DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.003
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
94 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0094-04

肺微血管内皮细胞系的建立及脂多糖作用后酪氨酸激酶受体活性的变化

王关嵩[1],蔡文琴[1],钱桂生[2],关 崧[2] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 研究肺微血管内皮细胞(LMVEC)系培养方法并探讨脂多糖(LPS)对LMVEC酪氨酸激酶受体(TKR)活性的作用。方法 贴块法培养大鼠LMVEC,并进行系列鉴定。采用放射免疫技术检测正常组、LPS(1μg/ml)作用2、8、16 h组的TKR活性的变化水平。结果 获得的LMVEC具有规律的鹅卵石形态,对异植物血凝素结合试验及CD31相关抗原免疫组化染色为阳性。LPS(1 μg/ml)作用2 h组LMVEC的TKR活性升高,8 h组达最高,16 h组的表达量低于8 h组,与正常组比较均有明显差别($P<0.05$)。结论 脂多糖(LPS)作用后LMVEC胞浆TKR活性升高,而胞膜TKR活性降低。提示在LPS所致的急性肺损伤等发病机制中TKR及其相关的信号途径可能发挥重要调节作用。

关键词:脂多糖;肺微血管;内皮细胞;培养;酪氨酸激酶受体
中图法分类号:Q813.11;R322.13;R392.11 文献标识码:A

Establishment of lung microvascular endothelial cell line and activity of tyrosine kinase receptor in the cells after lipopolysaccharide treatment

WANG Guan-song, CAI Wen-qin, QIAN Gui-sheng, GUAN Song (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a cell line of rat lung microvascular endothelial cells (LMVEC) and investigate the activity of tyrosine kinase receptor (TKR) in them after lipopolysaccharide (LPS) treatment. **Methods** Rat LMVEC were cultured with lung tissue block pasted methods, and were identified by using immuocytochemical methods with anti-human CD31 and factor Ⅷ antibody, by testing their binding with the Lectin Bandeiraea simplicifolia Ⅰ with immunofluoresence staining, and by measuring the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) with ACE kit. The cells were treated with LPS at 1μg/ml for 2, 8, 16, 24 h respectively. The activity of TKR in the cells was determined with radioimmunoassay. **Results** The self-cultured LMVEC in flask showed regular cobblestone morphology and positive for binding of the Lectin Bandeiraea simplicifolia Ⅰ and anti-human CD31 antibody. The TKR activity in LMVEC increased in 2 h group, reached the highest in 8 h group, and fell in 16 h group, but still significantly higher than that in normal group. **Conclusion** TKR activity increases in the cytoplasm of LMVEC, but decreases in the cell membrane, suggesting that TKR and its correlated signal pathways may exert important modulation in the mechanism of acute lung injury and systemic inflammatory response syndrome.

Key words: lipopolysaccharide; lung microvascular endothelial cells; culture; tyrosine kinase receptor

研究表明,内皮细胞在肺微血管和大血管之间存在着表型和功能上明显的差异[1]。而肺微血管与肺动脉高压、急性肺损伤和全身炎症反应综合征等的发病关系紧密[2],多数作用因素或因子首先通过损伤肺微血管内皮细胞(Lung microvascular endothelial cells, LMVEC)再引起肺组织的一系列病理生理变化。酪氨酸激酶受体(Tyrosine kinase receptor, TKR)可以引起受体型和非受体型两种信号转导途径的变化,在急性肺损伤等疾病的研究已受关注[3]。我们首先培养大鼠LMVEC,然后观察该细胞的TKR活性变化,为进一步探讨与LMVEC相关疾病的信号转导提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基,胎牛血清,胰蛋白酶,HBSS(Hyclone公司),荧光标记的异植物血凝素(FITC-BSI),苯甲磺硫氟(PMSF),正钒

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329);全军"十五"医学科研计划资助重点项目(01Z074);中国博士后科学基金(2001);第三军医大学基础部科研经费资助项目(2000)

作者简介:王关嵩(1967-),男,河南省平顶山市人,博士,副教授,主要从事慢性阻塞性肺病低氧肺动脉高压发病机制,血管内皮细胞和平滑肌细胞信号传导方面的研究,发表论文10余篇,现在附属新桥医院全军呼吸内科研究所工作,重庆 400037。电话:(023)68755320
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233;E-mail:cwenqin@yahoo.com

收稿日期:2002-03-12;修回日期:2002-07-10

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

酸钠(Na_3VO_4), Leupeptin, PNPP(Sigma 公司), 兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(ⅧR:Ag), 鼠抗人 CD31 单克隆抗体(DAKO 公司), 多聚谷酪氨酸(Polyclu:Try)(4∶1)(Fluka 公司), Tris-base, 二硫苏糖醇(DTT)(Roche 公司), γ-^{32}P-ATP(北京亚辉公司), 超高速离心机(Bechman), Bechman 液体闪烁计数仪, 其余试剂为国产分析纯。

1.2　内皮细胞培养

健康 Wiatar 大鼠体重(175±25) mg, 本校实验动物中心提供。10%乌拉坦腹腔麻醉后, 切断颈动脉放血处死, 取心肺组织于无菌三角烧瓶。剪取胸膜下肺组织(厚度小于 1.5 mm), 切成 1.5 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块。贴入无菌的培养瓶中, 置培养箱固化 2 h 后, 加入含 15%优等胎牛血清、肝素 90 U/ml、L-谷氨酰胺 4 mmol/L 的 DMEM 培养基进行培养。60 h 后将肺组织块取出。继续培养 14 d 左右, 细胞融合成单层细胞。用 0.1%胰蛋白酶进行消化, 每瓶加入约 1 ml, 镜下观察, 当细胞间连接疏松时立即倒出消化液, 加入足量(约 3 ml)培养基, 吸管吹打使细胞脱落并充分混匀, 吸出 0.1 ml 计数, 得出细胞总数, 将含细胞的培养液稀释成(2.5~3.0)×10^5 个细胞/ml 的接种浓度。试验用细胞传至 3~5 代, 与肺微血管内皮细胞相混的少量血细胞可以通过传代除去。

1.3　鉴定

1.3.1　倒置显微镜下观察细胞的形态和生长特性

1.3.2　Ⅷ因子相关抗原间接免疫荧光染色　用 PBS 液, 冲洗 3×3 min。样品片加 1∶50 兔抗人Ⅷ因子相关抗血清 50 μl 37 ℃下密封孵育 30 min, PBS 液冲洗 3×3 min, 吸水纸吸干, 缓冲甘油封片。加 1∶25 荧光标记的羊抗兔 IgG 50 μl, 并孵育、PBS 液冲洗、水吸干及封片后荧光显微镜观察。对照片第一抗体用 PBS 液代替, 其它步骤同样品片。

1.3.3　异植物血凝素结合试验　用 PBS 液冲洗, 水汲干后加入 25 μg/ml 荧光标记的异植物血凝素 50 μl, 在室温密封孵育 30 min, PBS 液冲洗 3×3 min, 水吸干和封片后荧光显微镜检查。

1.3.4　CD31 抗体的染色　常规免疫组化方法进行[4]。

1.3.5　血管紧张素转换酶活性(Angiotensin-converting enzyme, ACE)的测定　依照试剂盒的说明, 用紫外分光光度法测定细胞培养液中的 ACE 活性。

1.4　脂多糖处理细胞

按照文献[5]的方法, 1 μg/ml LPS 处理细胞 2、8、16、24 h, 每个时相点取一块培养板(6 孔), 细胞刮擦刮下细胞收集后用于以下活性测定。

1.5　TKR 活性测定

参阅文献[6]并进行改进。首先制备样品:将备用细胞悬浮于缓冲液 A(20 mmol/L, Tris-HCl, pH 7.5), 0.25 mol/L 蔗糖, 20 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DMSF 和 5 μg/mol (Leupeptin), 于冰浴中匀浆破碎细胞, 1 000× g 离心 10 min, 上清经 100 000× g 离心 1 h, 所得上清作胞浆 TKR 样品;将上述沉淀加入适量缓冲液 B(0.5% Tritox-100 缓冲液 A), 冰浴匀浆破碎后于 0 ℃提取 1 h, 再经 100 000× g 离心 1 h, 上清为胞膜 TKR 样品。然后进行 TPK 活力测定:反应总体积 50 μl, 含终浓度为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 50 mmol/L Na_3VO_4, 7 mg/ml PNPP, 0.85 mg/ml 多聚谷酪(Glu∶Tyr 为 4∶1)(对照用 H_2O 代);适量酶液, 50 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L $MnCl_2$。测膜性 TPK 时再加浓度为 0.025%的 TrionX-100;30 ℃预温, 加入 50 μmol/L γ-^{32}P-ATP(3.7×10^4 Bq)起动反应, 准备保温 5 min, 立即移入冰浴终止反应;取 30 μl 反应液加至滤纸上, 迅速投入冰冷的 10%三氯乙酸-2%磷酸液, 重复洗涤 3 次;用 5%三氯乙酸液洗 2 次, 每次 30 min, 无水乙酸洗 30 min, 吹干后于 Beckman 液闪仪测 cpm, 测定和对照的 cpm 相减后, 换算成^{32}P 参入多聚谷酪的 pmol(样品均为三复管);以多聚谷酪和^{32}P-ATP 为底物, 以每毫克酶蛋白每分钟催化 1 pmol 的^{32}P 转移到多聚谷酪定义为 1 个 TPK 的酶活力(U)。

1.6　统计学处理

所得结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPSS10.0 软件分析中 F 检验和 q 检验相差显著性。

2　结果

2.1　微血管内皮细胞生长情况

根据细胞生长的特点, 肺组织块培养时, 红细胞及白细胞最先从组织中游出, 然后是血管内皮细胞, 成纤维细胞和其它细胞则在 72 h 后才开始生长[7]。我们也观察到, 肺组织块贴于培养瓶壁后, 血细胞立即从肺组织块边缘向四周游出。24 h 肺微血管内皮细胞游出。60 h 将肺组织贴块取出后, 培养瓶中只有肺微血管内皮细胞和血细胞。7~10 d 后这两种细胞一起形成细胞单层。此时进行传代, 血细胞被除去, 培养瓶中只有肺微血管内皮细胞。倒置显微镜下可见细胞形态呈鹅卵石镶嵌状排列, 状如梭形或多角形, 大小均匀。胞核清晰, 呈卵圆形, 胞浆丰富。见图 1。

2.2　鉴定情况

2.2.1　培养微血管内皮细胞ⅧR:Ag 检测呈阴性。而对照的正常脐静脉内皮细胞胞浆染成紫蓝色。

2.2.2　异植物血浆素结合试验示肺微血管内皮细胞与 FITC-BSI 结合, 呈明亮的黄绿色荧光。见图 2。

2.2.3　内皮细胞特异抗原 CD31 染色, 细胞胞浆呈紫蓝色阳性。见图 3。

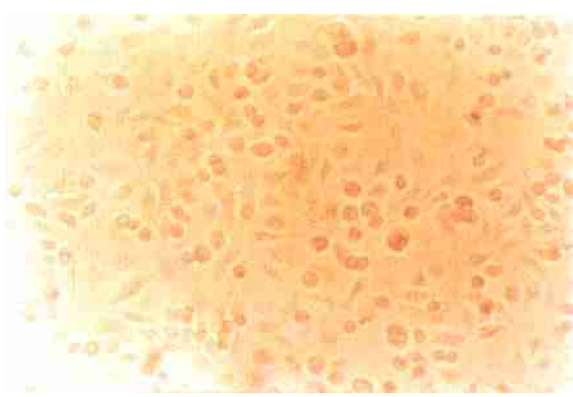


图 1　倒置显微镜下正常大鼠 LMVEC　(×250)

Fig 1　Normal rat LMVEC under an invert microscope　(×250)

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

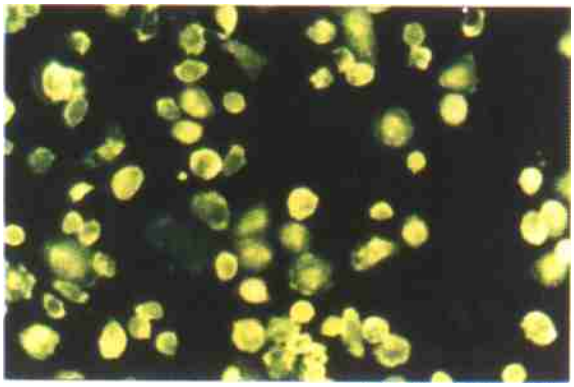


图 2 荧光显微镜下正常 LMVEC 与植物凝血素 FITC-BSI 结合的情况 (×100)

Fig 2 Binding of normal rat LMVEC with FITC-BSI under a fluorescence microscope (× 100)



图 3 正常 LMVEC 与抗人 CD31 抗原反应胞浆呈紫蓝色 (SABC 硫酸镍铵× 250)

Fig 3 Immunohistochemical reaction of normal rat LMVEC with anti-human CD31 antibody (Nickle ammonium sulfate intensified SABC× 250)

2.2.4 正常组和 LPS 作用组细胞培养液中均检测到 ACE 活性,而正常组 2、8、16 和 24 h 培养液中 ACE 活性逐渐增高。LPS 作用组与正常组比较,均减低。见表 1。

表 1 两组 LMVEC 细胞培养液中 ACE 活性的变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of angiotensin-converting enzyme (ACE) in the cultured LMVEC media ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	2 h	8 h	16 h	24 h
Normal	1.36±0.17	2.65±0.46 *	3.72±0.64 *	4.79±0.52 *
LPS	1.30±0.14	2.09±0.36 *	1.54±0.58	1.61±0.65

*: $P<0.01$ *vs* 2 h group

2.3 TKR 活性

放免法测定 LMVEC 的 TKR 活性结果如表 2,LPS 处理 LMVEC 后,胞膜 TKR 活性降低,24 h 降低为正常水平的 1/2。胞浆 TKR 活性升高,8 h 升高为正常水平的 2 倍,24 h 升高为原来的 5.2 倍。

表 2 LPS 对 LMVEC 中 TKR 活性的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of LPS on TKR activity in LMVEC ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

TKR activity	N	2 h	8 h	12 h	24 h
Membrane	48.31±6.92	35.85±4.90 *	30.47±7.58 *	26.31±6.90 *	21.19±3.32 *
Cytoplasm	43.17±6.83	80.08±12.36 *△	94.43±10.79 *△	152.33±18.65 *△	224.27±28.05 *

*: $P<0.05$ *vs* N group; △: $P<0.05$ *vs* 24 h group

3 讨论

实验采用组织贴块法,成功地培养出大鼠 LMVEC。经鉴定,Ⅷ因子相关抗原 ⅧR:Ag 检测呈阴性;与对 LMVEC 最具特异性的异植物血凝素 FITC-BSI 结合呈阳性;CD31 抗体检测呈阳性;培养液中能定量检测到 ACE 活性,并随培养时间增加 ACE 活性也逐渐增高,证明本实验培养获得的细胞为大鼠 LMVEC。陈思峰等[7] 的方法,未加用肝素,导致内皮细胞纯度不高。而 Magee[8] 报道的培养方法使用胶原酶,同时组织剪碎等程序较为复杂。本实验进行简单的贴块法分离 LMVEC,从而避免使用胶原酶和胰蛋白酶;采用肝素进行选择性培养,使细胞纯度较高;使用抗菌素,减少细菌等的污染,提高了成功率。此方法具有简单经济、分离培养出的内皮细胞纯度较高的特点。

酪氨酸蛋白激酶受体信号转导系统是重要的信号转导途径,许多生长因子受体具有 TPK 活性。该蛋白激酶以受体本身为底物,发生自身磷酸化,能以细胞内其他蛋白质为底物,引起多种蛋白质的磷酸化,而且其磷酸化位点在 Tyr 残基上。我们的研究显示,LPS 作用后 LMVEC 胞浆酪氨酸激酶受体活性升高,而胞膜酪氨酸激酶受体活性降低。说明 PTK 受体被激活,把 LPS 对 LMVEC 细胞刺激的信号转化为细胞内信号,从而激活 LMVEC 的反应,释放一些炎症介质和其它物质,在量较少时,可能引起机体的适应性应答,过量时引起机体的损害,如急性肺损伤等。文献[9] 报道,脂多糖依赖酪氨酸激酶的方式减低体外和体内小动脉内皮细胞传导应答的细胞间偶联,PTK 抑制剂(1.5 mmol/L TyrA9 和 10 nmol/L PP-2)能阻制脂多糖的效应。干扰素β 通过酪氨酸激酶依赖通道,低调 TNFα 诱导的细胞间粘附分子 1 在脑微血管内皮细胞中的表达[10]。LPS 处理血管的内皮细胞 10 h 后通过 PTK 级联以翻译后修饰的方式特异升高内皮源性一氧化氮合酶的活性,从而在内毒素休克的发病机制中发挥重要作用[11]。在牛的肺动脉内皮细胞中 LPS 以时间和剂量依赖的方式促进蛋白激酶 C 的特异底物(MARCKS)的磷酸化作用,酪氨酸激酶特异抑制剂金雀异黄素和 p38 MAPK 特异抑制剂 SB203580 阻止 LPS 的上述作用[3]。目前研究初步表明,在 LPS 所致 LMVEC 损伤、急性肺损伤和全身炎症反应综合征的发病机制中 TKR 及其相关

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

的信号途径可能发挥重要调节作用。

参考文献:

[1] Murphy S H, Bakopoulos N, Dame M K, *et al*. Heterogeneity of vascular endothelial cells: differentces in susceptibility to neutrophil-mediated injury [J]. Microvasc Res, 1998, 56(1): 203—211.

[2] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(5): 313—316.

[3] Zhao Y, Davis H W. Endotoxin causes phosphorylation of MARCKS in pulmonary vascular endothelial cells[J]. J Cell Biochem, 2000, 79(3): 496—505.

[4] 蔡文琴, 王伯彝云. 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. 8—20.

[5] 肖贞良, 孙耕耘, 钱桂生. 肺循环灌注对大鼠肺微血管内皮细胞分离和培养的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(11): 1053—1054.

[6] Kong S K, Wang J H. Purification and characterization of a protein tyrosine kinase from bovine spleen [J]. J Biol Chem, 1987, 262(6): 2597—2603.

[7] Chen S F, Fei X, Li S H, *et al*. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J]. Microvasc Res, 1995, 50(1): 119—128.

[8] Magee J C, Stone A E, Oldham K T, *et al*. Isolation, culture, and characterization of rat lung microvascular endothelial cells Am J Physiol [J]. 1994, 267(4 Pt 1): 433—441.

[9] Tyml K, Wang X, Lidington D, *et al*. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling *in vitro* and arteriolar conducted response *in vivo*[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(3): 1397—1406.

[10] Defazio G, Livrea P, Giorelli M, *et al*. Interferon beta-1a downregulates TNF αalpha-induced intercellular adhesion molecule 1 expression on brain microvascular endothelial cells through a tyrosine kinase-dependent pathway [J]. Brain Res, 2000, 881(2): 227—230.

[11] Huang K T, Kuo L, Liao J C. Lipopolysaccharide activates endothelial nitric oxide synthase through protein tyrosine kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245(1): 33—37.

(编辑　薛国文)

(上接 93 页)

轻按于新生儿皮肤上, 具体为: 头、胸、腹、手、足 5 个部位, 每个部位各测试 3 次, 再算出均值即可得到经皮胆红素值。利用公式[(头值+胸值+腹值)÷3 - 12] × 1.2 计算所得皮肤平均黄疸值即为患儿总胆红素测定值。再用数理统计的方法分析血液胆红素值与经皮肤测得的总胆红素值之间的关系以及头、胸、腹、手、足 5 个部位中, 哪个部位测得的胆红素值与血液胆红素值关系更密切。

1.4　统计学处理方法

结合实际分析认为经皮肤测胆红素值与血液胆红素值之间应成线性关系, 吻合度应该从线性预报效果进行评判。因此采用SPSS 程序包中的线性回归分析。

2　结果

见表 1。

表 1　56 例高胆红素血症患儿经皮和抽血测得的胆红素值(g/L, $\bar{x} \pm s$)

血液	5 部位计算均值	头	腹	胸	手	足
13.57±4.62	11.80±4.63	23.92±9.05	21.62±4.70	21.43±4.52	14.56±2.56	13.97±2.65

将皮肤平均黄疸值x 作为自变量、血液胆红素值 Y 作为因变量, 利用一元线性回归处理结果为:

$y = 4.3644 + 0.7976x$, $F_0 = 56.932$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.513$ 说明皮肤平均胆红素值与血液胆红素值之间存在非常显著的线性关系。

再将头部皮肤胆红素值(X_1)、胸部皮肤胆红素值(X_2)、腹部皮肤胆红素值(X_3)、手部皮肤胆红素值(X_4)、足跟部皮肤胆红素值(X_5)视为自变量, 分别与因变量血清胆红素值(y)作一元线性回归得到如下结果:

$y = -4.9263 + 0.8256x_1$, F0= 39.923, $P < 0.001$, $R^2 = 0.425$

$y = -2.0244 + 0.7280x_2$, F0= 45.409, $P < 0.001$, $R^2 = 0.457$

$y = -3.3065 + 0.8018x_3$, F0= 53.947, $P < 0.001$, $R^2 = 0.500$

$y = -3.9797 + 1.2288x_4$, F0= 34.021, $P < 0.001$, $R^2 = 0.387$

$y = -0.7403 + 1.0461x_5$, F0= 21.921, $P < 0.001$, $R^2 = 0.289$

从以上结果可以看出头部皮肤胆红素值(X_1)、胸部皮肤胆红素值(X_2)、腹部皮肤胆红素值(X_3)、手部皮肤胆红素值(X_4)、足跟部皮肤胆红素值(X_5)均与血清胆红素值(y)存在显著的线性关系, 其中腹部皮肤胆红素值与血清胆红素值之间的回归可决定系数最大, 说明五个部位相比之下腹部皮肤胆红素值与血清胆红素值的吻合度更好。

3　讨论

本研究的结果表明 TCB 值与血清总胆红素值有着良好的相关性, 可通过 TCB 检查推测血清总胆红素浓度[1]。以上数据显示, 选择不同的检查部位, 得到的 TCB 值并不相同。因此, 根据不同部位的TCB 值, 估计血清总胆红素值亦有所差异。徐三清等[2]比较了额部、胸骨等检查部位后发现, 额部(头)的胆红素值与血清胆红素值最为接近, 认为是较为有效的检查部位。而本研究发现腹部皮肤胆红素值与血清胆红素值的吻合度最好, 能比较客观地反映同一患儿在不同时期或不同患儿之间血清总胆红素值的动态变化及差异。综上所述, 经皮黄疸仪 TCB 是一种有效而无创性筛查新生儿高胆红素血症的工具, 具有广泛的临床应用价值。

关键词: 经皮测黄疸; 吻合度
中图法分类号: R722.170.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 马廷和, 宋　玫. 经皮黄疸仪检查的相关因素分析[J]. 河北医药, 1999, 21(6): 521.

[2] 徐三清, 刘皖君. 经皮黄疸仪对新生儿高胆红素血症的筛查作用[J]. 实用儿科临床杂志, 1996, 11(3): 145.

(编辑　郭建秀)

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