DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.001


# 用 MTT法测定内毒素对培养人肾小球内皮细胞的损伤作用*

论著

梁光萍** 罗向东 王晓军 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: 研究内毒素对人肾小球内皮细胞(HGVEC)活力的影响,探讨内毒素在烧伤早期损害中的作用。方法: 分离培养人肾小球内皮细胞,把细胞分为正常培养组,内毒素浓度梯度组,内毒素时间梯度组,无血清内毒素作用 HGVEC 12 h组,另设烧伤血清时间梯度组为阳性对照。用 MTT法测定经内毒素和烧伤血清刺激后 HGVEC活力变化。结果: 1μg/ml以上内毒素即可引起 HGVEC活力降低($P<0.01$),1μg/ml LPS时间梯度组细胞活力呈进行性下降,并在 12 h差异非常显著(与对照组比较)。在有血清和无血清条件下 1μg/ml LPS分别作用 HGVEC 12 h,细胞活力下降差别不显著。烧伤血清刺激组细胞活力 6 h即出现明显降低,时间早于内毒素组,1μg/ml内毒素 12 h才显著降低,烧伤血清组降低程度大于内毒素组,两组间在 3 h和 6 h差异均显著。形态学观察,LPS和烧伤血清作用 HGVEC可使其细胞核脱失。结论: 内毒素和烧伤血清均可损伤 HGVEC,使其活力降低。LPS对 HGVEC的损伤程度与 LPS浓度和作用时间呈正相关。内毒素对 HGVEC的损伤不依赖于血清参与。

关键词 内毒素;肾小球;血管内皮细胞;MTT法

中图法分类号 R392.11

严重烧伤后多脏器功能障碍(Multiple organ disturbance, MOD)是患者死亡的重要原因,其中肾功能损害是烧伤早期常见并发症之一。而血管内皮细胞(Vessel endothelial cell, VEC)在 MOD中起着重要作用[1,2]。本研究采用人肾脏肾小球内皮细胞(HGVEC)为模型,动态观察了内毒素(LPS)和人烧伤血清对 HGVEC活力的影响,以探讨其在 VEC损伤中的作用,并为临床早期防治 MOD提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 肾小球内皮细胞(HGVEC))的培养

新鲜胎肾,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 烧伤血清的制备

烧伤血清来源于 50%~80%Ⅲ度烧伤病人,伤后 48 h内取静脉血分离血清,56℃、30 min灭活补体,加入 M199培养液配成 20%烧伤血清培养液(Burn serum medium, BSM)。

### 1.3 内毒素和烧伤血清刺激 HGVEC

单层融合细胞用 0.02% EDTA-Na, 0.25%胰酶消化 2~3 min, 1 000 r/min离心 15 min,调整细胞密度达 1.5×10⁵个/ml, 150μl孔接种于 3个 96孔板,待细胞完全融合后弃上清,分为 3组: A组: 内毒素浓度组(内毒素购自 Sigma公司,产品号 L2880,来自大肠杆菌 011:B4株),内毒素浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0μg/ml,各浓度设 6孔(含 15%小牛血清)。37℃ 5% $CO_2$孵育 12 h,另设正常培养液作对照。B组: 内毒素时间梯度组,根据预试验结果,LPS 1μg/ml已能明显影响 HGVEC线粒体脱氢酶活性,以 1μg/ml作为 LPS损伤浓度,分别设 1 3 6 12 h 4个时相点,以正常培养液组作为对照。12 h点分为两组: 一组培养液含 15%小牛血清,另一组不含血清,余下各时相点及对照培养液中均含 15%小牛血清。C组: 20%人烧伤血清损伤时间梯度组,时间设计同 B组。培养过程中相差显微镜下动态观察 HGVEC形态变化。

### 1.4 MTT法测定

各时相点弃去原培养液,加入 MTT 20μl/孔(5 g/L),37℃ 5% $CO_2$孵箱孵育 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。

### 1.5 统计学处理

采用 $t$检验和直线相关分析。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39290700-03

** 梁光萍,女,24岁,技师

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

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 LPS对 HGVEC活力的影响

4组不同浓度 LPS刺激 HGVEC 12 h后,除 0.5μg/ml组外,余组均与对照组差异非常显著( $P < 0.01$),见图 1。

### 2.2 LPS和烧伤血清对培养的 HGVEC MTT产物 $D_\lambda$ 值的影响

烧伤血清和 1.0μg/ml LPS刺激 HGVEC后细胞活力分别于 6 h和 12 h显著降低( $P < 0.01$)烧伤血清组 HGVEC活力于 3 h和 6 h明显低于 LPS组( $P < 0.01$),用含小牛血清和不含小牛血清 1.0μg/ml LPS刺激 HGVEC,12 h测细胞活力差异不明显,见表 1。

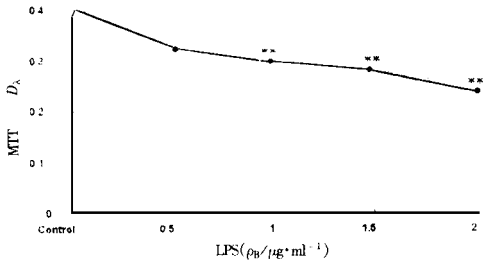



图 1 不同浓度 LPS对 HGVEC MTT产物 $D_\lambda$ 值的影响

**Fig 1 The effect of LPS on $D_\lambda$ of MTT of HGVECs**

** : $P < 0.01$

表 1 LPS和烧伤血清对培养的 HGVEC线粒体脱氢酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

**Tab 1 The effect of LPS and bure sera on $D_\lambda$ of MTT of HGVECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)**

| Group | Control | Incubation time | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 12 h (Without serum) |
| LPS group | 0.52± 0.04 | 0.51± 0.05 | 0.47± 0.02**## | 0.46± 0.02**## | 0.27± 0.09** | 0.32± 0.02 |
| Burn sera group | 0.65± 0.31 | 0.60± 0.22 | 0.33± 0.06 | 0.28± 0.02** | 0.29± 0.02** | |

** : $P < 0.01$ *vs* control; ## : $P < 0.01$ *vs* burn sera group

### 2.3 形态学变化,见图 2,3

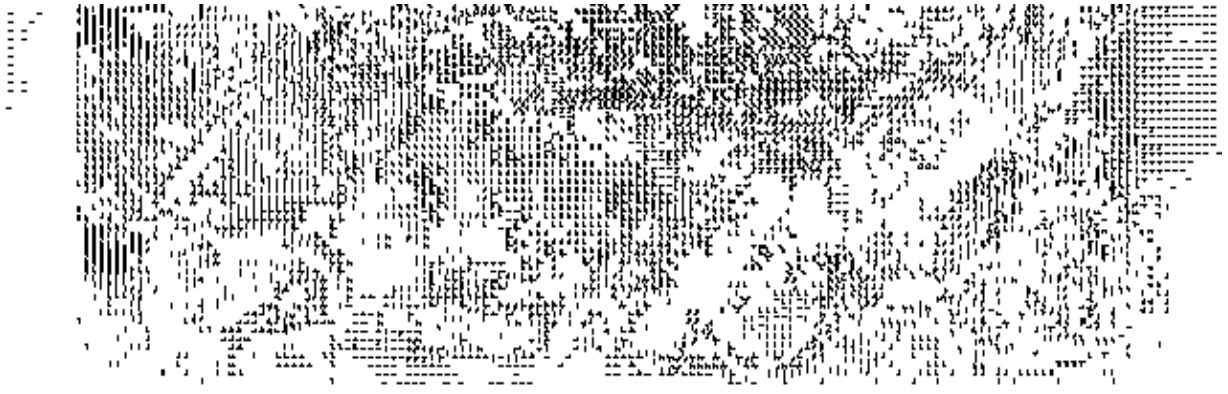


图 2 加入 LPS后 12 h,HGVEC形态学变化,HGVEC细胞核脱失—视野可见 3~4个脱核细胞 (卡马氏亮蓝染色× 200)

**Fig 2 Morphological changes of HGVEC culured in medium with 1μg/ml LPS**

some neuclei of HGVEC disappeared(average 3~4 cells/field) (Coomassie brilliant blue stain× 200)

图 3 加入烧伤血清后 12 h,HGVEC形态学变化,HGVEC胞核脱失—视野可见 1~2个脱核细胞 (卡马氏亮蓝染色× 200)

**Fig 3 Morphological changes of HGVEC cultured in medium with burn sera**

some nuclei of HGVEC disappeared(1~2 cells/field) (Coomassie brilliant blue stain× 200)

## 3 讨论

烧伤后血管内皮细胞损害是造成毛细血管通透性增高,进而引起微循环障碍甚至多器官功能障碍的病理基础。而细胞能量代谢紊乱,线粒体呼吸功能下降是 VEC损伤的重要原因。MTT法则是一种检测活细胞中线粒体脱氢酶的快速简便并具有高度灵敏性的方法,其原理是 MTT与活细胞中线粒体脱氢酶作用生成甲 结晶,结晶含量高低能很好的反映细胞群体中细胞活力与细胞的受损程度[3,4]。

内毒素对 HGVEC的活力有显著直接抑制作用,并呈明显的时间依赖性和浓度依赖性。本实验用不同浓度 LPS作用于 HGVEC 12 h,发现 1μg/ml以上的

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

LPS即可引起细胞活力明显下降.用 1μg/ml的 LPS作用于 HGVEC,细胞活力至 12 h开始显著降低。LPS可能是烧伤血清中的重要毒性成分之一,在引发烧伤后一系列病理生理变化和并发症中起着重要作用,是导致多脏器功能衰竭的主要原因之一[5]。目前关于 LPS对 VEC的损伤机制尚存有争议,主要焦点是由于内皮细胞不能表达内毒素受体 CD14,所以不能构成对细胞的直接损伤。另一种观点则认为 LPS与血浆中可溶性 CD14(sCD14)结合后可被 VEC吞噬进而造成 VEC损伤。我们用不同浓度 LPS和不同时间刺激 HGVEC,结果显示 LPS对 VEC的损伤不仅与 LPS浓度呈正相关,而且随时间推移不断加重,呈明显时间依赖性。同时在我们实验中有血清和无血清条件下用 1μg/ml LPS刺激 HGVEC,结果发现,细胞活力无明显差异,表明 LPS可以直接损伤 HGVEC,而且对细胞的损伤不一定依赖于血清中可溶性 CD14的存在,其损伤途径和损伤机制有待进一步研究。

烧伤血清对细胞的损伤作用比单纯 LPS作用强。我们过去研究表明烧伤血清对 VEC有损害作用,但烧伤血清中的损伤因素复杂,内毒素在其间所起的作用还不明确。本实验结果显示,烧伤血清和 LPS均可引起 HGVEC活力显著降低,时间分别为 6 h,12 h,其中 3 h和 6 h烧伤血清组细胞酶活力下降明显低于 LPS单独作用组,说明烧伤血清损伤 HGVEC比 LPS早,且损伤程度也大于 LPS组。由于烧伤血清对 HGVEC的损伤因素复杂,表现为一个多因素的综合效应,其机制还需进一步研究。

形态学变化:内毒素和烧伤血清对 HGVEC都有损伤作用,均在加入后 12 h出现变化。可见部分 HGVEC脱落,细胞体轻微肿胀,胞浆发生空泡变性,少数细胞微丝边界变得模糊不清,其特点是加入 LPS 12 h,部分 HGVEC核固缩和核裂解,细胞核发生丢失,但其胞体形态仍呈伸展状态,形成一贴壁的胞影。加入烧伤血清 12 h HGVEC也出现核固缩及细胞核消失的现象,但其数量较 LPS组少。

## 参考文献


1 罗向东,杨宗城,黎　鳌.家兔烧伤早期血管内皮细胞损伤的变化.第三军医大学学报,1995,17(4):279

2 杨宗城,罗向东.严烧伤后内皮细胞损伤及其在脏器损害发病中的作用.解放军医学杂志,1996,21(1):10

3 Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Imunol Method, 1986, 94(1-2): 57

4 Tim Mosmann. Rapid colori metric assay for celluar growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assaya. J Imunol Method, 1983, 65(1-2): 55

5 端　青,黄　策.细菌内毒素的研究现状.国外医学:微生物学分册,1997,20(4):30


(收稿:1998-02-26;修回:1998-07-14)

(编辑　张大春)

# Effects of endotoxin on cultured human glomerulus vascular endothelial cells*

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

**Abstract** Objective: To detect the effects of endotoxin on the viability and proliferation of human glomerulus vascular endothelial cells (HGVECs). Methods: After HGVECs were isolated and cultured, they were divided into the following four groups: ① The normally cultured group; ② LPS-with-different-concentration group; ③ LPS-at-different-time group; ④ burn-serum-stimulated group. MTT assay was used to determine the activity of mitochondrial dehydrogenase (MD). Results: In the second group, the viability and proliferation of HGVECs were significantly decreased ($P < 0.01$). When the LPS concentration was higher than 1μg/ml, the viability and proliferation of HGVECs were markedly dependent on LPS concentration and incubation time. In the third group, the viability and proliferation of HGVECs were increasingly inhibited by LPS and showed significant difference at 12 hours as compared with the fourth group. The viability and proliferation of HGVECs were decreased earlier in the fourth group than in the third and the degree was much lower than that in the first three groups. Conclusion: Both LPS and burn serum can damage HGVECs through decreasing the viability and proliferation of HGVECs. The degree of the damage of HGVECs by LPS is positively correlated to the concentration and time of LPS. The damage of HGVECs caused by LPS occurs later and is less severe than that by burn serum.

**Key words** endotoxin; glomerulus; vascular endothelial cell; MTT assay

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39290700-03

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