

[文章编号] 1000-4718(2007)12-2398-03

高脂饮食兔肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及ACE活性变化*

张晶¹, 涂明利¹, 吴尚洁^{2△}

(1 郧阳医学院附属太和医院呼吸内科, 湖北十堰 442000; 2 中南大学湘雅二医院呼吸内科, 湖南长沙 410011)

[摘要] 目的: 了解高脂饮食对兔肺泡巨噬细胞胞浆游离钙浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 及血管紧张素 I 转换酶(ACE)活性的影响, 探索哮喘与高脂饮食相关的可能机制。方法: 高胆固醇饮食法建立高脂兔模型($n=6$), 8 周后离体支气管肺泡灌洗; Fura2/am 测定肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 紫外法检测 ACE 活性。结果: 高脂组肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著高于正常组($P<0.01$); 其支气管肺泡灌洗液(BALF)及肺泡巨噬细胞上清液中 ACE 活性显著高于正常组(均 $P<0.01$); 高脂组 BALF 中肺泡巨噬细胞数、肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性均与血清总胆固醇含量呈正相关, r 分别为 0.851、0.840、0.847(均 $P<0.05$)。结论: 高脂饮食导致兔肺泡巨噬细胞活化, 活性增高的肺泡巨噬细胞处于易激状态。

[关键词] 高脂饮食; 巨噬细胞; 血管紧张素转换酶; 钙; 兔

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of $[Ca^{2+}]_i$ and the activity of ACE in alveolar macrophages of rabbits with high-fat diet

ZHANG jing¹, TU Ming-li¹, WU Shang-jie²

(1 Department of Internal Medicine, The Affiliated Taihe Hospital of Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China;

2 Department of Internal Medicine, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China.

E-mail: wu_shangjie@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of high-fat diet on the level of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) and the activity of angiotensin I converting enzyme (ACE) in alveolar macrophages (AMs) of rabbits. The association between asthma and high-fat diet was also observed. **METHODS:** Twelve male New Zealand rabbits were medially divided into normal diet group and 1.2% high-cholesterol diet group randomly. 8 weeks later, bronchial alveolar lavage was performed *in vitro*. $[Ca^{2+}]_i$ was determined by Fluo-2/am. The activity of ACE was detected with ultraviolet method. **RESULTS:** The levels of $[Ca^{2+}]_i$ in AMs greatly increased ($P<0.01$). The activity of ACE both in BALF and in culture supernatants of AMs was all greatly increased compared with normal diet group ($P<0.01$). In hypercholesterolemic group the number of macrophages in BALF showed a positive correlation with the content of cholesterol in serum, such as the level of $[Ca^{2+}]_i$ in AMs and the activity of ACE in the culture supernatants of AMs (all $P<0.05$). **CONCLUSION:** The results suggest that AMs of rabbits may be activated by hyperlipidemia and become ease to be stimulated.

[KEY WORDS] High-fat diet; Macrophages; Angiotensin converting enzyme; Calcium; Rabbits

长期以来, 学者们一直怀疑高脂饮食与支气管哮喘(简称哮喘, asthma)之间存在着关联^[1]。流行病学资料显示哮喘易发生于高脂饮食的儿童及成人, Weng 等^[2]研究发现高胆固醇饮食可导致实验动物肺组织炎症损伤, Yeh 等^[3]发现高胆固醇饮食加速哮喘鼠模型肺部炎症, 但其机制未明确。近年有关脂代谢紊乱对呼吸系统影响的研究越来越多^[4],

有学者研究发现高脂饮食可导致脂质在动物肺组织细胞内沉积^[5], 但对于这种有害颗粒在肺部沉着后引起的进一步变化尚未清楚。由于肺泡巨噬细胞是下气道局部炎症反应的主要始动细胞, 而肺泡巨噬细胞胞浆游离钙浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 及血管紧张素 I 转换酶(angiotensin I converting enzyme, ACE)是肺泡巨噬细胞活化指标。因此, 本研究的目的在于了解高

[收稿日期] 2006-05-23

[修回日期] 2006-09-06

* [基金项目] 湖北省教育厅重点资助项目(No. D200724005)

△通讯作者 E-mail: wu_shangjie@hotmail.com

脂饮食对兔肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及 ACE 活性的影响,探讨哮喘与高脂饮食相关的可能机制。

材 料 和 方 法

1 动物

高脂兔模型建立:12 只 3 月龄健康雄性新西兰兔购自上海畜牧咨询服务公司,由中南大学湘雅二医院实验动物中心负责提供饲养和观察场地(湖南省实验动物管理委员会,合格证:001 号;环境设施合格证:028 号)。单笼饲养 1 周后记录体重并经耳缘动脉抽血行基线血脂分析,然后随机给 6 只兔进高胆固醇饮食(1.0% 胆固醇、7.5% 蛋黄粉、8.0% 脂肪),正常组给正常饮食。8 周后深麻醉状态下(腹腔注射苯巴比妥钠 25 mg/kg, Sigma),心脏放血后分离出肺,无菌纱布擦净肺表面。

2 方法

2.1 支气管肺泡灌洗 7 号小儿头皮针插入气管,丝线固定,20 mL 注射器(10 mL/kg)缓慢注入冷 PBS,保留 1 min,轻轻按摩兔肺,缓慢回抽,回抽液注入预冷的烧杯,密封后保温桶立即送实验室处理。

2.2 肺泡巨噬细胞的收集、分离、纯化及体外培养

双层无菌纱布过滤支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF),记录回收量,取少量行瑞氏染色细胞分类计数;离心(4 °C, 1 500 r/min, 10 min),上清液 -70 °C 冻存待测;细胞成份用 PRMI-1640 培养基 5 mL 重悬,置于 37 °C、5% CO₂、100% 湿度培养箱中贴壁 2 h,去掉未贴壁细胞,细胞刮匙刮下贴壁细胞,计数并以台盼蓝检验细胞成活率在 90% 以上;离心后弃上清,完全培养基调 AM 浓度为 1×10^9 cells/mL,取悬液 1 mL 行胞浆游离钙浓度检测;另取悬液 1 mL 于 12 孔培养板中,同时每孔用 1 mL 完全培养基作空白对照,培养 24 h,集上清 -70 °C 冻存。

2.3 血脂测定 动物动脉血 5 mL 静置 30 min 后离心分离血清,一份血脂测定,另一份 -70 °C 冻存待测;血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量采用酶法试剂盒(上海蓝怡科技有限公司),由湘雅二医院生化检验室完成。

2.4 肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 测定 按 Fura2/AM 说

明书操作(为中国医学科学院药物研究所产品),按公式 $[Ca^{2+}]_i = Kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 计算钙离子浓度(Kd 为解离常数 224 nmol/L),荧光测定采用 Shimadzu RF-510 型荧光分光光度计。

2.5 各项样品 ACE 活性测定 血清、BALF、肺泡巨噬细胞培养上清液中 ACE 活性测定采用紫外法(试剂盒购自海军总医院),严格按说明书操作。

3 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,统计分析软件 SAS11.0。

结 果

1 2 组动物血脂及肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平

由表 1 可见,高脂组肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高($P < 0.01$),达正常组 1.5 倍。

表 1 2 组动物血脂及肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平

Tab 1 The levels of serum lipids and $[Ca^{2+}]_i$ in AMs of two groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	TC _g (mmol/L)	LDL-C _g (mmol/L)	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
Normal	1.24 ± 0.18	1.20 ± 0.48	223.95 ± 40.67
High-fat die	20.64 ± 1.66 [△]	18.73 ± 2.48 [△]	339.72 ± 56.24 [△]

g: eighth weeks. [△] $P < 0.01$ vs normal group.

2 2 组动物 BALF 中细胞数总数及细胞分类计数

由表 2 可见,高脂组 BALF 中细胞总数及肺泡巨噬细胞、淋巴细胞的分类计数均显著高于正常组,差异显著($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 2 组动物血清、BALF、肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性

由表 3 可见,高脂组 BALF 及肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性显著高于正常组(均 $P < 0.01$)。

4 高脂组 BALF 中肺泡巨噬细胞数、肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性与血清总胆固醇含量相关性分析

直线相关分析显示,高脂组 BALF 肺泡巨噬细胞数、肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性与血清总胆固醇含量均呈正相关,*r* 分别为 0.851、0.840、0.847,均 $P < 0.05$ 。

表 2 2 组动物 BALF 中细胞总数及细胞分类计数

Tab 2 Leukocyte numbers and differential count (mean % in parentheses) in BALF of rabbits in two groups ($10^5/L$, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	Total cell	Macrophage (%)	Lymphocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)
Normal	48.4 ± 17.5	43.6 ± 6.9(90.0)	3.5 ± 0.4(7.2)	0.7 ± 0.2(1.4)	0.1 ± 0.0(0.3)
High-fat diet	223 ± 63 ^{△△}	214 ± 35 ^{△△} (95.9)	7.8 ± 4.3 [△] (4.1)	0.8 ± 0.4(0)	0.2 ± 0.0(0)

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs normal group.

表 3 2 组动物血清、BALF、肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性

Tab 3 The activity of ACE in serum, BALF and the culture supernatants of AMs in two groups of rabbits ($U. \bar{x} \pm s. n = 6$)

Group	BALF	Serum	AM
Normal	2.2 ± 0.4	27.4 ± 8.5	6.2 ± 1.2
High - fat diet	21.0 ± 0.7 ^{△△}	39.9 ± 5.7 [△]	12.0 ± 2.2 ^{△△}

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs normal group.

讨 论

钙离子是细胞内复杂信号级联反应中最重要的信号分子之一。胆固醇是哺乳动物细胞膜重要组分,在调节细胞膜流动性和膜蛋白间信号联系中起关键性作用。胡厚源等^[6]报道 LDL 与氧化 HDL 均有促进内皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的作用。本研究首次观察到高胆固醇饮食引起兔肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高 ($P < 0.01$),说明脂代谢紊乱时,肺组织局部沉积的脂质及肺循环中过多的脂质可导致肺泡巨噬细胞钙超载,而胞内钙负荷增加提示细胞处于相对激活状态,对外界抗原刺激的易感性增强^[7];新近 Kim 等^[8]报道 $[Ca^{2+}]_i$ 可通过 p38 和 ERK1/2 MAPK 信号途径导致肥大细胞 NF- κ B 活化,上调 IL-8 合成和释放,其中 IL-8 是迄今发现最强的炎症细胞趋化与活化因子之一,我们推测在肺泡巨噬细胞很可能存在类似的过程(以后的实验将进一步探讨);另一方面,Julie 等^[9]发现氧化 LDL 能够以浓度依赖的方式直接刺激中性粒细胞和嗜酸性粒细胞趋化运动,募集粒细胞到肺部引发气道炎症起始阶段。而气道高反应性和气道慢性炎症是支气管哮喘的 2 个主要特征,因此,我们有理由认为高胆固醇饮食与哮喘之间存在关联。

许多研究已证实肺组织存在局部血管紧张素系统(angiotensin system, ATs), ATs 与哮喘有着密切的关系^[10]。BALF 中 ACE 活性测定可反映肺泡巨噬细胞活性,对了解肺损伤程度有一定的参考价值。本研究显示,高脂组 BALF、肺泡巨噬细胞培养上清液中 ACE 活性均显著高于正常组,提示 BALF 中 ACE 活性升高不仅直接来源于血清,还与高脂饮食致肺泡巨噬细胞活化产生更多的 ACE 有关,说明肺组织局部 ATs 在高胆固醇饮食时被活化。本研究观察到,高脂组实验兔 BALF 中炎症细胞明显增多 ($P < 0.01$),但以肺泡巨噬细胞和淋巴细胞为主,既不同于慢性阻塞性肺疾病中的以肺泡巨噬细胞和中性粒细胞增多为主,也与支气管哮喘气道以嗜酸性细胞为主的慢性非特异性炎症不同。因此推测高脂兔肺组织局部 ACE 活性显著升高可能主要参与外源性支气管哮喘的炎症过程。

本研究表明,高脂组兔 BALF 中肺泡巨噬细胞数、肺泡巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 及肺泡巨噬细胞培养上清液 ACE 活性与血清胆固醇含量均呈正相关(均 $P < 0.05$),说明高胆固醇饮食可能导致下呼吸道炎症状态。呈相对激活状态的肺泡巨噬细胞在哮喘与高脂饮食关联中所起的作用有待进一步的资料证明。由于胆固醇是食物中的普遍成分,而且摄入量越来越大,因此,高脂饮食在哮喘发病中的作用机制需要更多的研究。如果高脂饮食确能诱发或加重哮喘,我们在努力控制哮喘时,增加针对高脂饮食采取的防治措施可能会提高疗效。

参 考 文 献

- [1] Huang SL, Lin KC, Pan WH. Dietary factors associated with physician - diagnosed asthma and allergic rhinitis in teenagers - analysis of the first nutrition and health surveillance in Taiwan [J]. Clin Exp Allergy, 2001, 31(2): 259 - 264.
- [2] Weng S, Zeman L, Standley KN, et al. $\beta 3$ integrin deficiency promotes atherosclerosis and pulmonary inflammation in high - fat - fed, hyperlipidemic mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6730 - 6735.
- [3] Yeh YF, Huang SL. Dietary cholesterol enhances pulmonary eosinophilic inflammation in a murine model of asthma [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2001, 125(4): 329 - 334.
- [4] Gilliland FD, Berhane K, Islam T, et al. Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in schoolage children [J]. Am J Epidemiol, 2003, 158(5): 406 - 415.
- [5] Inselman LS, Chander A, Spitzer AR. Diminished lung compliance and elevated surfactant lipids and proteins in nutritionally obese young rats [J]. Lung, 2004, 182(2): 101 - 117.
- [6] 胡厚源, 陈运贞. 氧化 HDL 对内皮细胞 MCP-1, ICAM-1 含量和细胞内游离钙浓度的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(6): 559 - 562.
- [7] Jin S, Tian D, Chen JG, et al. Passive sensitization increases histamine - stimulated calcium signaling and NF- κ B transcription activity in bronchial epithelial cells [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2006, 27(6): 708 - 714.
- [8] Kim MS, Lim WK, Park RK, et al. Involvement of mitogen - activated protein kinase and NF - kappa B activation in Ca^{2+} - induced IL - 8 production in human mast cells [J]. Cytokine, 2005, 32(5): 226 - 233.
- [9] Julie B, Young S, Heather A, et al. Oxidized low - density lipoprotein activates migration and degranulation of human granulocytes [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(6): 702 - 709.
- [10] 钱效森, 林耀广, 孙梅励. 豚鼠支气管哮喘时血管紧张素系统的变化及糖皮质激素对其的作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(6): 577 - 579.