DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.015
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
154 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0154-03

急性肺损伤早期肺表面活性蛋白A、B含量的变化

肖 燕,崔社怀 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨油酸性急性肺损伤早期表面活性蛋白A、B(SP-A、SP-B)含量的变化。方法 复制油酸性大鼠急性肺损伤模型,采用Western Blot和ELISA术检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中SP-A、SP-B的含量。结果 BALF中SP-A、SP-B的含量在急性肺损伤后1 h就出现明显降低($P<0.01$),并在6 h内维持较低水平。结论 急性肺损伤早期即出现SP-A、SP-B含量下降,同时,本研究所建立的表面活性蛋白含量监测方法灵敏度高,特异性好,可供实验研究采用。

关键词:急性肺损伤;肺表面活性蛋白A、B
中图法分类号:R322.35;R563.02 文献标识码:A

Alterations of surfactant protein A and B in the early stage of acute lung injury in rats

XIAO Yan, CUI She-huai (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the alterations of surfactant protein A (SP-A) and B (SP-B) in rats in the early stage of acute lung injury induced by oleic acid. Methods An acute lung injury model was established by injecting oleic acid into the superior vena cava of rats and the levels of SP-A and SP-B in branchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined with Western Blot and ELISA. Results The levels of SP-A and SP-B in BALF were significantly decreased in the injured group 1 h after acute lung injury ($P<0.01$) and remained low in the next 6 h. Conclusion The levels of SP-A and SP-B were decreased in the early stage of acute lung injury. The methods used for detecting SP-A and SP-B we adopted are specific and sensitive, and might be helpful for other experimental study.

Key words: acute lung injury; surfactant protein

目前,急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)的发病机制仍不十分清楚。肺表面活性蛋白(Surfactant protein, SP)由肺泡Ⅱ型上皮细胞合成、分泌,对维持肺泡的正常结构功能起重要作用。近年来,随着对急性肺损伤发病机制及防治措施研究的深入,发现急性肺损伤时常伴有表面活性蛋白含量的降低[1],然而,人们对表面活性蛋白含量的改变与病程变化的关系尚缺乏全面的认识,同时尚不具备灵敏有效的检测表面活性蛋白含量的方法。本实验在成功复制大鼠油酸性ALI动物模型的基础上,我们探索运用Western Blot和ELISA两种方法检测了支气管肺泡灌洗液(Branchoalveolar lavage fluid, BALF)中SP-A、SP-B含量的变化,初步探讨了SP-A、SP-B在油酸性ALI中的变化规律,并建立了一种灵敏特异的SP含量检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

电泳仪、垂直板状电泳槽及转移电泳槽(北京东方仪器厂生产),低温高速离心机(Beckman公司生产),Gel Doc2000型生物医学图像处理系统(美国BIORAD公司产品),96孔酶联板(Sigma公司产品),3550型酶联自动检测仪(本校全军免疫学研究所提供)SP-A、SP-B多克隆抗体(美国俄亥俄洲儿童医院医学中心Wittsett教授惠赠),辣根过氧物酶标记羊抗兔IgG(Bio-Rad产品),低分子量标准蛋白质(上海丽珠东风生物技术有限公司产品),增强型化学发光(ECl)显影药盒及PVDF膜(美国杜邦NEN公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作 参考文献[2]方法进行,并略有改进。健康雄性Wistar大鼠30只,体重(200±20)g,随机分为油酸组(1、2、4、6 h,各时相点6只,$n=24$)和对照组($n=6$)。将大鼠用1%戊巴比妥钠(4 μl/g)经腹腔内注射麻醉,行气管、颈外静脉,颈动脉插管术。从颈动脉抽对照血气后,经颈外静脉从上腔静脉注入油酸(剂量为0.10~0.15 μl/g),对照组注入等量的等渗盐水(0.10~0.15 μl/g),于15 min内注完,并于不同时相点(1、2、4、6 h)放血活杀6只大鼠。作支气管肺泡灌洗,收集BALF,-70 ℃保存。取肺组织作光镜、电镜切片,观察病理形态改变,并测定肺湿/干比值(Wet/Dry ratio)。

1.2.2 样品的制备 参考文献[3]略有改进。取-70 ℃保存的BALF以300× g 4 ℃离心10 min,20 000× g 4 ℃离心35 min,分离为小聚集体和大聚集体,前者存于上清,后者存于沉淀,将沉淀用100 ml pH 7.0 PBS重悬(含蛋白酶抑制剂)。

1.2.3 Western Blot检测BALF中SP-A的含量 参照文献[3,4]进行,将样品用考马亮蓝定量法进行总蛋白定量,与样品缓冲液按1∶1配制并使其终浓度为1 μg/μl,上样量为每泳道20 μg,在15%的聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,电泳条件为100 V、4 ℃。然后以30 V、4 ℃经18 h转移到PVDF膜上,用5%~6%的含封闭用羊血清的脱脂奶粉封闭24 h,分别与1∶800抗SP-A多抗和1∶2 400辣根过氧化物酶标记的IgG相结合,然后用增强型化学发光显影药盒进行检测,在X胶片上与PVDF膜相对

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670336)
作者简介:肖 燕(1971—),女,四川省宜宾市人,硕士,医师,主要从事急性肺损伤方面的研究,现在解放军304医院呼吸科,北京 100037
收稿日期:2000-02-25;修回日期:2000-06-10

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

应的位置标记上分子量的正确位置, 最后将 X 胶片用于图像分析, 得到目的带的准确分子量和相对含量。

1.2.4　ELISA 检测 BALF 中 SP-A、SP-B 的含量　　参考文献[3]方法进行。先用方阵法滴定样品、一抗、二抗 ELIAS 检测的工作浓度分别为 100 μg/ml、1∶500(饱和剂量)、1∶1 000。将样品用包被液稀释, 加入 96 孔板, 100 μl/孔、4 ℃过夜(20～22 h), 次日, 倒尽包被物、空干、PBST 洗涤(5 min×3 次)。用 2% 羊血清封闭非特异结合位点, 与一抗孵育, 100 μl/孔、37 ℃(湿盒)、1 h, PBST 洗涤(5 min×3 次), 与二抗孵育, 100 μl/孔、37 ℃、1 h, PBST 洗涤(5 min×3 次)。加入底物溶液 100 μl/孔、37 ℃、15 min, 每孔加 1 滴终止剂, 测定 D_{450}值。

1.3　统计分析

各组数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　动物模型的评价

从大鼠上腔静脉注入油酸后, 立即出现呼吸频率增加、窘迫, 粉红色泡沫状痰液溢出、紫绀十分明显, 而对照组则无同样的变化。血气分析结果表明, 注入油酸后 PaO_2 与注入前相比较显著下降, 且随时间的延长而下降($P<0.05$), 而对照组 PaO_2 无明显变化($P>0.05$), 肺湿/干比值油酸组显著高于对照组($P<0.05$), 表明油酸组肺含水量显著增加, 随时间的延长而有加重的趋势。病理结果显示肺充血、渗出、水肿、实变、不张、炎性细胞浸润, I 型上皮细胞肿胀、变性、脱落, II 型上皮细胞空泡变性, 线粒体肿胀, 板层体排空或空泡样变, 符合 ALI 早期改变。

2.2　Western Blot 测定 BALF 中 SP-A 的含量

将样品用 15% 不连续聚丙烯酰胺分离后, 于 18×10^3～36×10^3 处有条带晰出, 见图 1。当转移到 PVDF 膜上, 用 5%～6% 脱脂奶粉封闭, 分别与一抗、二抗结合后, 得到背景较干净均一, 目标带清晰, 非特异性结合少的 X 线片, 见图 2, 与文献[3]报道一致。

对 X 线片进行图像分析, 所得的 SP-A 相对含量进行统计学处理, 结果表明 BALF 中 SP-A 的含量在 ALI 后 1 h 就出现下降, 与对照组比较差异显著($P<0.05$), 第 2、4、6 h SP-A 含量处于较低水平, 但组间差异不显著。

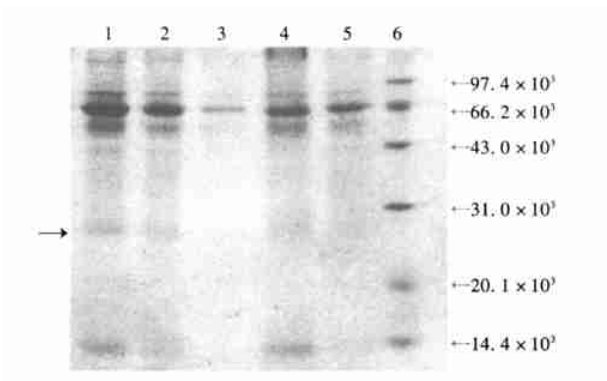


图 1　表面活性蛋白 A 的 SDS-PAGE 图

Fig 1　SDS-PAGE analysis of surfactant protein A

Lane 1: Control; Lane 2: 1 h after ALI; Lane 3: 2 h after ALI; Lane 4: 4 h after ALI; Lane 5: 6 h after ALI; Lane 6: Marker

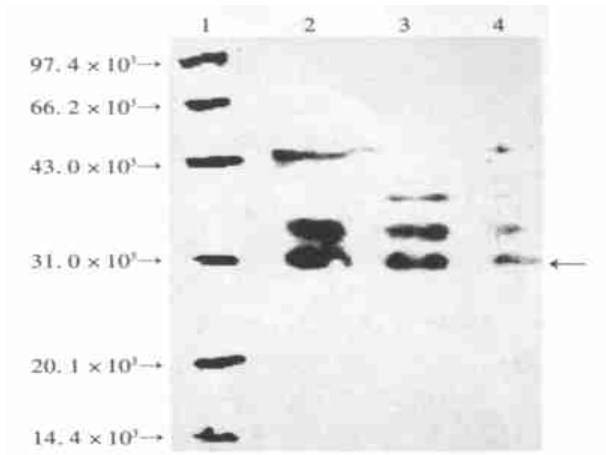


图 2　表面活性蛋白 A 的 Western Blot 分析

Fig 2　Western Blot analysis of surfactant protein A

Lane 1: Marker; Lane 2: Control; Lane 3: 1 h after ALI; Lane 4: 2 h after ALI

2.3　ELISA 测定 BALF 中 SP-A、SP-B 的含量

采用方阵滴定法寻求最佳实验浓度, 结果显示样品含量与其 D_{450}值间有良好的线性关系, 证明间接 ELISA 能较好地反映样品中 SP-A、SP-B 含量的变化。各实验组 ELISA 检测结果示 ALI 后, BALF 中 SP-A 含量显著低于对照组($P<0.01$), 而各组间差异不显著, 结果与用 Western Blot 方法检测 SP-A 得出的结果一致。SP-B 也出现相似的结果, 即 SP-B 也显著低于对照组($P<0.01$), 而其余各组间比较差异不显著($P>0.05$)。

3　讨论

油酸性急性肺损伤模型是研究急性肺损伤的病理和发病机制的常用模型之一, 本实验采用经上腔静脉注射油酸的方法成功复制出了大鼠 ALI 动物模型, 结果动物出现的生理、病理变化符合 ALI 早期改变, 为本研究探讨急性肺损伤早期肺泡灌洗液中表面活性蛋白 A、B 含量的变化奠定了基础。

肺表面活性蛋白含量降低与急性肺损伤的关系近年来日益受到临床医务工作者的重视。虽有研究证实急性肺损伤时常伴有表面活性蛋白含量的降低, 但人们对表面活性蛋白含量的改变与病程变化的关系尚缺乏全面的认识, 在利用 SP 含量变化来指导临床诊治 ALI 方面还缺乏一定的实验依据, 同时尚不具备灵敏有效的检测表面活性蛋白含量的方法。本实验采用 Western Blot 技术和 ELISA 技术首次从蛋白质水平检测大鼠急性油酸型 ALI 早期 BALF 中 SP-A、SP-B 含量的变化规律。实验结果显示: SP-A、SP-B 含量在 ALI 早期就开始降低, 此后一段时期处于较低水平。表明 SP 对维持肺泡的正常功能意义明显。

本研究所用 Western Blot 方法是近年来发展起来的一种用非放射性化学发光试剂替代传统底物的免疫印迹技术。该技术弥补了传统方法在蛋白质定量方面的局限性, 使检测蛋白质含量检测的灵敏度达到 1～

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

10 pg 水平，较传统方法提高1 000倍，可以检测出微量抗原，且反应迅速，最终的实验结果反映在X线片上，易于保存，检测后的膜经洗涤后可以重复利用，X线片可用来进行图像扫描分析，易于定量。本实验应用抗SP特异性抗血清结合经SDS-PAGE电泳后的相应特异蛋白质，然后与辣根过氧化物酶标记的IgG共孵育，最后用增强性化学发光试剂进行检测，是一种测定ALI前后BALF中SP含量的新技术。本实验结果表明，在X线片上得到的条带规则，背景干净，分辨率高，非特异性结合少，重复性好的X线片，目的带的位置与文献报道一致，X线片经用图像扫描分析，结果以面积×吸光度表示，得出目的蛋白质的相对含量。

分析ALI早期BALF中SP-A、SP-B含量下降的机制，可能与油酸的直接作用、Ⅱ型上皮细胞肿胀、脱落、空泡样变性、顽固性低氧血症、大量炎性细胞的侵入，释放大量氧自由基、细胞因子、蛋白水解酶有关[5,6]，一方面是破坏增加，另一方面是生成减少，就必然造成SP-A、SP-B含量的下降。

本实验建立的灵敏有效的SP含量变化监测方法可供实验研究采用。急性肺损伤早期即出现SP含量的下降，提示早期给予含SP的表面活性物质替代治疗或许对缓解ALI症状，抑制其病程起到重要作用。而急性肺损伤早期SP蛋白表达下降的机制将是我们需要进一步探讨的课题。

参考文献：

[1] Green K E, Wright J R, Steinberl K D. *et al*. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS[J]. Am J Respir Care Med, 1999, 160(6): 1 843—1 850.
[2] 崔社怀，郭先健，钱桂生. 高原ARDS表面活性物质相关蛋白A、B、C mRNA表达的变化[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(3): 181—183.
[3] Cleary G M, Antunes M J, Ciesieka D A. *et al*. Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration[J]. Pediatrics, 1997, 100(6): 998—1 003.
[4] 熊仁平，周元国. 蛋白免疫印迹法在G蛋白检测中的应用[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(2): 145—147.
[5] Kremlev S G, Phelps D S. Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production[J]. Am J Physiol, 1994, 267(11): L712—L719.
[6] 黄翠萍，徐永健，刘晓晴. 急性呼吸窘迫综合证的预测指标[J]. 国外医学：内科学分册，1999, 26(5): 204—207.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)02-0156-01

重组腺病毒介导的CTLA-4Ig cDNA在体外培养细胞中的表达

Expression of recombinant adenovirus mediated CTLA-4Ig in cultured different types of cells recton

杨世昕，吴 军，罗高兴，易绍萱，贺伟峰，黄赤兵，周立新，张 宁，陈希炜 （第三军医大学附属西南医院烧伤研究所，重庆 400038）

本研究用构建的CTLA-4Ig重组腺病毒转染体外培养的人真核细胞，以探讨核载体临床治疗应用的可行性。

1 材料

293细胞购自ATCC（美国），鼠抗人CTLA-4Ig单抗购自Pharmingen公司，5 ml亲合层析柱HiTrap Protein A为Pharmacia公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养

293细胞用含10%小牛血清的DMEM培养液；人成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞、HeLa细胞均用含5%小牛血清的DMEM培养液。培养条件均为37 ℃，5% CO_2，饱和湿度细胞培养箱中培养。

2.2 重组腺病毒的制作

将罗高兴[1]构建CTLA-4Ig重组腺病毒在293细胞中进行大量反复扩增，收集培养上清及细胞，反复冻融破碎细胞，离心取上清、过滤除菌，经亲合层析柱除去CTLA-4Ig蛋白制作成为转染液，－180°保存备用。

2.3 病毒滴度的测定

用空斑实验法测定转染液病毒滴度，按以下公式计算病毒滴度：病毒滴度(PFU/ml)= 每孔细胞数× 病毒原液稀释度× 10 ÷加入病毒液的量(ml)。

2.4 转染

将病毒转染一加入生长状态良好、增殖活跃的HeLa细胞于37 ℃ CO_2 培养箱转染不同时间，洗去转染液加入含5%胎牛血清的DMEM培养液继续培养。同样转染人成纤维细胞、人脐静脉内皮细胞。

2.5 免疫组化法检测细胞CTLA-4Ig表达

将转染的以上细胞在不同时相点终止，随后进行免疫组化法检测CTLA-4Ig表达。

（下转159页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39970756)
作者简介：杨世昕(1968—)，男，江西省永丰县人，硕士，主治医师，主要从事移植免疫方面的研究，现在南京军区空军九江庐山疗养院。电话：(023)68754149-8021
收稿日期：2000-03-02；修回日期：2000-09-23

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