DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.012
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
310 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0310-04

LPS直接诱导对肺微血管内皮细胞核因子κB活化的影响

顾大勇[1],马 布仁[2],王晓华[3],陈 莉[2],杨季云[2],曾祥元[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所第七研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]成都军区总医院临床实验研究所,成都 610083;[3]预防医学系劳动卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内毒素(lipopolysaccharide, LPS)的直接诱导作用对肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)核因子κB(NF-κB)活化的影响。方法 100 ng/ml LPS刺激PMVECs 0、0.5、1、2、4、6、8 h或1、10、100 ng/ml LPS刺激1 h后,凝胶电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测NF-κB的活化,免疫细胞化学(ICC)观察其亚基p50、p65的核转位。并通过加入NF-κB活化阻断剂TPCK观察其对100 ng/ml LPS刺激1 h诱导活化的影响。结果 LPS的直接刺激能迅速活化NF-κB,诱导其p50、p65亚基核转位,1 h即达到高峰,且呈剂量依赖关系,后逐渐下降。TPCK能显著抑制其活化($P<0.01$)。结论 LPS的直接刺激能诱导NF-κB的活化,这可能是LPS诱导炎症反应的一个重要环节。

关键词:LPS;肺微血管内皮细胞;NF-κB
中图法分类号:R329.2;R341.31;R977.7 文献标识码:A

Effects of direct stimulation by LPS on activation of nuclear factor-kappa B of pulmonary microvascular endothelial cells

GU Da-yong[1], MA Bu-ren[2], WANG Xiao-hua[3], CHEN Li[2], YANG Ji-yun[2], ZENG Xiang-yuan[2]([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Clinical Experiment, General Hospital, Chengdu Military Area Command, Chengdu 610083; [3]Department of Labor Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of direct stimulation by lipopolysaccharide (LPS) on the activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB) in pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs). Methods Activation of NF-κB was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and nuclear translocation of its two subunits, p50 and p65, was observed immunocytochemically when PMVECs were directly stimulated by 100 ng/ml LPS for 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 8 h or by 1, 10, and 100 ng/ml LPS for 1 h. Effects of TPCK (n-tosyl-phenylalanine-chloromethylketone), an inhibitor of activation, on NF-κB induced by 100 ng/ml LPS for 1 h were also observed. Results Direct stimulation by LPS could rapidly induce the activation of NF-κB and nuclear translocation of p50 and p65 in a dose-dependent manner, reaching the peak at 1 h and decreasing gradually. TPCK could significantly inhibit the activation of NF-κB. ($P<0.01$). Conclusion Direct stimulation by LPS can induce the activation of NF-κB, which may play an important role in inflammatory response induced by LPS.

Key words: LPS; pulmonary microvascular endothelial cell; NF-κB

脓毒综合征过程中肺脏是最易受累的靶器官,主要表现是急性肺损伤(acute lung injury, ALI),严重阶段即为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrom, ARDS),它实际上是机体过度炎症反应导致肺血管内皮和肺泡上皮广泛破坏的结果[1]。核因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)是有关炎症病理过程中许多炎性介质表达调控的关键性转录因子,它能调控细胞因子、粘附分子、趋化因子、酶等许多基因的表达,从而在启动、放大和延续炎症反应过程中起中枢性调节作用[2]。因此本研究依据LPS对血管内皮细胞的直接激活机制,以肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cell, PMVECs)为对象,在有血清存在前提下,从核调控因子NF-κB着手,观察LPS对PMVECs的直接激活作用。以进一步探索这种直接途径在肺脏损伤中的作用方式及机制,希望能更确切地诠释ALI、ARDS的发生机制。

作者简介:顾大勇(1972—),男,江苏省泰州市人,博士,主治医师,主要从事微血管损伤分子机制方面的研究。电话:(023)68757465

收稿日期:2002-09-29;修回日期:2003-03-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株　　人 PMVECs 株购自 Clonetics 公司。

1.1.2　主要试剂及来源　　抗 p50、p65 抗体购自北京中山公司。LPS, Leupeptin 及信号通路阻断剂 TPCK(n-tosyl-phenylalanine-chloromethylketone)为美国 Sigma 公司产品。T_4 激酶购自美国 Gibco。NF-κB 寡聚核苷酸探针 5′-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3′由上海生工合成。[γ-^{32}P] ATP 北京亚辉生产。

1.1.3　主要实验仪器　　细胞培养箱(日本), 电泳仪(Bio-Rad), 图像扫描仪(Tiger90), 液体闪烁计数仪(芬兰 LKB-1217)。

1.2　实验方法

1.2.1　实验处理及分组　　细胞生长至 80%以上融合度时用于实验。弃去培养液, 以无血清培养液培养 6 h 后更换为含 5%FCS 的新鲜培养液, 并加入 LPS 以 100 ng/ml 浓度刺激细胞分别至 0、0.5、1、2、4、6、8 h, 或 LPS 分别以 1、10、100 ng/ml 刺激细胞至 1 h。活化信号通路阻断试验组则在处理前加入 TPCK 预处理 30 min 后, 再以 100 ng/ml LPS 刺激至 1 h。每组各 6 个标本。

1.2.2　免疫细胞化学　　参照文献[3]的方法, p50 采用 DAB 染色, p65 采用硫酸镍胺-DAB 染色。同时做阴性对照: 血清稀释液代替一抗, 余同。

1.2.3　细胞核蛋白的提取　　参照文献[4]的方法并略经修改。至预定时相点, 冷 PBS 冲洗, 收集细胞并离心, 沉淀悬浮于 200 μl 冷缓冲液 A(10 mmol/L HEPES-KOH, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 μg/ml leupeptin pH 7.9), 冰置 15 min, 加入 10%NP-40 25 μl 涡旋 10 s, 离心。沉淀重新悬浮于 50 μl 冷的缓冲液 C(20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 μg/ml leupeptin), 冰置 30 min 振荡 1 min, 离心取上清。核蛋白用考马斯亮蓝法定量, 储存于 −70 ℃待用。

1.2.4　双链寡核苷酸探针的标记　　依次加入寡核苷酸探针(5 pmol/μl) 1.0 μl, 5X T_4 多核苷酸激酶缓冲液 5 μl, T_4 多核苷酸激酶(10 U/μl) 1.0 μl, [γ-^{32}P] ATP(3.7× 10^4 Bq/μl) 2.5 μl, 无核酸酶水 15.0 μl, 共 25 μl 反应混合液于 37 ℃孵育 10 min, 加入 1 μl 0.5 mol/L EDTA 终止反应, 然后加入 89 μl TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。用乙醇沉淀法去除未标记寡核苷酸探针。闪烁计数仪测定标记效率, 每微升的 cpm 值在 50 000～100 000 之间方可使用。

1.2.5　凝胶电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)　　5 μg 核蛋白同 5X 结合缓冲液(含 1 μg/μl poly dI-dC, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 5% 甘油, 1 mmol/L DTT, 1 μg/μl BSA pH 7.5), 1.6 μl 标记寡核苷酸探针于 37 ℃反应 1 h。DNA-蛋白复合物经 7%非变性聚丙烯酰胺凝胶于 150 V 电泳 3 h, 真空负压加热干燥凝胶后, −70 ℃放射自显影。在凝胶电泳率实验中设特异性竞争性对照, 即在反应体系中加入 200 倍未标记的特异性 NF-κB 探针, 室温下置 10 min 后加入标记探针。以后步骤同凝胶电泳迁移率实验。将显影结果经扫描仪扫入计算机中, 图像分析系统进行分析, 以积分灰度值表示 NF-κB 的活性变化。

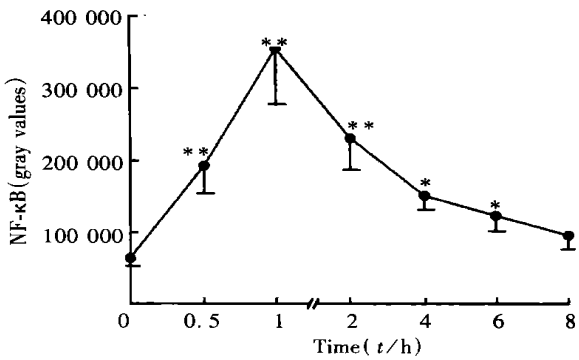
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验和单因素方差分析。

2　结果

2.1　LPS 直接诱导对 NF-κB 活化的影响

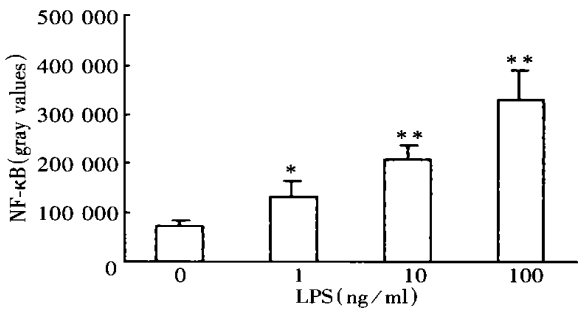
2.1.1　凝胶电泳迁移率(EMSA)试验　　EMSA 结果看出: 100 ng/ml LPS 刺激 PMVEC 30 min, NF-κB 发生显著性的转核活化, 1 h 达到高峰, 然后开始下降, 8 h 已处于低水平的维持状态。且 1 h 时 NF-κB 的活化随 LPS 的刺激剂量增加而增加(图 1, 2)。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 1　100 ng/ml LPS 直接诱导 NF-κB 活化的时相变化

Fig 1　Time-dependent changes of NF-κB activation induced by direct stimulation with 100 ng/ml LPS



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 2　不同浓度 LPS 直接刺激 1h 对 NF-κB 活化的影响

Fig 2　Effects of direct stimulation for 1 h with LPS at different concentrations on NF-κB activation

2.1.2　免疫细胞化学试验　　NF-κB 亚基 p65、p50 免疫细胞化学显示: 正常培养条件下, p65、p50 主要存在于胞浆中, 因而胞浆中呈强阳性染色; LPS 刺激能诱导 p65、p50 亚基转核, 在 30 min 时即可观察到 p65、p50 亚基明显的核转位, 胞核胞浆中均有阳性染色; 1 h 时 PMVEC 的核中染色呈强阳性, 而胞浆染色较弱(图 3～6)。

2.2　TPCK 对 LPS 直接诱导的 NF-κB 活化的影响

与对照组比, 20 μmol/L TPCK 显著的抑制 100 ng/ml LPS 诱导 1 h 的 NF-κB 的活化($P<0.01$)(图 7)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图3 LPS刺激前p65亚基主要位于PMVEC胞浆中 (ICC, DAB-Ni× 100)

Fig 3 p65 subunit mainly localized in cytoplasm of PMVECs before LPS stimulation (ICC, DAB-Ni× 100)

图4 100 ng/ml LPS刺激1 h, p65亚基大量发生转核 (ICC, DAB-Ni× 100)

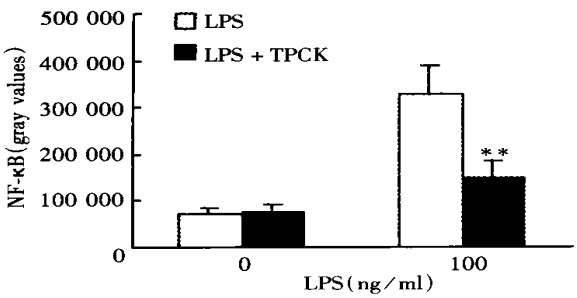
Fig 4 Lots of p65 subunit translocated to the nucleus at 1 h after transfection by 100 ng/ml LPS (ICC, DAB-Ni× 100)

图5 LPS刺激前p50亚基主要位于PMVEC胞浆中 (ICC, DAB× 200)

Fig 5 p50 subunit mainly localized in cytoplasm of PMVECs before LPS stimulation (ICC, DAB-Ni× 100)

图6 100 ng/ml LPS刺激0.5 h, p50亚基部分发生转核 (ICC, DAB× 200)

Fig 6 Parts of p65 subunit translocated to the nucleus at 0.5 h after transfection by 100 ng/ml LPS (ICC, DAB-Ni× 100)



**: $P<0.001$, *vs* LPS

图7 TPCK对LPS直接诱导NF-κB活化的影响

Fig 7 Effects of TPCK on NF-κB activation induced by direct stimulation with LPS

3 讨论

LPS即内毒素(endotoxin),在革兰阴性杆菌引起的脓毒综合征中发挥着重要作用。其主要致病机制之一是激活、损伤血管内皮细胞[5]。但由于内皮细胞无LPS的膜上性CD_{14}(mCD_{14})受体,因此过去一直认为LPS对内皮细胞的活化是通过一种间接途径来实现的[6,7]:LPS先活化有mCD_{14}的细胞中的NF-κB或其它转录途径,促进IL-1、TNF-α等的表达分泌,再通过这些因子与内皮细胞表面相应的受体来激活内皮细胞。后来有研究显示[8~10]:LPS可以不依赖于TNF-α、IL-1β等而在30~60 min内直接活化内皮细胞的NF-κB。进一步的相关研究表明:LPS还可以直接激活CREB、STAT6、p38MAPK等多种信号分子通路,实现对内皮细胞的直接激活作用[11]。表明可能存在着某种直接激活途径,其作用的机制可能是通过可溶性CD_{14},与胞膜上的TLR(toll-like receptor)结合而启动对内皮细胞的直接活化[8]。显然这种直接途径的激活作用可能在LPS的早期快速致炎中更有意义。然而,在微血管内皮细胞中是否也存在着这种直接作用,目前少见这方面的报道。

NF-κB是一种广泛存在的多效性的核转录因子,为Rel蛋白家族成员,为由多肽p65和p50亚基形成同源性或异源性的二聚体构成。非活化状态时以与IκB聚合的三聚体形式或与前体蛋白聚合的二聚体形式存在于胞浆中。多种因素如LPS等的刺激下可使NF-κB活化转核而调控一系列基因的表达如粘附分子、化学趋化因子、前炎症性细胞因子等[8]。研究表明NF-κB在多种肺部炎症疾病和肺损伤中均存在着活化现象[12~14],是启动,放大和延续肺部炎症反应过程中的中枢性调节因子,其活性与ALI和ARDS密切相关[15]。

本研究通过EMSA检测了LPS直接作用对PMVECs NF-κB活化的影响。结果显示:LPS直接作用能明显诱导PMVECs内NF-κB活化,100 ng/ml LPS刺激PMVEC 30 min NF-κB即被迅速显著活化,1 h活化达到高峰,此后逐渐回落,至8 h仍维持着一定的水

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

平。而且 1 h 时 NF-κB 的活化量随刺激的 LPS 浓度增加而增加。同时用 NF-κB 的两个亚基 p65、p50 的免疫细胞化学也显示:正常培养条件下,NF-κB 主要是存在于 PMVECs 胞浆中的,LPS 直接刺激能诱导 NF-κB 迅速活化转核,在 30 min 时即可观察到 p65、p50 亚基明显的核转位,1 h 时 PMVECs 的核内呈强阳性的显示 p65、p50 的存在。一方面更直观地显示 LPS 直接作用刺激 PMVECs 能明显诱导 NF-κB 的活化,验证了 EMSA 显示的结果。另一方面也表明 LPS 直接作用 PMVECs 刺激诱导的 NF-κB 的核转位包括了 p65、p50 两个亚基。结果说明 LPS 直接作用刺激 PMVECs 能明显诱导 NF-κB 的迅速活化,表明这可能是 LPS 参与肺损伤的作用方式之一。提示我们可以通过抑制这一条通路,特别是 NF-κB 作为一个治疗的靶点,来控制细菌感染及 ALI 发生,减少肺脏损伤。

参考文献:

[1] Artigas A, Bernard G R, Carlet J, *et al*. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(4pt1): 1332—1347.

[2] Boone D L, Lee E G, Libby S, *et al*. Recent advances in understanding NF-kappa B regulation[J]. Inflamm Bowel Dis, 2002, 8(3): 201—212.

[3] 蔡文琴, 王伯?云主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406—512

[4] Corsini E, Viviani B, Marinovich M, *et al*. Cyclosporin A exacerbates skin irritation induced by tributyltin by increasing nuclear factor kappa B activation[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(6): 1627—1634.

[5] Zhao B, Bowden R A, Stavchansky S A, *et al*. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(5): C1587—C1595.

[6] Wang P Y, Kitchens R L, Munford R S. Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide[J]. J Biol Chem, 1998, 273(38): 24309—24313.

[7] Sugita S, Kohno T, Yamamoto K, *et al*. Induction of macrophage-inflammatory protein-3alpha gene expression by TNF-dependent NF-kappaB activation[J]. J Immunol, 2002, 168(11): 5621—5628.

[8] Abreu M T, Vora P, Faure E, *et al*. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1609—1616.

[9] Haddad J J. Nuclear factor (NF)-kappa B blockade attenuates but does not abrogate LPS-mediated interleukin (IL)-1 beta biosynthesis in alveolar epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(1): 252—257.

[10] Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors[J]. J Endotoxin Res, 2000, 6(6): 453—457.

[11] 单佑安, 刘小华, 罗向东, 等. 内毒素直接作用于血管内皮细胞激活信号分子的研究[J]. 西北国防医学杂志, 2001, 15(1): 2—5.

[12] Porter D W, Ye J, Ma J, *et al*. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF-kappa B activation, inflammation, cytokine production, and damage[J]. Inhal Toxicol, 2002, 14(4): 349—367.

[13] Shenkar R, Yum H K, Arcaroli J, *et al*. Interactions between CBP, NF-kappaB, and CREB in the lungs after hemorrhage and endotoxemia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): L418—L426.

[14] Wilson S J, Wallin A, Della C G, *et al*. Effects of budesonide and formoterol on NF-kappaB, adhesion molecules, and cytokines in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(6): 1047—1052.

[15] Christman J W, Sadikot R T, Blackwell T S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases[J]. Chest, 2000, 117(5): 1482—1487.

(编辑　张大春)

2004 海峡两岸创伤医学论坛
暨第十一届全国创伤学术交流会征文通知

中华医学会创伤学分会、《中华创伤杂志》编辑部定于 2004 年 8 月 22 日至 24 日在乌鲁木齐市联合召开 2004 海峡两岸创伤医学论坛暨第十一届全国创伤学术交流会。

1 重点内容:(1)创伤急救的实施及模式探讨;(2)多发伤的救治;(3)颅脑伤、四肢脊柱伤、胸腹伤等部位伤的救治;(4)交通伤的临床与基础研究;(5)组织修复、组织工程等创伤基础研究。

2 要求:(1)未曾发表过论文的 500 字以内摘要 1 份,论文应具有科学性、先进性和实用性;(2)按结构式摘要撰写,顺序为文题、作者单位及邮政编码、姓名、目的、方法、结果、结论;(3)请寄打印稿并加盖公章,同时附该文软盘(word 格式),自留底稿不退稿。欢迎通过 E-mail 投稿。

3 会议将进行青年优秀论文评选(要求参选者 45 岁以下),除寄摘要外,需附全文 1 份,并另纸注明第一作者的年龄、职称及职务。符合本刊要求的获奖论文优先在本刊发表。并对参加会议者颁发国家级继续教育项目学会证书和中华医学会论文证书。

4 收稿地点:重庆市渝中区大坪长江支路 10 号《中华创伤杂志》编辑部向勇主任收。邮政编码:400042。电话:(023)68757524,68818654。传真:(023)68818654。E-mail:cmachz@public.cta.cq.cn。信封上请注明"创伤会议"。

5 截稿日期:2004 年 6 月 20 日前(以当地邮戳为准),逾期不予受理。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net