DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.027
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

文章编号:1000-5404(2002)07-0813-03

论著

内毒素对培养人脐静脉内皮细胞高能磷酸合成的影响

梁自文,杨宗城,罗向东,石富胜 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨内毒素(LPS)对血管内皮细胞高能磷酸合成的影响及其分子基础。方法 通过抑制消减杂交克隆培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)LPS刺激6 h后差异表达的基因,测序后得到一个下调表达的203 bp序列,与线粒体ATP合酶同源,扩增该序列并标记为探针,进行Northern杂交验证;测定胞内高能磷酸含量。结果 LPS刺激后,HUVEC内线粒体ATP合成酶基因表达下调,胞内ATP含量和能荷值显著降低。结论 LPS通过调控内皮细胞线粒体ATP合酶基因的表达,抑制线粒体呼吸功能,致细胞能量合成减少而影响细胞功能。

关键词:内毒素;人脐静脉内皮细胞;高能磷酸;抑制消减杂交
中图法分类号:R322.12/R329.28 文献标识码:A

Effects of lipopolysaccharide on synthesis of high-energy phosphate in human umbilical vein endothelial cells *in vitro*

LIANG Zi-wen, YANG Zong-cheng, LUO Xiang-dong, SHI Fu-sheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of lipopolysaccharid (LPS) on the constructive metabolism of the high-energy phosphate in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Suppression subtractive hybridization (SSH) was carried out on control HUVEC and HUVEC stimulated with 100 ng/ml LPS for 6 h. After sequencing, a down-regulated cDNA fragment (203 bp) was identified to be homologous to the mitochondrial ATP synthase, whose expression was detected with Northern blot. The contents of high-energy phosphates were measured. **Results** Expression of mitochondrial ATP synthase gene was down-regulated in LPS-stimulated HUVEC, and the contents of ATP were decreased significantly while the contents of ADP and AMP were increased. **Conclusion** LPS inhibits the mitochondrial respiratory function through regulating the expression of mitochondrial ATP synthase, which may affect the normal function of endothelial cells.

Key words: endothelial cells; high-energy phosphate; lipopolysaccharide; suppression subtractive hybridization

严重烧创伤易并发革兰阴性菌感染,常导致内毒素(LPS)血症,激活单核巨噬细胞、白细胞和血管内皮细胞,释放大量炎症介质诱发全身性炎症反应,严重者形成中毒性休克和多器官功能衰竭,是患者主要死亡原因之一。血管内皮细胞广布全身,其活化后结构和功能的改变是形成全身性炎症反应的病理基础。因此,阐明LPS激活内皮细胞的分子机制并寻找合适的防治措施是目前临床重度烧创伤救治面临的紧迫问题。我们在克隆内皮细胞内毒素刺激后差异表达基因中发现与能量代谢有关的基因表达改变,本实验报道了LPS对内皮细胞线粒体ATP合成酶基因表达及高能磷酸合成的影响。

1 资料和方法

1.1 细胞培养和分组

取人脐静脉内皮细胞株ECV-304(ATCC公司)置37 ℃ 5% CO_2 孵箱中,培养于含10%胎牛血清的M199培养基中,待细胞处于对数生长期中,分成LPS处理组(T组)和对照组(D组)。其中T组培养基中加入100 ng/ml LPS (O111:B4, Sigma公司),继续培养6 h后同时收集两组细胞。

1.2 抑制消减杂交

采用Trizol(Gibco BRI公司)试剂提取细胞总RNA,取1 mg总RNA用Oligotex mRNA mini kit(Qigen公司)分离mRNA,经比色定量后,各组取2 μg立即按PCR-select cDNA subtraction kit(Clontech公司)操作方法进行正向和反向消减杂交,将消减杂交产物克隆入pT-Adv质粒后电穿孔转化大肠杆菌DH5α,建立了正向和反向消减cDNA文库,经菌落斑点杂交筛选阳性克隆后测序,用BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行同源性检索。

1.3 Northern杂交

对消减杂交获得的差异表达基因进行Northern blot杂交检验。取-80 ℃冻存反向消减cDNA文库阳性克隆XT2点于500 μl LB(含100 mg/ml氨苄青霉素)指形管中,置37 ℃, 200 r/min振摇4 h,取1 μl菌液为模板以插入片段两侧接头内侧序列巢式PCR引物1(5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3')和巢式PCR引物2R(5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAG GT-3')进行PCR扩增,反应条件为94 ℃变性45 s, 94 ℃ 10 s, 68 ℃ 3 min, 28个循环,取5 μl产物电泳检验PCR反应,用Nucleospin Extraction kit (Clontech公司)纯化其余PCR产物,取9 μl纯化产物加1.5 μl RsaI(10 U/μl)酶切去掉两端接头并纯化后以随机引物法标记上[α-^{32}P]dATP,经CHROMA SPIN Columns (Clontech公司)纯化去除未结

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830400)
作者简介:梁自文(1967-),男,四川省彭州市人,博士研究生,主治医师,主要从事烧伤内皮细胞功能障碍机制研究,发表论文15篇。电话:(023)68754523
收稿日期:2001-10-21;修回日期:2002-03-12

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

合的[α-^{32}P] dATP 制备好探针备用。1%甲醛变性琼脂糖电泳 T 组和 D 组各 30 μg 总 RNA，经 785 vacuum blotter（BioRad 公司）于 10× SSC 转移液中真空负压（5 inchHg）转印 90 min 至阳离子尼龙膜（Amersham 公司）上，80 ℃烘干 2 h，置 5 ml expresshybridization solution（Clontech 公司）中，68 ℃预杂交 40 min；煮沸标记探针 5 min，迅速置冰水中，与 5 ml 新杂交液充分混匀后替换预杂交液，68 ℃杂交过夜，室温下 2× SSC/0.05% SDS 洗膜 3× 30 min，50 ℃ 0.1× SSC/0.1% SDS 洗膜 2× 20 min。－70 ℃放射自显影 3 d。剥离膜上结合探针，用管家基因 G3PDH 标记探针再与膜杂交验证两组总 RNA 上样量及转印效率相同。

1.4 ATP、ADP、AMP 含量测定

将 HUVEC 细胞培养于 75 ml 培养瓶中，LPS 刺激 6 h 后常规消化离心，置预冷的玻璃匀浆器中加入 10%高氯酸 2 ml，冰浴匀浆，4 ℃离心 15 000× g 离心 15 min，取上清 0.5 ml 加入 K_2CO_3 60 μl，摇匀，4 ℃离心 15 000 g× 15 min，取上清上柱测定。Gilson 高效液相色谱分析仪工作条件：色谱柱 SephrisorbC_{10} 250× 4.6 mm，流动相：50 mm PBS，pH 6.5，检测器：UV 260 nm，流速 1 ml/min，进样量 20 μl，根据 ATP、ADP、AMP 标准曲线，通过色谱工作站软件计算标本 ATP、ADP、AMP 含量（μmol/g）。能荷（EC）= ATP + 0.5ADP/（ATP + ADP + AMP）

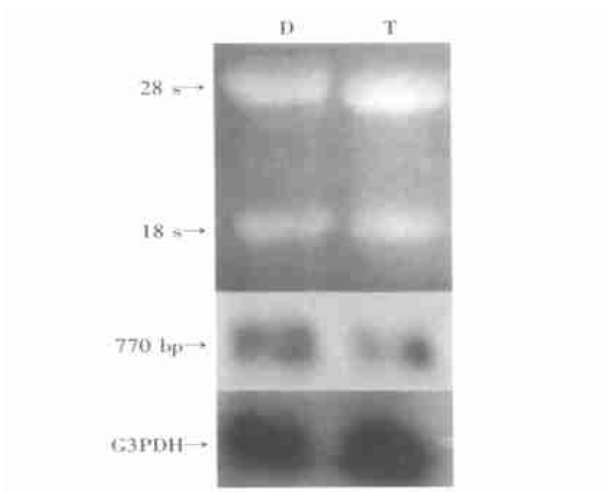
1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞差异表达基因筛选和鉴定

经抑制消减杂交，筛选出了数十条内皮细胞 LPS 刺激后差异表达基因（另文报道）。在下调表达基因中，编号为 XT2 克隆含一个 203 bp 的插入片段，经同源性检索发现与线粒体 ATP 合酶 cDNA（772 bp）完全同源，位于该基因的 250～452 bp。Northern 杂交显示该片段来源于一个约 770 bp 转录子，在 LPS 刺激的内皮细胞中表达量明显较对照细胞低，表明 LPS 刺激导致该基因下调表达，见图 1。



D：Control HUVEC；T：HUVEC stimulated by LPS；The same blots were hybridized with G3PDH to confirm similar loading and transfer of total RNA

图 1 线粒体 ATP 合酶 Northern 杂交

Fig 1 Northern blot of mitochondrial ATP synthase in HUVEC

2.2 内皮细胞高能磷酸含量和能荷变化

与对照组比较，LPS 刺激后，内皮细胞内 ATP 的含量显著降低，而 ADP 和 AMP 的含量明显增高，EC 显著下降，见表 1。

表 1 LPS 刺激对 HUVEC 高能磷酸含量和能荷的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of LPS on the contents and energy charge of high-energy phosphates in HUVEC（$\bar{x}\pm s$）

Group	ATP（μmol/g）	ADP（μmol/g）	AMP（μmol/g）	EC
D	4.81±0.23	1.18±0.04	0.24±0.02	0.87±0.80
T	3.52±0.15 *	1.64±0.06 *	0.60±0.01 *	0.75±0.69 *

D coutrol t HUVEC stimulatedb by LPS；*：$P<0.05$ *vs* D

3 讨论

严重烧创伤致革兰阴性菌感染后，细菌壁上活性成份脂多糖，即内毒素，大量进入血循环，作用于单核巨噬细胞，白细胞和血管内皮细胞，使之释放出大量炎症介质，诱发全身性炎症反应和广泛血清渗出而致中毒性休克[1]。广布全身的血管内皮细胞受 LPS 刺激活化后基因表达改变，引起细胞表型变化及正常功能障碍，是导致缺血-再灌注损伤和促进多器官功能衰竭的主要因素。

LPS 可通过间接和直接两条途径激活内皮细胞[2]。间接途径是 LPS 先与能表达膜 CD14 的髓样细胞（如单核巨噬细胞）结合，使其释放 TNFα 和 IL-1β，再与内皮细胞膜上相应受体结合活化内皮细胞。直接途径是 LPS 在血清中分泌型 CD14 的帮助下，与内皮细胞膜上特异跨膜受体 TLR4（Toll-like receptor 4）结合[3]，活化内皮细胞。LPS 与受体 TLR4 结合后可激活胞内以 NF-κB 信号转导为主的多条通路[4]，启动或抑制相关基因的表达，如上调 E-选择素、IL-8、细胞粘附分子和纤溶酶原激活抑制因子-1 等与炎症反应密切相关因子的表达，促进全身性炎症反应的形成[5]，引起内皮细胞表型和功能的改变。

由于正常的能量供给是细胞能否完成各项功能的基础，因此，我们就 LPS 刺激除活化细胞使其释放大量炎症介质和细胞因子外，对细胞能量代谢的影响及其分子机制进行了实验研究，结果表明 LPS 刺激 6 h 后，内皮细胞能量代谢已有明显异常，表现为胞内 ATP 储量减少，ADP、AMP 相应增加，乳酸堆集。表明线粒体呼吸功能下降，细胞有氧呼吸受损，必须靠增加无氧酵解来维持供能。内皮细胞这种能量代谢变化的分子基础是由于 LPS 调控了能量代谢的基因表达。抑制消减杂交[6]和 Northern 检验证明，LPS 刺激后，内皮细胞线粒体 ATP 合成酶表达下调。实验结果提示我们在烧伤病人全身性炎症反应的防治中，除抗内毒素和炎症介质外，还应注意给细胞补充能量，以利血管内皮细胞维持正常生理功能对抗内毒素的毒性作用。

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

参考文献：

[1] Nakae H, Endo S, Yamada Y, *et al*. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns[J]. Burns, 2000, 26(2): 139－144.

[2] Faure E, Thomas L, Xu H, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like recptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation[J]. J Immunol, 2001, 166(3): 2 018－2 024.

[3] Emmanuelle F, Ozlem E, Peter A, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kB through Toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15): 11 058－11 063.

[4] Jersmann H P, Hii C S, Ferrante J V, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1 273－12 739.

[5] Adeghi M, Collinge M, Pardi R, *et al*. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2 712－2 718.

[6] 梁自文, 罗向东, 杨宗城. 低丰度差异转录基因的克隆和高通量筛选[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2001, 24(3): 172－174.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2002)07-0815-01

个案与短篇

12 例猪原位肝移植手术的护理观察及配合

Nursing care and coordination of 12 cases of pig liver transplantation

喻启玲 （第三军医大学附属西南医院门诊部, 重庆 400038）

我院 2001 年 7～12 月期间, 开展体外静脉转流下猪原位肝移植 12 例次。10 例均获得成功, 术后动物存活时间大于 24 h。现将手术护理配合的经验作一介绍。

1 术前准备

1.1 思想及相关知识准备[1]

猪肝移植术围手术期的病理生理及麻醉有别于其他手术, 其特点是: 手术时间长, 脏器及组织长时间暴露容易引起感染; 血液肝素化容易导致出血较多; 大量液体的输入易导致急性肾功能不全、凝血机能障碍; 体外静脉转流期间操作不当容易导致气体栓塞、管道扭曲脱落等。此类手术对手术室及相关人员的无菌程度要求较高, 故应时刻保持高度的无菌操作观念, 做好自身及手术相关人员的监督工作。

1.2 物品及器械准备

肝移植手术的专用器械如: 三叶钳、血管牵拢器等术前应确保严格消毒。提前 1 d 完成手术所需无菌冰的制备。为使供肝植入期保持一定温度, 手术室应相对恒温 23～25℃。为确保手术室保暖, 应依次铺好手术床、海绵床垫、电热毯、橡皮布、床单等。气温较低时, 应准备部分待输注液体恒温箱中, 术前建立输血、输液、监测及采集标本的通道, 协助麻醉医师调整呼吸机及监测仪。

2 术中观察及配合

2.1 术中常规观察护理配合

巡回护士术中应按照医师所制定的计划表严密配合, 按计划抽取动脉血行血气分析、血常规和肾功检测, 并详细记录各种液体输入量、各种引流管位置及引流液的性状、颜色、量等。同时注意观察血流动力学变化及心电图改变, 发现异常, 随时向医师报告, 并根据情况相应调整液体输入速度。输液时应注意晶、胶体交替输注, 以维持机体内环境的渗透压。应具有高度的无菌观念, 严格的无菌操作技术, 分工明确, 责任到人。

2.2 供体手术配合

尽量缩短供肝切取时间, 减少热缺血时间, 灌注要确保低温(0～4 ℃)。手术中应争分夺秒, 配合医生在门静脉及腹主动脉插管后, 即行快速、加压的肝脏灌注, 灌注至肝脏颜色苍白为止。灌注液要求快速, 但不宜成直线, 滴入 0～4 ℃灌注液 2 000 ml 左右[2]。快速离断周围组织切取肝脏后置入双层无菌塑料袋中, 再放入盛有无菌冰的盆内修整。

2.3 供肝植入的手术配合[3]

在切除病肝前, 血液肝素化, 行门静脉、左髂内静脉至左侧颈内静脉转流, 在转流条件下和动物的无肝期, 动物容易发生血压波动和体温下降, 应相应扩容、调整转流速度, 并打开电热毯加温, 调整电热毯及手术室空调, 保证动物体温在 34 ℃以上。

供肝植入后, 应在周围覆盖冰屑, 防止肝脏复温过快。吻合肝上下腔静脉及门静脉后, 部分开放肝脏血流, 吻合肝下下腔静脉后, 停止转流, 对抗肝素。吻合过程中, 护士熟练配合医生, 及时提供器械, 以加速手术进程。主动向肝表面喷注冰盐水以及添加冰屑, 维持低温。定期检测血液激活凝血时间, 以判定血液凝固机能状态, 并根据具体情况加以调整。关腹前配置好含抗生素与抗霉菌药物的灌洗液灌洗腹腔。

3 术后观察及护理

术后 24 h 内密切观察各项生命体征。固定好腹部主要引流管, 引流管接闭式引流袋, 并观察引流物的质、量、色变化。尤其要密切观察胆汁量和质的变化。剂量 1 次/d, 如果无明显腹腔渗出液, 腹腔引流管可在术后 24～48 h 拔除。移植后腹水会出现, 引流液是典型血浆性的, 部分为血性。如可疑为新鲜出血, 可测定 Hb。大量出血应及时提醒医生再次手术。具体观察及处理见表 1。

作者简介：喻启玲(1963－), 女, 重庆市人, 主管护师。电话：(023)68754668

收稿日期：2002-03-05；修回日期：2002-06-10

（下转 818 页）

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