论著

文章编号:1000-5404(2009)20-1960-04

脂多糖下调过氧化物酶增殖体激活受体γ在大鼠原代肺泡Ⅱ型上皮细胞的表达

肖 波,王建春,王关嵩,邓朝霞,徐 静,钱桂生 (第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

摘 要:目的 观察脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)作用下大鼠肺泡Ⅱ型上皮(type Ⅱ alveolar epithelial,AT-Ⅱ)细胞过氧化物酶增殖体激活受体γ(PPARγ)的表达变化情况。**方法** 通过酶消化分离和免疫黏附法纯化原代培养AT-Ⅱ细胞,并进行碱性磷酸酶、肺表面活性物质相关蛋白A(SP-A)和电镜鉴定。采用RT-PCR法检测细胞经LPS作用后PPARγ、TNF-α、SP-A mRNA的改变,Western blot法检测LPS作用后细胞PPARγ表达,ELISA法检测TNF-α蛋白表达。**结果** 经碱性磷酸酶、SP-A和电镜鉴定,原代培养AT-Ⅱ细胞成功;在致炎因子LPS作用下,PPARγ mRNA和蛋白表达均下降,这一变化伴随炎性因子TNF-α的升高。**结论** 在LPS作用下,AT-Ⅱ细胞内PPARγ表达降低,提示PPARγ参与炎症反应。

关键词: 过氧化物酶增殖体激活受体γ;肺泡Ⅱ型上皮细胞;炎症

中图法分类号: R322.35;R345.46;R392.32 **文献标识码:** A

LPS stimulation down-regulates PPARγ expression in rat type Ⅱ alveolar epithelial cells

XIAO Bo, WANG Jian-chun, WANG Guan-song, DENG Zhao-xia, XU Jing, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To determine the effect of LPS stimulation on the expression of PPARγ in rat type Ⅱ alveolar epithelial (AT-Ⅱ) cells. **Methods** Rat lung tissues were digested by trypsase and collagenase. AT-Ⅱ cells were isolated and purified by immuno-adherence, and then primarily cultured AT-Ⅱ cells were identified by alkaline phosphatase (AKP), pulmonary surfactant-associated protein A (SP-A) staining and electron microscopy. PPARγ, TNF-α and SP-A mRNA levels in AT-Ⅱ cells were assayed by RT-PCR after being activated by lipopolysaccharide (LPS) stimulation, while the PPARγ and TNF-α protein levels in culture supernatants were measured by Western blotting and ELISA respectively. **Results** Primary culture of rat AT-Ⅱ cells were successfully established as confirmed by the expression of AKP and SP-A and unltrastructural features. PPARγ expression in AT-Ⅱ cells were decreased when stimulated with LPS, which were accompanied by increased TNFα expression. **Conclusion** Pro-inflammatory substance LPS can markedly inhibit the expression of PPARγ in AT-Ⅱ cells, which could be involved in the loss of control of inflammation.

Key words: PPARγ; type Ⅱ alveolar epithelial cell; inflammation

过氧化物酶增殖体激活受体γ(PPARγ)是核受体超家族非类固醇激素受体中PPARs的一个亚型,广泛分布于机体内,其主要生理功能在于调节血脂、血糖代谢和细胞生长、分化,近年来研究发现其还具有抗炎作用而备受关注[1]。大鼠肺泡Ⅱ型上皮(type Ⅱ alveolar epithelial,AT-Ⅱ)细胞是急性肺损伤(ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发病过程中的主要受损细胞[2],但PPARγ在AT-Ⅱ细胞中的表达及其在炎症情况下变化少见研究报道。为此本实验通过用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激原代培养的AT-Ⅱ细胞作为体外炎症模型观察PPARγ的表达及变化情况,以期进一步探讨PPARγ在炎症及ALI/ARDS发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

成年清洁级雌性SD大鼠[质量合格证编号SYXK(渝)2007-002],体质量180~220 g,由第三军医大学实验动物中心

基金项目: 国家自然科学基金(30570808);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G083)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570808) and the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06G083)

作者简介: 肖 波,男,湖北省武汉市人,硕士,主治医师,主要从事急性肺损伤发病机制与防治方面的研究。E-mail:xiaobo421@yahoo.cn

通信作者: 王建春,电话:(023)68774603,E-mail:wjc@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2009-03-02;**修回日期:** 2009-03-30

提供。LPS(O111:B4,Sigma 公司),胎牛血清、DMEM F12 培养基和胰蛋白酶(HyClone 公司),胶原酶(Gibco 公司),DNA 酶Ⅰ、HEPES(Sigma 公司),PBS、大鼠 IgG(中杉金桥公司),BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒(碧云天公司),Trizol(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(升博公司),RIPA(申能博彩公司),SP-A 兔多克隆抗体(博士德公司),PPARγ 鼠单克隆抗体和 β-actin 鼠单克隆抗体(Santa Cruz 公司),FITC 荧光标记羊抗兔二抗(博奥森公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(中杉金桥公司),ECL 发光试剂(Amersham 公司),大鼠 TNF-α ELISA 检测试剂盒(晶美公司),其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2　AT-Ⅱ细胞原代培养

1.2.1　AT-Ⅱ细胞分离　　大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)麻醉和肝素 400 U/kg 抗凝,气管插管后放血处死动物。开胸后,用 0.01 mol/L PBS 50 ml 经右室流出道快速冲洗肺循环直至肺呈白色,整体取出心肺、气管移入超净台。经气管插管用 20 ml 溶液Ⅰ(140 mmol NaCl,5 mmol KCl,2.5 mmol磷酸氢钠缓冲液,10 mmol HEPES,6 mmol 葡萄糖,0.2 mmol EDTA,pH 7.4)灌洗肺 5 次左右至灌洗液清亮,再用 20 ml 溶液Ⅱ(溶液Ⅰ中加入 2.0 mmol $CaCl_2$,1.3 mmol $MgSO_4$)灌洗 2 次。将 0.125% 胰蛋白酶与 0.1% 胶原酶混合液 15 ml 经气管插管注入肺,37 ℃水浴消化 20 min,除去心脏、大气道及结缔组织,快速剪碎肺组织,加入 4 ml 胎牛血清灭活消化酶和 DNA 酶Ⅰ,分散细胞,补足溶液Ⅱ20 ml 倒入三角烧瓶,37 ℃水浴摇动(130 次/min × 5 min),以 100、200 目滤网顺序过滤,400 × g 离心 10 min,弃上清,用 DMEM F12 培养基重悬细胞待提纯。

1.2.2　AT-Ⅱ细胞纯化　　将细胞悬液加入已用大鼠 IgG 包被的培养皿中培养 3 h,以去除巨噬细胞和淋巴细胞。吸取未贴壁细胞以 400 × g 离心 10 min,含 10% 胎牛血清的 DMEM F12 培养基重悬细胞,行台盼蓝染色检测细胞存活率。细胞计数后以(1.0 ~ 3.0) × 10^6 ml^{-1}的细胞数接种至 35 mm 培养皿中,在 37 ℃、5% CO_2条件下培养 24 h 后换液并去除不贴壁的细胞,并在此后的 14 d 连续观察细胞生长状态,选取其生长典型时段照相记录。

1.3　AT-Ⅱ细胞鉴定

1.3.1　碱性磷酸酶染色鉴定　　取出培养有 AT-Ⅱ的细胞爬片,TBS 冲洗后 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,TBS 冲洗后待标本风干,将配制好的 BCIP/NBT 显色液加至标本上,室温避光显色 2 ~ 5 min,水洗后酒精梯度脱水,二甲苯透明后中性树脂封片。

1.3.2　透射电镜观察　　纯化细胞悬液,经离心沉淀后用 2.5% 戊二醛固定,0.1 mol/L PBS 漂洗后用 1% 锇酸固定,丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋,半薄切片定位后超薄切片,铀染、铅染后透射电镜观察。

1.3.3　免疫荧光鉴定细胞 SP-A 的表达　取培养 3 d 的细胞爬片,常规固定、透化、封闭、洗涤,抗 SP-A 抗体(1∶50)4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤后用 FITC 荧光标记的二抗(1∶200),37 ℃孵育 60 min,PBS 洗涤后缓冲甘油封片,荧光显微镜观察。同时设无一抗孵育组作对照。

1.4　实验分组

实验分 2 组:LPS 组,加入 LPS(10 μg/ml)作用 6 h;对照组,于培养基中加入与 LPS 等量的 PBS 作对照。在光镜下观察相应的细胞形态改变。

1.5　RT-PCR 检测 AT-Ⅱ细胞 PPARγ、SP-A、TNF-α mRNA 的表达

1.5.1　总 RNA 提取　　体外培养 3 d 的 AT-Ⅱ细胞到作用时间点后,弃培养基,PBS 洗涤后加入 1 ml Trizol 裂解液中充分裂解,4 ℃,12 000 × g 离心 15 min,向上清中加入 0.2 ml 氯仿,振荡混匀后 4 ℃,12 000 × g 离心 15 min,取上清,0.5 ml 异丙醇沉淀,静置 10 min 后 4 ℃,12 000 × g 离心 10 min,沉淀用预冷的 1 ml 75% 乙醇洗涤,晾干后溶于 20 ~ 30 μl DEPC 水中。得到的总 RNA 在紫外光分光光度计下测其浓度。

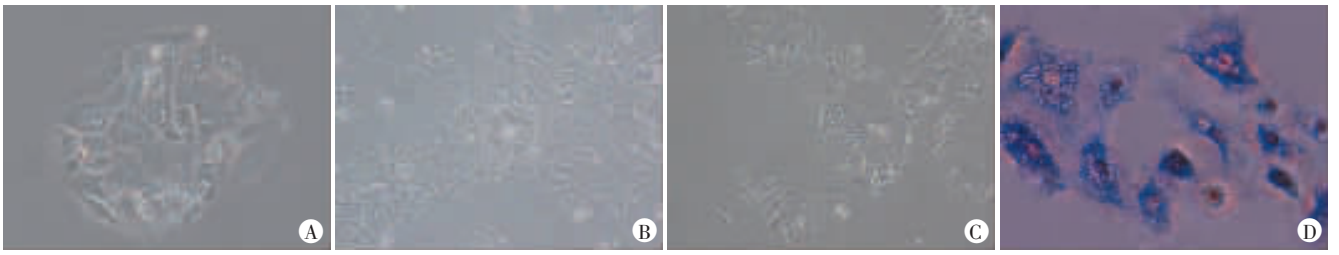
1.5.2　RT-PCR　　取各组 1 μg 总 RNA 为模板行逆转录反应,反应体系参照试剂盒说明书,反应条件:先室温 10 min,然后 42 ℃45 min,95 ℃5 min,最后 4 ℃ 10 min,合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增。以此为模板分别用 PPARγ、TNF-α、SP-A 和 β-actin 引物经 PCR 法进行扩增:先 94 ℃变性 5 min;然后 94 ℃变性 30 s,退火 45 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环。上述引物均根据 GenBank 上 PPARγ、TNF-α、SP-A 和 β-actin 序列,用 Primer3 在线引物设计软件设计,由上海英骏公司合成,引物序列及反应条件见表 1。反应完毕后将扩增产物各取 5 μl 行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,所得到的电泳条带用凝胶成像仪扫描成像。用 Quantity One 软件测定各条带积分光密度值,以 β-actin 的 RT-PCR 产物为内参照,以目的片段与 β-actin 片段的条带光密度比值作为各组 PPARγ、TNF-α、SP-A mRNA 的相对量进行比较。

表 1　目的基因的引物序列及反应条件

基因名称	引物序列	目的片段长度	退火温度
PPARγ	上游:5′-TTTACCACGGTTGATTTCTC-3′	319 bp	53 ℃
	下游:5′-GCTTCAATCGGATGGTTCTT-3′		
TNF-α	上游:5′-CTTCTGTCTACTGAACTTCGG-3′	380 bp	55 ℃
	下游:5′-GTGCTTGATCTGTTGTTTCC-3′		
SP-A	上游:5′-AGATTCTGCAAACAATGGGAGT-3′	359 bp	57 ℃
	下游:5′-CCTATCATTCCATGTCCCATCT-3′		
β-actin	上游:5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAG-3′	241 bp	62 ℃
	下游:5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′		

1.6　Western blot 检测细胞 PPARγ 蛋白表达

按 RIPA 说明书步骤分别提取各组培养 3 d 的 AT-Ⅱ细胞总蛋白,采用 Bradfard 法测定蛋白浓度。将所提取各组的总蛋白 20 μg 进行 10% SDS-PAGE 电泳 2 h,再行半干转转至 PVDF 膜上(恒流 5 mA/cm^2转移 60 min),TBST 洗膜后 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入一抗 PPARγ 鼠单克隆抗体(1∶400)和一抗 β-actin 鼠单克隆抗体(1∶500),4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜后与稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠二抗(1∶5 000)孵育 1 h,TBST 洗膜后加入 ECL 发光显色剂,室温避光孵育 5 min 后在 G-Box 扫描仪上行 CCD 扫描成像行条带分析。用 Quantity One 软件测定各条带积分光密度值,以 β-actin 的条带为内参照,以 PPARγ 片段与 β-actin 片段的条带光密度比值作为各组 PPARγ



A:培养2 d; B:培养4 d; C:培养7 d; D:培养2 d碱性磷酸酶染色

图1 原代培养的大鼠AT-Ⅱ细胞的光镜观察 (×100)

的相对量进行比较。

1.7 ELISA法检测细胞培养上清液中TNF-α蛋白含量

待各组到作用时间点后收集细胞的培养液,离心后取上清液,按照ELISA试剂盒内操作说明进行操作,显色后经自动酶标仪读数,参照标准曲线换算为浓度。

1.8 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件SPSS 13.0行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 AT-Ⅱ细胞原代培养结果

2.1.1 细胞产量和纯度 每只大鼠肺组织经酶消化分离、纯化贴壁后可获AT-Ⅱ细胞$(6.0 \pm 1.6) \times 10^6$($n=18$),碱性磷酸酶染色显示纯度为$(88.0 \pm 3.6)\%$ ($n=5$),台盼蓝染色检测细胞的活力为$(95 \pm 3)\%$ ($n=18$)。

2.1.2 光镜观察 结果见图1。体外培养的大鼠AT-Ⅱ细胞24 h后大量贴壁,但细胞仍呈圆形。36~48 h细胞呈岛状生长,并逐渐伸展连接成细胞单层,细胞核圆形,细胞质着色浅,呈泡沫状,细胞质内可见大量反差明显的特征性颗粒,碱性磷酸酶染色见反应产物呈深蓝色。LPS刺激后细胞较对照组稍显肿胀,颜色变暗,贴壁欠佳。大约4 d后细胞大量生长,但细胞内颗粒开始减少,7 d后细胞形态发生变化,胞体变大、伸展,细胞内颗粒逐渐减少甚至消失,并且部分细胞开始脱落。14 d后细胞完全伸展,细胞内颗粒消失,已失去AT-Ⅱ细胞的形态特征。

2.1.3 透射电镜观察 电镜下见分离纯化后的大鼠AT-Ⅱ细胞形态较规则,细胞核明显,细胞质内含有多个同心圆或平行排列的板层状结构即特征性的嗜锇小体。见图2。

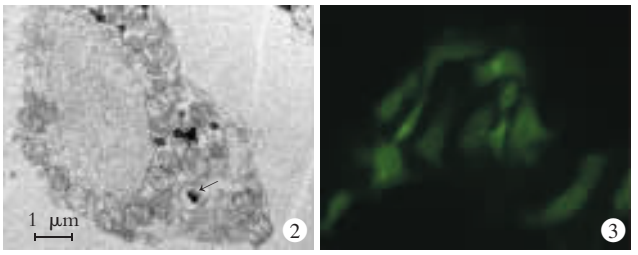


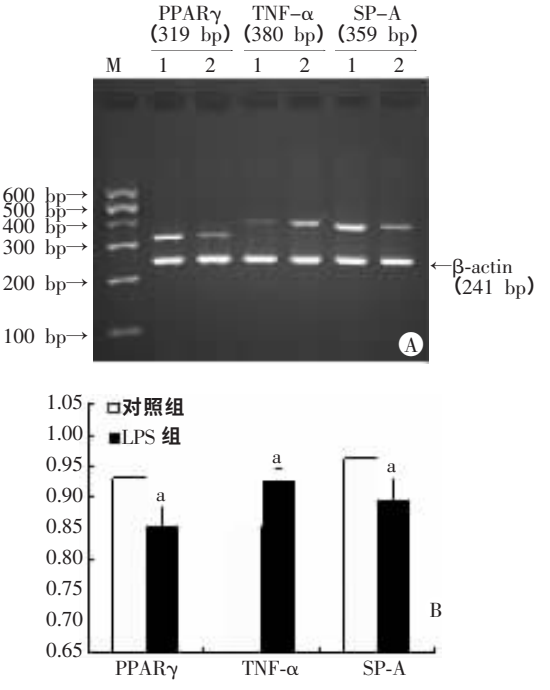
图2 原代培养大鼠AT-Ⅱ细胞超微结构观察 (TEM) ↑:嗜锇小体

图3 免疫荧光检测原代培养大鼠AT-Ⅱ细胞SP-A蛋白的表达 (荧光显微镜×100)

2.1.4 免疫细胞荧光结果 荧光显微镜下可见所培养的细胞经特异性标记物SP-A免疫荧光染色后,细胞质内呈现绿色荧光,提示该细胞表达SP-A蛋白。见图3。

2.2 RT-PCR结果

图4显示半定量RT-PCR检测PPARγ、TNF-α、SP-A mRNA表达的结果。与对照组比较,LPS作用后PPARγ、SP-A mRNA表达降低($P<0.05$);而炎性因子TNF-α mRNA表达显著升高($P<0.05$)。



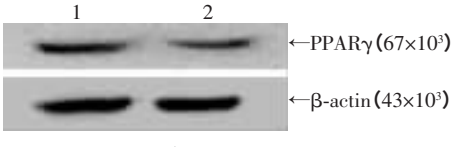
A:电泳结果 M:DNA标准;1:对照组;2:LPS组

B:定量分析结果 a: $P<0.05$,与对照组比较

图4 RT-PCR检测细胞PPARγ、TNF-α、SP-A mRNA的表达

2.3 Western blot检测结果

Western blot结果显示LPS作用细胞后,PPARγ对比对照组表达明显减少($P<0.05$)。见图5。



1:对照组;2:LPS组

图5 Western blot检测细胞PPARγ蛋白表达

2.4　细胞培养上清液中 TNF-α 的 ELISA 结果

ELISA 结果显示,LPS 作用细胞后,细胞培养上清液炎性因子 TNF-α 蛋白[(108.21 ± 24.56) pg/ml]较对照组[(21.09 ± 4.27) pg/ml]明显升高($P < 0.05$)。

3　讨论

PPARs 是核受体超家族非类固醇激素受体中一员,具有进化上保守性,普遍存在于各个物种,目前发现有 3 种亚型:PPARα、PPARβ 和 PPARγ,三者在组织中的分布和表达及生理功能不尽相同,其中以 PPARγ 与机体生理关系最密切。PPARγ 在机体内广泛分布,于脂肪组织和免疫细胞表达尤高,参与脂类代谢、糖代谢、细胞生长、分化与凋亡等多种生理反应的调节。近来研究显示 PPARγ 与炎症调控关系非常密切[1,3]:活化的 PPARγ 可通过蛋白间直接作用或竞争其他信号通路也必需的辅助活化因子等,调节 NF-κB、AP-1 等通路活性,进而抑制单核/巨噬细胞、中性粒细胞等产生 TNF-α 等炎性介质,抑制局部组织炎症。此外活化的 PPARγ 还可抑制免疫细胞增殖、分化和促进其凋亡,在机体中发挥抗炎作用。

目前认为 ALI 本质为炎症,为机体炎症反应和抗炎反应失衡,出现的过度炎症反应所导致[4],肺泡上皮细胞的损伤是 ALI 的一个重要病理改变。肺泡上皮细胞包括肺泡Ⅰ型上皮细胞和 AT-Ⅱ细胞,AT-Ⅱ细胞在肺泡损失时可分裂增殖并转化为肺泡Ⅰ型上皮细胞,对肺泡壁的损伤起修复作用,并由此被认为是肺泡上皮的干细胞[5]。AT-Ⅱ细胞还可合成与分泌表面活性物质,通过改善肺顺应性来维持肺泡结构的稳定。此外还可合成和分泌 TNF-α、前列腺素($PEGE_2$ 和 $PEGI_2$)等炎性介质,在调控肺内炎症和免疫反应中发挥重要作用[6]。

体外培养的 AT-Ⅱ细胞生物学特性较特殊,分离约 7 d 后细胞形态功能逐渐发生变化,且不能传代,原代培养难度较大。目前酶消化法分离 AT-Ⅱ细胞较为普遍[7],本实验采用低浓度胰蛋白酶和胶原酶联合消化,来获取所需的 AT-Ⅱ细胞,并采用免疫黏附选择法对分离的细胞悬液进行纯化。由于大多数的非 AT-Ⅱ细胞如巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞等细胞膜的表面含有免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段受体,将分离得到的细胞悬液培养于包被有 IgG 的培养皿中,有 Fc 段受体的巨噬细胞等细胞被粘附,而无 Fc 段受体的 AT-Ⅱ细胞得以洗脱而被纯化[8]。另外用滤网可滤去肺泡Ⅰ型上皮细胞。通过此法可获得产量和纯度均高的 AT-Ⅱ细胞。电镜观察细胞内存在特征性的板层小体是目前鉴定 AT-Ⅱ细胞最好的方法。而碱性磷酸酶是 AT-Ⅱ细胞分化的标志物,通过光镜观察细胞内碱性磷酸酶活性,方法成熟,操作简便,在鉴定 AT-Ⅱ细胞中具有较高的实用价值。SP-A 是肺表面活性物质的主要成分,也是 AT-Ⅱ细胞重要的免疫标记物。本实验通过碱性磷酸酶、SP-A 和电镜鉴定原代培养 AT-Ⅱ细胞成功。

本研究结果显示 PPARγ 在体外培养的 AT-Ⅱ细胞中有较高表达。基于革兰阴性细菌所引起的感染是引起 ALI/ARDS 最常见的原因之一,我们选择 LPS 作用 AT-Ⅱ细胞复制了细胞的炎症模型进行研究。本实验证实在致炎因素 LPS 作用下,AT-Ⅱ细胞内炎性因子 TNF-α 释放大量增加的同时,伴有 PPARγ 表达的下降。TNF-α 是一类具有多种生物学效应的重要的细胞因子,具有广泛的促炎活性,且参与炎症反应的“瀑布效应”,在组织和细胞炎症损伤中有着重要的作用[9]。由于 LPS 促进 AT-Ⅱ细胞中致炎因子 TNF-α 表达和下调 PPARγ mRNA 和蛋白表达,提示 PPARγ 可能参与了细胞的炎症反应,PPARγ 在炎症过程中水平上调有可能对抗 LPS 的致伤作用,是潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] Von-Knethen A, Soller M, Brune B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007, 55(1): 19 – 25.

[2] Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited[J]. Respir Res, 2001, 2(1): 33 – 46.

[3] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, *et al*. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 483(1): 79 – 93.

[4] Qian G S. Research progress in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Int Rev Allergy Clin Immunol, 2002, 8(2): 62 – 66.

[5] Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, *et al*. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury[J]. Respirology, 2006, 11(Suppl): S28 – S31.

[6] Mason R J. Biology of alveolar type II cells[J]. Respirology, 2006, 11(Suppl): S12 – S15.

[7] 周　莉, 金克炜. 肺泡Ⅱ型上皮细胞及其分离鉴定与原代培养[J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(3): 236 – 238.

[8] 郝　嘉, 李永旺, 肖颖彬. 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(5): 500 – 501.

[9] 张　青, 李　琦, 毛宝龄, 等. 急性呼吸窘迫综合征患者血浆 TNF-α、IL-6、IL-10 和 IL-13 水平变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 24(12): 2479 – 2480.

(编辑　王小寒)