DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.027
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
1080 2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1080-04

体外循环血清对培养大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤的研究

郝 嘉[1],郭 红[2],肖颖彬[1],王学峰[1],陈 林[1],钟前进[1] (第三军医大学附属新桥医院:[1]心血管外科;[2]消化内科;重庆 400037)

提 要:目的 探讨体外循环(CPB)血清对肺泡Ⅱ型上皮细胞(简称AT-Ⅱ)的损伤作用。方法 原代培养大鼠AT-Ⅱ,并与CPB血清共同孵育后观察其形态及生化指标变化和还原型谷胱甘肽(R-GSH)的保护作用。结果 培养液中MDA、LDH、AKP增加,细胞凋亡率上升,R-GSH能减轻细胞损伤。结论 CPB血清能直接损伤AT-Ⅱ,氧自由基可能是主要原因,这可能是术中肺表面活性物质减少的重要原因。R-GSH在体外能减轻CPB血清对AT-Ⅱ的损伤。

关键词:体外循环;细胞培养;Ⅱ型上皮细胞;谷胱甘肽;大鼠
中图法分类号:R322.35;R563.02 文献标识码:A

Effect of serum from cardiopulmonary bypass on the injury of cultured rat alveolar type Ⅱ epithelial cells

HAO Jia, GUO Hong, XIAO Ying-bin, WANG Xue-feng, CHEN lin, ZHONG Qian-jin (Department of Cardiovascular Surgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of serum drawn from patients undergone cardiopulmonary bypass (CPB) on the cultured rat alveolar epithelial type Ⅱ (AT-Ⅱ) cells. Methods: Morphological changes and apoptosis were observed in primary AT-Ⅱ cells cultured with serum from patients during cardiac surgery with CPB. The MDA, LDH and AKP levels in supernatant were determined. The protective effect of reduced glutathione (R-GSH) was also determined. Results The levels of MDA, LDH and AKP in the culture medium were increased rapidly with the addition of CPB serum, and the apoptosis rate of AT-Ⅱ cells was increased. R-GSH could attenuate the injury of AT-Ⅱ cells. Conclusion CPB serum can directly damage rat AT-Ⅱ cells *in vitro*, which may be caused by free radicals, and might mainly contribute to the decrease of active material on lung surface. R-GSH processes a protective effect on the damage of AT-Ⅱ cells induced by CPB serum *in vitro*.

Key words: cardiopulmonary bypass; cell culture; type Ⅱ epithelial cell; glutathione; rats

体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)术后特别是婴幼儿手术造成的呼吸功能不全有较高的发生率,很多患者术后早期临床表现尚可,但常在6~8 h时出现不明原因的继发性损伤过程降低肺功能,血氧分压降低为主的临床型很多见。近年研究认为肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar type Ⅱ epithelial cell, AT-Ⅱ)受损以及其合成的肺泡表面活性物质减少很可能是重要原因。为探讨在体外CPB血清对培养大鼠AT-Ⅱ的损伤情况和R-GSH的保护作用,我们将CPB术前和术后血清分别与AT-Ⅱ共同孵育,测定培养上清液中的丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(AKP)释放情况,并观察AT-Ⅱ凋亡变化。

作者简介:郝 嘉(1973—),男,四川省荣县人,硕士,助教,主要从事体外循环肺保护方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65218768。

收稿日期:2000-01-14;修回日期:2000-07-18

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

1　材料和方法

1.1　体外原代培养大鼠 AT-Ⅱ

采用 IgG 免疫粘附选择法[1]培养 Wistar 大鼠 AT-Ⅱ。细胞在 IgG 包被的培养瓶中培养, 1 h 后倒出培养液, 离心后按 10^6 个/ml 的细胞浓度加入 24 孔培养板或加入预置盖玻片的 6 孔培养板, 实验时间从此点起算。采用鞣酸多彩染色(× 200)和电镜法行细胞鉴定。台盼蓝染色法测定细胞活力。

1.2　CPB 血清的准备

选取 8 例室间隔缺损患者, 年龄(2.2±0.8)岁, 于麻醉诱导成功后 5 min(术前)和转流停止(术后)无菌采血, 离心后分离血清, 灭活补体活性, −70 ℃保存。

1.3　实验分组

1.3.1　对照组　　细胞培养 23 h 后吸尽培养液, 按 1∶10 比例配制 CPB 术前血清和 DMEM 培养液后加入培养板。

1.3.2　损伤组　　按 1∶10 比例配制 CPB 术后血清和 DMEM 培养液加入培养板。

1.3.3　R-GSH 组　　按 1∶10 比例配制 CPB 术后血清和 DMEM 培养液加入培养板, 同时还加入 1.6 mmol/L 的 R-GSH(浓度根据预实验结果和文献[2])。

1.4　板层小体图像分析

取出盖玻片行鞣酸染色, 用重庆大学编制的 Tiger™细胞图像分析仪行半定量分析, 每一玻片任选 5 个视野, 光镜下检测板层小体阳性细胞积分光密度(IOD)和平均光密度(AOD)值。

1.5　AT-Ⅱ培养液 MDA、LDH 和 AKP 测定

分别在细胞培养 2、8 和 18 h 时吸取 100 μl 上清液, -70 ℃保存。按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书测定, 用 722 分光光度计比色。

1.6　AT-Ⅱ凋亡检测

1.6.1　AT-Ⅱ凋亡率测定　　采用罗氏公司原位凋亡检测试剂盒检测, 方法为 TUNEL 法。光镜下棕黄色细胞为阳性凋亡细胞, 无显色为阴性, 随机计数 10 个视野中阳性、阴性细胞。

$$\text{凋亡发生率}=\frac{\text{阳性细胞}}{\text{阳性细胞}+\text{阴性细胞}}\times 100\%。$$

1.6.2　DNA 梯状电泳检测　　抽提细胞 DNA 后按文献[3]方法行梯状电泳检测。

1.6.3　bcl-2 免疫组化　　bcl-2 单抗购自博士德公司, 采用博士德公司 SABC 免疫组化试剂盒测定。根据颜色深浅将阳性分为+、++、+++。

1.7　统计学处理

采用单因素方差分析和 t 检验行统计学分析。

2　结果

2.1　AT-Ⅱ培养和鉴定

原代培养 AT-Ⅱ可收获 3×10^7 个/鼠, 纯度 90%, 活细胞率为 98%。透射电镜可见细胞中典型的板层小体, 见图 1。鞣酸多彩染色可见褐色嗜锇小体, 见图 2。

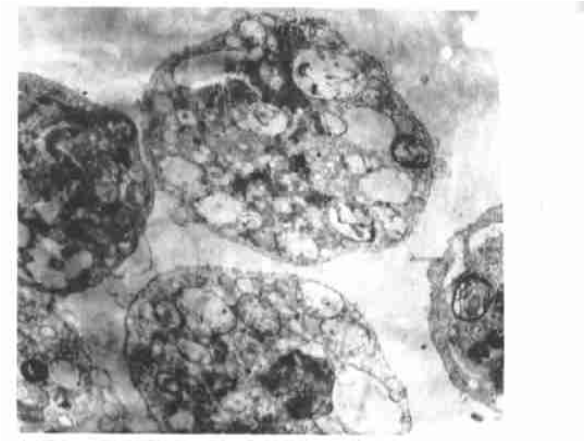


图 1　细胞中典型的板层状小体　(TEM× 6 000)

Fig 1　Multilameller body in cell　(TEM× 6 000)

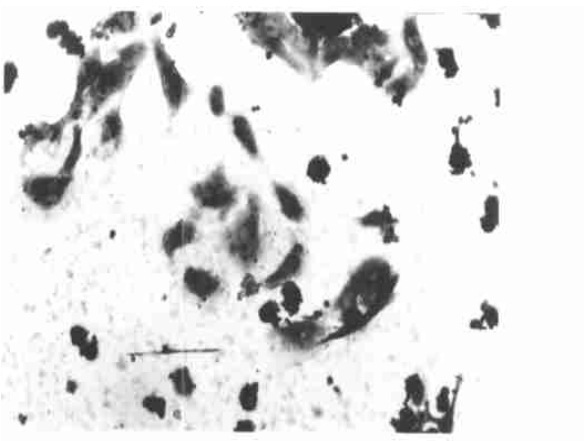


图 2　鞣酸多彩染色可见不均匀分布在核周的大小不一的褐色嗜锇板层小板, 细胞聚集成小岛状　(× 200)

Fig 2　Tannic acid stain. Osmiophilic multilameller body with different size and distributed around the nuclei; some cells gathered as an island　(× 200)

2.2　板层小体图像分析

损伤组和 R-GSH 组的 IOD、AOD 值均十分显著地低于对照组, R-GSH 组 IOD 值与损伤组差异显著, 见表 1。

表 1　板层小体图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Image analysis of multilameller body ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell number	IOD	AOD
Control	65	240.2±712.00	2.1810±0.1783
Injury	40	1020.1±542.03 *	2.0915±0.1811 *
R-GSH	40	1460.6±992.69	2.1257±0.1933

*: $P<0.01$ *vs* control, #: $P<0.05$ *vs* injury

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

2.3 培养液中 MDA、LDH 和 AKP 的变化

损伤组和 R-GSH 组培养液中 MDA、LDH 随培养时间延长逐渐升高，18 min 达到高峰。损伤组、R-GSH 组与对照组相差显著，R-GSH 组与损伤组相差显著，见表 2。

表 2 培养液中 MDA、LDH 和 AKP 的变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2 Changes of MDA、LDH and AKP in supernant($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Time(h)	MDA(C_B/mmol·L^{-1})			LDH(U/L)			AKP(U/L)		
	Control	Injury	R-GSH	Control	Injury	R-GSH	Control	Injury	R-GSH
2	2.28±0.08	4.38±0.09 *	2.83±0.06 *#	20.13±3.68	89.00±9.77 *	45.63±6.91 *#	4.07±0.22	6.55±0.43 *	4.10±0.18 *#
8	2.51±0.05	5.78±0.03	4.53±0.04 *#	36.38±5.93	179.5±9.30 *#	89.88±7.38 *#	5.01±0.26	20.91±0.64 *	8.89±0.66 *#
18	2.94±0.21	7.56±0.26 *	6.06±0.12 *#	95.63±37.74	361.7±31.7 *	234.3±61.3 *#	5.76±0.38	35.23±0.83 *	13.41±0.86 *#

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* injury

2.4 CPB 血清导致培养细胞凋亡

AT-Ⅱ在加入术后血清后凋亡率上升，DNA 电泳可见明显的 DNA 碎裂梯带，bcl-2 表达增强，说明术后血清能加速 AT-Ⅱ凋亡，见表 3。

表 3 细胞凋亡率和 bcl-2 免疫组化测定($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 3 Apoptosis rate and bcl-2 level ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	Control	Injury	R-GSH
Apoptosis rate	6.32±2.25	28.33±0.82 *	20.17±0.77 *#
bcl-2	0~+	++~+++	+~++

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* injury

3 讨论

CPB 时血清可透过肺毛细血管屏障，由于补体激活、血小板和白细胞聚集、氧自由基脂质过氧化损伤 AT-Ⅱ，导致 AT-Ⅱ合成和释放肺表面活性物质减少，并可造成 AT-Ⅱ肿胀、核固缩、细胞器破坏。由于研究心内直视手术中肺损伤的常有方法如肺活检、支气管肺泡灌洗(BAL)有取材、操作等困难，因此我们采用体外培养细胞法观察 AT-Ⅱ具体的损伤情况，并推测 CPB 术中人 AT-Ⅱ可能发生类似变化，以便采取相应的术中保护措施。罗奇志等[4]研究烟雾吸入性损伤血清对 PMN 粘附的影响时也采用了类似方法。

板层小体是肺表面活性物质(PS)贮存和释放的场所，实验发现 CPB 血清能减少板层小体 IOD 和 AOD 值，结合肺损伤导致支气管肺泡灌洗液和肺组织中 PS 减少的文献报道，这可能表明 PS 合成减少或降解增加，机制可能是：(1)氧自由基灭活 AT-Ⅱ的 Na^+ 通道，抑制其能量代谢与 PS 合成；(2)直接破坏 PS 的脂质代谢和结构，引起肺组织脂质过氧化。

MDA 量反映细胞内脂质过氧化程度，LDH 是胞浆标志酶，AKP 为膜标志酶，也是 AT-Ⅱ分化的特异标志物，三者的升高能更好地表明 AT-Ⅱ的受损。实验表明 CPB 术后血清在体外对 AT-Ⅱ有明显的脂质过氧化作用。

尽管 CPB 血清具体损伤机制复杂，尚需进一步探讨，但氧自由基很可能是导致细胞凋亡的重要原因，其机制可能为：氧自由基介导与凋亡有关的 DNA 损伤导致聚 ADP 核糖转移酶的活化和 p53 的积累；刺激一些死亡基因程序，活化对氧化应激敏感的核转录因子 NF-κB 和 AP-1。bcl-2 基因是细胞凋亡的抑制基因，在因谷胱甘肽缺乏而发生凋亡的神经元细胞中，bcl-2 的表达与氧自由基减少及降低细胞组织的氧化损伤相关，因此有人提出 bcl-2 可能通过一种抗氧化剂作用或通过抑制氧自由基的产生而抑制细胞凋亡[5]。

R-GSH 是一种巯基类抗氧化剂，它通过提供还原巯基维持含巯基酶和蛋白质稳定。Aerts 等[6]发现 AT-Ⅱ内 GSH 水平与细胞损伤指数成负相关，认为胞内 GSH 的调节是 AT-Ⅱ防止高氧损伤的重要机制。况九龙等也发现 GSH 含量降低(主要以 R-GSH 为主)可能引起其氧化-抗氧化系统失衡从而增加 AT-Ⅱ对氧化损伤的易感性[7]。研究表明 R-GSH 在体外能减轻氧自由基对培养人小肠上皮细胞的损伤[2]，且能减少培养大鼠嗜铬细胞瘤细胞的凋亡[8]。本研究表明 R-GSH 在体外能减轻 CPB 术后血清对培养大鼠 AT-Ⅱ的损伤及促凋亡作用，机制可能是：(1)体外直接对抗氧自由基的作用；(2)维持细胞内 GSH 稳定。

因此，为达到良好的临床肺保护效果，在 CPB 围术期应加强抗氧化治疗。运用 R-GSH 类药物(新药阿拓莫兰等)是一项值得推荐的措施。

参考文献：

[1] 郝 嘉，李永旺，肖颖彬. 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养

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

和鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 5(22): 500-501.

[2] 廖贤平, 余亚雄, 施诚仁, 等. 氧自由基对人类小肠上皮细胞的损伤作用及药物保护[J]. 中华小儿外科杂志, 1994, 15(5): 295-297.

[3] 胡庆柳, 丁振华, 谭小华. 凋亡而不出现 DNA 梯形带一例[J]. 细胞生物学杂志, 1998, 20(2): 76—78.

[4] 罗奇志, 杨宗城, 杨天德, 等. 烟雾吸入性损伤血清对 PMN 粘附的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 318-320.

[5] Dharmarajan A M, Hisheh S, Singh B, *et al*. Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum *in vitro*: A novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression[J]. Endocrinology, 1999, 140(4): 2 555—2 561.

[6] Aerts C, Wallaert B, Voisin C. *In vitro* effects of hyperoxia on alveolar type Ⅱ pneumocytes: Inhibition of glutathione synthesis increases hyperoxic cell injury[J]. Exp Lung Res, 1992, 18(6): 845-861.

[7] 况九龙, 颜春松, 邱小华, 等. 急性肺损伤谷胱甘肽的实验研究[J]. 江西医学院学报, 1998, 38(1): 7-12.

[8] 周国庆, 周孝达, 王桂松, 等. 多巴胺和谷胱甘肽对 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 1999, 19(1): 44-46.

(编辑　王　红)

(上接 1079 页)

3 μmol/L, 间接胆红素 12 μmol/L 乙肝三对(-)。7 月 19 日申请输血, 鉴定血型为 A Rh(D)经木瓜酶(Liss)法配血相合, 患者输注红细胞 6 U, 无不良反应。7 月 24 日再次申请输血, 上午输血 2 U 无反应, 25 日又申请输血, 输血约 150 ml, 出现高热 39.6 ℃、寒颤、高热、面色潮红、腰背痛、立即停止输血, 无尿, 考虑为溶血性输血反应, 实验室检查血中游离血红蛋白 813 mg/L, 尿中游离血红蛋白 19 mg/L, 即行血浆置换术, 换出血浆 4 200 ml, 输入新鲜冰冻血浆 2 000 ml 无不良反应。做血型血清学检查。

1　血型血清学检查

病人血型 $A_1CcDEMP_1$、供血者白某 $A_1CCDeeMN$。直接抗球蛋白试验: 病人输血前后均为阴性。罗某血清配血试验见表 1。

表 1　罗某血清配血试验

供血者序　号	方　法				
	木瓜酶法(Liss)	室温盐水	37℃盐水	抗人-IgG	博唯优柱状凝集
白某	0	4+	4+	4+	4+
李某	0	0	0	0	0
成某	0	0	0	0	0
周某	0	0	0	0	0
古某	0	0	0	0	0
刘某	0	0	0	0	0
谭某	0	0	0	0	0

罗某血清抗体鉴定: 我们选用由上海红十字血液中心提供的 1 组谱细胞, 由内蒙红十字血液中心提供的 1 组谱细胞。同时用 5 种方法进行检测。①木瓜酶法; ②室温盐水离心法; ③37 ℃盐水法; ④抗人-IgG 法; ⑤博唯优柱状凝集法。其中 10 号谱细胞为 Mi^a, 5 种方法只有木瓜酶法对其不凝集, 其它方法均凝集。5 种细胞对其它谱细胞均不发生凝集, 血清抗体效价见表 2。

表 2　罗某血清不同方法抗体效价

	木瓜酶法(Liss)	室温盐水	37℃盐水	抗人-IgG	博唯优柱状凝集
效价	0	4	4	16	16
积分	0	21	21	43	63

罗某血清吸收放散试验: 罗某血清加供血者白某细胞吸收后, 放散液分别加白某, 上海、北京红十字血液中心提供的 2 组谱细胞, 只同白某和上海提供的 10 号谱细胞凝集, 其它均不凝集。

2　结果与讨论

Mi^a属于 M 血型的 1 种亚型, 我们检测 1 335 例 Mi^a抗原阳性 49 例占 3.6%[1], 日本 Mohn 等[2] 报道在 3 305 例中只有 1 例 Mi^a, 抗原阳性为 0.08%, 抗体产生机会就更少。该患者生病时间长达 15 年, 从 90 年代起反复多次输血, 从未发生过输血反应, 无法断定抗 Mi^a是否因输血引起, 但根据我们试验结果分析, 该抗体性质属于冷抗体。Mi^a同 MN 抗原、抗体性质完全相类似, 因木瓜酶破坏 MN 抗原, 因此在木瓜酶法试验中不凝集, 而在室温盐水离心法、37 ℃盐水离心法、抗 IgG 法均凝集。

关键词: 溶血性输血反应; MN 血型; M 亚型; 抗 Mi^a 抗原
中图法分类号: R457.13　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 肖瑞卿, 林武存, 吴　毅等. 重庆巴县地区 MN 血型系统中 M 亚型 Mi^a的调查[J]. 第三军医大学学报, 2000.22(5): 438—439.

[2] Mohn J F, The blood group antigen Mi^a in Japanese[J]. Vox Sang, 1963, 8: 430.

(编辑　谢义霞)

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