

• 论著 •

组蛋白去乙酰化酶抑制剂对内毒素所致
血管内皮细胞损伤的影响

何慧敏 李昂 张淑文 段美丽

【摘要】 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂(HDACi)对内毒素所致血管内皮细胞损伤的影响,为临床脓毒症相关血管内皮细胞损伤后的保护提供实验依据。方法 体外培养血管内皮细胞特性的 EAhy926 细胞株。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测不同剂量脂多糖(LPS, 50、100、500、1 000 ng/ml)对血管内皮细胞的增殖作用。选择细胞存活率较高的 LPS 剂量,加入 100 μ g/ml HDACi 曲古抑霉素(TSA),采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 LPS 刺激内皮细胞 3、6、9、12、24 h 时细胞内 Toll 样受体 4 (TLR4)和 HDAC2 的蛋白表达。结果 与空白对照组比较,100 ng/ml LPS 刺激内皮细胞 9、12、24 h 后,TLR4 蛋白表达明显上调(1.01 \pm 0.14、1.25 \pm 0.16、1.20 \pm 0.19 比 0.34 \pm 0.05,均 P <0.01);刺激 12 h、24 h 时 HDAC2 蛋白表达有所上调(1.14 \pm 0.10、1.20 \pm 0.04 比 0.17 \pm 0.02,均 P <0.01)。与 LPS 组相比,TSA 组刺激 12 h 时 TLR4 蛋白表达明显下调(0.37 \pm 0.07 比 1.25 \pm 0.16, P <0.05),24 h 时 TLR4 蛋白表达无明显差异(0.37 \pm 0.10 比 1.20 \pm 0.19, P >0.05);TSA 组各时间点 HDAC2 蛋白表达下调,未见条带显现。结论 LPS 刺激血管内皮细胞后可上调内皮细胞 TLR4 及 HDAC2 的蛋白表达;而 TSA 可以下调 LPS 刺激内皮细胞后的 TLR4 表达。

【关键词】 Toll 样受体 4; 组蛋白去乙酰化酶; 曲古抑霉素; 内毒素; 血管内皮细胞

The effects of a histone deacetylase (HDAC) inhibitor on endotoxin-induced endothelial cell injury HE Hui-min, LI Ang, ZHANG Shu-wen, DUAN Mei-li. Department of Critical Care Medicine, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
Corresponding author: DUAN Mei-li, Email: beauty9659@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To examine the effects of HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) on lipopolysaccharide (LPS) induced genes expression in cultured endothelial cells in order to understand the mechanisms involved in the protection of endothelial cells against vascular endothelium injury during endotoxemia. **Methods** Cultured EAhy926 cells (a cell line with the features of vascular endothelial cells) were treated with LPS at 100 ng/ml [the dose was chosen for minimum impact on cell survival as determined using Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay], or LPS and TSA (100 μ g/ml). The expressions of toll-like receptor 4 (TLR4) and HDAC2 were measured by Western blotting 3, 6, 9, 12 and 24 hours after the beginning of the treatment. **Results** The expressions of TLR4 (as measured by densitometry) was found significantly higher (P <0.01) in LPS treated cells (1.01 \pm 0.14, 1.25 \pm 0.16, 1.20 \pm 0.19) 9, 12 and 24 hours after the beginning of the treatment as compared to untreated cells (0.34 \pm 0.05); The expression of HDAC2 was also found significantly higher (P <0.01) after LPS treatment for 12 and 24 hours (1.14 \pm 0.10, 1.20 \pm 0.04) in comparison with untreated control (0.17 \pm 0.02). In LPS+TSA treated cells, TLR4 expression (0.37 \pm 0.07) was significantly lower (P <0.05) after 12 hours of treatment in comparison with its LPS treated counterpart (1.25 \pm 0.16), while the level of TLR4 expression stayed unchanged 24 hours after the beginning of the treatment, as compared to the result at 12 hours (0.37 \pm 0.10 vs. 1.20 \pm 0.19, P >0.05). No visible HDAC2 expression was detected in the cells treated with LPS+TSA. **Conclusion** LPS stimulated the increase of TLR4 and HDAC2 expression in the vascular endothelial cells studied while TSA suppress the LPS induced TLR4 and HDAC2 expression in these cells.

【Key words】 Toll-like receptor4; Histone deacetylase; Trichostatin A, Lipopolysaccharide; Vascular endothelial cells

目前脓毒症发病率、病死率仍居高不下,日益成为危重病医学领域研究的热点问题之一^[1]。内毒素或脂多糖(LPS)被认为是引起革兰阴性(G⁻)菌脓

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.10.010

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7102039)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院重症医学科

通信作者:段美丽,Email: beauty9659@hotmail.com

毒症、脓毒性休克的最主要原因^[2]。越来越多的研究表明,内皮细胞在 LPS 引起的内毒素休克、多器官功能衰竭等病理过程中也起关键作用^[3]。LPS 识别和信号转导是宿主对 G⁻菌发生防御反应的关键。已证实 MD2 蛋白是一种相对分子质量为 20 000~30 000 的糖蛋白,在体内的作用是 Toll 样受体 4 (TLR4)细胞膜外结构域相结合。在 CD14 分子存在

下, LPS 直接与 TLR4-MD2 复合物紧密结合, 使得 TLR4 激活, 并向细胞内传递信号, 可激活内皮细胞中的核转录因子- κ B(NF- κ B)和丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导级联(cascade)过程, 导致细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等内皮细胞黏附分子的表达, 从而介导内皮细胞损伤^[4]。组蛋白去乙酰化酶(HDAC)可以在细胞染色质水平通过诱导组蛋白去乙酰化来调控细胞活化后的基因转录表达。HDAC 1、HDAC 2、HDAC 3 可能具有抗炎特性^[5]。最新的研究显示, 广谱 HDAC 抑制剂如曲古抑菌素(TSA)能够降低由 LPS 刺激的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平, 以及减少由 TNF- α 诱导产生的炎症细胞因子^[6]。

本研究旨在观察内毒素激活血管内皮细胞后 TLR4、HDAC2 的表达, 探讨 HDAC 抑制剂对血管内皮细胞 TLR4、HDAC2 表达的影响, 为临床脓毒症相关血管内皮细胞损伤后的保护提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞及试剂:融合细胞株 EAhy926 是人肺腺癌细胞株 A549 和人脐静脉内皮细胞杂交而成的永生细胞株, 具有血管内皮细胞的特性, 由首都医科大学基础部病理生理教研组赠送。LPS、TSA 为美国 Sigma 公司产品。TLR4 抗体为美国 R&D 公司产品, HDAC2 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。

1.2 脐静脉内皮细胞培养:将 EAhy926 细胞接种于培养瓶中, 使用 PRMI 1640 培养液培养, 24 h 更换一次培养基, 待细胞融合约 80% 时用含乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 内皮细胞存活率测定:将细胞以 5×10^4 /ml 接种于 96 孔培养板, 每孔含 3% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养液 200 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。然后加入不同浓度药物, 并设调零孔(含 3% 胎牛血清培养液)、对照孔(含细胞、不同浓度 LPS、3% 胎牛血清培养液), 每组 5 个复孔, 于终止培养 4 h 前每孔加入 20 μ l 四甲基偶氮唑盐溶液(MTT, 5 mg/ml), 继续培养 4 h 后弃去上清液, 镜下观察细胞呈放射状结晶。加入 MTT 溶解剂 Triton-ISOP 100 μ l, 震荡后置于细胞培养箱中过夜。次日测定 540 nm 处吸光度(A)值。细胞存活率=(药物组 A 值/空白对照组 A 值) \times 100%; MTT 转化率=(1-药物组 A 值/空白对照组 A 值) \times 100%。

1.4 实验分组:将对数生长期的细胞接种于培养瓶

中, 加入含 10% 胎牛血清的 PRMI1640 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 待细胞生长至融合状态时, 弃去培养基, 分为 3 组。空白对照组给予含 3% 胎牛血清的 PRMI1640 培养液培养; LPS 组给予 50、100、500、1 000 ng/ml LPS+培养液, 分别作用 3、6、9、12、24 h; TSA 组给予 100 ng/ml LPS+培养液+100 ng/ml TSA[1%的二甲基亚砜(DMSO)助溶], 分别作用 3、6、9、12、24 h。

1.5 检测指标及方法:各组于相应时间点, 采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测内皮细胞 TLR4、HDAC2 的蛋白表达。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 LPS 对 EAhy926 细胞作用不同时间存活率的影响:50 ng/ml、100 ng/ml LPS 在作用于 EAhy926 细胞 9~24 h 情况下, 细胞的存活率均大于 90%; 根据本课题组前期研究结果并结合本实验细胞存活情况, 选择 100 ng/ml 的 LPS 用于后续实验。

2.2 LPS 刺激内皮细胞后 TLR4、HDAC2 的表达(图 1; 表 1):与空白对照组比较, LPS 刺激内皮细胞 9、12 和 24 h 时 TLR4 表达明显上调(均 $P < 0.01$); LPS 刺激内皮细胞 12 h、24 h 时 HDAC2 表达明显上调(均 $P < 0.01$)。

LPS, 脂多糖, TLR4, Toll 样受体 4, HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶 2

图 1 蛋白质免疫印迹法检测 100 ng/ml LPS 刺激内皮细胞不同时间点 TLR4、HDAC2 的蛋白表达

2.3 TSA 对 LPS 刺激内皮细胞后 TLR4、HDAC2 表达的影响(表 1; 图 2):与 LPS 组相比, 加用 TSA 后 12 h TLR4 表达明显下调($P < 0.05$), 24 h TLR4 表达下调无差异($P > 0.05$); HDAC2 表达下调, 未见条带显现。

表 1 TSA 对 LPS 致血管内皮细胞损伤后 TLR4、HDAC2 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	TLR4	HDAC2
空白对照组		5	0.34±0.05	0.17±0.02
LPS 组	3 h	5	0.51±0.07	...
	6 h	5	0.15±0.11	...
	9 h	5	1.01±0.14 ^a	0.56±0.10
	12 h	5	1.25±0.16 ^a	1.14±0.10 ^a
	24 h	5	1.20±0.19 ^a	1.20±0.04 ^a
TSA 组	3 h	5
	6 h	5
	9 h	5
	12 h	5	0.37±0.07 ^b	...
	24 h	5	0.37±0.10	...

注: TSA, 曲古抑菌素, LPS, 脂多糖, TLR4, Toll 样受体 4, HDAC2, 组蛋白去乙酰化酶 2; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组同期比较, ^b $P < 0.05$; ...代表未发现

TSA, 曲古抑菌素, LPS, 脂多糖, TLR4, Toll 样受体 4
图 2 蛋白质免疫印迹法检测 TSA 对 100 ng/ml LPS 刺激内皮细胞后 TLR4 蛋白表达的影响

3 讨论

脓毒症是创伤、烧伤、休克、感染、大手术等临床急危重患者的严重并发症之一,也是诱发脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)的重要原因。临床高达 50% 的脓毒症患者是由 G⁻菌感染所致, LPS 是引起 G⁻菌脓毒症、脓毒性休克的最主要原因^[3]。目前对 LPS 在启动机体免疫反应,导致中毒性休克中的重要性已得到普遍认识,内皮细胞是 LPS 作用的重要靶器官, LPS 直接或间接损伤内皮细胞,中性粒细胞黏附于内皮细胞表面,继而进入细胞内膜,并激活补体结合而损伤内皮细胞,最终可导致微循环障碍、脓毒性休克。

研究表明,内皮细胞能表达 TLR4,且 LPS 能明显上调其表达水平,并呈一定的时间依赖性;而且,国外学者用 LPS 刺激人冠状动脉内皮细胞(HCAEC),应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测分析 HCAEC 上清液,结果显示, LPS 可增加白细胞介素(IL-6、IL-8)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的分泌;应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测显示 IL-1b 和 TNF- α 的 mRNA 表达增多,提示激活的 HCAEC 可能担当炎性细胞^[7]。

HDAC 是一组在细胞染色质水平、通过诱导组蛋白去乙酰化来调控包括染色质重组、转录活化或抑制、细胞周期、细胞分化及细胞凋亡等一系列生物学效应的酶,特别是与细胞活化后的基因转录表达调控有关。这些酶也能够后表达性的调整一些非组蛋白靶位,进而调控多种细胞功能^[8]。本研究显示, LPS 刺激内皮细胞 12 h、24 h 时 HDAC2 表达明显上调。有实验表明,高表达的特异性 HDAC2 提高了细胞因子诱导的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 NF- κ B 元素促进剂^[9]。

最新研究显示,广谱的 HDAC(HDACi, 如 TSA) 能降低由 LPS 刺激 TNF- α 及其诱导产生的炎症因子^[6]。本实验通过体外培养融合细胞株 EAhy926, 并给予 100 ng/ml 的 LPS 刺激血管内皮细胞不同时间发现, LPS 刺激内皮细胞 12 h 和 24 h 后 TLR4 表达明显上调;而加用 TSA 后 12 h TLR4 表达下调,可能与 TSA 抑制 HDAC2 表达后间接反馈性抑制 TLR4 有关,详细机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Jarrar D, Chaudry IH, Wang P. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review). *Int J Mol Med*, 1999, 4:575-583.
- [2] Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndromes (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*, 1998, 10:79-89.
- [3] 程君涛, 袁建成, 郑江, 等. 内毒素对人脐静脉内皮细胞形态和功能的影响. *中华烧伤杂志*, 2001, 17:155-158.
- [4] Andonegui G, Goyert SM, Kubes P. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions, a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J Immunol*, 2002, 169:2111-2119.
- [5] Klampfer L, Huang J, Swaby LA, et al. Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1. *J Biol Chem*, 2004, 279:30358-30368.
- [6] Furumai R, Ito A, Ogawa K, et al. Histone deacetylase inhibitors block nuclear factor- κ B-dependent transcription by interfering with RNA polymerase I recruitment. *Cancer Sci*, 2011, 102:1081-1087.
- [7] Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, et al. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res*, 2002, 56:126-134.
- [8] Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:38-51.
- [9] Halili MA, Andrews MR, Labzin LI, et al. Differential effects of selective HDAC inhibitors on macrophage inflammatory responses to the Toll-like receptor 4 agonist LPS. *J Leukoc Biol*, 2010, 87:1103-1114.

(收稿日期, 2011-07-27)
(本文编辑, 李银平)