

论著·实验研究

## 脂多糖对大鼠脑微血管内皮细胞 通透性的影响及机制研究

邓小鹿 何芳 彭镜 杨丽芬 张慈柳 向秋莲 吴丽文 王国丽 尹飞

(中南大学湘雅医院儿科,湖南 长沙 410008)

**[摘要]** 目的 了解脂多糖(LPS)对大鼠脑微血管内皮细胞(BMECs)通透性的影响及其可能的机制。方法 分离和培养原代大鼠 BMECs,随机分为对照组和 LPS 干预组。利用跨内皮细胞电阻抗检测 BMECs 屏障功能, Pull-down 法测定 RhoA 活性, Western blot 检测 p115RhoGEF 和紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-5 的蛋白表达量。结果 与对照组( $159.0 \pm 8.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )比较, LPS 作用 3 h 后,大鼠 BMECs 跨内皮细胞电阻抗值明显下降( $108.3 \pm 4.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ),作用 12 h 后达最低( $85.4 \pm 2.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )。LPS 作用 5 min 后 RhoA 明显活化,1 h 后出现 p115RhoGEF 蛋白表达上调,3 h 后紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-5 的表达水平均不同程度下降,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 LPS 诱导大鼠 BMECs 中 p115RhoGEF/RhoA 信号通路活化,导致紧密连接蛋白表达水平降低,引起 BMECs 通透性增加。 [中国当代儿科杂志,2011,13(11):908-911]

**[关键词]** 脂多糖;紧密连接;内皮细胞;大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)11-0908-04

### Influence of lipopolysaccharide on the permeability of rat brain microvascular endothelial cells and the molecular mechanism

DENG Xiao-Lu, HE Fang, PENG Jing, YANG Li-Fen, ZHANG Ci-Liu, XIANG Qiu-Lian, WU Li-Wen, WANG Guo-Li, YIN Fei. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 (Yin F, Email: yf2323@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To study the influence of lipopolysaccharide (LPS) on the permeability of rat brain microvascular endothelial cells (BMECs) and possible molecular mechanism. **Methods** Monolayers of primary rat BMECs were separated and cultured, and then treated with (LPS group) or without LPS (control group). The barrier integrity was measured by transendothelial electrical resistance (TEER) assay. The degrees of RhoA activation were determined by Pull-down assay. The expression levels of p115RhoGEF, zonula occludens-1 (ZO-1), occludin and claudin-5 proteins were detected by Western blot analysis. **Results** The average TEER values of rat BMECs in the LPS group were  $108.3 \pm 4.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$  and  $85.4 \pm 2.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  respectively 3 and 12 hrs after LPS treatment, which were significantly lower than that in the control group ( $159.0 \pm 8.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Compared with the control group, the activity of RhoA started to increase 5 minutes after LPS treatment, and the expression of p115RhoGEF protein started to increase 1 hr after LPS treatment and the cellular protein levels of ZO-1, occludin and claudin-5 decreased significantly 3 hrs after LPS treatment in the LPS group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LPS may activate the p115RhoGEF/RhoA pathway and decrease protein expression of ZO-1, occludin and claudin-5, resulting in an increased permeability of rat BMECs.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (11):908-911]

**Key words:** Lipopolysaccharide; Tight junction; Endothelial cell; Rats

在正常的生理情况下,脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)及其紧密连接(tight junction, TJ)发挥着屏障作用。在病理条件下,如缺血、感染性脑损伤时,BMECs屏障的完整性被破坏,脑血管通透性增加,脑水肿发生发

展,成为继发性脑损伤的重要原因。革兰阴性杆菌是小婴儿中枢神经系统感染较常见的病原体,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是其细胞壁的主要成分。本课题组的前期研究发现,应用 Ras 同源物(Ras homologous, Rho)抑制剂 C3 转移酶能够减轻

[收稿日期]2011-06-13; [修回日期]2011-07-13

[作者简介]邓小鹿,女,博士研究生。

[通信作者]尹飞,教授。

LPS对小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd.3 屏障功能的破坏;应用 Rho 激酶抑制剂(Y-27632)可以抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  诱导的体外血脑屏障通透性增加,表明 Rho/Rho 激酶信号通路活化与炎症过程中脑微血管内皮细胞功能异常关系密切<sup>[1-2]</sup>。鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)是 Rho 最为重要的活性调控分子,其家族成员 p115RhoGEF 被认为参与了脐静脉内皮细胞通透性增高的病理过程<sup>[3]</sup>。但是 LPS 对脑微血管内皮细胞的 p115RhoGEF/Rho 途径和紧密连接蛋白的影响尚不清楚。本研究拟通过对大鼠原代 BMECs 给予 LPS 处理,观察 p115RhoGEF 表达、Rho 活性、跨内皮细胞电阻抗(transendothelial electrical resistance, TEER)和 TJ 蛋白表达的变化,以探讨 LPS 对 BMECs 紧密连接的影响及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康 Sprague-Dawley(SD)7 d 龄大鼠(中南大学湘雅医学院动物部);RhoA 活性检测试剂盒(Cytoskeleton,美国);DMEM 高糖培养基(Thermo,美国);胎牛血清(四季青,中国);LPS(Sigma,美国);兔抗 RhoA 单克隆抗体(Cell Signaling Technology,美国);山羊抗 p115RhoGEF 多克隆抗体、兔抗 ZO-1 多克隆抗体、兔抗 occludin 多克隆抗体、兔抗 claudin-5 多克隆抗体(Santa Cruz,美国);Transwell、Millicell-ESR 电阻仪(Millipore,日本);其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯试剂。

### 1.2 大鼠脑微血管内皮细胞原代培养

按已建立的方法<sup>[4]</sup>分离和培养原代大鼠 BMECs。

### 1.3 实验分组

将第3~4代 BMECs 分为2组:对照组和 LPS 干预组,分别给予0.9%生理盐水和5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 刺激。选取 LPS 处理后5、15 min 检测 RhoA 活性,处理后1、3、6、12 h 检测 p115RhoGEF 蛋白表达变化,处理后3、6、12 h 检测 TEER 和 TJ 蛋白,包括闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、封闭蛋白(occludin)和闭合蛋白-5(claudin-5)表达变化。

### 1.4 细胞 RhoA 活性测定

RhoA 活性测定采用 Pull-down 方法,操作步骤依照 Cytoskeleton 公司提供的 RhoA 活性测定试剂盒说明书进行。将各组样品予 PBS 洗3次,加入0.5 mL 预冷的细胞裂解液(50 mmol/L Tris、

10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mol/L NaCl 及 1% TritonX-100),4 $^{\circ}\text{C}$ ,12000 r/min 离心 10 min,收集上清,采用 BCA 法测定蛋白质浓度。在细胞提取物中分别加入 50  $\mu\text{L}$  GST-RBD 融合蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$  涡旋孵育 1 h,3000 r/min 离心 3 min,弃上清。沉淀用 500  $\mu\text{L}$  Wash buffer 洗涤,3000 r/min 离心 3 min,弃上清。取沉淀行 SDS-PAGE 电泳,Western blot 检测 GTP-RhoA 的表达,GTP-RhoA/总 RhoA 的比值代表 RhoA 活性。

### 1.5 细胞 TEER 测定

细胞接种入 Transwell 细胞培养插,以未接种细胞仅在细胞插内加入等量相同培养基的样品为空白对照,利用 ESR 电阻仪测量单层细胞 TEER 读数。整个过程在恒温(23 $^{\circ}\text{C}$ )下进行,每个 Transwell 均取不同方向的3个点,每点重复测定3次,取均值乘以 Transwell 膜面积,即为该样品的 TEER 值,以  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  表示。而标准 TEER 值等于样品的实测 TEER 值减去空白对照的 TEER 值。

### 1.6 Western blot 检测 p115RhoGEF、ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白表达

提取各组细胞总蛋白;聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳;转膜;将含有蛋白质的 PVDF 膜用 PBST 于室温下封闭 1h;按 1:1000 加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$  平缓摇动 18 h;PBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次;按 1:10000 加入二抗,室温下孵育 1 h, PBST 洗膜 10 min  $\times$  3 次。然后加入等体积发光剂和增强剂反应 5 min。柯达 X 光胶片感光后自动洗片。最后采用 Quantity One 图像分析系统进行显影条带灰度值分析。

### 1.7 统计学分析

采用 Excel 7.0 和 SPSS 11.0 统计软件进行处理。数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 p115RhoGEF 蛋白表达水平

Western blot 结果显示,对照组可检测到 p115RhoGEF 的少量表达,在 LPS 刺激后 1、3、6 h,大鼠 BMECs 的 p115RhoGEF 表达增加( $F = 54.778$ ,  $P < 0.05$ ),12 h 恢复到正常表达水平( $P = 0.43$ )。见图 1。

### 2.2 各组 RhoA 活性水平

Pull-down 结果显示,对照组可检测到微弱的 GTP-RhoA, LPS 刺激后 5 min 和 15 min,大鼠 BMECs 的 RhoA 活性增高(图 2),与对照组比较差异有统计学意义( $F = 20.561$ ,  $P < 0.05$ )。

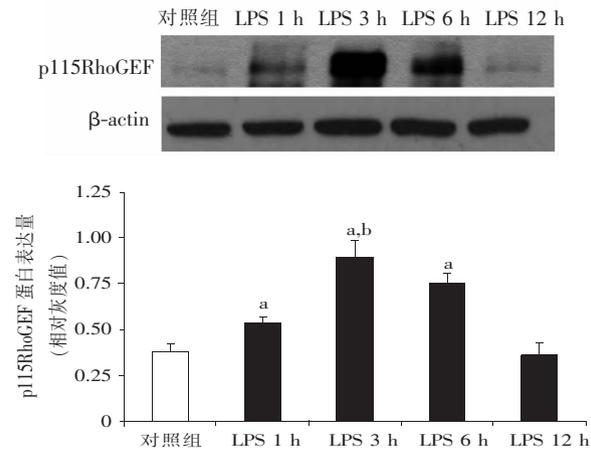


图1 各组 BMECs 的 p115RhoGEF 蛋白表达情况 (n=3)

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 LPS 1 h, 6 h 及 12 h 比较, 均  $P < 0.05$

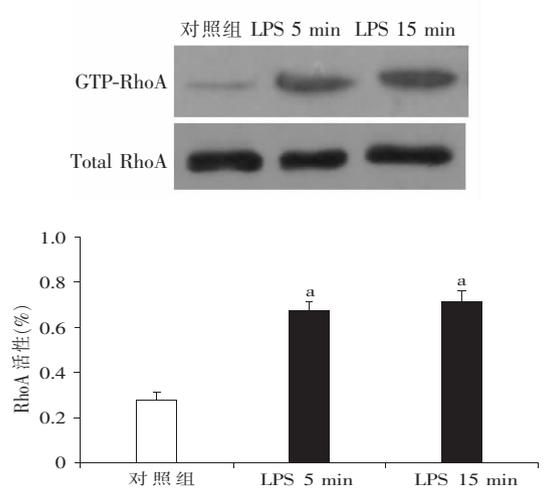


图2 各组 BMECs 的 RhoA 活性 (n=3)

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 各组 TEER 实验结果

LPS 导致大鼠 BMECs 细胞单层 TEER 以时间依赖性的方式下降 (图 3)。与对照组 ( $159.0 \pm 8.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) 相比,  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 作用 3 h 后 TEER 开始下降 ( $108.3 \pm 4.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) ( $P < 0.05$ ); 12 h 后 TEER 降至  $85.4 \pm 2.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , 仅为对照组基线水平的 53.7%。

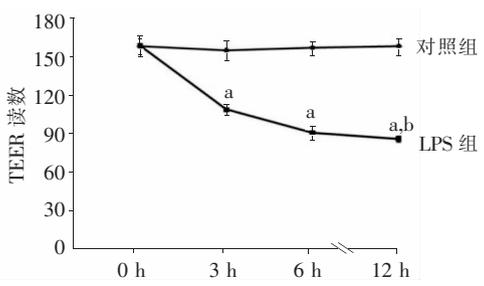


图3 各组 BMECs 单层 TEER 检测 (n=3)

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与同组其他时间点比较,  $P < 0.05$

### 2.4 各组 TJ 蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-5 表达水平

Western blot 结果显示, 对照组可检测到 ZO-1、occludin 和 claudin-5 的表达, 在 LPS 刺激 3 h 后, ZO-1 的表达开始减弱 ( $F = 59.844, P < 0.01$ ), 6 h 后 occludin 的表达明显减弱 ( $F = 18.955, P < 0.01$ ), 12 h 后 claudin-5 的表达明显减弱 ( $F = 4.096, P < 0.05$ )。见图 4。

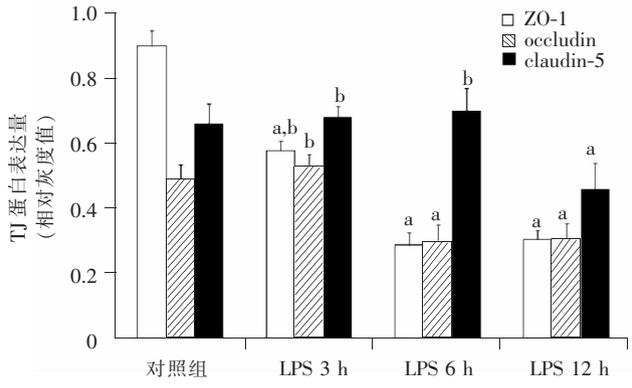
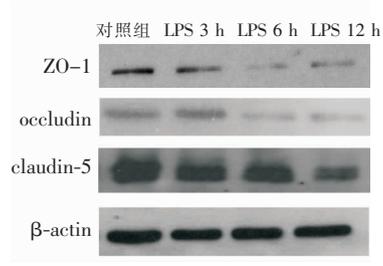


图4 各组 BMECs 的 ZO-1、occludin 和 claudin-5 蛋白表达情况 (n=3)

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 LPS 组 12 h 比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

BMECs 是构成血脑屏障最主要的成分, 感染性脑水肿、脑血管疾病和脑肿瘤的病理过程中都存在 BMECs 屏障功能的破坏。BMECs 间 TJ 的正常表达和分布是维持血脑屏障结构和功能的分子基础, 由跨膜蛋白 (claudin, occludin 和连接黏附分子) 和胞质附着蛋白 (zonula occludens, ZO) 组成。Occludin 是 1993 年由 Furuse 等<sup>[5]</sup> 发现的第一个 TJ 跨膜蛋白, 在脑血管内皮细胞的表达显著高于外周内皮细胞。ZO 主要包括 ZO-1, ZO-2 和 ZO-3 三个亚型, 对各种影响血脑屏障功能的刺激敏感。Claudin-5 选择性地表达于 BMECs, 被认为是调节脑微血管屏障功能的重要因子<sup>[6]</sup>。研究证实, 脑血管内皮细胞的

claudin-5 和 occludin 蛋白表达下调与脑水肿的发生发展有密切关系<sup>[7]</sup>。Sheth 等<sup>[8]</sup>发现 LPS 可以减少 occludin 和 ZO-1 在胆道上皮细胞间的分布,导致通透性增加。本研究采用 TEER 方法证实 LPS 处理大鼠 BMECs 后 3 h, TEER 明显下降。同时 Western blot 结果显示 LPS 刺激 3 h 后 TJ 蛋白 ZO-1 表达水平即出现下降,6 h 后 ZO-1 和 occludin 蛋白的表达量均明显下降,刺激 12 h 后 claudin-5 的表达量下降,与对照组比较差异均有统计学意义,提示 LPS 可使 ZO-1、occludin、claudin-5 表达下调,进而影响 BMECs 间 TJ 的形成,引起通透性的增加。

多种信号传导通路参与内皮细胞通透性的调控,其中小 G 蛋白 Ras 同源家族 Rho 蛋白主要调控 TJ 蛋白和细胞骨架结构,而 RhoA 是其中最具代表性的成员之一。RhoA 通过激活下游效应器 Rho 激酶,引起细胞骨架的肌球蛋白重组,调节内皮细胞的通透性<sup>[9]</sup>。Rho 通过两种构象的转换发挥类似“分子开关”的作用:结合 GTP 时为激活状态,当 GTP 水解成为 GDP 时回到失活状态。GEFs 帮助 Rho 蛋白脱离 GDP 并与 GTP 结合,进入活化状态,是 Rho 蛋白的正性调控因子。p115RhoGEF 是特异活化 RhoA 的 GEF,可以被 G 蛋白  $\alpha$  亚单位 12/13 ( $G\alpha_{12/13}$ ) 激活,将信号传导至 RhoA,活化下游效应分子导致微管解聚,破坏内皮细胞屏障功能<sup>[10]</sup>。Holinstat 等<sup>[3]</sup>对外周血管内皮细胞的研究中,发现蛋白激酶 C- $\alpha$  可以直接磷酸化 p115RhoGEF,导致 RhoA 活化,调节细胞骨架的重组。本研究结果在国内首次证实,大鼠 BMECs 存在 p115RhoGEF 蛋白的基础表达,LPS 可迅速诱导 p115RhoGEF 蛋白表达增加,并在一定程度上呈时间依赖关系;静息状态下,RhoA 处于与 GDP 结合状态,仅有少量的 RhoA-GTP 表达,LPS 刺激 5 min 后 RhoA-GTP 明显增加;表明 p115RhoGEF/RhoA 信号通路在 LPS 引起的大鼠 BMECs 的信号传递过程中起着十分重要的作用。Rho/Rho 激酶通路被激活后,可以通过信号传导使肌球蛋白轻链磷酸化、肌动-肌球蛋白交联增加、F-actin 骨架重组和应力纤维生成,导致内皮细胞收缩,单层内皮细胞通透性增加<sup>[11]</sup>;另一方面,激活的 Rho 激酶通过磷酸化 TJ 蛋白 occludin,促使紧密连接解体,损伤屏障功能<sup>[12]</sup>。

综上所述,LPS 刺激后可导致 BMECs 通透性增加,本研究在国内首次发现其机制与 LPS 引起的 TJ 蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-5 表达水平降低有关。p115RhoGEF/RhoA 信号传导通路活化可能参与了

此过程的调控。

志谢:感谢中南大学遗传学国家重点实验室的老师给予的热情帮助。

### [参 考 文 献]

- [1] 何芳,尹飞,彭镜,邓小鹿,吴丽文,张慈柳. LPS 诱导小鼠脑微血管内皮细胞通透性增高的分子机制[J]. 中南大学学报(医学版),2010,35(11):1129-1137.
- [2] 彭镜,尹飞,曾卫民,甘娜,张红媛. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  对体外血脑屏障模型通透性的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(36):176-179.
- [3] Holinstat M, Mehta D, Kozasa T, Minshall RD, Malik AB. Protein kinase C alpha-induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement[J]. J Biol Chem, 2003, 278(31):28793-28798.
- [4] 彭镜,尹飞,甘娜,张红媛. 体外血脑屏障模型的建立[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(6):525-529.
- [5] Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions[J]. J Cell Biol, 1993, 123(6 Pt 2):1777-1788.
- [6] Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 2007, 210(1):81-86.
- [7] Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure[J]. Hepatology, 2009, 50(6):1914-1923.
- [8] Sheth P, Delos Santos N, Seth A, LaRusso NF, Rao RK. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 293(1):G308-G318.
- [9] Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)[J]. J Biol Chem, 1996, 271(34):20246-20249.
- [9] Hart MJ, Sharma S, elMasty N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P, et al. Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(41):25452-25458.
- [10] Birukova AA, Birukov KG, Smurova K, Adyshev D, Kaibuchi K, Alieva I, et al. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction[J]. FASEB J, 2004, 18(15):1578-1590.
- [11] Wettshureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. J Mol Med, 2002, 80(10):629-638.
- [12] Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13):10423-10431.

(本文编辑:王庆红)