

[文章编号] 1000-4718(2007)06-1111-05

心房钠尿肽对肺泡 II 型上皮细胞的保护作用

闫志强^{1#}, 魏敏², 李志超^{1△}, 李志斌¹, 刘毅¹,
张博¹, 张齐¹, 彭利静¹, 罗颖¹⁽¹⁾第四军医大学病理生理学教研室, 陕西 西安 710032; ⁽²⁾新疆军区克州军分区卫生所, 新疆 阿图什 845350)

[摘要] 目的: 探讨心房钠尿肽(ANP)对脂多糖(LPS)引起肺泡 II 型上皮细胞(AT-II)损伤的治疗作用。方法: 分离培养 AT-II, 以 LPS 复制大鼠 AT-II 损伤模型, 分别给予 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 等不同剂量的 ANP 进行治疗, 通过观察 4 h、12 h、24 h 等时点细胞培养上清液中 LDH、MDA、AKP、总磷脂(TPL)水平及细胞培养上清液表面张力(ST)变化, 研究 ANP 对 LPS 引起的 AT-II 损伤的治疗作用。结果: 在不同剂量、不同时间条件下, 各 ANP 组细胞培养上清液 LDH、AKP 活性及 MDA 含量均明显低于 LPS 组, 呈明显的剂量依赖性和时间依赖性, 以高剂量组(10^{-6})和 12 h 时点疗效最佳。以 12 h 时点为例, 细胞培养上清液中 AKP 活性为: control(43.5 ± 10.4) U/L, LPS(98.1 ± 16.4) U/L, LPS + ANP(10^{-6}) (46.4 ± 10.5) U/L, LPS + ANP(10^{-7}) (60.7 ± 9.5) U/L, LPS + ANP(10^{-8}) (91.3 ± 13.9) U/L。LPS 组细胞培养上清液中 TPL 含量明显低于对照组, ST 水平明显高于对照组, 不同剂量、不同时间点的各 ANP 组细胞培养上清液中 TPL 含量均不同程度地高于对应的 LPS 组, 各 ANP 组细胞培养上清液中的 ST 水平均低于对应的 LPS 组。结论: ANP 可显著减轻 LPS 引起的 AT-II 损伤, 促进肺表面活性物质(PS)的合成、分泌, 且该作用有明显的剂量依赖性和时间依赖性。

[关键词] 心钠素; 呼吸窘迫综合征; 肺泡**[中图分类号]** R563.1 **[文献标识码]** A

Protective effect of atrial natriuretic peptide on alveolar type II cells

YAN Zhi-qiang¹, WEI Min², LI Zhi-chao¹, LI Zhi-bin¹, LIU Yi¹, ZHANG Bo¹,
ZHANG Qi¹, PENG LI-jing¹, LUO Ying¹⁽¹⁾Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China;
⁽²⁾Infirmery of Kezhou Military Subregion in Xinjiang, Atushi 845350, China. E-mail: lizhic@fmmu.edu.cn

[ABSTRACT] **AIM:** To study the protective effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on alveolar type II cells (AT-II) damaged by lipopolysaccharide (LPS). **METHODS:** AT-II were placed in a 6 well cell culture cluster (0.5×10^6 cells/cm²) and divided into 3 groups: (1) control group ($n=6$), the medium consisted of RPMI-1640 without FBS. (2) LPS group ($n=6$), the medium consisted of RPMI-1640 without FBS supplemented with LPS (1 mg/L). (3) ANP group ($n=6$), the medium consisted of RPMI-1640 without FBS supplemented with LPS (1 mg/L) and ANP (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L). After 4, 12 and 24 h, the cell culture mediums of control group, LPS group and ANP (10^{-7} mol/L) group were collected, and those of the ANP (10^{-6} , 10^{-8} mol/L) group were collected after 12 h. Alkaline phosphatase (AKP), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), total phospholipids (TPL) and surface tension (ST) in the medium of every group were examined. **RESULTS:** AT-II were characterized by AKP staining. The contents of LDH, AKP and MDA in the medium of every ANP group were lower than those in the corresponding LPS group. The TPL content in the medium of every ANP group was higher than that in the corresponding LPS group, and the change of ST of the medium was opposite to that of TPL. The effect at 12 h was the most significant, for example, at 12 h, the activities of AKP in the mediums were: control (43.5 ± 10.4) U/L, LPS (98.1 ± 16.4) U/L, LPS + ANP (10^{-6}) (46.4 ± 10.5) U/L, LPS + ANP(10^{-7}) (60.7 ± 9.5) U/L, LPS + ANP(10^{-8}) (91.3 ± 13.9) U/L. **CONCLUSION:** ANP protects the AT-II from being damaged by LPS and promotes the secretion of pulmonary surfactants.

[KEY WORDS] Atrial natriuretic factor; Respiratory distress syndrome; Pulmonary alveoli

[收稿日期] 2005-09-22 [修回日期] 2005-12-19

现在新疆乌鲁木齐市兰州军区乌鲁木齐总医院, 830000

△ 通讯作者 Tel: 029-84774548; E-mail: lizhic@fmmu.edu.cn

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是指由各种肺内外致病因素所导致的急性、进行性呼吸衰竭, 是急性肺损伤的严重阶段, 是常见且难治的临床急性危重症, 发病机制复杂, 治疗方法有限, 死亡率高达 50%。到目前为止, 仍然没有特效治疗措施, 近年来出现了一些新疗法, 但治疗效果仍不理想, 死亡率仍较高。肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar type II cells, AT - II) 对于维持肺功能具有重要作用, 该细胞损伤是 ARDS 发病过程中的重要环节之一。本室以往的研究已证明心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 对 ARDS 有治疗作用, 且该治疗作用可能与 ANP 保护 AT - II 有关^[1]。本实验拟利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 复制的体外培养 AT - II 损伤模型, 进一步探讨 ANP 对 AT - II 的保护作用。

材 料 和 方 法

1 材料

雄性 SD 大鼠, 体重 200 - 220 g, 第四军医大学实验动物中心提供; RPMI - 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; DNase I 购自华美公司; ANP、LPS、胰蛋白酶、Hepes 及 EGTA 均购自美国 Sigma 公司; 大鼠 IgG、DAB 及 BCIP/NBT 显色浓缩液购自北京中山生物技术公司; SP - A 多克隆抗体、SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司; 乳酸脱氢酶 (LDH)、碱性磷酸酶 (AKP)、丙二醛 (MDA) 试剂盒为南京建成生物工程研究所生产; 磷标准溶液为第四军医大学预防系高双斌高级实验师惠赠; CO₂ 恒温孵箱为德国 Kendro 公司生产; 倒置显微镜为 Olympus 公司生产; 725 - C 型紫外可见分光光度计为上海第三分析仪器厂生产; 电子显微镜为日本电子株式会社生产; 其它试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 AT - II 的分离、纯化、培养、鉴定及衰变观察

参照 Dobbs 等^[2]介绍的方法, 略有改动。大鼠称重, 腹腔内注射肝素 (1 × 10⁶ U/L) 4 mL/kg 和乌拉坦 (200 g/L) 5 mL/kg, 无菌条件下腹主动脉放血, 开胸, 用 II 液 [mmol/L: NaCl 140, KCl 5, Hepes 10, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.3, PBS (pH 7.4) 2.5] 经肺动脉冲洗肺内血, 同时经气管插管进行手动通气, 直至肺变苍白。取出心肺进行肺泡灌洗, I 液 [mmol/L: NaCl 140, KCl 5, Hepes 10, glucose 6, EGTA 0.2, PBS (pH 7.4) 2.5] 8 次, 每次 10 mL, II 液 2 次, 每次 10 mL, 37 °C 预热的胰蛋白酶 1 次 (10 mL)。经气管注入 37 °C 预热的 25 g/L 的胰酶消化液 20 mL, 37 °C 水浴消化 20 min, 每隔 5 min 补充胰酶 5 mL。消化完毕, 切除大气道、肺门及大血管等, 加入 5 mL 血清、4 mL

DNase I, 将肺组织剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块, 每分钟 130 次, 振荡 3 - 5 min, 120 目、200 目不锈钢网逐级过滤, 1 000 r/min 离心 8 min。用不含血清的 RPMI - 1640 培养液重悬细胞并计数, 调浓度至 2 × 10⁹ cells/L, 接种于包被大鼠 IgG 的细菌培养皿 (直径 90 mm) 10 mL/皿。37 °C、5% CO₂、95% 空气条件下孵育 1 h, 移出上清液中未黏附细胞, 离心收集细胞, 台盼蓝排斥试验证实活细胞率大于 93%。用含 15% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养液重悬细胞并计数, 调浓度至 1 × 10⁹ cells/L, 接种于培养板 0.5 × 10⁶ cells/cm²。37 °C、5% CO₂、95% 空气条件下孵育培养, 24 h 换液, 弃未贴壁细胞, 贴壁细胞即为分离、纯化的 AT - II。AKP 染色, 胞浆内可见深蓝色的阳性反应产物。SP - A 免疫细胞化学染色, 胞浆内可见橙黄色阳性反应产物。电镜下可见板层小体结构。综合上述 3 种鉴定方法, 阳性细胞率大于 88%。通过光镜观察及 AKP 染色证实, AT - II 在培养 60 h 内无明显衰变, 36 - 60 h 适合实验。

2.2 观察指标

①细胞培养上清液总磷脂 (total phospholipids, TPL) 的测定 采用 Bartlett^[3]法略有改动。细胞培养上清液中加入 2 倍体积的氯仿 - 甲醇 (2: 1, V/V) 萃取液, 振荡 1 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃上层液体但不弃界面杂质。加入 1/4 体积的甲醇 - 水 (1: 1, V/V) 萃取液, 振荡 1 min, 2 500 r/min 离心 10 min。弃去上层液及界面杂质, 氮气吹干, 即得到磷脂, -20 °C 保存待测。将磷脂加入 1 mL 高氯酸加热, 温度由低到高逐渐上升, 直至颜色由黑变白, 表示磷脂完全氧化, 继续加热蒸干高氯酸。磷钼蓝比色法测定样本中无机磷含量。根据磷脂中磷含量约为 0.04, 算出磷脂含量。

②细胞培养上清液表面张力 (surface tension, ST) 的测定 将毛细玻璃管垂直插入到细胞培养上清液中, 测量毛细管内外液面高度差, 根据拉普拉斯方程 $\sigma = \rho g (h + r/3)/2$ 计算出细胞培养上清液的 ST, 以此来反映肺泡表面活性物质 (pulmonary surfactants, PS) 的功能。其中, σ 为表面张力 (单位为 mN/m), r 为毛细管半径, ρ 为液体密度, g 为重力加速度, h 为内外液面高度差。

③细胞培养上清液中 LDH、AKP、MDA 水平的测定 按试剂盒说明书操作。

2.3 实验分组 调制浓度为 1 × 10⁶ cells/L 的细胞悬液, 常规接种于 6 孔培养板, 培养 36 h 后按下述分组: ① control 组 ($n = 6$) 每孔加入 2.5 mL 无血清 RPMI - 1640, 分别在 4、12、24 h 收集样品。② LPS 组 ($n = 6$) 每孔加入含 LPS (1 mg/L) 的无血清 RPMI - 1640 2.5 mL, 分别在 4、12、24 h 收集样品。③

ANP组($n = 6$) 每孔加入 2.5 mL 无血清 RPMI - 1640, 其中含 LPS 1 mg/L, ANP 含量分别为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L。ANP(10^{-7}) 组分别在 4、12、24 h 收集样品, ANP(10^{-6}) 组及 ANP(10^{-8}) 组于 12 h 收集样品。

3 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 组间差别以完全随机设计资料的方差分析处理。

结 果

1 ANP 对 AT - II 的保护作用

在不同剂量、不同时间条件下, 各 ANP 组细胞培养上清液 LDH、AKP 活性及 MDA 含量均低于 LPS 组。在 10^{-8} - 10^{-6} mol/L 范围内 ANP 作用呈明显的剂量依赖性, 以高剂量组 (10^{-6} mol/L) 效果最佳, 3 项指标均达正常水平; 以低剂量组 (10^{-8} mol/L) 效果最差, 3 项指标与 LPS 组无显著差异。我们以 LPS 组和 ANP 组的差值作为判断 ANP 疗效的指标, 结果显示 3 项指标均以 12 h 时点疗效最佳 (图 1 - 6)。

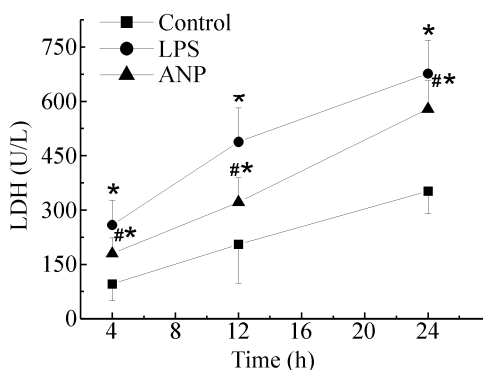


Fig 1 The change of LDH in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS.

图 1 各组 LDH 水平的变化

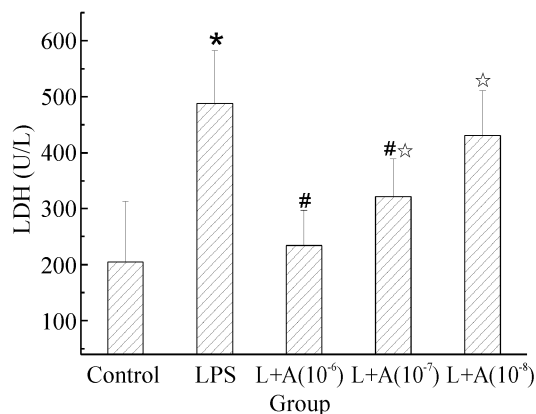


Fig 2 The change of LDH in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS; ☆ $P < 0.05$ vs the previous dose group of the ANP group.

图 2 各组 LDH 水平的变化

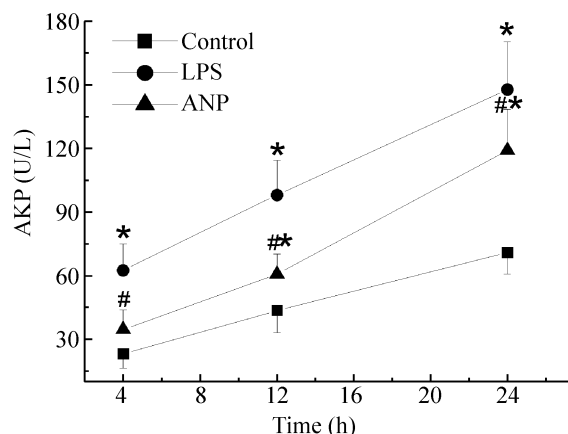


Fig 3 The change of AKP in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS.

图 3 各组 AKP 水平的变化

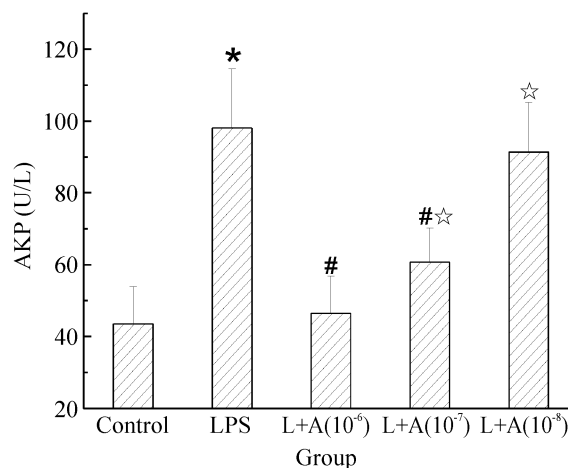


Fig 4 The change of AKP in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS; ☆ $P < 0.05$ vs the previous dose groups of the ANP group.

图 4 各组 AKP 水平的变化

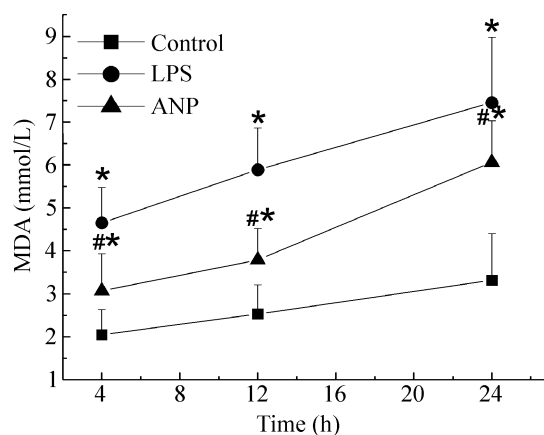


Fig 5 The change of MDA in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS.

图 5 各组 MDA 水平的变化

2 ANP 促进 AT - II 合成、分泌 PS 的作用

与 control 组比较, LPS 组细胞培养上清液中 TPL 含量明显降低, ST 水平显著升高。在不同剂量、不同时间条件下, 各 ANP 组细胞培养上清液中 TPL 含量均

高于 LPS 组,各 ANP 组细胞培养上清液 ST 均低于 LPS 组,在 10^{-8} - 10^{-6} mol/L 范围内有剂量依赖性,4、12、24 h 3 个时点以 12 h 疗效最佳(图 7 - 10)。

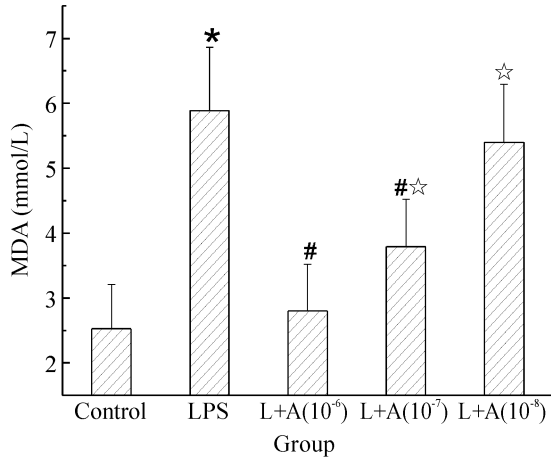


Fig 6 The change of MDA in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS; ☆ $P < 0.05$ vs the previous dose groups of the ANP group.

图 6 各组 MDA 水平的变化

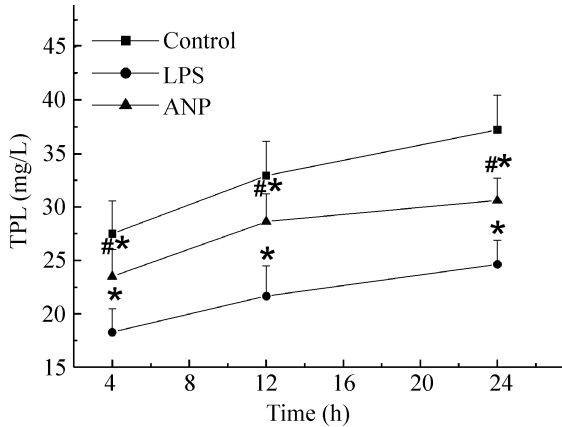


Fig 7 The change of TPL in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS.

图 7 各组 TPL 水平的变化

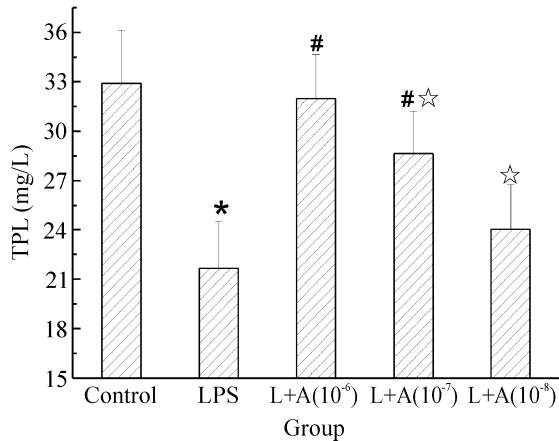


Fig 8 The change of TPL in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS; ☆ $P < 0.05$ vs the previous dose groups of the ANP group.

图 8 各组 TPL 水平的变化

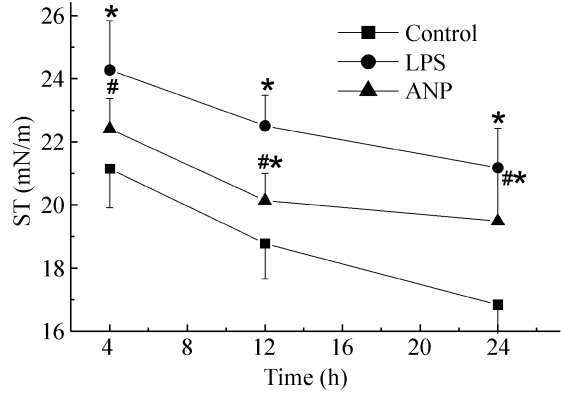


Fig 9 The change of ST in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS.

图 9 各组 ST 水平的变化

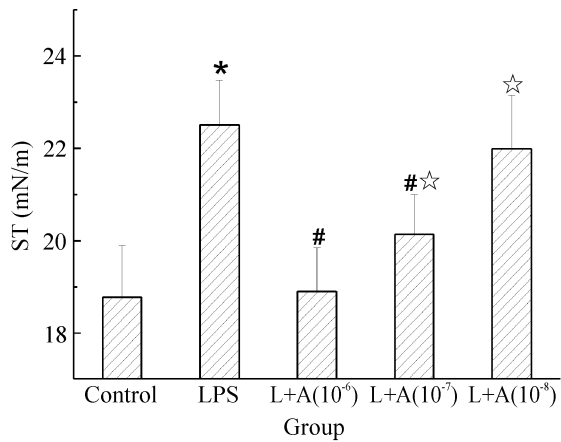


Fig 10 The change of ST in different groups. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs LPS; ☆ $P < 0.05$ vs the previous dose groups of the ANP group.

图 10 各组 ST 水平的变化

讨 论

多年来 ARDS 一直是科研工作者关注的焦点,现已明确革兰阴性菌感染、LPS 血症是其主要致病原因之一。LPS 引起 AT - II 损伤以及 PS 含量减少或功能减弱,导致肺泡表面张力增加,引起肺不张,加重 ARDS。可见 AT - II 损伤及 PS 异常既是肺损伤的结果,又是进一步加重肺损伤的基础,是 ARDS 发病中的重要环节之一。郑闵琴等^[4]证实给大鼠注射 LPS 后 AT - II 出现不同程度的退变或崩解、AT - II 内板层小体减少、肺内 PS 含量及活性下降。Li 等^[5]利用体外培养的 AT - II 证实 LPS 可以明显抑制 AT - II 合成 PS。近年来 ANP 对 ARDS 的疗效已经明确,但机制不清。Tharaux 等^[6]证实 AT - II 表面存在 ANP 受体。Irwin 等^[7]发现阻断 ANP 可加重 LPS 予处理的大鼠高原性肺水肿。本室先后证实:静脉注射 ANP 可使油酸或 LPS 性 ARDS 动物血及肺泡灌洗液中炎性因子含量明显下降,肺湿/干质量比显著降低,动脉氧分压升高,肺组织结构损伤明显减轻;

ANP 可减轻 LPS 引起的肺微血管内皮细胞损伤^[8-10]。本室于 2004 年已通过整体动物实验证实 ANP 可明显减轻 LPS 引起的急性肺损伤,且该治疗作用可能与 ANP 保护 AT - II 并促进其合成、分泌 PS 有关^[1]。

LDH 是胞内酶,细胞变性、损伤时 LDH 释放到胞外,使细胞培养上清液中 LDH 活性升高,目前已成为公认的反应细胞损伤的指标。AKP 是 AT - II 的特异性分化标志,AT - II 变性、坏死时胞内的 AKP 进入细胞培养上清液。因此,细胞培养上清液中 AKP 活性强弱可以特异性反映 AT - II 损伤程度。MDA 是脂质过氧化反应的代谢产物,测定其含量可反映机体脂质过氧化的程度,间接反应细胞损伤的机制。磷脂是 PS 的主要成分,占其质量的 80%,所以测定细胞培养上清液中 TPL 能间接反映 PS 含量变化。因此,细胞培养上清液中 TPL 能反映 AT - II 合成、分泌 PS 的功能。PS 由 AT - II 合成、分泌,在降低肺泡表面张力、调节肺部免疫功能等方面起着重要作用,是 ARDS 病理生理过程中至关重要的环节之一。PS 的主要功能之一是降低气液界面表面张力,细胞培养上清液 ST 反映 PS 降低表面张力的功能,ST 是 PS 质和量的综合体现,间接反映 AT - II 合成、分泌 PS 的功能。本实验中 LDH、AKP 及 MDA 水平变化说明 ANP 可明显减轻 LPS 引起的 AT - II 损伤,其疗效有明显的剂量依赖性和时间依赖性,该作用可能与 ANP 抑制脂质过氧化有关;TPL、ST 水平的变化说明 LPS 可使 AT - II 合成、分泌 PS 功能下降,ANP 可促进 AT - II 合成、分泌 PS,降低表面张力。为 ANP 治疗 ARDS 提供了实验依据,但 ANP 对 AT - II 的作用方式尚有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 闫志强,李志超,李志斌,等. 心房钠尿肽对急性肺损伤的治疗作用及其可能机制[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(23): 2199 - 2201.
- [2] Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity [J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 134(1): 141 - 145.
- [3] Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography [J]. Biol Chem, 1959, 234(3): 466 - 468.
- [4] 郑闵琴,汪盛贤,潘传敬,等. 内毒素损伤大鼠肺组织的面积密度变化及其发生机制[J]. 中国体视学与图像分析, 1999, 4(4): 251 - 256.
- [5] Li JJ, Sanders RL, McAdam KP, et al. Endotoxin suppresses surfactant synthesis in cultured rat lung cells[J]. J Trauma, 1989, 29(2): 180 - 188.
- [6] Tharaux PL, Dussaule JC, Couette S, et al. Evidence for functional ANP receptors in cultured alveolar type II cells [J]. Am J Physiol, 1998, 274(2Pt 1): L244 - L251.
- [7] Irwin DC, Rhodes J, Baker DC, et al. Atrial natriuretic peptide blockade exacerbates high altitude pulmonary edema in endotoxin - primed rats [J]. High Alt Med Biol, 2001, 2(3): 349 - 360.
- [8] 林允信,张丙芳,戚好文,等. 心钠素对兔油酸型急性肺损伤血及支气管肺泡灌洗液中 TNF α 、IL - 8、ET - 1 含量的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(15): 1395 - 1397.
- [9] 苗新芳,戚好文,李志超. ANP 对急性肺损伤大鼠 AQP1 表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(24): 2241 - 2243.
- [10] 李志斌,李志超,闫志强,等. 心房钠尿肽对脂多糖引起肺微血管内皮细胞损伤的治疗作用[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(4): 289 - 292.