

降钙素基因相关肽对高氧暴露下肺泡Ⅰ型上皮细胞增殖及蛋白激酶C α 信号途径的调控作用

付红敏 李利 王亚军 汤春辉 米弘琰 许峰 匡凤梧

【摘要】 目的 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)对高氧暴露下肺泡Ⅰ型上皮细胞(AECⅠ)的促增殖作用及其蛋白激酶C α /核转录因子- κ B(PKC α /NF- κ B)信号途径的调控机制。方法 将原代分离培养的孕21 d胎鼠AECⅠ分为空气组、高氧组、高氧CGRP组、高氧CGRP拮抗剂组。空气组和高氧组分别在21% O₂或85% O₂中暴露24 h;高氧CGRP组在高氧处理前加入CGRP,高氧CGRP拮抗剂组同时加入CGRP和CGRP受体拮抗剂CGRP8-37。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法和流式细胞术测定细胞增殖能力和不同细胞周期细胞比例;蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测胞膜和胞质PKC α 的表达;激光共聚焦检测NF- κ B p65的细胞核表达。结果 高氧组G0/G1期细胞比例明显高于空气组[(80.652±6.253)%比(45.825±2.899)%],而细胞增殖率[(68.752±5.766)%比(100.000±6.682)%]及S期、G2/M期细胞比例[分别为(14.198±4.785)%比(27.470±2.775)%,(5.148±1.688)%比(26.708±1.863)%]均低于空气组(均P<0.01)。CGRP干预可提高高氧暴露AECⅠ的增殖能力[(94.813±6.102)%],使S期和G2/M期细胞增多[(30.547±9.861)%,(17.668±9.509)%],均P<0.01。高氧组胞膜与胞质PKC α 比值显著低于空气组(0.63±0.10比1.00±0.09),而NF- κ B p65的荧光强度高于空气组(22.98±2.20比14.54±2.35);高氧CGRP组胞膜与胞质PKC α 比值(1.41±0.23)及核内NF- κ B p65荧光强度(35.38±3.37)均高于高氧组(0.63±0.10,22.98±2.20)及高氧CGRP拮抗剂组(0.74±0.10,24.88±1.81,均P<0.01)。结论 CGRP可促进高氧暴露下AECⅠ的生长增殖;PKC α 参与了CGRP对细胞作用的信号传递,而NF- κ B是PKC α 的下游分子之一,仅部分执行PKC α 的效应。

【关键词】 肺泡Ⅰ型上皮细胞; 蛋白激酶C; 核转录因子- κ B; 降钙素基因相关肽; 高氧

The proliferation-promoting effects of calcitonin gene-related peptide on type I alveolar epithelial cell exposed to hyperoxia mediated by protein kinase C α pathway FU Hong-min*, LI Li, WANG Ya-jun, TANG Chun-hui, MI Hong-ying, XU Feng, KUANG Feng-wu. * Department of Pediatrics, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China
Corresponding author: XU Feng, Email: xufeng9899@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on type I alveolar epithelial cell (AECⅠ) exposed to hyperoxia, and to determine whether the mechanism is mediated by protein kinase C α /nuclear factor- κ B (PKC α /NF- κ B) signal pathway. Methods AECⅠ were isolated from the lung of 21 days fetal rat and cultured for 15 hours to coalesce. Then AECⅠ were randomly assigned into four groups: air, hyperoxia, O₂/CGRP, and O₂/CGRP8-37 (a receptor antagonist against CGRP). AECⅠ were exposed to FiO₂ 21% (air) or 85% (hyperoxia) for 24 hours respectively. In O₂/CGRP and O₂/CGRP8-37 groups CGRP or both CGRP and CGRP8-37 were added into cultural fluid before placing the plate into 85% oxygen. Cell proliferation ability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and cell cycles by flow cytometry. Western blotting was employed to detect the fraction of PKC α in membrane and cytosol, and translocation of NF- κ B was observed under laser confocal microscopy. Results AECⅠ in hyperoxia group showed a decreased viability of AECⅠ [(68.752±5.766)% vs. (100.000±6.682)%] and had an enhanced percentage of G0/G1 phase [(80.652±6.253)% vs. (45.825±2.899)%] with a corresponding decline in percentage of S phase [(14.198±4.785)% vs. (27.470±2.775)%] and G2/M phases [(5.148±1.688)% vs. (26.708±1.863)%] compared with AECⅠ in air (all P<0.01). Addition with CGRP before hyperoxia exposure promoted AECⅠ proliferation [(94.813±6.102)%] and enhanced the cell proportions in S and G2/M phases [(30.547±9.861)% and (17.668±9.509)%], all P<0.01. The ratio of membrane to cytoplasm fraction of PKC α declined (0.63±0.10 vs. 1.00±0.09) and the fluorescence of NF- κ B in nucleus enhanced (22.98±2.20 vs. 14.54±2.35) in hyperoxia compared with that in air, while both the ratio of PKC α and intensity of NF- κ B were increased in O₂/CGRP group (1.41±0.23, 35.38±3.37) compared with those in hyperoxia (0.63±0.10, 22.98±2.20) and O₂/CGRP8-37 groups (0.74±0.10, 24.88±1.81, all P<0.01). Conclusion CGRP could promote proliferation of AECⅠ when exposed to high oxygen tension. PKC α participates in the signal transduction process and NF- κ B is a downstream molecular of PKC α , executing in part the function of PKC α signal.

【Key words】 Type I alveolar epithelial cell; Protein kinase C; Nuclear factor- κ B; Calcitonin gene-related peptide; Hyperoxia

降钙素基因相关肽(CGRP)是广泛分布于肺、心、脑等组织的神经肽类递质,能诱导多种细胞的增殖与分化,并参与了胚胎肺发育的进程^[1]。蛋白激酶Ca/核转录因子- κ B(PKCa/NF- κ B)信号通路参与机体多种重要的生理活动和病理过程,并与细胞的增殖分化有关^[2]。本研究中通过测定孕 21 d 胎鼠肺泡 I 型上皮细胞(AEC I)的细胞周期以及 PKCa、NF- κ B 的表达,观察 CGRP 对高氧暴露下 AEC I 生长增殖的影响,并探讨其作用途径是否涉及到 PKCa 信号途径,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂:孕 21 d SD 大鼠(第三军医大学大坪医院动物中心提供);胰蛋白酶(美国 BBI 公司);胶原酶 I (美国 Sigma 公司);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);大鼠 CGRP、CGRP8-37(美国 Anaspec 公司);兔肺表面活性蛋白 C(SPC)、PKCa、NF- κ B p65 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 胎鼠 AEC I 的分离、培养与鉴定:参照本室的方法分离和培养胎鼠 AEC I^[3]。在透射电镜下鉴定,并用免疫荧光鉴定 AEC I 胞质中的 SPC 表达情况来判断细胞纯度。

1.3 高氧损伤模型的建立及实验分组:将 AEC I 分为 4 组,各组处理方法如下。①空气组:置于含 5%CO₂、21%O₂ 的孵箱内培养;②高氧组:置于密闭氧仓,通入 85% O₂、5% CO₂、10% N₂ 的混合气体;③高氧 CGRP 组:预先加入 0.01 μ mol/L CGRP,再行高氧处理;④高氧 CGRP 拮抗剂组:细胞培养液中加入 0.01 μ mol/L CGRP 和 0.1 μ mol/L CGRP 拮抗剂 CGRP8-37,其余处理同高氧组。各组细胞均置于 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 细胞增殖率测定:采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法,用酶标仪检测细胞培养板各孔的吸光度(A)值。细胞增殖率(%)=处理孔 A 值/对照孔 A 值 \times 100%。

1.4.2 细胞周期检测:各组细胞处理完毕后弃去培养液,胰蛋白酶消化并离心,乙醇固定,流式细胞仪计算 G0/G1、S、G2/M 各期细胞比例。

1.4.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定 PKCa 蛋白表达:按试剂盒说明书抽提胞膜蛋白和胞质蛋白后,取蛋白质上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉封闭,分别与 PKCa 和二抗共同孵育,免疫荧光法(ECL)检测,Quantity One 4.5.0 软件分析各条带的 A 值。将空气组胞膜与胞质 PKCa 的 A 值比值(PKCam/PKCa_c)设定为 1,各组 PKCam/PKCa_c 的 A 值比值以此为参照得到相对值,进行统计学分析。

1.4.4 激光共聚焦法检测核内 NF- κ B p65 的表达:将细胞爬片,分 4 组处理后用甲醇固定,经 PBS 水化、牛血清白蛋白(BSA)封闭、加入 NF- κ Bp65 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗孵育、4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核、PBS 漂洗等过程后封片,显微镜下观察并采集图像,以荧光强度值进行统计学分析。

1.5 统计学方法:数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,多样本均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞产量和纯度:每 3~5 只胎鼠肺组织可分离获得 AEC I 细胞数平均为 $(30\pm 5)\times 10^6$ 。AEC I 胞质中的 SPC 在荧光显微镜下呈绿色荧光,表达绿色荧光的细胞占全部细胞的比例为 95% 以上。

2.2 CGRP 对高氧暴露下 AEC I 增殖率的影响(表 1):高氧组细胞的 A 值显著低于空气组($P<0.01$);当预先加入 CGRP 后,A 值增高,与高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组相比差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。说明存活细胞增多、生长增殖更活跃。

2.3 CGRP 对高氧暴露下 AEC I 细胞周期分布的影响(表 1):暴露于高氧后,AEC I 细胞 G0/G1 期细胞比例显著高于空气组,而 S 期、G2/M 期细胞比例显著低于空气组(均 $P<0.01$)。与高氧组和高氧 CGRP 拮抗剂组相比,高氧 CGRP 组 G0/G1 期细胞比例降低,而 S 期、G2/M 期细胞比例增高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

2.4 AEC I 中 PKCa 的膜转位情况(表 2;图 1):高氧组 AEC I 细胞 PKCam/PKCa_c 显著低于空气组($P<0.01$);而高氧 CGRP 组 PKCam/PKCa_c 比值高于高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组(均 $P<0.01$)。PKCam/PKCa_c 比值增高,提示 PKCa 发生了膜转位现象,使 PKCa 得以活化。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.05.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30670931);云南省应用基础研究项目(2008ZC083M)

作者单位:650032 昆明,云南省第一人民医院儿科(付红敏、王亚军、汤睿辉、米弘瑛、秦黎、李利);重庆医科大学儿童医院 PICU(许峰、匡凤梧)

通信作者:许峰,Email:xufeng9899@yahoo.com.cn

表 1 CGRP 对高氧暴露胎鼠 AEC I 增殖率及细胞周期分布的影响($\bar{x}\pm s$)

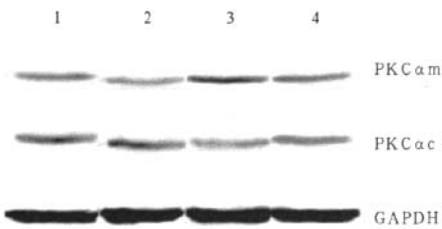
组别	样本数	AEC I 增殖情况		细胞周期分布(%)			
		A 值	增殖率(%)	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	S+G2/M 期
空气组	6	0.206±0.014	100.000±6.682	45.825±2.899	27.470±2.775	26.708±1.863	54.178±2.898
高氧组	6	0.141±0.012 ^a	68.752±5.766 ^a	80.652±6.253 ^a	14.198±4.785 ^a	5.148±1.688 ^a	19.347±6.253 ^a
高氧 CGRP 组	6	0.195±0.013 ^b	94.813±6.102 ^b	51.787±3.479 ^b	30.547±9.861 ^b	17.668±9.509 ^b	48.215±3.475 ^b
高氧 CGRP 拮抗剂组	6	0.146±0.014 ^c	71.199±6.655 ^c	79.830±7.795 ^c	12.175±3.692 ^c	7.993±4.658 ^c	20.168±7.800 ^c

注:CGRP:降钙素基因相关肽,AEC I:肺泡 I 型上皮细胞;与空气组比较,^a $P<0.01$;与高氧组比较,^b $P<0.01$;与高氧 CGRP 组比较,^c $P<0.01$

表 2 各组胎鼠 AEC I 中 PKCam/PKCac 比值及 NF-κBp65 荧光强度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	PKCam/PKCac	NF-κBp65
		比值	荧光强度
空气组	6	1.00±0.09	14.54±2.35
高氧组	6	0.63±0.10 ^a	22.98±2.20 ^a
高氧 CGRP 组	6	1.41±0.23 ^b	35.38±3.37 ^b
高氧 CGRP 拮抗剂组	6	0.74±0.10 ^c	24.88±1.81 ^c

注:AEC I:肺泡 I 型上皮细胞,PKCam/PKCac:胞膜与胞质蛋白激酶 Cα,NF-κB:核转录因子-κB,CGRP:降钙素基因相关肽;与空气组比较,^a $P<0.01$;与高氧组比较,^b $P<0.01$;与高氧 CGRP 组比较,^c $P<0.01$



AEC I:肺泡 I 型上皮细胞,PKC:蛋白激酶 C,PKCam:胞膜 PKCα,PKCac:胞质 PKCα,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶,1~4 依次为:空气组、高氧组、高氧 CGRP 组、高氧 CGRP 拮抗剂组,CGRP:降钙素基因相关肽

图 1 蛋白质免疫印迹法检测各组胎鼠 AEC I 中 PKCam/PKCac 的表达

2.5 AEC I 核内 NF-κB 的活化(表 2;彩色插图 2):激光共聚焦显微镜下观察,空气组核内 NF-κB 的绿色荧光较弱,高氧组细胞核内的绿色荧光强于空气组;当在高氧组细胞中加入 CGRP 干预后,核内的绿色荧光进一步增强。提示高氧或 CGRP 预处理均引起了核内 NF-κB 的表达增强。

3 讨论

既往研究已经证实,早产儿吸入高浓度氧可导致支气管肺发育不良(BPD)^[4]。其主要原因是高氧可抑制 AEC I 增殖,导致肺囊泡分裂和肺泡化进程受阻^[5-6]。CGRP 是一种细胞调控因子和细胞外信号

分子,与胚胎发育和细胞增殖分化有关。研究显示,在肺部发育早期,若肺神经内分泌细胞中 CGRP 表达延迟可导致肺发育受阻;对培养的神经细胞、心肌细胞及内皮细胞,CGRP 均有强大的刺激增殖作用^[7-8]。本课题组在前期研究中以孕 19 d 早产鼠 AEC I 为研究对象,发现 CGRP 可解除 60% O₂ 对 AEC I 的生长抑制作用^[9-10]。本研究中以足月胎鼠 AEC I 为研究对象,通过测定细胞增殖率、细胞周期以了解高氧对 AEC I 增殖的影响。结果显示高氧组细胞增殖能力及 S 期和 G2/M 期细胞比例显著低于空气组,而 G0/G1 期的细胞比例明显增高;预先加入 CGRP 后,细胞活性显著增高,S 期和 G2/M 期的细胞比例增多;当用拮抗剂阻断 CGRP 的作用后,上述指标均下降,接近高氧组水平。进一步表明了 CGRP 对 AEC I 的促增殖作用。

PKCα 是 PKC 家族中的经典成分,具有调控细胞增殖与分化、参与细胞信号传递等作用。静息时,PKCα 以非活性形式存在胞质中,当细胞受到刺激时,其从胞质移位到胞膜,使胞膜比例增高而被活化,并继续激活下游分子,如 NF-κB 等进行信息的传递^[11-12]。PKCα/NF-κB 信号途径参与了多种细胞的增殖分化,如人平滑肌细胞、血管内皮细胞以及神经干细胞增殖等^[13-14]。为了解 CGRP 的下游信号是否涉及 PKCα/NF-κB 信号途径,本结果显示,细胞暴露于高氧后,PKCam/PKCac 比值显著降低,与空气组比较差异显著;而高氧 CGRP 组二者比值高于高氧组及高氧 CGRP 拮抗剂组。提示高氧抑制了 PKCα 的激活,而 CGRP 可引起 PKCα 膜转位及活化,而这可能与 CGRP 对高氧的促增殖作用有关。

本研究中用激光共聚焦测定 AEC I 细胞核内 NF-κB 表达,结果显示,暴露于高氧的 3 组细胞核内 NF-κB 荧光强度均强于空气组,而高氧 CGRP 组核内 NF-κB 荧光强度又显著强于高氧组和高氧 CGRP 拮抗剂组,这与 PKCα 的变化不完全一致,说明 NF-κB 活化还有其他因素参与。由于细胞信号网

络是一个复杂的系统,多条途径常常交互在一起作用,最终的效应可能需综合多种因素考虑。

参考文献

[1] Van Lommel A. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB); chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr Respir Rev*, 2001, 2: 171-176.
 [2] 陈敏, 唐建武. PKC 亚型的生物学特性与调节功能. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2002, 22: 493-496.
 [3] 付红敏, 许峰, 黄波, 等. 胎鼠肺泡 I 型上皮细胞的分离及原代培养. *重庆医科大学学报*, 2009, 34: 586-589.
 [4] Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol*, 2003, 8: 39-49.
 [5] Helt CE, Staversky RJ, Lee YJ, et al. The Cdk and PCNA domains on p21 Cip1 both function to inhibit G1/S progression during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L506-513.
 [6] 陈娟, 许峰, 蒋静, 等. 氧化应激状态下肺泡 I 型上皮细胞凋亡及细胞外信号调节激酶信号转导机制的研究. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 193-196.
 [7] Villa I, Dal Fiume C, Maestroni A, et al. Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003,

284: E627-633.
 [8] Connat JL, Schnüriger V, Zanone R, et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide differently modulates proliferation and differentiation of smooth muscle cells in culture depending on the cell type. *Regul Pept*, 2001, 101: 169-178.
 [9] 付红敏, 许峰, 黄波, 等. 高氧暴露对早产鼠 AEC I 生长增殖的影响及 CGRP 的干预作用. *第四军医大学学报*, 2009, 30: 389-392.
 [10] 付红敏, 许峰, 刘成军, 等. 高氧对早产鼠肺泡 I 型上皮细胞的影响及降钙素基因相关肽的保护作用. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 578-581.
 [11] Kontny E, Kurowska M, Szczepańska K, et al. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J Leukoc Biol*, 2000, 67: 249-258.
 [12] 蒋丽. 大黄对脓毒症大鼠核因子- κ B 活化的抑制作用. *中西医结合急救杂志*, 2004, 11: 364-367.
 [13] Xu SZ, Shan CJ, Bullock L, et al. Pb²⁺ reduces PKCs and NF- κ B in vitro. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22: 189-198.
 [14] Lu H, Guizzetti M, Costa LG. Inorganic lead stimulates DNA synthesis in human astrocytoma cells: role of protein kinase C alpha. *J Neurochem*, 2001, 78: 590-599.

(收稿日期: 2009-11-22)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

择期手术后发生严重脓毒症的流行趋势

哥伦比亚大学的学者最近对术后脓毒症的流行趋势进行了深入分析。工作人员从 1997 至 2006 年美国全国住院患者数据库中选择因择期手术住院超过 3 d 的成人患者,按世界疾病分类临床修订标准第 9 版诊断为术后脓毒症,伴器官功能障碍时为严重脓毒症。对相关人口学特征、手术程序和并发症进行校正后用 Logistic 回归分析。共分析 2 039 776 例患者,严重脓毒症发生率从 1997 年 0.3% 升至 2006 年 0.9%,校正相关协变量后趋势不变,即校正后严重脓毒症每年升高的优势比是 1.12 (95% 可信区间为 1.11~1.13, $P < 0.001$)。术后严重脓毒症患者的院内病死率从 1997 年 44.4% 降至 2006 年 34.0%,校正后趋势不变,即每年优势比为 0.94 (95% 可信区间为 0.93~0.95, $P < 0.001$)。学者们认为,10 年期间术后脓毒症的发生率明显上升,但住院患者病死率呈下降趋势。

杨明星, 编译自《Anesthesiology》, 2010, 112: 917-925; 胡森, 审校

脓毒症时皮下脂肪组织产生的白细胞介素-6 影响患者血压

细胞因子是脓毒症时机体的主要炎症介质。有资料显示,生理和病理状态时皮下脂肪组织 (SAT) 会产生不同的细胞因子。奥地利学者应用开放流量微循环 (OFM) 技术对严重脓毒症时 SAT 产生的细胞因子与患者血压之间的关系进行了研究。通过装在腹部 SAT 中的 OFM 导管定时收集 9 例严重脓毒症患者的组织液,并抽取患者血液,检测 SAT 液和血浆中的白细胞介素- 1β (IL- 1β)、IL-6 和 IL-8 含量。结果显示, SAT 中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 水平高于血浆中,提示这些细胞因子在插管位置局部生成。心室舒张压 (DBP) 随 SAT 中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 水平反向变化,提示脂肪组织在炎症时产生的细胞因子可能影响到血管舒缩性。多重回归分析显示,平均 DBP 与 SAT 中 IL-6 含量关系密切 ($R_2 = 0.82, P = 0.002$)。研究人员认为,脓毒症时 SAT 产生的 IL-6 参与调控血管舒缩,进而影响血压。

杨明星, 编译自《Cytokine》, 2010-03-18 (电子版); 胡森, 审校

丙酮酸盐复苏能够减轻失血性休克时的全身炎症和心肌氮化应激

最近,美国科学家对丙酮酸林格液 (PR) 能否比普通林格液 (LR) 更有效稳定失血性休克 (HS) 后的平均动脉压 (MAP) 并减轻心肌炎症反应进行了研究。将山羊放血 (255 ± 22) ml 使 MAP 降至 (48 ± 1) mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa) 后,夹闭右侧股动脉 30 min,以 10 ml/min 持续滴入 LR 或 PR 90 min,然后恢复股动脉血流。结果显示,夹闭 4 h 后,PR 和 LR 复苏山羊的 MAP 分别升高至 (59 ± 4) mm Hg 和 (47 ± 3) mm Hg ($P < 0.05$); PR 使血液中的 HCO₃⁻ 和剩余碱值均升高,同时抑制中性粒细胞的升高和心肌中的氮化应激。研究人员因此认为,与 LR 相比,PR 能更有效地稳定 HS 后的 MAP,抑制心肌中的氮化应激,减轻全身炎症反应。

杨明星, 编译自《Mil Med》, 2010, 175: 166-172; 胡森, 审校

降钙素基因相关肽对高氧暴露下肺泡 II 型上皮细胞增殖 及蛋白激酶 C α 信号途径的调控作用

(正文见 263 页)

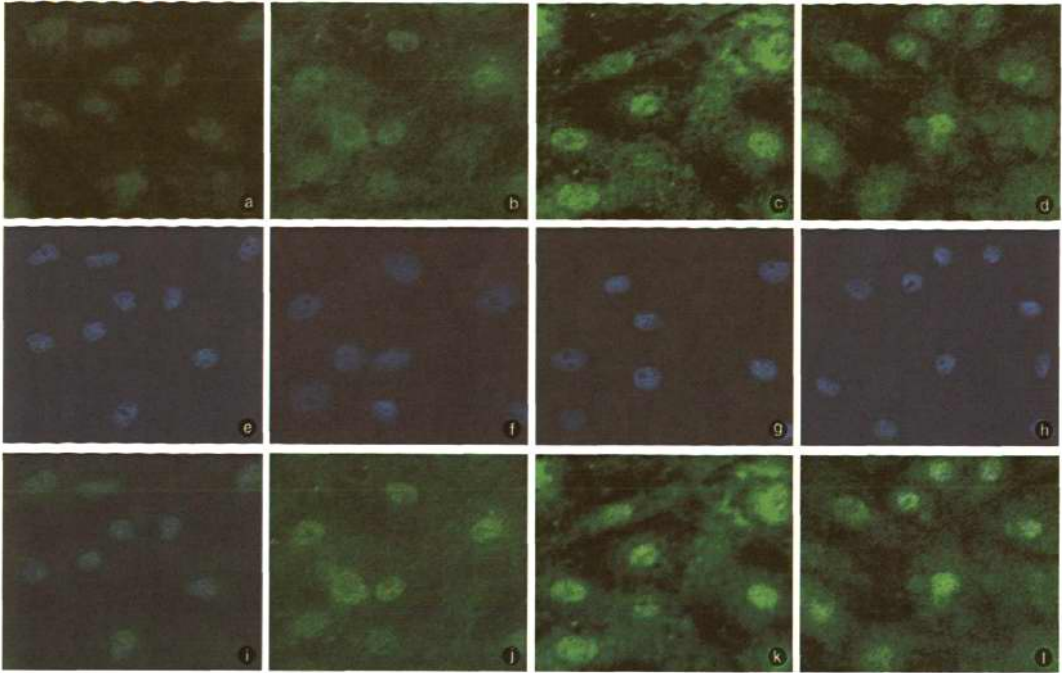


图1 激光共聚焦显微镜下观察核内核转录因子- κ B(NF- κ B)p65的表达 经异硫氰酸荧光素(FITC)标记的荧光二抗孵育后(a~d)呈绿色荧光, NF- κ B p65表达越多, 荧光强度越强, 其中高氧降钙素基因相关肽(CGRP)组(c)绿色荧光最强, 其次为高氧 CGRP 拮抗剂组(d)、高氧组(b), 空气组(a)荧光最弱; 经4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后空气组(e)、高氧组(f)、高氧 CGRP 组(g)、高氧 CGRP 拮抗剂组(h)细胞核染成蓝色, 表达强度一致; 同一张细胞爬片分别经FITC染色与DAPI染色后合成后的图片(i~l), 绿色荧光主要都分布在胞核, 其中高氧 CGRP 组(k)核内绿色荧光最强, 其次为高氧 CGRP 拮抗剂组(l)、高氧组(j), 空气组(i)核内荧光最弱 $\times 200$

还原型谷胱甘肽对脓毒症大鼠肺部超微结构及血中细胞因子水平的影响

(正文见 282 页)

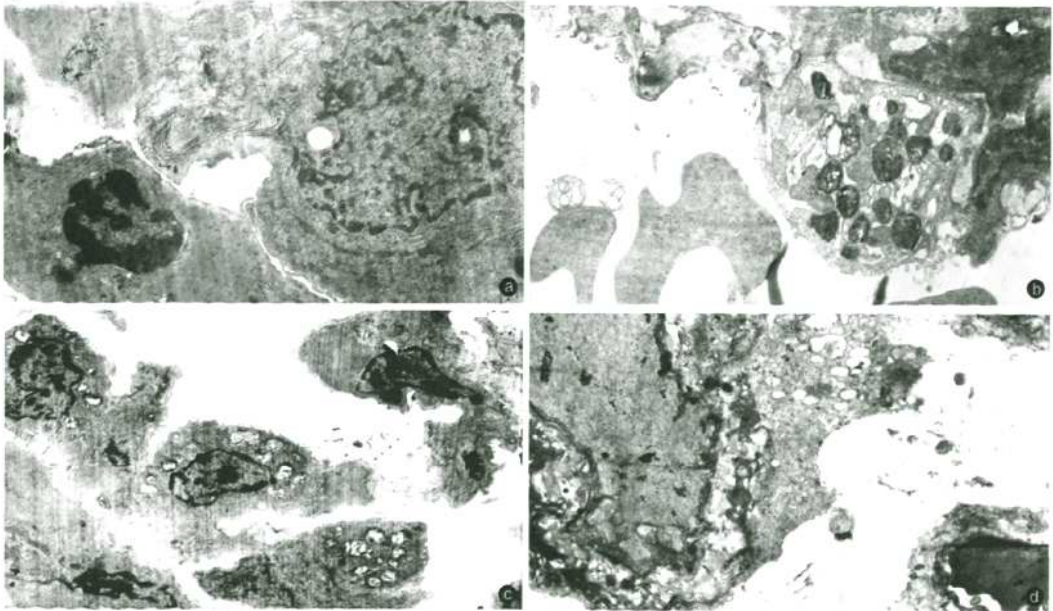


图1 电镜下观察各组大鼠肺组织超微结构改变 假手术组(a)肺泡 II 型上皮细胞结构正常 $\times 6\ 000$, 脓毒症模型组(b)肺泡腔可见红细胞、游离细胞器, 肺泡 II 型上皮细胞水肿, 胞质稀薄, 线粒体肿胀 $\times 6\ 000$, 还原型谷胱甘肽(GSH)组(c)肺泡 II 型上皮细胞结构基本正常, 微绒毛基本存在 $\times 3\ 600$, 左氧氟沙星(LEV)组(d)肺泡 II 型上皮细胞线粒体嵴断裂、消失, 空泡化变性明显 $\times 7\ 000$ 醋酸铀-柠檬酸铅双染

降钙素基因相关肽对高氧暴露下肺泡 II 型上皮细胞增殖及蛋白激酶 C α 信号途径的调控作用

作者: 付红敏, 李利, 王亚军, 汤春辉, 米弘瑛, 许峰, 匡凤梧, FU Hong-min, LI Li, WANG Ya-jun, TANG Chun-hui, MI Hong-ying, XU Feng, KUANG Feng-wu
作者单位: 付红敏, 李利, 王亚军, 汤春辉, 米弘瑛, FU Hong-min, LI Li, WANG Ya-jun, TANG Chun-hui, MI Hong-ying(云南省第一人民医院儿科, 昆明, 650032), 许峰, 匡凤梧, XU Feng, KUANG Feng-wu(重庆医科大学儿童医院PICU)
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2010, 22(5)
被引用次数: 0次

参考文献(14条)

1. Vilia I; Dal Fiume C; Maestroni A; et al Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity 2003
2. Xu SZ; Shan CJ; Bullock L Pb²⁺ reduces PKCs and NF- κ B in vitro 2006(3)
3. 付红敏; 许峰; 黄波 高氧暴露对早产鼠AEC II生长增殖的影响及CGRP的干预作用 2009
4. Connat JL; Schn(u)riger V; Zanone R The neuropeptide calcitonin gene-related peptide differently modulates proliferation and differentiation of smooth muscle cells in culture depending on the cell type 2001
5. 蒋丽 大黄对脓毒症大鼠核因子- κ B活化的抑制作用 2004
6. Kontny E; Kurowska M; Szczepa(n)nska K Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes 2000
7. 付红敏; 许峰; 刘成军 高氧对早产鼠肺泡 II 型上皮细胞的影响及降钙素基因相关肽的保护作用[期刊论文]-中国危重病急救医学 2008(10)
8. 陈娟; 许峰; 蒋静 氧化应激状态下肺泡 II 型上皮细胞凋亡及细胞外信号调节激酶信号转导机制的研究[期刊论文]-中国危重病急救医学 2007(4)
9. Helt CE; Stavarsky RJ; Lee YJ The Cdk and PCNA domains on p21 Cipl both function to inhibit G1/S progression during hyperoxia 2004
10. Saugstad OD Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants 2003
11. 付红敏; 许峰; 黄波 胎鼠肺泡 II 型上皮细胞的分离及原代培养[期刊论文]-重庆医科大学学报 2009(5)
12. 陈敏; 唐建武 PKC亚型的生物学特性与调节功能[期刊论文]-国外医学(生理、病理科学与临床分册) 2002(5)
13. Van Lommel A Pulmonary neuroendocrine cells(PNEC)and neuroepithelial bodies(NEB):chemoreceptors and regulators of lung development 2001
14. Lu H; Guizzetti M; Costa LG Inorganic lead stimulates DNA synthesis in huraan astrocytoma cells:role of protein kinase C alpha 2001

相似文献(4条)

1. 学位论文 付红敏 CGRP在高氧诱导肺泡 II 型上皮细胞损伤中的作用及其信号转导途径探讨 2009
第一部分早产胎鼠肺泡 II 型上皮细胞分离、纯化、培养及鉴定。
目的: 探讨胎鼠肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)的分离、纯化及原代培养方法, 建立胎鼠AEC II细胞模型, 为有关胎儿肺发育及新生儿肺部疾病的研究奠定基础。
方法: 采用胰酶结合胶原酶的消化方法, 分离肺组织细胞成份, 然后经差速离心和差速贴壁的方法纯化AEC II, 进行原代培养; 通过台盼蓝染色检测细胞活

力, 倒置相差显微镜观察细胞生长特点及形态特征, 透射电镜鉴定, 改良巴氏染色检测细胞纯度以及免疫荧光技术检测表面蛋白C (SP-C) 的表达。

结果:

每3~5只胎鼠可获得AEC II (36±5) × 106, 活力(98±2)%。镜下观察原代AEC II呈岛状生长, 外观呈多边形或立方形。透射电镜可见特征性的板层小体, 改良巴氏染色见胞质内有较多颗粒, 纯度为96±3%, 呈现SP-C绿色免疫荧光的细胞占96%以上。

结论:

利用胰酶和胶原酶消化, 以及差速离心和差速贴壁的方法可成功分离出高产量、高纯度的胎鼠AEC II, 能满足体外进一步实验的需要。

第二部分高氧暴露对早产鼠肺泡 II 型上皮细胞的氧化损伤及CGRP的保护作用。

目的:

观察高氧对早产鼠肺泡 II 型上皮细胞 (AEC II) 的影响以及降钙素基因相关肽 (CGRP) 对AEC II 的保护作用。

方法:

将原代分离培养的孕19d早产鼠AEC II接种至6孔培养板, 实验随机分为空气组、高氧组、高氧CGRP组、高氧CGRP受体拮抗剂组。空气组和高氧组分别置于体积分数为21%的空气和60%的氧气中暴露24h; 高氧CGRP组在暴露前加入CGRP; 高氧CGRP拮抗剂组在高氧CGRP组基础上加入CGRP受体拮抗剂 (CGRP8-37)。培养24h后, 用分光光度计测定各组丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (TAOC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; 用流式细胞仪检测活性氧 (ROS) 和细胞凋亡率; 用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定表面活性蛋白C (SP-C) 的mRNA表达。

结果:

与空气组比较, 高氧组MDA、ROS及细胞凋亡率均显著增高, TAOC、SOD水平及SP-C mRNA表达均显著降低 (P<0.01)。与高氧组比较, 高氧CGRP组细胞MDA、ROS水平及细胞凋亡率均显著下降; 而TAOC、SOD水平及SP-C mRNA表达均明显增高 (P<0.01)。高氧CGRP拮抗剂组与高氧组各指标比较差异均无统计学意义。

结论:

60%氧暴露24h可导致早产鼠AEC II发生氧化损伤, 诱导细胞凋亡及SP-C mRNA表达下降; 而CGRP可部分减轻AEC II的氧化损伤, 减少凋亡, 促进SP-CmRNA表达, 对高氧损伤的AEC II起保护作用。

第三部分 CGRP对60%氧暴露早产鼠AEC II 生长增殖的影响。

目的:

探讨降钙素基因相关肽 (CGRP) 对60%氧暴露早产鼠肺泡 II 型上皮细胞 (AEC II) 生长增殖的影响。

方法:

原代分离培养孕19d早产鼠AEC II, 随机分为6组: 空气组、空气CGRP组、空气CGRP拮抗剂组、高氧组、高氧CGRP组、高氧CGRP拮抗剂组。空气组和高氧组分别在氧体积分数为21%的空气和60%的氧气中暴露24h; 空气或高氧CGRP组在置于空气或高氧环境前加入CGRP; 空气或高氧CGRP拮抗剂组同时加入CGRP和CGRP受体拮抗剂后, 再置于空气或60%的氧气中培养24h。先用MTT比色法测定不同浓度CGRP (10⁻¹⁰~10⁻⁷M) 对正常AEC II生长的影响, 以确定CGRP的实验最佳浓度; 分别采用MTT法和流式细胞术测定各组细胞增殖能力和细胞周期, 逆转录聚合酶链反应和免疫荧光技术测定表面活性蛋白C (SP-C) 的mRNA及蛋白表达。

结果:

MTT法结果显示, CGRP从10⁻¹⁰~10⁻⁸M, 呈剂量依赖方式促进正常培养的早产鼠AEC II生长, 因此选择10⁻⁸M CGRP来干预细胞。加入10⁻⁸M CGRP还可使正常培养的AEC II进入G2/M及S期的比例增多, SP-C mRNA及SP-C蛋白表达增高 (与空气组相比, P<0.01)。暴露于60%氧24h后, 细胞存活率下降, G0/G1期细胞比例增高, G2/M及S期细胞相应降低, SP-C mRNA及SP-C蛋白表达低下 (与空气组比较, P<0.01)。而预先加入10⁻⁸M CGRP后, 促进了高氧暴露AEC II的增殖能力, 使S及G2/M期细胞增多, 并可提高AEC II的SP-CmRNA及SP-C蛋白表达水平 (与高氧组及高氧CGRP拮抗剂组比较, P<0.01)。

结论:

60%氧暴露24h可抑制早产鼠AEC II增殖分化, 而CGRP可促进AEC II生长, 部分解除高氧对AEC II的抑制作用。

第四部分 PKC α 信号转导途径介导了CGRP对高氧肺泡 II 型上皮细胞损伤的保护作用。

目的:

通过测定PKC α 和NF-κ B的活化情况, 从细胞内信号转导通路这一角度探讨CGRP对高氧肺泡上皮细胞损伤的保护作用机制。

方法:

原代分离培养孕19d早产鼠AEC II, 随机分为6组: 空气组、空气CGRP组、空气CGRP拮抗剂组、高氧组、高氧CGRP组、高氧CGRP拮抗剂组。空气组和高氧组分别在氧体积分数为21%的空气和60%的氧气中暴露24h; 空气或高氧CGRP组在置于空气或高氧环境前加入CGRP, 空气或高氧CGRP拮抗剂组同时加入CGRP和CGRP受体拮抗剂, 再置于空气或60%的氧气中培养24h。用Western blot检测胞膜和胞浆PKC α 的表达变化, 激光共聚焦检测NF-κ B的核表达情况。

结果:

在正常培养的AEC II细胞中加入CGRP后, 胞膜与胞浆PKC α 的比值显著增高, NFκ B的荧光较强, 与空气组及空气CGRP拮抗剂组相比有显著性差异 (P<0.01)。细胞暴露于高氧后, 胞膜与胞浆PKC α 比值显著低于空气组, 而NFκ B的荧光强度高于空气组 (p<0.01)。高氧CGRP组二者比值及核内NFκ B荧光强度高于高氧组及高氧CGRP拮抗剂组, 差异有显著性意义 (p<0.01)。

结论:

PKC α 介导了CGRP对细胞的信号传递过程, 参与了CGRP对高氧AEC II损伤的保护作用, 而NF-κ B是PKC α 的下游信号, 部分执行了PKC α 传递的保护功能

2. 期刊论文 [李炼, 罗自强, 伍祛球, 孙秀泓, 血管活性肠肽对肺表面活性物质结合蛋白A表达的影响 -中国应用生理学杂志2004, 20\(2\)](#)

目的: 研究血管活性肠肽 (VIP) 对肺表面活性物质结合蛋白A (SP-A) 表达的影响以及VIP调控SP-A表达的细胞内信号转导途径。方法: 运用免疫组织化学和RT-PCR技术研究VIP对SP-A表达的影响; 并进一步运用受体拮抗、蛋白激酶抑制、反义寡核苷酸阻断等手段探讨VIP促进SP-A表达的信号转导途径。结果: ①VIP (10⁻⁸mol/L) 促进肺泡 II 型细胞 (AT II) 细胞中的SP-A蛋白表达和提高肺组织SP-AmRNA含量; ②VIP受体拮抗剂 (10⁻⁶mol/L) 可取消VIP (10⁻⁸mol/L) 促进SP-A表达的效应; ③蛋白激酶C抑制剂H7 (10⁻⁵mol/L) 和c-fos基因的反义寡核苷酸 (9 × 10⁻⁶mol/L) 均可阻断VIP促进SP-A表达的作用。结论: VIP通过其受体促进SP-A的表达, PKC及c-fos蛋白在介导VIP促进SP-A表达的细胞内信号转导过程中起重要作用。

3. 期刊论文 [罗自强, 孙秀泓, 秦晓群, LUO ZI-QIANG, SUN XIU-HONG, QIN XIAO-QUN c-fos基因在内皮素-1促肺泡 II 型细胞表面活性物质合成中的作用 -生理学报1999, 51\(3\)](#)

应用反义技术探讨c-fos基因在ET-1调控肺泡 II 型细胞 (AT II) 表面活性物质 (PS) 合成的胞内信号转导中的作用。结果显示: (1) 内皮素-1 (ET-1) 可提高AT II 细胞的3H-胆碱掺入量。 (2) 蛋白激酶C (PKC) 激活剂PMA可使AT II 细胞的3H-胆碱掺入量增加, PKC抑制剂H7可抑制ET-1的促PS合成效应。 (3) ET-1和PMA可显著提高Fos蛋白表达量, H7和c-fos反义寡核苷酸 (ODN) 预处理可抑制ET-1促Fos蛋白表达和促3H-胆碱掺入效应。 (4) ET-1、正义及反义ODN对AT II 细胞乳酰脱氢酶 (LDH) 释放量均无显著影响。结果证实: ET-1可促进AT II 的PS合成, 激活PKC上调c-fos基因表达是ET-1促AT II 细胞合成PS的胞内信号转导途径。

4. 学位论文 [傅娟 肺气肿发病机制中肺组织的损伤与修复及其影响因素的研究 2001](#)

该研究采用了免疫细胞和组织化学、原位杂交、RT-PCR、Western Blot等分子生物学技术, 对肺气肿大鼠模型肺组织及体外培养的肺泡巨噬细胞、肺泡 II 型上皮细胞、小气道平滑肌细胞增殖与凋亡及其相关基因表达和调控进行了研究, 并观察了川芎嗪、丹参、地塞米松、脂多糖等对肺气肿组织bFGF mRNA表达及小气道平滑肌细胞凋亡的影响, 为肺气肿治疗提供了理论基础。

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201005003.aspx
授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 45f19098-006c-4c7c-9520-9ede016177fa

下载时间: 2011年5月9日