

1-磷酸鞘氨醇对过氧化氢所致微血管通透性增高的影响

张丽志^{1,2}, 苏健², 温克^{1*} (1.天津医科大学基础医学院药理教研室, 天津 300070; 2.天津市第一中心医院妇产科, 天津 300192)

摘要: 目的 研究 1-磷酸鞘氨醇(S1P)对氧化应激状态下过氧化氢引起的大鼠微血管通透性增高的影响。方法 应用大鼠在体肠系膜微血管灌注的方法, 通过外源性给予过氧化氢模拟病理条件下氧化应激状态, 并通过测定微静脉的静水传导性(hydraulic conductivity, Lp), 观察 S1P 对过氧化氢引起的微血管通透性增高的影响; 并利用在体免疫荧光组织化学技术, 观察 S1P 对过氧化氢引起的内皮细胞粘附连接主要成分钙粘蛋白(VE-Cadherin)、F-肌动蛋白变化的影响。结果 过氧化氢可增加微血管 Lp 至正常对照的 6.13 ± 0.87 倍($P < 0.01$); 微血管经 S1P 预处理后, 再给予过氧化氢未出现 Lp 的明显变化, 与对照值比较无显著性差异。免疫荧光组织化学检测结果显示: 过氧化氢可改变内皮细胞 F-肌动蛋白形态及分布, 细胞 F-肌动蛋白分布紊乱不规则, 细胞内部有密集的应力纤维形成。过氧化氢也可影响 VE-Cadherin 正常结构, 导致粘附连接断裂, 细胞间隙形成。而 S1P 预处理可抑制过氧化氢对 VE-Cadherin 和 F-肌动蛋白的影响。结论 S1P 可抑制过氧化氢引起的血管通透性增高, 其机制可能与 S1P 抑制应力纤维形成、加强内皮细胞间粘附连接, 抑制细胞间隙形成有关。**关键词:** 血管通透性; 1-磷酸鞘氨醇; 过氧化氢; 静水传导性; 血管内皮细胞钙粘蛋白; 肌动蛋白

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)01-0006-04

Effect of Sphingosine 1-Phosphate on the Increased Microvessel Permeability Induced by H₂O₂

ZHANG Lizhi^{1,2}, SU Jian¹, WEN Ke^{1*} (1.Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) on the increased microvessel permeability of rat induced by hydrogen peroxide(H₂O₂). **METHODS** The method of rat mesenteric microvascular perfusion *in vivo* was used. Microvessel permeability was assessed by measuring hydraulic conductivity(Lp). The microvessel were stained with immunofluorescence technique and examined with laser confocal microscopy to observe the effect of S1P on the changes of vascular endothelial-cadherin (VE-Cadherin) and F-actin caused by H₂O₂. **RESULTS** H₂O₂ increased Lp to 6.1 ± 0.9 times of the control($P < 0.01$), but after pretreatment with S1P, H₂O₂ did not give rise to a further significant change. Immunofluorescence study showed that H₂O₂ could change F-actin cytoskeletal architecture. F-actin arranged disorderly and irregularly. Formation of stress fiber was observed in the middle part of cell. H₂O₂ could also restructure VE-Cadherin. Detachment of adherent junction and formation of endothelial gap was observed. Pretreatment with S1P could inhibit the change of VE-Cadherin and F-actin induced by H₂O₂. **CONCLUSION** S1P can improve the increased microvessel permeability caused by H₂O₂, which might mediated by inhibiting the formation of stress fibre and endothelial gaps, strengthening adherent junction.

KEY WORDS: microvessel permeability; sphingosine 1-phosphate; hydrogen peroxide; hydraulic conductivity; vascular endothelial-cadherin; actin

氧化应激状态下, 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的过多积聚可引起血管内皮细胞的功能和结构的异常^[1], 表现为内皮细胞屏障功能减弱、通透性增加、炎细胞黏附增加、组织、器官水肿和功能障碍等。过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)是病理条件下粒细胞所释放的 ROS 的一种, 已有体外研究证实 H₂O₂ 可导致内皮细胞通透性增加^[2], 但其机制尚不清楚。1-磷酸鞘氨醇

(sphingosine 1-phosphate, S1P)是细胞膜鞘磷脂的代谢产物之一, 本实验室前期研究发现, S1P 可增强内皮细胞屏障功能, 抑制炎症状态下内皮细胞的通透性增加^[3], 但 S1P 对氧化应激或 H₂O₂ 引起的内皮细胞通透性变化是否有影响尚无研究报道。为进一步明确 S1P 保护内皮细胞的机制, 本实验应用在体微静脉插管技术观察 S1P 对 H₂O₂ 诱导的血管通透性增高的影响, 并进一步采用免疫

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173058); 天津市自然科学基金重点项目(10JCZDJC20900)

作者简介: 张丽志, 女, 博士, 副主任医师 Tel: 13820962964 E-mail: zhllizh1234@163.com *通信作者: 温克, 男, 博士, 副教授 Tel: 13820883653 E-mail: wenke@tjmu.edu.cn

荧光染色技术观察 S1P 对内皮细胞间粘附连接主要结构蛋白——血管内皮细胞钙粘蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-Cadherin)及细胞骨架肌动蛋白的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, 2~3 月龄, 体质量 220~250 g, ♂ ♀ 各半, 由天津实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(津)2005-0001。

1.2 试剂

S1P(美国 Avanti Polar Lipids 公司, 批号: 0429998-8); H_2O_2 (美国 EMD 公司); 钙粘蛋白单克隆 IgG 抗体及异硫氰酸荧光素(Fluorescein-isothiocyanate, FITC)标记驴抗羊 IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; Alexa Fluoro 488 标记的鬼笔环肽(美国 Molecular Probe 公司)。

1.3 仪器

Leica TCS SL 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司); 液压微型推进器(美国 Stoelting 公司); Olympus CK40 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 大鼠肠系膜微血管静水传导性(hydraulic conductivity, L_p)的测量

参考文献[3]的方法, 大鼠背部皮下注射 3% 戊巴比妥钠($65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉, 仰卧位固定, 腹壁做 1.5~2 cm 正中切口, 将肠系膜置于倒置相差显微镜上。选取肠系膜直径为 30~50 μm 的微静脉进行镜下微血管插管。并通过微插管灌注相应受试药物, 灌注压力为 50~80 cm 水柱。应用改良的 Landis 技术, 通过连续测量单位时间内通过单位面积微血管壁的水流量, 计算出肠系膜微血管 L_p , 可反映微血管的通透性^[4]。实验分组: 选取 32 只 SD 大鼠, 随机分为 4 组, 每组 8 只: 对照组: 灌注 1% BSA 75 min; H_2O_2 组: 首先灌注 1% BSA 15 min, 然后灌注 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$ 60 min; S1P 组: 首先灌注 1% BSA 15 min, 然后灌注 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ S1P 15 min; S1P+ H_2O_2 组: 首先灌注 1% BSA 15 min, 然后依次灌注 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ S1P 15 min 以及含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ S1P 的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$ 60 min。灌注过程中连续测量 L_p 的变化, 并计算与灌注 1% BSA 时 L_p 的比值。所有受试药物均用 1% BSA-林格氏液配制。

2.2 在体大鼠微血管内皮细胞钙粘蛋白的免疫荧光染色

实验动物分组、肠系膜微血管插管同“2.1”项下, 微静脉灌注受试药物同时, 表面滴注 1% 多聚甲醛固定 15 min。分离微静脉, PBS 漂洗 2 次, 每次 10 min。然后用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 漂洗 30 min。室温下含 1% BSA 及 0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭 30 min。加入钙粘蛋白单克隆 IgG 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。含 1% BSA 的 PBS 漂洗 3 次后, 加入 FITC 标记的二抗室温避光孵育 30 min, 用激光共聚焦显微镜观察。激发波长 490 nm, 发射波长 520 nm。选择 xy 扫描方式, 用 Leica 三维重建软件对连续断层扫描数据进行处理, 显示三维图像, 观察内皮细胞 VE-Cadherin 变化。

2.3 在体大鼠微血管内皮细胞骨架肌动蛋白的免疫荧光染色

实验动物分组、肠系膜微血管插管同“2.1”项下, 微静脉灌注受试药物同时, 肠系膜表面滴注 2.5% 戊二醛 15 min。0.1% Triton X-100 表面滴注 30 min 后, 血管内灌注同时表面滴注 $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Alexa Fluoro 488 标记的鬼笔环肽及 0.1% Triton X-100 20 min。经 1% BSA-林格氏液冲洗 20 min 后, 用激光共聚焦显微镜观察。激发波长 495 nm, 发射波长 518 nm。选择 xy 扫描方式, 用 Leica 三维重建软件对连续断层扫描数据进行处理, 显示三维图像, 观察内皮细胞肌动蛋白分布情况。

2.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。显著性检验水平 $\alpha=0.05$, 显著性检验标志 $P<0.05$ 有显著差异。所有统计分析均使用 SPSS 12.0 软件计算分析。

3 结果

3.1 S1P 对 H_2O_2 所致大鼠肠系膜微血管 L_p 增加的影响

单独灌注 H_2O_2 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 60 min 可引起微血管 L_p 明显升高, 为正常对照值的 6.13 ± 0.87 倍, 与对照比较具有显著性差异($P<0.01$)。单独灌注 S1P ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可轻度降低微血管 L_p 值, 为对照值的 (0.66 ± 0.12) 倍 ($P<0.05$)。经 S1P 预处理后, 再灌注 H_2O_2 未见 L_p 明显变化。为对照值的 (0.89 ± 0.10) 倍, 与对照值比较无显著性差异, 结果见图 1。

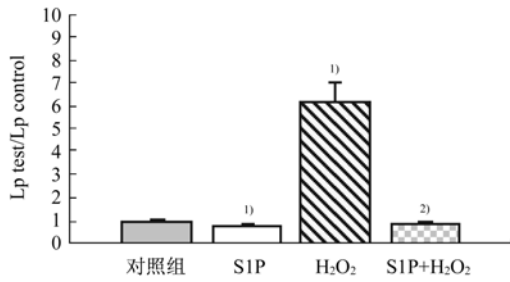


图1 S1P对H₂O₂引起的微血管通透性增加的影响(n=8, $\bar{x} \pm s$)

与对照组比较, ¹⁾P<0.01, 与H₂O₂组比较, ²⁾P<0.01

Fig 1 The effect of S1P on the increased microvessel permeability caused by H₂O₂(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with H₂O₂ group, ²⁾P<0.01

3.2 S1P对H₂O₂所致血管内皮细胞钙粘蛋白变化的影响

对照组血管内皮细胞 VE-Cadherin 主要分布于细胞周边, 位于细胞间粘附连接处, 线条清晰连续, 边缘光滑流畅, 可见明显的内皮细胞形状, 细胞间连接紧密, 未见明显间隙。而 H₂O₂ 灌注 60 min 后 VE-Cadherin 线条模糊, 呈断裂状, 边缘粗糙可见毛刺状突起。单用 S1P 未见对 VE-Cadherin 的形状有影响, 但 S1P 预处理可抑制 H₂O₂ 引起的 VE-Cadherin 结构的变化, 结果见图 2。

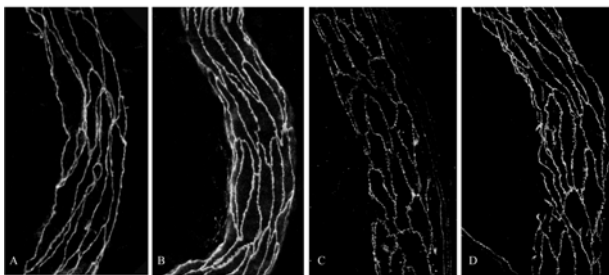


图2 激光共聚焦显微镜观察微血管内皮细胞钙粘蛋白的荧光染色(200×)

A-对照组; B-S1P组; C-H₂O₂组; D-S1P+H₂O₂组

Fig 2 The staining images of the microvessel endothelial-cadherin observed by laser confocal microscopy(200×)

A-control group; B-S1P group; C-H₂O₂ group; D-S1P+H₂O₂ group

3.3 S1P对H₂O₂所致血管内皮细胞肌动蛋白变化的影响

对照组肠系膜微静脉内皮细胞骨架蛋白 F-肌动蛋白主要分布在细胞周边, 细胞轮廓清晰完整连续, 细胞内可见 F-肌动蛋白有序的网格状结构, 胞质中未见密集的 F-肌动蛋白纤维。单用 S1P 未

见对肌动蛋白的分布有影响。微血管内皮细胞受 H₂O₂ 作用后, 细胞 F-肌动蛋白分布紊乱不规则, 细胞内部有密集的应力纤维形成。S1P 预处理后, 可抑制 H₂O₂ 对肌动蛋白的影响, 结果见图 3。

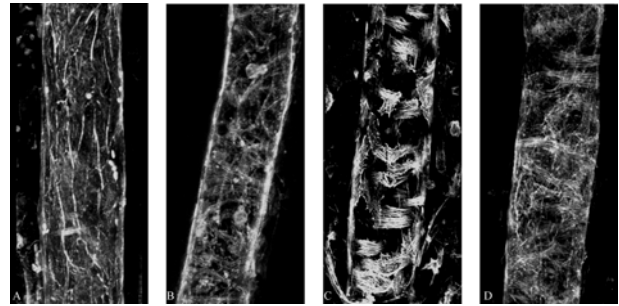


图3 激光共聚焦显微镜观察微血管内皮细胞肌动蛋白的荧光染色(200×)

A-对照组; B-S1P组; C-H₂O₂组; D-S1P+H₂O₂组

Fig 3 The staining images of the microvessel endothelial-actin observed by laser confocal microscopy(200×)

A-control group; B-S1P group; C-H₂O₂ group; D-S1P+H₂O₂ group

4 讨论

研究表明, 氧化应激与多种心血管疾病的发生发展有关, 如动脉粥样硬化、心肌缺血、高血压等^[5]。ROS 的大量产生可引起内皮细胞功能异常。本实验利用在体微血管插管技术, 通过灌注 H₂O₂ 以模拟氧化应激状态, 并进一步观察 S1P 对氧化应激条件下微血管通透性增加的影响及其相关机制。本实验发现 H₂O₂ 可增加微血管 Lp, 即增加透过微血管壁的液体流量, 提高微血管通透性, 而 S1P 预处理可抑制 H₂O₂ 引起的微血管 Lp、通透性异常。

内皮细胞间粘附连接是维持内皮细胞屏障功能、影响微血管通透性的主要结构^[6], 而 VE-Cadherin 是内皮细胞粘附连接的主要结构蛋白^[7], 其细胞外的 N 端与相邻细胞 VE-Cadherin 的 N 端互相连接, 在细胞间聚集成簇; 使相邻内皮细胞紧密粘附, 构成一个具有屏障功能的选择性的半透膜, 控制着物质在血管壁两侧的相互交换。其功能和结构的改变可引起粘附连接解离, 细胞间隙打开, 大量液体和大分子物质通过旁细胞途径进行转运, 从而导致血管通透性升高^[8]。本研究通过 FITC 标记的 VE-Cadherin 抗体免疫荧光染色技术证实 H₂O₂ 可引起 VE-Cadherin 发生形态上的变化, 破坏细胞粘附连接。而 S1P 预处理可抑制 H₂O₂

对 VE-Cadherin 的影响, 加强细胞间粘附连接, 抑制细胞间隙形成。结果表明, S1P 可抑制氧化应激条件下 H₂O₂ 对粘附连接的破坏, 抑制细胞间隙打开, 加强内皮细胞屏障功能, 抑制微血管通透性增加。S1P 可通过加强粘附连接维持内皮细胞完整性, 这与其他实验室相关体外研究结果一致^[9]。

粘附连接与细胞膜下的微丝骨架系统存在着紧密的联系, VE-Cadherin 细胞内的 C 端通过胞浆中的连环蛋白与细胞内主要骨架蛋白-肌动蛋白连接, 从而使 VE-Cadherin 锚定到细胞内的细胞骨架上^[10]。肌动蛋白在细胞内以聚合状(filamentous actin, F-actin)和球状单体(global actin, G-actin)两种形式存在。G-肌动蛋白为单体球形蛋白, 可溶于胞浆; F-肌动蛋白呈纤维状, 具有可收缩性, 是构成细胞骨架的主要成分。F-肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用而产生的中心张力与细胞间连接所产生的拴缚力相互对抗, 以维持内皮细胞正常的扁平状态以及正常的屏障功能。正常内皮细胞 F-肌动蛋白形成的微丝主要分布在细胞的周边和核周部位, 形成致密周围束。病理条件下, 肌动蛋白微丝可发生重组, 致密周围束消失, 形成由非极性单行排列的肌动蛋白丝组成的应力纤维, 中心张力增加, 引起细胞形态发生改变, 并通过 VE-Cadherin 等使细胞间粘附连接发生改变, 导致内皮细胞间隙形成, 通透性增加^[11]。鬼笔环肽可特异性与 F-肌动蛋白结合, 因此荧光标记的鬼笔环肽可特异性的显示 F-肌动蛋白。本研究选用 Alexa Fluoro 488 标记的鬼笔环肽可特异性与 F-肌动蛋白结合, 并进一步观察 S1P、H₂O₂ 血管内皮细胞 F-肌动蛋白的影响。实验结果证实, H₂O₂ 可诱导 F-肌动蛋白重组, 形成应力纤维。而 S1P 可抑制 H₂O₂ 诱导的应力纤维的形成, 并可能通过抑制应力纤维的形成, 影响粘附连接, 抑制通透性的增加。

本实验室前期研究证实, S1P 可抑制 PAF 引起的 VE-Cadherin 变化, 并抑制通透性增加。综上所述, 本研究显示, S1P 可抑制氧化应激、炎症等

病理状态的微血管通透性增加, 该作用与 S1P 抑制应力纤维形成, 保持粘附连接完整性有关。血管通透性增加主要由两个途径来介导: 旁细胞途径及穿细胞途径^[12]。本实验结果证明, S1P 可影响旁细胞途径, 但是否对穿细胞途径有影响, 尚有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] PUDDU P, PUDDU G M, CRAVERO E, et al. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension [J]. *Blood Press*, 2008, 17(2): 70-77.
- [2] FISCHER S, WIESNET M, RENZ D, et al. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway [J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(7): 687-697.
- [3] ZANG C Y, KANG Y, WEN K, et al. Effect of sphingosine 1-phosphate on increase in microvessel permeability induced by platelet activating factor [J]. *Chin J Pathophysiol*(中国病理生理杂志), 2010, 26(4): 681-685.
- [4] KENDALL S, MICHEL C C. The measurement of permeability in single rat venules using the red cell microperfusion technique [J]. *Exp Physiol*, 1995, 80(3): 359-372.
- [5] MISRA M K, SARWAT M, BHAKUNI P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(10): RA209-RA219.
- [6] DEJANA E, ORSENIGO F, LAMPUGNANI M G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 13): 2115-2122.
- [7] BAZZONI G, DEJANA E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 869-901.
- [8] LEE W L, SLUTSKY A S. Sepsis and endothelial permeability [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(7): 689-691.
- [9] MOCHIZUKI N. Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1 [J]. *Circ J*, 2009, 73(12): 2183-2191.
- [10] INGBER D E, TENSEGRITY I. Cell structure and hierarchical systems biology [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 7): 1157-1173.
- [11] SCHULTE D, KÜPPERS V, DARTSCH N, et al. Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability [J]. *EMBO J*, 2011, 30(20): 4157-4170.
- [12] KOMAROVA Y, MALIK A B. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways [J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(3): 463-493.

收稿日期: 2012-03-12