

神经酰胺对胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞增殖的影响

卫园园¹ 杨进¹ 陆友金¹ 刘辉¹ 操基玉²

摘要 取1只妊娠17.5 d的ICR小鼠,将其体内的胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)经分离、纯化、培养、鉴定后,分别加入不同浓度的神经酰胺,培养12、24和48 h后进行MTT试验。在Transwell上构建AECⅡ单层,以10 μmol/L的神经酰胺与AECⅡ培养12和24 h,并设置相对照组。应用伏欧计测定跨上皮电阻值。结果显示,随着神经酰胺染毒浓度的升高和染毒时间的延长,AECⅡ细胞增殖抑制率呈上升趋势。10 μmol/L的神经酰胺分别刺激融合的AECⅡ单层12和24 h后,与未处理对照组比较,神经酰胺刺激组的跨上皮电阻值显著下降。

关键词 肺泡Ⅱ型上皮细胞;神经酰胺;细胞增殖;单层通透性

中图分类号 R 563.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1502-03

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)最显著的病理学变化是弥漫性肺泡上皮细胞损伤,从而导致肺泡上皮屏障的结构和功能的损害。研究^[1]表明,神经酰胺在ALI肺水肿发生发展过程中发挥重要作用。Kolliputi et al^[2]在高氧所致的ALI小鼠的肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AECⅡ)和人类急性单核细胞白血病细胞株(human acute monocytic leukemia, THP-1)的联合培养模型中发现,高氧能够导致肺部神经酰胺水平升高,而神经酰胺升高的水平与肺功能的损伤程度一致。该研究参考国内外相关研究^[3-4],建立胎鼠AECⅡ的原代培养方法,并初步研究神经酰胺对AECⅡ体外增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康6~8周龄SPF级ICR小

2014-05-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085QH165)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院呼吸内科,合肥 230601

²安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生和环境卫生学系,合肥 230032

作者简介:卫园园,女,硕士研究生;

杨进,男,主治医师,责任作者,E-mail:gangqj1015@gmail.com;

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

鼠3只,其中雌鼠2只(体重为18~20 g),雄鼠1只(体重为20~25 g),由安徽省实验动物中心提供。动物房的温度保持在20~25℃,相对湿度为(50±5)%,光照时间白天:黑夜为12 h:12 h。将实验小鼠按雌:雄为2:1于晚上20:30进行合笼,于次日8:30检查阴栓,阴栓阳性者记为妊娠第0.5天。

1.2 主要仪器与试剂 2424-2型恒温CO₂培养箱(美国Shellab公司);酶标仪(澳大利亚Sunrise公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);1230型透射电镜(日本JEM公司);跨上皮电阻测量仪(美国Millipore公司)。DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、PBS均购自美国Hyclone公司;BCIP/NBT碱性磷酸酶(alkline phosphatase, AKP)显色试剂盒购自碧云天生物技术研究所;噻唑蓝(MTT)购自美国Amresco公司;神经酰胺购自美国Cayman公司。

1.3 胎鼠AECⅡ的原代培养 参照王勇等^[3]方法加以改进。选择妊娠17.5 d的ICR孕鼠1只,脱颈处死后置于75%酒精浸泡5 min,剖腹取出胎鼠后将胎鼠置于预冷至4℃的无菌PBS中,取出肺后尽量除去气管支气管血管等组织,PBS液冲洗至液体清亮,在5 min内快速将肺组织剪成约1 mm³的小块,再用PBS清洗3遍。将组织块放入离心管,加入0.25%的胰蛋白酶1 ml(每只胎鼠约0.1 ml)消化20 min,在消化过程中,每隔5 min振荡1次。消化结束后,加入等体积含有10%FBS的DMEM终止消化,经200目滤网过滤,然后以1 000 r/min离心(离心半径为156 mm)5 min,弃去上清液,加入含有10%FBS的DMEM混匀细胞。将细胞悬液加入培养皿中,置于37℃、5%CO₂培养箱培养。待成纤维细胞贴壁后(约45 min)将未贴壁细胞移入另一新培养皿中,重复3次。最后一次用含有10%FBS的DMEM重悬剩余未贴壁细胞,接种到新的培养皿中,置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h,换液,此时贴壁细胞即为AECⅡ,可进行细胞鉴定及后续实验。

1.4 胎鼠AECⅡ的鉴定

1.4.1 倒置相差显微镜观察 在倒置显微镜下观察不同培养时间后AECⅡ的贴壁生长情况及形态

特征变化。

1.4.2 AKP 染色法鉴定 取对数生长期 AEC II 制作细胞爬片,用 4% 多聚甲醛固定后,按照 BCIP/NBT 的 AKP 显色试剂盒提供的方法进行免疫细胞化学操作,脱水、干燥、封片。倒置显微镜下观察胞质内有深蓝色反应产物的细胞为阳性。

1.4.3 透射电镜鉴定 取对数生长期 AEC II,弃去培养液,胰酶消化后,以 2 000 r/min(离心半径为 156 mm)离心 10 min,用 2.5% 戊二醛固定,包埋,行超薄切片,于透射电镜下观察。

1.5 MTT 法测定神经酰胺对 AEC II 增殖的影响

参照 Paul et al^[4] 的方法进行实验。选取对数生长期 AEC II,调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml,接种到 96 孔培养板中,每孔液体量为 100 μl ,分别加入终浓度为 25、50、60、70、80、90、100 $\mu\text{mol/L}$ 的神经酰胺,并设细胞对照组(完全培养基)和溶剂对照组(含 1% 的 DMSO)。培养 12、24 和 48 h 后,每孔分别加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl ,继续培养 4 h 后分别加入 150 μl DMSO,37 °C 振荡 10 min,置于酶标仪上测定波长为 490 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。每个浓度设 5 个复孔,实验重复 3 次。抑制率(%) = (对照孔 OD₄₉₀ - 实验孔 OD₄₉₀) / 对照孔 OD₄₉₀ × 100%,并计算药物的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值。

1.6 AEC II 细胞单层跨上皮电阻值(transepithelial electrical resistance, TER)的测定 取 Transwell 小室 9 只,按 $3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种 AEC II 后,联合 TER 和倒置显微镜判断 Transwell 上 AEC II 单层融合情况,待细胞融合后,低血清培养基继续培养 24 h,随机分为未处理对照组($n=3$)、10 $\mu\text{mol/L}$ 神经酰胺刺激 12 h 组($n=3$)、10 $\mu\text{mol/L}$ 神经酰胺刺激 24 h 组($n=3$),应用伏欧计分别检测各组 TER。

1.7 统计学处理 实验结果取 3 次的平均值,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析进行比较。

2 结果

2.1 AEC II 的鉴定

2.1.1 倒置相差显微镜下观察 AEC II 的形态 体外培养 24 h 后,AEC II 伸展贴壁,呈岛状生长方式,细胞为圆形或立方形,大小约为 10~20 μm ,胞质内有较多黑色颗粒围绕细胞核分布,见图 1A、B。

2.1.2 AKP 染色法鉴定 原代培养 48 h 后进行 AKP 染色,显微镜下可见细胞胞质内的 AKP 反应产

物呈深蓝色,见图 1C。

2.1.3 电镜鉴定 原代培养 48 h 后的 AEC II 细胞胞质内分布有特征性板层小体(箭头所示),数量为 2~10 个,细胞膜上有时可见微绒毛,见图 1D。

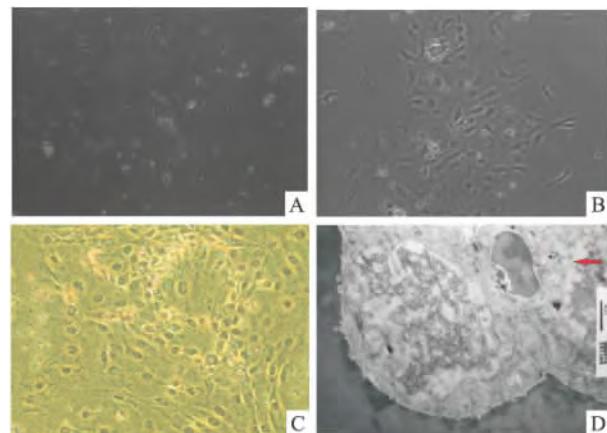


图 1 AEC II 的鉴定

A:倒置显微镜下 AEC II 的观察结果 $\times 100$; B:倒置显微镜下 AEC II 的观察结果 $\times 200$; C:免疫细胞化学法染色 AEC II 的观察结果 $\times 200$; D:电镜下 AEC II 的观察结果 $\times 8000$

2.2 神经酰胺对 AEC II 体外增殖的影响 MTT 结果显示神经酰胺可以显著抑制 AEC II 的体外增殖,不同浓度梯度的药物作用于细胞 24 h 后,抑制率随药物浓度的增加而增高,IC₅₀ 值为 68.7 $\mu\text{mol/L}$,见表 1;随后选取与 IC₅₀ 值接近的 70 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度作用于细胞 12、24、48 h 后可见,随着染毒时间的延长,抑制率逐渐升高,与染毒 12 h 和 24 h 比较,染毒 48 h 时 AEC II 的存活率明显下降,差异均有统计学意义,而染毒 12 h 与染毒 24 h 时比较,AEC II 的存活率差异无统计学意义($F=15.100$),见表 2。

2.3 神经酰胺对 AEC II 细胞单层通透性的影响 融合 AEC II 单层分别给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 神经酰胺刺激

表 1 不同浓度神经酰胺对 AEC II 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	抑制率 (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
细胞对照	0.66 ± 0.10	-	
溶剂对照	0.65 ± 0.10	2	
神经酰胺($\mu\text{mol/L}$)			68.7
25	0.61 ± 0.10	8	
50	$0.54 \pm 0.09^*$	18	
60	$0.44 \pm 0.13^*$	33	
70	$0.36 \pm 0.16^*$	45	
80	$0.28 \pm 0.15^*$	58	
90	$0.20 \pm 0.14^*$	70	
100	$0.09 \pm 0.07^*$	86	

与细胞对照组比较:^{*} $P < 0.05$

表2 不同处理时间神经酰胺对 AEC II 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	处理时间 (h)	OD 值	抑制率 (%)
细胞对照	12	0.60 ± 0.10	-
	24	0.66 ± 0.10	-
	48	0.58 ± 0.05	-
溶剂对照	12	0.59 ± 0.01	2
	24	0.65 ± 0.10	2
	48	0.57 ± 0.06	2
神经酰胺(70 μmol/L)	12	0.40 ± 0.08 [*]	33
	24	0.36 ± 0.16 [*]	45
	48	0.03 ± 0.03 [*]	95

与细胞对照组比较: ^{*} $P < 0.05$

12 h 和 24 h 后, 应用伏欧计分别检测各组 TER, 结果如表 3 所示: 与未处理对照组比较, 10 μmol/L 神经酰胺刺激 12 h 后, TER 显著下降; 10 μmol/L 神经酰胺刺激 24 h 后, TER 进一步下降。

表3 不同处理时间神经酰胺对 AEC II 单层 TER 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	处理时间 (h)	TER(Ω · cm ²)
未处理对照	12	20.33 ± 1.99
	24	27.75 ± 1.73
神经酰胺刺激(10 μmol/L)	12	12.94 ± 2.87 [*]
	24	9.94 ± 2.11 [*]

与未处理对照组比较: ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

目前对于 ALI 肺水肿时神经酰胺与肺泡上皮屏障功能之间的关系研究不多。众所周知, 因为肺泡上皮较血管内皮通透性低, 其在肺水肿中发挥的作用更大。Schweitzer 等^[5]发现神经酰胺在小鼠肺气肿模型中是介导肺泡细胞凋亡的关键物质, 上调神经酰胺水平可以在肺部引发氧化应激依赖性的细胞凋亡。肺泡上皮屏障损伤(肺泡上皮细胞受损、凋亡)是 ALI 发病环节中的重要一步, 可进一步引起肺水肿、透明膜形成等典型 ALI 病理改变^[6]。在本课题实验者的前期工作中已成功建立了外源性神

经酰胺诱导的小鼠肺水肿模型, 并发现神经酰胺可以通过抑制肺泡上皮细胞连接蛋白表达而损伤肺泡上皮屏障功能^[7]。AEC II 在肺泡上皮屏障的构成中起重要作用, 本实验进一步在分离的小鼠 AEC II 中研究了神经酰胺对 AEC II 体外增殖的影响, MTT 结果显示: 随着神经酰胺染毒浓度的升高和染毒时间的延长, AEC II 细胞增殖抑制率呈上升趋势, 神经酰胺可以显著抑制 AEC II 的体外增殖, 这提示神经酰胺能降低 AEC II 的活性, 抑制其生长。而在 Transwell 上构建的 AEC II 单层, 经神经酰胺刺激后, TER 显著下降, 反映出 AEC II 单层通透性显著增加, 进一步提示了神经酰胺对肺泡上皮屏障具有损伤作用。这为下一步体外研究神经酰胺与肺泡上皮屏障功能之间的关系奠定了基础。

参考文献

- Zimmerman G A, McIntyre T M. PAF, ceramide and pulmonary edema: alveolar flooding and a flood of questions [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(6): 245–8.
- Kolliputi N, Galam L, Parthasarathy P T, et al. NALP-3 inflammasome silencing attenuates ceramide-induced transepithelial permeability [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(9): 3310–6.
- 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, 10(27): 872–5.
- Paul W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability [J]. Methods Mol Biol, 2011, 716(10): 157–68.
- Schweitzer K S, Hatoum H, Petracchi I, et al. Mechanisms of lung endothelial barrier disruption induced by cigarette smoke: role of oxidative stress and ceramides [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(6): 836–46.
- Zhang Y L, Li Q Q, Guo W, et al. Effects of chronic ethanol ingestion on tight junction proteins and barrier function of alveolar epithelium in the rat [J]. Shock, 2007, 28(2): 245–52.
- 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.

Effect of ceramide on proliferation inhibition of alveolar type II cells of fetal mice

Wei Yuanyuan, Yang Jin, Lu Youjin, et al

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

Abstract Alveolar type II epithelial cells (AEC II) were isolated from 17.5 days gestational age ICR mice, purified, incubated and identified. The cells were treated with different concentrations of ceramide for 12, 24 and

◇经验与体会◇

肝硬化合并门静脉血栓形成的危险因素分析

周 磊¹ 孔德润²

摘要 研究肝硬化患者门静脉血栓(PVT)形成的多种危险因素。回顾性分析肝硬化患者110例,其中39例肝硬化PVT患者作为PVT组,71例肝硬化未合并血栓患者作为对照组,收集相关临床资料,对可能影响PVT形成的因素进行单因素分析和Logistic回归模型分析。单因素分析和Logistic回归模型分析结果显示纤维蛋白原是肝硬化PVT形成的独立危险因素($P = 0.002$, $P = 0.031$)。肝硬化患者应注意监测纤维蛋白原以便早期发现和预防PVT的形成。

关键词 肝硬化;门静脉血栓;危险因素

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1505-03

门静脉血栓(portal vein thrombosis,PVT)是指形成在门静脉主干或者累计肠系膜上静脉、脾静脉、肠系膜下静脉的血栓,为一种深部血管阻塞性疾病,PVT形成是肝硬化失代偿期门静脉高压症的少见但严重并发症之一。肝硬化PVT患者可以反复出现顽固性腹水和上消化系大出血,严重威胁患者的生命。血液凝血功能障碍、血流速度减慢、血管内皮损伤是常见的造成静脉血栓形成的几大原因。但肝硬化引起PVT的机制目前尚不明确,推测可能与门静脉周围淋巴管炎及纤维化、肝脏结构的改变、门静脉血流速度的减慢有关,也可能与肝脏合成功能的下降,引起体内抗凝因子及凝血因子水平改变有关^[1-3]。PVT形成的危险因素较多,该研究拟对肝

硬化排除肝癌患者PVT形成的危险因素进行分析,以利于早期发现和预防肝硬化PVT的形成,为今后肝硬化PVT诊治和预防提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 由病案检索系统选取安徽医科大学第一附属医院2008年1月~2013年10月住院的110例肝硬化患者,分析其临床资料。男74例,女36例,男女比例2.05:1。年龄19~82(54.50±13.87)岁。肝硬化病因:乙型肝炎肝硬化65例,丙型肝炎肝硬化1例,自身免疫性肝硬化11例,酒精性肝硬化4例,药物性肝硬化3例,血吸虫性肝硬化2例,不明原因肝硬化24例。

1.2 诊断标准 病例的入选标准:经病史、主诉、体格检查、辅助检查资料分析,按照2010年慢性乙型肝炎防治指南^[4]、丙型肝炎防治指南^[5]与酒精性肝病诊疗指南^[6]等诊断标准符合肝硬化诊断。患者均经彩色超声多普勒检查,若发现门静脉中有不被压缩的高回声团块,且具有反向血流,或者是星点状血流,部分可以无血流,则认为有PVT形成。必要时加做CTA和MRA以证实其是否患有PVT。

1.3 实验方法 110例肝硬化患者中,合并有PVT患者39例作为PVT组,未合并有PVT的肝硬化患者71例作为对照组。病例均收集以下数据:性别,年龄,肝硬化(乙肝、丙肝、自身免疫性、酒精性、药物性、血吸虫性、不明原因)的病因,糖尿病史,脾切除术病史,外周全血白细胞(white blood cell,WBC),红细胞(red blood cell,RBC),血红蛋白(hemoglobin,HB),血小板计数(platelet count,PLT),血糖(blood glucose,GLU),血白蛋白(serum albumin,

2014-04-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271736)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:周 磊 男,硕士研究生;

孔德润 男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:kdr168@sohu.com

48 h, then conducted MTT assay. Construction of AEC II monolayer on Transwell, with 10 μ mol/L ceramide and AEC II for 12 and 24 h, and set the corresponding control groups, the volt-ohmmeter applied to measuring TER values. ① The survival rate of AEC II was decreased with a dose-time dependent manner. ② After confluent AEC II monolayers were stimulated with 10 μ mol/L ceramide for 12 and 24 h, there were significant decreases in TER when compared with the control group, respectively.

Key words alveolar type II epithelial cells; ceramide; cell proliferation; monolayer permeability