DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.026
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)20-1833-04

论著

内毒素与血管内皮细胞结合特性初探

陈 建,王 翔,罗向东,杨宗城 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨无血清因素参与下血管内皮细胞(Vasvular endothelial cell, EC)与细菌内毒素(Lipopolysacchrides, LPS)的结合特点。方法 用激光共聚焦显微镜观察异硫氰酸荧光素标记的内毒素(Fluorescein isothiocyanate labelled LPS, FITC-LPS)与EC的结合情况,并提取荧光标记内毒素与内皮细胞结合后细胞膜性成分观察其中的荧光物质强度。结果 EC与FITC-LPS的结合存在浓度依赖性,结合的荧光主要集中于细胞浆,尤其是胞浆近核周区,核仁也可染色,结合的内毒素同细胞膜性成分关系密切。结论 EC可与LPS直接结合,并可能进入细胞内部而发挥作用。

关键词:细菌内毒素;血管内皮细胞
中图法分类号:R322.12;R329.2;R996 文献标识码:A

Properties of the binding of LPS to vascular endothelial cells

CHEN Jian, WANG Xiang, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the properties of the serum free binding of vascular endothelial cells (ECs) to lipopolysaccharide (LPS). Methods The binding of ECs to fluorescein isothiocyanate labelled LPS (FITC-LPS) was observed with laser confocal microscope (LCM). The extract of ECs membrane after binding with FITC-LPS was recorded with fluorescence microscope. Results The binding of ECs to FITC-LPS was in a dose-dependent manner. The fluorescence was mainly distributed in cytoplasm, especially near the nucleus which could also be stained. The bound FITC-LPS had a very close relationship with the membranous system of ECs. Conclusion ECs could bind to LPS directly and could function intracellularly.

Key words: endotoxin; vascular endothelial cell

在严重创伤、烧伤、感染中,内毒素(Lipopolysacchrides, LPS)与效应细胞之间的相互作用是引起体内各种病理生理紊乱的始动因素之一,细胞因子、内皮细胞、单核巨噬细胞系统三者处在十分重要的中心环节上[1]。作为CD14阴性细胞,内皮细胞与LPS之间相互作用的机制远未阐明。然而不管内毒素如何损伤内皮细胞,结合是它们能相互作用的第一步。本研究从内毒素与内皮细胞的结合特性出发,为阐明内毒素损伤内皮细胞的机制寻找新突破口。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39830400)
Supported by a grant from National Natural Science Foundation of China (39830400)
作者简介:陈 建(1972—),女,湖北省枝城市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤早期血管内皮细胞损伤方面的研究。电话:(023)68754149—8082
收稿日期:2003-06-26;修回日期:2003-09-08

1 材料与方法

1.1 细胞培养

血管内皮细胞株ECV-304购自美国ATCC公司,采用添加10%小牛血清的M199培养基,在37 ℃ 5% CO_2 恒温细胞培养箱中培养,每2~3天更换培养液,细胞融合度80%~90%时用0.04% EDTA与0.25%胰蛋白酶(1∶1混合)按1∶1~2比例消化传代。

1.2 细胞荧光染色法

EC细胞接种于盖玻片上,常规培养至细胞伸展接近融合;75%乙醇4 ℃下固定45 min;将细胞置于无血清培养基配制的

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

一定浓度FITC-LPS(Sigma)溶液中37 ℃下反应一定时间,每次实验均设空白对照组(无血清培养基组),弃反应液,PBS漂洗,自然干燥;封片(90%甘油+10% PBS)后直接于激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 荧光标记内毒素与内皮细胞结合后细胞膜性成分的提取[4]

用含有荧光标记内毒素的无血清培养液与内皮细胞(每组细胞数约5.0×10^7)共培养3 h;用无血清培养基洗掉过量的含荧光标记内毒素的培养液,收集细胞;0.5 ml 80%的甲醇溶液悬浮内皮细胞,再加入等体积的膜脂提取液(甲醇/氯仿:1/2)萃取3次;离心后合并有机相,用氮气吹干后备用;观察时将提取物溶解于氯仿/甲醇(3∶1)中,上样于载玻片,自然风干后观察。

本研究中所有实验均独立重复3次以上。

1.4 统计学处理

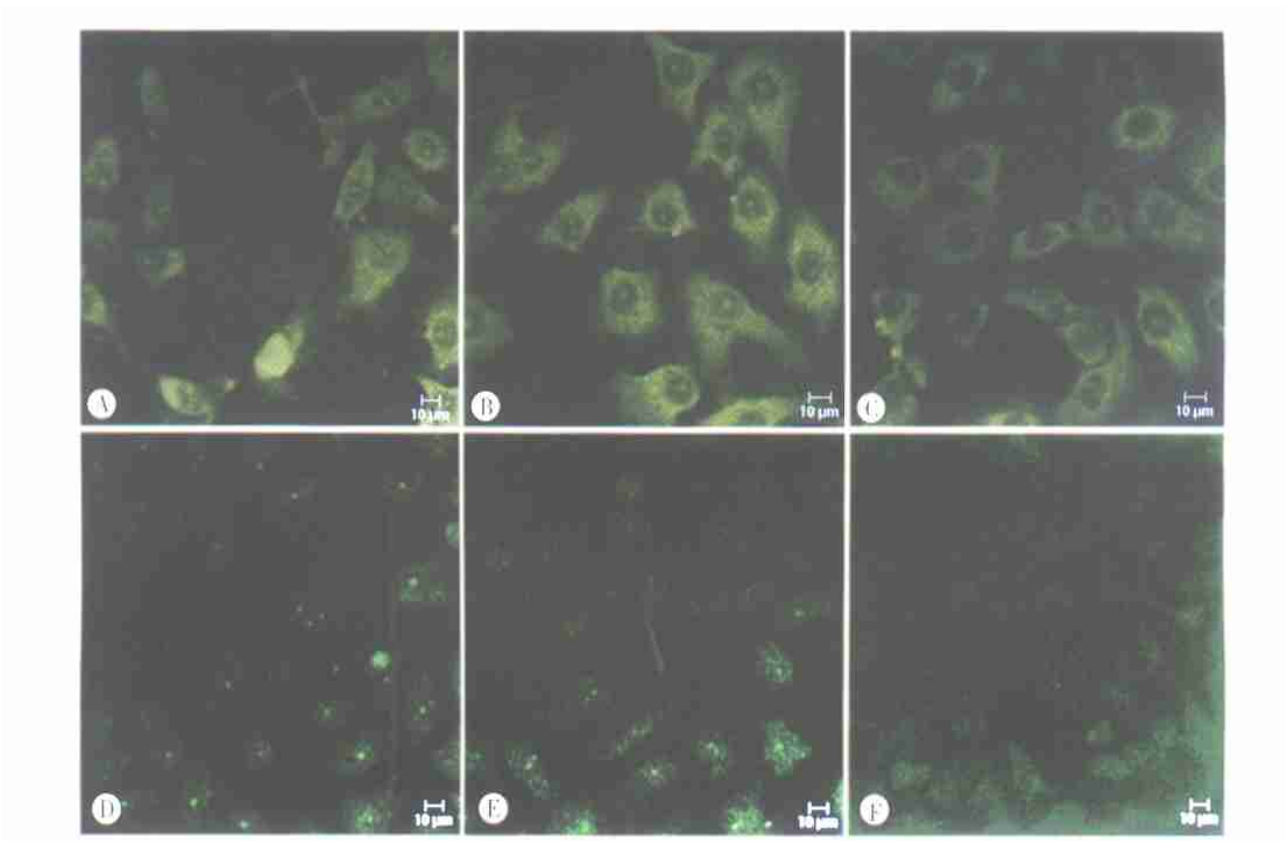
数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 10.0软件进行方差齐性检验后用单向方差分析。

2 结果

2.1 用激光共聚焦显微镜观察ECV-304与FITC-LPS的结合情况

2.1.1 FITC-LPS与EC的结合具有浓度依赖性 不加入荧光标记内毒素时EC在激光共聚焦显微镜下自发荧光微弱,随体系中加入标记内毒素浓度的增加,EC上结合的荧光渐强。0.000 1 μg/ml FITC-LPS即显示出与EC结合的能力,0.01 μg/ml时染色较对照显著增强($P<0.05$,与对照组相比),随FITC-LPC浓度增加,细胞荧光强度增长渐缓,有饱和趋势。

2.1.2 过量未标记的内毒素可竞争性抑制FITC-LPS与EC的结合 用未标记LPS成倍递增的方式竞争FITC-LPS对EC的染色效应,结果显示未标记LPS为FITC-LPS 5倍以前的竞争无统计学意义,5倍之后未标记LPS可明显竞争FITC-LPS对EC的染色效应,到100倍时EC染色已基本被抑制,接近本底水平,见图1。



A~F: Concentrations of unlabelled LPS: 0, 0.2, 2, 10, 20 and 200 μg/ml

图1 激光共聚焦显微镜观察ECV-304先与不同竞争倍数未标记LPS孵育3 h再加入2 μg/ml FITC-LPS孵育4 h后的结合情况 (×400)

Fig 1 The 4 h binding of ECV-304 to FITC-LPS after competition with unlabelled LPS (×400)

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

2.1.3　结合部位的观察　　通过激光共聚焦显微镜的断层扫描功能, 可清楚的观察到结合的荧光主要集中于细胞浆, 尤其是胞浆近核周区, 呈现出颗粒状、片状、网状结构, 见图 2.

对存活状态下 EC 染色发现, 荧光开始集中于细胞浆, 随孵育时间的延长细胞核也出现明显染色, 表现出一个"进核"的过程。

2.2　FITC-LPS 与 EC 膜脂系统之间相互作用的观察

不同浓度荧光标记内毒素同 EC 孵育后, 提取细胞膜脂质系统, 用荧光显微镜观测并拍摄记录。实验显示, 无细胞存在时萃取液并不能把内毒素从溶液状态中萃取出来, 而当内毒素同细胞孵育后, FITC-LPS 能随细胞膜脂成分一同被萃取出来, 见图 3, 说明结合的内毒素同内皮细胞膜脂质系统关系十分密切。

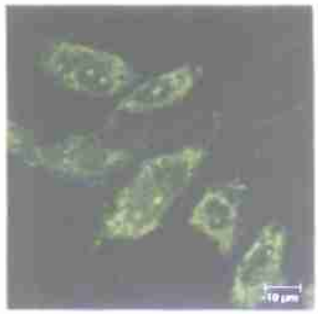
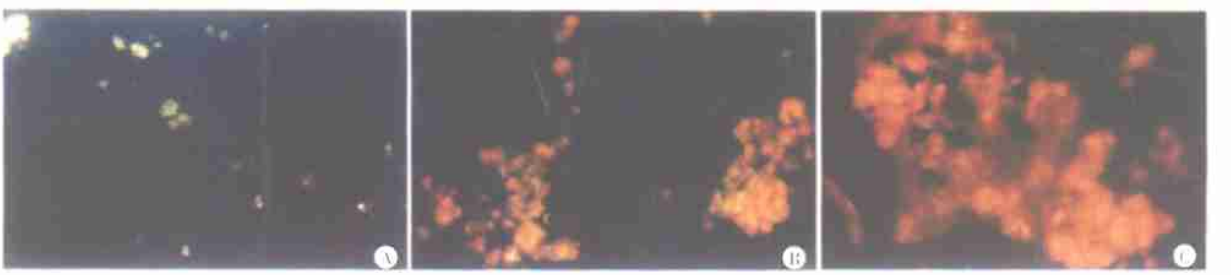


图 2　ECV-304 与 2 μg/ml FITC-LPS 孵育 4 h 时的结合荧光主要集中于细胞浆(× 1 000)

Fig 2　Bound fluorescence mainly distributed in cytoplasm (2 μg/ml FITC-LPS for 4 h)(× 1 000)



A: 1.25 μg/ml FITC-LPS; B: 2.5 μg/ml FITC-LPS; C: 10 μg/ml FITC-LPS

图 3　荧光显微镜下观察 FITC-LPS 同 ECV-304 孵育 3 h 后的细胞膜性成分(× 400)

Fig 3　Cell membrane extracted at 3 h after incubation of ECV-304 and FITC-LPS under fluorescence microscope

3　讨论

内毒素结构复杂, 作用广泛, 其激活效应细胞的机制一直是困扰各国学者的世界性难题。1998 年以前的近 20 年间, 虽肯定了 LBP、sCD14 在将 LPS 转运到 EC 上所起的转脂蛋白的作用[5], 并推测 EC 上可能存在 LPS·sCD14 复合物的受体, 但至今也没有找到这个受体, 使 LPS 激活 EC 机制的研究陷入困境。近年来, Toll/IL-1R 受体家族研究的兴起, 使其有望成为研究 LPS 作用机制的突破口。在本实验应用荧光细胞化学的方法, 从细胞水平着重观察了 LPS 与 EC 结合的特点, 研究显示 EC 与 LPS 可以直接结合, 并有深入探讨的必要。

从 FITC-LPS 直接染色的结果看, 荧光主要集中于细胞浆, 尤其是胞浆近核周区, 在作用浓度高、时间长时, 核仁也可染色。在对 EC 活细胞染色过程的观察中发现, 随染色时间延长, 染色先出现于细胞浆, 后可见于核仁区。

Thieblemont 等[6] 的研究显示, 在 LPS 以 LPS·sCD14 复合物方式与 PMN 的胞膜结合后, LPS 单体被迅速转移到一个胞内区域。而且这种 LPS 向细胞内的运动在引起一些细胞反应中是必需的, 因为阻碍这种运输也阻止了 LPS 作用下的整合素介导的 PMN 粘附反应[7]。对 LPS 低敏鼠细胞的研究发现, 它们正是缺乏将 LPS 向胞内的转运的能力[8]。在 PMN 和上皮细胞系 Hela 细胞, LPS 单体在进入细胞后其定位与 Golgi 复合体在细胞内分布一致——核周区, 推测 LPS 向 Golgi 复合体的运输是 LPS 能刺激细胞引发效应的普遍现象[9]。可见细胞对 LPS 的反应是在将 LPS 转运到细胞内开始的。

LPS 进入 EC 之后, 是否也定位于 Golgi 体呢? 有几个支持点: ①FITC-LPS 也分布于胞浆内近核周区; ②膜磷脂提取实验提示 FITC-LPS 与细胞膜系统关系密切; ③对 PMN 和 Hela 细胞的研究发现, LPS 进入 Golgi 体可能是 LPS 活化细胞的共有方式; ④EC 同上皮细胞系 Hela 一样是 CD14 阴性细胞, 对 LPS 的反应可能借相同途径。但由于时间和条件限制笔者没有能在这方面进行更深入的探讨。

Golgi 体作为细胞内重要的细胞器。已发现其中有大量酶类存在, 除参与糖蛋白、糖脂的合成酶外, 还有氧化还原酶、磷脂酶、酪氨酸蛋白激酶、参与磷脂合成的转移酶等[9]。最近更有研究表明 Golgi 体内存在 Toll 的上游信号分子(pipe 和 windbentle)[10]、IL-1 受体

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

在与配体结合后也可被运输至 Golgi 复合体[11]。可见 LPS 一旦被转送至 Golgi 体将可能激活多种酶类，细胞效应也由此引发。

LPS 的刺激信号究竟是在膜外与 Toll 样受体（TLR）或其它受体结合后直接引发，还是进入胞内通过其它途径引发尚不能肯定。但从本研究观察到的 LPS 与 EC 结合的细胞内定位来看，后者的可能性大。最近有报道怀疑在应激状态下可大量表达的热休克蛋白（HSP60）是TLR的内源性配体[12]，我们是不是可以大胆设想，LPS 进入 Golgi 体可能导致某些蛋白质的合成、修饰障碍，这些错误的蛋白质与胞浆内热休克因子（HSF）结合后入核，与 HSP 启动基因结合，导致 HSP 产生增加[13]。HSP 产生后被分泌到胞膜，然后与 TLR 结合引发一系列效应。

参考文献：

[1] 罗向东，石富胜，王晓军，等. LPS 对血管内皮细胞的直接损伤作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1609－1612.

[2] Vita N，Lefort S，Sozzani P，*et al*. Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial LPS[J]. J Immunol，1997，158(7)：3457－3462.

[3] Tennenberg S D，Weller J J. Endotoxin-induced neutrophil-mediated endothelial cytotoxicity is enhanced by T-lymphocytes[J]. J Surg Res，1997，69(1)：11－13.

[4] 张抒峰，常理文. 红细胞膜上各种磷脂中脂肪酸的测定[J]. 分析化学，1994，22(4)：346－350.

[5] Wurfel M M，Wright S D. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers[J]. J Immunol，1997，158(8)：3925－3934.

[6] Thieblemont N，Wright S D. Transport of bacterial lipopolysaccharide to the Golgi apparatus[J]. J Exp Med，1999，190(4)：523－534.

[7] Detmers P A，Thieblemont N，Vasselon T，*et al*. Potential role of membrane internalization and vesicle fusion in adhesion of neutrophils in response to lipopolysaccharide and TNF[J]. J Immunol，1996，157(12)：5589－5596.

[8] Thieblemont N，Wright S D. Mice genetically hyporesponsive to lipopolysaccharide（LPS）exhibit a defect in endocytic uptake of LPS and ceramide[J]. J Exp Med，1997，185(12)：2095－2100.

[9] 杨天华. 医学细胞生物学概论[M]. 第3版. 成都：四川科学技术出版社，1996. 115－116.

[10] Anderson K V. Pinning down positional information：Dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo[J]. Cell，1998，95(4)：439－442.

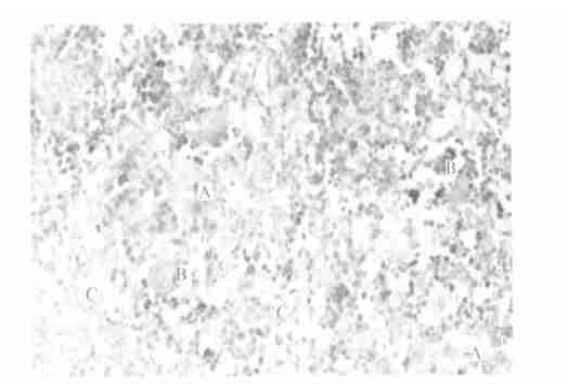
[11] Praast G，Hofmeister R，Grube K，*et al*. The internalized interleukin-1 activation complex in fibroblasts localizes to the Golgi apparatus[J]. J Inflamm，1995，46(3)：125－138.

[12] Ohashi K，Burkart V，Flohé S，*et al*. Cutting edge：heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex[J]. J Immunol，2000，164(2)：558－561.

[13] 金惠铭. 病理生理学[M]. 第4版. 北京：人民卫生出版社，1999. 108－109.

（编辑 陈聪连）

（上接1832页）



A：单核巨噬细胞；B：多核巨噬细胞；C：窦内皮细胞

图1 脾组织内Ⅷ因子的免疫组化染色 （SABC×400）

3 讨论

现已普遍认为脾脏是最大的周围淋巴器官，具有重要的免疫功能，对其在血液学中的意义认识较少，有待深入。本研究说明脾脏内的巨噬细胞除了具有较强的吞噬清除颗粒性异物，发挥重要的天然免疫作用外，还能分泌第Ⅷ凝血因子，维持血液正常的凝血性。红髓窦内皮细胞也有大量Ⅷ凝血因子表达，提示窦内皮细胞不仅是参与红髓滤过床、发挥清除功能的重要细胞，而且是第Ⅷ因子的“产业工人”。姜洪池等[3]通过异体脾移植、输入异体脾细胞治疗血友病A获得较好疗效——血液中Ⅷ因子显著升高，出血停止[4]。这都充分说明脾脏是合成、分泌Ⅷ因子的重要器官，显示了脾脏在抗血友病A中具有不可低估的作用，预示着脾脏移植作为治疗血友病A的措施之一具有广阔的应用前景，值得深入细致的研究。同时有作者注意到脾切除后血液中血小板急剧升高，血液粘稠度增加，诱发静脉内血栓形成，威胁术后病人的健康，这又从另一方面说明脾脏在调控人体正常凝血机能中的重要性。因此，作者认为脾脏不仅是一个重要的免疫器官，而且是一个不可忽视的凝血机能调控器官，在维持血液正常凝血机能方面发挥重要作用。

关键词：脾脏；Ⅷ因子

中图法分类号：R331.21 文献标识码：B

参考文献：

[1] 丁培芳，王勤友，申法奎，等. 甲型血友病患者凝血因子FⅧ抗体的调查[J]. 临床血液学杂志，2001，14(5)：229－230.

[2] Kootstra N A，Matsumura R，Verma I M. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors[J]. Molecular Therapy，2003，7(5)：623－631.

[3] 姜洪池，乔海泉，夏穗生. 亲属供脾移植治疗血友病甲[J]. 中国实用外科杂志，1999，(5)：281－282.

[4] 刘慎微，刘乐欣，姜汉英，等. 同种脾细胞输注治疗血友病甲[J]. 中华器官移植杂志，1995，16(2)：79－80.

（编辑 陈聪连）

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