

体外培养肉鸡肺动脉内皮细胞的脂质过氧化损伤

潘家强, 李锦春, 谭勋, 王金勇, 孙卫东, 王小龙*

(南京农业大学畜禽营养代谢病研究室, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用组织贴块法培养肉鸡肺动脉内皮细胞 (PAEC), 并依据细胞形态学特点和凝血因子 相关抗原免疫组化染色结果对所培养的细胞进行鉴定。以黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶 (X/XO) 系统作为氧自由基发生系统建立 PAEC 氧化损伤模型。结果表明: 肉鸡 PAEC 在体外能够存活并传 5 ~ 6 代。形态学观察和 因子抗原免疫组化染色检查证明培养的细胞符合肺动脉内皮细胞的特点。氧自由基能够明显损伤 PAEC, X/XO 系统作用下细胞生长被抑制, 甚至导致细胞死亡, 并且这种抑制作用对 XO 有剂量依赖性。与正常对照组相比, 损伤组 PAEC 培养液中脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量升高, 提示氧自由基促进了 PAEC 的脂质过氧化。这说明氧自由基对肉鸡肺动脉内皮细胞具有损伤作用, 可能在肉鸡肺动脉高压综合征的发病过程中起重要作用。

关键词: 肉鸡; 肺动脉内皮细胞; 脂质过氧化损伤

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 2030 (2007) 02 - 0107 - 04

Lipid peroxidative injury of the cultured pulmonary artery endothelial cells of broiler in vitro

PAN Jia-qiang, LI Jin-chun, TAN Xun, WANG Jin-yong, SUN Wei-dong, WANG Xiao-long*

(Institute of Nutritional and Metabolic Disorder in Domestic Animals and Fowls,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Pulmonary artery endothelial cells (PAEC) of broiler were isolated by the method of tissue explantation. Identifications of the cultured cells were performed with the morphological feature and immunocytochemical stain using specific antiserum against factor related antigen. Xanthine/xanthine oxidase (X/XO) served as the oxygen free radical (OFR) generating system. *In vitro* model of oxidative injury of PAEC was established based on the X/XO system. The results showed that PAEC could survive *in vitro* and subculture for 5 - 6 generations. Morphological and immunocytochemical observations of cultured cells demonstrated specific characteristics of endothelial cells. PAECs were severely damaged by OFR. The viability of cells was inhibited by X/XO system, and dose-dependent decrease in cell viability was found with increasing XO dosages. Some cells even died. The concentration of malondialdehyde (MDA, a product of lipid peroxidation) was increased in the culture media treated with X/XO system, suggesting that OFR promoted the lipid peroxidation of PAEC. These results suggest that OFR might have an injury effect on the endothelium of pulmonary artery in broiler and may play an important role in the mechanism of pulmonary hypertension syndrome.

Key words: broiler; pulmonary artery endothelial cells (PAEC); lipid peroxidative injury

肺动脉内皮细胞 (PAEC) 是存在于肺动脉内膜的单层细胞, 通过释放血管舒张因子和血管收缩因子, 如一氧化氮、内皮素和血管紧张素等, 而具有多种血管活性作用。近年来的研究表明, 血管内皮细胞的损伤可导致多种心血管疾病的发生, 如动脉粥样硬化、糖尿病、高血压和肺动脉高压等。血管内皮细胞受损的原因很多, 其中氧自由基损伤是目前研究的热点之一。对肉鸡的研究发现, 氧自由基和脂质过氧化损伤在肉鸡肺动脉高压综合征 (pulmonary hypertension syndrome, PHS) 的发病过程中起着重要的作用^[1-3]。Pan 等^[1]发现, PHS 肉鸡血浆中过氧化脂质含量升高, 说明脂质过氧化作用参与了肉鸡 PHS 的病理过程; 何诚等^[4]通过电镜检查发现 PHS 患鸡肺动脉内皮细胞发生了明显的损伤。那么, 肺动脉高压肉鸡肺动脉内皮细胞损伤与脂质过氧化作用的关系究竟如何? 在人类医学上, 已经利用哺乳动

收稿日期: 2006 - 01 - 07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371061)

作者简介: 潘家强, 博士, 讲师, 主要从事畜禽营养代谢病研究, 现工作单位为华南农业大学。*通讯作者: 王小龙, 教授, 博士生导师, E-mail: wangxiaolong888@sohu.com。

物体外细胞培养的手段对过氧化应激和肺动脉内皮细胞损伤两者的关系进行了大量的研究^[5],但从比较医学的角度对家禽进行的研究至今尚未见报道。另外,血管内皮细胞培养是目前心血管疾病研究中常用的研究手段,人类和多种动物肺动脉内皮细胞的体外培养方法都已建立,但家禽肺动脉内皮细胞的体外培养至今仍未见报道。本研究拟建立一种可靠的肉鸡 PAEC 体外培养方法,并建立一套氧自由基损伤体外培养肉鸡 PAEC 的模型,从细胞形态和增殖方面探讨氧自由基和脂质过氧化对肉鸡肺动脉内皮细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1 日龄 AA 肉鸡, M - 199 培养基 (GBCO BRL), 新生牛血清 (杭州四季青公司), L - 谷氨酰胺、明胶、胰蛋白酶 (1 250)、噻唑蓝均为 AMRESCO 公司产品, 兔抗因子 相关抗原抗体购自北京中杉金桥公司, SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司, 黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶均为 Signa 公司产品, 丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒购自南京建成生物技术公司。

1.2 肉鸡 PAEC 的培养和鉴定

1.2.1 PAEC 的原代培养 取 1 日龄健康 AA 肉鸡, 无菌取出肺动脉, 放在盛有 D-Hanks 液的培养皿中, 分离血管外膜的脂肪和结缔组织, 用 D-Hanks 液反复冲洗, 并用注射器将血管内的血液冲净。用眼科剪纵行剪开肺动脉平展在平皿内, 用双面刀片将其切成 1 mm × 1 mm 的小动脉片, 用弯头针挑起, 以其内膜面贴入经 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 明胶液预包被的 25 mL 培养瓶中, 各块间距离 0.5 cm 左右。加盖置 37 °C、饱和湿度的二氧化碳培养箱 1~2 h, 使之贴牢; 加入含 20 % 小牛血清的 M - 199 培养基 2 mL, 于 37 °C、5 % 二氧化碳培养箱中培养, 2~3 d 换 1 次液。约 3~5 d 后肺动脉片周围有细胞长出。培养 5~8 d 后细胞生长达到一定密度时, 将小动脉片取出, 继续培养 6~10 d, 直至形成细胞单层。

1.2.2 PAEC 的传代 原代培养的 PAEC 长成单层时, 以 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶和 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 液室温下进行消化。传代培养用含 10 % 小牛血清的 M - 199 培养基, 一般 1 瓶传 2 瓶, 继续置 37 °C、5 % 二氧化碳培养箱中培养。至细胞长满后按上述方法依次传代, 每 5~7 d 传代 1 次。

1.2.3 PAEC 的鉴定 在倒置显微镜下观察肉鸡原代和传代 PAEC 的形态。用凝血因子 相关抗原免疫组化染色的方法对培养的细胞进行鉴定, 免疫组化染色步骤按照试剂盒操作说明进行。

1.3 氧化损伤模型建立及试验分组

取生长良好的第 3~4 代 PAEC 以 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 48 h 后, 将原培养基吸出, 加入新培养基和不同浓度 X/XO。按 Ram 等^[6]的方法建立细胞氧化损伤模型。将细胞分为正常对照组和 3 个损伤组, 每组 12 孔。各组处理如下: 对照组仅加入培养基 200 μL , 损伤组在培养基中加入剂量相同的黄嘌呤 (xanthine, X) 和不同剂量的黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO), 使 X 终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, XO 终浓度分别为 0.1、0.2 和 0.3 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 各组终体积均为 200 μL 。

1.4 氧自由基对肉鸡 PAEC 损伤的形态学观察及 PAEC 存活和增殖能力的测定

X/XO 系统分别作用 PAEC 1、12 和 24 h, 在倒置显微镜下观察细胞的形态并摄像记录。用 MTT 比色法测定细胞的存活和增殖能力^[7]。X/XO 系统作用 PAEC 24 h, 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续孵育 6 h; 吸出孔内培养液后每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 室温下振荡 10 min, 用酶标仪检测各孔 A_{570} 值 ($\lambda = 570 \text{ nm}$), 以 A_{570} 值代表细胞存活和增殖活力。

1.5 丙二醛 (MDA) 含量的测定

X/XO 系统作用 PAEC 24 h 后吸出培养基, 冷冻保存。采用丙二醛检测试剂盒测定细胞上清液内的 MDA 含量, 测定方法为硫代巴比妥酸法。

1.6 数据处理

用单因素方差分析法对数据进行统计分析, 按邓肯氏多重比较法进行各组数据间的差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 肉鸡 PAEC 的形态学和因子 相关抗原免疫组化鉴定

倒置显微镜下观察肉鸡 PAEC 呈短梭形或多角形, 单层生长, 长成单层的细胞呈典型的铺路石样外

观 (图 1), 符合血管内皮细胞的特征。因子 相关抗原免疫组化染色可见培养细胞的胞浆内有棕黄色颗粒 (图 2), 证实培养的细胞为 PAEC, PAEC 的阳性率在 90 % 以上。

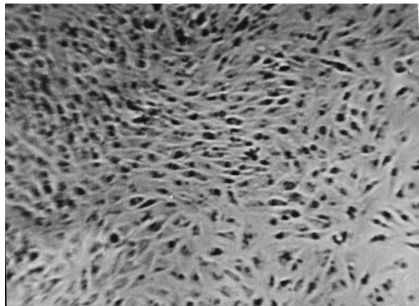


图 1 肉鸡 PAEC 形态学鉴定 (×100)

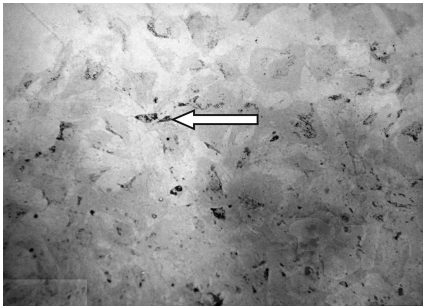


图 2 肉鸡 PAEC 的免疫组化鉴定 (×400)

Fig. 1 Morphological identification of broiler PAEC Fig. 2 Immunohistochemical identification of broiler PAEC

2.2 氧自由基对肉鸡 PAEC 损伤的形态学观察

与图 1 正常 PAEC 相比, X/XO 系统作用 1 h, PAEC 细胞出现收缩, 细胞间隙明显增大。其中 0.3 U · mL⁻¹ XO 组变化最明显。12 h 后胞浆内出现低折光率颗粒和空泡样物质。随着 XO 浓度的增加, PAEC 受损伤的程度逐渐加剧。24 h 后, 0.1 U · mL⁻¹ 和 0.2 U · mL⁻¹ XO 组可见培养板底部分区域细胞从培养板脱落死亡 (图 3 - A, 图 3 - B), 而 0.3 U · mL⁻¹ XO 组大部分细胞变圆脱落 (图 3 - C)。

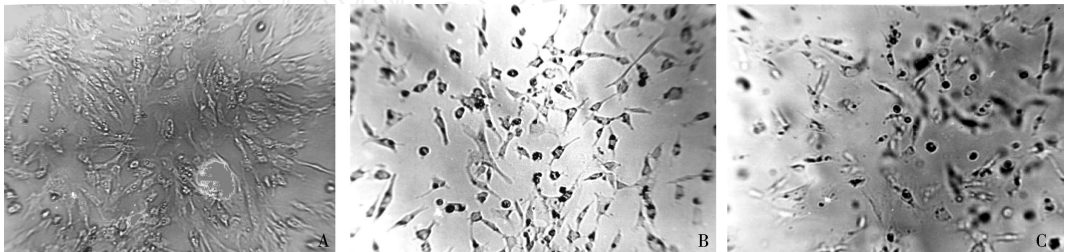


图 3 氧自由基对肉鸡 PAEC 损伤的形态学观察 (X/XO 系统作用 24 h, ×100)

Fig. 3 Morphological observing of the injury effect of OFR on broiler PAEC, 24 h after the action of X/XO system

A: 10 μmol · L⁻¹ X + 0.1 U · mL⁻¹ XO; B: 10 μmol · L⁻¹ X + 0.2 U · mL⁻¹ XO; C: 10 μmol · L⁻¹ X + 0.3 U · mL⁻¹ XO

2.3 不同浓度 X/XO 对 PAEC 生长的影响

各试验组细胞孔 A₅₇₀ 值均低于对照组, 差异显著, 其中以 0.3 U · mL⁻¹ XO 组降低最显著。随着 XO 浓度的增加, A₅₇₀ 值的降低对 XO 呈剂量依赖性 (图 4 - A)。

2.4 不同浓度 X/XO 对肉鸡 PAEC 产生脂质过氧化物的影响

由图 4 - B 可见, 培养液中加入 X/XO 后, 细胞的脂质过氧化作用增强, 培养液中 MDA 含量升高, 各试验组均显著高于对照组, 且 MDA 含量的升高与 XO 呈剂量依赖性。

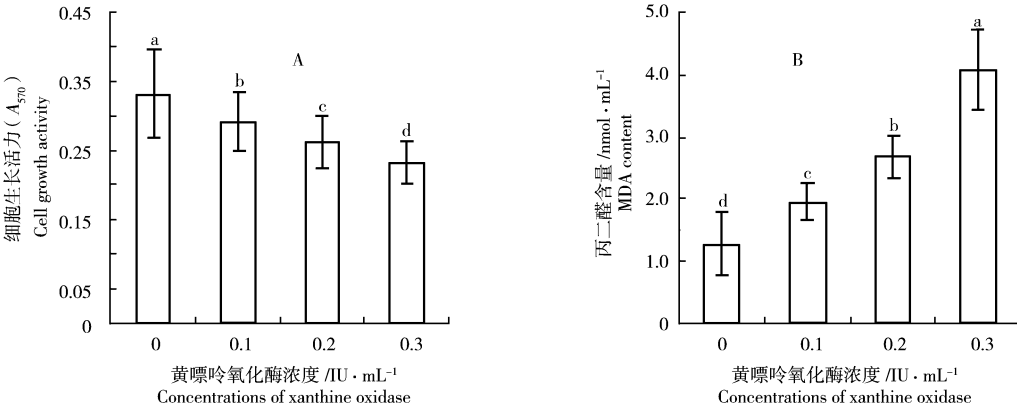


图 4 不同浓度 X/XO 对肉鸡 PAEC 生长活力 (A) 及产生脂质过氧化物 (B) 的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of X/XO on the growth activity (A) and MDA content (B) of broiler PAEC
不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05). The different small letters show significant difference at 0.05 level

3 讨论

3.1 肉鸡 PAEC 体外培养方法的建立

本研究采用组织贴块法首次培养出原代肉鸡 PAEC, 并成功进行了传代。形态学观察和凝血因子相关抗原免疫组化染色鉴定表明所培养的细胞是肺动脉内皮细胞, 且纯度较高。这一方法的建立为进一步研究肉鸡 PHS 和其他心血管疾病提供了有效的研究手段。

3.2 黄嘌呤氧化酶自由基发生系统

黄嘌呤氧化酶是体内常见的能产生自由基的酶, 主要存在于血管内皮细胞内, 它可催化次黄嘌呤及黄嘌呤分别氧化成黄嘌呤和尿酸, 并产生活性氧自由基, 所以选择 X/XO 系统作为肉鸡 PAEC 氧化损伤的模型是有代表性的。除了 X/XO 系统外, 常用的体外产生氧自由基的模型还有: 次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶模型^[8]、过氧化氢 (H_2O_2) 模型^[6]、氢过氧化枯烯模型^[9]和电解模型^[10]等。

3.3 氧自由基对肉鸡 PAEC 的损伤作用及机制

本试验显示, X/XO 系统作用肉鸡 PAEC 后, 能够改变细胞的正常形态, 抑制细胞生长, 并且这种抑制作用对 XO 有剂量依赖性, XO 浓度越高, 对细胞生长的抑制作用越明显。高剂量的 X/XO 可导致培养细胞的明显死亡。本研究结果证实 X/XO 系统产生的氧自由基对肉鸡 PAEC 具有损伤作用, 这一结果与 Gupta 等^[5]报道的氧自由基对哺乳动物肺动脉内皮细胞的损伤效应一致。Gupta 等^[5]用 $100 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 处理体外培养的猪 PAEC, 并检测乳酸脱氢酶的释放量以评估细胞氧化损伤程度, 结果发现 H_2O_2 呈剂量依赖性地引起猪 PAEC 的细胞毒作用。

目前的研究表明, 自由基对机体组织的生物学作用主要与生物膜的脂质过氧化有关。本试验中, 不同浓度 X/XO 作用肉鸡 PAEC 24 h 后, 细胞培养液内脂质过氧化的代谢终产物 MDA 的含量呈剂量依赖性的升高, 这说明 X/XO 系统产生的氧自由基诱发了肉鸡 PAEC 的脂质过氧化。这一试验结果进一步支持了先前的发现, 前期在肉鸡体内进行的研究中, 发现 PHS 发病过程中氧自由基和脂质过氧化产物含量明显升高^[1], 并且出现了肺动脉内皮的损伤^[4]。

本研究结果表明, 外源性的氧自由基可损伤体外培养的肉鸡肺动脉内皮细胞, 这一作用主要通过细胞的脂质过氧化途径实现。这一结果从细胞学的角度肯定了自由基理论在肉鸡 PHS 发病过程中的作用, 为进一步研究肉鸡肺动脉高压的发病机制和防治方法提供了理论根据。

参考文献:

- [1] Pan J Q, Tan X, Li J C, et al. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature [J]. British Poultry Science, 2005, 46(3): 374 - 381
- [2] Bottje W B, Wideman R F. Potential role of free radicals in the pathogenesis of pulmonary hypertension syndrome [J]. Poultry and Avian Biology Reviews, 1995, 6: 221 - 231
- [3] 吴建光, 郭定宗, 熊道焕. 腹水综合征肉鸡氧自由基变化规律 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(6): 594 - 596
- [4] 何诚, 赵德明, 梁礼成. 低温高能日粮对肉鸡肺动脉和腹水症的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(1): 34 - 40
- [5] Gupta M P, Evanoff V, Hart C M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells [J]. The American Journal of Physiology, 1997, 272: L1133 - L1141
- [6] Ram J I, Hiebert L M. Dextran sulfate protects porcine but not bovine cultured endothelial cells from free radical injury [J]. The Canadian Journal of Veterinary Research, 2003, 67(2): 81 - 87
- [7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 186 - 187
- [8] Nonami Y, Rao V, Shiono N, et al. Quenching the effects of L-arginine on free radical injury in cultured cardiomyocytes [J]. Surgery Today, 1998, 28(4): 379 - 384
- [9] 杨丽霞, 祝善俊, 张崇德. 脂质过氧化对培养人内皮细胞释放内皮素、前列环素的影响 [J]. 高血压杂志, 1995, 3(3): 188 - 189
- [10] 梅兵, 王耀发, 吴骏^①, 等. 氧自由基致体外培养血管内皮细胞的损伤及人参皂甙的保护作用 [J]. 药理学, 1994, 29(11): 801 - 808

责任编辑: 周广礼