

· 论著 ·

# 内毒素对人巨噬细胞系 U937 生物学性状和生长因子分泌能力的影响

明佳 刘旭盛 刘亮 徐辉 冉新泽 程天民

**【摘要】** 目的 探讨不同浓度的内毒素/脂多糖(LPS)对人巨噬细胞系 U937 生物学性状和生长因子分泌能力的影响。方法 分别以 0.0、0.1、1.0、10.0、50.0、100.0  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 刺激体外培养的 U937, 作用 24 h 后运用四氮唑蓝(MTT)法测定细胞增殖活力, 应用流式细胞仪测定细胞凋亡率, 并用酶联免疫吸附测定法检测细胞培养上清中转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 和血管内皮生长因子(VEGF)浓度的变化。结果 与 LPS 为 0.0  $\mu\text{g/ml}$  时比较, 当其浓度为 0.1 ~ 100.0  $\mu\text{g/ml}$  时可刺激 U937 细胞凋亡、促进其分泌 TGF- $\beta_1$  ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 其中低浓度(0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$ )的 LPS 可促进 U937 增殖( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 但对 VEGF 的分泌无明显影响( $P > 0.05$ ); 高浓度(50.0、100.0  $\mu\text{g/ml}$ )的 LPS 对 U937 的增殖无促进作用( $P > 0.05$ ), 但能提高 VEGF 的分泌能力( $P < 0.01$ )。结论 LPS 可激活 U937 并促使其分泌 TGF- $\beta_1$ , 刺激浓度以 0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$  为宜; LPS 仅在较高浓度时能促进 U937 细胞分泌 VEGF。

**【关键词】** 内毒素类; 内皮生长因子; 转化生长因子- $\beta_1$ ; U937; 细胞增殖; 细胞凋亡

**Effect of lipopolysaccharide on the biological features and growth factor secretion power of U937 cell line** MING Jia, LIU Xu-sheng, LIU Liang, XU Hui, RAN Xin-ze, CHENG Tian-min. Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: LIU Xu-sheng, Email: liuxusheng2002@hotmail.com, Tel: 023-66870573

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of lipopolysaccharide(LPS) in different concentrations on the biological features and growth factor secretion power of U937 cell line. Methods In vitro cultured U937 cells were stimulated by 0 (as control), 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 and 100  $\mu\text{g/ml}$  LPS respectively for 24 hours. Thereafter, the cell proliferation ability was determined by MTT method. The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry. The changes in the contents of transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) of the supernatant of the cell culture were assessed by ELISA. Results Apoptosis and TGF $\beta_1$  secretion could be induced by LPS in dose of 0.1 to 100  $\mu\text{g/ml}$  when compared with that without LPS challenge ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). In detail, LPS in lower dose (0.1, 1.0 and 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) could promote the proliferation of U937 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ) but exerted no effect on VEGF secretion. In contrary, LPS in high dose (50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) could promote VEGF secretion ( $P < 0.01$ ) but exerted no effects on the proliferation of U937 cells. Conclusion U937 cells could be activated to increase the secretion of TGF $\beta_1$  by LPS in optimal dose of 0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , but the secretion of VEGF could only be promoted by LPS in higher concentration.

**【Key words】** Lipopolysaccharide; Vascular endothelial growth factor; Transforming growth factor  $\beta_1$ ; U937; Cell proliferation; Apoptosis

U937 细胞来源于人组织细胞淋巴瘤, 为不成熟的巨噬细胞样细胞, 缺乏成熟巨噬细胞的诸多特性。内毒素/脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或佛波酯可通过核转录因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ ) 信号通路诱导 U937 活化, 导致急性炎症反应, 表达单核-巨噬细胞的许多特征, 如表达 C3 受体和 Fc 受体<sup>[1]</sup>, 并能分泌许多

细胞因子, 它们与正常巨噬细胞所分泌的细胞因子具有相同的生理活性, 可促进血管生成和细胞增殖<sup>[2]</sup>。但是, 在目前有关 LPS 诱导 U937 的实验报道中, LPS 的用量及作用时间差异很大, 有用 0.1  $\mu\text{g/ml}$  作用 18 h 者<sup>[3]</sup>, 也有用 10.0 ~ 100.0  $\mu\text{g/ml}$  作用 72 h 者<sup>[4,5]</sup>。本研究观察了用不同剂量的 LPS 刺激 U937 24 h 后细胞增殖活力、细胞周期及其分泌的转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平的变化, 为深入研究 U937 细胞在血管生成中的作用奠定基础。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054205)

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室(明佳、刘旭盛、刘亮); 第三军医大学军事预防医学院复合伤研究所(徐辉、冉新泽、程天民)

通信(讯)作者: 刘旭盛, Email: liuxusheng2002@hotmail.com, 电话: 023-66870573

## 材 料 与 方 法

1. 主要试剂及仪器: LPS (0111:B4) 为美国 Sigma 公司产品, RPMI 1640 完全培养基为美国 Gibco 公司产品, TGF- $\beta_1$  和 VEGF 的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自北京晶美生物工程有限公司, HTS 7000 Plus 型 ELISA 测定仪为美国 Perkin Elmer 公司产品, FACS 420 型流式细胞仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

2. 细胞来源及培养: 人巨噬细胞系 U937 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 用含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基常规培养。当细胞密度达到  $2 \times 10^6$ /ml 时传代, 1 次/3 d, 使之维持在  $(1 \sim 20) \times 10^5$ /ml。

3. 细胞增殖活力测定: 采用四氮唑蓝 (MTT) 法。将 U937 细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 的密度接种于 96 孔培养板中, 200  $\mu$ l/孔, 分别加入 0.0、0.1、1.0、10.0、50.0、100.0  $\mu$ g/ml 的 LPS 进行刺激, 每种浓度 6 个复孔。刺激 20 h 后每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 离心半径 9 cm, 1000 r/min 离心 5 min。弃上清, 每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。采用 ELISA 检测仪于波长 490 nm 处测定各孔的吸光度 (A) 值。

4. 细胞凋亡率、细胞培养上清中 TGF- $\beta_1$  和 VEGF 含量的测定: 将 U937 细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 的密度接种于 6 孔培养板中, 2.5 ml/孔, 分别加入 0.0、0.1、1.0、10.0、50.0、100.0  $\mu$ g/ml 的 LPS 进行刺激, 每种浓度 6 个复孔。刺激 24 h 后, 离心半径 9 cm, 1000 r/min 离心 5 min。收集细胞培养上清, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TGF- $\beta_1$  和 VEGF 的浓度。另收集细胞沉淀, 加入预冷的磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 随后用体积分数 70% 的乙醇固定, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml, 加入等体积碘化丙啶 (PI), 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min 以上。用 300 目筛网过滤, 去除成团细胞, 应用流式细胞仪进行 DNA 细胞周期分

析, 通过检测亚二倍体核型峰的峰值, 计算出 U937 细胞的凋亡率。

5. 统计学分析: 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 统计程序对计量资料进行分析, 用 Student-Newman-Keuls 比较多组均数间的差异性。

## 结 果

1. 细胞增殖活力的变化: 与 LPS 为 0.0  $\mu$ g/ml 时比较, 当其浓度为 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/ml 时, U937 细胞活力均明显升高 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ); 当 LPS 为 50.0、100.0  $\mu$ g/ml 时, 细胞活力无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

2. 细胞凋亡率的变化: 与 LPS 为 0.0  $\mu$ g/ml 时比较, 当其浓度为 0.1 ~ 100.0  $\mu$ g/ml 时, U937 细胞的凋亡率均明显升高 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 见表 1。

3. VEGF 浓度的变化: 与 LPS 为 0.0  $\mu$ g/ml 时比较, 当其浓度为 50.0、100.0  $\mu$ g/ml 时, VEGF 浓度均明显增高 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

4. TGF- $\beta_1$  浓度的变化: 与 LPS 为 0.0  $\mu$ g/ml 时比较, 当其浓度为 0.1 ~ 100.0  $\mu$ g/ml 时 U937 细胞分泌的 TGF- $\beta_1$  均明显增多 ( $P < 0.01$ ), 其中 LPS 为 10.0  $\mu$ g/ml 时达峰值 (表 1)。

## 讨 论

单核-巨噬细胞不仅在炎症反应中发挥提呈抗原、吞噬、消化、杀伤作用, 而且还可以合成、分泌多种生物活性介质, 参与成纤维细胞、血管内皮细胞的迁移、增生, 促进血管和肉芽组织的形成。在巨噬细胞分泌的细胞因子中, 目前 TGF- $\beta_1$  和 VEGF 被研究得较多。TGF- $\beta_1$  的作用显示出剂量依赖性, 低浓度 ( $< 0.5$  ng/ml) 的 TGF- $\beta_1$  可促进内皮细胞迁移, 加强由碱性成纤维细胞生长因子、VEGF 所诱导的血管生成作用; 而高浓度 ( $> 0.5$  ng/ml) 的 TGF- $\beta_1$  则阻止内皮细胞迁移, 抑制血管生成<sup>[6,7]</sup>。VEGF 是体内重要的血管生成诱导因子, 可以刺激内皮细胞合

表 1 不同浓度的内毒素/脂多糖刺激下 U937 细胞增殖活力、凋亡率及生长因子分泌能力的改变 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The changes in cellular activity, apoptotic rate and growth factor secretion in U937 by the stimulation of LPS in different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ )

LPS 浓度 ( $\mu$ g/ml)	孔数	细胞增殖活力	细胞凋亡率 (%)	血管内皮生长因子 (pg/ml)	转化生长因子 $\beta_1$ (pg/ml)
0.0	6	0.96 $\pm$ 0.47	2.81 $\pm$ 1.28	2.90 $\pm$ 0.59	10.85 $\pm$ 0.25
0.1	6	2.39 $\pm$ 0.42**	4.80 $\pm$ 0.84*	2.80 $\pm$ 0.04	13.12 $\pm$ 0.60**
1.0	6	2.02 $\pm$ 0.22**	4.66 $\pm$ 0.27*	2.80 $\pm$ 0.05	16.86 $\pm$ 0.56**
10.0	6	1.32 $\pm$ 0.24*	4.87 $\pm$ 0.95*	3.00 $\pm$ 0.12	20.91 $\pm$ 0.18**
50.0	6	1.24 $\pm$ 0.13	6.02 $\pm$ 0.59**	8.00 $\pm$ 0.35**	18.71 $\pm$ 0.32**
100.0	6	1.24 $\pm$ 0.17	8.57 $\pm$ 1.57**	8.40 $\pm$ 0.25**	15.64 $\pm$ 0.03**

注: 细胞增殖活力的检测值为吸光度 (A) 值; 与 0.0  $\mu$ g/ml LPS 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

成蛋白酶,促进其增殖和迁移。由此可见,TGF- $\beta_1$ 和 VEGF 在血管生成中具有重要地位。

U937 细胞是目前运用较多的用以研究单核-巨噬细胞分化及功能的细胞模型,而 LPS 是诱导其产生炎症介质的最有效刺激物<sup>[8]</sup>。LPS 是革兰阴性细菌的内毒素,由 O 特异侧链、核心多糖和类脂 A 组成。据报道,未分化的 U937 细胞不能产生细胞因子,即使应用 LPS 刺激也一样<sup>[9]</sup>;但另有报道,U937 细胞经 LPS 刺激后可以分泌白细胞介素(IL)1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ <sup>[10]</sup>。

本研究结果显示:U937 细胞未经 LPS 刺激时即可分泌 TGF- $\beta_1$  和 VEGF;低浓度(0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/ml}$ )LPS 可促进 U937 细胞增殖及分泌 TGF- $\beta_1$ ,但对 VEGF 的分泌无明显影响;高浓度(50.0、100.0  $\mu\text{g/ml}$ )LPS 不促进 U937 细胞增殖,但可促使其分泌 VEGF,此时 TGF- $\beta_1$  的分泌虽较低浓度时有所下降,但仍明显高于未刺激时(LPS 为 0.0  $\mu\text{g/ml}$  时)。由此可见,TGF- $\beta_1$  和 VEGF 的分泌与 LPS 的刺激浓度呈现一定的剂量依赖关系。

流式细胞仪检测技术是目前较客观的检测细胞凋亡的手段之一,尤其在定量分析和细胞周期分析时更为有效。其原理是:将 DNA 结合染料 PI 嵌入重叠的 DNA 中,DNA 含量低于正常二倍体的细胞即为亚二倍体细胞,亦即凋亡细胞,呈现亚二倍体核型峰的特征,在 DNA 直方图上表现为 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型(Sub-G1),而二倍体峰(G1 细胞)降低。通过检测亚二倍体细胞群的峰值,即可计算出细胞的凋亡率<sup>[11]</sup>。本研究细胞凋亡检测结果表明,LPS 在浓度为 0.1~100.0  $\mu\text{g/ml}$  时均可加速 U937 的凋亡。

LPS 对细胞增殖和凋亡所产生的影响可能与 LPS 的直接毒性作用有关;而 LPS 对 U937 细胞分泌 TGF- $\beta_1$ 、VEGF 所产生的不同影响是否与二者不同的分泌机制有关,有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 1 陈政良,谢佩蓉. Clq 和抗 ClqR mAb 抑制 U937 细胞产生 TNF- $\alpha$ . 中国免疫学杂志,1996,12:203-208.
- 2 Kadl A, Huber J, Gruber F, et al. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol*, 2002,38:219-227.
- 3 王梁华,冯煜,钟山,等. Toll 样受体抗体抑制脂多糖激活巨噬细胞. 生物化学与生物物理进展,2001,28:367-371.
- 4 季晓辉,姚垒,李焕娣,等. 单核巨噬细胞对 HSV-1 的抵抗及 LPS, BCG 对其的影响. 中国免疫学杂志,1996,12:155-158.
- 5 邱劲,王小明,李惠敏,等. TNF- $\alpha$ , LPS, oxLDL 和 Ang II 诱导 U937 细胞 PDGF-B 基因转录. 中国病理生理杂志,2000,16:962.
- 6 Marie JG, Gudrun V, Susumu I, et al. Balancing the activation state of the endothelial via two distinct TGF- $\beta$  type I receptor. *EMBO J*, 2002, 21:1743-1753.
- 7 Takashi M, Robert DR, William CA. Transforming growth factor  $\beta$  mediated inhibition of the flk-1/KDR gene is mediated by a 5'-untranslated region palindromic GATA site. *J Biol Chem*, 2001, 276:5395-5402.
- 8 戴继红,许峰,鲁焕章. 内毒素刺激单核巨噬细胞活化的分子生物学. 国外医学生理病理科学与临床分册,1998,18:47-50.
- 9 Taimi M, Defacque H, Commes T, et al. Effect of retinoic acid and vitamin D on the expression of interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in the human monocytic cell line U937. *Immunology*, 1993, 79:229-235.
- 10 Tamotsu I, Ichiro H, Masakazu A, et al. Effects of interferon-gamma on cell differentiation and cytokine production of a human monoblast cell line, U937. *Inflammation*, 1995, 19:627-636.
- 11 彭刚艺,凌文华. 氧化低密度脂蛋白诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡的细胞周期分析. 第一军医大学分校学报,2000,23:12-14.

(收稿日期:2003-05-07)

(本文编辑:罗勤 莫愚)

## · 经验交流 ·

### 应用磺胺嘧啶银软膏面膜治疗面部烧伤创面

李凯

面部为暴露部位,烧伤发生率较高,治疗时多采用暴露疗法,即用磺胺嘧啶银(SD-Ag)软膏外涂创面,3次/d,换药时再将残留的药膏清除。此操作较繁琐,药物难以涂抹均匀。为此笔者制作了“SD-Ag 软膏面膜”用以治疗面部烧伤创面,效果较好。

该“面膜”是根据患者面部创面形状用单层大张无菌纱布剪制而成,预留双眼、鼻、口等处的开口,在纱布上均匀涂

布 SD-Ag 软膏。它可根据用量一次性制备,存好备用。使用时将其覆盖于面部创面上并用压舌板轻轻按压,使之紧贴于创面,不留空隙。每次换药时只需将“面膜”轻轻揭掉,创面经简单处理后,再覆以新的“面膜”。

笔者单位使用“SD-Ag 软膏面膜”后,工作量明显减少,工作效率得以提高。

(收稿日期:2002-06-09)

(本文编辑:莫愚 罗勤)

作者单位:115000 营口市中心医院烧伤科