论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2582-04

体外LPS诱导血管内皮细胞通透性改变及其与连接蛋白43的关系

明 佳[1],袁侨英[2],周 艳[1],苟元彬[3],刘良明[4] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:乳腺疾病中心[1],老年科[2];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:第六研究室[3],第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[4])

[摘要] **目的** 研究缝隙连接蛋白(connexin,Cx)43在脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的大鼠血管内皮细胞(vascular endothelial cell,VEC)通透性中的表达变化及其意义。**方法** 以1、2、3、4 μg/ml LPS刺激原代培养的大鼠VEC,观察作用15、30 min,1、2、3、4、5、6、7 h后VEC增殖活力和通透性的变化;2 μg/ml LPS刺激VEC后,采用RT-PCR和Western blot等方法检测Cx43的表达变化;分析VEC通透性和Cx43表达之间的相关性。**结果** 1、2 μg/ml的LPS对VEC增殖活力无明显影响,3、4 μg/ml的LPS明显降低了VEC的增殖($P<0.01$);2 μg/ml的LPS能够较好地模拟脓毒性休克的血管高通透性($P<0.01$);用此浓度的LPS刺激VEC后Cx43的mRNA和蛋白表达均逐渐降低($P<0.01$);Cx43的表达与LPS引起的VEC通透性改变呈负相关关系($r=-0.877$,$P<0.01$)。**结论** Cx43可能参与了脓毒性休克后VEC通透性的调节;Cx43可能具有抑制脓毒性休克后血管内膜通透性的作用。

[关键词] 脓毒性休克;脂多糖;血管通透性;血管内皮细胞;连接蛋白43
[中图法分类号] R322.12;R363.21;R631.1 **[文献标志码]** A

Effect of LPS on vascular permeability of vascular endothelial cells and role of connexin43 in the process

Ming Jia[1], Yuan Qiaoying[2], Zhou Yan[1], Gou Yuanbin[3], Liu Liangming[4] ([1]Breast Disease Center, [2]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department 6, [4]Department 2, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] Objective To investigate the expression and significance of connexin43 (Cx43) in the increased vascular permeability induced by LPS. Methods Rat vascular endothelial cells (VECs) were primary isolated from normal SD rats' superior mesenteric arteries (SMAs), and then cultured with treatment of 1, 2, 3 or 4 μg/ml LPS for 15 and 30 min, and 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7 h. Cell vitality and permeability were determined with MTT assay and Transwell chamber technique respectively. The mRNA and protein expression of Cx43 were determined in the cells after 2 μg/ml LPS treatment. Results LPS at 1 and 2 μg/ml didn't change the cell vitality, while 3 and 4 μg/ml LPS diseased it obviously ($P<0.01$). LPS of 2 μg/ml increased the cell permeability ($P<0.01$). The expression of Cx43 at mRNA and protein levels was gradually decreased after 2 μg/ml LPS treatment. VECs' permeability and the expression of Cx43 had a negative correlationship. Conclusion Cx43 is involved in the regulation of vascular permeability following septic shock. Cx43 may be used to attenuate vascular permeability in septic shock.

[Key words] septic shock, LPS, vascular permeability, vascular endothelial cell, connexin 43

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5102). Corresponding author: Liu Liangming, E-mail: liangmingliu@yahoo.com

血管通透性是指血液成分通过微血管壁透出到血管外的能力,它是衡量不同脏器、组织、细胞和血液进行物质交换能力的重要指标。血管通透性增高涉及炎症、烧伤、休克、免疫、肿瘤转移等一系列病理过程的发生和发展,甚至是晚期休克患者死亡的主要原因之一[1-2]。由于其发生机制尚未完全研究清楚,目前尚无改善血管通透性的有效措施。我们的前期研究发现,脂多糖(lipopolysaccharide;LPS)和组胺可以呈剂量依赖性地增加单层培养血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)的通透性,机制主要与其对细胞骨架和细胞凋亡的调节有关[3];VEC同时表达连接蛋白(connexin,Cx)37、40和43[4],Cx43是目前研究最广、了解最多的连接蛋白之一;我们前期研究发现,Cx43参与了失血性休克后血管内膜依赖的舒缩反应性的调节[5],但是,Cx43在脓毒性休克血管高通透性中的作用及机制尚不清楚。为此,本实验围绕LPS对VEC通透性的作用及Cx43的表达变化规律展开研究,希望通过本研究拓宽对VEC和Cx43的认识,为休克后血管

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5102)
[通信作者] 刘良明,E-mail:liangmingliu@yahoo.com

通透性的防治提供理论上的帮助,为严重创伤/休克的治疗开辟一个新的方向。

1 材料与方法

1.1 VEC原代培养及传代

参考我室原有的实验方法进行VEC原代培养及传代[6],取3~5代的VEC用于实验,根据免疫荧光试剂盒(北京中山生物技术有限公司)说明,以兔抗大鼠VWF抗体(1∶100,Santa Cruz)鉴定VEC的VWF表达。

1.2 实验分组

不同浓度LPS对VEC增殖活力的实验分为5个组($n=8$):正常对照组、LPS 1、2、3、4 μg/ml组。不同浓度LPS对VEC通透性影响的实验分为4个组($n=8$):正常对照组、LPS 1、2、3组。Cx43的mRNA和蛋白表达检测实验分组($n=8$):正常VEC组、2 μg/ml LPS作用15、30 min,1、2、3、4、5、6、7 h。

1.3 不同浓度LPS对VEC增殖活力的影响

采用四氮噻唑蓝(MTT)法,将VEC以1×10^6/ml的密度、200 μl/孔接种于96孔培养板中,分别加入1、2、3、4 μg/ml的LPS进行刺激,每种浓度6复孔,分别在刺激15、30 min,1、2、3、4、5、6、7 h后每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl,37 ℃孵育4 h,离心半径9 cm,1 000 r/min离心5 min。弃上清,每孔加入150 μl二甲基亚砜振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择490 nm波长在酶联免疫检测仪上测定各孔的光密度值,按[实验组D(490)/对照组]×100%计算细胞增殖率。

1.4 不同浓度LPS对VEC通透性的影响

将原代培养的VEC传代至第3~5代时用于实验。按每孔2×10^5个细胞接种于24孔板的Transwell(直径6 mm,孔径3.0 μm)中,在上、下腔内分别加入DMEM/F12完全培养基,上室200 μl,下室600 μl,培养72 h后在Transwell培养上室中加入5 μl异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(4 mg/ml),5 min后从下室取100 μl培养液至96孔板内(计为零时),按照实验分组要求给予不同浓度的LPS,分别在作用后15、30 min,1、2、3、4、5、6、7 h从下室取100 μl培养液至96孔板内,每次从下室取100 μl培养液后,补充相同体积培养液入下室,根据所取液体荧光素的累计数占5 μl荧光素标记的牛血清白蛋白总荧光素的百分率计算结果,通过观察百分率的变化反映LPS对VEC通透性的影响。

$$渗透率=\frac{X_1+X_2+\cdots+X_n}{总荧光值}\times100\%$$

渗透率=(X1:第一个取样点所测得荧光素值;X2:第二个取样点所测得荧光素值;Xn:第n个取样点所测得荧光素值。

1.5 2 μg/ml LPS刺激下Cx43的mRNA表达

采用RT-PCR技术进行Cx43 mRNA表达的检测,细胞总RNA的提取按常规方法进行,按照试剂盒说明(TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0,日本)将组织总RNA进行逆转录(42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,1个循环),Cx43的引物正义链:GATGAGGAAGGAAGAGAAGC;反义链:TTGTTTCT-GTCACCAGTAAC;GAPDH的引物正义链:AATGGGAAGCTG-GTCATCAAC;反义链:CCAAAGTTGTCATGGATGACC。产物长度588 bp,Cx43的PCR扩增首先是94 ℃预变性2 min,然后94 ℃ 30 s,50.5 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min循环40次,最后72 ℃延伸10 min;GAPDH的扩增程序是:94 ℃,2 min,然后94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min循环40次,最后72 ℃延伸10 min;各实验组的RT-PCR产物电泳影像通过凝胶扫描仪进行DNA电泳条带和光量子强度分析,以GAPDH基因作内对照,将Cx43与GAPDH的比值作为连接蛋白表达水平的参数,对连接蛋白的PCR产物进行相对定量。

1.6 2 μg/ml LPS刺激下Cx43的蛋白表达

采用Western blot技术进行Cx43蛋白表达检测,按常规方法提取细胞总蛋白,用Folin-酚法将样本总蛋白定量为4 mg/ml。实验当天取35 μl样本总蛋白加入5 μl上样缓冲液[7],100 ℃沸水煮5 min;进行10% SDS-PAGE胶电泳(60 V电压,3~4 h),电泳完毕后进行常规的转膜、封闭后孵育兔抗大鼠Cx43多克隆抗体(4 μg/ml,Zymed,美国);兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体(1∶5 000,ProteinTec,美国);辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1∶4 000,中杉金桥)室温孵育1 h后,暗室中将膜与增强发光底物反应(KPL,美国)约5 min,X胶片感光、显影及定影。以GAPDH基因作内对照,将X胶片通过扫描呈像,运用Photoshop 8.0进行条带灰度的数据采集,将Cx43与GAPDH的比值作为连接蛋白表达水平的参数,对连接蛋白的PCR产物进行相对定量。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行数据统计,统计结果用$\bar{x}\pm s$表示,各组间均数比较行一维方差分析和Post hoc检验(S-N-K/LSD),相关性分析采用Pearson correlation检验。

2 结果

2.1 VEC原代培养及传代

显微镜下观察VEC呈扁平状、卵圆形、单层鹅卵石状镶嵌排列,VEC的VWF表达呈强阳性表达(图1),表达VWF的细胞数为91.3%。

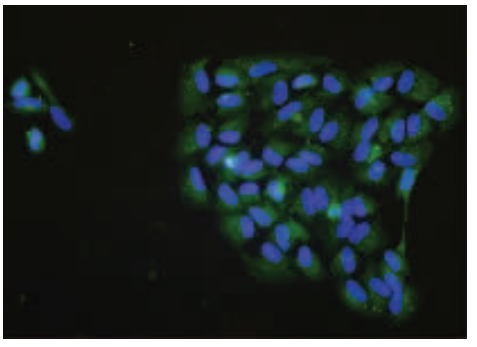


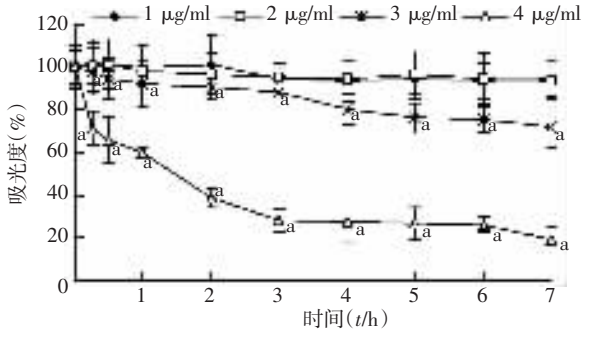
图1 免疫荧光染色观察血管内皮细胞的VWF表达 (×200)

2.2 不同浓度LPS对VEC增殖活力的影响

1、2 μg/ml LPS作用于VEC 3 h后,细胞增殖活力有轻度下降,但是无统计学意义($P>0.05$);3、4 μg/ml LPS作用15 min即有VEC增殖力的明显下降($P<0.01$),随着时间的延长,细胞的增殖能力逐渐下降,3 μg/ml作用5 h后、4 μg/ml作用3 h后,VEC增殖能力的下降幅度逐渐减缓(图2)。

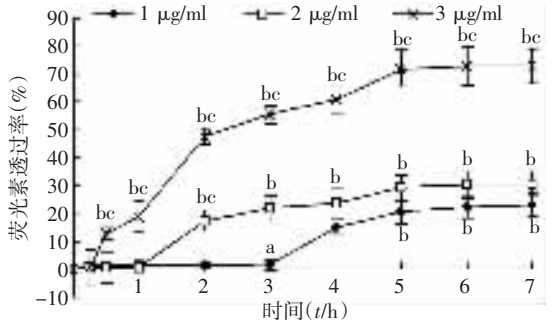
2.3 不同浓度LPS对VEC通透性的影响

1 μg/ml LPS作用3 h后VEC通透性开始增加($P<0.05$),4 h后增加明显($P<0.01$);2 μg/ml LPS作用2 h后VEC通透性明显增加($P<0.01$);3 μg/ml LPS作用30 min后VEC通透性明显增加($P<0.01$);3个浓度的LPS作用5 h后VEC通透性趋于稳定,6、7 h与5 h比较无统计学差异($P>0.05$,图3)。



a：$P<0.01$，与正常对照组(0 h)比较

图2　不同浓度 LPS 对 VEC 增殖能力的影响

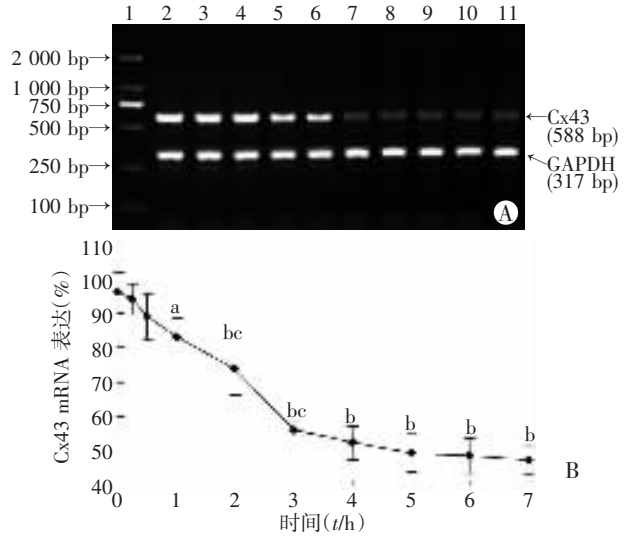


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组(0 h)比较；c：$P<0.01$，与同一 LPS 浓度组中的前一时间点比较

图3　不同浓度 LPS 对 VEC 通透性的影响

2.4　2 μg/ml LPS 对 Cx43 mRNA 表达的影响

Cx43 在 2 μg/ml LPS 作用 15 min 开始进行性表达下降，1 h 后显著低于正常对照组($P<0.05$)，2 h 后非常显著低于正常对照组($P<0.01$)，LPS 刺激 2～3 h，Cx43 表达下降幅度最明显(与前一时间组相比 $P<0.01$)，5、6、7 h Cx43 mRNA 的表达维持在低水平(图4)；与2 μg/ml LPS 作用后 VEC 通透性变化进行相关性分析，二者呈现明显的负相关关系($r=-0.952$，$P<0.01$)。

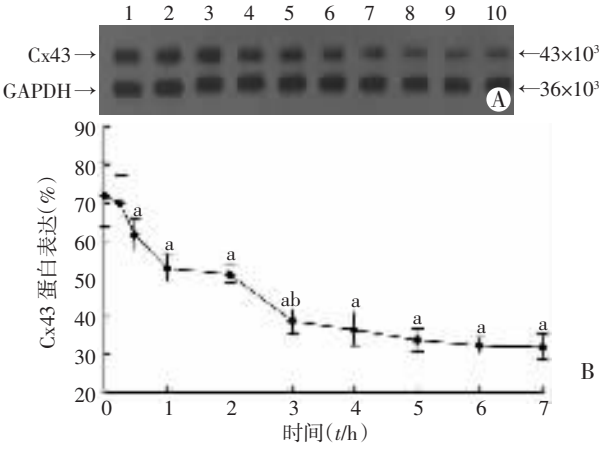


A：RT-PCR 检测结果　1：DNA 标准；2：正常对照组；3～11：分别表示 2 μg/ml LPS 作用后 15、30 min，1、2、3、4、5、6、7 h；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组(0 h)比较；c：$P<0.01$，与前一时间点比较

图4　2 μg/ml LPS 作用不同时间点对 Cx43 mRNA 表达的影响

2.5　2 μg/ml LPS 对 Cx43 蛋白表达的影响

Cx43 在 2 μg/ml LPS 作用 30 min 后表达明显降低，在作用后 30 min、1、2、3、4、5 h 表达进行性降低，5、6、7 h 未见明显下降，3 h 组的表达量下降幅度最明显(与其前一时间组相比 $P<0.01$)(图5)。与 2 μg/ml LPS 作用后 VEC 通透性行相关性分析，二者呈现明显的负相关关系($r=-0.877$，$P<0.01$)。



A：Western blot 检测结果　1：正常对照组；2～10：分别表示 LPS 作用后 15、30 min、1、2、3、4、5、6、7 h；B：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与正常对照组(0 h)比较；b：$P<0.01$，与 2 h 组比较

图5　2 μg/ml LPS 作用不同时间对 VEC 内 Cx43 蛋白表达的影响

3　讨论

目前，有关休克后血管通透性增高的机制研究认为，VEC 间裂隙形成是严重感染、烧伤、休克后血管通透性增加的主要原因之一[8]，大分子物质从微静脉壁透出有穿内皮细胞和内皮细胞旁两条途径，其中，穿细胞途径主要由 VEC 表面受体或细胞内囊泡介导，是一种耗能的透出方式，多数学者认为细胞旁途径是大分子物质透出微静脉的主要途径[3]，因此，VEC 间的连接及其相关蛋白成为当前研究血管通透性的重点之一。

VEC 间的连接包括紧密连接、黏附连接和缝隙连接(gap junction，GJ)[9]，前两者在炎症后血管通透性增高中的作用已得到公认，即炎症刺激通过降低紧密连接和粘附连接的粘附强度，促进了细胞收缩和 VEC 间裂隙的形成[10]。GJ 是位于相邻细胞膜上的、直径约 1.5 nm 的亲水通道，它允许电信号和相对分子质量低于 1 000 或直径小于 1.0 nm 的离子或小分子物质通过，对维持血管功能的稳定和一致、内环境的稳定起着重要的调控作用[11]。GJ 的基本组成单位是连接蛋白，在人类基因谱中连接蛋白有 21 个成员，VEC 同时表达 Cx37、40 和 43[4]，Cx43 是目前研究最广、了解最多的连接蛋白之一。我们前期研究发现，Cx43 参与了失血性休克后血管内膜依赖的舒缩反应性的调节[4]，

但是,Cx43 是否在休克后血管通透性调节中起作用目前尚不清楚。已有研究表明,LPS 作为一种炎性致病因子,它的识别和信号转导是宿主发生防御反应的关键,可直接活化进而损伤血管 VEC,影响其结构和功能,并使 VEC 的合成、分泌、代谢及灭活活性物质的功能发生变化。有研究表明,在内毒素血症大鼠的肾和肺中 Cx43 的表达是增加的,心脏 Cx43 的表达是降低的[12],LPS 可以明显降低 Cx43 的表达[13],增加微血管内皮细胞内 Cx43 的酪氨酸磷酸化程度[14]。但是,LPS 是否可以改变 VEC 的 Cx43 的表达,及其在 LPS 诱导的血管通透性中的作用说不清楚,为此,本实验以 LPS 刺激 VEC 细胞模拟血管通透性模型,重点研究了 Cx43 在 LPS 诱导的血管通透性变化中的作用及其表达变化规律。

我们首先观察了不同浓度的 LPS 对 VEC 增殖活力和通透性的影响,实验结果显示,1、2 μg/ml 的 LPS 对 VEC 的增殖活力无明显影响,而 3、4 μg/ml 的 LPS 明显降低了 VEC 的增殖能力;本实验进一步观察了 1、2、3 μg/ml 的 LPS 对 VEC 通透性的作用,1 μg/ml 的 LPS 在作用后 4 h VEC 的通透性有明显增加,2 μg/ml 的 LPS 在作用后 2 h VEC 通透性明显增加,3 μg/ml 的 LPS 在作用后 30 minVEC 通透性即有明显增加,随着时间的延长通透性进一步增加,到达 5 h 后,3 个剂量组的 VEC 通透性均无进一步的下降,由于 2 μg/ml LPS 对 VEC 增殖率无明显影响,同时又能较好的模拟 VEC 通透性变化,在后续实验中我们研究了 2 μg/ml LPS 对 VEC 中 Cx43 表达的影响。

实验结果显示,2 μg/ml LPS 作用 VEC 后,随着时间的延长 VEC 通透性逐渐增加,细胞内 Cx43 mRNA 和蛋白表达随之下降,通过相关性分析发现,VEC 的通透性和 Cx43 的表达呈明显的负相关关系;具体表现在:LPS 作用 15 min 后 VEC 通透性开始增加,Cx43 mRNA 表达即有下降;2 h 后 VEC 通透性增加幅度最大,Cx43 mRNA 和蛋白表达也有明显下降;至 5 h 后通透性进入平台期,Cx43 mRNA 和蛋白表达也达低谷,随后无明显下降;Cx43 的蛋白表达在 LPS 作用 30 min 后有明显下降,3 h 后下降幅度最大,至 5 h 后达低谷,随后无明显下降。由此我们推测,Cx43 可能参与了 LPS 诱导的血管通透性的调节,二者呈负相关关系。但是,我们尚需运用基因转染或特异性的工具药促进 Cx43 的表达,以进一步明确 Cx43 在 LPS 诱导的血管通透性的作用。

综上所述,Cx43 可能参与了 LPS 诱导的血管通透性的调节,二者呈负相关关系。但是,内皮细胞骨架在血管屏障功能中起着重要的稳定作用[15],Cx43 是否通过调节内皮细胞骨架参与了 LPS 调节血管通透性,LPS 通过何种信号通路改变细胞 Cx43 的表达等问题均有待进一步研究。

参考文献:

[1] Benz P M, Blume C, Moebius J, *et al*. Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes[J]. J Cell Biol, 2008, 180(1):205 - 219.

[2] 贺教江, 李涛, 杨光明, 等. TNF-α 对家兔内毒素休克钙敏感性的影响及其与 Rho 激酶和蛋白激酶 C 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9):865 - 868.

[3] 贺志高, 肖南, 刘韧, 等. 内毒素对鼠肺/肠微血管及体外培养内皮细胞通透性的影响及凋亡在其中的作用[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5(12):1214 - 1216.

[4] Haefliger J A, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2):345 - 356.

[5] Ming J, Li T, Zhang Y, *et al*. Regulatory effects of myoendothelial gap junction on vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2009, 31(1):80 - 86.

[6] 明佳, 徐竞, 李涛, 等. 连接蛋白 40/43 调节大鼠血管平滑肌细胞内钙离子浓度与肠系膜上动脉收缩反应性的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2009, 25(1):31 - 35.

[7] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning:A laboratory manual[M]. 3rd ed. Beijing:Science Publishing Company, 2002:1564 - 1595.

[8] Lum H, Malik A B. Regulation of vascular endothelial barrier function[J]. Am J Physiol, 1994, 267(3 Pt 1):L223 - L241.

[9] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions:molecular organization and role in vascular homeostasis[J]. Physiol Rev, 2004, 84(3):869 - 901.

[10] Utech M, Mennigen R, Bruewer M. Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010:484987.

[11] Nakagawa S, Maeda S, Tsukihara T. Structural and functional studies of gap junction channels[J]. Curr Opin Struct Biol, 2010, 20(4):423 - 430.

[12] Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, De-Maio A. Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide[J]. Shock, 1998, 10(2):97 - 102.

[13] Yeh T H, Hsu W C, Chen Y S, *et al*. Lipopolysaccharide decreases connexin 43 expression on nasal epithelial cells *in vitro*[J]. Acta Otolaryngol, 2005, 125(10):1091 - 1096.

[14] Lidington D, Tyml K, Ouellette Y. Lipopolysaccharide-induced reductions in cellular coupling correlate with tyrosine phosphorylation of connexin 43[J]. J Cell Physiol, 2002, 193(3):373 - 379.

[15] Bogatcheva N V, Verin A D. Reprint of"The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function"[Microvascular Research 76 (2008) 202-207][J]. Microvasc Res, 2009, 77(1):64 - 69.

(收稿:2010-07-13 修回:2010-09-15)

(编辑 栾 嘉)