基础研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0686-03

不同体积分数氧对胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外生长状态的影响

李 祝,方 芳,冉迎春,敖晓晓,姚 兰,许 峰
(重庆医科大学附属儿童医院重症监护室儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨不同氧体积分数状态下,胎鼠原代肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar type Ⅱ epithelial cell,AECⅡ)体外生长状态的变化。方法:原代培养胎鼠AECⅡ并用电镜鉴定;建立氧体积分数0.95组(95% O_2)、氧体积分数0.4组(40%O_2)和空气组(21%O_2)3种氧化损伤性细胞模型,各自暴露12、24 h和48 h;用倒置相差显微镜观察各组细胞的形态变化;四甲基偶氮唑盐反应比色法(MTT法)检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞内活性氧(Reactive oxygen species,ROS)浓度。结果:与空气组相比,氧体积分数0.4组在12、24 h存活率和凋亡率均无统计学差异,但48 h后出现统计学差异,ROS在24 h即出现统计学差异;氧体积分数0.95组每组均和空气组有统计学差异。此外,氧体积分数0.4组细胞的形态变化较氧体积分数0.95组损伤轻,但仍重于空气组。结论:体外40%O_2的氧刺激在超过48 h以后,AECⅡ也会出现相应的氧化损伤。

【关键词】氧化应激;肺泡Ⅱ型上皮细胞;高氧;活性氧
【中国图书分类法分类号】R322.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-17

Effects of different state of oxidative stress on the fetal rat alveolar type Ⅱ epithelial cells in vitro

LI Zhu, FANG Fang, RAN Ying-chun, AO Xiao-xiao, YAO Lan, XU Feng
(*Pediatrics Intensive Care Unit, Chongqing Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate effects of different state of oxidative stress on fetal rats alveolar type Ⅱ epithelial cells(AECⅡ)cultured in vitro. *Methods*: AECⅡ were primarily cultured; then randomly divided into three groups of oxidative damage with the oxygen concentration 0.95(95% O_2), 0.4(40% O_2)and room air(21% O_2). Each group was exposed for 12, 24 h and 48 h respectively. Then cell morphological change was observed by inverted microscope; and cell survival rate was determined by MTT assay, apoptosis rate and intracellular reactiveosygenspecies (ROS)concentration were determined by flow cytometry. *Results*: Compared to room air group, survival rate and apoptosis rate of oxygen concentration 0.4 group were not significantly diferent after 12 h and 24 h exposure, but the differences were significant after 48 h exposure, and ROS was significantly different after 24 h exposure; there were significant differences between oxyren concentration 0.95 group and roon air group at three time points. In addition, the morphological change of cells in oxygen concentration 0.4 group was less damage than those in oxygen concentration 0.95 group, but still heavier than those in room air group. *Conclusion*: After stimulation by 40%O_2 over 48 h in vitro, corresponding oxidative damage would also appear in AECⅡ.

【Key words】oxidative stress; AECⅡ; hyperoxia; reactive oxygen species(ROS)

氧疗是临床上治疗低氧血症的重要手段[1],但长时间的高浓度氧暴露会导致氧自由基及其衍生物在肺组织的产生,一旦超过机体的代偿极限,将引起高氧性肺损伤[2]。

大量研究表明,肺损伤的修复完全依赖AECⅡ的增殖和分化。AECⅡ的增殖和分化不仅可以修复肺泡的正常结构,更可以有效地进行功能的修复,AECⅡ可以看做是肺泡的干细胞[3,4]。

作者介绍:李 祝(1985-),女,硕士,
研究方向:高氧肺损伤。
通信作者:许 峰,男,教授,Email:xufeng9899@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30670931)。

目前对于氧体积分数0.5(50%O_2)以上的浓度造成的肺损伤已经被许多实验证实[5,6],本文针对临床上常用氧体积分数0.4(40%)为研究点、作用于原代培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar type Ⅱ epithelial cell,AECⅡ),并与氧体积分数0.95组(95%)和空气组(21%)进行比较,探讨AECⅡ的生长和凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级SD成年大鼠购自重庆医科大学实验动物中心;胰蛋白酶(美国BBI公司);*DNase* Ⅰ(北京鼎国生物技术有限

责任公司）；胶原酶Ⅰ（美国 sigma 公司）；DMEM/F12 培养基（美国 Gibco 公司）；特级胎牛血清（天津 TBD 公司）；MTT（美国 Amresco 公司）；DMSO（美国 sigma 公司）；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒（美国 BD Biosciences Phamingen 公司）；DCFH-DA 分子探针（上海碧云天生物技术有限公司）；倒置显微镜（Nikon TE2000-U）。

1.2 方法

1.2.1 早产鼠 AECⅡ的分离、培养 成年 SD 大鼠，雌雄按 1:1 合笼交配，找到阴栓日计为妊娠第 1 天。取孕 19 d 胎鼠，参照文献方法[7]，分离 AECⅡ。步骤如下：水合氯醛麻醉孕 19 天大鼠，剖宫取出胎鼠分离胎肺，分离气管等非肺组织后剪至 1 mm^3 大小，胰酶消化 20~25 min。筛网过滤，滤液离心后弃上清，加入 10%胶原酶Ⅰ消化 20~30 min 后离心，完全培养基（DMEM/F12+10%FBS）重悬，接种至培养瓶 30 min 后贴壁的为成纤维细胞，未贴壁的为 AECⅡ，吸出离心后接种至新的培养瓶。如此反复贴壁 3 次，以纯化 AECⅡ。最后未贴壁的细胞按浓度 1.5×10^6 个/ml 接种至 6 孔培养板，培养 24 h 后弃除未贴壁的细胞，此时贴附在瓶底的细胞即为 AECⅡ细胞。改良巴式染色法纯度>95%，台盼蓝拒染法测定细胞活率>85%。

倾掉孔内培养液，冰冷 PBS 洗 2 次。胰酶消化后加入含血清的 PBS 缓冲液，吹打至镜下观察粘附细胞基本脱落。收集细胞悬液离心后加入 0.4%戊二醛溶液，4℃下固定，2 h 后换成 1 mol/L PBS 缓冲液。丙酮脱水、环氧树脂包埋、超薄切片和醋酸枸橼酸电子双重染色等处理程序后制备为电镜细胞标本。透射电镜下观察寻找 AECⅡ特征性结构——嗜锇性板层小体和微绒毛结构。

1.2.3 高氧损伤模型建立及实验分组 AECⅡ接种培养 24 h 后换液，随机分为 3 组：①空气组：细胞在含 5%CO_2 细胞培养箱；②氧体积分数 0.95 组：细胞在含 95%浓度的 O_2 中培养；③氧体积分数 0.4 组：细胞在含 40% O_2 中培养。后两组细胞置于密闭氧仓，分别通入 95%O_2、5%CO_2 的混合气体和 40%O_2、5%CO_2、55%N_2 的混合气体。培养 12，24 h 和 48 h 后检测。

1.2.4 MTT 法检测细胞存活 细胞以 1×10^6 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μl，空气组、氧体积分数 0.4 组和氧体积分数>0.95 组各 4 复孔，培养 12，24，48 h。各组细胞培养处理所需时间后，吸去孔内液体，加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl/孔和培养基 180 μl/孔，反应 4 h 后，快速去除培养液，每孔加入二甲亚砜（DMSO）150 μl，振荡器作用 10 min 混匀，多功能酶标仪检测 492 nm 吸光度（A_{492}），空白孔调零。A_{492} 值越高表示活细胞越多。细胞存活率计算公式：细胞存活率=处理孔 A_{492}/对照孔 $A_{492}\times100\%$。

1.2.5 Annexin Ⅴ/PI 双标记法检测 AECⅡ凋亡 消化并收集各组贴壁细胞，PBS 洗 2 次，重悬于结合液（10 mmHepes/NaOH，pH7.4，140 mm NaCl，2.5 mmol/L$CaCl_2$）中，吹打成单细胞悬液。取细胞悬液与 Annexin Ⅴ-FITC 及 PI 于室温下黑暗处孵育 15 min，流式细胞仪（FACScalibur，BD 公司）检测，cellquest 分析软件进行分析。

1.2.6 细胞内活性氧检测（DCFH-DA 分子探针法） 细胞以 1×10^6 个/ml 浓度接种于 6 孔细胞培养板中，不同氧气刺激处理相应时间后，去除细胞培养液，加入用无血清培养液按 1:1 000 稀释好的 DCFH-DA 1 ml，37℃孵育 20 min，流式细胞仪检测各组细胞的荧光强弱，激发波长 488 nm，发射波长 525 nm。

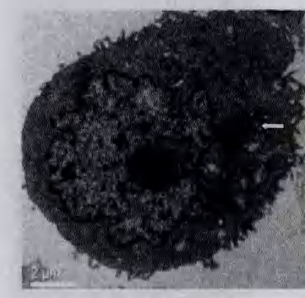
1.3 统计学处理

用 SPSS17.0 计算机统计软件重复测量资料方差分析实验数据。

2 结 果

2.1 电镜鉴定细胞

透射电镜下可见 AECⅡ细胞体积较大，细胞质中分布有 AECⅡ细胞特征性结构－板层小体，呈“洋葱皮”状，细胞膜上有明显微绒毛（图 1）。



⇦ 为板层小体

图 1 AECⅡ电镜照片（×7 000）

2.2 倒置显微镜观察高氧暴露对各组 AECⅡ形态学变化。

空气组 AECⅡ早期呈岛状生长，细胞之间连接紧密，胞核大深染，偶尔可见分裂相。随着时间的延长，细胞间隙增大，胞浆颜色变淡，板层小体减少，核周和胞浆出现空泡。

氧体积分数＞0.95 组暴露 12、24 h，上述结构变化更明显，部分细胞肿胀，胞内空泡明显，局部出现细胞皱缩和核周透明带，死亡漂浮细胞增多。暴露 48 h 后，可见较多的细胞碎片以及漂浮细胞，贴壁细胞基本失去正常结构。

氧体积分数 0.4 组同时间点细胞变化表现在两者之间（图 2）。

2.3 高氧暴露对各组 AECⅡ存活和凋亡的影响

在存活率方面：与空气组比较，氧体积分数 0.95 组在12、24、48 h 其存活率明显降低（$P<0.05$）。

与空气组比较，氧体积分数 0.4 组在 12、24 h 无统计学差异，48 h 其存活率明显降低（$P<0.05$）。

在凋亡率方面：与空气组比较，氧体积分数 0.95 组在 12、24、48 h 其早期凋亡率明显升高（$P<0.05$）。

与空气组比较，氧体积分数 0.4 组在 12、24 h 早期凋亡率无统计学差异，48 h 后其早期凋亡率明显升高（$P<0.05$）（表 1）。

2.4 高氧暴露后 AECⅡROS 水平变化

氧暴露 12 h 后，氧体积分数 0.95 组与空气组、氧体积分

表 1　不同时间各组 AEC Ⅱ 存活率和凋亡率变化($\bar{x} \pm s$,n=6)

时间	存活率(%)			早期凋亡率(%)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
空气	100.00 ± 0.000	87.09 ± 3.851[a]	71.17 ± 1.655[a]	4.35 ± 1.516	5.67 ± 0.3011	8.17 ± 1.479
40% O_2	93.87 ± 0.389	87.73 ± 4.505	65.74 ± 1.479[c]	4.46 ± 2.110	2.24 ± 1.256	28.33 ± 6.189[c]
95% O_2	67.64 ± 1.929[bc]	51.86 ± 6.724[bc]	37.99 ± 1.215[bc]	14.76 ± 2.265[bc]	25.28 ± 8.353[ab]	28.78 ± 6.681[c]
F	304.703	106.491	362.961	27.022	12.556	19.027

注：P<0.05，a，与空气 12 h 组比较；b，与同时间点氧体积分数 0.4 组相比；c，与同时间点空气组相比

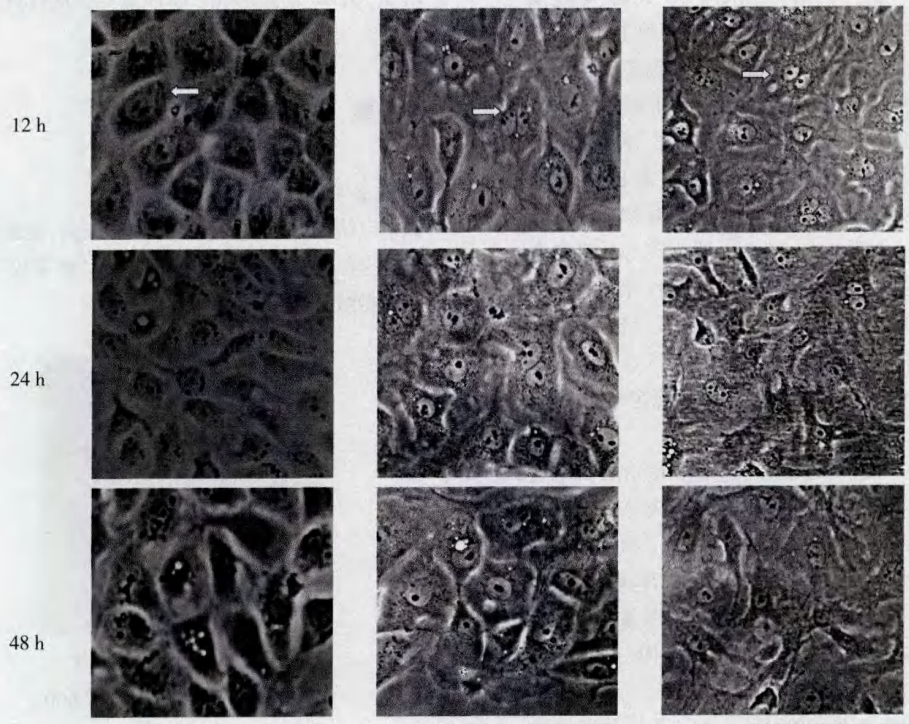


图 2　AEC Ⅱ 在不同体积分数氧暴露后细胞形态的变化（×200）

数 0.4 组相比，ROS 水平明显升高(P<0.05)，而氧体积分数 0.4 组与空气组之间则无明显差异；氧暴露 24 h 后，氧体积分数 0.4 组和氧体积分数 0.95 组与空气组相比均明显升高(P<0.05)，以氧体积分数 0.95 组最为明显(表 2)。

表 2　暴露 12、24 h 后各组细胞中 ROS 值($\bar{x} \pm s$,n=6)

时间	ROS	
	12 h	24 h
空气组	36.54 ± 2.338	95.57 ± 5.259
40% O_2 组	58.61 ± 10.217	204.24 ± 39.928[b]
95% O_2 组	321.14 ± 15.976[ab]	504.63 ± 30.982[ab]
F	625.927	154.805

注：P<0.05，a，与同时间点氧体积分数 0.4 组相比；b，与同时间点空气组相比

3　讨　论

高氧暴露可导致体内活性氧堆积，高水平的 ROS 对细胞蛋白质和 DNA 可造成不可逆的氧毒性损伤，加速细胞的损伤和死亡[8]。我们前期研究显示[2,6]，高氧所致的肺损伤在不同年龄阶段与不同吸氧分数及其所用时间密切相关[9]。氧疗作为一种治疗急性缺氧性疾病在临床使用相当普遍[10]。然而高浓度氧暴露又可导致急性肺损伤，因此临床上在保证血气正常情况下，尽量以低浓度短时间的氧使用为主[11]。但国际上对于具体的吸氧分数和使用时间，还没有一个明确的指标[12-14]。

本课题选用临床上氧疗常用的浓度 40%O_2[15,16]为实验条件，并与空气组和高氧分数(0.95 组)比较。结果表明，氧体积分数 0.4 组在细胞的形态变化，存活率和凋亡率等方面均优于氧体积分数 0.95 组，但随着暴露的时间延长，氧体积分数 0.4 组的氧化损伤程度随之加重，累计到 48 h 后与空气中的生长情况出现统计学差异。

本实验表明随着时间的延长，空气组、氧体积分数 0.4组和氧体积分数 0.95 组的 ROS 水平均有不同程度的升高。氧体积分数 0.95 组在 12 h 和 24 h 均明显高于氧体积分数 0.4 组和空气组，氧体积分数 0.4 组在 12 h 内与空气组无明显差异，但超过 24 h 后较空气组明显增加。因此随着氧化应激时间的延长，即使较低浓度的氧气刺激，在超过 48 h 以后也会出现相应的氧化损伤。本实验仍是体外细胞水平研究，不能

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0689-04

外源性 D- 核糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

马林峰，杨双强，杨庆军
（重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨外源性 D-核糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法：24 只 SD 大鼠随机分成假手术组、缺血再灌注(Ischemia/reperfusion，I/R)组、D-核糖组。假手术组：只予以左冠状动脉前降支穿线不结扎；I/R 组：左冠状动脉前降支结扎 30 min，再灌注 120 min；D-核糖组：左冠状动脉前降支穿线前 30 min，给予尾静脉缓慢推注 D-核糖，余操作同 I/R 组。各组术毕取结扎处远端左心室游离壁心肌组织备用。RT-PCR 检测心肌中细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物-1(Cytokine-induced neutrophil chemoattractant properties 1，CINC-1)mRNA，ELISA 检测髓过氧化物酶(Myeloperoxidase，MPO)，Western blot 检测核因子-κB(Nuclear factor-κB，NF-κB)，HE 染色观察心肌病理改变。结果：与假手术组相比，D-核糖组、I/R 组 CINC-1mRNA 的表达量，NF-κB 和 MPO 的量均明显增高($P<0.05$)，心肌组织病理学变化明显加重，中性粒细胞浸润明显增多。与 I/R 组相比，D-核糖组 CINC-1mRNA 的表达量，NF-κB 和 MPO 的量又明显减少($P<0.05$)，心肌组织病理学变化明显减轻，中性粒细胞浸润明显减少。结论：外源性 D-核糖对 SD 大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用，其作用机制可能与减少心肌组织中 NF-κB 的含量，降低心肌组织 CINC-1mRNA 的表达，减少心肌中 MPO 含量，减少心肌组织中性粒细胞浸润有关。

作者介绍：马林峰(1986-)，男，硕士，
研究方向：心肌保护。
通信作者：杨双强，男，教授，Email：yysqiang@163.com。

反应细胞在体内所受到的其他来自神经体液等各方面的影响，其结果还有待于进一步研究观察。

参 考 文 献

[1] Askie L M，Henderson-Smart D J，ko H.Restricted versus liberal oxygen exposure for preventing morbidity and mortality in preterm or low birth weight infants[J].Cochrane Database Syst Rev，2009，(1)：CD001077.

[2] Wu C Y，Yue F，Li M，*et al*.*Effects of hyperoxia on inflammatory response in lung of infantile rats*[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2010，22(7)：389-392.

[3] Hengartner M O.The biochemistry of apoptosis[J].Nature，2000，407(6805)：770-776.

[4] Shi X，Zhang H，Xiong S.Primary culture of alveolar epithelial type Ⅱ cells and its bionomic study[J].Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci，2007，27(6)：653-656.

[5] Masood A，Belcastro R，Li J，et al.A peroxynitrite decomposition catalyst prevents 60% O_2-mediated rat chronic neonatal lung injury[J].Free Radic Biol Med，2010，49(7)：1182-1191.

[6] Fu H M，Xu F，Liv C J，et al.Influence of 60% oxygen inhalation on type Ⅱ alveolar epithelial cells and protective role of calcitonin gene-related peptide from their damage induced in premature rat[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2008，20(10)：578-581.

[7] 付红敏，许 峰，黄 波，等.胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离和原代培养[J].重庆医科大学学报，2009，34(5)：586-589.

[8] Feng G，Wang Z G.Screening and cloning of susceptible genes related to acute lung injury[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2003，15(6)：372-375.

[9] Liu H C，Chang L W，Rong Z H，et al.Relation of insulin-like growth factor binding protein-2 with hyperoxia-induced lung injury in term and premature neonatal rats[J].Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue，2008，20(6)：331-334.

[10] Saugstad O D.Why are we still using oxygen to resuscitate term infants[J]?Perinatol，2010，30(Suppl)：46-50.

[11] Lanka K，Cummings J J.Initiating preterm resuscitation with less than 100% oxygen[J].Perinatol，2010，30(5)：366.

[12] Saugstad O D，Ramji S，Vento M，et al.Oxygen for newborn resuscitation：how much is enough[J]?Pediatrics，2006，118(2)：789-792.

[13] Kbar F A，Campbell I A.Oxygen therapy in hospitalized patients：the *impact of local guidelines*[J].Eval Clin Pract，2006，12(1)：31-36.

[14] Wang C L，Anderson C，Leone T A，et al.Resuscitation of preterm neonates by using room air or 100% oxygen[J].Pediatrics，2008，121(6)：1083-1089.

[15] Roberts D，Wacogne I.Question 3 In patients with spontaneous pneumothorax，does treatment with oxygen increase resolution rate [J]?Arch Dis Child，2010，95(5)：397-398.

[16] Oh S，Lee E，Lim Y，et al.Comparison of the effects of 40% oxygen and two atmospheric absolute air pressure conditions on stress-induced premature senescence of normal human diploid fibroblasts[J].Cell Stress Chaperones，2008，13(4)：447-458.

（责任编辑：关蕴良）