

文章编号:1005-6947(2007)10-1013-04

· 简要论著 ·

硫酸软骨素对牛磺胆酸钠诱导的大鼠离体胰腺细胞骨架损伤的影响

何忠野, 葛春林, 郭克建, 郭仁宣

(中国医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:为探讨硫酸软骨素(CS)对牛磺胆酸钠诱导的大鼠离体胰腺腺泡细胞氧化应激损伤及细胞骨架蛋白F-actin结构的影响。笔者将雄性Wistar大鼠36只,经分离提纯获取胰腺腺泡细胞悬液,牛磺胆酸钠处理离体胰腺细胞后,随机分3组即细胞模型(细胞骨架损伤)组,CS处理组和对照组。各组分别于30 min,1 h,3 h进行MDA, GSH, SOD和ATP含量测定。离心细胞涂片后,以罗丹明-法罗丁F-actin染色,在共聚焦激光显微镜下观察F-actin结构的变化;用流式细胞术检测细胞的F-actin蛋白含量。结果示,模型组GSH, SOD和ATP明显下降($P < 0.05$),MDA明显升高($P < 0.05$)。CS组GSH, SOD, ATP下降幅度小于模型组,差异有显著性($P < 0.05$);MDA升高幅度小于模型组,差异有显著性($P < 0.05$)。模型组细胞骨架蛋白F-actin解聚并弥漫分布于胞浆内,其蛋白含量持续下降($P < 0.05$);CS组F-actin结构较稳定,其蛋白水平明显高于模型组($P < 0.05$)。提示:牛磺胆酸钠诱导的离体胰腺细胞早期已存在内源性抗氧化物质的显著下降,脂质过氧化增加和ATP耗竭加重了细胞损伤。CS可通过减轻氧化应激损伤维持ATP含量,缓解F-actin的降解,稳定细胞骨架结构从而减轻细胞损伤。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(10):1013-1016]

关键词: 硫酸软骨素; 胰腺细胞; 细胞骨架; 氧自由基

中图分类号: R 34-33

文献标识码: B

急性坏死性胰腺炎(ANP)早期细胞内发生的功能紊乱,与细胞骨架蛋白——肌动蛋白微丝(F-actin)的排列紊乱和解聚有密切关系^[1]。有研究^[2-3]发现在急性胰腺炎(AP)发生、发展中产生了大量活性氧及自由基(ROS)同时伴有内源性抗氧化剂消耗及能量耗竭导致F-actin解聚,引发并加重了实验性ANP。外源性硫酸软骨素(chondroitin-sulfate, CS)可通过抗氧化作用维持细胞内ATP含量,减轻ANP大鼠胰腺细胞损伤^[4]。笔者研究了CS对牛磺胆酸钠诱导的离体胰腺细胞骨架的作用,旨在进一步了解细胞骨架变化、氧化应激损伤和CS三者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

注射用CS(软灵芝)购自西安博森生物制药

有限责任公司;牛磺胆酸钠购自Sigma公司;10%水合氯醛注射液系本院制剂室制备;TCS SP2激光共聚焦显微镜购自Leica公司;6K15-NR11234离心细胞涂片仪为Sigma公司产品;罗丹明-法罗丁和I型胶原酶为Sigma产品;胰腺组织中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和三磷酸腺苷(ATP)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;胎牛血清及F12培养液购自武汉博士德公司。雄性Wistar大鼠36只,体重200~250g,由本校实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计及分组 以胶原酶消化和机械分离相结合的方法分离胰腺细胞,步骤如下:切取Wistar大鼠胰腺组织,剪碎为1 mm × 1 mm × 1 mm的小块。经150 μm尼龙网过滤后,加入到4%牛血清清蛋白溶液中,120 r/min离心纯化3 min并重复10次。再悬浮于含20%胎牛血清的F12培养液中稳定30 min(5% CO₂湿润空气,37℃)。腺泡细胞鉴定,将细胞悬液调整到10⁵~10⁶个/mL

收稿日期:2006-10-23; 修订日期:2006-12-21。

作者简介:何忠野,男,辽宁沈阳人,中国医科大学第一临床学院副主任医师,主要从事胆胰外科方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 E-mail:hzy_1971@163.com

浓度后,在离心涂片仪上离心涂片(1 000r/min, 10 min),制成细胞切片用亚甲蓝溶液染色后,以0.2N 醋酸盐缓冲液分色,并用4% 钼酸胺溶液处理后观察。腺泡细胞内的酶原颗粒呈鲜蓝色而背景不着色(图1)。细胞分离后随机分为3组(每组,每时点6只大鼠胰腺细胞)即细胞模型(细胞骨架损伤)组,CS处理组和对照组。CS组中细胞悬液与4%的CS预孵30 min后,以0.2%牛磺胆酸钠分别处理30 min,1h及3h。ANP组在牛磺胆酸钠处理前仅给予等量生理盐水预孵。

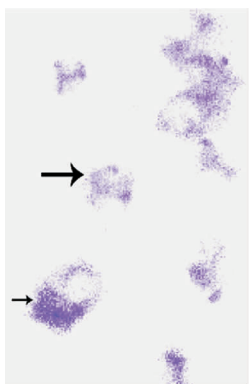


图1 酶原颗粒亚甲蓝染色($\times 400$)(箭头所指为酶原颗粒)

1.2.2 指标测定 于各时点分别以TAB比色法测定3组细胞的MDA、亚硝酸盐形成法测定SOD、Beutler改良法测定GSH、用色谱法测定ATP含量。

1.2.3 免疫荧光染色 将细胞悬液离心涂片仪上涂片,制成细胞切片;在冷丙酮(4℃)中固定30 min后,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗5 min \times 3次;避光条件下滴加Rhodamine-Phalloidin(10G-actin μ g/mL溶于0.1% Triton X-100),37℃孵育45 min,PBS冲洗5 min \times 3次;中性甘油封片,染色后的细胞涂片在Leica TCS-SP2共聚焦激光显微镜系统下观察并采集图象(分别在550G-actin-nm和580G-actin-nm波长下激发及观察)。

1.2.4 流式细胞术检测胰腺细胞内F-actin含量 离心细胞悬液(1 200r/min,5 min)去上清液后得到约 $10^6 \sim 10^7$ 个细胞加入罗丹明-法罗丁(10 μ g/mL)300 μ L孵育1h,以PBS冲洗(5min \times 3次);最后用流式细胞仪测定胰腺细胞中F-actin含量变化。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示(率的比较经正态性转换)。统计采用SPSS软件包单因素方差分析,Tukey-t检验方法。

2 结果

2.1 各组细胞中SOD,GSH,MDA和ATP含量的变化

模型组MDA明显高于对照组差异有显著性($P < 0.05$),CS组明显低于模型组($P < 0.05$)。经CS处理的大鼠胰腺细胞中内源性抗氧化剂SOD,GSH及ATP含量明显高于模型组($P < 0.05$)(附表)。

附表 SOD等的检测结果($\bar{x} \pm s$)

检测指标	组别	时点		
		30 min	1h	3h
SOD (nmol/mL)	模型	20.4 \pm 1.2 ¹⁾	14.1 \pm 4.1 ¹⁾	9.0 \pm 2.2 ¹⁾
	CS	28.4 \pm 1.8 ²⁾	20.8 \pm 1.8 ^{1),2)}	13.3 \pm 1.7 ^{1),2)}
	对照	31.5 \pm 2.2	29.7 \pm 2.3	32.6 \pm 1.6
GSH (μ g/100 μ L)	模型	13.1 \pm 0.8 ¹⁾	12.7 \pm 0.5 ¹⁾	9.1 \pm 1.5 ¹⁾
	CS	15.1 \pm 1.0 ²⁾	14.6 \pm 0.5 ^{1),2)}	12.3 \pm 0.9 ^{1),2)}
	对照	16.9 \pm 0.9	17.2 \pm 2.3	16.6 \pm 1.2
MDA (nmol/mL)	模型	9.6 \pm 0.8 ¹⁾	12.5 \pm 1.7 ¹⁾	27.1 \pm 0.8 ¹⁾
	CS	7.8 \pm 0.7 ²⁾	8.1 \pm 0.7 ²⁾	12 \pm 0.9 ^{1),2)}
	对照	7.9 \pm 1.8	8.2 \pm 0.9	6.8 \pm 1.3
ATP (μ mol/mL)	模型	7.7 \pm 0.6 ¹⁾	6.7 \pm 0.4 ¹⁾	4.2 \pm 0.3 ¹⁾
	CS	10.9 \pm 0.2 ^{1),2)}	10.3 \pm 0.5 ^{1),2)}	7.8 \pm 0.5 ^{1),2)}
	对照组	12.7 \pm 0.5	12.7 \pm 0.5	12.6 \pm 0.6
F-actin (%)	模型	66.8 \pm 1.8 ¹⁾	50.9 \pm 2.4 ¹⁾	29.6 \pm 1.3 ¹⁾
	CS	75.3 \pm 1.1 ²⁾	70.9 \pm 0.2 ^{1),2)}	61.4 \pm 2.3 ^{1),2)}
	对照组	80.5 \pm 3.9	79.4 \pm 2.2	81.3 \pm 1.1

注:1)与对照组比较 $P < 0.05$;2)与ANP组比较 $P < 0.05$

2.2 F-actin在细胞内分布的变化

激光共聚焦显微镜观察发现,对照组F-actin定位于胰腺腺泡细胞膜周围、呈环形。模型组早在30 min即出现actin骨架的解聚和分布紊乱,F-actin散乱分布于细胞浆中,荧光强度减弱;并随着时间推移逐渐加剧。CS组的F-actin分布紊乱程度较模型组明显减轻(30 min时点分布接近正常),荧光强度比模型组强(图2)。

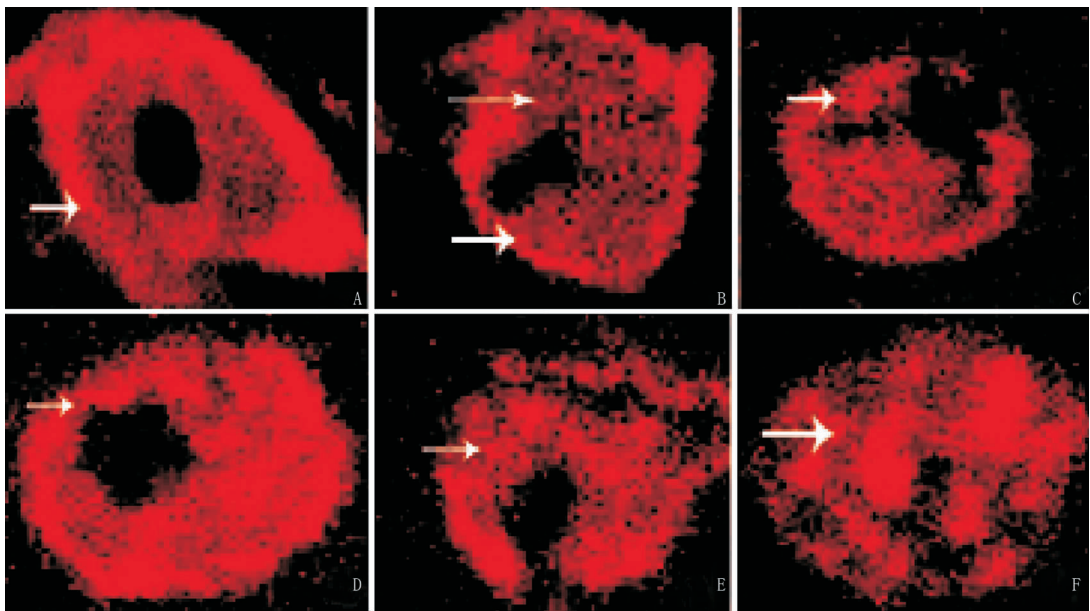


图 2 离体细胞中 actin 骨架分布的变化 ($\times 1\ 000$) (箭头所指为 F-actin) 30 min 时:(A) CS 处理 F-actin 呈环形环绕分布于细胞膜周;(B) CS 处理 F-actin 向细胞内分散但膜周仍深染;(C) CS 处理 F-actin 分布于细胞内较均匀;(D) 模型组向细胞内分散。1 h 时:(E) 模型组 F-actin 分布不均。3 h 时:(F) 模型组 F-actin 结构基本消失

2.3 F-actin 蛋白含量的变化

流式细胞仪检测发现,F-actin 在正常胰腺腺泡细胞中含量较高但 ANP 组含量在 30 min 时已

有所下降,并随着时间推移逐渐加剧;而 CS 可明显缓解 F-actin 含量的降低 ($P < 0.05$) (附表) (图 3)。

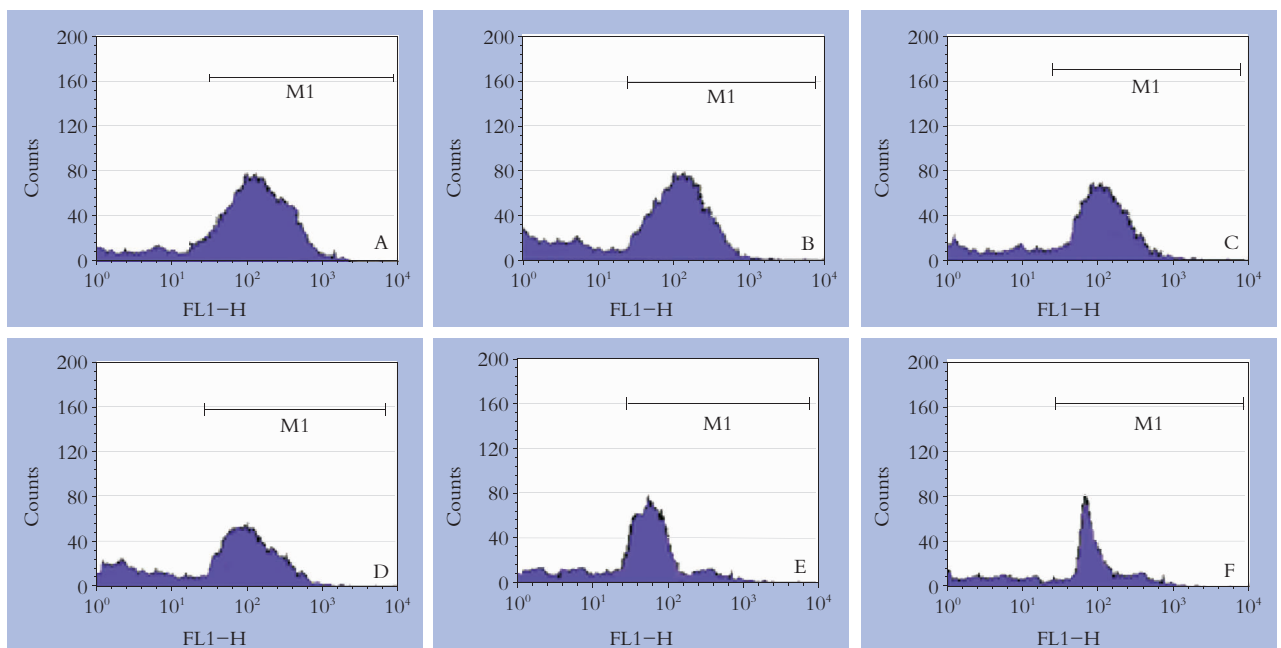


图 3 流式细胞术测定的离体胰腺细胞 F-actin 含量 30min 时:(A) CS 处理 F-actin 蛋白接近正常;(D) 模型组 F-actin 蛋白明显减少。1 h 时:(B) CS 处理 F-actin 蛋白略有减少;(E) 模型组 F-actin 蛋白进一步减少。3 h 时:(C) CS 处理 F-actin 蛋白仍较多;(F) 模型组 F-actin 蛋白接近耗竭

3 讨论

AP 早期,细胞生物学事件发生于细胞内并具有消化酶分泌、转运、胞吐的复杂的功能紊乱^[1],它们与胰腺细胞骨架功能紊乱有关。组成胰腺细胞骨架主要成分的肌动蛋白微丝参与胰酶分裂时的胞膜裂开、融合,将消化酶以胞吐方式推入腺泡腔。研究^[5]发现:AP 时肌动蛋白降解导致细胞骨架解体,干扰酶原分泌及细胞功能。肌动蛋白微丝系由肌动蛋白多聚体 F-actin 构成,F-actin 则由许多肌动蛋白单体(G-actin)以螺旋方式构成。由 G-actin 单体构成 F-actin 时需要 ATP 参与。随着 ATP 含量减少以至耗竭,G-actin 合成 F-actin 障碍,F-actin 又不断解聚导致 F-actin:G-actin 比例失衡,细胞骨架破坏,引发和加剧了 AP。

在 AP 的发生、发展中产生大量 ROS,同时伴有内源性抗氧化剂消耗,从而引起氧化应激损伤。ROS 的产生具有多源性、级联性特点,最终发生呼吸爆发(respiratory burst)形成 ROS 产生的级联放大效应,引起组织损伤。ROS 作用的靶分子为脂质、核酸、酶、蛋白等,并主要攻击构成细胞膜的脂质中存在的高度不饱和脂肪酸,以脂质过氧化连锁反应方式生成过氧化脂质(LPO)。LPO 的直接和间接作用是 ROS 对生物损害的主要原因之一。它使生物膜流动性下降、脆性增高,导致线粒体损伤及细胞间隔消失,影响能量合成,ATP 耗竭,终致细胞骨架蛋白 F-actin 损伤^[6-8]。CS 是氨基葡聚糖家族(GAGs)的主要成员之一。近期研究揭示^[9]:CS 不仅是细胞外基质的组成成分,而且调控某些细胞事件和生理过程。CS 以其羧基团及磺基团与启动 Fenton 反应的 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 等过渡金属离子反应,起到抗氧化作用。CS 可通过减少 ROS 产生,降低氧化应激损伤,维持细胞内 ATP 含量,从而减轻 ANP 大鼠胰腺细胞骨架蛋白 F-actin 的损伤。本研究表明:牛磺胆酸钠诱导的离体胰腺细胞损伤早期即有

细胞骨架的剧烈变化,F-actin 分布紊乱、含量降低。同时伴随内源性抗氧化剂及能量耗竭,脂质过氧化增加。CS 可作为氧自由基清除剂通过减轻氧化应激损伤维持 ATP 含量,从而缓解 actin 细胞骨架的损伤。

参考文献:

- [1] Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(2): G189 - G196.
- [2] Kao SJ, Yang FL, Hsu YH, *et al.* Mechanism of pulmonary edema caused by enterovirus 71 [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(12): 1784 - 1788.
- [3] Trullsson L, Sandstrom P, Sundqvist T, *et al.* The influence of a load of L-Arginine on serum amino acids and pancreatic apoptosis/proliferation and ATP levels in the rat [J]. *Pancreas*, 2004, 29(4): 113 - 120.
- [4] Campo GM, Avenoso A, Campo S, *et al.* Administration of hyaluronic acid and chondroitin-4-sulfate limits endogenous antioxidant depletion and reduces cell damage in experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2004, 28(2): e45 - e53.
- [5] Hirase T, Kawashima S, Wong EY, *et al.* Regulation of tight junction permeability and occluding phosphorylation by Rho-A-P160 Rock-dependent and -independent mechanism [J]. *J Biolchem*, 2001, 276(13): 10423 - 10431.
- [6] Lynch G, Kohler S, Leser J, *et al.* The tyrosine kinase Yes regulates actin structure and secretion during pancreatic acinar cell damage in rats [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 447(4): 445 - 451.
- [7] Weber H, Huhns S, Luthen F, *et al.* Calpain activation contributes to oxidative stress-induced pancreatic acinar cell injury [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(8): 1241 - 1252.
- [8] Janney PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 763 - 781.
- [9] Sugahara K, Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfate glycosaminoglycans [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(5): 518 - 527.