

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00483

## 热休克蛋白 A12B 降低脂多糖诱导的血管内皮细胞通透性

康秋香<sup>1</sup>, 陈 依<sup>1</sup>, 余桂芳<sup>2</sup>, 张 旭<sup>1\*</sup>, 朱科明<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院麻醉科 ICU, 上海 200433
2. 上海交通大学医学院附属第三人民医院麻醉科, 上海 201999

**[摘要]** **目的** 探讨脂多糖诱导下血管内皮细胞热休克蛋白 A12B(HSPA12B)表达的改变及其对血管内皮通透性的影响。**方法** 体外传代培养人脐静脉内皮细胞,并将其分为空白组(未进行任何处理)、脂多糖(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )诱导组、脂多糖+HSPA12B高表达组(转染 HSPA12B 过表达质粒)和脂多糖+阴性质粒对照组(转染阴性对照质粒)。采用电阻抗检测仪检测脐静脉内皮细胞的跨内皮电阻抗,流式细胞仪检测血管内皮钙黏素(VE-cadherin)的表达,蛋白质印迹、PCR 检测 HSPA12B 的表达改变。**结果** 脐静脉内皮细胞经脂多糖诱导后,细胞中 HSPA12B 表达在 0~12 h 内上调,12 h 时达高峰。HSPA12B 能使脐静脉内皮细胞的跨内皮电阻抗值明显升高( $P<0.001$ ),并能完全对抗脂多糖诱导造成的跨内皮电阻抗值的下降( $P<0.001$ )。HSPA12B 能使脐静脉内皮细胞细胞膜上 VE-cadherin 的表达上调。**结论** HSPA12B 可能通过上调 VE-cadherin 表达降低血管内皮细胞的通透性,从而保护血管内皮的屏障功能。

**[关键词]** 热休克蛋白 A12B;脂多糖类;人脐静脉内皮细胞;跨内皮电阻抗

**[中图分类号]** R 361.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0483-05

## Heat shock protein A12B decreases lipopolysaccharide-induced permeability of human umbilical vein endothelial cells

KANG Qiu-xiang<sup>1</sup>, CHEN Yi<sup>1</sup>, YU Gui-fang<sup>2</sup>, ZHANG Xu<sup>1\*</sup>, ZHU Ke-ming<sup>1\*</sup>

1. Department of Anesthesiology (Intensive Care Unit), Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Anesthesiology, the 3<sup>rd</sup> People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the lipopolysaccharide (LPS)-induced changes of heat shock protein A12B (HSPA12B) expression and its effect on the permeability of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** The HUVECs cultured *in vitro* were divided into four groups: control group (without any treatment); LPS group (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS); LPS + pIRES2-EGFP-HSPA12B-3Flag group (The HSPA12B gene overexpression plasmid was transiently transfected into HUVECs and then LPS of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was added); and LPS + pIRES2-EGFP-3Flag group (The negative control plasmid was transiently transfected into HUVECs and then LPS of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was added). The transendothelial electrical resistance (TEER) of HUVECs was measured by MERSST $\times$ 01 Electrode. The expression of VE-cadherin was studied by flow cytometry. RT-PCR and Western blotting analysis were used to examine the expression changes of HSPA12B mRNA and protein in HUVECs stimulated with LPS at various time points. **Results** It was showed that after stimulated with LPS, HSPA12B mRNA and protein were gradually upregulated, and peaked at 12 h. HSPA12B significantly increased the TEER value of HUVECs ( $P<0.001$ ), and it could completely offset the decline of TEER value induced by LPS ( $P<0.001$ ). Besides, HSPA12B could cause upregulation of VE-cadherin expression. **Conclusion** HSPA12B can reduce the permeability of vascular endothelial cells by up-regulating the expression of VE-cadherin, thus protecting the vascular endothelial barrier function of endothelial cells.

**[Key words]** heat-shock protein A12B; lipopolysaccharides; human umbilical vein endothelial cells; transendothelial electrical resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 483-487]

**[收稿日期]** 2014-12-18 **[接受日期]** 2015-03-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270128). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270128).

**[作者简介]** 康秋香, 硕士生. E-mail: 444348048@qq.com

\* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-31161845, E-mail: zhangxu918@aliyun.com; Tel: 021-31161844, E-mail: kmzhu@aliyun.com

脓毒症是严重感染导致的全身炎症反应综合征。急性肺损伤是脓毒症最常见的并发症之一<sup>[1]</sup>。肺微血管内皮细胞(PMVEC)损伤引起的肺通透性增高在脓毒症急性肺损伤的发生发展中起着关键作用<sup>[2-3]</sup>。热休克蛋白 A12B(HSPA12B)是热休克蛋白 HSP70 超家族中的一员,主要表达于血管内皮细胞,与血管的生成和稳定有关<sup>[4]</sup>。研究表明,HSPA12B对脂多糖(LPS)诱导的小鼠 PMVEC 具有一定保护作用(可抑制内皮细胞的炎症反应)<sup>[5]</sup>。探讨 HSPA12B 对血管内皮通透性的直接影响,对临床脓毒症急性肺损伤的研究更具价值。本研究拟通过体外实验,构建高表达 HSPA12B 的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),检测该细胞经 LPS 诱导后的跨内皮电阻抗 (TEER) 和血管内皮钙黏素 (VE-cadherin) 的表达,探讨 HSPA12B 对血管内皮通透性的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞培养与主要试剂** HUVEC 由第二军医大学长海医院中心实验室保存。HUVEC 用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS、1%青/链霉素双抗)培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,根据细胞生长状态进行传代。DMEM 培养基和 10%胎牛血清购自 Gibco 公司;LPS、PrimeSTAR 酶购自 Sigma 公司;脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;TRIzol、Rever Tra Ace qPCR RT Kit (FSQ-101)均购自 ToYoBo 公司;HSPA12B 抗体购自 Santa Cruz 公司;Actin 抗体、RIPA Buffer 购自 Cell Signaling Technology 公司;VE-cadherin 流式抗体购自 BD 公司;其他相关试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

**1.2 HSPA12B 高表达质粒的构建** 从 GenBank 中查询目的基因 HSPA12B 及其上、下游的序列,用 VectorNTI 软件进行引物设计。扩增目的基因所用的上、下游引物序列分别为 5'-GAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACCATGTTGGCTGTCCCGGAG-3' 和 5'-ATTCTGAAGCTTGAGCTCGAGGTTGGA-AAGAAAGTCGATGGA-3'。使用高保真的 PrimeSTAR 酶扩增目的基因,目的基因 PCR 扩增成功后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,把目的基因条带从琼脂糖凝胶电泳后的胶中割下来,并做胶回收(按胶回

收试剂盒说明进行)。用限制性内切酶 *Nhe* I-HF 和 *Xho* I 对表达载体及目的基因片段进行双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的基因。将酶切后的目的基因与表达载体进行同源重组,然后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。用 PCR 筛选阳性克隆。经测序鉴定无误后进行质粒抽提,用于后续实验。

**1.3 HSPA12B 高表达 HUVEC 细胞的获得及 LPS 处理方法** 将 HSPA12B 高表达质粒转染至 HUVEC。具体步骤如下:转染前 1 d 将 HUVEC 接种到 6 孔板,待细胞达到 70%~80%融合度时,采用 Lipofectamine2000 将每孔 2  $\mu$ g 的 HSPA12B 高表达质粒及阴性质粒瞬时转染入 HUVEC 细胞。转染后 6~8 h 更换完全培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,36 h 后加入终浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 LPS。

**1.4 HSPA12B mRNA 表达的检测** 细胞进行处理后,用 TRIzol 试剂充分裂解细胞,进一步提取细胞总 RNA,采用 Rever Tra Ace qPCR RT Kit 将 1  $\mu$ g 总 RNA 在 37℃ 30 min、98℃ 5 min 的条件下反转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板,用半定量 PCR 法检测 HSPA12B 的 mRNA 表达水平。反应体系:10  $\times$  PCR Buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 各 1.2  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.25  $\mu$ L, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至总反应体系 20  $\mu$ L。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 45 s,72℃ 20 s,共 28 个循环;72℃ 7 min。扩增 HSPA12B 所用的上、下游引物序列分别为 5'-CCTTCATTGACTTCTACCGC-3' 和 5'-GGCTTCACAAGACATTCGG-3', 扩增内参 GAPDH 所用上、下游引物序列分别为 5'-GAAATCCCATCACCATCTTC-3' 和 5'-CTTGAGGCTGTTGTCATACTTC-3'。扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

**1.5 HSPA12B 蛋白表达的检测** 细胞处理后,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白。采用 Pierce 蛋白定量试剂盒 BCA 法测定每个蛋白样本的总蛋白浓度。每个样本上等量总蛋白进行 SDS-PAGE 分离目的蛋白,再用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,以 5%脱脂牛奶封闭,用鼠抗 HSPA12B 抗体(1:100)和兔抗鼠的二抗

(1:2 000) 孵育, ECL 显色曝光。

1.6 TEER 的检测 实验分为 4 组: 空白组(未进行任何处理), LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 诱导组, LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + HSPA12B 高表达组(转染 pIRES2-EGFP-HSPA12B-3Flag 质粒)和 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 空质粒对照组(转染 pIRES2-EGFP-3Flag)。细胞以  $1 \times 10^5$  接种于 Transwell 的 0.4  $\mu\text{m}$  孔径的培养皿, 用只加入相同培养基而不接种细胞的样品作为空白对照。待相应处理后, 使用 MERSST  $\times 01$  Electrode (美国 Millipore) 检测 HUVEC 细胞的 TEER 值<sup>[6]</sup>。

1.7 VE-cadherin 表达的检测 实验分为 3 组: 空白组, LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + HSPA12B 高表达组和 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 空质粒对照组。细胞进行相应处理后, 用胰酶将细胞消化, 离心收集细胞, 用  $1 \times \text{PBS}$  洗涤 1 次, 再用  $1 \times \text{PBS}$  重悬细胞, 按说明书加入流

式抗体避光反应 30 min, 离心弃上清, 加入  $1 \times \text{PBS}$ , 上机前震荡均匀, 使用流式细胞仪(BD Calibur) 检测细胞 VE-cadherin 表达, 通过计量抗体-荧光染料 的平均荧光强度来反映其表达量。

1.8 统计学处理 相同实验进行 3 次生物学重复。采用 GraphPad Prism5 软件进行数据统计学处理与分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较用 ANOVA 方差分析。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 LPS 诱导后 HUVEC 中 HSPA12B 的表达 用 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 分别处理 HUVEC 细胞 0、3、6、9、12 和 24 h 后, 用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 HSPA12B 在 mRNA 和蛋白质水平的表达。结果显示: HSPA12B 在 0~12 h 内表达上调, 12 h 达到高峰(图 1)。

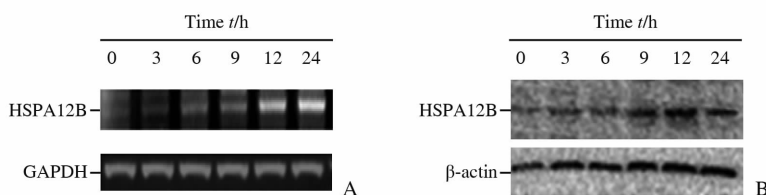


图 1 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 诱导后 HUVECs 中 HSPA12B 在不同时间点的表达

Fig 1 Expression changes of HSPA12B in HUVECs exposed to 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS at various time points

A: RT-PCR; B: Western blotting analysis. LPS: Lipopolysaccharide; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

2.2 HSPA12B 对 LPS 诱导的 HUVEC TEER 的影响 蛋白质印迹结果显示, HSPA12B 高表达质粒 pIRES2-EGFP-HSPA12B-3Flag 构建成功, 能够使 HUVEC 高表达 HSPA12B(图 2)。TEER 值检测结果显示: 空白组、LPS 组、LPS+HSPA12B 高表达组、LPS+空质粒对照组的 TEER 值分别为(36  $\pm$  2)、(25  $\pm$  1)、(45  $\pm$  2)、(28  $\pm$  1) $\Omega$ , 说明 HSPA12B 能使 HUVEC 的 TEER 值升高( $P < 0.001$ ), 并能完全对抗 LPS 诱导造成的 TEER 值的下降( $P < 0.001$ )。

2.3 HSPA12B 对 LPS 诱导的 HUVEC 细胞表面 VE-cadherin 表达的影响 分别处理 12 h 后, 空白组、LPS+HSPA12B 高表达组和 LPS+空质粒对照组中 HUVEC 细胞表面 VE-cadherin 的阳性百分比

分别为(2.48  $\pm$  0.38)%、(4.53  $\pm$  0.89)%、(1.47  $\pm$  0.28)% (图 3)。LPS+HSPA12B 高表达组的 VE-cadherin 表达水平较 LPS+空质粒对照组高, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。

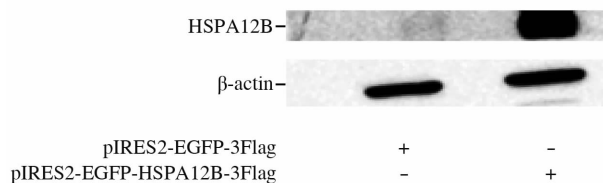


图 2 HSPA12B 高表达质粒在 HUVECs 中的表达(蛋白质印迹分析)

Fig 2 Verification of pIRES2-EGFP-HSPA12B-3Flag expression in HUVECs (Western blotting analysis)

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

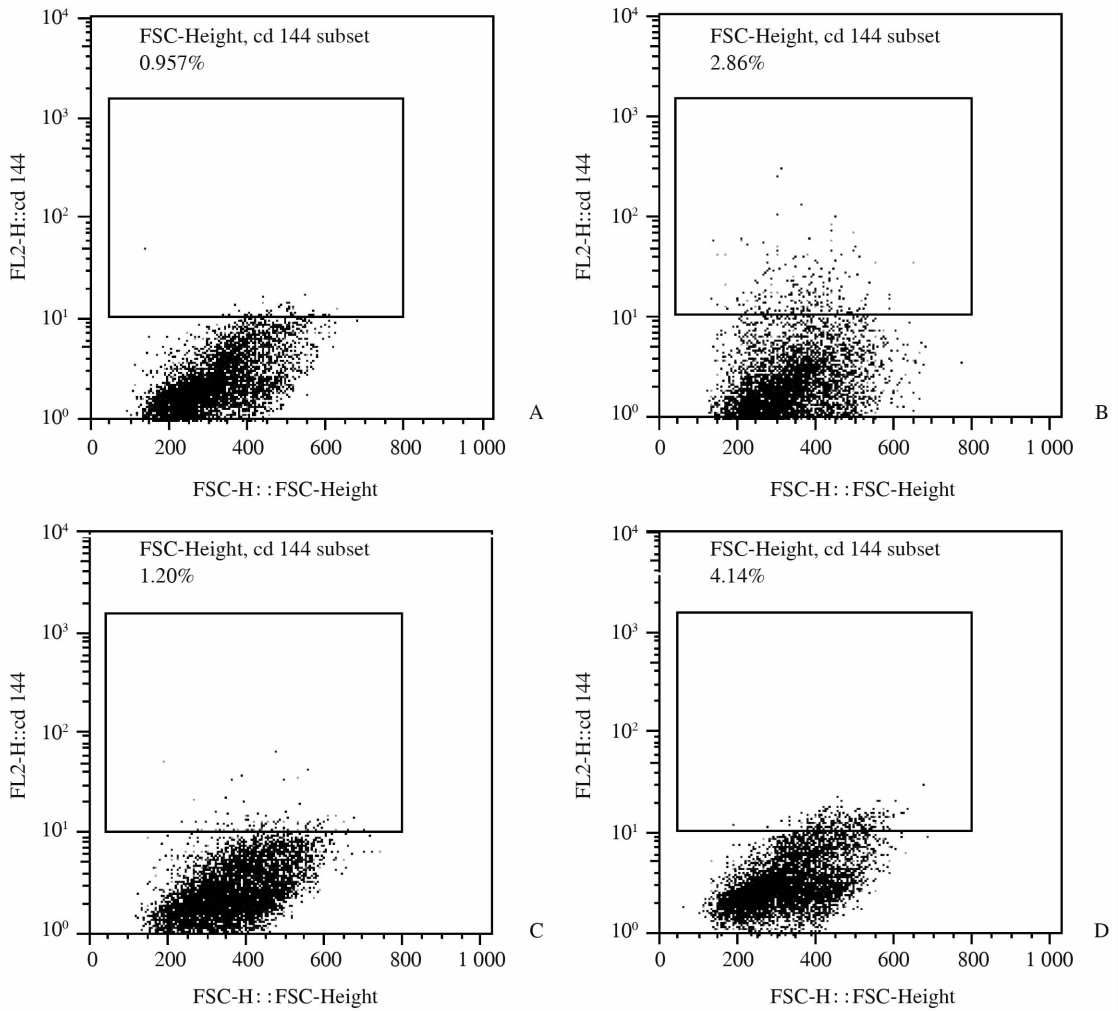


图3 HSPA12B对LPS诱导的HUVEC细胞表面VE-cadherin表达的影响

Fig 3 Effects of HSPA12B on VE-cadherin expression in HUVECs exposed to LPS

A: Isotype; B: Control; C: LPS + pIRES2-EGFP-3Flag; D: LPS + pIRES2-EGFP-HSPA12B-3Flag. LPS: Lipopolysaccharide; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

### 3 讨论

重症感染、烧伤、创伤等导致的脓毒症，仍然是ICU患者的主要死亡原因<sup>[7]</sup>。尽管目前现代医学已取得长足的进步，但脓毒症发病率仍不断攀升，其死亡率居高不下。急性肺损伤是脓毒症最常见的并发症之一，迄今为止还没有一种基于其病理生理机制的治疗能够降低肺损伤程度或者改善患者的临床症状。其主要病理特征为肺微血管通透性增高，肺泡渗出富含蛋白质的液体，进而导致肺水肿及透明膜形成，可伴有肺间质纤维化<sup>[8]</sup>。血管内皮细胞屏障功能的完整性在脓毒症急性肺损伤的发生、发展中起着重要作用，因此寻找在脓毒症时能保护内皮细胞的屏障功能的分子显得至关重要。

近年来，在脓毒症内皮细胞损伤研究中，热休克

蛋白 HSPA12B 逐渐受到关注<sup>[9]</sup>。HSPA12B 主要表达在内皮细胞中，与血管的生成和稳定有关，帮助血管内皮细胞抵御多种有害因素的侵犯<sup>[4]</sup>。因此，HSPA12B 可能参与了内皮细胞屏障功能的维持。本研究结果显示，LPS 处理 HUVEC 后 HSPA12B 的表达在 12 h 时达到高峰，提示 HSPA12B 可能与脓毒症内皮细胞功能的改变相关。

TEER 值的检测目前被广泛应用于内皮细胞通透性的评价当中<sup>[10]</sup>。TEER 值升高说明内皮细胞跨膜电阻增加，通透性降低；反之，则说明内皮细胞跨膜电阻降低，通透性升高。本研究结果显示，HSPA12B 过表达质粒转入 HUVEC 后，能明显升高 LPS 处理后 HUVEC 的 TEER 值，降低其通透性，提示 HSPA12B 在脓毒症时起到了保护内皮细胞屏障功能的作用。

内皮细胞间的连接主要包括黏附连接和紧密连接,其中 VE-cadherin 是细胞间黏附连接的最主要成分,在维持血管内皮完整性方面起着关键作用<sup>[11]</sup>。在胚胎期,VE-cadherin 参与了血管系统的生成与稳定;成年期,则调控着血管的通透性<sup>[12]</sup>。研究表明,如果黏附连接蛋白 VE-cadherin 表达水平降低或发生降解,抑或调控其黏附连接结构形成及稳定性的因素减弱或消失,都将导致内皮屏障功能障碍<sup>[13]</sup>。因此,VE-cadherin 被认为在血管内皮细胞的通透性中起着决定性的作用<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,HSPA12B能使 LPS 处理的 HUVEC 细胞表面的 VE-cadherin 明显升高,提示 HSPA12B 可能通过上调 VE-cadherin 的表达,从而起到保护内皮细胞屏障功能的作用。

血管内皮通透性屏障功能障碍是脓毒症发病机制的关键环节,尤其是脓毒症急性肺损伤发生发展的中心环节。而目前对于脓毒症及其并发症急性肺损伤的治疗仍局限于抗感染、液体保守治疗及保护性肺通气等措施,还没有针对内皮屏障功能障碍这一病理生理机制以便有效减轻患者的肺损伤程度、改善其病情的治疗措施<sup>[8,14]</sup>。因此,保护肺内皮屏障的完整性可能成为治疗急性肺损伤新的研究方向。结合我们的实验,HSPA12B 可能从病理生理机制方面为临床治疗脓毒症及急性肺损伤提供新的潜在靶点。

## [参考文献]

[1] Sadowitz B, Roy S, Gatto L A, Habashi N, Nieman G. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9: 1169-1178.

[2] Matthay M A, Zemans R L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 147-163.

[3] Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis

[J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36: 1286-1298.

[4] Steagall R J, Rusinol A E, Truong Q A, Han Z. HSPA12B is predominantly expressed in endothelial cells and required for angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26:2012-2018.

[5] 余桂芳,张旭,朱科明. 热休克蛋白 A12B对脂多糖诱导肺微血管内皮细胞损伤的影响[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2014, 34:1022-1026.

[6] Wang L, Luo H, Chen X, Jiang Y, Huang Q. Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9:e90472.

[7] Stearns-Kurosawa D J, Osuchowski M F, Valentine C, Kurosawa S, Remick D G. The pathogenesis of sepsis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:19-48.

[8] Herold S, Gabrielli N M, Vadász I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305:L665-L681.

[9] Zouein F A, Kurdi M, Booz G W. HSPA12B and repairing the heart: beauty in simplicity [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99:587-589.

[10] Miao Y S, Zhao Y Y, Zhao L N, Wang P, Liu Y H, Ma J, et al. MiR-18a increased the permeability of BTB via RUNX1 mediated down-regulation of ZO-1, occludin and claudin-5 [J]. *Cell Signal*, 2014, 27:156-167.

[11] Gulino-Debrac D. Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function [J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1:e24180.

[12] Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity [J]. *Dev Cell*, 2013, 26:441-454.

[13] Bhattacharya J, Matthay M A. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury [J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75:593-615.

[14] Gill S E, Taneja R, Rohan M, Wang L, Mehta S. Pulmonary microvascular albumin leak is associated with endothelial cell death in murine sepsis-induced lung injury *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e88501.