

论著·实验研究

利多卡因对高氧暴露早产大鼠肺泡Ⅱ型 上皮细胞损伤的保护作用

丁小芳 钟礼立 张兵 李嘉

(湖南省人民医院儿科,湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的 观察利多卡因(Lido)对高氧暴露的早产大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)增殖和凋亡的影响,为防治早产儿高氧肺损伤提供依据。方法 原代培养的早产大鼠 AECⅡ随机分为4组:空气组、高氧组、空气+Lido组、高氧+Lido组。高氧、高氧+Lido组按5 L/min 通入95% O₂/5% CO₂ 高纯混合气,10 min后密封。空气+Lido、高氧+Lido组加入20 μg/mL Lido。各组均置于培养箱(37℃,5% CO₂)中培养24 h,收集各组细胞,采用流式细胞仪检测 AECⅡ 凋亡率和细胞周期;运用 Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达。结果 与空气组比较,高氧组 AECⅡ 凋亡率增高,G2/M、S 期细胞比例明显降低($P < 0.01$);PCNA 蛋白表达明显下调($P < 0.01$)。而 Lido 干预后可使 AECⅡ 凋亡率降低,G2/M、S 期细胞比例增高,PCNA 蛋白表达上调。结论 高氧可使早产大鼠 AECⅡ 凋亡增加,增殖抑制;Lido 对高氧所致的 AECⅡ 损伤有直接的抑制作用。

[中国当代儿科杂志,2011,13(4):313-316]

[关键词] 利多卡因;凋亡;增殖;肺泡Ⅱ型上皮细胞;高氧;早产大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)04-0313-04

Protective effects of lidocaine on hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells from premature rats

DING Xiao-Fang, ZHONG Li-Li, ZHANG Bing, LI Jia. Department of Pediatrics, People's Hospital of Hunan, Changsha 410005, China (Zhong L-L, Email:hznll000@gmail.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of lidocaine on apoptosis and proliferation of hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells (AEC II) from premature rats. **Methods** Primary cultured AEC II isolated from premature rats were randomly divided into four groups: air, air + lidocaine (20 μg/mL), 95% O₂/5% CO₂, and 95% O₂/5% CO₂ + lidocaine. The cells in each group were collected 24 hrs after culture in ordinary incubators (37℃, 5% CO₂). The proliferation and apoptosis of AEC II were detected by flow cytometry. Protein levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were measured by Western blot. **Results** The apoptosis rate of AEC II increased, the percentages of G2/M and S phase cells decreased and the protein levels of PCNA decreased significantly in the group exposed to 95% O₂/5% CO₂ compared with the group exposed to air ($P < 0.01$). Lidocaine treatment decreased apoptosis rate of AEC II, increased percentage of G2/M and S phase cells, and increased protein levels of PCNA. **Conclusions** Hyperoxia can increase apoptosis and inhibit proliferation of AEC II in premature rats. Lidocaine may have protective effects against the AEC II injuries. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (4):313-316]

Key words: Lidocaine; Apoptosis; Proliferation; Type II alveolar epithelial cell; Hyperoxia; Premature rats

早产儿对缺氧耐受性差,因此使用氧疗的机会更多,然而,氧毒性对早产儿可产生严重后遗症,如慢性肺疾病和视网膜病。而肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)在高氧肺损伤修复中占重要地位^[1-2]。AECⅡ具有许多重要的功能,包括合成、释放肺表面活性物质、参与离子转运以及损伤后肺组织修复

等^[3-4]。因此,减轻 AECⅡ 的损伤可望成为防治高氧肺损伤的有效方法。研究发现利多卡因(Lido)能稳定细胞膜,抑制中性粒细胞向受伤组织迁移、与内皮细胞黏附代谢和炎性因子的释放,从而减轻多种原因引起的急性肺损伤^[5]。但对早产儿高氧所致的肺损伤是否亦具有保护作用,目前报道甚少。本

[收稿日期]2010-07-26;[修回日期]2010-11-31
[基金项目]湖南省教育厅科研项目基金资助(07C572)。
[作者简介]丁小芳,女,硕士,主治医师。
[通信作者]钟礼立,副主任医师。

研究通过观察 Lido 对高氧所致的早产大鼠 AEC II 增殖和凋亡及增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的影响, 为防治早产儿高氧肺损伤提供更科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胰蛋白酶、I 型胶原酶、噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) (北京鼎国生物制品); Dnase-1、RNA 酶 (Rnase)、碘代吡啶 (PI) (Premage 公司); 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS, 杭州四季青生物工程材料有限公司); DMEM, D-hanks (湖南省人民医院临床研究所); 角化蛋白 (cytokeratin) 及荧光显色剂购自武汉博士德生物公司; 95% O₂/5% CO₂ 高纯混合气 (湖南莲湖氧气厂); Lido (常州康普药业有限公司, 0710065) 用含 15% FCS 的 DMEM 配成 2、20、200 μg/mL 浓度; 小鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体、β-actin、山羊抗鼠 IgG/HRP (深圳晶美生物公司)。Elx-800 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tek 公司产品); 流式细胞仪 (德国 Beckman 公司); 紫外分光光度计 (美国 Perkin Elmer 公司, Lambda 25 型); 图像分析系统为美国 GDS-8000 型医学彩色图象分析系统。

1.2 方法

1.2.1 早产大鼠 AEC II 的原代培养鉴定 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 购自湖南农业大学实验动物部。雌雄按 3:1 同笼过夜, 次日晨检查雌鼠阴道阴栓计为孕 0 d, 孕期满 20 d (足月为 22 d) 时行剖宫产术, 取出胎鼠作为早产鼠。剪开胎鼠胸腔, 取出肺组织, 参照并改进祝华平等^[6]的方法分离纯化 AEC II, 以 5 × 10⁵/L 的细胞密度接种于 50 mL 培养瓶中, 培养 48 h 后用免疫组化及电镜鉴定, 结果细胞数量多、纯度高可符合本实验要求。

1.2.2 MTT 比色法检测 Lido 对早产大鼠 AEC II 增殖影响的最佳浓度 纯化的早产大鼠 AEC II, 以 1 × 10⁶ 细胞/mL 接种于 96 孔板, 每孔 180 μL, 空白调零孔加无细胞的 15% FCS 的 DMEM, 置于 5% CO₂ 培养箱中培养至融合成单层 (约 24 h) 弃去原培养液, D-hanks 液洗去未贴壁的细胞分组处理, 每组 12 孔。对照组: 用 15% FCS 的 DMEM 培养, 不加 Lido。Lido 组: 参照徐道妙等^[7]的文献, 用含 2、20、200 μg/mL Lido 的 15% FCS 的 DMEM 培养。继续培养 24 h 后, 每孔加 20 μL MTT, 培养箱中 37℃ 孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加 150 μL DMSO, 室温震荡

10 min。酶联免疫检测仪上于 490 nm 处读吸光度 A 值, 计算各组均数及相对生长指数 (growth index, GI), GI = (处理组 A490/对照组 A490 值) × 100%, GI > 100% 为刺激生长, GI < 100% 为抑制生长。重复该实验 3 次。

1.2.3 实验分组 20 d 早产大鼠 AEC II, 经贴壁纯化后随机分为 4 组 (每组 5 瓶): 空气组 (Air)、高氧组 (HO)、空气 + Lido 组 (Air + Lido)、高氧 + Lido 组 (HO + Lido)。HO 及 HO + Lido 组在更换培养液后按 5 L/min 通入 95% O₂/5% CO₂ 高纯混合气, 10 min 后密封。Air + Lido 及 HO + Lido 组在更换培养液时加入 20 μg/mL Lido (根据 MTT 实验结果选取最佳浓度), 各组均置于培养箱 (37℃, 5% CO₂) 中培养 24 h, 收取各组细胞作流式细胞及 Western blot 检测。其中 HO 及 HO + Lido 组在培养结束时用 CYS1 数字式测氧仪测培养瓶中氧浓度, 弃去低于 90% 的标本。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期

细胞周期分为有丝分裂期 (M 期) 和分裂间期, 分裂间期又包括 DNA 合成期 (S 期), 在 M 与 S 期之间是 G0/G1 期, S 与 M 期之间是 G2 期。用 PI 染色分析, 可在二倍体 G0/G1 期的峰前出现“亚二倍体”峰, 即细胞凋亡峰 (subG1 峰), subG1 期细胞是凋亡细胞。收获细胞用冷的 PBS 洗 3 次, 加入 75% 冷乙醇固定后 (-20℃ 冰箱保存待测), 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗 2 次, 加 RNase 100 mg/L 孵育 20 min, 加 PI 染液避光孵育 30 min, 上流式细胞仪于 488 nm 处检测 PI 荧光强度, 计算出 SubG1、G0/G1、G2/M、S 期细胞比例。实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 PCNA 蛋白 蛋白裂解法提取细胞总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 每泳道加入蛋白样品 10 μL 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿式电转移至 PVDF 膜上, 将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 中并在室温下封闭 1 h, 封闭结束后, 将 PVDF 膜剪开, 分别孵育一抗 (PCNA 1:200、β-actin 1:500, 均用 TTBS 稀释), 4℃ 摇动过夜, TTBS 洗膜 (10 min × 4 次), 加入辣根过氧化物酶 (HRPO) 偶联的羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:200, 用 TTBS 稀释), 在室温下轻轻摇动 1 h, TTBS 洗膜 (10 min × 4 次), ECL 增强化学发光剂 (美国 Pierce 公司) 显色 5 s ~ 5 min。用 GDS-8000 型医学彩色图象分析系统扫描曝光后 X 线片上的显影条带, 测定各显色的积分吸光度值, 并进行吸光度扫描分析, 以 PCNA/β-actin 曝光后显影条带吸光度 A 值比值代表 PCNA 蛋白表达的相对含量。

1.3 统计学分析

所有数据用 SPSS 13.0 统计软件处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析后 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养观察

每5~7只20日胎龄早产大鼠经分离纯化贴壁后获 AEC II 数平均为 $68 \times 10^6 \pm 7 \times 10^6$ 个,倒置显微镜观察,AEC II 呈圆形或立方体,典型岛状生长,纯度高达 $(87 \pm 3)\%$,苔盼蓝拒染实验检测细胞活力为 $(95 \pm 1)\%$,经免疫组化及电镜证实确为 AEC II,见图1。充氧前,倒置显微镜下可见细胞贴壁紧,细胞亮,呈生长状态。HO 及 HO + Lido 组培养24 h后,镜下观察见细胞贴壁欠佳,少数细胞内可见颗粒,表现为生长不良状态。Air 及 Air + Lido 组细胞培养24 h后,细胞无明显改变。

2.2 Lido 对早产大鼠 AEC II 增殖的影响

MTT 比色法显示,Lido 在 2~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,均可促进细胞生长,在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时其细胞 GI 最高($P < 0.01$),见图2。

2.3 Lido 及高氧对早产大鼠 AEC II 生长周期及凋亡的影响

与 Air 组比较,HO 组 SubG1、G0/G1 期细胞比例明显增高($P < 0.01$),G2/M、S 期细胞比例明显降低($P < 0.01$);与 Air 组比较,Air + Lido 组 SubG1、G2/M 期细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$),G0/G1 期细胞比例明显降低($P < 0.01$),S 期细胞比例明显增高($P < 0.01$);HO + Lido 组与 HO 组比较,Sub G1、G0/G1 期细胞比例明显降低($P < 0.01$),G2/M、S 期细胞比例明显增高($P < 0.01$),且与 Air 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

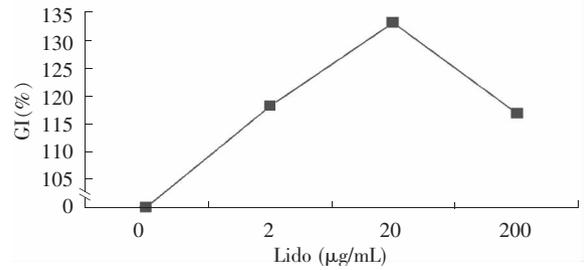


图2 不同浓度 Lido 对 AEC II 增殖的影响

表1 各组细胞周期频数分布比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	Sub G1 期	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
Air	5	3.3 ± 1.2	37.8 ± 4.6	32.7 ± 4.4	29.4 ± 3.3
Air + Lido	5	2.8 ± 1.5	29.2 ± 5.4 ^b	42.2 ± 4.3 ^a	28.6 ± 5.4
HO	5	10.7 ± 1.5 ^a	64.5 ± 2.6 ^a	19.7 ± 2.5 ^a	15.8 ± 2.0 ^a
HO + Lido	5	5.6 ± 1.1 ^c	41.0 ± 3.8 ^c	30.8 ± 4.6 ^d	28.2 ± 3.3 ^c

与 Air 组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$; 与 HO 组比较, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$

2.4 Lido 及高氧对早产鼠 AEC II PCNA 表达的影响

Western blot 检测结果示 HO 组 AEC II 细胞 PCNA 表达低于 Air 组、Air + Lido 及 HO + Lido 组 ($P < 0.05$), Air + Lido 组 PCNA 蛋白表达明显高于 Air 组 ($P < 0.05$), HO + Lido 组 PCNA 蛋白表达明显低于 Air + Lido 组 ($P < 0.01$),与 Air 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。图3~4。

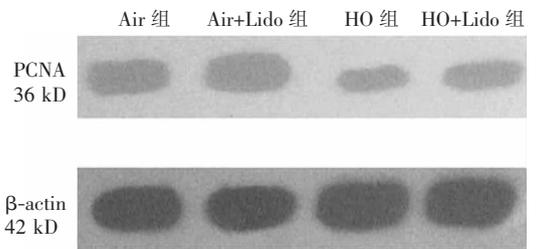


图3 各组细胞 PCNA 蛋白表达比较

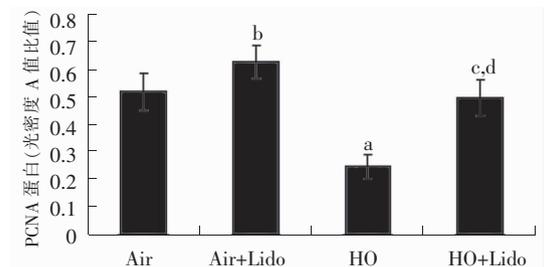


图4 各组细胞 PCNA 蛋白表达比较 与 Air 组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$; c: 与 HO 组比较, $P < 0.01$; d: 与 Air + Lido 组比较, $P < 0.01$

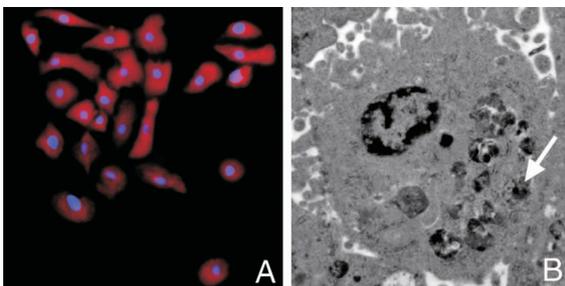


图1 AEC II 细胞培养观察 A: 免疫荧光化学显色 ($\times 200$), 阳性细胞呈圆形或立方体, 胞浆着红色; B: 透射电镜 ($\times 10000$), 可见板层小体(箭头所示)。

3 讨论

在正常肺组织的发生、急性肺损伤(acute lung injury, ALI)病理过程中, AEC II 都与增殖和凋亡过程有关,但 AEC II 过度凋亡可能参与 ALI 的发病机制^[1,8]。实验研究证实高氧引起的肺损伤中存在 AEC II 凋亡^[9-10]。成年鼠和新生鼠高氧诱导的 AEC II 凋亡的程度与高氧持续时间和肺损伤的程度呈正相关^[11]。高氧可通过激活细胞周期限制点而抑制细胞增殖^[12]。本研究结果显示,原代培养的 AEC II 暴露在高氧中,SubG1 期、G0/G1 期细胞比例显著增多,S、G2/M 期细胞比例明显减少。由此可见,高氧抑制早产鼠 AEC II 增殖可能与高氧引起的 G1 期阻滞,进而使细胞延迟进入 S 期,DNA 合成受到抑制,并最终导致细胞增殖受抑有关。

PCNA 是 DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白,为 DNA 复制和修复所必须存在于细胞核内的一种 36 KD 多肽,其表达和合成对于细胞周期的完成非常重要,PCNA 的阳性表达虽然不直接说明细胞正在进行分裂,但可以反映细胞处于细胞周期中,具有活跃的增殖潜能。因此,PCNA 成为评价细胞增殖水平的常用指标之一^[13]。本研究结果表明,HO 组 PCNA 表达较 Air 组明显降低,提示高氧时 AEC II 增殖下降与 PCNA 的低表达有关,这可能是高氧引起肺发育阻滞的重要原因。

动物实验证明,Lido 能减弱高氧、盐酸吸入、内毒素诱导以及急性胰腺炎所致的 ALI,Lido 减轻 ALI 的机制与其减少细胞因子释放及补体系统激活有关^[14]。本研究发现,不同剂量 Lido 均能促进早产大鼠 AEC II 细胞生长,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时其细胞 G1 最高,与文献报道一致^[7]。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lido 对 Air 组早产鼠 AEC II 凋亡无影响,但对其增殖却有促进作用。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lido 对高氧组细胞损伤有直接的保护作用,表现为 AEC II 凋亡率降低,G2/M、S 期细胞比例增高;PCNA 蛋白表达上调。其机制可能是通过增加 PCNA 蛋白表达水平,促进早产鼠 AEC II 进入 S 期,减少早产鼠 AEC II 凋亡来实现。

Lido 可部分逆转高氧对早产鼠 AEC II 损伤,从

而减轻高氧所致的肺发育受阻,促进损伤后修复,为临床防治慢性肺损伤提供了新的理论和方法,但其具体机制尚需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury[J]. Crit Care, 2003, 7(5):355-358.
- [2] 富建华,薛辛东. 高浓度氧诱导早产儿肺损伤的研究现状[J]. 中国当代儿科杂志,2003,5(1):78-80.
- [3] Crandall ED, Matthay MA. Alveolar epithelial transport. Basic science to clinical medicine[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 1021-1029.
- [4] Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells [J]. Cell Prolif, 2004, 37(1): 89-96.
- [5] DePietro MR, Eichacker PQ. Lidocaine for acute lung injury: questions still to answer[J]. Crit Care Med, 2000, 28(2): 589-591.
- [6] 祝华平,常立文,李文斌,刘汉楚,张谦慎. 胎鼠肺细胞的分离纯化及原代培养[J]. 华中科技大学学报(医学版),2003, 32(6):597-600.
- [7] 徐道妙,明广峰,吴晓英,陈胜喜. 利多卡因对 LPS 致大鼠肺泡 II 型上皮细胞损伤的保护作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2006,31(2):241-244.
- [8] McGrath-Morrow SA, Stahl J. Apoptosis in neonatal murine lung exposed to hyperoxia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(2): 150-155.
- [9] Gavino R, Johnson L, Bhandari V. Release of cytokines and apoptosis in fetal rat Type II pneumocytes exposed to hyperoxia and nitric oxide; modulatory effects of dexamethasone and pentoxifylline[J]. Cytokine, 2002, 20(6): 247-255.
- [10] Buckley S, Barsky L, Driscoll B, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D. Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats[J]. Am J Physiol, 1998, 274(5 Pt 1): L714-L720.
- [11] Roper JM, Mazzatti DJ, Watkins RH, Maniscalco WM, Keng PC, O'Reilly MA. In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(5): L1045-L1054.
- [12] O'Reilly MA. DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: braking to facilitate repair[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): L291-L305.
- [13] 常立文,祝华平,李文斌,刘汉楚,张谦慎,陈红兵. 苦杏仁甙对高氧暴露早产鼠肺泡 II 型细胞的保护作用[J]. 中华儿科杂志,2005,43(2):118-123.
- [14] Huang TK, Uyehara CF, Balaraman V, Miyasato CY, Person D, Egan E, et al. Surfactant lavage with lidocaine improves pulmonary function in piglets after HCl-induced acute lung injury [J]. Lung, 2004, 182(1):15-25.

(本文编辑:徐福兰)