

脂多糖诱导肺微血管内皮细胞 SSeCKS mRNA 表达的研究

李惠 孙耕耘 费黎明 沈继龙

【摘要】 目的 研究脂多糖(LPS)对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞(PMVEC)中 Src 抑制的蛋白激酶 C 底物(SSeCKS)mRNA 表达的影响,以及甲泼尼龙对其的干预作用。方法 体外培养大鼠 PMVEC,根据与 LPS 孵育时间和 LPS 剂量不同随机分组,并用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 PMVEC 中 SSeCKS mRNA 的表达变化。结果 正常情况下,PMVEC 中 SSeCKS mRNA 低表达。LPS 在体外可诱导 SSeCKS mRNA 的表达明显增高,表达水平变化与 LPS 呈剂量和时间依赖关系:LPS 孵育 1 h 后,PMVEC 中 SSeCKS mRNA 的表达量随 LPS 剂量增加而逐渐增高(正常对照组为 0.263 ± 0.033 ;LPS 0.1 mg/L 时为 0.529 ± 0.066 ,1 mg/L 时为 1.391 ± 0.048 ,10 mg/L 时为 2.339 ± 0.055 ,100 mg/L 时为 2.861 ± 0.069),组间比较差异有统计学意义($F=639.096, P<0.05$);10 mg/L 的 LPS 与 PMVEC 共用孵育,0.5 h SSeCKS mRNA 表达开始增高,1 h 时达峰值,之后逐渐降低,12 h 表达仍高于正常水平(正常对照组为 0.301 ± 0.022 ;LPS 0.5 h 为 1.617 ± 0.018 ,1 h 为 2.378 ± 0.031 ,3 h 为 2.148 ± 0.056 ,6 h 为 1.322 ± 0.042 ,12 h 为 0.772 ± 0.044),组间比较差异有统计学意义($F=726.346, P<0.05$)。甲泼尼龙干预后可显著抑制 LPS 诱导的 SSeCKS mRNA 表达增高(2.664 ± 0.104 比 $1.759 \pm 0.151, F=156.000, P<0.05$)。结论 ①LPS 可诱导大鼠 PMVEC 中 SSeCKS mRNA 表达上调,并呈剂量和时间的依赖关系,提示 SSeCKS 与 LPS 诱导的大鼠 PMVEC 损伤有关。②甲泼尼龙参与可抑制 LPS 诱导的 SSeCKS mRNA 表达增高。

【关键词】 脂多糖; 血管内皮细胞; 炎症; Src 抑制的蛋白激酶 C 底物; 大鼠

Studies on the expression of Src-suppressed C kinase substrate mRNA in pulmonary microvascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide LI Hui*, SUN Geng-yun, FEI Li-ming, SHEN Ji-long. * Department of Respiratory Medicine. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University. Hefei 230022, Anhui, China

Corresponding author: SUN Geng-yun (Email: sungengyun@tom.com)

【Abstract】 Objective To study the expression of Src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) mRNA in pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) induced by lipopolysaccharide (LPS), and the interfering effect of methylprednisolone sodium succinate. **Methods** Rat PMVEC (RPMVEC) were isolated and cultured in vitro, then grouped randomly according to different culture time and different dosage of LPS, and the expression of SSeCKS mRNA in RPMVEC of different groups were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Normally, the expression of the SSeCKS mRNA in RPMVEC was maintained on a low level, and it could be elevated by stimulation of LPS, and the changes in the expression exhibited in dosage and time dependent manner. After being stimulated with LPS for 1 hour, the extent of increase in SSeCKS mRNA in RPMVEC coincided with the increased dosage of LPS (control: 0.263 ± 0.033 ; LPS of 0.1 mg/L: 0.529 ± 0.066 ; LPS of 1 mg/L: 1.391 ± 0.048 ; LPS of 10 mg/L: 2.339 ± 0.055 ; LPS of 100 mg/L: $2.861 \pm 0.069, F=639.096, P<0.05$). When RPMVEC were stimulated with 10 mg/L of LPS, the expression of SSeCKS mRNA began to increase at 0.5 hour, peaked at 1 hour, then decreased gradually, and it remained high even at 12 hours (control: 0.301 ± 0.022 ; LPS 0.5 hour: 1.617 ± 0.018 ; 1 hour: 2.378 ± 0.031 ; 3 hours: 2.148 ± 0.056 ; 6 hours: 1.322 ± 0.042 ; 12 hours: $0.772 \pm 0.044, F=726.346, P<0.05$); After methylprednisolone sodium succinate had been given, the increase of SSeCKS mRNA induced by LPS is inhibited (2.664 ± 0.104 vs. $1.759 \pm 0.151, F=156.000, P<0.05$). **Conclusion** ① LPS could induce up-regulation of SSeCKS mRNA, the elevation is in time and dosage dependent manner. This indicate SSeCKS is related with LPS induced injury of RPMVEC. ② Methylprednisolone sodium succinate inhibit the increase of SSeCKS mRNA induced by LPS.

【Key words】 lipopolysaccharide; vascular endothelial cell; inflammation; Src-suppressed C kinase substrate; rat

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670935)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院呼吸内科(李惠,孙耕耘,费黎明);安徽医科大学重要遗传基因资源利用教育部省部共建重点实验室,人畜共患病安徽省重点实验室(沈继龙)

通讯作者:孙耕耘,博士生导师,Email:sungengyun@tom.com

作者简介:李惠(1982-),女(汉族),安徽省人,硕士研究生,医师,Email:lihui8219@sina.com.

已知急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)是临床常见的危重症^[1],肺微血管内皮细胞(PMVEC)受损、肺微血管通透性增高是其重要的病理特征。PMVEC 细胞骨架蛋白含量、分布及功能的变化引起 PMVEC 形态和收缩性的改变,是不同炎症因子导致肺微血管通透性增高的最后共同通路。Src 抑制的蛋白激酶 C 底物(SSeCKS)是一种细胞骨架蛋白,自 1995 年首次被发现至今^[2],对其研究多着重于在肿瘤发生中的作用,而对其在血管通透性调控中的作用报道较少。研究表明,SSeCKS 也是一种炎症反应蛋白,内毒素模型小鼠肺、肾、肝脏等多处组织中 SSeCKS 表达均增加^[3]。革兰阴性(G⁻)菌感染后 ALI/ARDS 高危因素首位^[4],内毒素脂多糖(LPS)是 G⁻菌感染致 ALI/ARDS 的重要物质,可诱导大鼠 PMVEC 单层通透性显著增加^[5]。本实验通过体外培养大鼠 PMVEC,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测不同剂量 LPS 诱导大鼠 PMVEC 后 SSeCKS 的表达变化,并观察甲泼尼龙的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器:Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)干粉及胎牛血清(Hyclone,美国),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的植物血凝素(PHA)、LPS(Sigma,美国),总 RNA 提取试剂盒、鸟成髓细胞性白血病病毒(AMV)逆转录试剂盒、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP, Promega, 美国),Taq 酶、SSeCKS PCR 引物、DNA DL2000 Marker(TaKaRa,日本),甲泼尼龙(辉瑞制药比利时公司,美国),其余试剂均为国产分析纯试剂自行配制;Wistar 大鼠,普通级(安徽安立试验动物公司);荧光显微镜(Leica,德国),梯度基因扩增仪(BIOMETRA,德国),凝胶图像采集与分析系统(捷达 801,江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.2 PMVEC 的分离培养及鉴定

1.2.1 PMVEC 的分离培养:取体重约 120 g 的健康雄性 Wistar 大鼠 1 只,用体积分数为 10%的水合氯醛(300 mg/kg)腹腔内注射麻醉,同时注射肝素钠 3 kU。双侧颈动脉放血活杀动物,迅速打开胸腔,经右心灌注 DMEM 培养基至双肺发白,取出肺脏置 DMEM 培养基中;充分漂洗肺脏后,去脏层胸膜,取表面肺组织,切成约 1 mm³ 大小的组织块,均匀放置在细胞培养瓶中,间距为 1 cm,倒置放在体积分数为 5%的二氧化碳(CO₂)孵箱中孵育 2 h;加入含体积分数为 10%胎牛血清、100 kU/L 青霉素、

100 kU/L 链霉素的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂、湿度为 95%~100%的孵箱内培养 60 h 后去除组织块。3~4 d 更换一次培养液,培养至细胞单层 80%~90%汇合时用质量分数为 0.25%的胰蛋白酶消化后 1:2 传代,将第 2~5 代细胞用于实验。**1.2.2 PMVEC 的鉴定:**倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长特性,并进行荧光标记的 PHA 结合试验。细胞消化后加 2~3 滴细胞悬液于盖玻片上,稳定贴壁后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,潮干,冷丙酮固定 5~10 min,干燥,加荧光标记的 PHA(25 mg/L)避光孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,干燥后树脂封片,在荧光显微镜下观察。

1.3 RT-PCR 检测 LPS 诱导 PMVEC mRNA 的表达及甲泼尼龙的干预作用

1.3.1 总 RNA 提取:取生长良好的 PMVEC,按不同 LPS 剂量(0.1、1、10 和 100 mg/L)于不同时间点(0.5、1、3、6 和 12 h)分组诱导。甲泼尼龙组在每瓶中加入 10 mg/L LPS 的同时加入 0.2 g/L 的甲泼尼龙作用 1 h。另设正常对照组,每组 4 瓶细胞。终止 LPS 作用后用 PBS 漂洗 2 次,吸净细胞瓶中的液体,按总 RNA 提取试剂盒中说明书所示步骤提取总 RNA。

1.3.2 cDNA 合成:取溶于无核酶水中的 RNA 模板 5 μl,70 ℃水浴 10 min 后冰浴 5 min,加入下列试剂建立逆转录体系:无核酶水 4.9 μl、10×Buffer 缓冲液 2 μl、MgCl₂ 4 μl、dNTP 2 μl、随机引物 1 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、AMV 逆转录酶 0.6 μl。混匀后瞬时离心,室温下 10 min,42 ℃水浴 60 min,95 ℃水浴 5 min,冰水中 5 min,-20 ℃保存备用。

1.3.3 PCR 扩增:根据 GenBank 提供的 SSeCKS 基因已知序列(AY695056),由 Primer Premier 5.0 软件设计 CDS 区引物序列:上游 5'-AATCCATCC CAATCATAGTAAC-3',下游 5'-TCTCAAGGTC CCAACAGC-3'。以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照,β-actin 引物序列:上游 5'-ATCCATCCCAATC ATAGTAAC-3',下游 5'-CTCAAGGTCCCAACA GC-3'。PCR 反应体系为 20 μl,其中含 cDNA 1 μl、10×Buffer 缓冲液 2.5 μl、10 mmol/L 4×dNTP 0.5 μl、Taq 酶 0.13 μl、引物各 0.5 μl。扩增条件为:95 ℃ 5 min 预变性,95 ℃ 1 min、52 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,循环 30 次,72 ℃延伸 10 min。

1.3.4 PCR 产物的电泳分析:配制质量分数为 1%的琼脂糖凝胶(内含溴化乙锭),取 PCR 产物 5 μl,与 6×上样缓冲液 1 μl 充分混匀后上样,DNA

Marker 5 μ l, 90 V 电压电泳 30 min, 结果用凝胶成像分析系统紫外分光成像, 记录积分吸光度(A)值。以 β -actin mRNA 作为内参照进行校正, 各样本的基因表达量用该样本扩增后产物在凝胶上条带的 A 值与 β -actin 基因条带的 A 值相比, 以其比值进行半定量表示。

1.4 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 多组数值变量资料间比较用单因素方差分析, 先进行方差齐性检验和正态检验, 不符合者进行相应变量变换(对数变换)后再进行方差分析; 差异显著性检验用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养: 观察体外培养的 PMVEC, 可见细胞从组织块游出时多为类圆形或多边形, 大小均匀, 胞核清晰, 胞质丰富(图 1), 生长 2~3 周时出现单层汇合, 呈铺路石样排列, 有接触抑制现象(即细胞完全单层汇合后停止分裂), 与荧光标记的 PHA 结合呈黄绿色荧光。



图 1 大鼠原代 PMVEC 镜下观察结果($\times 100$)

2.2 SSeCKS mRNA 的表达

2.2.1 不同剂量 LPS 诱导 PMVEC 后 SSeCKS mRNA 表达的变化(图 2, 表 1): LPS 孵育 1 h 后, PMVEC 中 SSeCKS mRNA 表达量随孵育浓度 0~100 mg/L 而逐渐增高, LPS 100 mg/L 时表达最高(P 均 < 0.05)。

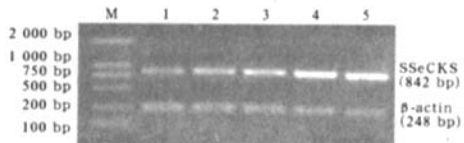


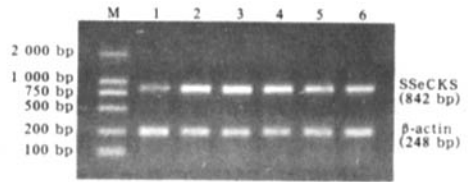
图 2 不同剂量 LPS 与 PMVEC 孵育 1 h 后 SSeCKS mRNA 的表达

表 1 不同剂量 LPS 与 PMVEC 孵育 1 h 后 SSeCKS mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	样本数	SSeCKS mRNA 表达
正常对照组	4	0.263 \pm 0.033
LPS 0.1 mg/L 组	4	0.529 \pm 0.066 ^a
LPS 1 mg/L 组	4	1.391 \pm 0.048 ^{ab}
LPS 10 mg/L 组	4	2.339 \pm 0.055 ^{abc}
LPS 100 mg/L 组	4	2.861 \pm 0.069 ^{abcd}
F 值		639.096
P 值		< 0.05

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 0.1 mg/L 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS 1 mg/L 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 LPS 10 mg/L 组比较, ^d $P < 0.05$

2.2.2 10 mg/L LPS 诱导 PMVEC 后不同时间 SSeCKS mRNA 表达的变化(图 3, 表 2): 10 mg/L LPS 与 PMVEC 共同孵育, 0.5 h SSeCKS mRNA 开始增高, 1 h 达高峰, 随后逐渐下降, 但至 12 h 表达水平仍高于正常水平(P 均 < 0.05)。



M: Marker; 1~6 依次为正常对照组, LPS 刺激 0.5、1、3、6 和 12 h 组

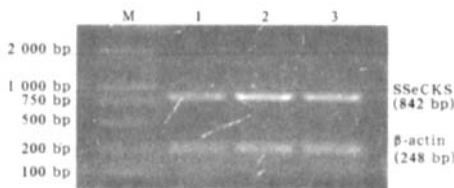
图 3 10 mg/L LPS 与 PMVEC 孵育不同时间后 SSeCKS mRNA 的表达

表 2 10 mg/L LPS 与 PMVEC 孵育不同时间后 SSeCKS mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	样本数	SSeCKS mRNA 表达
正常对照组	4	0.301 \pm 0.022
LPS 刺激 0.5 h 组	4	1.617 \pm 0.018 ^a
LPS 刺激 1 h 组	4	2.378 \pm 0.031 ^{ab}
LPS 刺激 3 h 组	4	2.148 \pm 0.056 ^{abc}
LPS 刺激 6 h 组	4	1.322 \pm 0.042 ^{abcd}
LPS 刺激 12 h 组	4	0.772 \pm 0.044 ^{abcd}
F 值		726.346
P 值		< 0.05

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 刺激 0.5 h 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 LPS 刺激 1 h 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 LPS 刺激 3 h 组比较, ^d $P < 0.05$

2.2.3 甲泼尼龙对 LPS 诱导 PMVEC 后 SSeCKS mRNA 表达的影响(图 4, 表 3): LPS 诱导 PMVEC 后 SSeCKS mRNA 表达显著增高($P < 0.05$); 0.2 g/L 甲泼尼龙与 10 mg/L LPS 共同孵育 1 h 后, 可显著降低 SSeCKS mRNA 表达($P < 0.05$)。



M:Marker;1~3 依次为正常对照组、LPS 组和甲泼尼龙组

图 4 甲泼尼龙对 LPS 诱导 PMVEC 后 SSeCKS mRNA 表达的干预作用

表 3 甲泼尼龙对 LPS 诱导 PMVEC 后 SSeCKS mRNA 表达的干预作用(x±s) A 值

组别	样本数	SSeCKS mRNA 表达	A 值
正常对照组	4	0.420±0.029	
LPS 组	4	2.664±0.104 ^a	
甲泼尼龙组	4	1.759±0.151 ^{ab}	
F 值		156.000	
P 值		<0.05	

注:与正常对照组比较,^aP<0.05;与 LPS 组比较,^bP<0.05

3 讨论

研究肺微血管通透性的调节机制对寻找 ALI/ARDS 的防治措施具有重大意义。PMVEC 衬附在肺微血管腔内面,其连续性和完整性是维持正常肺微血管通透性的基础。PMVEC 是内毒素作用的主要靶细胞,LPS 损伤 PMVEC 时,细胞骨架蛋白含量、分布和功能的变化可引起 PMVEC 收缩性增强、细胞间隙形成,导致血管通透性增高^[6]。F-肌动蛋白(F-actin)是构成血管内皮细胞骨架的主要成份,它的解聚、重排与内皮细胞收缩性密切相关^[7],因此,在维持血管通透性方面起着重要作用。

LPS 是一种强烈的致炎因子。本课题组既往的研究发现,LPS 在体外即可直接导致培养的大鼠 PMVEC 损伤,表现为大鼠 PMVEC 单层通透性增高,且通透性的增高与 LPS 剂量和作用时间呈正相关^[8];同时出现大鼠 PMVEC 中央 F-actin 发生解聚、密度减低^[9]。SSeCKS 是一种细胞骨架蛋白,主要在啮齿类动物中表达,在人类中亦有表达,被称为 gravin^[1]。SSeCKS 上具有 F-actin 的结合位点^[10],故可能通过调节 F-actin 的解聚、重排调控大鼠 PMVEC 单层通透性。文献报道,在小鼠的内毒素损伤模型中,肺组织中的 SSeCKS 表达增加。体外培养大鼠 PMVEC 发现,在正常情况下 PMVEC 低表达 SSeCKS,LPS 可诱导 SSeCKS mRNA 过度表达,提示 SSeCKS 基因参与到 LPS 诱导的炎症反应过程中,表达变化呈剂量和时间依赖关系,SSeCKS 的表

达强度可能与炎症所致的 PMVEC 损伤程度以及 PMVEC 单层通透性改变有关。

本研究还发现,甲泼尼龙可以降低 LPS 诱导的 SSeCKS mRNA 表达增高。有研究证实,LPS 诱导大鼠 PMVEC 单层通透性增加与 β-肾上腺素受体(β-AR)数目减少及活性下降有关^[11]。糖皮质激素可明显使大鼠肺组织中 β-AR 数目增多、活性增加^[12]。SSeCKS 上具有 β₂-AR 的结合位点^[10],β₂-AR 的活性增加可以增强其与 SSeCKS 的相互作用^[13]。甲泼尼龙是否通过增加细胞膜上 β₂-AR 数目、提高受体活性,从而抑制 LPS 诱导的 SSeCKS mRNA 表达增高,尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 景炳文. 急性呼吸窘迫综合征的临床表现与救治[J]. 中国危重病急救医学,2004,9(9):572-574.
- [2] Lin X, Nelson P J, Frankfort B, et al. Isolation and characterization of a novel mitogenic regulatory gene, 322, which is transcriptionally suppressed in cells transformed by src and ras [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(5): 2754-2762.
- [3] Kitamura H, Okita K, Fujikura D, et al. Induction of Src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) in vascular endothelial cells by bacterial lipopolysaccharide [J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50(2): 245-255.
- [4] Udobi K F, Childs E, Touijer K. Acute respiratory distress syndrome [J]. Am Fam Physician, 2003, 67(2): 315-322.
- [5] Morel N M, Petruzzo P P, Hechtman H B, et al. Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial cell contraction [J]. Inflammation, 1990, 14(5): 571-583.
- [6] Dudek S M, Garcia J G. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(4): 1487-1500.
- [7] Waschke J, Curry F E, Adamson R H, et al. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(3): H1296-H1305.
- [8] 张泓, 孙耕耘. 血管紧张素 I 及其受体拮抗剂对大鼠肺微血管内皮炎性损伤效应的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10): 608-610.
- [9] 孙耕耘, 肖贞良, 方传彪. 山莨菪碱对内毒素致肺微血管内皮细胞骨架变化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(2): 197-199.
- [10] Gelman I H, Lee K, Tomblor E, et al. Control of cytoskeletal architecture by the src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS [J]. Cell Motil Cytoskeleton, 1998, 41(1): 1-17.
- [11] 肖贞良, 孙耕耘, 黄碧琼, 等. 炎性损伤对大鼠肺微血管内皮细胞 β-受体的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(2): 100-102.
- [12] Mano K, Akbarzadeh A, Townley R G. Effect of hydrocortisone on β-adrenergic receptors in lung membranes [J]. Life Sci, 1979, 25(22): 1925-1930.
- [13] Tao J, Wang H Y, Malbon C C. Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the β₂-adrenergic receptor [J]. EMBO J, 2003, 22(24): 6419-6429.

(收稿日期:2007-10-20 修回日期:2007-12-22)

(本文编辑:李银平)