论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0954-03

内毒素上调血管内皮细胞11β-HSD2基因的表达

王兴友,钱桂生,黄桂君,李玉英 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨内毒素对血管内皮细胞内11β羟基类固醇脱氢酶2(11β-HSD2) mRNA的影响,以及p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)在其中所起的作用。**方法** 应用逆转录-聚合酶链反应,测定血管内皮细胞在不同剂量内毒素作用时11β-HSD2 mRNA的量以及采用p38 MAPK特异性抑制剂SB20358(10 mmol/L)抑制p38 MAPK后11β-HSD2 mRNA的量。**结果** 内毒素1.0、10、20、50、100 μg/L与血管内皮细胞共培养24 h后11β-HSD2 mRNA/β-actin mRNA均不同程度高于正常培养水平,而SB203580抑制p38 MAPK后可部分抑制内毒素引起的11β-HSD2 mRNA水平增高。**结论** 内毒素可诱导11β-HSD2基因转录增强,激活p38 MAPK可能是一种重要机制。

关键词: 内毒素;血管内皮细胞;11β羟基类固醇脱氢酶2

中图法分类号: R322.12; R394.2; R996 **文献标识码:** A

Mechanism of 11β-HSD2 gene expression up-regulated by endotoxin in vascular endothelial cells

WANG Xing-you, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, LI Yu-ying (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate effects of endotoxin on 11β-HSD2 gene transcription in vascular endothelial cells to observe the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway. **Methods** The effects of endotoxin in the presence or absence of p38 MAPK specific inhibitor SB203580 on the transcription of 11β-HSD2 in vascular endothelial cells was evaluated by reverse transcription DNA polymerase chain reaction. **Results** Treatments of endotoxin (1.0, 10, 20, 50, 100 μg/ L) for 24 h increased the ratios of 11β-HSD2mRNA/β-actin mRNA in vascular endothelial cells. The induction of 11β-HSD2 mRNA by endotoxin could be inhibited partially by 10 mmol/ L SB203580. **Conclusion** Endotoxin stimulated the transcription of 11β-HSD2 gene in vascular endothelial cells. The activation of p38 MAPK might be an important mechanism of 11β-HSD2 gene induced by endotoxin.

Key words: endotoxin; vascular endothelial cell; 11-β hydroxysteroid dehydrogenase type 2

内毒素(endotoxin, LPS)对血管内皮细胞的损伤是体内炎症放大诱发急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)发病的一个重要机制[1],因此推测糖皮质激素(glucocorticoid, GC)对ARDS的抗炎作用会以血管内皮细胞作为一个主要靶点,而Ⅱ型11-β羟基类固醇脱氢酶(11-β hydroxysteroid dehydrogenase type 2, 11β-HSD2)是糖皮质激素的代谢酶,它催化糖皮质激素C11位的酮基与羟基之间的氧化还原反应,在细胞内将有生物活性的糖皮质激素转化为无活性的糖皮质激素,从而降低局部器官组织细胞内有生物活性的糖皮质激素水平。

作者简介:王兴友(1962-),男,贵州省毕节市人,博士研究生,副主任医师,主要从事ARDS发病机制与治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)65230736,E-mail:xypyxhbj2006@yahoo.com.cn

通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603

收稿日期:2004-11-01;修回日期:2004-12-29

因此可以推测11β-HSD2的表达增多将不利于机体的抗炎作用而有利于ARDS的发生发展。在人血管、肺、肾及肾上腺等组织均有11β-HSD2基因表达[2-4],在内毒素的致炎过程中11β-HSD2是否发生上调尚待研究。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是细胞外信号传导到核内的重要中介蛋白之一,p38 MAPK是其中已鉴定的一个主要亚族,在应激和炎症等多种病理过程均有p38 MAPK的激活[5]。本研究报告内毒素引起血管内皮细胞11β-HSD2基因转录变化,探讨p38 MAPK激活在其中的作用以及11β-HSD2在内毒素发ARDS发生机制中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

血管内皮细胞株来源于美国典型物种保藏中心(ATCC),由

本所李玉英博士惠赠，内毒素是 *E. Coli* 026：B6 菌种来源，从 Sigma 公司购得。p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 购自 Sigma 公司。小牛血清、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、均购自 GIBCO/BRL 公司。Tripure 试剂购自 Roch 公司，逆转录试剂盒、PCR 试剂和 PCR marker 购自 Promega 公司。根据 Cooper、Bland 等[6,7]由上海博亚生物技术有限公司合成引物，11β-HSD 2 引物：正义链 5′-ACCGTATTGGAGTTGAACAGC-3′，反义链 5′-TCACTGACTCT-GTCTTGAAGC-3′。用这对引物可扩增出 477 bp 的 11β-HSD2 的片断。β-actin 引物：正义链 5′-GTCACCAACTGGGACG-ACA-3′，反义链 5′-TGGCCATCTCTTGCTCGAA-3′。用这对引物可扩增出 468 bp 的 β-actin 的片断。

1.2　血管内皮细胞的培养

血管内皮细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内贴壁培养，待长满培养瓶培养面后用 PBS 冲洗 2 次，加入 0.25% 胰蛋白酶消化，传代。

1.3　实验分组

1.3.1　为了确定内毒素对 11β-HSD2 的基因转录的影响　　用 1.0、2.0、10、20、50、100 μg/ L 的内毒素分别与血管内皮细胞共培养 24 h，不接触内毒素的细胞作对照。

1.3.2　p38 MAPK 在内毒素影响 11β-HSD2 基因转录中的作用

在培养细胞中先加入 10 mmol/L SB203580 孵育 2 h 后，再用 10、50 μg/L 的内毒素处理细胞 24 h；不加 SB203580 仅用 10、50 μg/L 的内毒素处理作阴性对照；不用 SB203580 和内毒素的正常培养细胞作正常对照。各组实验均重复 4 次。

1.4　逆转录聚合酶链反应

1.4.1　总 RNA 提取　　从各瓶血管内皮细胞用 Tripure 试剂快速提取总 RNA，紫外分光测定 $D(260)/D(280)$ 确定其纯度和量，1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性。

1.4.2　逆转录合成 cDNA　　取总 RNA 2 μg，用逆转录试剂盒合成 cDNA。

1.4.3　RT-PCR 扩增 cDNA　　取 cDNA 模板用 0.5 mmol/L 的 11β-HSD2 引物进行 PCR，反应体系为 25 μl，其中，50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl（pH 9.0），0.1% TritonX-100，2 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L 的 dNTP，*Taq* DNA 酶 2.5 单位。95 ℃预变性 7 min，94 ℃ 1 min，48 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，进行 38 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。同时用 β-actin 引物扩增 β-actin 作内标，反应体系基本一样，但 $MgCl_2$ 改为 0.75 mmol/L，94 ℃ 1 min，60 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，进行 30 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。

1.4.4　PCR 产物的鉴定和半定量　　取 10 μl PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下观察，并在紫外凝胶图像分析仪上进行荧光亮度测定，计算 11β-HSD2/β-actin 值。

1.5　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计软件，组间差异检验采用 t 检验。

2　结果

2.1　RNA 的纯度、完整性鉴定

各样提取的 RNA 测得 $D(260)/D(280)$ 的比值均大于 1.9，1% 甲醛变性凝胶电泳可见完整清晰的 5、18、28 S 条带，说明 RNA 无明显降解。

2.2　内毒素对血管内皮细胞 11β-HSD2 mRNA 的影响

在正常培养的细胞可检测到较少量的 11β-HSD2 mRNA，内毒素在一定剂量范围（1.0 ~ 100 μg/L）与细胞血管内皮共培养 24 h，可引起 11β-HSD2 mRNA 明显增加，并随着剂量的增高，逐渐形成平台（表 1）。

表 1　内毒素对血管内皮细胞 11β-HSD2 mRNA 的影响（$\bar{x} \pm s$）

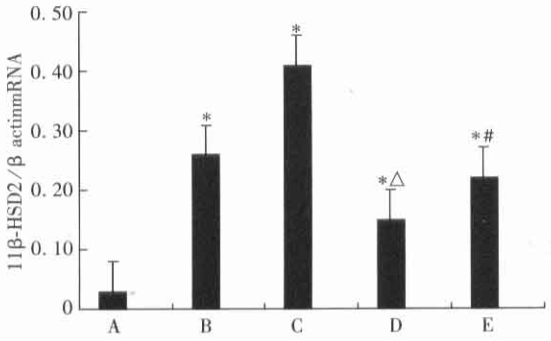
Tab 1　Effect of LPS on expression of 11β-HSD2 mRNA in VEC（$\bar{x} \pm s$）

LPS（μg /L）	11β-HSD2 mRNA/β- actin mRNA
0	0.03 ± 0.004
1.0	0.10 ± 0.04*
2.0	0.12 ± 0.02*
10	0.26 ± 0.03*
20	0.32 ± 0.06*
50	0.41 ± 0.04*
100	0.46 ± 0.06*

*：$P < 0.05$，*vs* 0 μg/L LPS

2.3　p38 MAPK 在内毒素上调 11β-HSD2 mRNA 中的作用

10、50 μg/L 内毒素分别作用 24 h 可使 11β-HSD2 mR2NA/β-actin mRNA 明显升高，抑制 p38 MAPK 可减弱该效应，两者差异有显著，但抑制 p38 MAPK 后 11β-HSD2 mRNA/β-actin mRNA 亦明显高于正常对照（图 1），不能完全回到正常对照水平。表明 p38 MAPK 的激活在内毒素上调 11β-HSD2 mRNA 表达过程中只是部分介导。



A：0 μg/L LPS；B：10 μg/L LPS；C：50 μg/L LPS；D：10 μg/L LPS + SB20358；E：50 μg/L LPS + SB20358；*：$P < 0.05$，*vs* 0 μg/L；△：$P < 0.05$，*vs* 10 μg/ L LPS；#：$P < 0.05$，*vs* 50 μg/L LPS

图 1　p38 MAPK 在内毒素上调 11β-HSD2 mRNA 中的作用

Fig 1　Effects of p38 MAPK on 11β-HSD2 mRNA expression stimulated by LPS

3　讨论

目前已阐明细胞内有活性的 GC 的浓度主要由 11-β 羟基类固醇脱氢酶（11-β hydroxysteroid dehydrogenase，11β-HSD）来控制。11β-羟类固醇脱氢酶是人体内一种微粒体复合酶体，该酶为糖皮质激素的代谢酶，它催化糖皮质激素 C11 位的酮基与羟基之间的氧化还

原反应，使有生物活性的糖皮质激素与无活性的17羟11脱氢糖皮质激素相互转化，从而调节局部器官组织内的有生物活性的糖皮质激素水平。国外学者将其称为控制细胞内糖皮质激素浓度的“分子开关(molecular switch)”。迄今，已鉴定了11β-HSD的两种同工酶——Ⅰ型和Ⅱ型11β-HSD(11β-HSD1和11β-HSD2)。二者是不同基因的产物，11β-HSD1是以NADP(H)为优势辅酶的氧化还原酶，首先从肝脏中纯化，分子量为34×10^3。它具有氧化与还原的双向催化作用，既可使皮质醇脱氢氧化为无活性的可的松，又可使可的松还原为有活性的皮质醇，并以还原反应为主。11β-HSD2首先从肾脏中纯化，分子量约40×10^3，主要以NAD为辅酶，主要是催化单向氧化反应。一般认为11β-HSD1能增强细胞内GC的浓度和活性，而11β-HSD2的作用则刚好相反[2,3,8,9]。此外，鉴于11β-HSD1和11β-HSD2在血管内皮有相当数量的分布，它能通过酶催化作用，影响局部血管床皮质醇的浓度来调节血管张力，有人提出部分高血压病人存在着11β-HSD缺陷，特别是血管床11β-HSD2的缺陷，导致血管的皮质醇受体暴露在过高的皮质醇浓度和对皮质醇的敏感性增强，引起血管张力升高而出现高血压[10]。新近11β-HSD在炎症反应中的调控作用开始得到关注，有研究表明[11]人单核、巨噬细胞内主要存在11β-HSD1，用11β-HSD1的特异阻断剂作用后可增加IL-8的释放，而用内毒素脂多糖(LPS)则能上调11β-HSD1的表达。而日本学者新近报道[12]用免疫组化的方法在14例ARDS死亡患者的肺组织检出大量11β-HSD2，而只在其中2例病人检测出极少的11β-HSD1，认为肺内11β-HSD2表达增多和11β-HSD1表达减少是外源GC治疗ARDS失败的原因。表明11β-HSD1和11β-HSD2的分布存在物种和组织差异性。

本实验显示内毒素能明显上调血管内皮细胞内11β-HSD2 mRNA的表达，同时我们的前期实验显示用11β-HSD2的特异阻断剂预处理血管内皮细胞，可明显降低内毒素诱导的血管内皮细胞的凋亡(该结果将另文发表)。表明11β-HSD2在血管内皮细胞内的表达增多导致细胞内糖皮质激素的活性降低可能是内源性抗炎机制减弱的一个方面，也可能是内毒素诱导机体炎症反应和ARDS发生的一个机制。而p38 MAPK是已鉴定MAPK家族的亚族之一，在应激和炎症等多种病理过程均有p38 MAPK激活介导[5]。本实验显示抑制p38 MAPK就可部分抑制内毒素诱导的11β-HSD2 mRNA增加，姜勇等[13]报道提示内毒素可引起剂量依赖性的p38激酶活性增加。可见，内毒素诱导11β-HSD2 mRNA增加很可能有部分是通过激活p38 MARK来实现的。11β-HSD2可以作为防治ARDS等炎性疾病的一个治疗靶点，通过阻断p38 MAPK抑制11β-HSD2的表达，提高血管内皮细胞内有生物活性的糖皮质激素水平来防治ARDS等炎性疾病是一个值得研究的课题。

参考文献：

[1] Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, *et al*. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis[J]. Crit Care Med, 2002, 30(5 Suppl): S302 - S312.

[2] Walker E A, Stewart P M. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections[J]. Trends Endocrinol Metab, 2003, 14(7): 334 - 339.

[3] Blum A, Maser E. Enzymology and molecular biology of glucocorticoid metabolism in humans[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003, 75: 173 - 216.

[4] Krozowski Z. The 11β-hydroxysteroid dehydrogenases: functions andphysiological effects[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 151(1-2): 121 - 127.

[5] Yue T L, Ni J, Romanic A M, *et al*. TL1, a novel tumor necrosis factor-like cytokine, induces apoptosis in endothelial cells. Involvement of activation of stress protein kinases (stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase) and caspase-3-like protease[J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1479 - 1486.

[6] Cooper M S, Walker E A, Bland R, *et al*. Expression and functional consequences of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone[J]. Bone, 2000, 27(3): 375 - 381.

[7] Bland R, Worker C A, Noble B S, *et al*. Characterization of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase activity and corticosteroid receptor expression in human osteosarcoma cell lines[J]. J Endocrinol, 1999, 161(3): 455 - 464.

[8] Heiniger C D, Rochat M K, Frey F J, *et al*. TNF-alpha enhances intracellular glucocorticoid availability[J]. FEBS Lett, 2001, 507(3): 351 - 356.

[9] Cai T Q, Wong B, Mundt S S, *et al*. Induction of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001, 77(2-3): 117 - 122.

[10] Morris D J, Brem A S, Ge R, *et al*. The functional roles of 11β-HSD1: vascular tissue, testis and brain[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 203(1-2): 1 - 12.

[11] Thieringer R, Le Grand C B, Carbin L, *et al*. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages[J]. J Immunol, 2001, 167(1): 30 - 35.

[12] Satoshi S, Tsubochi H, Ishibashi H, *et al*. Increased expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Pathol Int, 2003, 53(11): 751 - 756.

[13] 姜 勇，刘爱华，张 琳，等. 脂多糖激活p38在诱导肿瘤坏死因子α基因表达中的作用[J]. 中华医学杂志，1999，79(5)：360 - 364.

(编辑 龙 亮)