DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.015

LPS对大鼠肺泡Ⅱ型细胞 Fas抗原表达及细胞凋亡的影响

宋 勇* 毛宝龄 孙庆华 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 目的: 探讨 Fas信号通路在肺泡Ⅱ型细胞损伤作用的可能机制及意义。方法: 建立大鼠肺泡Ⅱ型细胞体外培养,采用流式细胞术,原位杂交、逆转录-多聚酶链式反应等方法,观察大肠杆菌内毒素(LPS)对肺泡Ⅱ型细胞 Fas mRNA蛋白质及细胞凋亡的影响。结果: 成功建立大鼠肺泡Ⅱ型细胞体外培养技术,LPS刺激后,肺泡Ⅱ型细胞 Fas mRNA蛋白质表达均显著增加($P < 0.01$),LPS可诱导肺泡Ⅱ型细胞凋亡,并在一定范围内呈量-效关系。结论: LPS对肺泡上皮细胞的损伤效应,除直接损伤作用外,还可能通过诱导 Fas抗原表达增加,而致细胞凋亡的方式进行。

关键词 脂多糖;肺泡上皮; Fas抗原;细胞凋亡;大鼠
中图法分类号 R392.11

在多种原因导致的急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)中,均有明显的肺泡Ⅱ型细胞受损,其受损的确切机制至今尚未完全阐明。本研究通过建立大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养模型,观察脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)对肺泡Ⅱ型细胞 Fas mRNA蛋白质及细胞凋亡的影响,探讨 Fas信号通路在肺泡Ⅱ型细胞损伤中的可能机制及意义。

1 材料与方法

1.1 大鼠肺泡Ⅱ型细胞体外培养

健康 Wistar大鼠,本校动物所提供。大鼠肺泡Ⅱ型细胞分离培养,参照文献[1]并加以改进。大鼠麻醉、放血活杀,灌注肺血管、分离肺脏,反复灌洗肺泡×10次,胰酶灌注肺脏、消化保留肺内消化后的液体,将肺脏切成 1 mm^3大小的组织碎块经纱布及滤网过滤,收集滤液细胞种入玻璃培养皿中并清除巨噬细胞×2次,培养于 DMEM培养基,鉴定采用锇酸-丹宁酸染色。

1.2 肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡流式细胞检测及 Fas抗原表达的流式细胞免疫学检测

参照左连富等[2]方法进行。

1.3 肺泡Ⅱ型上皮细胞 DNA碎片的电泳检测

按 B.M公司试剂盒(Apoptotic DNA Ladder Kit)提供方法进行。

1.4 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 Fas mRNA表达原位杂交检测步骤

参照蔡文琴等[3]建立的方法进行。

1.5 RT-PCR

采用两步法, Fas引物由中国科学院上海生物工程中心合成,序列如下: Fas 上游引物: 5′-CAA GGG ACT GAT AGC ATC TTT GAG G-3′,下游引物: 5′-TGT GAA AGT CCA GAA CCC TAA GG-3′;β-actin 上游引物: 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′,下游引物: 5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′。PCR产物采用 Tiger 920G图象分析软件进行分析。

1.6 实验设计分组

实验时培养液改为无血清培养液进行,培养时间均为 24 h。LPS处理组: 分为: 1、10、100 μg/ml 3组。对照组: 采用等量无菌生理盐水加入培养基中作为对照。

1.7 统计分析

全部数据都以 $\bar{x} \pm s$表示。采用 t检验。

2 结果

2.1 大鼠肺泡Ⅱ型细胞原代培养的建立及鉴定

采用改良胰蛋白酶灌注消化法,分离培养肺泡Ⅱ型上皮细胞。结果显示,于胰蛋白酶溶液中加入 HEPES有利于稳定 pH,提高细胞产量;消化时间以 15 min左右为宜,在剪碎、过滤后所得细胞数为 (36.4±5.7)×10^6细胞/大鼠(n=20);以玻璃培养皿吸附、纯化两次后,细胞产量为(13.5±3.9)×10^6细胞/大鼠(n=20)。台盼蓝染色其活细胞比例均为 95%以上;经锇酸-丹宁酸染色鉴定,其纯度均在 90%以上,完全可以满足本实验的要求,见图 1。

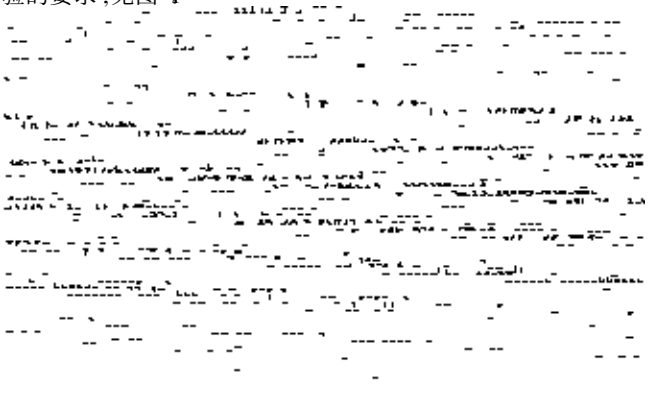


图 1 体外培养的大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(锇酸-丹宁酸染色×400)

Fig 1 Cultured rat pneumocyte type Ⅱ (osmic acid-tannic acid staining×400)

* 宋 勇,男,35岁,主治医师,博士后,现在南京军区总医院呼吸内科,南京,210002

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

2.2　LPS和 TNFα诱导肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡的 DNA琼脂糖凝胶电泳

LPS(10μg/ml)刺激 24 h,肺泡Ⅱ型上皮细胞 DNA电泳均可见典型的"梯状"带,而对照组无上述类似变化,见图 2

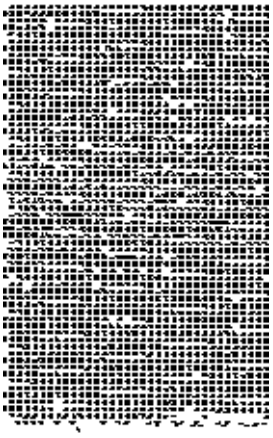


图 2　大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 DNA电泳　A: 对照组　B: LPS 10μg/ml

Fig 2　Electrophoresis of DNA in pneumocyte type Ⅱ induced by LPS　A: control B: LPS 10μg/ml

2.3　LPS对肺泡Ⅱ型细胞凋亡的影响

由表 1可见,LPS各浓度组肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡率均较对照组明显增加($P < 0.01$),并随 LPS刺激浓度增高,凋亡率不断增加,说明两者之间存在一定的量效关系。

表 1　LPS对肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡的影响

Tab 1　Effects of LPS on the apoptosis of pneumocyte type Ⅱ cell *in vitro*

Group	LPS(μg/ml)	Rate of apoptosis (%)
LPS	1	14.8± 2.4△
	10	46.3± 3.4△
	100	68.1± 4.9△
Control		2.4± 0.3

△: $P < 0.01$ *vs* control

2.4　LPS对肺泡Ⅱ型上皮细胞 Fas mRNA表达的影响

原位杂交和 RT-PCR结果发现,Fas mRNA在肺泡Ⅱ型上皮细胞有一定量的基础表达;LPS刺激后,Fas mRNA表达明显上调($P < 0.01$),见表 2,图 3 4

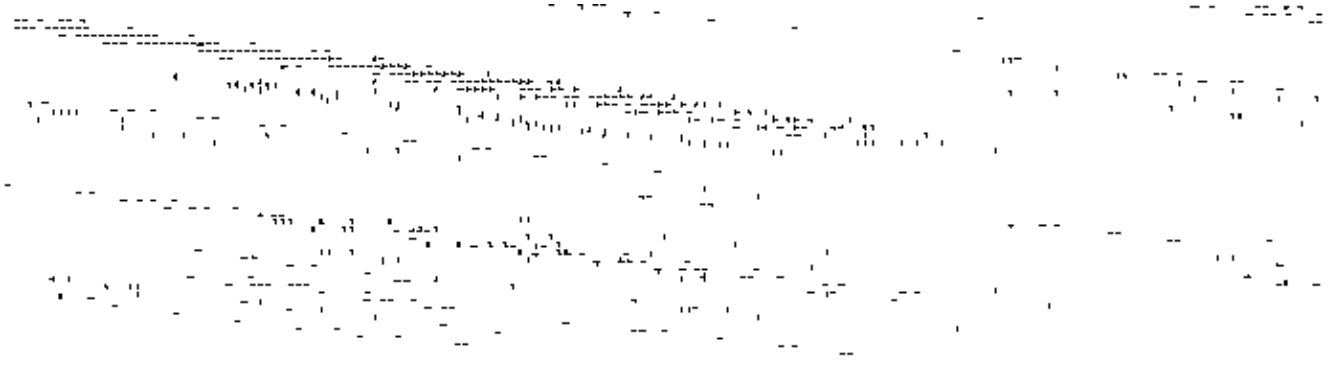


图 3　大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 Fas mRNA表达的原位杂交　A: 对照组　B: LPS 10μg/ml(× 400)

Fig 3　In situ hybridization for Fas mRNA in pneumocyte type Ⅱ　A: control　B: LPS 10μg/ml(× 400)

表 2　LPS对 Fas mRNA表达的影响(RT-PCR)

Tab 2　Effects of LPS on Fas mRNA expression (RT-PCR)

Group	LPS(μg/ml)	Fas mRNA
LPS	1	0.67± 0.06△
	10	0.84± 0.08△
	100	0.87± 0.07△
Control		0.18± 0.02

△: $P < 0.01$ *vs* control

2.5　LPS对 Fas抗原蛋白质表达的影响

流式细胞免疫学检测结果表明,LPS刺激后肺泡Ⅱ上皮型细胞 Fas抗原表达上调,与对照组的基础表达水平相比,差异非常显著($P < 0.01$),见表 3

表 3　LPS对 Fas抗原蛋白质表达的影响

Tab 3　Effects of LPS on Fas antigen protein expression

Group	LPS(μg/ml)	Fas antigen(%)
LPS	1	17.8± 2.4△
	10	28.9± 2.7△
	100	30.3± 2.6△
Control		4.1± 0.8

△: $P < 0.01$ *vs* control

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



图 4 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 Fas mRNA RT-PCR产物电泳结果 (A: Fas mRNA, Bβ-actin)

Fig 4 Electrophoresis of RT-PCR for Fas mRNA expression in rat pneumocyte type Ⅱ (A: Fas mRNA, B: β-actin) 1: λ DNA/EcoRⅠ + HindⅢ Marker, 2: Control, 3: LPS (1 μg/ml), 4: LPS(10μg/ml)

3 讨论

3.1 肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离培养

由于肺泡Ⅱ型上皮细胞的正常功能维持及在损伤修复中的重要作用[4],多年来国内外不少实验室进行了分离培养肺泡Ⅱ型上皮细胞的探索和努力。目前分离肺泡Ⅱ型上皮细胞多使用酶消化法,以弹力蛋白酶使用范围最广[5];但因弹力蛋白酶昂贵且不易购得,故我们选择胰蛋白酶作为消化酶。以往常将肺脏切碎后进行消化,这无疑增加了对肺间质的消化。我们采用自气管向肺泡灌注胰蛋白酶进行消化,经玻璃培养皿贴壁吸附巨噬细胞的方法,并对肺泡Ⅰ型上皮细胞用滤网过滤进行纯化。结果显示:分离培养、纯化后细胞的纯度大大提高,达 90%以上,完全可以满足实验的要求。

3.2 LPS对肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡及 Fas mRNA和蛋白质表达的影响

近来的研究认为,致病因素对肺泡Ⅱ型细胞的损伤和影响,是 ALI发病中的重要环节[6]。迄今,ALI时,肺泡Ⅱ型上皮细胞受损的确切机制尚未完全阐明。Fas抗原是细胞表达的Ⅰ类膜受体分子。Fas抗原主要分布于活化的 T和 B淋巴细胞上[7],当其与 Fas配基(FasL)结合后可在几小时内诱导细胞凋亡。近来研究表明,Fas也可在造血细胞、上皮细胞、免疫细胞等有表达[8]。Fas mRNA在肺脏有较弱的表达,并在体外培养的鼠肺泡Ⅱ型细胞和培养的Ⅱ型细胞系上均有表达[9]。我们采用原位杂交、RT-PCR和免疫组化技术,证实了 Fas mRNA和蛋白质在体外培养的大鼠肺泡Ⅱ型细胞上有一定程度的表达。LPS作为 G⁻细菌细胞壁的主要组成部分,是 G⁻菌主要的致病因子,参与许多重要的病理过程,在感染性 ALI时,LPS是主要的致病因素[10],本实验结果显示:LPS刺激后,肺泡Ⅱ型细胞 Fas mRNA 蛋白质表达均明显增加,LPS可致肺泡Ⅱ型细胞凋亡,并在一定范围内呈量-效关系。提示:LPS对肺泡上皮细胞的损伤效应,除直接损伤作用外,还可能通过诱导 Fas抗原表达增加,而致细胞凋亡的方式进行。

参考文献

1 Dobbs L G. Isolation and culture of pneumocyte type Ⅱ. Am J Physiol, 1990, 258(2): L134

2 左连富 主编.流式细胞术与生物医学.沈阳:辽宁科学技术出版社, 1996. 371~374

3 蔡文琴,王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994. 406~409

4 Matthay M A. Function of the alveolar epithelial barrier under pathologic conditions. Chest, 1994, 105(Suppl): 67S

5 Dobbs L G, Gonzalez R, Williams W C. Improved method for isolating type Ⅱ cells high yield and purity. Am Rev Respir Dis, 1986, 134(1): 141

6 Aronsen E L, Shannon J M. Epithelial injury and repair. ARDS acute respiratoy distress in adults. Edited by Timothy W Evans and Christopher Haslett Chapman and Hall, London, 1996. 197~213

7 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, *et al*. The polypeptide encoded by the cDNA for human surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell, 1991; 66(2): 233

8 Watanabe T R, Branna C I, Itoh N, *et al*. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. J Immunol, 1992, 148(5): 1274

9 Fine A, Anderson N L, Rothstein T L, *et al*. Fas expression in pulmonary pneumocyte type Ⅱ. Am J Physiol, 1997, 273(1): 64

10 Brigham K L, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(5): 913

(收稿: 1998-07-29;修回: 1998-11-09)

(编辑 张大春)

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

Effects of LPS on Fas expression and apoptosis in pneumocyte typeⅡ

Song Yong, Mao Baoling, Sun Qinghua (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the mechanism of Fas signal-pathway on damage of pneumocyte type Ⅱ. Methods: By using cytometry techniques, ISH and RT-PCR, the Fas mRNA, protein and apoptosis were studied in pneumocyte typeⅡ. Results: A method for isolation and culture of pneumocyte typeⅡ in rats were developed. Fas mRNA and protein expression were increased markedly ($P < 0.01$) after treated with LPS. Apotosis of pneumocyte typeⅡ might be induced by LPS and was dependent on the dose of LPS. Conclusion: Except the direct damage on the pneumocytes, LPS may cause apoptosis by inducing the increase of expression of Fas antigen.

Key words lipopolyasccharide; pneumocyte; Fas; apoptosis; rat

(上接 503页)

表面皮肤游离移植 2例,用双侧邻近皮瓣 6例,取双侧大腿皮肤游离移植 1例。

1.3 结果

伤口一期愈合 6例,1例双侧皮瓣尖端部分坏死,二期游离植皮,1例取双侧大腿皮肤游离移植,术中出血多死亡。术后病理诊断均为 NF1

1.4 随访

随访 3~ 27年,平均(13.29± 8.60)年。其中 4例术后未复发,3例术后残瘤稍增大。1例因右小腿包块近 5月来迅速增大,伴疼痛,考虑恶变,因患者拒绝治疗而出院,1年半后因恶变死亡。

2 讨论

2.1 神经纤维瘤病(NF)的临床表现

NF是临床上少见的疾病,但又是神经遗传病中相对常见的常染色体显性遗传病,发病率约 1/3000,该病遗传学有较大可变性[2]。约有 20%~ 50%家属成员患有相同疾患,也有不少散发病例[3]。男女无区别[4]。

NF1是多系统疾病,临床表现多样,牛奶咖啡色斑,多发性神经纤维瘤,Lisch结节(虹膜错构瘤)是该病主要临床表现,可并发皮下结节、中枢和内脏肿瘤、骨骼畸形、智力迟钝、巨颅、雀斑等。患者在出生后幼儿期即可被发现,肿瘤随年龄缓慢增大,于青春期和妊娠期可加速发展。短期内肿瘤迅速增大,局部疼痛,肿块固定,要考虑恶变的可能。该病恶变率为 7%。活检组织病理检查因无特征性病理解剖改变,其价值受一定限制,尚须结合临床确诊[5]。

2.2 外科手术治疗

NF1发展成为体表巨大肿瘤,面积大于 100 cm^2 为巨大型,本组病例均大于此面积。肿瘤具有包膜,局限,在皮下和深筋膜之间生长者可手术全切除。肿瘤无包膜,部位深,侵犯重要组织部位可大部切除。肿瘤有分叶分段者,也可以分期、分段切除。我们 20多年的随访观察,残瘤均生长缓慢,达到减轻负重和改善畸形的目的。由于肿瘤巨大、悬垂、皮肤松驰,瘤体内常形成血管窦,切除时窦壁无伸缩性,故手术出血难以控制,术前必须有充分的估计和有效的止血措施。我们体会采用以下措施有利于止血:① 肿瘤位于四肢者,可用止血带,在无血状态下切除肿瘤;② 位于颈部者,可先结扎颈外动脉;③ 降压麻醉有利于减少术中出血,以 8.0~ 10.6 kPa(60~ 80 mmHg)之间,时间不宜超过 30~ 45 min,长时间低血压,术后并发症多,如需再次降压,待血压回升后,可考虑再次降压;④ 肿瘤具有分叶分段者,可分期、分段手术切除;⑤ 用"7"号粗丝线环扎瘤体,线与线之间交叉,可减少瘤体的血供。另外术前可作动脉造影,了解肿瘤的血供情况,是否行暂时性血管栓塞术,以减少术中出血,需慎重考虑之。手术过程中边切边止血是有用的止血方法,可以防止休克的发生。由于瘤体切除后的创面大,创面重建是手术遇到的另一个难题,如肿瘤局限,皮肤条件好,也可以切除后皮肤直接缝合,或局部形成皮瓣修复创面。如瘤体巨大,皮肤受侵犯,可以切除肿瘤后,取下肿瘤表面条件较好的皮肤,用取皮鼓反取制成中厚皮片(0.62~ 0.80 mm)或全层皮片,整张或拼接成整张,缝合于创面,皮片截孔引流,打包加压包扎。随访观察这种皮片易成活,疤痕挛缩少,能耐磨,且不需另行取皮,减少了患者的痛苦和创面出血,临床上值得推广。本组有两例采用此方法,获得成功。另有一例切除肿瘤后,再在双侧大腿取皮覆盖创面,加重了出血,患者死亡,是为教训。在关节的屈面和颈部植皮,应注意功能锻炼和使用功能支具,防止畸形的再度发生。

关键词　神经纤维瘤病Ⅰ型 外科手术
中图法分类号　R730.264

参考文献

1 National Institutes of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis. Conference Statement. Arch Neurol, 1988, 45(5): 575
2 方炳良.神经系统遗传病的基因分析.国外医学:分子生物学分册, 1992, 14(1): 20
3 彭　斌,李舜伟.神经纤维瘤病 20例临床资料分析.北京医学, 1996, 18(3): 131
4 张涤生.常见体表肿瘤和疤瘤和疤痕组织.见:吴阶平,裘法祖 主编.黄家驷外科学.第 5版.北京:人民卫生出版社, 1992. 630~ 632
5 Vincent M, Riccardi M D. von Recklinghausen neurofibromatosis. N Engl J Med, 1981, 305(27): 1617

(收稿: 1998-01-11;修回: 1998-07-21)
(编辑　冷怀明)

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