DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.007

内毒素、烫伤血清对培养的大鼠心脏微血管内皮细胞间连接的影响*

王晓军** 罗向东 梁光萍 罗 勤 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:探讨内毒素、烫伤血清对培养的心脏微血管内皮细胞(CMEC)间连接成分 VE-钙粘附分子表达的影响,研究内毒素对严重烧伤后内皮细胞的损伤机制。方法:① CMEC的分离培养;② 烫伤血清和内毒素刺激培养的 CMEC后 ELISA测定内皮细胞间连接成分 VE-钙粘附分子的表达。结果:CMEC经 20%的烫伤血清刺激后,6 h开始 VE-钙粘附分子的表达即有明显减少,是正常对照组的 65%,到 24 h仍在低的水平($P<0.01$);经内毒素(2 mg/L)刺激,从 1 h开始即有显著降低,是对照组的 80%,6 h降低到最低点,是对照组的 56%,后仍在低的水平($P<0.01$)。不同浓度的内毒素(0.5、1.0、1.5和 2.0 mg/L)对培养的 CMEC进行刺激,作用 12 h后,与正常对照组相比差异显著($P<0.05$和 $P<0.01$),分别为对照组的 88%、83%、80%和 47%,且 2.0 mg/L刺激组有更明显的降低;相同浓度的内毒素(均为 2.0 mg/L)刺激,有血清和不含血清组差异不明显($P>0.05$)。结论:烫伤血清和内毒素可以影响内皮细胞中 VE-钙粘附分子的表达,内毒素的影响有剂量的依赖关系,有无血清的存在对 VE-钙粘附分子表达的影响差异不明显。

关键词 内毒素;灼伤;心脏微血管;内皮细胞;细胞间连接;钙粘附分子;大鼠

中图法分类号 R644;R543.7

严重烧伤后早期最主要表现是由于内皮细胞屏障功能受损导致大分子物质和血细胞的渗出,引起组织、脏器的水肿,加重主要脏器的损害的受损,其病理基础是内皮细胞连接的破坏,所以内皮细胞的连接在严重创伤后的多脏器功能损害中具有极为重要的作用。本研究分离培养了含有高度微血管的脏器……心脏微血管内皮细胞(CMEC)[1]作为模型,动态观察了内毒素、烧伤血清对 CMEC间连接的特有成分 VE-钙粘附分子表达的影响,为早期的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

VE-钙粘附分子单抗(C3678)、胶原酶Ⅱ型(C6885)、内毒素(L2630)、M199培养液、培养瓶和 96孔培养板从 SIGMA公司购入。IgG/HRP(ZB-2301)、抗Ⅷ因子(ZA-0111)从中山公司购入,胰蛋白酶 Fluka公司分装。

1.2 心脏微血管内皮细胞的分离和培养

参考文献[2,3]的方法分离、培养心脏微血管内皮细胞。简述如下:雄性 Wistar大鼠 180~250 g,戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后打开胸腔,主动脉插管,用 KHBB缓冲液逆行冲洗约 5 min,剪去左心房、心耳及右心室,沿左室壁剪开,75%酒精灭活 30 s后去除心室壁外侧 1/4组织,剪碎后用 0.2%胶原酶消化 30 min,然后用 0.02%胰蛋白酶消化 10 min,用 50目和 200目滤网过滤,100× g,离心 10 min,用含有 20%胎牛血清的 M199培养液培养,4 h后用 M199洗去未附壁细胞,2~3 d换液 1次,2~3代细胞用于实验。细胞经抗Ⅷ因子及形态学鉴定证实绝大多数为血管内皮细胞。

1.3 Wistar大鼠烫伤血清的获得

Wistar大鼠 180~250 g,背部剃毛面积达 30%,用 100℃开水烫伤 18 s造成 30% TBSAⅢ度烫伤(病理证实),24 h后取血离心获得血清,56℃灭活补体,用 M199培养液配成 20%的烫伤血清。

1.4 VE-钙粘附分子在心脏微血管内皮细胞的表达

细胞生长为单层融合后用 0.25%胰蛋白酶-0.01% EDTA消化,调整细胞密度为 2×10^5个/ml接种于 96孔板(200 μl/孔),待细胞完全融合后弃上清,用 20%的烫伤血清和内毒素(2 mg/L)作用,分为正常对照组(含 20%的胎牛血清)和 1、4、6、12、24 h 5个时相点,及用 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L(含血清)、2.0 mg/L(不含血清)5个不同浓度的内毒素作用(孵育时间为 12 h),于 37℃二氧化碳培养箱内培养。依次加入下列试剂:0.25%戊二醛固定,3%过氧化氢,0.3% Triton X-100,3%小牛血清白蛋白,VE-钙粘附分子单抗(1∶500,4℃,过夜),IgG/HRP(1∶3000,37℃,1 h),每孔加入液体量为 100 μl,每次加液前用 0.01

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700-03

** 王晓军,男,35岁,主治医师,博士研究生

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

mol/L PBS漂洗 3次,每次 3 min.用磷酸构橼酸钠缓冲液,0.004% 邻苯二胺 (OPD)和 0.015%过氧化氢显色 (37℃,5 min),2 mol/L硫酸终止反应。在酶标仪 (波长 492 nm)上读取光密度 (D_A)值.用 PBS代替一抗孵育细胞,测定背景染色,用实验组的 D_A值减去背景值表示心脏微血管内皮细胞 VE钙粘附分子的表达.

1.5 统计学处理

以 $\bar{x}\pm s$表示,采用 t检验.

2 结果

2.1 内毒素和烫伤血清对培养的心脏微血管内皮细胞连接成分 (VE-cadherin)的影响

心脏微血管内皮细胞经 20%的烫伤血清刺激后,从 6 h开始其连接成分 -VE钙粘附分子的表达即有明显减少,是正常对照组的 65%,到 24 h一直维持在一个低的水平 ($P<0.01$);经内毒素 (2 mg/L,作用巨噬细胞的浓度)刺激,从 1 h开始即有显著降低,是对照组的 80%,6 h降低到最低点,是对照组的 56%,后维持在低的水平 ($P<0.01$),见表 1

表 1　内毒素 (2 mg/L)和烫伤血清对培养的心脏微血管内皮细胞 VE-Cadherin表达的影响 (D_{492},$\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Tab 1　The changes of expression of VE-cadherin in CMEC induced by endotoxin and burn sera(D_{492},$\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Groups	Control	Incubated times(t/h)				
		1	4	6	12	24
Burn sera	3.73± 0.38	3.08± 0.41	3.48± 0.07	2.43± 0.85**	2.37± 0.68**	2.18± 0.06**
Endotoxin	3.55± 0.31	2.85± 0.32**	2.31± 0.33**	2.00± 0.12**	1.93± 0.09**	1.83± 0.12**

** : $P<0.01$ *vs* control

2.2 不同浓度的内毒素对培养的心脏微血管内皮细胞连接成分 (VE-cadherin)的影响

用不同浓度的内毒素对培养的心脏微血管内皮细胞进行刺激,作用 12 h后的结果见表 2

表 2　不同浓度内毒素对培养的心脏微血管内皮细胞 VE钙粘附分子表达的影响 (D_{492},$\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Tab 2　The changes of expression of VE-cadherin in CMEC induced by different concentration of endotoxin(D_{492},$\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Control	Concentration of endotoxin(ρ_B/mg·L^{-1})				
	0.5	1.0	1.5	2.0(With sera)	2.0(Without sera)
1.86± 0.12**	4.35± 0.27	3.84± 0.56*	3.65± 0.11*	3.50± 0.55**	2.06± 0.10**

* : $P<0.05$,** : $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

本所对严重烧伤后内皮细胞的功能变化作了系统的研究,对其形态和连接亦进行过探讨[4],但严重烧伤后早期连接结构成分变化的研究国内外报道甚少。在内皮细胞的紧密、粘附、缝隙和韧带连接等几种方式中,粘附连接在心、肺等富含微血管的主要脏器中起非常重要的调控作用。它是一种细胞膜的连接,由 VE钙粘附分子介导,使细胞膜和胞内的细胞浆蛋白及肌动蛋白微丝构成的网相连,是内皮细胞连接 (特别是微血管内皮细胞连接)最重要的一种连接方式,它不仅通过连接结构的变化,同时调控细胞骨架结构的变化引起细胞的变形,调控大分子物质和血细胞的渗出[5]。本研究探讨不同刺激因素对粘附连接的影响.

3.1 烫伤血清和心脏微血管内皮细胞间连接

本实验结果发现,烫伤血清作用心脏内皮细胞 6 h,其连接成分 VE钙粘附分子的表达即有明显的降低,到 24 h仍处于低的表达水平,这和临床早期的大量大分子物质和血细胞的渗出,导致组织脏器的水肿和损害的加重是一致的。烫伤血清是含有烧伤后多种毒性成分、较接近活体上的多因素损伤,如凝血酶、组胺和多种细胞因子都可以影响内皮细胞间粘附连接蛋白 VE钙粘附分子表达的变化,引起微血管内皮细胞通透性的增加[6]。但这种变化是可逆的,具体机制尚需进一步探讨.

3.2 内毒素和心脏微血管内皮细胞间连接

本研究发现,用活化巨噬细胞的内毒素浓度 (2 mg/L)刺激内皮细胞,从 1 h开始即有 VE钙粘附分子表达的明显减低,6 h达到最低点,到 24 h仍处于最低水平。同时用不同浓度的内毒素刺激,其 VE钙粘附分子的表达随浓度的增加而减少,说明内毒素对 VE-钙粘附分子状态的影响有剂量的依赖关系。目前对内毒素损伤内皮细胞的机制尚有争论,有的认为内毒素只能引起内皮细胞的形态皱缩和表达与 PMN粘附的

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

粘附分子,而不能构成对内皮细胞的损伤,其损伤主要依赖于激活白细胞所致。另外一部分学者认为内毒素可以直接损伤内皮细胞,但由于内皮细胞不能表达内毒素受体(CD14),其对内皮细胞的损伤需要血浆中的可溶性 CD14的参与[7]。本实验证实内毒素可以影响内皮细胞粘附连接成分 VE-钙粘附分子的状态和表达,同时在研究中,我们用大剂量的内毒素(2 mg/L)在有血清和无血清存在的情况下观察到 VE-钙粘附分子无论有无血清存在,内毒素都可以明显降低 VE-钙粘附分子在内皮细胞中的表达($P > 0.05$)。由于 VE-钙粘附分子是一种跨膜蛋白,其膜内的相连蛋白有信号传递功能[8],是否由此可以找出内毒素损伤内皮细胞的新途径,尚需进一步探讨。

参考文献

1 Breier G, Breviario F, Caveda L *et al*. Molecular cloning and expression of muring vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. Blood, 1996; 87(2): 630

2 朱世辉,苏 波,唐洪泰等. SD大鼠心脏微血管内皮细胞的分离及培养. 第二军医大学学报, 1996; 17(增刊): 82

3 Nishida M, William W C, Mary E G *et al*. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. Am J Physiol, 1993; 264(2 pt 2): H639

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. 第三军医大学学报, 1995; 17(4): 279

5 Ranscht B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. Curr Opin Cell Biol, 1994; 6: 740

6 Rabiet M J, Plantier J L, Rival Y *et al*. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 1996; 16(3): 488

7 Yang Z, Breider M A, Carroll R C *et al*. Soluble CD_{14} and lipopolysaccharide binding protein from bovine serum enable bacterial linoplsaccharide-mediated cytotxicity and activation of bovine vascular endothelial cells *in vitro*. J Leukoc Biol, 1996; 58: 241

8 Lampugnani M G, Corada M, Caveda L *et al*. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: Differential association of Plakoglobin, β-catenin, and α-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). J Cell Biol, 1995; 129(1): 203

(收稿: 1998-01-20; 修回: 1998-03-18)

(编辑 王 红)

Effects of endotoxin and burn serum on intercellular junction of cultured rat cardiac microvascular endothelial cells*

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

Abstract **Objective**: To explore the effects of endotoxin and burn serum on the expression of endothelial VE-cadherin, an intercellular junctional component, of the isolated and cultured cardiac microvascular endothelial cells. **Methods**: ① The cardiac microvascular endothelial cells were isolated and cultured. ② ELISA was employed to determine the expression of endothelial VE-cadherin, after the cultured cardiac microvascular endothelial cells were stimulated with burn serum and endotoxin. **Results**: After the stimulation by 20% burn serum, the expression was obviously decreased from the 6th h ($P < 0.01$) and remained low at the 24th h postburn ($P < 0.01$). After the stimulation of 2 mg/L endotoxin, the expression was markedly decreased from the 1st h, reached its valley at 6th h and remained low thereafter postburn ($P < 0.01$). The cultured cardiac microvascular endothelial cells were stimulated by different concentrations of endotoxin for 12 hours. The results showed that the expressions with endotoxin at concentrations of 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/L were different from that in the control ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), i.e. 88%, 83%, 80% and 47% of that in normal respectively. Under the action of the same concentration of endotoxin, no marked difference was found between the expression in the sample with and without serum ($P > 0.05$). **Conclusion**: The burn serum and endotoxin exert effects on the expression of VE-cadherin of the endothelial cells and endotoxin does this in a dose-dependent manner. The serum stimulation is not an important factor for the expression.

Key words endotoxin; burn; cardiac microvascular endothelial cell; intercellular junction; VE-cadherin; rat

* 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