

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.011

MT2A 对脂多糖介导的人肺毛细血管内皮细胞损伤的保护作用*

周家田¹ 梁卫东^{1Δ} 曾小飞¹ 尚观胜² 廖世均³ 吴 鹏¹ 颜神超¹

(1 成都医学院第一附属医院胸心外科 四川 成都 610500; 2 成都市第七人民医院 四川 成都 610500;

3 四川省第四人民医院 四川 成都 610500)

摘要 目的:探索不同浓度的金属硫蛋白 2A(Metallothionein 2A, MT2A)对脂多糖(Lipopolysaccharid, LPS)介导的人肺微血管内皮细胞损伤的保护作用。**方法:**培养人肺毛细血管内皮细胞株(Human lung microvascular endothelial cells, HPMVECs),经过一定浓度 LPS 溶液进行刺激后,利用不同浓度的 MT2A 与对照组共同培养,一段时间后观察炎症介质 IL-6、TNF- α 释放的量及荧光显微镜观察组 HPMVECs 骨架形态变化。**结果:**各组 TNF- α 浓度均在 0 h 最低,随之逐渐升高,到 6 h 达到高峰;从各时间点来看,除 0 h 各组 TNF- α 浓度无显著差异外($F=0.717$, $P=0.549$),其余各时间点 B1、B2、B3 均显著高于 A 组(均 $P<0.05$)。各组中 IL-6 浓度均在 0 h 最低,A 组在 2 h 达到高峰,随后逐渐下降;B1 组在 4 h 达到高峰,随之下降;B2、B3 组从 0 h 开始逐渐升高,到 6 h 达到峰值;从各时间点来看,除 0 h 各处理因素无显著差异外($F=2.341$, $P=0.092$),其余各时间点 B1、B2、B3 均低于 A 组(均 $P<0.05$)。A 组 6 h 小时后纤维状肌动蛋白(F-actin)明显解聚,分布明显减少,应力纤维排列紊乱或者消失;B1 组、B2 组、B3 组 6 h 小时后,与 A 组相比,F-actin 的分布明显较多,应力纤维排列较为整齐。**结论:**LPS 刺激人肺毛细血管内皮细胞有明显损伤效应,加入 MT2A 后细胞相关炎症因子释放量、细胞骨架损伤情况明显减轻,表明一定浓度的 MT2A 对 LPS 介导的肺毛细血管损伤有明显保护作用。

关键词:金属硫蛋白 2A;肺损伤;肺保护;炎症因子;细胞骨架;脂多糖

中图分类号:R-33;R563 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)06-1051-06

Protective Effect of MT2A on Lipopolysaccharide-mediated Injury of Human Pulmonary Capillary Endothelial Cells*

ZHOU Jia-tian¹, LIANG Wei-dong^{1Δ}, ZENG Xiao-fei¹, SHANG Guan-sheng², LIAO Shi-jun³, WU Peng¹, YAN Shen-chao¹

(1 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan, 610500, China; 2 Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610500, China;

3 Sichuan Fourth People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610500, China)

ABSTRACT Objective: To explore the protective effects of different concentrations of metallothionein 2A on human lung microvascular endothelial cell injury. **Methods:** Culture human lung capillary endothelial cell line, stimulated with a certain concentration of LPS solution, and then use different concentrations of MT2A. Co- Cultivation with the control group, the amount of IL-6 and TNF- α released from the inflammatory medium and the morphology of the HPMVECs in the fluorescence microscope group were observed after a period of time. **Results:** The concentration of TNF- α in each group was the lowest at 0 h, then gradually increased, and reached a peak at 6 h. From the time points, except for 0h, there was no significant difference in the concentration of TNF- α between the groups ($F=0.717$, $P=0.549$). At other time points, B1, B2, and B3 were significantly higher than those in group A (both $P<0.05$). The IL-6 concentration of each group was the lowest at 0 h, and the peak of group A peaked at 2 h, then gradually decreased. The peak of group B1 peaked at 4 h and then decreased. Groups B2 and B3 gradually increased from 0h and peaked at 6 h. From each time point, there was no significant difference ($F=2.341$, $P=0.092$) except for 0h treatment factor. B1, B2 and B3 were lower than group A at other time points (all $P<0.05$). After 6 hours in group A, fibrillating actin (F-actin) depolymerized, the distribution was significantly reduced, and the stress fibers were disordered or disappeared. After 6 hours in the B1, B2 and B3 groups, the distribution of F-actin was significantly more than that of the A group, and the stress fibers were arranged neatly. **Conclusion:** LPS stimulates human lung capillary endothelial cells to have obvious damage. After the addition of MT2A, the release of cell-associated inflammatory factors and cytoskeletal damage were significantly reduced, indicating that certain concentrations of MT2A have significant protective effects against LPS-mediated pulmonary capillary damage.

* 基金项目:四川省教育厅科研重点项目(17ZA0136)

作者简介:周家田(1993-),男,硕士研究生,主要研究方向:食管癌、肺癌等胸部肿瘤的研究,E-mail: 863830856@qq.com

Δ 通讯作者:梁卫东(1968-),男,硕士研究生导师,副教授,主要研究方向:食管癌、肺癌、纵膈肿瘤、胸部创伤、瓣膜外科疾病,

E-mail: 53701944@qq.com,电话:13881905797

(收稿日期:2019-07-30 接受日期:2019-08-25)

Key words: Metallothionein 2A; Lung injury; Lung protection; Inflammatory factor; Cytoskeleton; Lipopolysaccharid

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1051-06

前言

急性肺损伤(ALL)主要特征是严重的低氧血症、弥漫性肺泡损害和肺浸润,肺血管内皮细胞损伤、凋亡在急性肺损伤中占重要作用,其屏障作用破坏是急性肺损伤的标志,其病理学改变为肺毛细血管及肺泡上皮细胞的大面积损伤,特别是由革兰氏阴性细菌引起的。革兰氏阴性细菌的胞外脂质(LPS)是先天免疫反应和炎症的促进剂,能够刺激炎症细胞产生各种炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6,从而介导炎症反应并造成细胞损伤。最近的研究表明,LPS 能够诱导多种不同类型的血管内皮细胞损伤、凋亡,包括人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和人类微血管内皮细胞^[1-4]。肺微血管内皮细胞(Pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)是肺部炎症过程中炎症细胞因子的主要靶点,其屏障功能在炎症反应中起着非常重要作用,防止血小板、白细胞粘附及有害物质进入组织。在 LPS 介导的直接损伤和多形核白细胞(Polymorphonuclear leukocytes, PMN)的活化导致的间接损伤、细胞粘附分子(Cell adhesion molecules, CAMs)的抑制作用导致的损伤等在肺内皮细胞损伤中占主体地位。

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是低分子量(6-7kDa)蛋白质,是一种广泛存在哺乳动物、高等植物及某些原核生物中的蛋白,是富含半胱氨酸分子的大家族^[5]。人 MT 由 11 种功能异构体组成:MT-1 (A,B,E,F,G,H,M 和 X),MT-2 (称为 MT2A),MT-3、MT-4。据报道 MTs 在各种动物模型中起到保护作用,包括脂多糖诱导的肺损伤^[6]、类风湿性关节炎^[7]、多发性硬化^[8]、凝血障碍^[9]、乙醇诱导的胃十二指肠粘膜损伤^[10]和幽门螺杆菌引起的胃炎^[11]。MT2A 由 61 个氨基酸组成,其特征在于低分子量(7kDa)、高半胱氨酸含量(30%)和芳香族氨基酸缺乏^[12]。MT2A 的功能是调节金属稳态、解毒、氧化应激、免疫防御、细胞周期进程、细胞增殖和分化以及血管生成^[13]。Liu Y^[14]等为了研究 MT2A 是否涉及 LPS 产生的 IL-6,用敲除 MT2A 基因的 HUVEC 细胞培养一段时间后用 LPS 处理,检测到 IL6 的含量明显增加,证明 MT2A 基因能被 LPS 激活,并且在 HUVEC 细胞中 LPS 诱导的 IL-6 表达中起关键作用。本文通过培养人肺毛细血管内皮细胞,经 LPS 介导损伤后检测细胞骨架及相关炎症因子释放情况,同时探讨 MT2A 对于肺损伤的保护作用,为临床建立离体纯化的 MT2A 对肺的保护作用的理论依据,改进或增加治疗方法,提高治疗效果。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

实验所用 HPMVEC 细胞购自美国 SCIENCECELL 公司,人白介素 6(IL-6)试剂盒和人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒购自贝赛维斯(中国)有限公司,DMEM 培养基、牛血清白蛋白、L-谷氨酰胺和 HEPES 购自美国 GIBCO 公司,胰蛋白酶购自美国 Invitrogen 公司,LPS、TRITC-鬼笔环肽、胎牛血清、青霉素、链

霉素和 DMSO 购自美国 Sigma 公司,人 MT2A 蛋白购自美国 Proteintech 公司,TritonX-100 购自广州威佳科技有限公司。

1.2 细胞培养

37℃ 恒温水浴锅快速复苏人肺毛细血管内皮细胞株(HPMVECs),调整细胞浓度,稀释成约 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于培养皿中,采用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱常规培养,每 3 天更换培养液,细胞长满时以 0.25% 胰蛋白酶消化传代,2-4 代可用于实验。

1.3 细胞分组

将第 2-4 代传代细胞与于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 24-48 小时后,倒置显微镜下观察,待细胞融合至 80%-90% 时去其含有胎牛血清的 RPMI1640 的完全培养基,换用无胎牛血清的培养基培养 2-4 小时后用于实验。实验分为 2 组,即对照组(A):蒸馏水加入含有 LPS 500 ng/mL 组的细胞中,并以含有胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养;实验组(B):根据 MT2A 的浓度设置分为 3 个亚组,即:B1 MT2A 50 ng/mL+LPS 500 ng/mL 1 mL 加入培养孔,并以含有胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养;B2 MT2A 250 ng/mL+LPS 500 ng/mL 加入培养孔,并以含有胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养;B3 MT2A 500 ng/mL+LPS 500 ng/mL 加入培养孔,并以含有胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基培养。

取 96 孔板,根据实验分组设置培养孔,同时设置 5 个对照孔,每孔植入清洁无菌圆形玻片,将肺毛细血管内皮细胞(HPMVECs)按照 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于培养板孔中,加入含有胎牛血清的 RPMI1640 的培养基培养,分别于培养后 0、2、4、6 小时时留取培养基,1500 rpm,3 min 后取其上清。培养 24 小时后更换为无血清的 RPMI1640 的培养。

1.4 ELISA 法检测 IL-6、TNF- α

1)提前 20 分钟从 -20℃ 冰箱中取出试剂盒,平衡至室温。2)配置洗涤液、标准品、检测抗体(抗待测物抗体)工作液、以及二抗[抗(抗待测物抗体)抗体-HRP]工作液。3)加样:分别设置空白孔、标准孔、待测样品孔,标准孔加系列稀释度的标准品,空白孔加入样品稀释液 50 μL ,带测孔加待测样品;同时每孔加检测抗体(抗待测物抗体)工作液 50 μL ,各孔加完后给酶标板覆膜,并轻轻震荡板子混匀,37℃ 孵育 60 分钟。4)洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1-2 分钟,洗涤液 350 $\mu\text{L}/\text{孔}$,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干;5)加二抗工作液:立即每孔加入配好的二抗[抗(抗待测物抗体)抗体-HRP]工作液 100 μL (使用前 15 分钟内配制)。6)洗板:弃去孔内液体,甩干,洗板 3 次,每次浸泡 1-2 分钟,洗涤液 350 $\mu\text{L}/\text{孔}$,甩干并在吸水纸上轻拍,将孔内液体拍干。7)加底物读数:每孔加底物溶液(TMB)90 μL ,酶标板加上覆膜 37℃ 避光孵育 15 分钟左右。每孔加终止液 50 μL ,终止反应,待颜色变黄后立即用酶标仪在 450 nm 波长测各孔的光密度,并换算。

1.5 细胞骨架观察

从 96 孔板中取出玻片,待其自然干燥后用 3.7% 的甲醛固

定 10 min, 用 PBS 洗液清洗各组玻片后, 用 0.1% 的 Triton-100 处理细胞约 10 min, 清洗玻片。将 TRITC 标记的鬼笔环肽 (50 μ g/ml) 1:600 稀释, 加入牛血清白蛋白后对细胞进行染色, 暗室、室温下染色 30-40 min。再次用 PBS 液清洗玻片, 待其干燥后用 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察各组细胞骨架形态变化。

1.6 统计学分析

本研究所有数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两个独立样本比较采用 t 检验, 对于重复测量数据比较采用重复测量方差分析, 符合球形对称的采用 Mauchly's W 检验, 不符合 "球形假设" 的采用 Greenhouse-Geisser 公式校正自由度, 以 $P < 0.05$ (双侧) 为差异有统计学意义。

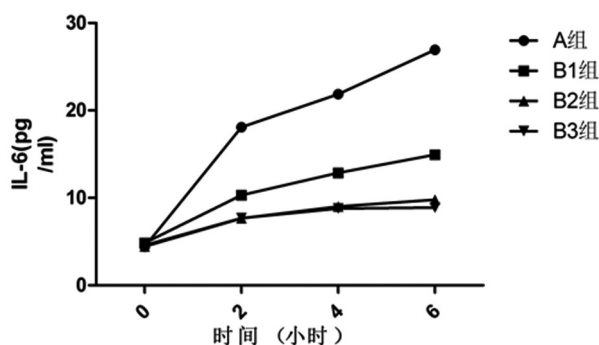


图 1 IL-6 浓度与时间关系

Fig.1 The relationship between IL-6 concentration and time

2 实验结果

2.1 IL-6、TNF- α 浓度与时间关系

由图 1、图 2 中可以看出, 0 小时时各组之间 IL-6、TNF- α 的浓度变化不大, 2 小时时 A 组 (加入 LPS+生理盐水组) IL-6、TNF- α 浓度明显升高, 高于其他组; 往后时间点增长放缓; B1 组 (加入 LPS+MT2A50 ng/mL 组) 各时间点较 A 组 IL-6、TNF- α 浓度升高缓慢, B2 (加入 LPS+MT2A250 ng/mL 组)、B3 组 (加入 LPS+MT2A500 ng/mL 组) 升高较 B1 组更缓慢, 图 3、图 4 各组中 IL-6、TNF- α 的浓度均不同程度升高, B1、B2、B3 组与 A 组相比, HPMVECs 培养液中 IL-6、TNF- α 浓度升高不明显, 说明 MT2A 能够抑制 LPS 刺激后 HPMVECs 培养液中 IL-6、TNF- α 浓度升高。

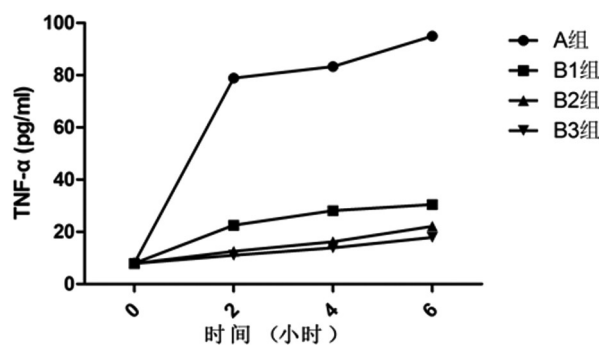


图 2 TNF- α 浓度与时间关系

Fig.2 The relationship between TNF- α concentration and time

2.2 TNF- α 浓度测定

表 1 显示各分组前后不同时间点之间存在显著差异 ($F = 20761.171, P < 0.001$); 不同处理因素间存在显著差异 ($F = 75398.601, P < 0.001$); 处理因素与处理时间前后存在交互效应 ($F = 6904.579, P < 0.001$)。各处理因素均在 0 h TNF- α 浓度最低,

随之逐渐升高, 到 6 h 达到高峰。从各时间点来看, 除 0 h TNF- α 浓度无显著差异外 ($F = 0.717, P = 0.549$), 其余各时间点 B1、B2、B3 均高于 A 组 (均 $P < 0.05$)。与 B1 相比, B2、B3 在 2 h、4 h、6 h 均高于 B1 水平 (均 $P < 0.05$)。与 B2 相比, B3 在 2 h、4 h、6 h 均高于 B2 水平 (均 $P < 0.05$)。

表 1 实验中各组 TNF- α 浓度变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$ 单位: pg/mL)

Table 1 Changes in TNF- α concentration in each group during the experiment ($\bar{x} \pm s, n=6$ units: pg/mL)

Groups	0 h	2 h	4 h	6 h
A group	8.04 $\pm$ 0.09	78.88 $\pm$ 0.23	83.26 $\pm$ 0.78	94.94 $\pm$ 0.87
B1 group	7.94 $\pm$ 0.31	22.56 $\pm$ 1.16 ^a	28.14 $\pm$ 0.80 ^a	30.42 $\pm$ 0.88 ^a
B2 group	7.86 $\pm$ 0.33	12.53 $\pm$ 0.57 ^{ab}	16.23 $\pm$ 0.53 ^{ab}	22.10 $\pm$ 0.56 ^{ab}
B3 group	7.90 $\pm$ 0.28	11.07 $\pm$ 0.39 ^{abc}	13.90 $\pm$ 0.25 ^{abc}	17.91 $\pm$ 0.24 ^{abc}
F	0.717	45898.724	23817.587	24605.166
P	0.124	<0.001	<0.001	<0.001

Note: The main effect of treatment factors, $F = 75398.601, P < 0.001$; time factor main effect, $F = 20761.171, P < 0.001$; interaction between the two, $F = 6904.579, P < 0.001$; compared with group A, ^a $P < 0.05$ ^b $P < 0.05$ compared to the B1 group; ^c $P < 0.05$ compared to the B2 group.

2.3 IL-6 浓度测定

表 2 中各分组前后不同时间点之间存在差异 ($F = 1765.859, P < 0.001$); 不同处理因素间存在差异 ($F = 2096.176, P < 0.001$); 处理因素与处理时间前后存在交互效应 ($F = 206.915, P < 0.001$)。各处理因素均在 0 h IL-6 浓度最低, A 组在 2 h 达到高峰, 随后逐渐下降; B1 组在 4 h 达到高峰, 随之下降; B2、B3 组从 0 h 开

始逐渐升高, 到 6 h 达到峰值。从各时间点来看, 除 0 h 各处理因素无显著差异外 ($F = 2.341, P = 0.092$), 其余各时间点 B1、B2、B3 均显著低于 A 组 (均 $P < 0.05$)。与 B1 相比, B2、B3 在 2 h、4 h、6 h 均显著低于 B1 水平 (均 $P < 0.05$)。与 B2 相比, B3 在 4 h、6 h 均显著低于 B2 水平 (均 $P < 0.05$), 两者在 2 h 未显示出差异。

表 2 实验中各组 IL-6 浓度变化($\bar{x} \pm s$, n=6 单位: pg/mL)

Table 2 Changes in IL-6 concentration in each group during the experiment ($\bar{x} \pm s$, n=6 units: pg/mL)

Groups	0 h	2 h	4 h	6 h
A group	4.42± 0.29	18.08± 0.39	17.68± 0.42	16.93± 0.50
B1 group	4.85± 0.39	10.30± 0.42 ^a	12.86± 1.03 ^a	10.94± 0.58 ^a
B2 group	4.43± 0.41	7.67± 0.41 ^{ab}	9.01± 0.13 ^{ab}	9.78± 0.39 ^{ab}
B3 group	4.60± 0.46	7.69± 0.46 ^{abc}	7.78± 0.39 ^{abc}	7.88± 0.32 ^{abc}
F	2.341	1227.457	506.761	645.864
P	0.092	<0.001	<0.001	<0.001

Note: The main effect of treatment factors, $F=2096.176$, $P<0.001$; time factor main effect, $F=1765.859$, $P<0.001$; interaction between the two, $F=206.915$, $P<0.001$; compared with group A, ^a $P<0.05$ ^b $P<0.05$ compared to the B1 group; ^c $P<0.05$ compared to the B2 group.

2.4 细胞骨架的变化

荧光显微镜可见:TRITC- 鬼笔环肽与肌动蛋白特异性结合后并在绿光激发下呈红色。图 3-6 中可见 A 组 (加入 LPS+生理盐水组)6 小时后 F-actin 明显解聚,分布明显减少,应力纤维排列紊乱或者消失;B1 组 (加入 LPS+MT2A50 ng/mL 组)、

B2 组 (加入 LPS+MT2A250 ng/mL 组)、B3 组 (加入 LPS+MT2A500 ng/mL 组)6 小时后,F-actin 分布减少,应力纤维排列紊乱或者部分消失,与 A 组相比,F-actin 的分布明显较多,应力纤维排列较为整齐。

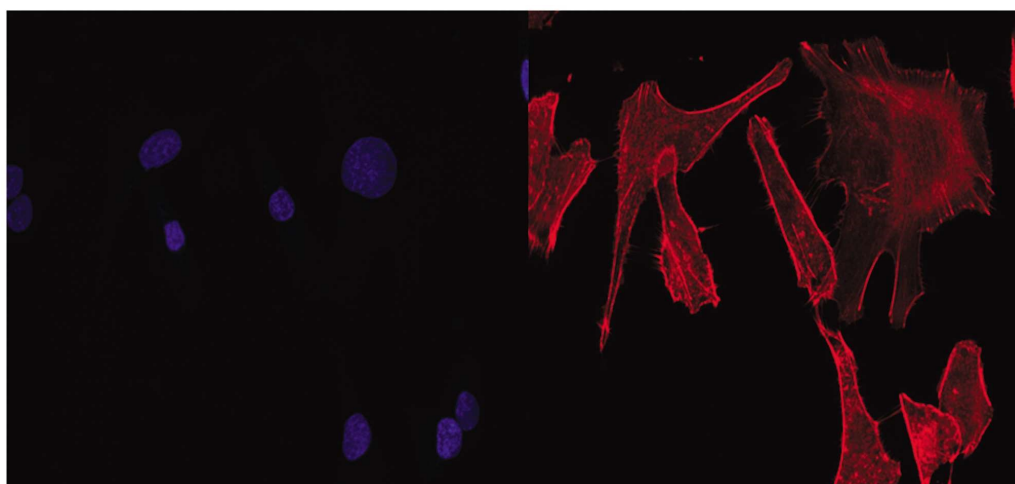


图 3 A 组细胞骨架:核周 F-actin 的分布明显减少,应力纤维排列紊乱或者消失
(左:细胞核;右:细胞骨架× 400)

Fig.3 Group A cytoskeleton: The distribution of F-actin around the nucleus is significantly reduced, and the stress fibers are disordered or disappear.

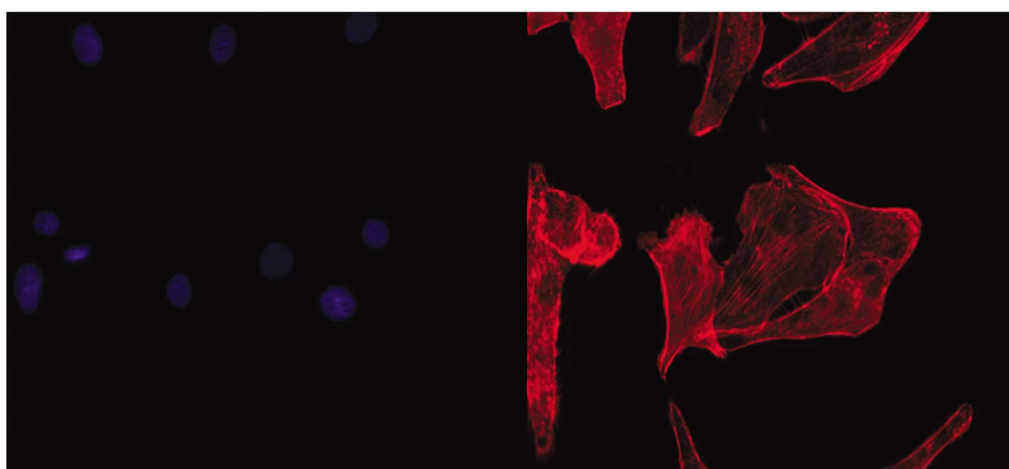


图 4 B1 组细胞骨架:核周 F-actin 分布减少,应力纤维排列紊乱或者部分消失
(左:细胞核;右:细胞骨架 X400)

Fig.4 B1 group cytoskeleton: the distribution of F-actin in the perinuclear group is reduced, and the stress fibers are arranged disorderly or partially disappeared.

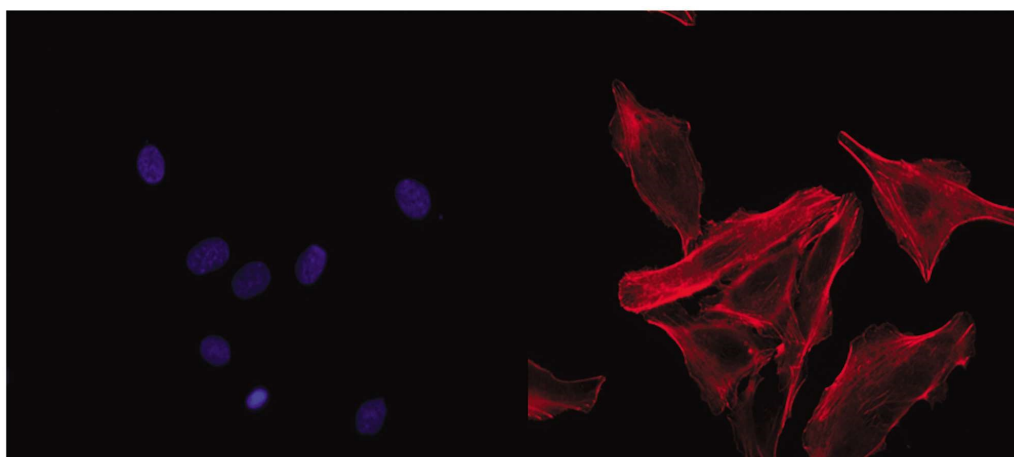


图 5 B2 组细胞骨架:核周 F-actin 分布较多,应力纤维排列稍显紊乱或者部分消失
(左:细胞核;右:细胞骨架× 400)

Fig.5 B2 group cytoskeleton: the distribution of F-actin is more than one week, and the stress fiber arrangement is slightly disordered or partially disappeared.

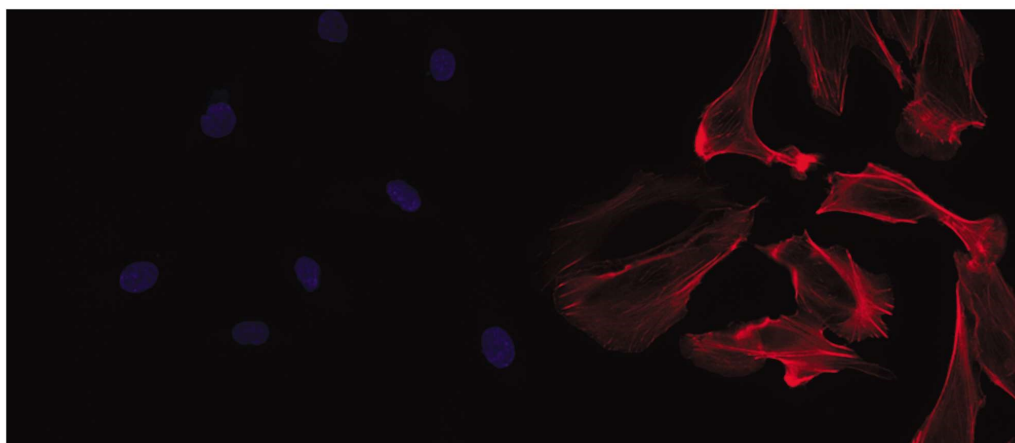


图 6 B3 组细胞骨架:核周 F-actin 分布较多,应力纤维排列稍显紊乱
(左:细胞核;右:细胞骨架× 400)

Fig.6 B3 group cytoskeleton: the distribution of F-actin is more than one week, and the stress fiber arrangement is slightly disordered.

3 讨论

肺是一个全身静脉血必经的开放的器官,经过各级支气管、气管与外界相通,因此肺容易受到外界损伤而导致相关肺部疾病,如间质性肺炎、化学性肺炎、细菌/病毒性肺部感染。如得不到有效的预防或治疗,这些疾病可以从一些早期亚临床症状发展到严重的急性肺损伤^[15],甚至急性呼吸窘迫综合症,两者均有较高的致死率。

近年来研究显示,肺血管内皮细胞不仅是严重低氧浓度血症导致的急性肺损伤的靶细胞,同时也是导致肺损伤的重要炎症效应细胞。由炎症反应所导致的肺血管内皮细胞的损伤和功能改变,反过来又会促使炎症反应进一步放大或延续,因此肺血管内皮细胞在炎症性肺损伤中的地位和作用非常重要^[16]。异常刺激,如氧化应激、炎症等可引起细胞凋亡^[17],并在氧化应激反应过程中大释放量炎症因子,如 IL-6 和 TNF- α ^[18]等。MT2A 可以调节 MAPKs,具有抗氧化、抗细胞凋亡作用,其通过抑制氧化应激介导的线粒体细胞色素 c 释放和活化的半胱天冬酶-3 来减少阿霉素诱导的心肌损伤^[19],保护人类脐带来自

与脂多糖(LPS)相关凋亡的静脉内皮细胞,以及通过结合膜受体影响细胞行为如增殖和趋化^[20]。MT2A 还可以保护内质网(ER)应激诱导的心肌衰竭与心肌细胞凋亡相关的心力衰竭^[21]。此外,MT2A 是通过下调半胱天冬酶-9 和半胱天冬酶-12 的表达而导致的凋亡的保护性蛋白^[22]。研究表明,MT-1/2 敲除将显著加重肾脏氧化损伤和间歇性低氧缺氧诱导的炎症反应^[23]。

本实验 A 组 (LPS+ 生理盐水组)、B1 组 (LPS+MT2A50 ng/mL 组)、B2 组 (LPS+MT2A250 ng/mL 组)、B3 组 (LPS+MT2A500 ng/mL 组),从浓度曲线图中可以明显看到各组中 IL-6、TNF- α 的浓度随时间的变化均有不同程度升高,并且增长趋势更加显著,说明经 LPS 刺激后 HPMVECs 培养液中 IL-6、TNF- α 浓度明显升高;且据统计学分析,IL-6 的浓度各分组前后不同时间点之间存在差异 ($F=1765.859, P<0.001$);经过不同浓度的 MT2A 处理后,B1、B2、B3 组与 A 组相比,IL-6、TNF- α 浓度升高不明显,说明 MT2A 能够抑制 LPS 刺激后 HPMVECs 培养液中 IL-6、TNF- α 浓度升高,减少炎症因子的释放,保护人肺毛细血管内皮细胞。在 6 小时后,各组之间的细胞骨架的观察我们发现,A 组小时后 F-actin 明显解聚,分布明

显减少, 应力纤维排列紊乱或者消失; B1 组、B2 组、B3 组 F-actin 分布减少, 应力纤维排列紊乱或者部分消失, 与 A 组相比, F-actin 的分布明显较多, 应力纤维排列较为整齐。可以判断, MT2A 能够抑制 F-actin 的解聚, 保护肺毛细血管内皮细胞骨架, 减少其通透性。因此我们猜测其可能有保护急性肺损伤的作用。

4 结论

一定浓度的 LPS 能够对刺激肺毛细血管内皮细胞炎性因子 IL-6、TNF- α 的释放, 造成细胞炎性损伤。同时, 也能够对肺毛细血管内皮细胞细胞骨架明显损伤, 证实 LPS 对肺毛细血管内皮细胞的损伤作用。通过实验证实, MT2A 能够减少炎性因子 IL-6、TNF- α 释放, 同时对于肺毛细血管内皮细胞细胞骨架具有保护作用。所以我们认为 MT2A 能够对于 LPS 介导的肺损伤有保护作用。

参考文献(References)

- [1] Hotchkiss R S, Swanson P E, Freeman B D, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1230-1251
- [2] Berman R S, Frew J D, Martin W. Endotoxin-induced arterial endothelial barrier dysfunction assessed by an in vitro model[J]. Br J Pharmacol, 1993, 110(4): 1282-1284
- [3] Trepels T, Zeiher A M, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation[J]. Endothelium, 2006, 13(6): 423-429
- [4] Wang Y, Chen H, Li H, et al. Effect of angiopoietin-like protein 4 on rat pulmonary microvascular endothelial cells exposed to LPS[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3): 568-576
- [5] Freisinger E, Vasak M. Cadmium in metallothioneins[J]. Met Ions Life Sci, 2013, 11: 339-371
- [6] Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, et al. Protective role of metallothionein in acute lung injury induced by bacterial endotoxin[J]. Thorax, 2004, 59(12): 1057-1062
- [7] Ashino T, Arima Y, Shioda S, et al. Effect of interleukin-6 neutralization on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expressions in arthritic mouse liver[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 558(1-3): 199-207
- [8] Pedersen D S, Fredericia P M, Pedersen M O, et al. Metallic gold slows disease progression, reduces cell death and induces astrogliosis while simultaneously increasing stem cell responses in an EAE rat model of multiple sclerosis [J]. Histochem Cell Biol, 2012, 138(5): 787-802
- [9] Inoue K, Takano H, Shimada A, et al. Role of metallothionein in coagulatory disturbance and systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice[J]. FASEB J, 2006, 20(3): 533-535
- [10] Takano H, Satoh M, Shimada A, et al. Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice[J]. Lab Invest, 2000, 80(3): 371-377
- [11] Mita M, Satoh M, Shimada A, et al. Metallothionein is a crucial protective factor against Helicobacter pylori-induced gastric erosive lesions in a mouse model [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(4): G877-G884
- [12] Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions [J]. J Trace Elem Med Biol, 2005, 19(1): 13-17
- [13] Takahashi S. Positive and negative regulators of the metallothionein gene (review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 795-799
- [14] Liu Y, Liu H, Chen W, et al. EOLA1 protects lipopolysaccharide induced IL-6 production and apoptosis by regulation of MT2A in human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 395(1-2): 45-51
- [15] Wolthuis E K, Vlaar A P, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice[J]. Crit Care, 2009, 13(1): R1
- [16] Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes J R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(9): 10697-10721
- [17] Bogatcheva N V, Verin A D. The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function [J]. Microvasc Res, 2008, 76(3): 202-207
- [18] Oikonomou N, Harokopos V, Zalevsky J, et al. Soluble TNF mediates the transition from pulmonary inflammation to fibrosis[J]. PLoS One, 2006, 1: e108
- [19] Roel M, Rubiolo J A, Temon E, et al. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction [J]. Mar Drugs, 2015, 13(8): 4633-4653
- [20] Lynes M A, Hidalgo J, Manso Y, et al. Metallothionein and stress combine to affect multiple organ systems [J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(5): 605-611
- [21] Yang L, Wang J, Yang J, et al. Antioxidant metallothionein alleviates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial apoptosis and contractile dysfunction[J]. Free Radic Res, 2015, 49(10): 1187-1198
- [22] Ma H, Su L, Yue H, et al. HMBOX1 interacts with MT2A to regulate autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15121
- [23] Wu H, Zhou S, Kong L, et al. Metallothionein deletion exacerbates intermittent hypoxia-induced renal injury in mice [J]. Toxicol Lett, 2015, 232(2): 340-348
- [19] Kang DH, Lee DJ, Lee S, et al. Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells[J]. Nature Commun, 2017, 8(1): 40-54
- [20] Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(33): 12157-12162
- [21] Manandhar G, Miranda-Vizuete A, Pedrajas JR, et al. Peroxiredoxin 2 and peroxidase enzymatic activity of mammalian spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2009, 80(6): 1168-1177
- [22] Liu J, Wang W, Liu X, et al. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function[J]. Fertil Steril, 2018, 110(6): 1058-1066
- [23] Shi H, Liu J, Zhu P, et al. Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H₂O₂-induced damage to spermatozoa [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2018, 56(3): 141-150

(上接第 1032 页)