DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.007
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1609-04

论著

LPS对血管内皮细胞的直接损伤作用的初步研究

罗向东,石富胜,王晓军,杨宗诚,黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨烧伤后早期内毒素对血管内皮细胞(Vasculancndothelial cells, VEC)的直接损伤作用。方法 采用RF/6A135猴血管内皮细胞株和ECV-304人脐静脉内皮细胞株为模型,将细胞分为正常对照组和细菌脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)浓度梯度组。观察不同时相点LPS对内皮细胞形态、脱氢酶活性的影响、VEGF表达、VE-cadherine的表达和LPS与VEC结合能力及对VEC中MAPK信号传导系统磷酸化的影响。结果 LPS对VEC的形态影响明显。2.0μg/ml LPS可明显激活内皮细胞的线粒体脱氢酶活性,并有时间依赖性;刺激内皮细胞2~12 h,可诱导VEGF的表达;刺激内皮细胞6~48 h,VE-cadherine表达进行性下降。激光共聚焦显微镜和流式细胞仪分析显示LPS能与内皮细胞结合。免疫细胞化学和Western blotting分析显示LPS可诱导ERK1/ERK2和P38MAPK磷酸化。结论 LPS能与VEC结合并损伤VEC的功能和形态。LPS对VEC的作用还伴有MAPK系统信号ERK1/ERK2和P38的磷酸化,说明LPS可以诱导VEC的跨膜信号传导。

关键词:LPS;血管内皮细胞;损伤
中图法分类号:R322.1+2;R392.11 文献标识码:A

Direct effects of LPS on the injury to vascular endothelial cells

LUO Xiang-dong, SHI Fu-sheng, WANG Xiao-jun, YANG Zhong-cheng, LI Ao (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the direct effects of lipopolysaccharide (LPS) on the injury to vascular endothelial cells (VECs) at early postburn stage. Methods RF/6A135 and ECV-304 cell lines were employed as the model and were divided into control group and groups treated with LPS at different concentrations. The effects of LPS on the VEC morphological changes, the dyhydrogenase activities, the VEGF and VE-cadherine expressions, the binding capacity of LPS to VEC and the phosphorylation of MAPK signal pathway at different time points were observed. Results The changes in the VEC morphology was obvious after LPS stimulation. The activity of mitochondrial dyhydrogenase could be activated dramatically by LPS at the concentration of 2.0 μg/ml in a time-dependent manner. The expression of VEGF could be induced during 2-12 h after LPS stimulation but the expression of VE-cadherine decreased progressively during 6-48 h after LPS stimulation. Analysis by laser confocal microscopy and flow cytometry revealed that LPS could bind to VEC. Immunocytometric and Western blot analysis revealed that the phosphorylation of ERK1/ERK2 and P38 MAPK could be induced by LPS. Conclusion LPS can bind to VEC. The morphology and function of VEC can be damaged by LPS with phosphorylation of ERK1/ERK2 and P38 molecules, suggesting that LPS can induce the trans-membrane signal transduction of VEC.

Key words: lipopolysaccharide; vascular endothelial cells; injury

细菌脂多糖(Lipopolysaccheride, LPS)是细菌内毒素的主要成分,内毒素与外毒素不同,其毒性作用主要通过激发宿主细胞产生过强的反应来体现。细菌内毒素对血管内皮细胞的作用是引起内皮细胞过强功能反应导致脏器微循环障碍的重要因素之一[1]。我们发现,烧伤早期(最早约15 min)即可见血浆内毒素浓度的升高。因此,内毒素在脏器损害中的作用成为烧伤及创伤领域关注的课题。鉴于对LPS受体CD14的认识,目前绝大多数学者认同LPS通过刺激免疫细胞释放细胞因子从而诱发全身过度炎症反应的间接损害途径[1~3]。对LPS直接作用在CD14阴性细胞(血管内皮细胞等)的认识尚不多。

血管内皮细胞生物学研究表明内皮细胞具有重要的生物学功能,主要包括:①选择性控制血浆大分子物质的通过;②合成血管基底膜成分;③维持抗凝与促凝平衡;④调节血管张力;⑤参与血浆物质代谢;⑤参与炎症反应等。近来我们发现烧伤早期各主要内脏毛细血管内皮细胞均有不同程度的形态学改变、血管痉挛

作者简介:罗向东(1962—),男,四川省达州市人,博士,研究员,主要从事烧伤早期损害机制及干胞增殖与分化的信号转导机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754316

收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

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

或过度扩张、白细胞在血管内皮表面粘附等病理生理变化，严重影响微循环，加重组织的缺血、缺氧[4,5]。

1 材料与方法

1.1 细胞株的培养和实验前准备

本实验采用 RF/6A135 猴血管内皮细胞株（中国科学院细胞所）和 ECV-304 人脐静脉内皮细胞株（美国 ATCC），培养液为 DMEM（含 10% 胎牛血清），培养于 50 ml 培养瓶中传代，每 48 h 更换培养液 1 次。实验前将细胞接种于 25 ml 培养瓶中传代，培养 24～48 h 用于实验。实验开始前细胞无血清培养 24 h。实验细胞分为正常对照组、LPS 浓度梯度组，观察不同时相点的各项指标变化。每个时相点设 5 个样本，每组实验重复 3 次。

1.2 细胞形态学

ECV-304 细胞经不同浓度 LPS 刺激后，多聚甲醛固定、考马斯亮蓝染色[6]，在不同时相点进行光镜观察。

1.3 LPS 对内皮细胞脱氢酶活性的影响

ECV-304 细胞培养在 96 孔板上，用 2.0 μg/ml LPS 刺激 6～48 h，加入 5 mg/ml MTT20 μl/每孔，37 ℃孵育 4 h，出现紫色结晶后，加入二甲亚砜 100 μl，混漩后，分光光度计测定 570 nm 波长处的 *A* 值。

1.4 LPS 刺激 VEC 对 VEGF 表达的影响（ELISA 法）

ECV-304 细胞培养在 96 孔板上，用 2.0 μg/ml LPS 刺激 2～24 h，用 3% 戊二醛固定，再用 0.03% Tritonx-100 处理 20 min，10% BSA 10 min，孵育 12 h，用 PBS 漂洗后用羊抗鼠过氧化酶标记二抗（1∶1 000）孵育 4 h，与显色底物（Bioseed Inc，USA）反应后，用 2 mol/L H_2SO_4 终止显色，分光光度计 450 nm 处测定 *A* 值。

1.5 LPS 刺激 VEC 对 VE-cadherine 表达的影响（ELISA）

ECV-304 细胞在 96 孔板上，用 2.0 μg/m LPS 刺激 2～24 h，一抗用 anti-VE-cadherine 单抗（Sigma）1∶200，其余步骤同上一指标。

1.6 LPS 与 VEC 结合能力

FITC 标记 LPS 与 VEC 的结合能力分析，流式细胞仪检测：ECV-304 细胞培养在 25 cm^2 培养瓶中，用前用 0.25% 胰酶消化，漂洗，将细胞数调整到 1× 10^6 个/ml，分成 7 份，并与不同浓度的 LPS（用 FITC 标记）（0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2 μg/ml）37 ℃孵育 3 h，75% 乙醇固定，漂洗，用流式细胞仪检测 LPS 结合量。

FITC 标记 LPS 与 VEC 的结合能力，用激光共聚焦显微镜观察：ECV-304 细胞培养在小盖玻片上，用 FITC 标记的浓度为 2.0 μg/ml 的 LPS 刺激细胞一定时间（分别为 15、30、60 min、1、4、6 h），然后用 3% 戊二醛固定，0.01 mol/L PBS（pH 7.4）洗去游离 LPS 后，用激光共聚焦显微镜观察。

1.7 LPS 对 VEC 中 MAPK 信号传导系统磷酸化的影响

Westem blotting 分析：培养 RF/6A 135 细胞株于 25 cm^2 培养瓶中，实验前无血清培养 24 h，用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，悬浮细胞到 1.6× 10^8/ml，分成 5 份，用无血清培养液洗涤细胞，用 LPS（0.5、1.0、2.5、5.0 μg/ml）刺激内皮细胞，37 ℃ 15 min，用细胞溶解缓冲液 100 μl，超声破碎细胞，煮沸 5 min，SDS-PAGE 电泳，转膜，用抗磷酸化 ERK1/ERK2 和 P38MAPK 单抗（1∶1 500）孵育 12 h，荧光显色系统检测[7]。

免疫细胞化学：在玻片上培养 RF/6A 135 细胞，2.0 μg/ml LPS 刺激细胞，于 15、30、60 min 固定细胞，用抗磷酸化 ERK1/ERK2 和 P38MAPK 单抗（1∶1 500）孵育 12 h，碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗（1∶1 000），与 BCIP/NBT 反应显色。

2 结果

2.1 LPS 对 VEC 损伤的形态学变化

LPS 对 VEC 的形态影响最明显，也极具有特点，通常 LPS 作用 VEC 后 3 h 即可产生。最多见胞浆出现较大空泡，逐渐有核空化或核碎裂及核脱出胞体的表现。在损伤实验和荧光标记 LPS 的结合实验中，均见到了明显的脱核现象，还可见胞浆空化，胞体收缩等表现。

2.2 LPS 对 VEC 胞浆内脱氢酶活性的影响

VEC 与 LPS（2.0 μg/ml）共同孵育后 VEC 胞浆脱氢酶活性的影响：2.0 μg/ml LPS 可明显激活内皮细胞的线粒体脱氢酶系活性，并有时间依赖性，见图 1。提示 LPS 可以激活内皮细胞的能量代谢。

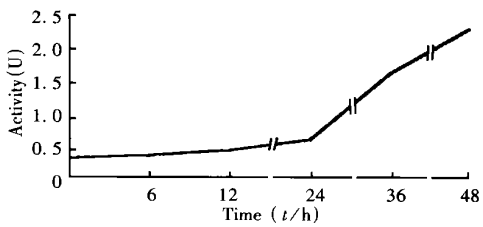


图 1 LPS 刺激 VEC 的脱氢酶系的活力逐渐增强

Fig 1 Increasing activity of dehydrogenase after stimulation by LPS

2.0 μg/ml LPS，刺激内皮细胞后引发脱氢酶系活力的明显增加，且具有时间依赖性。

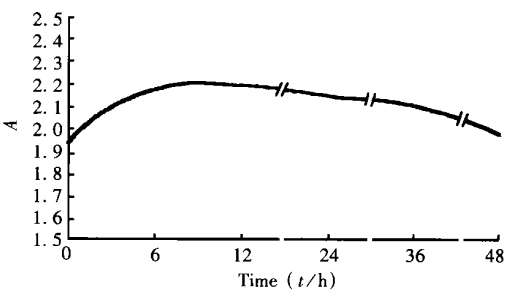


图 2 LPS 诱导的 VEGF 表达量的变化

Fig 2 Changes of VEGF expression after stimulation by LPS

2.3 LPS 对 VEC VEGF 表达的影响

2.0 μg/ml LPS 刺激内皮细胞 2～12 h，均可诱导 VEGF 的表达，表明 LPS 损伤内皮细胞并激活其修复功能，LPS 刺激内皮细胞 24 h 后 VEGF 显著降低，见图 2。此时根据病理形态学变化，内皮细胞已受到严重损伤，因此，VEGF 降低可能与损伤有关。

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

2.4　LPS 对VEC VE-cadherine 表达的影响

2.0 μg/ml LPS 刺激内皮细胞 6～48 h，VE-cadherine 进行性下降，见图 3。由于 VE-cadherine 与内皮细胞间的相互连接有关，因此可能导致血管通透性增加，在 LPS 诱导的某些疾病的发生中起重要作用。

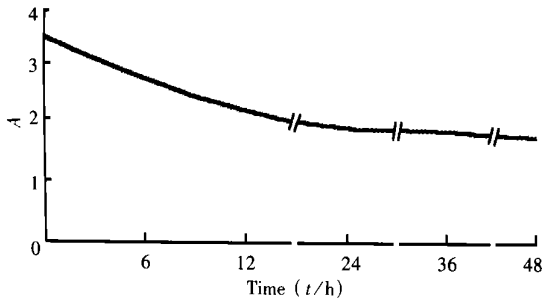


图 3　LPS 诱导的 VE-cadherine 的表达量逐渐减少

Fig 3　Decrease of VE-cadherine expression gradually after stimulation by LPS

2.5　LPS 与 VEC 的结合实验

流式细胞仪分析不同浓度 FITC 标记 LPS 与 VEC 孵育 3 h 后结合能力分析：流式细胞仪分析显示 LPS 能与内皮细胞结合，但随 LPS 浓度增高，结合能力逐渐下降，见图 4。

激光共聚焦显微镜观察 FITC 标记内毒素与 VEC 的结合分析：激光共聚焦显微镜可观察到 LPS 与内皮细胞的结合，同时，发现 LPS 能进入胞浆和胞核，并对内皮细胞核造成严重损伤。

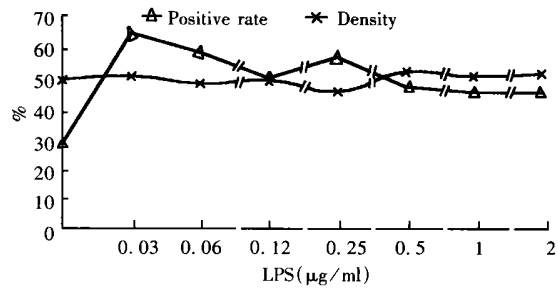


图 4　LPS 与 VEC 结合的阳性率与结合密度

Fig 4　The positive rate and density of LPS binding to VEC

2.6　LPS 对VEC 中 MAPK 信号家族磷酸化的影响

Westem blotting 分析：LPS 诱导的 P38MAPK 磷酸化，见图 5。

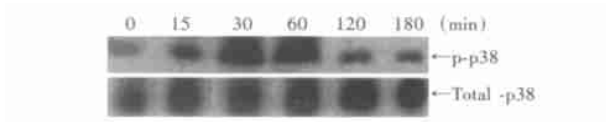


图 5　LPS 诱导 P38MAPK 磷酸化

Fig 5　LPS-induced phosphorylation of P38 MAPK

免疫细胞化学分析：LPS 可诱导 ERK1/ERK2 和 P38MAPK 的磷酸化和核转位，磷酸化在 LPS 刺激后 15 min 后明显增高，30 min 减弱，60 min 消失，见图 6。ERK1/ERK2 MAPK 的磷酸化在 15～30 min 明显增高，60 min 减弱，但总的磷酸化强度弱于 P38MAPK。

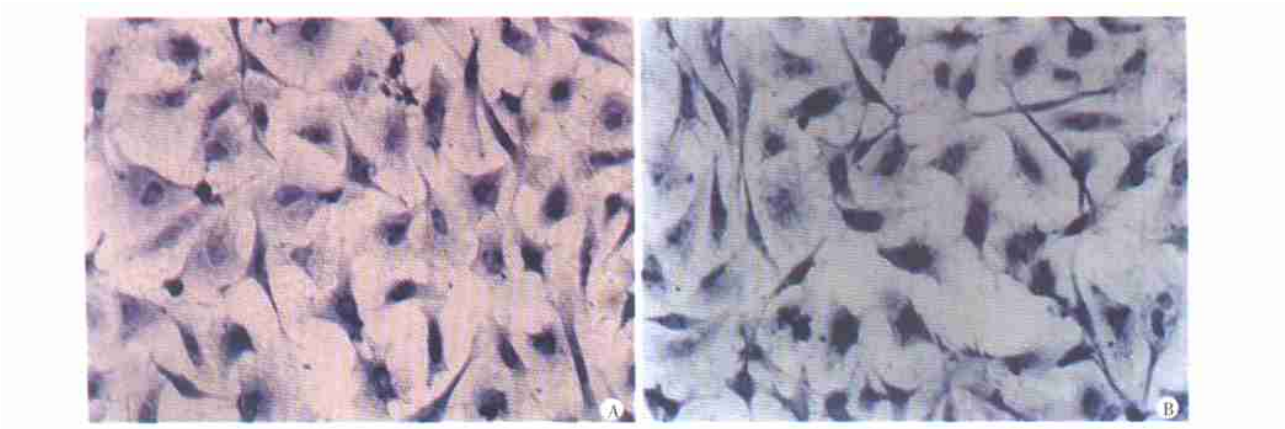


图 6　ERK1/ERK2 MAPK 的磷酸化及核转位(A)，P38MAPK 的磷酸化及核转位(B)

Fig 6　Phosphorylation and translocation of the nucleus of ERK1/ERK2 MAPK(A) and P38HAPK(B)

3　讨论

多脏器功能损害是严重创伤、感染及多种疾病的最终共同通路，其发病机制复杂，是当前国内外医学研究的前沿[6]。20 世纪 70 代后期，本所开始研究烧伤早期多脏器损害的发生机制。先后对缺血、缺氧、感染及失控性炎症反应等因素进行了研究，发现血管内皮细胞损伤后引起的组织水肿是脏器损害的共同发病基础。20 世纪 90 年代开始对血管内皮损伤机制和功能的研究进一步证明，烧伤早期血管内皮广泛损伤[7]，其后果是导致促凝血倾向[8]、血管痉挛性收缩、内皮表达粘附分子(ICAM-1，P-selectin)增多[9]，促进白细胞与内皮的粘附，加重了组织损害[10]。逐步形成了血管内皮细胞在烧伤早期脏器损害中起核心作用的思想。

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

在烧伤早期损伤血管内皮细胞的研究中，由于LPS入血时间早，是诱发失控性炎症反应的重要物质，研究LPS对VEC损伤机制，对认识多脏器损害的发生机理具有重要的理论意义。

3.1 LPS对VEC的直接损伤与间接损伤

由于烧伤或创伤后LPS比细菌更容易进入血液循环，因此在烧伤早期即可以发现血中LPS增高。内毒素通常通过直接或间接两条途径作用于血管内皮，造成细胞的过强反应，细胞出现形态和功能改变。内毒素的间接损伤是指LPS通过与免疫细胞膜上的CD14结合，诱导免疫细胞释放多种细胞因子和炎性介质，最后再影响VEC的通路；直接损伤是指LPS直接作用在VEC上而产生的损伤效应。以往对间接损伤途径进行了较多研究。而针对直接损伤的研究较少。主要原因是VEC不能表达LPS受体CD14而未被人们重视。近年来，较多的证据表明VEC上存在LPS受体。

间接途径是许多炎性物质、细胞因子的共同通路，而直接损伤对VEC讲更具其专一性。

3.2 LPS直接与VEC结合并损伤VEC

本研究初步表明LPS在VEC上有结合，主要表现为荧光标记LPS在激光共聚焦显微镜下显示荧光着色，同时流式细胞仪分析发现从0.031 25～2.0 μg/ml LPS与VEC有结合表现，特点是LPS浓度增加后，荧光细胞比例反而下降。根据LPS对VEC损伤的形态学研究，发现2.0 μg/ml LPS作用3 h以上即可见到VEC核裂解、核损伤表现。相同浓度下，VEC上的VE-cadherine表达量也明显下降，说明细胞连接开始松懈，血管通透性开始升高。因此，阳性细胞减少可能与细胞损伤增加有关(死亡细胞增加)。VE-钙粘附分子是内皮细胞间粘附连接的特定成分，LPS、TNF烧伤血清都可以在体外直接导致的内皮细胞中VE-钙粘附分子表达的减少。LPS可以诱导内皮细胞胞内连接蛋白α、β、γ-catenin表达的减少和磷酸化，在钙粘附分子、catenins网络和胞内骨架蛋白中起重要的作用，α-catenin是主要的连接蛋白，γ- catenin是胞内骨架的稳定蛋白。PD 098059、SB 203580和SB 202474对LPS诱导的VE-钙粘附分子和胞内配体α、β、γ-catenin的减少均有抑制作用，3种信号通路阻断剂对VE-钙粘附分子和胞内配体α、β、γ-catenin的影响并不完全相同，对VE-钙粘附分子和胞内配体α-catenin的影响比对β、γ-catenin的影响要强。以上结果说明MAPK参与了LPS诱导内皮细胞屏障变化的信号调控。

3.3 LPS损伤VEC前有激活VEC的现象

本研究重点观察了LPS对VEC脱氢酶特别是线粒体脱氢酶的活性影响，发现2.0 μg/ml LPS作用于VEC，脱氢酶活性随时相延逐渐升高，而相同浓度LPS作用3 h后即可见VEC的形态学变化，甚至核的严重损伤。VEGF的表达量也是在2～12 h逐渐达高峰，24 h以后开始下降。

LPS对VEC的直接作用还伴有MAPK系统信号ERK1/ERK2和P38的磷酸化，说明LPS可以诱导VEC的跨膜信号传导，具备启动细胞反应的潜力。LPS还可以迅速诱导p38与ERK1/2的磷酸化与核转位。免疫细胞化学显示，100 ng/ml LPS刺激VECs 30 min，可以明显引起的p38、ERK1/2磷酸化与核转位，western blotting显示这些信号分子的磷酸化强度具有刺激时间依赖性，100 ng/ml的LPS刺激细胞最早在15 min内就可检测到p38磷酸化信号的增强，以30～60 min磷酸化程度最强，3 h后恢复至基础水平，而刺激引起ERK1/2的磷酸化以15 min最强，30～60 min内磷酸化水平维持在较高水平，随后磷酸化强度逐步降低。

本实验初步证明P38MAPK磷酸化参与了LPS诱导的内皮细胞跨膜信号传导，并且P38MAPK的磷酸化程度与LPS的刺激浓度有明显的依赖关系。根据以上结果推测，LPS可能引起VEC的应激性反应和细胞的其它功能改变。

参考文献：

[1] Viriyakosol S, Kirkland T. Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxin 1995[J]. Clin Infect Dis, 1995, 21(Suppl 2): S190－195.

[2] Wisse E, Braet F, Luo D, *et al*. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver[J]. Toxicol Pathol, 1996, 24(1): 100－111.

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

[4] 罗向东，杨宗城，黎 鳌. 家兔烧伤早期内脏血管内皮细胞损伤的变化[J]. 第三军医大学学报，1995, 17(4)，279－283.

[5] 黎 鳌. 创伤后脏器功能不全[M]. 石家庄：河北科学技术出版社，1999. 560－584.

[6] 罗向东，杨宗城，黎 鳌，等. 缺氧环境对培养的血管内皮细胞的损伤[J]. 中华创伤杂志，1996, 12(5): 306－308.

[7] 张宗梁，林明群，王妙珠，等. 巨噬细胞免疫调变信号Raf-1, MAPK P44, MAPK P42和P38 MAPK的研究[J]. 实验生物学报，1997, 30(1): 37－40.

[8] Dries D J. Activation of the clotting system and complement after trauma [J]. New Horiz, 1996, 4(2): 276－288.

[9] Damtew B, Marino J A, Fratianne R B, *et al*. Neutrophil lipoxygenase metabolism and adhesive function following acute thermal injury[J]. J Lab Clin Med, 1993, 121(2): 328－336.

[10] Bhatta N, Isaacson K, Flotte T, *et al*. Injury and adhesion formation following ovarian wedge resection with different thermal surgical modalities [J]. Lasers Surg Med, 1993, 13(3): 344－352.

(编辑 张 宁)

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