论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0670-04

全氟化碳对脂多糖诱导肺微血管内皮细胞表达ICAM-1的影响

徐顺贵[1],吴国明[1],徐 智[1],冯起甲[1],郭芮伶[1],陈维中[1],张健鹏[2] ([1]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;[2]武警总医院呼吸科,北京 100039)

提 要:目的 观察全氟化碳(PFC)对脂多糖(LPS)诱导肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC)表达细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的影响,探讨PFC的抗炎作用及其对PMVEC的保护机制。**方法** 采用组织块法培养大鼠PMVEC,将细胞接种于Transwell小室,按随机数字表法分为空白对照组(C)、PFC干预组(F)、LPS刺激组(L)、LPS刺激+PFC干预组(LF),以处理0 h为空白对照,各处理组分别给予PFC或100 μg/L LPS共孵育3、8、24 h,通过MTT法观测PFC作用后正常大鼠PMVEC细胞活力变化,应用逆转录PCR(RT-PCR)和流式细胞术(FCM)分别检测各组各时相点大鼠PMVEC ICAM-1 mRNA和蛋白表达量。**结果** PFC作用后,正常大鼠PMVEC的细胞活力未见明显改变。各组各时相点ICAM-1 mRNA表达的变化规律与蛋白质水平基本一致,F组各时相点ICAM-1的表达量与C组比较均无显著性差异($P>0.05$);L组各时相点细胞的ICAM-1表达均较C组显著增强($P<0.05$,$P<0.01$);LF组与L组同时相点比较,3 h组ICAM-1表达量无明显差异($P>0.05$),但8 h和24 h组均有显著降低($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** PFC通过抗炎效应直接下调LPS诱导PMVEC表达ICAM-1,发挥PMVEC保护作用。

关键词: 全氟化碳;肺微血管内皮细胞;细胞间黏附分子-1;脂多糖;急性肺损伤

中图法分类号: R392.3;R563;R967 **文献标识码:** A

Effects of perfluorocarbon on lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured pulmonary microvascular endothelial cells

XU Shun-gui[1], WU Guo-ming[1], XU Zhi[1], FENG Qi-jia[1], GUO Rui-ling[1], CHEN Wei-zhong[1], ZHANG Jian-peng[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of perfluorocarbon (PFC) on lipopolysaccharide (LPS)-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in cultured pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs). **Methods** Rat PMVECs cultured by peripheral lung tissue-sticking method were seeded in Transwell chambers and divided randomly into 4 groups: group C remained untreated as blank control; group F was incubated with PFC; group L was stimulated with 100 μg/L LPS; group LF was treated with 100 μg/L LPS and PFC. After treated for 3, 8 and 24 h, the cells of each group were harvested respectively. The cell viability of normal rat PMVECs treated by PFC was determined by MTT assay. Then the mRNA expression of ICAM-1 was semi-quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction and the level of ICAM-1 protein expression was detected by flow cytometry. **Results** The cell viability of normal rat PMVECs was not impaired significantly by treatment of PFC. Both mRNA and protein expression of ICAM-1 had no significant difference between group F and group C ($P>0.05$). Treatment of group L cells with 100 μg/L LPS significantly induced the mRNA and protein expression of ICAM-1 in a time-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). In comparison with group L correspondingly, the mRNA and protein expression of ICAM-1 in group LF were not suppressed significantly by treatment for 3 h ($P>0.05$), while did for 8 h, 24 h ($P<0.01$, $P<0.05$).

基金项目: 国家"十五"重大攻关课题(2003BA712A07-01)

Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of the National "Tenth Five-Year Plan" of China (2003BA712A07-01)

作者简介: 徐顺贵(1974-),男,福建省仙游县人,博士研究生,主治医师,主要从事急性肺损伤发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68755320

通讯作者: 吴国明,E-mail:guomingwu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2006-11-27;**修回日期:** 2007-01-18

Conclusion　Perfluorocarbon suppresses the mRNA and protein expression of ICAM-1 induced by LPS in cultured PMVECs, which suggests a potential mechanism that PFC protects PMVECs from LPS-induced injury via its anti-inflammatory effect.

Key words: perfluorocarbon; pulmonary microvascular endothelial cells; intercellular adhesion molecule-1; lipopolysaccharide; acute lung injury

内毒素性急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是临床常见的危重症，肺泡毛细血管膜损伤是其主要病理生理改变，肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC)表达的细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在介导多形核白细胞(PMN)聚集、激活和致伤过程中起关键作用[1]。采用全氟化碳(perfluorocarbon, PFC)部分液体通气或吸入治疗 ALI 可取得较好疗效[2,3]，然而其机制尚未完全阐明，特别是 PFC 的抗炎作用有待进一步研究。虽然动物实验已显示部分液体通气可减轻内毒素性 ALI 肺内 PMN 的聚集[4]，但 PFC 是否能直接下调脂多糖(LPS)诱导 PMVEC ICAM-1 的表达尚不明确。因此，本研究旨在观察 PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC 表达 ICAM-1 的影响，以探讨 PFC 对 PMVEC 的保护作用，从抗炎角度进一步阐明 PFC 治疗内毒素性 ALI 的疗效机制。

1　材料与方法

1.1　主要实验材料

DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司)，优等胎牛血清(美国 Gibco 公司)，胰蛋白酶(美国 Amresco 公司)，异硫氰酸荧光素标记植物凝集素 BSI(FITC-BSI，美国 Sigma 公司)、LPS(*E. coli* O111:B4，美国 Sigma 公司)、四甲基偶氮唑盐(MTT，美国 Sigma 公司)，Biozol 总 RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒(日本 Bioflux 公司)，FITC 标记小鼠抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体(英国 Serotec 公司)，FITC 标记小鼠 IgG1 同型对照抗体(美国 Caltag 公司)，PFC(C_8F_{18}，上海华捷视医疗设备有限公司)，兔抗大鼠 CD34 多克隆抗体(武汉博士德公司)，S-P 免疫组化染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥公司)，Transwell 小室(美国 Corning 公司)，SD 大鼠(由第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2　大鼠 PMVEC 的培养和鉴定

健康 3 月龄雄性 SD 大鼠 10 只，体质量(145.1 ± 10.6)g。参照文献[5]采用组织块法培养大鼠 PMVEC，通过 CD34 免疫细胞化学染色和植物凝集素 BSI 结合试验对 2 代细胞进行鉴定。3～4 代细胞接种于 Transwell 小室，台盼蓝拒染法测定细胞活力后用于实验。

1.3　实验分组和处理

将细胞分为空白对照组(C)、PFC 干预组(F)、LPS 刺激组(L)、LPS 刺激 + PFC 干预组(LF)。设处理 0 h 为空白对照组，F 组在 Transwell 外室中加入 PFC 进行干预，L 组在 Transwell 内室中给予 100 μg/L LPS 刺激细胞，LF 组在 Transwell 内室和外室中分别施加 100 μg/L LPS 和 PFC 进行共孵育，各处理组细胞孵育 3、8、24 h 后进行指标检测。实验重复 5 次。

1.4　细胞活力检测

采用 MTT 法观测 PFC 对正常大鼠 PMVEC 细胞活力的影响。接种于 96 孔 Transwell 小室的大鼠 PMVEC 经 PFC 处理 0、3、8、24 h 后，每孔加 5 μg/L MTT 溶液 20 μl，37 ℃继续孵育 4 h，弃上清，加入 DMSO 150 μl，振荡 10 min 使结晶完全溶解，用酶标仪在波长 490 nm 处测定各孔吸光度值[D(490)]。

1.5　细胞 ICAM-1 mRNA 表达量检测

接种于 6 孔 Transwell 小室中的大鼠 PMVEC 经相应处理后，通过 RT-PCR 法检测各组各时相点细胞 ICAM-1 mRNA 的表达水平。应用 Biozol 提取细胞总 RNA，1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计测定其纯度并定量。RT-PCR 采用两步法，即先取总 RNA 2 μg 逆转录为 cDNA，然后进行 PCR 扩增。大鼠 ICAM-1、β-actin 引物采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 进行设计。ICAM-1：上游 5′-TATCGGGATGGTGAAGTCTGTC-3′，下游 5′-TGGCGGTAATAGGTGTAAATGG-3′，扩增产物长度 204 bp；β-actin：上游 5′-CTGCCGCATCCTCTTCCTC-3′，下游 5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3′，扩增产物长度 398 bp。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

PCR 扩增条件：ICAM-1 扩增条件为 94 ℃预变性 3 min，接着 94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 50 s，进行 30 个循环，末次循环后 72 ℃ 延伸 5 min；β-actin 扩增的退火温度为 55 ℃，其余条件与 ICAM-1 相同。

PCR 产物的半定量分析：PCR 后取 5 μl 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪扫描成像，采用 Alpha Innotech 公司图像分析软件测定各条带吸光度值。以同一样本 ICAM-1 条带与 β-actin 条带的吸光度值之比表示 ICAM-1 mRNA 相对表达量。

1.6　细胞 ICAM-1 蛋白表达量检测

采用流式细胞术(FCM)检测各组各时相点大鼠 PMVEC ICAM-1 蛋白表达量。各组细胞处理达到预定时相点后，分别加入 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 混合消化液消化各孔细胞，0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 1 次，1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞，用 1% BSA/PBS 重悬并调整细胞密度为 1×10^6/ml，吸取 100 μl 细胞悬液放入 EP 管，加入 FITC 标记小鼠抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体 10 μl，同时设立同型对照，相应标本中加入 FITC 标记小鼠 IgG1 同型对照抗体 10 μl，各管混匀后在室温下避光孵育 30 min，1% BSA/PBS 洗涤细胞 1 次，离心弃上清液，细胞重悬于 0.2 ml 1% BSA/PBS 中，上流式细胞仪检测荧光值，每管样品计数 10 000 个细胞，以平均荧光强度(MFI)表示 ICAM-

1的蛋白表达量。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析(Tukey 法)。

2 结果

2.1 大鼠 PMVEC 鉴定

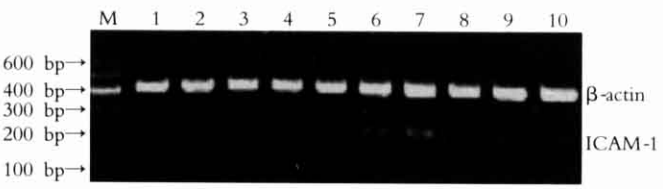
倒置相差显微镜下见培养细胞呈短梭形或多角形，铺路石样排列，单层贴壁生长，CD34 免疫细胞化学染色阳性，与植物凝集素 FITC-BSI 结合呈阳性，证实所养细胞为大鼠 PMVEC。鉴定结果显示细胞纯度大于 90%。台盼蓝拒染法检测各实验组细胞活力，拒染率均大于 95%。

2.2 PFC 对正常大鼠 PMVEC 细胞活力的影响

正常大鼠 PMVEC 经 PFC 处理 3、8、24 h 后，MTT 法测得各组吸光度值分别为(0.921 ±0.049)、(0.919 ±0.035)、(0.911 ±0.012)，与空白对照(0 h)组(0.923 ±0.037)比较，无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC ICAM-1 mRNA 表达的影响

F 组细胞用 PFC 干预 3、8、24 h 后，各时相点 ICAM-1 mRNA 的相对表达量分别为(0.137 ±0.086)、(0.134 ±0.062)、(0.154 ±0.078)，与 C 组(0.083 ±0.031)比较均无显著性差异($P>0.05$)；L 组给予 LPS 刺激 3、8、24 h 后，各时相点细胞的 ICAM-1 mRNA 相对表达量分别为(0.324 ±0.089)、(0.353 ±0.095)、(0.566 ±0.230)，均较 C 组显著增高($P<0.05$，$P<0.01$)；LF 组细胞经 LPS 刺激和 PFC 干预后，与 L 组同时相点比较，3 h 组 ICAM-1 mRNA 表达量(0.219 ±0.075)无明显差异($P>0.05$)，但 8 h 组(0.202 ±0.049)和 24 h 组(0.224 ±0.067)均有显著降低($P<0.01$)。各组各时相点大鼠 PMVEC ICAM-1 mRNA 表达情况见图 1。



M：标准；1：空白对照组；2－4：PFC 干预 3、8、24 h 组；5－7：LPS 刺激 3、8、24 h 组；8－10：LPS 刺激＋PFC 干预 3、8、24 h 组

图 1 PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC ICAM-1 mRNA 表达的影响

2.4 PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC ICAM-1 蛋白表达的影响

F 组细胞用 PFC 干预 3、8、24 h 后，各时相点 ICAM-1 蛋白表达 MFI 分别为(11.52 ±1.35)、(12.24 ±2.21)、(12.60 ±2.54)，与 0 h 组(9.06 ±1.92)比较均无显著性差异($P>0.05$)；L 组给予 LPS 刺激 3、8、24 h 后，各时相点细胞的ICAM-1 蛋白表达的 MFI 分别为(13.48 ±2.28)、(15.64 ±2.67)、(15.96 ±2.78)，均较 0 h 组显著增强($P<0.05$，$P<0.01$)；LF 组细胞经 LPS 刺激和 PFC 干预后，与 L 组同时相点比较，3 h 组 ICAM-1 蛋白表达 MFI(13.18 ±1.72)无明显差异($P>0.05$)，但 8 h 组(11.48 ±2.07)和 24 h 组(10.70 ±3.01)均有显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

内毒素是 ALI 的主要致病因素之一。PMVEC 作为肺泡毛细血管膜的内屏障，是内毒素性 ALI 时 LPS 攻击的首要靶细胞，该细胞损伤在 ALI 的发病机制中居于重要地位。PMVEC 受 LPS 刺激后可表达多种黏附分子，其中 ICAM-1 在介导 PMN 黏附、激活和致伤过程中起着关键作用[6]。PMN 与 PMVEC 黏附后，既可激活 PMN 释放弹性蛋白酶等炎性介质降解 PMVEC 结构蛋白，又能启动 ICAM-1 信号转导重构 PMVEC 细胞骨架[7]，致使 PMVEC 的结构和功能受到破坏。下调 ICAM-1 异常表达，可减少 PMN 与 PMVEC 黏附，减轻黏附后致伤效应，有效保护 PMVEC。

动物实验和临床研究表明，采用 PFC 部分液体通气或吸入治疗 ALI 可取得较好的疗效。这一方面得益于 PFC 具有高携氧能力、低表面张力等特殊的理化性质[8]，另一方面与 PFC 的抗炎效应密切相关。目前，有关 PFC 的抗炎机制仍存在一定争议。有学者认为，PFC 仅是通过物理性阻隔炎性细胞和炎症因子的相互作用而发挥抗炎效应[9]。另有观点认为，PFC 具有直接抗炎的生物效应[10]。其中的一项研究资料显示，PFC 显著抑制肺灌洗 ALI 小猪模型肺组织 ICAM-1 的表达[11]，由此提示 PFC 对肺组织 ICAM-1 的异常表达具有干预作用。然而 PFC 通过何种途径下调肺组织 ICAM-1 表达尚不明确。由于 PFC 具有一定的脂溶性[12]，可穿越肺泡毛细血管膜进入肺循环[13]，而 PMVEC 是肺组织 ICAM-1 主要的细胞来源，因此我们推测 PFC 可直接作用于 PMVEC 并下调 ICAM-1 的表达。为了验证上述推测，我们采用组织块法培养了大鼠 PMVEC，将细胞接种于 Transwell 小室与 LPS、PFC 共孵育，通过 MTT 法观察 PFC 对正常大鼠 PMVEC 细胞活力的影响，运用逆转录 PCR 技术和流式细胞术分别从 mRNA 和蛋白水平观测 PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC 表达 ICAM-1 的影响。实验结果显示，PFC 未改变正常大鼠 PMVEC 的细胞活力，对正常细胞 ICAM-1 的表达亦无明显影响。用 LPS 刺激大鼠 PMVEC 3 h～24 h，细胞 ICAM-1 表达量逐渐增加，与 0 h 组比较具有显著差异。加入 PFC 干预，与 LPS 刺激组比较，3 h干预组的 ICAM-1 表达量未见明显变化，但 8 h 和

24 h 却有显著降低。以上结果表明，PFC 对大鼠 PMVEC 无明显的毒副作用，PFC 对 LPS 诱导大鼠 PMVEC 表达 ICAM-1 具有明显的下调作用。由于共孵育时应用了 Transwell 小室，既体外模拟了肺泡毛细血管膜，又排除了 PFC 的物理阻隔因素，因此进一步证实了 PFC 是通过直接抗炎的生物效应而下调 ICAM-1 表达。

综上所述，通过本研究我们明确了 PFC 具有抗炎的生物效应，能直接下调 LPS 诱导 PMVEC ICAM-1 的异常表达，进而抑制 PMN 对 PMVEC 的黏附和致伤，发挥 PMVEC 保护作用。由此，我们从抑制黏附分子表达角度初步阐明了 PFC 治疗内毒素性 ALI 的疗效机制。

参考文献：

[1] Hildebrand F, Pape H C, Harwood P, *et al*. Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis[J]. Exp Toxicol Pathol, 2005, 56(4-5): 281 - 290.

[2] 宋　鹏，李　琦，王长征，等. 部分液体通气联合伊洛前列素治疗兔油酸型急性肺损伤[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：587 - 590.

[3] 黄志坚，李　琦，宋　鹏，等. 全氟化碳联合沐舒坦露化吸入对兔急性肺损伤的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(6)：490 - 493.

[4] Rotta A T, Steinhorn D M. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 1998, 26(10): 1707 - 1715.

[5] 徐顺贵，吴国明，徐　智，等. 组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞的综合鉴定[J]. 第三军医大学学报，2007，29(1)：39 - 42.

[6] 赵高峰，巴玉峰，齐　宇，等. 兔肺移植早期肺组织中细胞间黏附分子-1 表达的变化[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(4)：625 - 627.

[7] Wang Q, Yerukhimovich M, Gaarde W A, *et al*. MKK3 and -6-dependent activation of p38alpha MAP kinase is required for cytoskeletal changes in pulmonary microvascular endothelial cells induced by ICAM-1 ligation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(2): L359 - L369.

[8] Bleyl J U, Ragaller M, Tscho U, *et al*. Changes in pulmonary function and oxygenation during application of perfluorocarbon vapor in healthy and oleic acid-injured animals[J]. Crit Care Med, 2002, 30(6): 1340 - 1347.

[9] Baba A, Kim Y K, Zhang H, *et al*. Perfluorocarbon blocks tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells in vitro[J]. Crit Care Med, 2000, 28(4): 1113 - 1118.

[10] von-der-Hardt K, Kandler M A, Fink L, *et al*. Laser-assisted microdissection and real-time PCR detect anti-inflammatory effect of perfluorocarbon[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(1): L55 - L62.

[11] Schoof E, von-der-Hardt K, Kandler M A, *et al*. Aerosolized perfluorocarbon reduces adhesion molecule gene expression and neutrophil sequestration in acute respiratory distress[J]. 2002, 457(2 - 3): 195 - 200.

[12] Obraztsov V V, Neslund G G, Kornbrust E S, *et al*. *In vitro* cellular effects of perfluorochemicals correlate with their lipid solubility[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(5): L1018 - L1024.

[13] Reickert C, Pranikoff T, Overbeck M, *et al*. The pulmonary and systemic distribution and elimination of perflubron from adult patients treated with partial liquid ventilation[J]. 2001, 119(2): 515 - 522.

（编辑　王　红）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 x，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文"υ"，不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r"，不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"－"或"＋"表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{5+} 等，不采用 Ca^{++}、P^{+++++}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角，例如：$^{99}Tc^m$、$^{113}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成"^{131}碘"、"铟^{113m}"、"P^{32}"、"Tc^{99m}"。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）3 类，r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

本刊编辑部