DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.023
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1179-03

论著

N-乙酰半胱氨酸保护大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外实验研究

黄 恩[1],刘晓岚[1],罗艳梅[1],杨 忠[2] ([1]解放军第324医院药剂科,重庆 400020;[2]第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 通过体外实验研究N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine,NAC)对肺泡Ⅱ型上皮细胞的保护作用。方法 原代培养大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar epithelial type Ⅱ,AT-Ⅱ),以AT-Ⅱ培养液中加入多形核中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophils,PMNs)激活后的上清液为实验模型,通过测定AT-Ⅱ脱落率、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,AKP)活性及培养液丙二醛(Malonyldialdehyde,MDA)、白介素8(Interleukin-8,IL-8)含量,观察NAC对AT-Ⅱ的保护作用。结果 NAC使AT-Ⅱ脱落率增加趋势、AKP活性降低趋势减小,培养液上清中MDA和IL-8含量增加趋势减小。结论 NAC能减轻PMNs激活对培养AT-Ⅱ损伤的程度。

关键词:肺泡上皮;中性粒细胞;细胞培养;N-乙酰半胱氨酸
中图法分类号:R322.35;R914.4;R977.4 文献标识码:A

Protective effect of N-acetylcysteine on alveolar epithelial type Ⅱ cells *in vitro*

HUANG En, LIU Xiao-lan, LUO Yan-mei, YANG Zhong (Department of Pharmacy, No. 324 Hospital of People's Liberation Army of China, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To explore the effect of N-acetylcysteine on alveolar epithelial type Ⅱ (AT-Ⅱ) cells cocultured with activated neutrophil supernatant. Methods AT-Ⅱ cells were cocultured with activated neutrophil supernatant. The effect of N-acctyleysteine(NAC) on AT-Ⅱ cells was studied through detecting the shedding rate, alkaline phosphatase (AKP) expression in AT-Ⅱ cells and the changes of MDA and IL-8 in cultural supernatant. Results The shedding rate of AT-Ⅱ, the content of MDA and IL-8 were increased rapidly when adding activated neutrophil supernatant, while AKP synthesis decreased. NAC reduced the trend of these changes. Conclusion NAC can reduce the injury of AT-Ⅱ cells induced by activated neutrophil supernatant *in vitro*.

Key words: alveolar epithelial; neutrophil; cell culture; N-acetylcysteine

多形核中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophils,PMNs)在肺内扣押、释放炎性介质损伤肺细胞,是急性肺损伤的重要致伤机制。肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar epithelial type Ⅱ,AT-Ⅱ)不仅通过分泌肺表面活性物质稳定肺泡张力,也参与损伤后肺部的免疫和防御反应。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine,NAC)是一种抗氧化剂,也是一种巯基供给剂,它的分子量较小,易进入细胞[1]。多种研究表明,NAC对肝、肾、肠等脏器损伤具有保护作用。本研究以AT-Ⅱ培养液中加入PMNs激活后的上清液为模型,观察NAC对AT-Ⅱ的作用,以为NAC用于急性肺损伤的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 PMNs分离培养和激活

参照文献[2]方法进行。成年Wistar大鼠颈动脉插管采血,Hanks液(含5%小牛血清)两倍稀释后加在淋巴细胞分离液层面上,1 000 r/min离心8 min,吸弃上层血浆和单个核白细胞,向下层粒细胞和红细胞中加入5倍体积的红细胞溶解液,0 ℃溶解15 min后800 r/min离心10 min,Hanks液洗2次后弃上清,RPM1640(含10%小牛血清)重悬,测细胞浓度1×10^{6}个/ml,涂片染色分类计数PMNs纯度(92.8±2.59)%,台盼蓝染色活细胞计数(95.2±2.17)%。

作者简介:黄 恩(1963-),男,重庆市人,硕士,主管药师,主要从事药物药理学方面的研究。电话:(023)67710025

收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-08-20

100 mg酵母多糖(Sigma,USA)加适量生理盐水隔水煮沸20 min,与正常大鼠血清调理,配成悬液(10 g/L)。将酵母多糖悬液和PMNs悬液混合(1∶1),孵育30 min后(37 ℃)1 000 r/min离心10 min,收集上清液,-70 ℃保存[3]。

1.2 原代培养大鼠AT-Ⅱ

按文献[4]介绍的方法,将获取的AT-Ⅱ用RPM1640重悬后加入培养皿,24 h后换培养液,观察细胞形态变化。

1.3 实验分组及方法

本实验设正常对照组(对照组,与培养液1∶1体积比加入无血清培养基)、损伤实验组[5](损伤组,与培养液1∶1体积比加入含激活PMNs培养上清液的无血清培养基)、NAC组(与培养液1∶1体积比加入含激活PMNs培养上清液的无血清培养基,后者NAC含量[6]为2.0 mmol/L,NAC购自Sigma)。以上各组AT-Ⅱ细胞浓度为5×10^{5}个/ml,在5% CO_2条件下孵育(37 ℃),4、12、24 h后收集培养上清于-70 ℃保存待测或12h时取出盖玻片行AT-Ⅱ AKP染色。

1.4 细胞脱落率测定

各组培养24 h后计数脱落细胞,0.25%胰酶洗脱贴壁AT-Ⅱ,行细胞计数以间接反映贴壁细胞数。按下式计算AT-Ⅱ细胞脱落率。

$$细胞脱落率(\%)=\frac{游离细胞数}{(游离细胞数+贴壁细胞数)}\times 100\%$$

1.5 碱性磷酸酶染色及图像分析

参照文献[7]介绍的方法,培养12 h后取出盖玻片NBT/BICP(硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3 吲哚基磷酸,Sigma,USA)法行AT-Ⅱ AKP染色。CMIAS真彩色图像分析系统行半定量分析,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

每一玻片随机选 5 个高倍视野(× 400),检测 AKP 阳性细胞平均吸光度(*A*)值。

1.6 AT-Ⅱ培养液中 MDA 和 IL-8 含量检测

MDA 含量行硫代巴比妥酸法,采用南京建成生物工程研究所 MDA 含量测定试剂盒。IL-8 含量测定行酶联免疫吸附测定法(ELISA),采用晶美公司 IL-8 测定试剂盒。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS10.0 统计分析,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞脱落率变化结果

损伤组细胞脱落率非常显著高于对照组,NAC 组细胞脱落率非常显著少于损伤组。结果见表 1。

表 1 AT-Ⅱ脱落率变化结果($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of shedding rate of AT-Ⅱ cells($n=6, \bar{x}\pm s$)

	Control group	Injury group	NAC group
Shedding rate (%)	6.1±0.8	22.1±3.2**	14.7±2.4**##

**: $P<0.01$ *vs* Control group; ##: $P<0.01$ *vs* Injury group

2.2 AKP 染色图像分析结果

损伤组 AKP 平均灰度值较对照组显著降低,NAC 组 AKP 平均灰度值降低程度小于损伤组,两者比较有非常显著的差别。结果见表 2。

表 2 AT-Ⅱ AKP 染色图像分析结果($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of AKP in AT-Ⅱ cells($n=6, \bar{x}\pm s$)

	Control group	Injury group	NAC group
A	2.38±0.18	1.74±0.18**	1.99±0.19**##

**: $P<0.01$ *vs* Control group; ##: $P<0.01$ *vs* Injury group

2.3 培养液中 MDA 和 IL-8 含量变化结果

损伤组培养液中 MDA 和 IL-8 含量均呈升高趋势,并非常显著地高于对照组同时相点,NAC 组 MDA 和 IL-8 含量非常显著地小于损伤组。结果见表 3 和表 4。

表 3 培养液中 MDA 含量变化结果(mmol/L, $n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of MDA and IL-8 content in cultural supernatant (mmol/L, $n=6, \bar{x}\pm s$)

Group	4 h	12 h	24 h
Control	2.02±0.16	2.45±0.27	2.87±0.33
Injury	4.12±0.48**	5.63±0.56**	7.23±0.61**
NAC	2.79±0.24**##	4.48±0.47**##	4.23±0.36**##

**: $P<0.01$ *vs* Control group; ##: $P<0.01$ *vs* Injury group

表 4 培养液中 IL-8 含量变化结果(pg/ml, $n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of IL-8 content in cultural supernatant (pg/ml, $n=6, \bar{x}\pm s$)

Group	4 h	12 h	24 h
Control	2.52±0.18	4.37±0.39	6.92±0.45
Injury	5.39±0.45**	7.24±0.79**	9.35±1.15**
NAC	3.74±0.39**##	5.68±0.48**##	6.39±0.72**##

**: $P<0.01$ *vs* Control group; ##: $P<0.01$ *vs* Injury group

3 讨论

急性肺损伤发生中有多种损伤因素参与并加重其损伤程度,其中 PMNs 肺内聚集是导致肺损伤的重要因素之一[8]。呼吸爆发产生活性氧代谢物、脱颗粒释放毒性蛋白质和颗粒酶及参与"无复流现象"的发生是 PMNs 导致肺损伤的途径之一[9]。AT-Ⅱ的损伤是肺损伤的关键环节,其受损程度无疑将影响肺损伤后的修复,因此对 AT-Ⅱ的损伤机制和保护研究具有重要意义。

AKP 是 AT-Ⅱ分化的特异标志物,也是膜标志酶,检测其活性的变化可以了解 AT-Ⅱ的受损程度[10]。本研究通过扫描其染色灰度值进行定量分析,发现 PMNs 激活后的上清夜能抑制 AT-Ⅱ的 AKP 活性,而 NAC 能抑制 AKP 活性减少程度,说明 NAC 对 AT-Ⅱ具保护作用。MDA 含量反应脂质过氧化反应发生程度,能间接反应氧自由基对培养细胞的损伤程度,NAC 组 MDA 含量显著少于损伤组,说明 NAC 可能通过抑制氧自由基的产生而具 AT-Ⅱ保护作用。IL-8 对 PMNs 有趋化作用,是诱导 PMNs 变形、迁路、激活释放炎性介质的重要因子,它也是组织损伤的重要炎性介质[11]。AT-Ⅱ在维持正常肺功能中起着十分重要的作用,它受到损伤时也可释放 IL-8 并参与肺炎症反应的调节,如烟雾提取物[12]或缓激肽[13]均能损伤 AT-Ⅱ并刺激其 IL-8 大量释放。NAC 组 IL-8 含量显著少于损伤组,提示 NAC 可调控 IL-8 表达,其对 AT-Ⅱ的保护作用与 IL-8 的降低有一定关系。细胞贴壁是培养 AT-Ⅱ功能正常的表现之一,细胞贴壁率的测定结果充分说明 NAC 对维持 AT-Ⅱ的功能形态正常有较好作用。本研究结果表明,NAC 能减轻 PMNs 释放炎性介质对培养大鼠 AT-Ⅱ的损伤。在体实验表明,NAC 不但抑制损伤和炎症后机体脂质过氧化反应程度,还可抑制机体免疫功能下降的趋势,并可抑制损伤后机体 NF-KB 的激活,从而减轻炎症反应的程度。这正与本实验结果相佐证,但有关 NAC 在肺损伤在体实验中的保护机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Matsumoto K, Hashimoto S, Gon Y, *et al*. N-acetylcysteine inhibits IL-1 alpha-induced IL-8 secretion by bronchial epithelial cells[J]. Respir Med, 1998, 92(3): 512—515.

[2] Koenderman L, Kok P T, Hamelink M L, *et al*. An improved method for the isolation of eosinophilic granulocytes from peripheral blood of normal individuals[J]. J Leukoc Biol, 1988, 44(2): 79—86

[3] 周向东, 李天星. 围急性呼吸窘迫综合征期杀菌-通透性增加蛋白相关指数的探讨[J]. 中国危重病急救医学杂志, 1998, 10(2): 67—69.

[4] 曾庆富, 钱仲裴, 蒋海鹰. Ⅱ型肺泡上皮细胞的分离、纯化及原代培养[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(S): 9

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] 王晓军, 罗向东, 工宪航, 等. 中性粒细胞对肝细胞的损伤效应及烧伤血清的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 1997, 5(1): 29—31.
[6] Mulier B, Rahman I, Watchorn T, *et al*. Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH) [J]. Eur Respir J 1998, 11(2): 384—391.
[7] Cunningham A C, Milne D S, Wilkes J, *et al*. Consttiutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelia cells (type II pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findmgs[J]. J Cell Sci, 1994, 107(2): 443—449.
[8] Abraham E, Carmody A, Shenkar R, *et al*. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1 137—1 145.
[9] Kinoshita M, Ono S, Mochizuki H. Neutrophils mediate acute lung injury in rabbits: role of neutrophil elastase[J]. Eur Surg Res, 2000, 32(6): 337—346.
[10] Punithavathi D, Venkatesan N, Babu M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131(2): 169—172.
[11] Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, *et al*. Phagocytosing neutrophils produce and release high ammount of the neutrophil-activating peptide 1/Interleukin 8[J]. J Exp Med, 1991, 173(3): 771—774.
[12] Masubuchi T, Koyama S, Sato E, *et al*. Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity[J]. Am J Pathol, 1998, 153(6): 1 903—1 912.
[13] Koyama S, Sato E, Nomura H, *et al*. Bradykinin stimulates type II alveolar cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity and inflammatory cytokines[J]. Am J Pathol, 1998, 153(6): 1 885—1 893.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2002)10-1181-01

个案与短篇

脑胶质瘤介入治疗的护理体会

Nursing care of treating cerebral glioma by intervention therapy

付 利 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经外科, 重庆 400042)

1997 年 2 月至 2001 年 12 月, 我科对 22 例经病理证实的胶质瘤病人采用微导管灌注威猛的化疗方法, 取得了较好的效果, 现将护理体会介绍如下。

1 对象和方法

1.1 一般资料

本组 22 例, 男性 13 例, 女性 9 例, 年龄 26~57 岁。其中 7 例术中行全切除, 9 例为大部分切除, 6 例为部分切除。术后病理诊断: 星形胶质细胞瘤, II 级 4 例, II ~ III级 6 例, III级 5 例, IV级 7 例。肿瘤均位于大脑半球, 为一侧颈内动脉供血。

1.2 材料与方法

化疗药物选用威猛(VM26), 化疗时在 DSA 监视下采用 Seldinger 技术穿刺股动脉, 按程序将 Magic 微导管置入颈内动脉眼动脉分支以上, 然后经 Magic 微导管用加压输液袋快速输入 20%甘露醇 250 ml 开放血脑屏障(BBB), 把化疗药物威猛 100 mg 加入 100 ml 生理盐水中, 用高压注射器从 Magic 导管内自动注入。其中灌注 1 次者 5 例, 2 次者 4 例, 3 次者 5 例, 4 次者 6 例, 5 次者 2 例, 共灌注 62 次。术后第一次化疗时间为: 2 周 14 例, 3 周 4 例, 4 周 4 例。

2 结果

根据化疗前与化疗后 1~1.5 个月增强 CT 或 MRI 检查显示的肿瘤体积改变, 按 WHO 制定的实体肿瘤对化疗敏感性的评判标准[1]进行疗效评定: 完全缓解(CR)3 例, 部分缓解(PR)5 例, 无变化(NC)10 例, 恶化(PB)4 例, 有效率 36.36%。

3 护理

3.1 化疗前准备

3.1.1 心理准备 由于该化疗方法与常规的化疗方法不同, 部分病人及家属思想上有顾虑。我们把此方法的优点及特点给病人及家属讲解, 让他们以积极的态度配合治疗, 消除心理上的压力。

3.1.2 备皮 化疗前 1 d 会阴部备皮, 并嘱病人化疗晨清洗会阴。

3.1.3 常规检查 化疗前行 CT 或 MRI 检查, 以便化疗后对比; 查血常规, 了解白细胞情况。如果白细胞减低则暂时不能化疗, 待白细胞正常后进行。作凝血象检查, 防止化疗后出血不止。

3.1.4 药物准备 做好碘过敏试验; 化疗前 3~5 d 用地塞米松 10 mg/d 静滴, 可减轻化疗药物的副反应和减轻脑水肿; 因肿瘤均在大脑半球, 苯巴比妥钠 0.2 g 肌注, 2 次/d, 防止癫痫发作; 苯巴比妥钠同时还具有维持肿瘤周围有较高抗癌药物浓度, 使药物浓度维持较长时间, 减少对骨髓的毒性作用。

3.1.5 其他 由于化疗中应用高渗性脱水剂, 病人在化疗中不能活动, 化疗前给予留置尿管。

3.2 化疗后护理

3.2.1 化疗完毕拔管后加压压迫穿刺点 20 min, 并用加压包扎带压迫 6 h, 防止穿刺点出血。限制穿刺侧下肢活动并伸直 12 h。随时观察足背动脉搏动情况, 防止局部形成血肿压迫股动脉导致下肢供血不足, 或形成血栓栓塞下肢动脉, 导致下肢缺血坏死。

3.2.2 定时测血压、脉搏、呼吸, 随时观察病人的意识及瞳孔变化, 以防颅内出血形成血肿发生脑疝。

(下转 1184 页)

作者简介: 付 利(1971—), 女, 重庆市人, 护师, 主要从事神经外科护理方面的研究。电话: (023)68757243

收稿日期: 2001-09-11; 修回日期: 2001-11-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net