

• 论著 •

甲基-β-环糊精对Ⅰ型肺泡上皮细胞增殖与转分化的影响

王勤 王建春 李玉英 王关嵩

【摘要】 目的 观察甲基-β-环糊精(MβCD)破坏脂质微区结构对Ⅰ型肺泡上皮细胞(AECⅠ)增殖、转分化及细胞周期的影响。方法 采用MβCD破坏体外培养的AECⅠ细胞膜脂质微区(MβCD干扰组),以必需基本培养基(DMEM)作为对照。用血细胞计数器计数培养细胞,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖能力,流式细胞仪检测细胞周期,免疫荧光双标和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测AECⅠ特异性肺泡表面活性蛋白C(SP-C)及Ⅰ型肺泡上皮细胞(AECⅠ)特异性水通道蛋白5(AQP5)的表达。结果 与对照组比较,MβCD组干扰后24、48、72h细胞数及增殖能力显著降低[细胞数($\times 10^6/ml$): 2.74 ± 0.56 比 8.05 ± 0.92 , 4.45 ± 0.68 比 10.52 ± 0.81 , 7.82 ± 0.59 比 11.39 ± 0.81 ;MTT结果(A值): 0.25 ± 0.20 比 0.45 ± 0.02 , 0.35 ± 0.03 比 0.54 ± 0.28 , 0.48 ± 0.04 比 0.59 ± 0.05 ,均 $P < 0.01$];MβCD组干扰后24h G0/G1期细胞比例显著增多,S期细胞比例显著减少[G0/G1期:(60.06 ± 1.65)%比(43.43 ± 3.59)%;S期:(16.20 ± 2.17)%比(34.07 ± 2.63)%,均 $P < 0.05$];MβCD组干扰后48h、72h SP-C蛋白表达明显增多(0.54 ± 0.04 比 0.47 ± 0.03 , 0.19 ± 0.03 比 0.06 ± 0.02),AQP5蛋白表达明显减少(0.30 ± 0.04 比 0.43 ± 0.06 , 0.39 ± 0.04 比 0.59 ± 0.04 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 MβCD破坏体外培养AECⅠ脂质微区结构后,细胞发生G1期阻滞,细胞增殖和转分化受到抑制。

【关键词】 肺泡上皮细胞,Ⅰ型; 脂质微区; 增殖; 转分化; 细胞周期

Effects of methyl-β-cyclodextrin on the proliferation and transdifferentiation of type I alveolar epithelial cells WANG Qin, WANG Jian-chun, LI Yu-ying, WANG Guan-song. Institute of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China
Corresponding author: WANG Jian-chun, Email: wjc5577@126.com

【Abstract】 Objective To study the destructive effects of the membrane lipid microdomain with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) on the proliferation, transdifferentiation and cell cycle of type I alveolar epithelial cell (AEC I). Methods The membrane lipid microdomain of AEC I was destroyed by MβCD (MβCD interference group) in vitro, and then cultured with DMEM as control. Cell number was counted with hemacytometer; the proliferation rate was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT); flow cytometry was used to assay the cell cycle. The expressions of AEC I-specific surfactant protein-C (SP-C) and AEC I-specific aquaporin-5 (AQP5) were detected by immunofluorescence and Western blotting analyses. Results Compared with control group, cell number and the cell proliferation was decreased in MβCD interference group at 24, 48 and 72 hours after interaction [cell numbers ($\times 10^6/ml$): 2.74 ± 0.56 vs. 8.05 ± 0.92 , 4.45 ± 0.68 vs. 10.52 ± 0.81 , 7.82 ± 0.59 vs. 11.39 ± 0.81 ; MTT results (A value): 0.25 ± 0.20 vs. 0.45 ± 0.02 , 0.35 ± 0.03 vs. 0.54 ± 0.28 , 0.48 ± 0.04 vs. 0.59 ± 0.05 , all $P < 0.01$]. MβCD could increase the percentage of cells in G0/G1 phases and decreased the percentage in S phases at 24 hours [G0/G1 phases: (60.06 ± 1.65)% vs. (43.43 ± 3.59)%; S phases: (16.20 ± 2.17)% vs. (34.07 ± 2.63)%, both $P < 0.05$]. Incubation of AEC I with MβCD resulted in up-regulation of the expression of SP-C (0.54 ± 0.04 vs. 0.47 ± 0.03 , 0.19 ± 0.03 vs. 0.06 ± 0.02) and down-regulation of AQP5 (0.30 ± 0.04 vs. 0.43 ± 0.06 , 0.39 ± 0.04 vs. 0.59 ± 0.04) at 48 hours and 72 hours after interaction ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion The destruction of membrane lipid microdomain by the MβCD can inhibit proliferation and transdifferentiation of AEC I, and induce cell cycle arrest in G1 phase.

【Key words】 Type I alveolar epithelial cell; Membrane lipid microdomain; Proliferation; Transdifferentiation; Cell cycle

研究已发现急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺炎、肺水肿等肺部疾病的基本病

理变化为肺泡上皮屏障破坏,而肺泡上皮屏障修复决定了患者的预后^[1-2]。Ⅰ型肺泡上皮细胞(AECⅠ)作为肺泡上皮细胞的干细胞,可以通过有丝分裂补充自身的数量并向Ⅰ型肺泡上皮细胞(AECⅠ)转分化,从而修复肺泡上皮屏障^[3]。因此,AECⅠ的增殖与分化在肺损伤的修复过程中起关键性作用^[4]。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.04.005

基金项目:国家自然科学基金项目(30700346)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所

通信作者:王建春,Email:wjc5577@126.com

而了解 AEC I 的增殖和转分化机制对肺部疾病的治疗具有重要意义^[5]。脂质微区(membrane lipid microdomain)为细胞膜富含胆固醇和鞘脂并具有一定稳定性的区域,包括脂筏(lipid raft)和小窝(caveolae)。研究发现,脂质微区参与了多种信号通路,如丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)、细胞外信号调节激酶(ERK)、转化生长因子- β (TGF- β)、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路等,是细胞内外信息传递和物质交换的重要通道,在多种细胞增殖及分化中起重要作用^[6]。甲基- β -环糊精(M β CD)对胆固醇具有极强的亲和力,可以用于提取细胞膜胆固醇,特异性破坏脂质微区^[7]。本实验中通过研究 M β CD 干扰体外培养的大鼠 AEC I 细胞膜脂质微区后对 AEC I 增殖和转分化的影响,探讨脂质微区在肺泡上皮屏障修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料:雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2007-0005。DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、Hanks 液(含钙、镁,含酚红)、D-Hanks 液(不含钙、镁,含酚红)、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶 I)、M β CD 购自美国 Sigma 公司;IV 型胶原酶购自美国 Gibco 公司;兔抗大鼠特异性肺泡表面活性蛋白 C (SP-C)、山羊抗大鼠特异性水通道蛋白 5(AQP5)、兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)一抗均购自美国 Santa Cruz 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗兔 IgG(二抗)、四甲基异硫氰酸罗达明(TITC)标记的小鼠抗山羊 IgG(二抗)购自北京中杉金桥公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(二抗及 HRP 标记的兔抗山羊 IgG(二抗)购自北京博奥森公司;蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测试剂盒购自武汉博士德公司;增强化学发光(ECL)试剂购自江苏碧云天公司。

1.2 AEC I 细胞分离:腹腔注射戊巴比妥麻醉大鼠,肝素抗凝,开胸取心、肺,用 D-Hanks 液灌洗,向肺内注入 0.25%胰蛋白酶与 0.1%胶原酶 1:1 混合液,水浴消化。剪碎肺组织,加入 FBS 灭活消化酶,用 DNA 酶 I 分散细胞,加入 Hanks 液,水浴摇动、过滤,离心 10 min,弃上清,用 DMEM/F12 培养基重悬细胞待提纯。

1.3 AEC I 细胞纯化:将细胞悬液加入已用大鼠 IgG 包被的培养皿中培养 3 h,以去除巨噬细胞和淋巴细胞。吸取未贴壁细胞离心,10%FBS 重悬细胞。

细胞计数后以 2.5×10^6 /ml 的细胞数接种至 35 mm 培养皿中,在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 1~5 d,培养基每 24 h 换液 1 次以去除不贴壁的细胞。

1.4 实验分组:细胞纯化培养 24 h 后,吸去培养基,加入无血清 DMEM 培养 6 h 以排除外源性胆固醇干扰,然后将实验分两组:M β CD 组加入 M β CD (5 mmol/L)作用 2 h;对照组加入与 M β CD 等量的 DMEM 作用 2 h;作用完毕后以 DMEM 冲洗 3 次,加入 10%FBS 正常培养。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 AEC I 细胞形态观察:在 M β CD 干扰后 24、48、72 h 常规换液,在倒置相差显微镜下观察细胞形态的改变。

1.5.2 直接细胞计数:在 M β CD 干扰后 0、24、48、72 h 用胰蛋白酶消化细胞,收集两组细胞,显微镜下计数细胞数。重复检测 5 次,取均值。

1.5.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖:以 5×10^4 /ml 密度将细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μ l,每组设 5 个复孔,取均值。分别于 M β CD 干扰后 0、24、48、72 h 吸去孔内液体,分别加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液和培养基反应 4 h 后,快速吸去孔内液体,再加入二甲亚砜(DMSO),振荡混匀,多功能酶标仪检测波长 570 nm 处的吸光度(A)值,空白孔调零。

1.5.4 流式细胞仪检测细胞周期:M β CD 干扰后 24 h 每组收集 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ 个细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,乙醇固定过夜,离心收集细胞,PBS 洗细胞 1 次,加入含 RNA 酶、碘化丙啶(PI)、聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)的 PBS 避光孵育,流式细胞仪检测细胞周期,软件分析。每组实验重复 3 次,取均值。

1.5.5 免疫荧光双标法鉴定细胞 SP-C 和 AQP5 的表达:取 M β CD 干扰后 72 h 的细胞爬片,常规固定、透膜、封闭、洗涤,加入兔抗大鼠 SP-C 和山羊抗大鼠 AQP5 一抗(1:200)孵育,PBS 洗涤,加入小鼠抗兔 FITC 和小鼠抗山羊 TITC 荧光素标记二抗(1:300),水平摇床 30 min,PBS 洗涤后 4,6-二氨基-2-苯基吡啶染色(DAPI 染色)染核,PBS 洗 3 次后抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下观察。同时设一抗阴性对照以排除非特异性荧光。其中 SP-C 表达呈绿色荧光,AQP5 表达呈红色荧光。

1.5.6 Western blotting 检测 SP-C、AQP-5 的蛋白表达:取 M β CD 干扰后 48 h、72 h 的两组细胞,加入蛋白提取液充分裂解;冰上放置 30 min;4 °C 高速

离心 20 min;取上清液,按 1/4 体积加入上样缓冲液,煮沸 5 min;于 12%聚丙烯酰胺凝胶上样电泳;半干转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上;加入 5%脱脂牛奶(TBST 配置),室温下水平摇床上作用 2 h;加入一抗工作液(1:1 000, TBST 配置),4 ℃冰箱过夜;TBST 漂洗 3 次,每次 15 min;加入相应二抗(1:3 000, TBST 配置),37 ℃水平摇床 30 min;TBST 漂洗 4 次,每次 15 min;加入 ECL 显影剂,凝胶成像系统成像。以目的蛋白与 β-actin 灰度值比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.6 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 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 *q* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MβCD 对细胞形态的影响(彩色插页图 1):倒置相差显微镜下观察,对照组干扰后 24 h AEC I 大量贴壁,呈梭形、岛状生长,细胞核呈圆形,细胞质内可见大量反差明显的特征性颗粒;48 h 后细胞大量生长、伸展,细胞内颗粒开始减少;72 h 后细胞胞体变大、伸展,细胞内颗粒逐渐减少甚至消失。MβCD 组干扰后 24 h AEC I 细胞膜较对照组稍显粗糙,细胞内颗粒较对照组减少;48 h 后细胞边界不清,排列紊乱;72 h 后细胞仍呈梭形,细胞形态较干扰前无明显变化。

2.2 MβCD 对 AEC I 细胞数及增殖的影响(表 1):MβCD 组干扰后 24、48、72 h 时 AEC I 细胞数明显低于同时间点对照组(均 *P*<0.01);且 MTT 比色法检测结果提示细胞增殖能力较对照组明显下降(均 *P*<0.01)。

表 1 MβCD 对体外培养大鼠 AEC I 细胞数及增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	细胞数($\times 10^6/ml$)	细胞增殖(A 值)
对照组	0 h	5	1.56±0.20	0.23±0.02
	24 h	5	8.05±0.92	0.45±0.02
	48 h	5	10.52±0.81	0.54±0.28
	72 h	5	11.39±0.81	0.59±0.05
MβCD 组	0 h	5	1.55±0.18	0.22±0.02
	24 h	5	2.74±0.56 ^a	0.25±0.20 ^a
	48 h	5	4.45±0.68 ^a	0.35±0.03 ^a
	72 h	5	7.82±0.59 ^a	0.48±0.04 ^a

注:MβCD,甲基-β-环糊精,AEC I,I 型肺泡上皮细胞;与对照组同期比较,^a*P*<0.01

2.3 MβCD 对 AEC I 细胞周期的影响(表 2):流式细胞仪检测显示,MβCD 组干扰后 24 h,G0/G1 期

细胞比例较对照组明显升高(*P*<0.05);S 期细胞比例较对照组明显降低(*P*<0.05)。

表 2 MβCD 对体外培养大鼠 AEC I 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	G0/G1 期(%)	S 期(%)	G2/M 期(%)
对照组	3	43.43±3.59	34.07±2.63	22.50±1.75
MβCD 组	3	60.06±1.65 ^a	16.20±2.17 ^a	23.73±1.27

注:MβCD,甲基-β-环糊精,AEC I,I 型肺泡上皮细胞;与对照组比较,^a*P*<0.05

2.4 MβCD 对 AEC I 转分化的影响

2.4.1 免疫荧光双标法检测 MβCD 对 SP-C 和 AQP5 表达的影响(彩色插页图 2):激光共聚焦显微镜下观察,对照组干扰后 72 h AEC I 细胞标记物 SP-C 仅见少量表达,AEC I 细胞标记物 AQP5 大量表达,提示细胞已由 AEC I 转化为 AEC I;而 MβCD 组 SP-C 表达仍呈阳性,表现为与 AQP5 共同表达,提示其转分化受到抑制;一抗阴性对照组未见非特异性荧光。

2.4.2 Western blotting 检测 MβCD 对 SP-C 和 AQP5 表达的影响(图 3;表 3):对照组干扰后 48 h、72 h SP-C 蛋白表达呈下降趋势,AQP5 蛋白表达呈上升趋势;MβCD 组干扰后 48 h、72 h SP-C 蛋白表达明显高于对照组,AQP5 蛋白表达明显低于对照组(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

MβCD,甲基-β-环糊精,AEC I,I 型肺泡上皮细胞,SP-C,肺泡表面活性蛋白 C,AQP5,水通道蛋白 5,β-actin,β-肌动蛋白
图 3 蛋白质免疫印迹法检测 MβCD 对体外培养大鼠 AEC I 细胞 SP-C 和 AQP5 表达的影响

表 3 MβCD 对体外培养大鼠 AEC I 细胞 SP-C 和 AQP5 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	SP-C 表达	AQP5 表达
对照组	48 h	5	0.47±0.03	0.43±0.06
	72 h	5	0.06±0.02	0.59±0.04
MβCD 组	48 h	5	0.54±0.04 ^a	0.30±0.04 ^b
	72 h	5	0.19±0.03 ^b	0.39±0.04 ^b

注:MβCD,甲基-β-环糊精,AEC I,I 型肺泡上皮细胞,SP-C,肺泡表面活性蛋白 C,AQP5,水通道蛋白 5;与对照组同期比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01

3 讨论

脂质微区广泛存在于人体各种细胞胞膜,富含鞘脂类和胆固醇,可选择性地募集某些蛋白分子,具有特殊化学组成及特性,是细胞信号分子富集和信号转导的枢纽,参与细胞分化、增殖、肿瘤发生、炎症等多种病理生理过程^[6]。既往实验表明,破坏小鼠的脂质微区后可使肺功能和耐力明显下降,易导致肺水肿、肺纤维化、肺动脉高压等疾病^[9]。适当的胆固醇水平对维持脂质微区结构十分重要,M β CD 可特异性破坏脂质微区所含的胆固醇,而对细胞膜的完整性无影响,因此,可用于研究脂质微区的作用^[10]。

本实验中细胞计数、MTT 比色法检测结果显示,M β CD 组较对照组 AEC I 细胞数目减少,增殖受到显著抑制。流式细胞仪检测结果显示,M β CD 干扰后 G0/G1 期 AEC I 细胞所占比例显著上升,S 期细胞所占比例显著下降,细胞停滞于 G0/G1 期,细胞生长、增殖受到抑制;说明脂质微区对于细胞生长、增殖起到积极作用。上述结果提示:M β CD 抑制 AEC I 增殖可能与脂质微区破坏后引起的细胞 G1 期阻滞、进入 S 期延迟有关。

正常培养的 AEC I 可自发向 AEC II 转分化。本实验中应用免疫荧光双标检测 AEC I 和 AEC II 各自特异性的细胞表面标志物 SP-C 和 AQP5 的表达变化,进而观察 AEC I 细胞的转分化过程。结果表明,对照组在干扰后 72 h SP-C 仅见少量表达,AQP5 大量表达,提示细胞已基本分化为 AEC II。而 M β CD 组在干扰后 72 h 细胞表面同时表达 SP-C 和 AQP5,说明 AEC I 向 AEC II 转分化较对照组明显延迟。Western blotting 结果表明,M β CD 组在干扰后 48 h、72 h SP-C 蛋白表达显著高于对照组,而 AQP5 蛋白表达显著低于对照组,进一步验证了免疫荧光双标的结果。二者结果提示:通过 M β CD 干扰 AEC I 脂质微区,可抑制其向 AEC II 的转分化,

脂质微区在 AEC I 转分化过程中起关键作用。

综上所述,本实验使用 M β CD 破坏脂质微区,抑制 AEC I 的增殖和转分化,提示细胞膜脂质微区可能在肺泡上皮细胞损伤修复过程中起重要作用,采用修复脂质微区的药物可能有助于预防和治疗肺泡上皮细胞损伤,为肺损伤的治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] Davydov DS, Desai SV, Needham DM, et al. Psychiatric morbidity in survivors of the acute respiratory distress syndrome, a systematic review. *Psychosom Med*, 2008, 70, 512-519.
- [2] 黄善灶,王静飞.血必净注射液治疗创伤后急性肺损伤 40 例临床分析. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15, 244-245.
- [3] 徐静,王建春,肖波,等.急性肺损伤大鼠肺组织肝 X 受体 α 表达的研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21, 203-206.
- [4] Mason RJ. Biology of alveolar type I cells. *Respirology*, 2006, 11 Suppl, S12-15.
- [5] Nishina K, Mikawa K, Morikawa O, et al. The effects of intravenous anesthetics and lidocaine on proliferation of cultured type I pneumocytes and lung fibroblasts. *Anesth Analg*, 2002, 94, 385-388.
- [6] Cohen AW, Razani B, Schubert W, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, 2004, 53, 1261-1270.
- [7] Buschiazio J, Bonini IC, Alonso TS. Inhibition of *Bufo arenarum* oocyte maturation induced by cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin, role of low-density caveolae-like membranes. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778, 1398-1406.
- [8] Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, 185-194.
- [9] Garrean S, Gao XP, Brovkovich V, et al. Caveolin-1 regulates NF-kappa B activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 2006, 177, 4853-4860.
- [10] Nishiyama A, Shinohara T, Pantuso T, et al. Depletion of cellular cholesterol enhances macrophage MAPK activation by chitin microparticles but not by heat-killed *Mycobacterium bovis* BCG. *Am J Cell Physiol*, 2008, 295, C341-349.

(收稿日期:2010-07-17)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

黑皮质素可通过胆碱能抗炎通路来抑制重症急性胰腺炎的发生

重症急性胰腺炎(SAP)通常可诱发多器官功能障碍综合征(MODS)。以往的研究表明,黑皮质素可通过激活大脑黑皮质素-4受体(MC4-R)作用于迷走神经介导的胆碱能抗炎通路,从而抑制 MODS 的发生。近日美国研究人员对 MC4-R 激动剂 RO27-3225 在 SAP 中的作用进行了研究。实验人员将 SAP 模型大鼠随机分为两组,其中实验组行双侧颈部迷走神经切断术并注射烟碱乙酰胆碱受体阻断剂松达氯铵;对照组不进行处理。两组分别于腹腔内注射相同剂量 MC4-R 激动剂 RO27-3225。结果表明,与实验组比较,对照组注射 RO27-3225 后可显著降低 SAP 大鼠血清脂肪酶和淀粉酶的活性以及肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-6 表达,同时胰腺组织的髓过氧化物酶活性增加受到抑制。研究者初步判断,MC4-R 激动剂 RO27-3225 可通过激活胆碱能抗炎通路,从而抑制急性胰腺炎的进展,对机体起到保护作用。

方涛,编译自《Crit Care Med》,2011-01-21(电子版);胡森,审核