

• 论著 •

八肽缩胆囊素受体在血管内皮细胞中的表达及脂多糖的影响

平静 谷振勇 高峰 丛斌 凌亦凌

【摘要】 目的 观察八肽缩胆囊素受体(CCK-R)mRNA在人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 中的表达,并探讨内毒素脂多糖(LPS)对 CCK-AR、CCK-BR mRNA 表达的影响。方法 培养人脐静脉内皮细胞株 ECV-304,以 LPS 0.01、0.1、1、10 mg/L 孵育 ECV-304 2 h 或用 1 mg/L LPS 孵育 ECV-304 0.5、2、6、12 h,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CCK-AR、CCK-BR 的 mRNA 表达,并对扩增产物的特异性进行测序分析。结果 与空白对照组比较,0.01、0.1 及 1 mg/L LPS 孵育细胞 2 h 可剂量依赖性引起 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达明显升高(P 均 <0.05),其中 0.01 mg/L LPS 诱导 CCK-AR mRNA 效应不明显,但可明显诱导 CCK-BR mRNA 表达;与 1 mg/L LPS 组比较,10 mg/L LPS 孵育细胞 2 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达未继续出现明显升高(P 均 >0.05)。与空白对照组比较,1 mg/L LPS 孵育细胞 0.5~2 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达呈时间依赖性升高(P 均 <0.05);与 LPS 孵育 2 h 比较,1 mg/L LPS 孵育细胞 6 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达明显下降,但仍高于空白对照组(P 均 <0.05);与 LPS 孵育 6 h 比较,1 mg/L LPS 孵育细胞 12 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达进一步降低(P 均 <0.05),且与空白对照组比较已无显著差异(P 均 >0.05)。结论 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 在 ECV-304 中均有表达,LPS 可诱导 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达上调。

【关键词】 缩胆囊素; 脂多糖; 血管内皮细胞; 受体; 内毒素休克

The expression of cholecystokinin-octapeptide receptor in vascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide PING Jing, GU Zhen-yong, GAO Feng, CONG Bin, LING Yi-ling. Department of Forensic Medicine and Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China
Corresponding author: GU Zhen-yong, Email: zygusjz@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of cholecystokinin-octapeptide receptor (CCK-R) mRNA, and observe the effect of lipopolysaccharide (LPS) on CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA expression in ECV-304. **Methods** The human umbilical vein endothelial cell line ECV-304 was cultured and treated with LPS in dosage of 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L for 2 hours, or treated with LPS in dosage of 1 mg/L for 0.5, 2, 6, 12 hours. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to examine the expression of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA in ECV-304, and to analyse the sequences of the amplification products. **Results** Compared with control group, the expression of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA was significantly upregulated in a dose-dependence manner after incubated with 0.01, 0.1 and 1 mg/L LPS for 2 hours (all $P < 0.05$). However, the expression of CCK-AR mRNA showed no significant increase, while that of CCK-BR mRNA was increased, after being incubated with 0.01 mg/L LPS. The expressions of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA in the 10 mg/L LPS group showed no significant difference compared with 1 mg/L LPS group (both $P > 0.05$). The expression of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA was significantly upregulated in a time-dependence manner after incubated with 1 mg/L LPS from 0.5 hour to 2 hours compared with control group (all $P < 0.05$). After incubated with 1 mg/L LPS for 6 hours, the expression of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA was significantly decreased compared with 2-hour group, but was still higher than that of control group (both $P < 0.05$). Its expression was decreased further after being incubated with 1 mg/L LPS for 12 hours compared with the 6 hours group (both $P < 0.05$), but showed no significant difference compared with the control group (both $P > 0.05$). **Conclusion** Both CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA are expressed in ECV-304. LPS can up-regulate the expression of CCK-AR mRNA and CCK-BR mRNA.

【Key words】 cholecystokinin-octapeptide; lipopolysaccharide; vascular endothelial cell; receptor; endotoxic shock

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.09.011

基金项目:河北省自然科学基金项目(301351);教育部科技研究重点基金项目(204016)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学法医学与病理生理学教研室(平静现在右江民族医学院病理学教研室工作;

谷振勇现在苏州大学医学部法医学系工作)

通信作者:谷振勇,Email:zygusjz@126.com

内毒素休克是以血管功能紊乱、循环阻力降低及体循环血压进行性降低为主要病理特征。血管内皮细胞(VEC)单层覆盖于血管内膜表面,正常条件下广泛参与调节血管紧张度、免疫反应、脂质代谢及内皮下基质合成等生理活动。作为内毒素的主要靶细胞,VEC 在内毒素休克发生过程中具有十分重要的作用^[1]。八肽缩胆囊素(CCK-8)是机体缩胆囊素的主要功能片段,具有明确的抗休克作用。研究已证实,CCK 通过其受体 CCK-R 发挥抗休克作用^[2]。CCK-R 在体内广泛分布,然而 VEC 是否存在 CCK-R 及其具体表达类型迄今尚未明了,在内毒素脂多糖(LPS)刺激作用下 CCK-R 的变化趋势亦不清楚。本实验中以人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 为研究对象,观察 CCK-A 受体(CCK-AR)和 CCK-B/胃泌素受体(CCK-BR)的 mRNA 表达,并探讨 LPS 对 CCK-R 表达变化的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料:人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC,武汉),LPS(*E. coli*)、CCK-8 均为美国 Sigma 公司产品,TRIzol 试剂购自赛百胜基因技术公司,CCK-AR、CCK-BR 及 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由北京奥科生物公司合成,500 bp DNA ladder 购自北京天为时代生物公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 ECV-304 培养及预处理:用含体积分数为 10%胎牛血清、100 mg/L 链霉素、100 kU/L 青霉素的 RPMI 1640 培养液培养 ECV-304 细胞,培养条件:37 °C、体积分数为 5%的 CO₂ 和 95%的 O₂。用质量分数为 0.25%的胰蛋白酶消化传代,待细胞长到每瓶 1×10⁶ 个时,量效组用溶剂或 LPS 0.01、0.1、1、10 mg/L 分别孵育 ECV-304 细胞 2 h,时效组用溶剂或 LPS(1 mg/L)分别孵育 ECV-304 细胞 0.5、2、6、12 h。

1.3 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CCK-R mRNA 表达

1.3.1 ECV-304 总 RNA 的提取及鉴定:TRIzol 一步法提取细胞总 RNA。取总 RNA 提取液各 1 μ l 行纯度与完整性鉴定;取总 RNA 20 μ g 经 1%琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳鉴定。

1.3.2 RT-PCR 检测 CCK-R mRNA 表达:取总 RNA 4 μ g,在鸟类成髓细胞性白血病病毒(AMV)反转录酶作用下,用随机引物合成 cDNA。在含有 2 mmol/L MgCl₂、4 U Taq DNA 聚合酶及 25 pmol CCK-R 特异性引物反应体系中进行 cDNA PCR,

β -actin 为内参照。CCK-AR 特异性引物:上游引物 5'-CATGCTCATCGTCATCGTGCT-3',下游引物 5'-GGCTGTACGAGAACCTGGACA-3'(320 bp);CCK-BR 特异性引物:上游引物 5'-GTTGCTGGTGATCGTTGTGC-3',下游引物 5'-CCAGTGTGCTGATGGTGGTGT-3'(332 bp); β -actin:上游引物 5'-CATCCTGCGTCTGGACCT-3',下游引物 5'-TCAGGAGCAATGATCTTG-3'(480 bp)。循环参数:变性 95 °C 30 s,复性 59 °C 1 min (CCK-AR) 或 58 °C 1 min (CCK-BR),延伸 72 °C 1 min,循环 28 次后进一步延伸 72 °C 7 min。取 10 μ l PCR 反应产物经 1.8%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳后,紫外灯下观察结果,在计算机中,使用 Gel-pro 凝胶分析软件对电泳谱带进行半定量分析,用任意单位(AU)表示凝胶谱带的面积×荧光强度值,CCK-AR/ β -actin、CCK-BR/ β -actin 比值的 AU 代表各自的 mRNA 相对表达水平。

1.4 DNA 测序:对 RT-PCR 方法所扩增出来的特异性 CCK-AR 和 CCK-BR 产物进行测序分析,所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96,测序试剂为 BigDye terminator v 2.0,由上海生工生物工程技术服务有限公司测序部操作完成。

1.5 统计学分析:使用 SPSS 统计分析软件,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组均数比较行单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差法(LSD)进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ECV-304 中 CCK-AR 和 CCK-BR 的 mRNA 表达:在 ECV-304 中存在着 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达,CCK-AR mRNA 扩增产物大小为 320 bp,CCK-BR mRNA 扩增产物大小为 332 bp。

2.2 DNA 测序结果:将 CCK-AR 和 CCK-BR 测序所得的碱基序列经过 Blast 比对,与 Genbank 中 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 序列完全吻合。

2.3 LPS 对 ECV-304 中 CCK-R mRNA 表达的量效作用(图 1):与空白对照组比较,用 0.01、0.1、1 mg/L LPS 孵育细胞 2 h 可剂量依赖性引起 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达明显升高(P 均 <0.05),其中 0.01 mg/L LPS 诱导 CCK-AR 的 mRNA 效应不明显,但可明显诱导 CCK-BR 的 mRNA 表达;与 1 mg/L LPS 组比较,10 mg/L LPS 孵育细胞 2 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达未继续出现明显升高(P 均 >0.05)。

2.4 LPS 对 ECV-304 中 CCK-R mRNA 表达的时

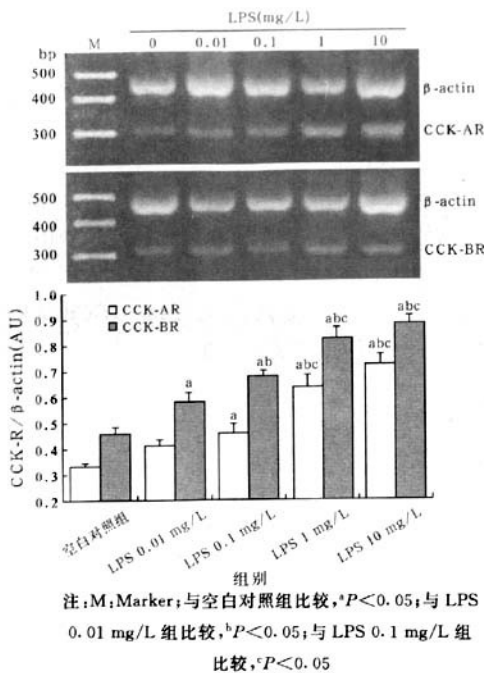


图1 不同剂量 LPS 孵育 ECV-304 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 表达

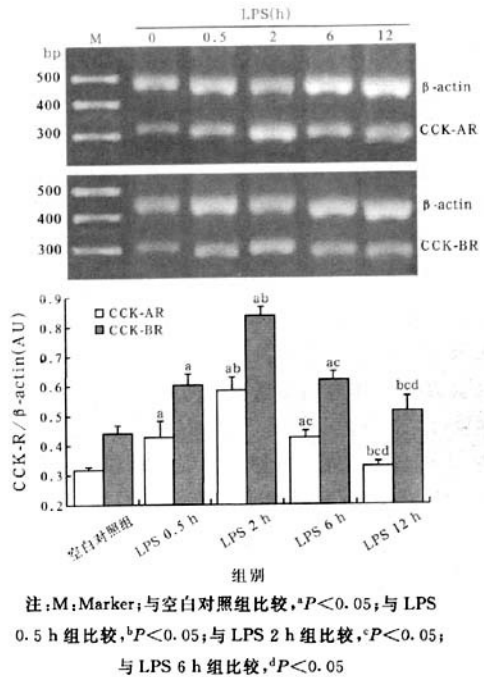


图2 LPS 孵育 ECV-304 不同时间 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 表达

效作用(图 2):与空白对照组比较,1 mg/L LPS 孵育细胞 0.5~2 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达呈时间依赖性升高(P 均 <0.05);与 LPS 孵育细胞 2 h 比较,孵育细胞 6 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达明显下降,但仍明显高于空白对照组(P 均 <0.05);与 LPS 孵育细胞 6 h 比较,孵育 12 h CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达进一步降低(P 均 <0.05),且与空白对照组比较差异已无统计学意义(P 均 >0.05)。

3 讨论

VEC 作为体内最大的内分泌器官,在机体的稳态中发挥重要作用,它通过释放一氧化氮(NO)、前列环素和内皮素等以维持血管舒缩功能的动态平衡。ECV-304 细胞株是由膀胱癌上皮细胞与人脐静脉内皮细胞融合建立的永生细胞系,最初是由日本东京医学研究中心于 1990 年提出,相关研究表明,ECV-304 在药理和病理生理学方面具有 VEC 模型研究价值^[3]。本实验中利用人脐静脉内皮细胞株 ECV-304,观察 CCK-AR 和 CCK-BR 的 mRNA 表达,并探讨 LPS 对 CCK-R 表达变化的影响。

本室的系列研究表明,在内毒素休克大鼠整体实验中,CCK-8 可提高平均动脉压(MAP),降低肺动脉高压,减轻肺组织的病理变化,减少肺内中性粒

细胞聚集,对抗 LPS 导致的离体肺动脉异常反应性变化,提高生存率;使用 CCK-R 拮抗剂丙谷胺后则明显延缓内毒素休克大鼠 MAP 的恢复,并使死亡率明显上升,提示 CCK 通过其受体发挥抗休克作用。离体血管功能实验表明,CCK-8 减轻 LPS 诱导的兔离体血管反应性异常变化,保护 VEC,改善内皮依赖性舒张血管反应,使用 CCK-R 拮抗剂或 CCK 抗血清后上述作用明显减弱^[4]。在分子水平,CCK-8 可抑制 LPS 引起的 ECV-304 诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达增高及 NO 生成增多^[5],抑制 LPS 诱导 ECV-304 细胞核转录因子- κ B(NF- κ B) p65 蛋白表达及核移位,从而抑制性调节 LPS 诱导的 NF- κ B 信号转导通路^[6],以及抑制 LPS 诱导牛肺动脉内皮细胞 NO 生成增多,减少 NO 衍生物过氧亚硝基阴离子的生成,减轻 VEC 氧化损伤及细胞凋亡^[7]。预先注入 CCK-8 可使 LPS 攻击小鼠血清及肺组织白细胞介素-4(IL-4)、IL-10 等抗炎细胞因子的表达进一步增加,参与机体抗炎反应过程^[8]。

CCK-R 是细胞膜上的一类糖蛋白,根据对其配基亲和力差异、分布及分子结构的不同将 CCK-R 主要分为 CCK-AR、CCK-BR 两种亚型。丛斌等^[9]用 CCK-AR、CCK-BR 及 CCK-8 特异性引物得到的扩增产物和 γ -³²P-ATP(AP) 标记的 3 种特异性

探针对 CCK-AR、CCK-BR 及 CCK-8 3 种扩增产物进行杂交,发现 CCK-AR 和 CCK-BR 在支气管黏膜上皮细胞、VEC、肺泡上皮细胞以及巨噬细胞内均有表达。本实验结果显示 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 在 ECV-304 中均有表达,在 LPS 刺激 ECV-304 后 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 与空白对照组相比均显著增高。与空白对照组比较,0.01、0.1 及 1 mg/L LPS 孵育细胞 2 h 可剂量依赖性引起 CCK-AR 及 CCK-BR 的 mRNA 表达明显升高(其中 0.01 mg/L LPS 诱导 CCK-AR mRNA 效应不明显)。CCK-R mRNA 表达增加及内毒素休克时血中 CCK 含量升高,可认为是机体的一种自我保护机制,LPS 在损伤机体的同时亦启动了机体自身的保护性反应。LPS 诱导 ECV-304 中 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 表达上调的原因尚不清楚,以往研究提示,LPS 可诱导 CCK 合成增加,增加的 CCK 对其受体产生正向调节作用而使受体上调;LPS 与受体结合后引起 CCK-R mRNA 表达增加的异种调节;LPS 通过引起快速反应基因表达增加,实现对 CCK-R mRNA 表达的上调作用^[10]。

综上所述,CCK-8 是抗内毒素休克的重要肽类物质,其抗休克的分子机制复杂,可能由 CCK-R 介导了其抗休克的生物学效应。在 ECV-304 中存在着 CCK-AR 与 CCK-BR 的 mRNA 表达,LPS 可诱导其表达上调。

参考文献

- [1] Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA, et al. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(5): C1587-1595.
- [2] 凌亦凌, 王乐丰. 八肽胆囊收缩素抗内毒素休克的实验研究. *生理学报*, 1996, 48(4): 390-394.
- [3] 吴其夏, 邱劲. ECV304 细胞可作为一般模型、工具或靶用于生物医学和药理学研究. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(1): 139-142.
- [4] 丛斌, 凌亦凌, 谷振勇, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导离体兔肺动脉反应性变化的影响. *中国病理生理杂志*, 1999, 15(6): 484-487.
- [5] 闫俊, 谷振勇, 王杏云, 等. 八肽缩胆囊素对脂多糖诱导血管内皮细胞诱生型一氧化氮合酶表达变化的抑制作用. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2): 96-100.
- [6] 高峰, 谷振勇, 平静, 等. 八肽缩胆囊素调节脂多糖诱导 ECV-304 细胞核转录因子- κ B 表达的受体机制研究. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(3): 150-153.
- [7] 谷振勇, 凌亦凌, 王杏云, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖诱导肺动脉内皮细胞凋亡的抑制作用. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(12): 724-727.
- [8] 倪志宇, 闫玉仙, 丛军, 等. 八肽胆囊收缩素对脂多糖攻击小鼠抗炎症细胞因子表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(10): 480-583.
- [9] 丛斌, 凌亦凌, 谷振勇, 等. 胆囊收缩素-A 及 B 受体 mRNA 在 SD 大鼠肺组织中的表达. *中国实验动物学杂志*, 1999, 9(2): 73-77.
- [10] 许顺江, 高维娟, 姚玉霞, 等. 脂多糖对大鼠肺间质巨噬细胞 CCK 受体 mRNA 表达的影响. *第二军医大学学报*, 2003, 24(11): 1208-1211.

(收稿日期: 2009-07-08)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

人体体位对腹压的影响

高腹压是导致重症患者病死率升高的一种常见原因,但体位对腹压是有影响的。为了能够根据腹压变化进行及时正确的临床判断,美国的医学研究人员对体位和腹压的具体关系进行了深入研究。研究人员对分布于 12 个重症监护病房(ICU)中的 132 例有高腹压和腹腔间隔综合征危险的重症患者进行了持续观察,以囊内压力测量技术分别监测患者在平卧位及床头抬高 15°和 30°时的腹压,连续 4 h,零位关系点设定在腋中线与髂棘水平交汇处。监测结果显示,不同床头角度时的平均腹压存在明显差异($P < 0.0001$);与平卧位相比,床头抬高 15°时腹压升高 1.5 mm Hg(1.3~1.7 mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa),抬高 30°时腹压升高 3.7 mm Hg(3.4~4.0 mm Hg)。科研人员认为,床头抬高能够导致腹压的急剧升高;为了能够根据腹压的不同变化对病情影响进行正确判断,有必要对体位改变过程中的腹压进行连续监测。

杨明星, 编译自《Crit Care Med》, 2009, 37(7): 2187-2190; 胡森, 审校

糖尿病和胰岛素与急性肺损伤的关系

以往研究发现,胰岛素水平和血糖控制在严重疾病过程中具有调节作用。最近,美国的科研人员检索了糖尿病与急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)之间关系的文献,分析了糖尿病患者肺损伤后血糖代谢的特点以及糖尿病治疗的作用。研究者在 MEDLINE 或 PubMed 上查询自 2008 年初至 10 月 1 日的文献,使用的检索词为: ALI、ARDS、高血糖、糖尿病、胰岛素、羟甲基戊二酸单腺辅酶 A 还原酶抑制剂(他汀类药物)、血管紧张素转换酶抑制剂和过氧化物酶增殖体活性受体,包括这些检索词的混合形式。重点收集了以人类和动物进行研究的的数据,包括糖尿病和 ALI;高血糖和 ALI;糖尿病患者血糖的代谢特点和 ALI;糖尿病治疗和 ALI。研究者从临床和实验室研究的结果认为,糖尿病患者应避免发生 ALI/ARDS,两者联系途径可能和高血糖对炎症反应的影响、代谢异常及患者治疗因素间的相互作用有关,还需进一步深入研究。

杨明星, 编译自《Crit Care Med》, 2009, 37(8): 2455-2464; 胡森, 审校