论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0492-04

不同剪切力对豚鼠微血管内皮细胞形态学的影响

袁 伟,张学渊,魏运军,李 琪,钟 诚,姜振东 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察不同剪切力对体外培养的豚鼠耳蜗、脑微血管内皮细胞的影响。**方法** 用自制的流体力学装置在不同时相点、以不同剪切力对豚鼠脑、耳蜗微血管内皮细胞进行力学作用,获得形态学图像并进行形状参数 Pyx 的测定分析。**结果** 通过胶原酶消化法可获得单层培养的豚鼠耳蜗、脑微血管内皮细胞。对于耳蜗微血管内皮细胞,剪切力为 0.883 dyn/cm^{2}时作用 24 h 未发生细胞形态改变;当剪切力增加到 1.184 dyn/cm^{2}时,作用 8 h 后细胞形态即开始出现顺流体方向的顺应性变化,随时间延长,变化趋势更明显。而脑微血管内皮细胞在剪切力 0.267 dyn/cm^{2}时作用 24 h 未发生细胞形态改变;当剪切力增加到 1.069 dyn/cm^{2}时,作用 4 h 后细胞形态即开始出现顺流体方向的顺应性变化。**结论** 耳蜗、脑微血管内皮细胞在受到剪切力作用后其形态学不同于静态培养的内皮细胞。

关键词: 耳蜗;内皮,血管;血液动力学

中图法分类号: R312;R322.13;R329.24 **文献标识码**: A

Effects of shear stress on morphology of different microvascular endothelial cells

YUAN Wei, ZHANG Xue-yuan, WEI Yun-jun, LI Qi, ZHONG Cheng, JIANG Zhen-dong (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of different shear stresses on the morphological changes of cochlear and brain microvascular endothelial cells from guinea pigs. Methods We obtained the morphological photos of cochlear and brain microvascular endothelial monolayer cells with the hydrodynamic system we designed and detected the morphological parameters such as Pyx. Results After digestion with collagenase type I, we obtained the monolayer cells of cochlear and brain microvascular endothelial monolayer. As to cochlear microvascular endothelial cells isolated from guinea pigs, no morphological changes were found when shear stress was 0.883 dyn/cm^2 and the acting time was 24 h. When shear stress was 1.184 dyn/cm^2 and the acting time was 8 h, compliant changes from former disorderliness into orderliness following the direction of liquid flowing in the cells occurred. This changing tendency was in a time-dependent manner. As to brain microvascular endothelial cells, no morphological changes were found when shear stress was 0.267 dyn/cm^2 and the acting time was 24 h. When shear stress was 1.069 dyn/cm^2 and the acting time was 4 h, compliant changes began from former disorderliness into orderliness following the direction of liquid flowing in the cells. Conclusion Cochlear and brain microvascular endothelial cells from guinea pigs cultured under the condition of shear stress are morphologically different from statically cultured endothelial cells. Range of shear stress that two kinds of microvascular endothelial cells can tolerate is different.

Key words: cochlea; endothelium, vascular; hemodynamics

血脑屏障是机体内维持中枢神经系统内环境稳定的基础,内耳迷路液与血液之间的血迷路屏障是维持内耳微环境的重要生理屏障。一些学者在对比研究血脑屏障和血迷路屏障对几种不同物质的通透性时发现,迷路对这些物质存在着选择性通透,与血脑屏障有一定的相似性,但又具有不同性。血脑屏障和血迷路屏障的关键是毛细血管的通透性,而影响其通透性的基础是毛细血管的连续型内皮细胞[1]。作为血流与管腔的界面,内皮细胞时刻接受着血流剪切力的冲击,

基金项目:国家自然科学基金(39870834)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39870834)
作者简介:袁 伟,男,河北张家口市人,博士研究生,主治医师,主要从事耳鼻咽喉基础与临床方面的研究。E-mail: weiyuan175@sina.com
通信作者:张学渊,E-mail: yingsc@public.cta.cq.cn
收稿日期:2007-10-08;**修回日期**:2008-01-28

剪切力对血迷路屏障和血脑屏障的重要组成部分——微血管内皮细胞的影响可能是两个屏障差异的原因之一,但二者与血流剪切力的关系尚少见报道。我们通过体外流体力学装置对培养的脑微血管内皮细胞、耳蜗微血管内皮细胞形态学进行了相关研究,初步探讨了剪切力对不同微血管内皮细胞形态学的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　选用健康封闭群豚鼠 20 只(第三军医大学实验动物中心),耳廓反射灵敏,无中耳感染,雌雄不拘,体质量(300 ± 25)g。采用随机数字表法分为 4 个不同剪切力组,每组 5 只。

1.1.2　试剂　　Ⅰ型胶原酶(Sigma,美国),兔抗人Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.1.3　仪器　　灌流系统由驱动恒流泵(HL_4 上海沪西仪器厂)、平行平板流动腔、储液器及若干导管组成。实验时,贮液槽、平行平板流动腔及部分导管置于恒温孵箱内(Forma3111,美国),光学照相系统采用在平行平板流动腔橡胶垫片中央开窗,在倒置相差显微镜下通过透明有机玻璃直接观察内皮细胞形态变化并记录。Tiger 图像分析仪(第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室提供)。

1.2　实验方法

参照本实验室方法进行豚鼠耳蜗血管纹微血管内皮细胞的分离、培养、纯化和鉴定[1]。参照文献[2]的方法进行豚鼠脑微血管内皮细胞的分离、培养、纯化和鉴定:分别选取 0、0.5、1、2、4、8、16、24 h 等 8 个时相点用倒置相差显微镜对受到不同剪切力作用后的耳蜗微血管内皮细胞进行形态学观察,以初始 0 h 未接受剪切力作用的内皮细胞作为对照。

根据预实验结果设计两个不同剪切力组,耳蜗微血管内皮细胞设计的剪切力大小依次为 0.883、1.184 dyn/cm^2。脑微血管内皮细胞设计的剪切力大小依次为 0.267、1.069 dyn/cm^2。接受剪切力作用后的细胞进行形态学形状参数 Pyx(视场测量参数因子,衡量场方向分布特性。此值为 1 时,即无方向性,与 1 偏离越远,方向性越强)的图像分析。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2　结果

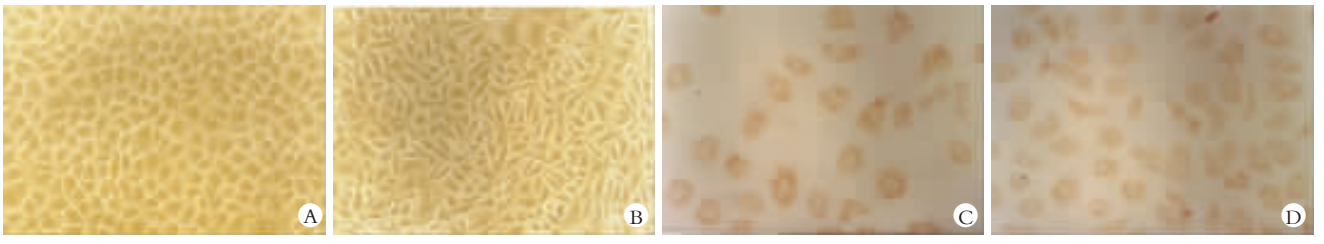
2.1　豚鼠耳蜗与脑微血管内皮细胞的培养及鉴定

耳蜗血管纹组织段经 0.5% Ⅰ型胶原酶消化后,由数个细胞组成的"细胞岛"逐渐融合成单层见图 1A(纯度达 95% 以上),脑微血管段经消化培养后内皮细胞融合成单层见图 1B,整体呈"铺路石"样。二者经免疫组化(S-P 法)鉴定,对Ⅷ因子抗原反应阳性,均证实为内皮细胞(见图 1C、D)。

2.2　不同时间点不同剪切力作用对豚鼠耳蜗和脑微血管内皮细胞形态的影响

2.2.1　不同时间点不同剪切力作用对豚鼠耳蜗微血管内皮细胞形态的影响　　当剪切力为 0.883 dyn/cm^2 时,对单层培养的内皮细胞持续作用 24 h,倒置相差显微镜下观察细胞的整体排列及单个细胞的形态都未发生明显变化(图 2A),统计分析 Pyx 各时相点与 0 h 相比差异无统计学意义($P > 0.05$);当剪切力增大到 1.184 dyn/cm^2 时,镜下观察显示作用 8 h 后细胞形态开始出现顺应性变化,单个细胞由以前的椭圆形变得更为梭长,细胞整体排列由以前的无序性变为顺流体方向的有序性(图 2B),24 h 后细胞排列方向性更加明显,同时出现细胞间空隙增大,细胞个体之间的连接状态发生改变,部分细胞甚至脱落,不能形成致密单层,经统计分析 Pyx 和 Q 值与未接受剪切力 0 h 时相比差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.2.2　不同时间点不同剪切力作用对豚鼠脑微血管内皮细胞形态的影响　　当剪切力为 0.267 dyn/cm^2 对对脑微血管内皮细胞剪切作用 24 h,经图像分析测量细胞整体排列及单个细胞的形态都未发生明显变化(图 2C)。统计分析 Pyx 各时相点与 0 h 相比差异无统计学意义($P > 0.05$);当剪切力增大到 1.069 dyn/cm^2 时,剪切作用 4 h 后细胞逐渐伸长,细胞排列逐渐与血流方向一致,作用 16 h 后细胞已有部分脱落,细胞间隙增大,不能形成致密单层(图 2D)。经统计分析 Pyx 值与未接受剪切力 0 h 时相比差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。



A:耳蜗微血管内皮细胞; B: 脑微血管内皮细胞; C: 耳蜗内皮细胞鉴定图片; D: 脑内皮细胞鉴定图片

图 1　耳蜗与脑微血管内皮细胞的培养及鉴定　(倒置显微镜 ×100)

表 1　不同剪切力作用下各时相点耳蜗微血管内皮细胞形状参数 Pyx($\bar{x} \pm s$)

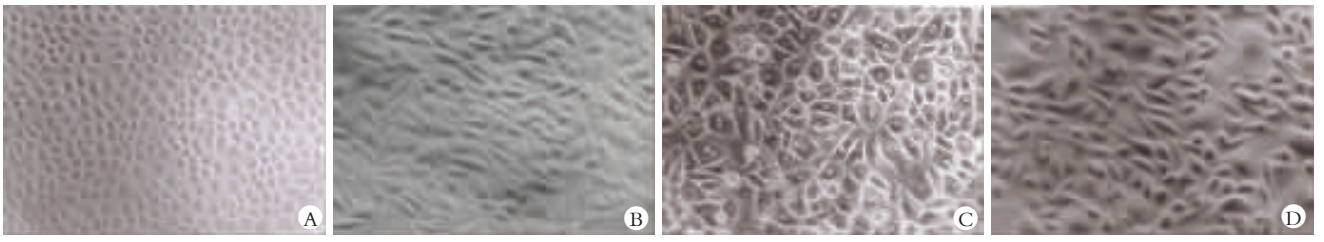
剪切力 (dyn/cm^2)	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
0.883	1.320 2 ± 5.477 2E − 05	1.320 1 ± 5.477 2E − 05	1.320 1 ± 5.477 2E − 05	1.320 2 ± 3.206 5E − 07	1.320 2 ± 8.366 6E − 05	1.320 2 ± 5.477 2E − 05	1.320 2 ± 7.071 1E − 05	1.320 2 ± 8.366 6E − 05
1.184	1.319 9 ± 4.560 7E − 04	1.320 0 ± 3.781 5E − 04	1.320 1 ± 3.507 1E − 04	1.322 2 ± 4.257 4E − 03	1.327 2 ± 4.770 0E − 03	1.343 0 ± 2.581 1E − 03[a]	1.697 9 ± 1.476 0E − 02[a]	2.644 2 ± 4.018 3E − 03[a]

a: $P < 0.05$, 与初始 0 h 未接受剪切作用时比较,$F = 30\,985.51$

表 2 不同剪切力作用下各时相点脑微血管内皮细胞形状参数 Pyx($\bar{x} \pm s$)

剪切力 (dyn/cm²)	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
0.267	1.277 5±1.231 7E-03	1.277 9±1.503 9E-03	1.277 7±7.231 9E-04	1.277 3±1.071 4E-03	1.276 5±6.534 5E-04	1.276 9±1.390 7E-03	1.276 7±1.134 5E-03	1.276 7±1.535 8E-03
1.069	1.275 1±1.408 9E-03	1.277 1±2.127 9E-03	1.287 1±3.086 6E-03	1.318 8±3.706 5E-03	1.450 0±1.200 8E-02[a]	1.951 9±2.221 0E-02[a]	2.266 9±9.776 3E-03[a]	3.137 6±7.33 3E-02[a]

a: $P<0.05$, 与初始 0 h 未接受剪切作用时比较, $F=3\ 697.46$



A: 0.883 dyn/cm² 作用 24 h; B: 1.184 dyn/cm² 剪切力作用 8 h; C:0.267dyn/cm² 剪切力作用 24 h; D: 1.069 dyn/cm² 剪切力作用 4 h

图 2 不同剪切力作用下耳蜗、脑微血管内皮细胞形态学改变 (倒置显微镜 ×100)

3 讨论

血迷路屏障与血脑屏障一样,都是由毛细血管内皮细胞为基础而构成的物质交换系统,Auerbach 等[3]通过研究证实,不同血管内皮细胞其细胞生物学特性存在着较大的差异,例如与肺等外周器官的内皮细胞相比,中枢器官的微血管多为无窗型内皮,细胞间形成紧密连接,胞饮较少,对辣根过氧化物酶等大分子物质不通透,因此,有学者将这类微血管内皮称为屏障型内皮细胞。构成血脑屏障和血迷路屏障的脑及内耳微血管内皮细胞是典型的屏障型内皮,但这两种内皮细胞也有着不同的通透特性。影响其通透性的原因众多,血流剪切力是影响内皮细胞的重要因素,本研究对此进行了相关研究。

细胞的功能与所处力学环境密切相关,体内生理状态下,血流剪切力作用使内皮细胞形成高度分化的表型,其形态学乃至生物活性物质分泌(如内皮素、一氧化氮等)均有别于静态情况[4]。血流剪切力通过对管壁作用使内皮细胞形态学发生变化,可使细胞与细胞间空隙、细胞内结构改变,最终导致血管通透性的变化。体内血流的生理剪切力大小与内皮细胞关系目前尚无高分辨率技术直接测量,因此,模拟体内流体力学环境对微血管内皮细胞进行相关研究可进一步了解血脑屏障、血迷路屏障的病理生理机制。

血液在流动过程中对管壁内皮细胞的作用力主要有剪切力、压应力和周向应力,其中平行作用于管壁的剪切力为主要力量。我们参照 Bacabac 等[5]的方法设计并改进了平行平板流动腔,产生可调节大小的剪切力并能随时监测动态变化。

本实验成功地在体外原代培养出豚鼠耳蜗和脑微血管内皮细胞,经特异性检测标记Ⅷ因子相关抗原鉴定,确定为内皮细胞。对培养的单层细胞进行 24 h 的不同力学作用实验显示:耳蜗微血管内皮细胞随剪切力变化而出现形态学改变,体外实验中耳蜗微血管内皮细胞所能承受的范围是 0.883 ~ 1.184 dyn/cm² (剪切力下限是根据预试验结果确定的,比 0.883 低经过长时间剪切作用细胞形态未发生明显变化)。相对而言,脑微血管内皮细胞能承受的剪切力波动范围较大(0.276 ~ 1.069 dyn/cm²),同文献[6,7]报道相比,微血管内皮比大血管内皮的耐受性差,我们认为微血管对所处微环境要求较严格,要求血液流速和流量控制在一定范围内,以维持微环境稳定,同时较小流速和流量更有利于物质交换。脑微血管内皮细胞能承受的剪切力波动范围较大(0.276 ~ 1.069 dyn/cm²),允许较大范围的血流波动,对外界流变环境适应性较强。而内耳微血管所承受的剪切力只能在很小范围内波动(0.883 ~ 1.184 dyn/cm²),一方面说明内耳对所处微环境要求更严格,保证耳蜗生理功能稳定运行;另一方面说明耳蜗血管内皮细胞对血流变化是非常敏感的,剪切力发生很小变化即能引起内皮细胞形态学改变。体内血流环境中内皮细胞时刻不停地接受血流的冲击,生理病理状况不同产生的剪切力大小不同,随时间改变血管内皮形态学会产生相应的变化。

我们在实验中摸索出了豚鼠耳蜗微血管内皮细胞和脑内皮细胞体外所能承受的剪切力范围,为进一步探讨生理状态下两种内皮细胞血管活性物质释放、生长因子表达、细胞与细胞间连接改变等生理生化特性提供了参考,可进一步揭示血迷路屏障和血脑屏障通透性调控的机制。

参考文献:

[1] 张学渊, 魏运军. 耳蜗微血管内皮细胞通透性体外模型的研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 36(6): 409 - 411.

[2] 钱志远, 黄 强, 周丽英, 等. 鼠脑微血管内皮细胞的分离与长期培养[J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21(1): 42 - 45.

[3] Auerbach R, Alby L, Morrissey L W, *et al*. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells[J]. Microvasc Res, 1985, 29(3): 401 - 411.
[4] Kaiser D, Freyberg M A, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231(3): 586 - 590.
[5] Bacabac R G, Smit T H, Cowin S C, *et al*. Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers[J]. J Biomech, 2005, 38(1): 159 - 167.
[6] Ives C L, Eskin S G, McIntire L V. Mechanical effects on endothelial cell morphology: *in vitro* assessment[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1986, 22(9): 500 - 507.
[7] 宋晓燕, 曾衍钧, 李彩霞, 等. 流动剪切力对鼠脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响[J]. 生理学报, 2001, 53(1): 13 - 17.

（编辑　栾　嘉）

文章编号:1000-5404(2008)06-0495-01

个案与短篇

儿童哮喘急性发作期血小板参数和 CD62p、CD63 的测定及临床意义

孙　萍,陈婷婷,吴星恒,杨　明,黄正刚　（南昌大学第一附属医院儿科,南昌 330006）

近年来研究表明支气管哮喘急性发作期存在血小板的活化[1]。本研究测定哮喘急性发作期的儿童血小板膜糖蛋白 CD62p、CD63 阳性表达率和血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)和大血小板比率(P-LCR)4 项指标,旨在探讨 CD62p、CD63 及血小板与儿童哮喘的发病关系,为哮喘的治疗提供一定的理论依据。

1　对象与方法

1.1　对象

选取 2004 年 1 月至 2006 年 7 月在我院哮喘门诊或住院的发作期哮喘患儿 83 例,全部病例均符合哮喘诊断[2]。男性 47 例,女性 36 例;年龄 3 个月至 14 岁,平均(3.96 ± 3.69)岁;其中 25 例测定 CD62p、CD63 阳性表达率;缓解后 77 例,男性 43 例,女性 34 例,年龄 4 个月至 14 岁,平均年龄(4.02 ± 3.52)岁,其中 20 例测定 CD62p、CD63 阳性表达率。正常对照组 80 例,为我院健康体检儿,男性 45 例,女性 35 例,平均年龄(4.01 ± 3.90)岁,既往无血液病,肝肾疾病和过敏性疾病等, 其中 20 例测定 CD62p、CD63 阳性表达率。各组性别构成和平均年龄差别均无显著性意义($P > 0.05$)。

1.2　方法

1.2.1　血小板 4 项指标检测　　采用日本东亚 SYSMEX 公司生产的 XE-2100 型全自动血液分析仪,使用配套试剂,取空腹静脉血,15% EDTA-K2 抗凝,2 h 内放入仪器进行自动测试。

1.2.2　血小板 CD62p、CD63 阳性表达率的测定,清晨空腹采血 2 ml,15% EDTA 抗凝,室温下离心(800 r/min)5 min,取上层富含血小板血浆,调整血小板 $300 \times 10^9\ L^{-1}$,每管中分别加入 CD62p -FITC,CD63-PE 和阴性对照 IgG1-FITC 及 IgG1-PE,置 20 ~ 25 ℃室温暗处孵育 15 min 后,PBS 洗涤 2 次,采用美国 Becton-Dickins 公司生产的流式细胞仪检测,CellQuest 软件(BD 公司)获取血小板 10 000 个,分析数据。

1.2.3　统计学分析　　数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行计量资料间比较 t 检验和直线回归法的相关分析。

2　结果

2.1　血小板各参数测定

哮喘发作组 PLT 水平明显高于对照组($t = 8.523$, $P < 0.01$),MPV,PDW 和 P-LCR 低于对照组($t = 2.537$, $t = 2.115$, $t = 3.859$, $P < 0.01$, $P < 0.05$),哮喘发作组 PLT 水平高于缓解组($t = 5.432$, $P < 0.01$), MPV 低于缓解组($t = 2.524$, $P < 0.01$), 缓解组各参数与对照组比无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1　各组血小板 4 项指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PLT(10^9/L)	MPV(fL)	PDW(GSD)	P-LCR(%)
哮喘组					
发作期	83	310.86 ± 102.71[ac]	8.41 ± 1.55[ad]	15.30 ± 2.79[b]	20.26 ± 7.10[ac]
缓解期	77	210.82 ± 57.57	8.98 ± 1.36	15.89 ± 2.98	25.16 ± 8.34
正常对照组	80	201.33 ± 41.87	9.13 ± 1.26	16.21 ± 2.23	24.99 ± 9.32

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; c: $P < 0.01$; d: $P < 0.05$, 与哮喘缓解期比较

2.2　哮喘儿童 CD62p、CD63 的表达

急性发作组 CD62p、CD63 阳性表达率均显著高于正常对照组及缓解组($t = 7.186$, $t = 6.998$, $P < 0.01$)。缓解组与对照组比无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

表 2　各组 CD62p、CD63 检测结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	CD62p	CD63
哮喘组			
发作期	25	8.62 ± 2.95[ab]	6.72 ± 1.88[ab]
缓解期	20	3.76 ± 1.53	3.09 ± 1.36
正常对照组	20	2.84 ± 1.34	2.67 ± 0.98

a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.01$, 与哮喘缓解期比较

2.3　哮喘儿童 CD62p、CD63 的表达水平与 PLT 的关系

哮喘儿童 CD62p、CD63 的阳性表达与 PLT 相关分析两者呈显著正相关($r = 0.45$, $r = 0.47$, $P < 0.05$)。

（下转 498 页）

基金项目:江西省卫生厅科学研究基金(040023)
Supported by the Scientific Research Funds of Public Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region (040023)
作者简介:孙　萍,女,江西省万年县人,博士,主任医师,主要从事儿童呼吸系统疾病方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(0791)8692558
收稿日期:2007-05-11;修回日期:2007-09-25