

· 论 著 ·

一氧化氮抑制甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡的实验研究*

荔蕊, 胡章雪, 赵锦宁, 汪丽, 刘蕾, 史源[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所儿科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨一氧化氮对甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡的抑制作用及其机制。方法 成功建立胆甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡模型后, 检测一氧化氮合酶的表达水平及一氧化氮供体对甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡的抑制作用。结果 甘氨酸鹅脱氧胆酸可诱导 A549 细胞发生 caspase-3 依赖的细胞凋亡, 凋亡过程中伴随有一氧化氮合酶表达抑制, 一氧化氮供体能有效地减弱胆酸诱导的 A549 细胞凋亡。结论 通过吸入一氧化氮可有效抑制甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡。

关键词:一氧化氮; 甘氨酸鹅脱氧胆酸; 肺泡上皮细胞; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)06-0601-03

Experimental study on inhibition of NO in process of Glycochenodeoxycholate inducing A549 cell apoptosis*

Li Rui, Hu Zhangxue, Zhao Jingning, Wang Li, Liu Lei, Shi Yuan[△]

(Department of Pediatrics, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of nitric oxide (NO) on Glycochenodeoxycholate (GCDC) induced A549 cell apoptosis and its mechanism. **Methods** After establishing apoptosis model of A549 cell which was induced by GCDC, the expression of inducible nitric synthase (iNOS) and inhibitory effect of NO donors on inducing A549 cell apoptosis by GCDC were detected. **Results** GCDC can induce A549 cell apoptosis relied on caspase3. The expression of iNOS was inhibited during the process of apoptosis, and the donors of NO can reduce A549 cell apoptosis effectively. **Conclusion** NO inhalation can effectively inhibit the process of alveolar epithelial cell II (AECII) apoptosis induced by GCDC.

Key words: nitric oxide; glycochenodeoxycholate; alveolar epithelial cell; apoptosis

新生儿呼吸窘迫综合征(neonate respiratory distress syndrome, NRDS)是一类重要的新生儿疾病, 病死率高。近年来, 国内外多家 NICU 报道足月儿与近足月儿 NRDS 患病率增加, 且具备不同于早产儿 NRDS 的临床特征^[1-3]。妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)母亲所分娩之足月新生儿患 NRDS 的发病率显著增加^[4-5], 机制不清楚。肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type 2 epithelium cell, AEC II)是合成与分泌肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)的主要场所, AEC II 凋亡增加将导致 PS 持续分泌不足, 肺泡塌陷、萎缩, 继而发生 NRDS。作者的前期研究发现: 胆酸的主要成分之一甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholate, GCDC)对 AEC II 具有诱导凋亡和坏死的作用, 而且可显著减少 AEC II 中肺泡表面活性物质的合成。NO 是一种可溶性气体, 可由 L-精氨酸在一氧化氮合酶催化下产生。在病理状态下, 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)是 NO 大量生成的关键酶, 具有重要意义。iNOS/NO 与低浓度外源性 NO 对于细胞凋亡具有抑制作用, 临床多中心研究发现, 对严重呼吸衰竭的新生儿使用 NO 吸入治疗, 显著降低了外源性 PS 和高频机械通气的使用率^[6]。机械通气初期开始使用 NO 吸入治疗效果明显好于呼吸衰竭严重时再使用^[7]。上述临床现象强烈提示 NO 具备降低肺动脉高压之外的其他治疗作用,

联系到项目组发现 NRDS 中 AEC II 的凋亡对呼吸衰竭的重要影响, 以及 NO 可能具备抗 GCDC 诱导 AEC II 凋亡的作用, NO 极有可能通过抑制 AEC II 凋亡而产生了对 NRDS 的上述治疗作用。本研究拟通过细胞试验检测甘氨酸鹅脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡模型中一氧化氮合酶的表达变化, 以及外源性 NO 对细胞凋亡的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺癌上皮细胞株 A549 细胞购自上海中科院细胞所。

1.1.2 仪器与试剂 PRMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司); 小牛血清(美国 GM 公司); 甘氨酸鹅脱氧胆酸盐(sigma 公司); 胰酶细胞消化液(碧云天生物技术研究所); caspase-3 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); 一氧化氮合酶抗体及一氧化氮供体 SNAP(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法 (1)细胞与细胞培养从液氮罐中取出存有 A549 细胞的冻存管, 放于 37℃ 温水中, 用镊子住轻轻摇动使其迅速融化。1000~2 000 r/min, 3~5 min 离心。在无菌操作台中采用 75% 的乙醇彻底擦拭冻存管, 然后打开冻存管, 注意动作要轻柔。用 1 mL 枪头将上清液去除, 加入 1 mL 预热的细胞培养液将细胞吹散开, 转移至 25 cm² 培养瓶中。补充 4 mL 的

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901630)。 作者简介: 荔蕊(1986~), 本科, 主要从事新生儿呼吸窘迫症的发病机制研究。

△ 通讯作者, E-mail: petshi530@vip.163.com。

RPMI 1640 培养基,并且添加 10% 的胎牛血清。倒置显微镜下观察,37 ℃、5%CO₂ 培养。24 h 后,更换新的培养液。细胞复苏后常规传代培养。待细胞呈对数期生长后用于实验。(2) 甘氨酸脱氧胆酸诱导经典的凋亡途径,采用荧光免疫实验。在 24 孔板中放入小玻片,进行细胞爬片,将细胞分为两组,一组加入 200 μmol/L GCDC,一组做空白对照。先使用 caspase-3 染色试剂盒对 caspase-3 染色荧光倒置下呈红色,再 DAPT 染细胞核荧光倒置显微镜下呈蓝色。分别拍照后,重合在一起,显紫红色为依赖 caspase-3 途径的细胞凋亡。(3) 细胞凋亡采用 caspase-3 检测试剂盒进行检测采用蛋白印迹法(Western Blot)方法检测一氧化氮合酶表达水平,NO 供体 SNAP 与胆酸共处理 A549 细胞以判断其对细胞凋亡的作用。收集细胞,PBS 洗涤,抽提细胞裂解液,蛋白定量,SDS-PAGE 电泳,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转移,5%脱脂奶粉封闭,室温静置 1.5~2

h,caspase-3 多抗室温反应 1~2 h,TBS(含 0.05% Tween 20 的 TBS)洗 3 次,5~10 min/次,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温反应 1~2 h,TBS-T 洗 3 次,5~10 min/次,NBT/BCIP 显色。

1.3 统计学处理 结果计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组之间比较采用单因素方差分析,并两两组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GCDC 诱导 A549 细胞凋亡 为了进一步确定甘氨酸脱氧胆酸能否诱导经典的凋亡途径,进行了荧光免疫实验。结果显示,甘氨酸脱氧胆酸处理后的 A549 出现了明显的凋亡。使用 caspase-3 染色试剂盒对 caspase-3 染色呈红色,DAPT 染细胞核呈蓝色,图 1 中上图为 200 μmol/L GCDC 处理组,下图为空白对照组,结果证明 GCDC 可诱导 A549 细胞依赖 caspase-3 途径凋亡。见图 1。

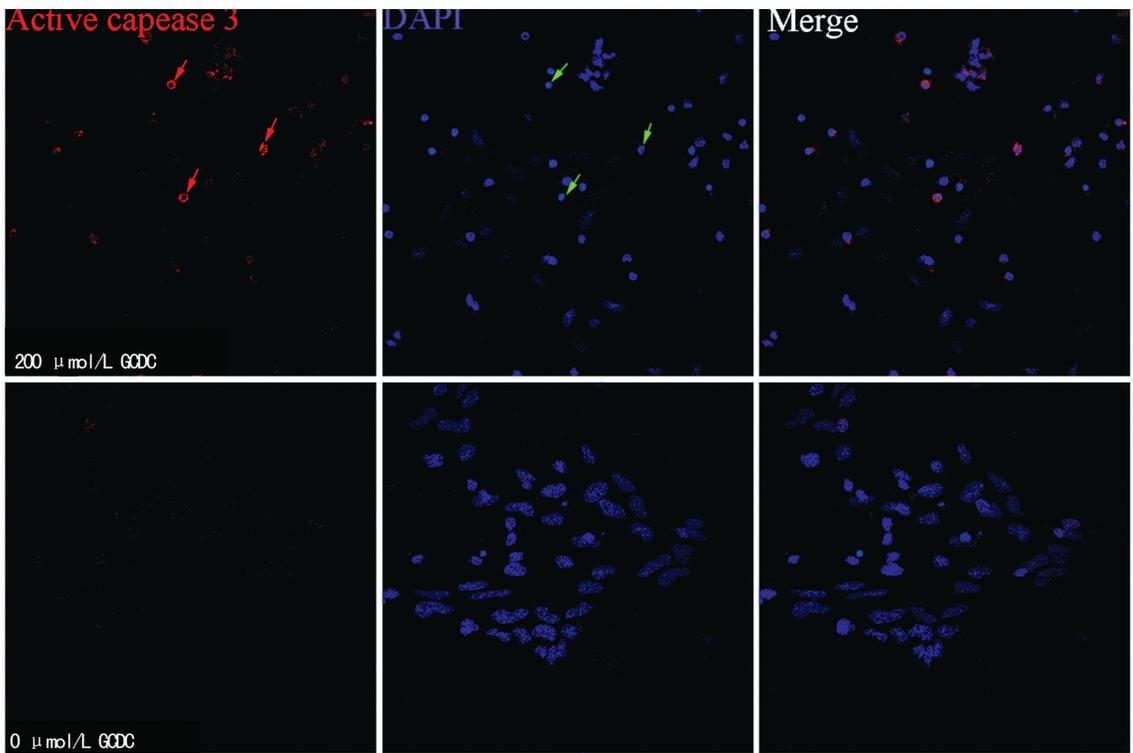


图 1 GCDC 诱导细胞死亡

2.2 GCDC 抑制 A549 中 iNOS 表达 不同浓度 GCDC 处理 A549 后,细胞中 iNOS 的蛋白表达水平明显降低,且具有浓度依赖性。实验证明,GCDC 可抑制 iNOS 在细胞中的表达水平,当 GCDC 浓度达到 1 000 μmol/L 时,iNOS 表达明显受到抑制,GCDC 浓度与抑制 iNOS 程度正相关。见图 2。

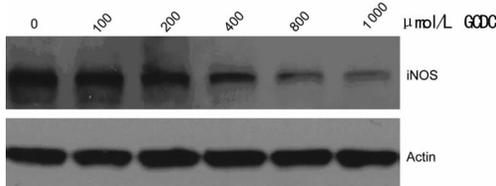
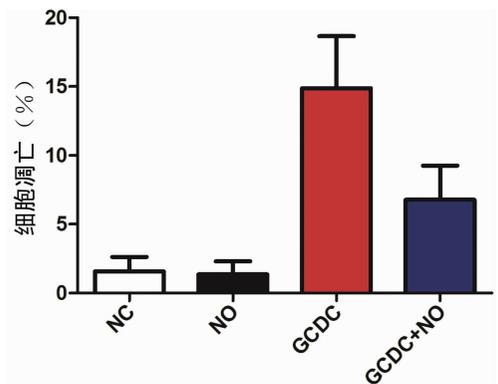


图 2 GCDC 处理 AEC II 后 iNOS 的表达变化情况

2.3 外源性 NO 抑制 GCDC 诱导的 A549 凋亡 以 NO 供体 SNAP(0~1 mmol/L)单独处理 AEC II 时,细胞不发生凋亡;GCDC 可诱导 AEC II 凋亡,但用 SNAP 和 GCDC 共处理 AEC

II 后则降低了细胞的凋亡程度。见图 3。



NC:溶剂组;NO:0.2 mmol/L NO 供体 SNAP 处理组;GCDC:200 μmol/L GCDC 处理组;GCDC+NO:200 μmol/L GCDC+0.2 mmol/L NO 供体 SNAP 处理组。

图 3 NO 供体 SNAP 与对 GCDC 诱导 AEC II 凋亡的影响

3 讨 论

ICP 主要临床表现为皮肤瘙痒、黄疸及肝功能异常,可导致孕妇和胎儿的并发症。ICP 主要危害胎儿,可致胎儿宫内窘迫、流产、死胎等,增高围产儿发病率和死亡率。ICP 最常发生在孕晚期,但在妊娠期间也可以随时发病。ICP 对孕妇的影响不大,但是对胎儿有很大影响,有研究显示与正常妊娠相比,ICP 患者脐带血孕激素重硫酸化代谢产物含量高,胎儿类固醇硫酸盐水平合成量降低,使胎儿类固醇合成功能受损。1883 年就报道了 ICP,描述 ICP 为妊娠期间复发性黄疸,分娩后消失。很多研究证实激素在 ICP 治病机制中起着重要作用。ICP 最常见于经产妇,在经产妇与初产妇的发病率分别为 20.0% 和 4.7%。ICP 通常发生于怀孕的后 3 个月,为雌激素水平的高峰时期有 ICP 家族史的妇女,服用避孕药后也会出现 ICP 的临床症状。黄体酮及代谢产物也可能是发病机制,Bacq 等^[8]做了临床实验,12 例先兆早产患者有 11 例有服用过天然孕激素治疗。

NRDS 又称为肺透明膜病(hyaline membrane disease, HMD),是由 PS 缺乏而导致,以出生后不久便出现呼吸窘迫呈进行性加重的综合征,是新生儿重症监护室常见的危急重症,发病率及病死率高^[9],临床症状以呼吸急促困难、呻吟为主要表现。PS 是由 AEC II 合成分泌的磷脂蛋白复合物,胎儿在 18~20 周 AEC II 已经能够分泌少量的 PS 转移至肺泡表面,随胎龄增长,PS 的合成分泌量增高,所以本病易发生于早产儿,胎龄越小,发病率越高,足月儿与近足月儿(胎龄大于或等于 35 周)的发病率是较低的^[3]。近年来,国内外多家 NICU 报道足月儿与近足月儿 NRDS 患病率增加,且具备不同于早产儿 NRDS 的临床特征^[1-2,10],所以早产并不是 PS 分泌不足致 NRDS 的主要原因。围生期窒息、前置胎盘、胎盘早剥及孕妇低血压致胎儿血容量下降等均能诱发胎儿的呼吸窘迫症。最新的研究表明,母亲患有 ICP 时,胎儿 NRDS 发病概率显著增高。

胆汁酸对孕妇和胎儿的毒性作用,妊娠中晚期胎儿和母体合成的胆汁酸都是通过胎盘转运的,Ding 等^[11]发现胆汁酸可能损害细胞器从而导致多核细胞生理功能失常,影响胎盘合成和转运功能。孕妇胆汁酸升高,可导致胎盘绒毛间隙狭窄,胎盘灌注量减少;胆汁酸有浓度依赖性血管收缩作用,高浓度胆汁酸使绒毛血管痉挛,从而导致胎盘灌注不足,发生胎儿窘迫。胆汁酸通过胎盘进入胎儿体内后,其细胞毒作用破坏线粒体膜产生氧自由基,从而导致胎儿的氧利用障碍^[12]。胆酸盐可刺激肠蠕动,但是胆酸过高,便会造成羊水胎粪污染。各种炎症细胞在肺内积聚、黏附、激活同时释放大量的活性氧和蛋白酶,直接或间接引起胎儿的肺损伤,从而增加新生儿窒息,及吸入性肺炎的概率,患 NRDS 的风险明显升高^[13]。

本实验通过研究一氧化氮抑制甘氨酸脱氧胆酸诱导 A549 细胞凋亡,为预防和治疗 NRDS 寻找新的治疗方法和药物靶点,从而降低 NRDS 的发生率。

参考文献:

[1] Engle MA. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate[J]. Pediatrics, 2008,121(2):419-432.

- [2] Chen A, Shi LP, Zheng JY. Clinical characteristics and outcomes of respiratory distress syndrome in term and late-preterm neonates[J]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2008, 46(9):654-657.
- [3] Moya F, Sinha S, D'Agostino RB. Surfactant-replacement therapy for respiratory distress syndrome in the preterm and term neonate: congratulations and corrections[J]. Pediatrics, 2008, 121(6):1290-1291.
- [4] Zecca E, De Luca D, Marras M. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and neonatal respiratory distress syndrome[J]. Pediatrics, 2006, 117(5):1669-1672.
- [5] Liu J, Shi Y, Dong JY, et al. Clinical characteristics, diagnosis and management of respiratory distress syndrome in full-term neonates[J]. Chin Med J(Engl), 2010, 123(19):2640-2644.
- [6] Wang YF, Liu CQ, Gao XR, et al. Collaborative study group for neonatal respiratory diseases. effects of inhaled nitric oxide in neonatal hypoxemic respiratory failure from a multicenter controlled trial[J]. Chin Med J(Engl), 2011, 124(8):1156-1163.
- [7] González A, Fabres J, D'Apremont I, et al. Randomized controlled trial of early compared with delayed use of inhaled nitric oxide in newborns with a moderate respiratory failure and pulmonary hypertension[J]. J Perinatol, 2010, 30(6):420-424.
- [8] Bacq Y, Myara A, Brechot MC, et al. Serum conjugated bile acid profile during intrahepatic of pregnancy[J]. J Hepatol, 1995, 22(1):66-70.
- [9] Rojas MA, Lozano JM, Rojas MX, et al. Very early surfactant without mandatory ventilation in premature infants treated with early continuous positive airway pressure: a randomized, controlled trial[J]. Pediatrics, 2009, 123(1):137-142.
- [10] St Clair C, Norwitz ER, Woensdregt K. The probability of neonatal respiratory distress syndrome as a function of gestational age and lecithin/sphingomyelin ratio[J]. Am J Perinatol, 2008, 25(8):473-480.
- [11] Ding YL, Tang LL. Tereological study on syncytial cell of humal placenta and deteminations of tatal bile acid in cord blood of intrahepatic cholestasis of preguan[J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2005, 40(7):453-456.
- [12] Reyes H. The spect rumof liver and gast rointestinal diseaseseen in cholestasisof pregnancy[J]. Gastroenterol Clin North Am, 1992, 21(4):905-910.
- [13] Enrico Z, Daniele DL, Marco M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and neonatal respiratory distress syndrome[J]. Pediatrics, 2006, 117(10):1669-1672.