 AECⅡ单层 24 h 后,各组间 TEER 值、OD 值差异均有统计学意义( $F = 38.780, 19.780, P < 0.001$ )。C-8 神经酰胺作用后,ZO-1、Occludin 蛋白( $F = 71.150, P < 0.01; F = 7.703, P = 0.002$ )及 mRNA( $F = 4.887, P = 0.014; F = 3.637, P = 0.048$ )表达量明显降低。**结论** C-8 神经酰胺可能通过下调紧密连接蛋白的表达增加肺泡Ⅱ型上皮细胞通透性。

**关键词** 神经酰胺; 紧密连接; 肺上皮细胞; 跨上皮电阻

**中图分类号** R 563

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)02-0195-05

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)最显著的病理学变化是弥漫性肺泡上皮细胞损伤,包括肺泡上皮屏障、肺泡水清除、肺泡表面活性物质的分泌等<sup>[1]</sup>。其中肺泡上皮屏障损伤是 ARDS 发病环节中的重要一步,而肺泡上皮屏障发挥选择性通透作用主要依赖于肺泡上皮细胞间紧密连接<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明,神经酰胺在 ARDS 肺水肿发展过程中发挥重要作用,其可抑制肺泡表面活性物质生成而促进肺水肿形成,然而目前有关神经酰胺与肺泡上皮屏障之间关系的研究甚少。研

究<sup>[4]</sup>表明神经酰胺能够增加肠道上皮细胞的通透性。该研究试图在细胞水平上研究 C-8 神经酰胺对肺上皮屏障通透性的影响,初步探讨其作用机制,为下一步抑制神经酰胺生成从而治疗 ARDS 提供理论依据,为 ARDS 的诊疗提供新思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 6~8 周龄 ICR 小鼠 8 只,雌雄各半,20~25 g,由安徽省实验动物中心提供。动物房温度维持于 20~25 °C,相对湿度(50 ± 5)% ,每日光照时间约 12 h。将实验鼠按雄:雌为 1 : 1 于 21:00 进行合笼,次日 9:00 查阴栓,阴栓阳性者记为妊娠第 1 天。

**1.1.2 试剂及器材** DMEM、胰酶、胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、PBS 均购自美国 Hyclone 公司; C-8 神经酰胺购自美国 Cayman 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 跨上皮电阻仪购自美国 Millipore 公司; ZO-1 单克隆抗体购自美国 Zymed 公司; Occludin 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养条件及方法** 参照王勇等<sup>[5]</sup>方法将第 17 天 ICR 孕鼠颈椎脱臼法处死,于酒精中浸泡 5 min,取出胎鼠后置于预冷 4 °C 无菌 PBS 中,提取双肺并尽量除去气管、支气管、血管等组织,润洗 3 遍后用无菌眼科剪于 5 min 之内剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块并用 PBS 清洗直至液体清亮。0.25% 胰蛋白酶消化组织块 10 min,消化期间每隔 5 min 震荡 1 次,随即加入等体积的含有 10% FBS 的 DMEM 终止消化,过滤,1000 r/min(离心半径为 156 mm)离心 5 min,弃上清液,加入含 10% FBS 的 DMEM 制成细胞悬液接种于培养皿,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,1 h 后换皿,重复 3 次。24 h 后换液,此时贴壁细胞即为肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AECⅡ)。

**1.2.2 胎鼠 AECⅡ的鉴定** ①倒置相差显微镜观察:运用倒置显微镜观察 AECⅡ贴壁生长情况及

2015-11-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81400058); 安徽省自然科学基金项目(编号: 1208085QH165)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院呼吸内科, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 合肥 230032

作者简介: 汪影,女,硕士研究生;

陆友金,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: luyougolden@ hotmail. com

形态学特征; ② 碱性磷酸酶( alkaline phosphatase , AKP) 染色法鉴定: 将对数生长期的 AEC II 接种到 12 孔板制作细胞爬片 ,4% 多聚甲醛固定 ,按照 BCIP/NBT AKP 显色试剂盒说明书进行操作; ③ 透射电镜鉴定: 对数生长期的 AEC II 经 PBS 清洗 ,胰酶消化后 ,2 500 r/min( 离心半径为 156 mm) 离心 10 min 2.5% 戊二醛固定、包埋 ,制作超薄切片 ,于透射电镜下观察。

**1.2.3 肺上皮细胞单层通透性** ① 跨上皮电阻 ( transepithelial electrical resistance ,TEER) 的测定: AEC II 以  $3 \times 10^5 / \text{cm}^2$  接种于 Transwell 的顶层小室微孔膜上 ,根据本课题组前期 MTT 实验结果<sup>[6]</sup> ,随机分为 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  C-8 神经酰胺培养 24 h ,应用跨上皮电阻测量仪检测各组 TEER 。② 辣根过氧化物酶标记法( horseradish peroxidase notation ,HRP) : 细胞融合后加入终浓度为 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  C-8 神经酰胺培养 24 h ,弃去上室培养液 ,加入浓度为 0.34 mg/ml HRP 的 DMEM ,孵育 1 min 后 取下室液 60  $\mu\text{l}$  ,加入 860  $\mu\text{l}$  混合反应液 ( 50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 5 mmol/L 愈创木酚 ) 及 100  $\mu\text{l}$  新鲜配制的 0.6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 ,置于 12 孔板中 ,室温反应 15 min 后检测波长在 470 nm 下的 HRP 吸光度( optical density ,OD) 变化。

**1.2.4 Western blot 法检测紧密连接蛋白的表达** 给予不同浓度的 C-8 神经酰胺 ( 0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  ) 刺激后消化收集各组细胞 ,裂解离心 ( 12 000 r/min ,离心 10 min) 提取蛋白质。二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( SDS-PAGE) 分离蛋白 ,再转至聚偏二氟乙烯膜 ( PVDF) 膜上 ,5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min ,TBST 漂洗 10 min × 3 次; 分别加入抗 ZO-1 鼠单抗 ( 1 : 200 ) 、抗 Occludin 兔多抗 ( 1 : 250 ) 4 °C 过夜 ,TBST 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ( 1 : 100 000 ) 于摇床室温孵育 75 min ,TBST 漂洗 10 min × 4 次 ,ECL 显色。用天能图像分析系统进行分析。

### 1.2.5 实时定量 PCR 检测紧密连接 mRNA 的表达

提取 RNA ,逆转录为 cDNA ,并以此为模板进行 PCR 扩增。本实验所用引物使用 PubMed 在线 Primer3 软件设计 ,由上海生工公司合成 ,小鼠各基因引物序列见表 1 。

表 1 各基因引物序列和基因片段长度

基因	序列 ( 5'-3' )	大小 ( bp )
Gapdh	F: ACCCCAGCAAGGACACTGAGCAG R: GCCCCCTCCTGTTATTATGGGGT	142
ZO-1	F: CGTCCGGGGAAAGTCCGGGAA R: CTGGGACAAAAGTCCGGGAA	186
Occludin	F: CTGAGCACCTGGGATTCCG R: ACATGGCTGATGTCAGTGGT	100

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析 ,正态性数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 两组之间的均数比较采用两独立样本 t 检验 ,多组间的均数比较采用方差分析; 两两比较采用 LSD 检验。

## 2 结果

**2.1 AEC II 细胞鉴定** 倒置显微镜下观察到原代培养 18 ~ 24 h 后 ,AEC II 贴壁伸展 ,呈圆形或立方形 胞质内有大量细小颗粒围绕细胞核分布 ( 图 1A ) ; 体外培养 24 h 后进行 AKP 染色 ,细胞内 AKP 反应产物呈深蓝色 ( 图 1B ) ; 透射电镜下可见 AEC II 内有特征性的板层小体 ( 箭头所示 ) ,于细胞膜上有时可见微绒毛 ( 图 1C ) 。

**2.2 C-8 神经酰胺对 AEC II 单层细胞通透性的影响** 随着 C-8 神经酰胺浓度的增加 ,TEER 值逐渐下降 ,各组间 TEER 值差异有统计学意义 ( $F = 38.780$ ,  $P < 0.001$ ) 。不同浓度组与对照组相比 ,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。 HRP 测定结果显示 随着浓度的增加 OD 值呈上升趋势 ,各组间 OD 值差异有统计学意义 ( $F = 19.780$ ,  $P < 0.001$ ) ,神经酰胺 50  $\mu\text{mol/L}$  组和 100  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组相比 ,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。见表 2 。

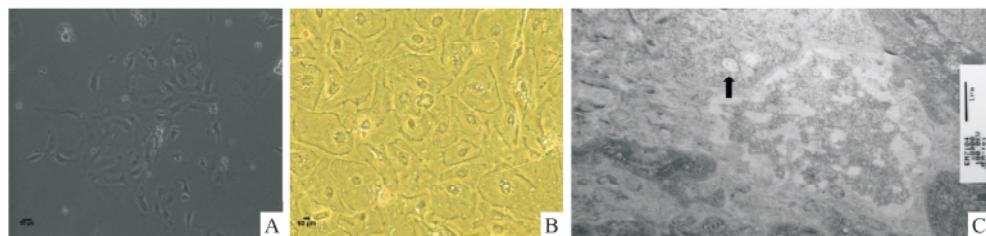


图 1 AEC II 细胞鉴定图片

A: 倒置显微镜下可见 AEC II 呈圆形或立方形  $\times 200$ ; B: 显微镜下可见细胞内的 AKP 反应产物呈深蓝色 AKP 染色  $\times 200$ ; C: 电镜下可见 AEC II 内有特征性板层小体  $\times 15 000$

表2 不同浓度C-8神经酰胺对AEC II单层通透性的影响( $n=5 \bar{x} \pm s$ )

组别( $\mu\text{mol/L}$ )	TEER( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	OD值(470 nm)
0	$35.73 \pm 3.26$	$0.037 \pm 0.018$
25	$25.47 \pm 3.28^*$	$0.071 \pm 0.029$
50	$20.64 \pm 3.54^*$	$0.107 \pm 0.029^*$
100	$16.53 \pm 2.91^* \#$	$0.149 \pm 0.034^* \#$

与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较: \*  $P < 0.05$ ; 与25  $\mu\text{mol/L}$ 组比较:

#  $P < 0.05$

**2.3 C-8神经酰胺对AEC II紧密连接蛋白表达的影响** 采用Western blot法检测各组ZO-1和Occludin蛋白的表达情况(图2),结果显示各组ZO-1的表达差异有统计学意义( $F = 71.150$ ,  $P < 0.001$ )。C-8神经酰胺各剂量组与对照组相比ZO-1的表达均显著下调( $P < 0.05$ )。各组Occludin的表达差异有统计学意义( $F = 7.703$ ,  $P = 0.002$ )。神经酰胺50  $\mu\text{mol/L}$ 组和100  $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比,Occludin的表达均下调( $P < 0.05$ )。

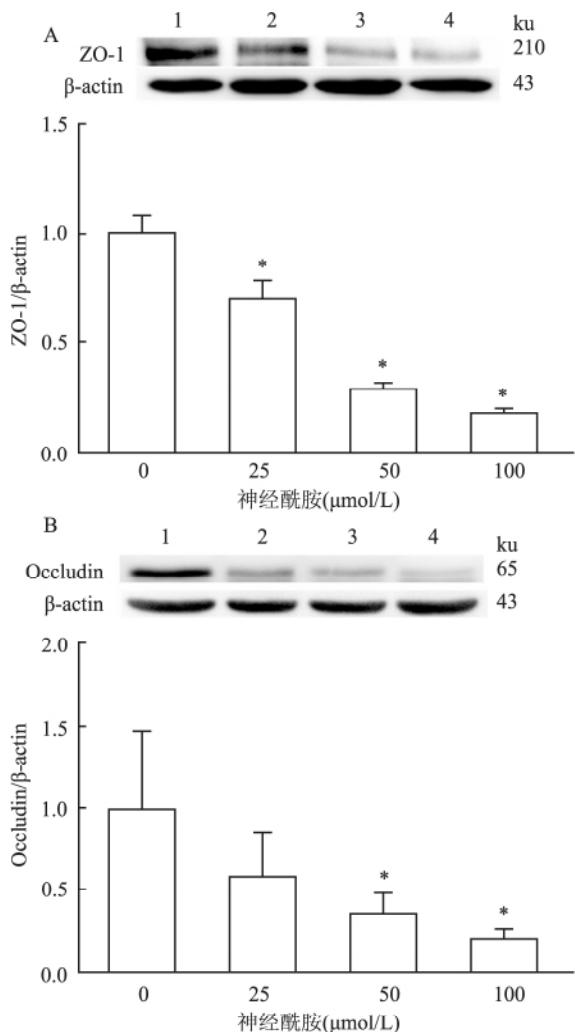
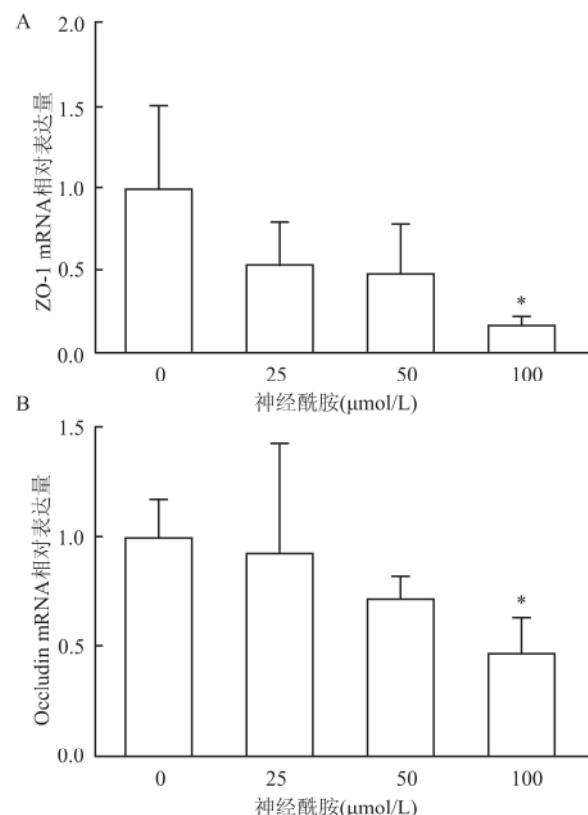


图2 C-8神经酰胺对AEC II紧密连接蛋白表达的影响

1: 0  $\mu\text{mol/L}$ 组; 2: 25  $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: 50  $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: 100  $\mu\text{mol/L}$ 组; A: ZO-1; B: Occludin; 与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 C-8神经酰胺对AEC II紧密连接mRNA表达的影响** C-8神经酰胺作用后ZO-1及Occludin mRNA表达水平平均有所下调(ZO-1:  $F = 4.887$ ,  $P = 0.014$ ; Occludin:  $F = 3.637$ ,  $P = 0.048$ ),与对照组相比,C-8神经酰胺100  $\mu\text{mol/L}$ 组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3)。

图3 C-8神经酰胺对AEC II紧密连接mRNA表达的影响  
A: ZO-1; B: Occludin; 与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较: \*  $P < 0.05$ 

### 3 讨论

ARDS是临床高病死率疾病,目前尚缺乏有效的诊断及治疗手段<sup>[7]</sup>。既往研究<sup>[8-9]</sup>显示,在ARDS发生过程中,紧密连接蛋白表达和分布发生改变,对液体和蛋白质经细胞旁途径选择性通透作用增强而导致肺水肿。当机体遭受应激刺激时,神经酰胺可作为“第二信号分子”发挥信号传导作用,放大炎症反应引起组织损伤<sup>[10]</sup>。前期研究<sup>[6]</sup>已验证神经酰胺可引起肺泡细胞损伤,本研究显示在神经酰胺刺激下TEER显著下降,OD值呈上升趋势,即神经酰胺导致肺泡上皮通透性增加,且这种变化具有一定的浓度依赖性。在哺乳动物体内,多种神经酰胺合酶可催化合成不同长度酰基链的神经酰胺。研究<sup>[11]</sup>表明C-8神经酰胺水溶性较好,细胞膜

穿透力较强 对细胞的增殖分化具有更明显的影响 ,故本实验使用 C-8 神经酰胺作为研究对象。

在 ARDS 动物模型中神经酰胺增加<sup>[12]</sup> ,通过抑制神经酰胺表达可以减轻肺水肿、炎症反应 改善小鼠生存率<sup>[13]</sup>。同时神经酰胺参与肠上皮屏障及皮肤上皮屏障功能的调节<sup>[4]</sup> ,本研究表明神经酰胺通过降低紧密连接蛋白的表达增加肺泡上皮细胞的通透性。本研究中 4 组间 AEC II 各紧密连接表达量有明显差异 ,Western blot 显示随着神经酰胺剂量的增加 ,ZO-1 及 Occludin 表达逐渐减弱; 应用 Real-time PCR 检测到给予 100 μmol/L 神经酰胺刺激后 AEC II 表达 ZO-1 、Occludin mRNA 明显降低。上述结果提示 C-8 神经酰胺可能通过紧密连接影响肺上皮通透性 同时也可表明神经酰胺对紧密连接 ZO-1 和 Occludin 的调节主要发生在蛋白水平 ,加大剂量才发生转录水平的变化 ,这可能与神经酰胺导致的损伤是个急性损伤有关 具体机制仍有待研究。

综上所述 ,本研究显示 C-8 神经酰胺能够增加 AEC II 单层细胞的通透性 ,下调紧密连接蛋白的表达 这些蛋白可能是神经酰胺增加肺上皮屏障通透性的作用靶点 ,为进一步研究神经酰胺引起肺上皮屏障功能受损的分子机制提供了基础 ,同时为 ALI 提供新的诊断思路及治疗靶点。

## 参考文献

- [1] 刘晨风 ,吴小红 ,曾 扬 ,等. 白介素 33 在百草枯诱导小鼠急性肺损伤中的作用机制研究 [J]. 安徽医科大学学报 ,2014 ,49( 8) :1027 - 32.
- [2] Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions [J]. *Annu Rev Physiol* ,2013 ,75: 551 - 67.
- [3] Sparkman L ,Chandru H ,Bogaram V. Ceramide decreases surfactant protein B gene expression via downregulation of TTF-1 DNA binding activity [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ,2006 ,290( 2) :L351 - 8.
- [4] Janssens M ,van Smeden J ,Gooris G S ,et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients [J]. *J Lipid Res* ,2012 ,53( 12) :2755 - 66.
- [5] 王 勇 ,操基玉 ,郭冬梅 ,等. 油烟中细颗粒物致胎鼠肺泡 II 型上皮细胞氧化应激指标的影响 [J]. 环境与健康杂志 ,2010 ,27( 10) :872 - 5.
- [6] 卫园园 ,杨 进 ,陆友金 ,等. 神经酰胺对胎鼠肺泡 II 型上皮细胞增殖的影响 [J]. 安徽医科大学学报 ,2014 ,49( 10) :1502 - 5.
- [7] 吴学玲 ,白春学. 新型甲型 H1N1 流感诱发急性肺损伤的诊治进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志 ,2010 ,33( 6) :448 - 51.
- [8] Xie W ,Wang H ,Wang L ,et al. Resolvin D1 reduces deterioration of tight junction proteins by upregulating HO-1 in LPS-induced mice [J]. *Lab Invest* ,2013 ,93( 9) :991 - 1000.
- [9] Uchida T. Acute lung injury and alveolar epithelial function [J]. *J Anesth* ,2011 ,25( 1) :152 - 4.
- [10] Tibboel J ,Reiss I ,de Jongste J C ,et al. Sphingolipids in lung growth and repair [J]. *Chest* ,2014 ,145( 1) :120 - 8.
- [11] Karasavvas N ,Erukulla R K ,Bittman R ,et al. Stereospecific induction of apoptosis in U937 cells by N-octanoyl-sphingosine stereoisomers and N-octyl-sphingosine. The ceramide amide group is not required for apoptosis [J]. *Eur J Biochem* ,1996 ,236( 2) :729 - 37.
- [12] von Bismarck P ,Wistädter C F ,Klemm K ,et al. Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model [J]. *Am J Respir Crit Care Med* ,2008 ,177( 11) :1233 - 41.
- [13] Yang J ,Qu J M ,Summah H ,et al. Protective effects of imipramine in murine endotoxin-induced acute lung injury [J]. *Eur J Pharmacol* ,2010 ,638( 1 - 3) :128 - 33.

## Effects of C-8 ceramide on the monolayer permeability and the tight junction proteins in alveolar epithelial type II cells

Wang Ying ,Yang Jin ,Liu Hui ,et al

( Dept of Respiratory Medicine ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601)

**Abstract Objective** To study the impact of C-8 ceramide on the alveolar epithelial barrier and the tight junction proteins of alveolar epithelial type II cells ( AEC II ) . **Methods** The primarily cultured AEC II was purified by differential adherence method. The cells were seeded on Transwell polyester membranes to construct *in vitro* models of AEC II monolayers with different concentrations of C-8 ceramide ( 0 ,25 ,50 ,100 μmol/L) for 24 hours when they became fused. The monolayer permeability was measured by transepithelial electrical resistance ( TEER ) and horseradish peroxidase notation ( HRP ) . The total protein and RNA were extracted from AEC II . Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction were used to detect the protein and mRNA levels of ZO-1 ,Occludin

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.022.html>

# 美洲大蠊水提取物对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用

夏超<sup>1</sup>, 王佳佳<sup>2</sup>, 李芳群<sup>1</sup>, 胡祥鹏<sup>1</sup>, 宋莎莎<sup>1</sup>, 章礼久<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究美洲大蠊水提取物对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用及部分机制。方法 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、美洲大蠊 30 mg/kg、60 mg/kg 和 120 mg/kg 组和秋水仙碱组, 每组 10 只。免疫性肝纤维化模型通过大鼠腹腔注射猪血清制备 0.5 ml/kg, 每周 2 次, 共 12 周。造模期间给药组分别给予相应的受试药物, 正常组和模型组分别给予等剂量的生理盐水。于造模给药结束后处死大鼠, 测定肝脾指数; 收集外周血, 测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、透明质酸 (HA)、层粘蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原酶 (PC Ⅲ) 和 Ⅳ型胶原酶 (C Ⅳ) 含量; 取肝脏, HE、Masson 染色观察肝组织病理及胶原沉积变化; 制备肝脏匀浆, ELISA 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 含量; 免疫组织化学和 Western blot 法测定肝组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达。结果 与模型组比较, 美洲大蠊 (30、60、120 mg/kg) 能降低肝纤维化大鼠升高的肝脾指数, 降低血清中 ALT、AST、HA、LN、PC Ⅲ、C Ⅳ 水平, 降低肝组织 MDA 含量, 提高 SOD 及 GSH 活性, 减轻大鼠肝脏病理损伤程度, 减少肝组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 的表达。结论 美洲大蠊水提取物对猪血清诱导的免疫性肝纤维化大鼠有显著的保护作用, 其机制可能与其抗氧化作用及抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达有关。

**关键词** 美洲大蠊水提取物; 免疫性肝纤维化; 猪血清; 抗氧化; 转化生长因子  $\beta$ 1

2015-11-17 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QH168); 安徽省公益性研究联动计划项目(编号: 1501ld04046)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院消化内科, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 夏超, 男, 硕士研究生;

王佳佳, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: ljedu@163.com;

章礼久, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhanglijiu6336@163.com

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0199-06

肝纤维化是肝脏对各种慢性刺激进行损伤修复时的病理改变, 主要表现为肝内细胞外基质的过度沉积。肝纤维化是肝硬化的前期过程, 其病理过程的可逆性为延缓慢性肝病发展为肝硬化提供了可能。美洲大蠊为蜚蠊科昆虫, 俗称蜚蠊, 又称蟑螂、偷油郎等, 是一种十分古老的昆虫。其入药始载于《神农本草经》, 并将其列为中品, 味咸、寒, 治血瘀坚、寒热、破积聚、喉咽痛、内寒无子<sup>[1]</sup>。近年来美洲大蠊的药用价值得到了人们广泛关注。美洲大蠊的不同提取物对大鼠急性免疫性肝损伤均有一定的保护作用<sup>[2]</sup>, 但对大鼠免疫性肝纤维化是否有作用尚不清楚。该实验采用猪血清诱导大鼠免疫性肝纤维化模型, 研究美洲大蠊水提取物对其的治疗作用及初步机制探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠 50 只 ( $200 \pm 20$ ) g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。

**1.2 药品与试剂** 美洲大蠊购自云南腾冲坤发生物养殖有限公司, 经安徽医科大学药理学实验室鉴定为美洲大蠊干燥虫体。将虫体研磨成粉, 干燥通风保留。实验室先前的方法<sup>[2]</sup>获得水提取物: 称取干燥虫粉 500 g, 以 5 倍量石油醚超声脱脂 2 次, 每次 30 min, 旋转蒸发干燥, 回收石油醚; 用 15 倍量的蒸馏水分 3 次超声提取, 每次 30 min; 提取液合并浓缩干燥, 得美洲大蠊水提取物。秋水仙碱购自西双版纳药业有限公司。猪血清, 取新鲜猪血清离心过滤除菌自制。谷丙转氨酶( alanine aminotransferase ,

respectively. **Results** Stimulated with different concentration of C-8 ceramide for 24 h, the TEER of cells decreased ( $F = 38.78, P < 0.001$ ) and the OD<sub>470</sub> increased ( $F = 19.78, P < 0.001$ ) significantly. Results from Western blot and RT-PCR demonstrated significant decrease of ZO-1 ( $F = 71.150, P < 0.01; F = 4.887, P = 0.014$ ) and Occludin ( $F = 7.703, P = 0.002; F = 3.637, P = 0.048$ ) expression in the AEC II with C-8ceramide. **Conclusion** C-8 ceramide may disrupt the alveolar epithelial barrier by decreasing expression of ZO-1 and Occludin.

**Key words** ceramides; tight junction; pulmonary epithelial cell; trans-epithelial electrical resistance