DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.010

类脂 A和内毒素对人肾小球内皮细胞线粒体脱氢酶活性的影响*

罗晓凤** 梁光萍 罗向东 杨宗城 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:为证明构成内毒素(LPS)的主要核心部分类脂 A(Lipid A)在 LPS直接损伤内皮细胞中所起的作用。方法:分离培养人肾小球内皮细胞(HGVEC),把细胞分为正常对照组、LPS时间梯度组、LPS浓度梯度组和 Lipid A浓度梯度组。线粒体脱氢酶(Mitochondria dehydrogenase,MtDH)活性采用 MTT法测定。结果:时间梯度组:1μg/ml LPS使内皮细胞线粒体脱氢酶活性呈进行性下降,在 12 h时比正常对照组下降显著($P<0.01$)。浓度梯度组 LPS在 0.9μg/ml使线粒体脱氢酶活性显著下降,而 Lipid A在 0.6μg/ml处即可出现显著下降。结论:LPS和 Lipid A均可直接损伤 HGVEC,使其线粒体脱氢酶活性下降,Lipid A的损伤作用强于 LPS,证明 Lipid A在 LPS引起的内皮细胞直接损伤中起主要作用。

关键词 类脂 A;内毒素;人肾小球内皮细胞;线粒体脱氢酶;MTT法
中图法分类号 R344;R344.51

多脏器功能衰竭(MOF)是烧伤患者的严重并发症和主要致死原因[1]。近年研究发现血管内皮细胞损伤可能是引发烧伤后 MOF的重要因素[2]。在多种引起 VEC损伤的因素中 LPS的损伤作用一直是人们关注的重点。现已知 LPS的主要成份为 Lipid A,但目前对于 Lipid A在烧伤后 MOF中所起的作用知之甚少。本研究采用体外培养的 HGVEC为模型,动态观察了不同浓度下 LPS和 Lipid A和 HGVEC线粒体脱氢酶活性的影响,以分析两者对 VEC损伤的作用和程度,为进一步研究 LPS对 VEC的损伤机制和 MOF发生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 人肾小球内皮细胞(HGVEC)的培养

新鲜人胎肾,用无菌 Hanks液冲净表面血迹,剥离肾被膜,剪肾皮质于 50目滤网研磨,同时用 Hanks液将其冲滤至 200目上,收集 200目滤网上组织团,1 000 r/min离心 10 min,沉淀为肾小球。将肾小球加入 0.02%胶原酶(Hanks液配)中,孵育 1 h,吹散细胞团,4 h后去掉未贴壁细胞。用含 20%胎牛血清 M199培养液培养,2~3 d换液一次,经抗Ⅷ因子及形态学鉴定,90%细胞为 HGVEC。

1.2 LPS刺激 HGVEC

单层融合细胞用 0.25% EDTA-Na,0.25%胰酶消化 2~3 min,1 000 r/min离心 15 min,调整细胞密度为 1.5×10⁵个/ml,150μl/孔接种于 96孔板,待细胞完全融合后弃上清,分为三组:

A组:内毒素时间梯度组(内毒素由 Sigma公司购入,产品号 L2880,来自大肠杆菌 0111:B4株)内毒素浓度为 1.0μg/ml,37℃ 5% CO_2孵育,时间分别为 1 3 6 12 h,每时相各设 5孔(含 15%小牛血清)。另设正常细胞培养组作对照。

B组和 C组:分别为内毒素和类脂 A浓度梯度组。根据 A组实验结果,LPS于 12 h处对线粒体脱氢酶活性有显著抑制作用,设立 LPS和 Lipid A(Sigma,L5399,为双磷酸类脂 A),0.3 0.6 0.9 1.2μg/ml处 4个浓度梯度,以正常细胞组作对照,孵育 12 h。每个浓度各设 5孔。

1.3 MTT法测定 MtDH活性

各时相点和浓度点弃去原培养液,加入 MTT 20μl/孔(5 g/L),37℃ 5% CO_2孵育 4 h,各孔中加入 200μl二甲基亚砜(DMSO),室温振荡 10 min,酶联反应仪测定 490 nm波长处 D_A值。

1.4 统计学处理

采用 t检验。

2 结果

2.1 1μg/ml LPS在不同时相点对 HGVEC活力的影响

1μg/ml LPS刺激 HGVEC,分别于 1 3 6 12 h测定 MtDH活性。随时间延长,MtDH活性降低,至 12 h时与正常对照组比较有显著降低($P<0.01$),见表 1。

表 1 1μg/ml LPS对 HGVECs的 MtDH活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effect of LPS(1μg/ml) on MtDH activity of HGVECs($\bar{x}\pm s$)

Control	Incubation time(h)			
	1	3	6	12
1.56±0.12	1.50±0.15	1.41±0.06	1.38±0.06	0.78±0.27※

$n=5$;※:$P<0.01$ *vs* control

2.2 不同浓度 LPS和 Lipid A与 HGVEC孵育 12 h MtDH活性比较

LPS和 LipidA在相同浓度时比较 MtDH活性差异不显著($P>0.05$);LPS和 Lipid A随着浓度增加,MtDH活性逐渐降低,LPS升至 0.9μg/ml和 LipidA升至 0.6μg/ml以后,MtDH活性显著低于对照($P<0.01$),见表 2。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39830400
** 罗晓凤,女,25岁,护师
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 不同浓度 LPS和 Lipid A对 HGVEC的 MtDH活性影响

Tab 2 The effect of LPS and Lipid A with various concentration on MtDH activity of HGVECs

	Control	Concentration (μg/ml)			
		0.3	0.6	0.9	1.2
LPS	1.63± 0.015	1.60± 0.005	1.45± 0.23	0.96± 0.24※	1.05± 0.17※
Lipid A	1.63± 0.015	1.27± 0.05	1.04± 0.05※	0.91± 0.12※	0.99± 0.51※

※: $P < 0.01$ *vs* control; no significance between LPS group *vs* Lipid A group

2.3 形态学变化见图 1,2

内毒素浓度达到 0.9μg/ml以上,共同孵育时间达到 12 h以上均可见到内皮细胞明显的形态学变化。最常见的形态改变为胞体收缩,细胞边缘卷曲,其次是细胞浆中的网状结构消失(卡马斯亮蓝染色时可见胞浆中丰富的网状结构)[3]。同时可见到较多的细胞核固缩,核碎裂,少数细胞的核消失、脱出。类脂 A引起的内皮细胞损伤,在形态上与 LPS非常相似,其损伤浓度在 0.6μg/ml以上,作用时间在 12 h以上。





图 1 加入 0.9μg/ml LPS后 12 h HGVEC的形态变化 细胞肿胀,胞浆内结构部分消失,胞核部分脱落,呈空泡状

Fig 1 Morphologic changes of HGVEC cultured in medium with 0.9μg/ml LPS at 12 h

图 2 加入 0.6μg/ml Lipid A后 12 h HGVEC的形态变化 细胞皱缩,细胞间连接消失,部分细胞脱落,有些细胞呈空泡状

Fig 2 Morphologic changes of HGVEC cultured in medium with 0.6μg/ml Lipid A at 12 h

3 讨论

LPS是革兰氏阴性杆菌细胞壁上的脂糖成分,由类脂 A和多糖链组成。本实验所用类脂 A为含有两种磷酸基的完整 Lipid A[4]。文献报道单磷酸基 Lipid A的生物活性低于双磷酸基 Lipid A。目前认为 LPS的主要生物学效应部分是脂多糖的类脂 A部。烧伤早期血中内毒素升高较早,是参与损伤血管内皮细胞的重要因素之一。国内外对内毒素在多脏器损害发生中的作用已引起广泛关注。通常内毒素通过直接和间接两条途径损伤内皮细胞,使内皮细胞出现过强反应,引起功能和形态变化,对全身脏器造成损害。内毒素对血管内皮细胞的间接损害(指内毒素通过刺激免疫细胞,释放炎性介质和细胞因子作用内皮细胞)研究得较多,也比较深入[5],而内毒素对内皮细胞的直接损伤研究较少,许多机制尚不清楚[6],是一正待突破的环节。本实验从内毒素的主要生物活性成分类脂 A入手,以直接作用于 HGVEC的方法来研究内毒素的直接作用。

本实验发现 LPS和 Lipid A对 HGVEC线粒体脱氢酶活性有显著的直接抑制作用,并有明显的时间依赖性和浓度依赖性。刺激 HGVEC同等时间(12 h),Lipid A(0.6μg/ml)对 HGVEC线粒体脱氢酶的抑制浓度低于 LPS(0.9μg/ml),从而说明 Lipid A对 HGVEC的直接损伤作用强于 LPS。

实验说明 Lipid A是损伤 HGVEC的主要成分。LPS由 O-特异侧链、核心多糖和类脂 A组成,其分子量随所含糖、脂的比重不同而相差较大,约为(1 000~2 000)× 10^3 u,本实验所用 LPS为大肠杆菌 011:B4株提取,其 LPS中富含类脂 A。因此,从理论上推测与 LPS相同浓度下 Lipid A损伤效应应该大致与 LPS相差不多,但由于目前尚不清楚内皮细胞上与 LPS结合的受体物质的性质,还未有人对 LPS损伤内皮细胞的机制进行研究,也未能证实 LPS损伤内皮细胞的主要核心是 Lipid A。本研究首次证明了 Lipid A是 LPS中对内皮细胞造成直接损伤的主要成分。

参考文献

1 黄跃生,杨宗城,陈发明,等.严重烧伤脏器损害机制与防治.解放军医学杂志,1996,21(1):20

2 杨宗城,罗向东,高建川,等.严重烧伤后内皮细胞损伤及其在早期脏器损害发病中的作用.解放军医学杂志,1996,21

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

(1): 10
3 罗向东,杨宗城,黎 鳌.缺氧环境对培养的血管内皮细胞的损伤.中华创伤杂志, 1996, 12(5): 306
4 Qureshi N, Takayamak, Heller D, *et al*. Position of ester groups of the Lipid A backbone of lipopolysaccharides obtained from salmonella typhimurium. J Biol Chem, 1983, 258(21): 12947
5 Tennenberg S D, Weller J J. Endotoxin-induced, neutrophil-mediated entothelial cytotoxicity is enhanced by T-lyphocytes. J Surg Res, 1997, 69(1): 11
6 罗向东,杨宗城,黎 鳌.内毒素对培养人脐静脉内皮细胞的损伤作用.中华创伤杂志, 1998, 14(3): 154

(收稿: 1998-10-10;修回: 1999-02-01)
(编辑 汪勤俭)

Effects of lipid A and LPS on mitochondrial dehydrogenase of human glomerular endothelial cells*

Luo Xiaofeng, Liang Guangping, Luo Xiangdong, Yang Zongcheng (Research Institute of Burn, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To investigate the injurious effects of LPS and lipid A on vascular endothelial cells (VECs). **Methods**: Cultured human glomerular vascular endothelial cells (HGVECs) were divided into the control group and the groups treated with LPS in different time durations, the groups treated with LPS in different concentrations and the groups treated with lipid A in different concentrations. The activity of mitochondrial dehydrogenase was measured with MTT. **Results**: LPS 1μg/ml inhibited significantly the activity of mitochondrial dehydrogenase ($P < 0.01$). The inhibiting concentration was lower in lipid A (0.6μg/ml) than in LPS (0.9μg/ml). **Conclusion**: Both LPS and lipid A possess direct injurious effects on HGVECs and inhibit the activity of mitochondrial dehydrogenase. The inhibition is more powerful in lipid A than in LPS. The finding suggests that lipid A plays a major role in the injurious effects on VECs.

Key words lipid A; LPS; human glomerular vascular endothelial cell; mitochondrial dehydrogenase; MTT

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39830400

欣洛维治疗十二指肠溃疡临床疗效观察

Clinical observation of duodenum ulcer treated with thimic protein

徐 钊* 房殿春 廖福权 周子成 王振华 徐采朴 杜清书 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆, 400038

欣洛维是从健康乳猪新鲜胸腺中提取的一组蛋白类生物活性物质,为国家一类三期临床验证新药,有促进内皮细胞、成纤维细胞的生长和溃疡愈合的作用。我们用欣洛维治疗经纤维胃镜证实的十二指肠溃疡 51例,其中胃镜复查 60 mg组(甲)和 30 mg组(乙)各 10例,非胃镜复查 30 mg组(丙)31例,对其疗效和副反应进行了前瞻性观察,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象

51例均经纤维胃镜证实的十二指肠溃疡 50例,复合性溃疡 1例,溃疡直径 0.3~2.0 cm之内,不超过两个者,伴有相关溃疡病消化道症状者,试验前停用一切抗溃疡病药物,各组患者的基本情况相似。溃疡病出血、穿孔、幽门梗阻、内分泌疾病引起的溃疡、严重的肝、肾、心血管疾病、恶性肿瘤、妊娠及哺乳期妇女均不列为观察对象。

1.2 方法

1.2.1 胃镜复查 30 mg组和非胃镜复查组,每日口服欣洛维 2次,每次 30 mg;胃镜复查 60 mg组,每日口服欣洛维 2次,每次 60 mg,均为四周一疗程。

1.2.2 51例患者均观察治疗前后血、尿常规, BUN、Cr、GPT和血清胆红素,服药前后按 0、1、2、3等级和服药后每两周复诊一次,记录症状变化情况和药物副反应。

1.2.3 20例胃镜复查组随机分配,结束前、后 3 d复查胃镜,记录溃疡大小、愈合及周围炎症情况。

1.2.4 疗效判断 溃疡消失,瘢痕形成,周围炎症消失为愈合。溃疡愈合但有炎症者为显效。溃疡缩小>1/2(含 1/2),两个

(下转 258页)

* 徐 钊 男, 47岁,主任医师

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