LPS和LT对体外大鼠肠粘膜微血管内皮细胞的影响*

王 新[1,2a], 谭建华[3], 索占伟[4], 刘金玲[2b], 杜绍范[5], 穆 祥[4], 韦旭斌[1]

(1 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2 莱阳农学院 a 动物科学系; b 外语系, 山东 青岛 266109;
3 中国人民解放军军事医学科学院 军事兽医研究所, 吉林 长春 130062; 4 北京农学院 动物科学系, 北京 昌平 102206;
5 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161)

[摘 要] 将大鼠肠粘膜微血管内皮细胞分为空白对照组、BSA 对照组、LPS1 组、LPS2 组、LT1 组和LT2 组6 个组, 分别用维持培养液, 含50 μg/mL BSA、1 或10 μg/mL LPS、10 或50 μg/mL LT 的培养液静置培养12 h, 研究不同浓度LPS 和LT 对体外大鼠肠粘膜微血管内皮细胞形态及NO 分泌量的影响, 并确定LPS 和LT 致大鼠肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量。结果表明, LPS 可使细胞长宽比增大, 间隙变宽, 而LT 可使细胞肿大, 排列紊乱; 各浓度的LPS 和LT 均能引起肠粘膜微血管内皮细胞的NO 分泌量升高, 但1 μg/mL LPS 与50 μg/mL LT 的作用更明显; LPS 和LT 致大鼠肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量分别是1 和50 μg/mL。

[关键词] 肠粘膜; 微血管内皮细胞; LPS; LT

[中图分类号] S858.912.61+2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)08-0031-04

大肠杆菌外毒素(the heat-labile toxin, LT)和内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)是大肠杆菌的主要致病因子。有研究[1]表明, 血管内皮细胞是内毒素作用的主要靶细胞, 在内毒素的作用下, 血管内皮细胞会发生形态、结构和功能的变化。虽然有关内毒素对体外培养血管内皮细胞影响的报道很多, 但是不同部位的血管内皮细胞在形态、结构、功能上存在异质性, 不同组织器官的微血管内皮细胞的异质性则更大, 因此研究内毒素对不同类型微血管内皮细胞的影响非常必要。

一般认为, 大肠杆菌肠毒素主要作用于肠粘膜上皮细胞, 并且这种作用是特异的。小肠粘膜是毒素吸收的主要部位, 除上皮细胞外, 肠粘膜微血管内皮细胞是毒素最先作用的细胞, 也是肠道各种炎症发生的"门户"[2]。到目前为止, 尚未见有关肠毒毒素和肠粘膜微血管内皮细胞相互作用的研究报道。为此, 本试验研究了不同浓度LPS 和LT 对体外大鼠肠粘膜微血管内皮细胞形态及NO 分泌量的影响, 并确定了LPS 和LT 致大鼠肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量, 以期为大肠杆菌的致病机理研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 DMEM 培养基、BSA、LPS 和LT 均为Sigma 公司产品, 胰酶为GIBICO 公司产品, NO 检测试剂盒购自晶美生物工程有限公司, 大鼠ET-1 酶联免疫检测试剂盒购自Assay Designs 公司。

1.1.2 大鼠肠粘膜微血管内皮细胞 大鼠肠粘膜微血管内皮细胞由北京农学院动物科学系实验室提供。

1.1.3 主要溶液的配制 DMEM 基础培养液: 称取DMEM 干粉13.4 g, $NaHCO_3$ 3.7 g, 溶于1 000 mL 超纯水中, 调节pH 值为7.2; DMEM 完全培养液: DMEM 基础培养液83 mL + 29.2 g/L 谷氨酰胺溶液2 mL + FBS 15 mL; 细胞维持培养液: DMEM 基础培养液93 mL + 29.2 g/L 谷氨酰胺2 mL + FBS 5 mL; 2.5 g/mL 胰酶; 含1, 10 μg/mL LPS 的细胞维持培养液; 含10, 50 μg/mL LT 的细胞维持培养液; 含50 μg/mL BSA 的细胞维持培养液。以上液体均过滤除菌。

1.2 细胞接种

用2.5 g/mL 胰酶消化大鼠肠粘膜微血管内皮细胞, 调整密度为5×10^4/mL, 充分混匀后接种于48

* [收稿日期] 2005-09-16
[基金项目] 北京市自然科学基金项目(6021001)
[作者简介] 王 新(1971-), 男, 吉林松原人, 讲师, 在读博士, 主要从事细胞动态生化研究。E-mail: xinw2004me@sohu.com
[通讯作者] 穆 祥(1960-), 男, 江苏启东人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医药-微血管-细胞微环境学研究。
韦旭斌(1950-), 男, 重庆人, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医临床中药学研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

孔培养板中,每孔0.5 mL,然后置入37 ℃、体积分数5% CO_2 培养箱中静置培养,48 h后取3个孔的细胞计数,当细胞密度增至1×10^5/mL时,进行下述试验。

1.3 LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞形态的影响

取30个孔的细胞,分为空白对照组、BSA对照组、LPS1组、LPS2组、LT1组和LT2组等6个组,每组5孔。各组均于试验前换液,依次在各孔中加入0.5 mL不同的培养液,空白对照组加维持培养液,LPS1和LPS2组分别加含1和10 μg/mL LPS的细胞维持培养液,LT1和LT2组分别加含10和50 μg/mL LT的细胞维持培养液,然后置入37 ℃、体积分数5% CO_2 培养箱中静置培养,12 h后在倒置显微镜下观察各组细胞的形态学变化,并拍照记录。

1.4 LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量的影响

1.4.1 细胞上清液收集 培养12 h后吸取每孔细胞的上清液,分别收集到贴好标签的小离心管中,3 000 r/min离心10 min,然后将各管中的细胞上清液在无菌条件下,平均分装到3个小离心管中,分为3批,封口,于-20 ℃冰箱中保存备用。

1.4.2 NO分泌量的测定 NO分泌量的测定按试剂盒说明书进行。

1.5 数据分析

试验数据采用t检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞形态的影响

由图1可以看出,空白对照组(图1A)与BSA组(图1B)的肠粘膜微血管内皮细胞轮廓清晰,胞核明显,胞浆饱满,细胞之间结构均匀,排列整齐;LPS1组(图1C)的肠粘膜微血管内皮细胞轮廓变得模糊不清,细胞间隙变宽,细胞长宽比增大,排列不齐;LPS2组(图1D)的肠粘膜微血管内皮细胞几乎看不出明显的轮廓,“铺路石”样的结构消失,排列紊乱,有些区域的细胞间看不出明显的界限;LT1组(图1E)的肠粘膜微血管内皮细胞变化不明显,但细胞有所增大,轮廓不清;LT2组(图1F)的肠粘膜微血管内皮细胞明显变大,细胞结构不均,间隙疏松,细胞轮廓变得模糊不清。结果表明,对于LPS,1 μg/mL即可引起肠粘膜微血管内皮细胞形态学变化,而10 μg/mL的剂量对细胞的作用更强;对于LT,10 μg/mL对肠粘膜微血管内皮细胞有一定的作用,50 μg/mL对肠粘膜微血管内皮细胞有明显的作用。2种毒素对肠粘膜微血管内皮细胞形态学的影响均呈量效关系。

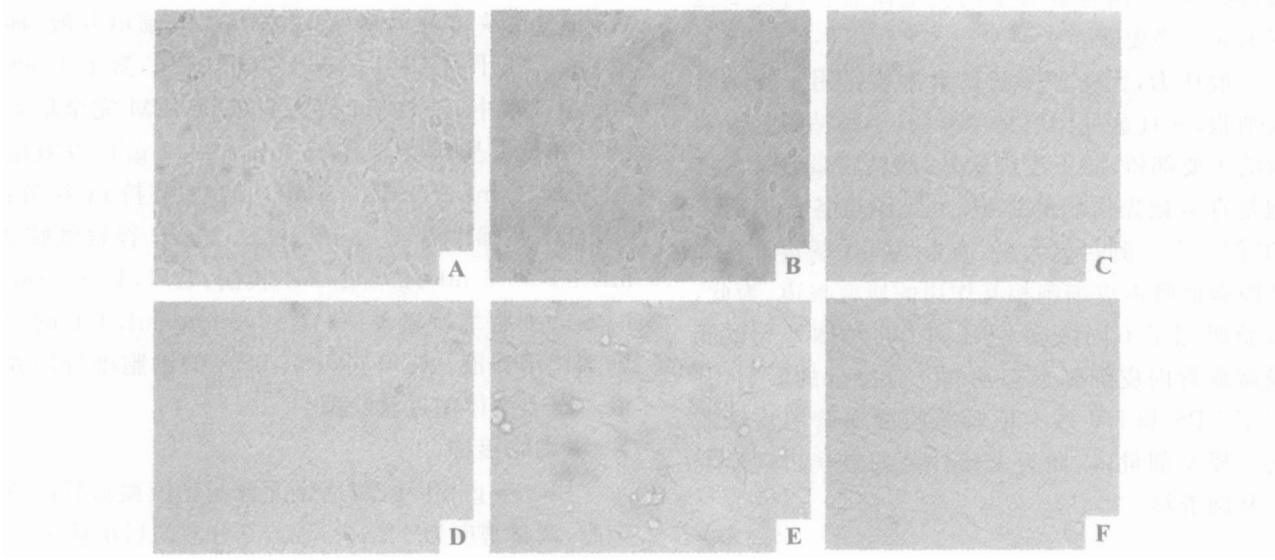

图1 LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞形态的影响(10×40)

A. 空白对照组细胞(10×40);B. BSA对照组细胞;C. LPS1组细胞;D. LPS2组细胞;E. LT1组细胞;F. LT2组细胞

Fig. 1 Respective effects of LPS and LT on the shapes of intestinal mucous membrane microvascular endothelial cells

A. Blank control group cells' shapes(10×40);B. The BSA control group cells' shapes;C. The LPS1 group cells' shapes;D. The LPS2 group cells' shapes;E. The LT1 group cells' shapes;F. The LT2 group cells shapes

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　不同浓度LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量的影响

由表1可以看出,BSA对照组肠粘膜微血管内皮细胞NO的分泌量高于空白对照组,但二者差异不显著($P > 0.05$),其他组的NO分泌量均极显著高于空白对照组($P < 0.01$);所有毒素组肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量均极显著高于BSA对照组($P < 0.01$);LPS1组较LPS2组NO分泌量高,LT2组较LT1组NO分泌量高;在所有的毒素组中,LPS1组肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量最高,LT1组NO分泌量最低,LT2组和LPS2组NO分泌量差异不显著($P > 0.05$)。上述结果表明,1 μg/mL的LPS和50 μg/mL的LT在12 h内对肠黏膜微血管内皮细胞分泌NO的影响较明显,所以考虑以1 μg/mL的LPS和50 μg/mL的LT作为对肠黏膜微血管内皮细胞作用的模型剂量。

表1　不同浓度的LPS和LT对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量的影响

Table 1　Respective effects of different concentration of LPS and LT on the intestinal mucous membrane microviscular endothelial cells excreting NO

孔号 The serial number of the wells	空白对照组 Blank control group	BSA对照组 BSA control group	LPS1组 LPS1 group	LPS2组 LPS2 group	LT1组 LT1 group	LT2组 LT2 group
1	39.44	36.62	63.38	53.52	52.11	64.79
2	45.77	48.59	71.13	63.38	57.75	62.68
3	45.07	52.11	78.17	72.53	55.63	61.27
4	37.32	40.14	72.54	69.01	57.75	71.13
5	42.96	52.81	87.32	76.76	51.41	76.06
平均值 Average	42.11±3.67 a	46.05±7.30 a	74.51±8.89 b	67.04±9.02 c	54.93±3.01 d	67.19±6.22 c

注:表中同行数据后标不同小写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

Note: The different lower case letters after the data on the same line demonstrate most much significant difference ($P < 0.01$).

3　讨　论

NO和内皮素(ET)是血管内皮细胞分泌的、可引起血管紧张度改变的一对因子。在生理条件下,2种因子共同调节血管的正常功能,一旦出现合成障碍或释放2种因子的比例失调,将会导致多种疾病的形成和发生。有很多试验[3]证明,NO和ET都可作为血管内皮细胞损伤中的标志物。有研究[4]表明,正常情况下,血管内皮细胞会分泌少量的NO,但在内毒素或其他致病因子的刺激下,内皮细胞分泌的NO量则急剧增加。早在20世纪60年代,人们就注意到革兰氏阴性杆菌内毒素对血管内皮细胞的形态、功能及代谢有明显的影响。有研究[5]证明,血管内皮细胞受损是全身性炎症反应综合征以及多器官功能障碍的基本原因。

肠粘膜作为机体内最易受到损伤的部位,其微血管内皮细胞在肠道感染、细菌移位以及内毒素性休克中起重要作用,但有关内毒素对肠粘膜微血管内皮细胞影响的研究还未见报道。本试验研究了LPS对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞的影响,结果表明,内皮细胞经LPS刺激后,形态发生明显变化,主要表现为细胞排列紊乱,正常的"铺路石"状结构模糊不清,细胞变长,并且这种变化与LPS剂量呈明显的量效关系,这与程君涛等[6]的研究结果相似。

本试验结果显示,1 μg/mL的LPS和50 μg/mL的LT均可以使大鼠肠粘膜微血管内皮细胞充分受到损伤,但并不损害细胞的基本功能,这与一些文献[6-8]报道的LPS和LT致其他器官的内皮细胞损伤的模型剂量是一致的。简华刚等[7]报道,LPS剂量在0.001～1 μg/mL时,体外培养大鼠肺微血管内皮细胞NO分泌量随LPS剂量的增加而升高;但当LPS剂量大于1.0 μg/mL时,随LPS剂量的增加,NO分泌量不再增加。本试验结果显示,1 μg/mL的LPS剂量即可引起大鼠肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量明显增多,并且分泌量较10 μg/mL的还多,这与简华刚等[7]的研究结果基本一致。从LPS引起微血管内皮细胞分泌NO升高的程度来看,本试验1.0 μg/mL LPS引起肠粘膜微血管内皮细胞分泌NO的量约为原来的1.8倍;而简华刚等[7]的研究结果显示,LPS作用于肺微血管内皮细胞后,NO的分泌量是原来的8倍,这可能与不同组织器官的微血管内皮细胞在分泌能力上存在差异有关。其他剂量的LPS对大鼠肠粘膜微血管内皮细胞NO分泌量的影响,还需作进一步研究。10 μg/mL剂量的LPS对细胞形态的影响较1 μg/mL剂量的大,而其对NO分泌的影响较1 μg/mL剂量的小。这可能是由于10

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

μg/mL LPS作用一定时间后,细胞在一定程度上丧失了原有的分泌功能,而1 μg/mL LPS的作用在细胞的代偿功能范围之内。1 μg/mL的LPS能引起肠粘膜微血管内皮细胞明显的形态学变化,说明在此剂量下内皮细胞已受到一定程度的影响,但尚具有一定的分泌功能,可考虑将此剂量作为内毒素致肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量。

陈清等[8]研究过LT对豚鼠回肠上皮细胞的影响,结果发现,LT能引起上皮细胞的线粒体肿胀,并且细胞出现空泡化和胞浆疏松现象。本研究发现,LT对肠粘膜微血管内皮细胞形态的影响,主要表现为细胞体积增大,间隙变宽,说明肠粘膜微血管内皮细胞通透性增加,这可能是导致水盐渗出的直接原因。LT对肠粘膜微血管内皮细胞分泌NO的影响结果表明,10 μg/mL的剂量对细胞的分泌功能有一定的作用,50 μg/mL的剂量对其分泌有明显的影响,可考虑将50 μg/mL的剂量作为LT致肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量。

综上所述,LPS和LT致大鼠肠粘膜微血管内皮细胞损伤的模型剂量分别是1和50 μg/mL,这与一些文献[6-8]报道的LPS和LT致其他器官微血管内皮细胞损伤的模型剂量是一致的。

[参考文献]

[1] Yamaguchi H, Ishii E, Tashiro K, et al. Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis[J]. Leuk Lymphoma, 1998, 31: 61-69.

[2] Swerlick R A, Lawley T J. Role of microvascular endothelial cells in inflammation[J]. J Invest dermatol, 1993, 100: 111-115.

[3] Schaleramp M A. Renin angiotension system compotents and endothelial disease[J]. Clirr Investing 1993(suppl): 3-6.

[4] 刘宝华, 陈惠孙, 周继红, 等. 内毒素对人脐静脉血管内皮细胞分泌功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(6): 539-540.

[5] Tsujikawa A, Kiryu J, Yamashiro K, et al. Interactions between blood cells and retinal endothelium in endotoxic sepsis[J]. Hypertension, 2000, 36: 250-258.

[6] 程君涛, 袁建成. 内毒素对人脐静脉内皮细胞形态和功能的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(3): 155-158.

[7] 简华刚, 周继红. 内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 457-459.

[8] 陈 清, 申 洪, 俞守义. 产毒性大肠杆菌肠毒素对豚鼠回肠上皮细胞的影响[J]. 基础医学与临床, 2001, 21(4): 356-357.

Respective effects of LPS and LT on the intestinal mucous membrane microvascular *in vitro*

WANG Xin[1,2a], TAN Jian-hua[3], SUO Zhan-wei[4], LIU Jin-ling[2b], DU Shao-fan[5], MU Xiang[4], WEI Xu-bin[1]

(1 *Pasturage and Theriatrics School, Jilin University, Changchun, Jilin* 130062, *China*;
2 *a Animal Science Department; b Foreign Language Department, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong* 266109, *China*;
3 *Institute of Military Veterinary Academy of Military Medical Science, PLA, Changchun, Jilin* 130062, *China*;
4 *Animal Science Department, Beijing Agricultural College, Changping, Beijing* 102206, *China*;
5 *Prologue and Theriatrics School, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning* 110161, *China*)

Abstract: The intestinal mucosa microvascular endothelial cells were divided into blank control group, BSA control group, LPS1 group, LPS2 group, LT1 group and LT2 group. By adding feeding medium 50 μg/mL BSA, 1 μg/mL LPS, 10 μg/mL LPS, 10 μg/mL LT and 50 μg/mL LT culture fluid respectively into the 6 groups to cultivate statically for 12 hours, the respective effects of different concentrations of LPS and LT on the intestinal mucous membrane microvascular endothelial cells' shape and excreting NO was studied, then the model dosage of LPS and LT damaging intestinal mucosa microvascular endothelial cells in rats was decided. LPS makes the ratio between the length and the width of a cell increase and the gaps between cells wider; LT makes the cells swell and the alignment in disorder. Both LPS and LT of every concentration can lead to the rising of the secretion of NO by intestinal mucosa microvascular endothelial cells, but the function of 1 μg/mL LPS and 50 μg/mL LT is more obvious. The model dosage of LPS and LT damaging intestinal mucosa microvascular endothelial cells in rats is respectively 1 μg/mL and 50 μg/mL.

Key words: intestinal mucosa; microvascular endothelial cells; LPS; LT

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net