论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1268-04

重组 Shh 因子对海水浸泡肺微血管内皮细胞增殖和凋亡的影响研究

杨 昱,钱桂生,王关嵩,邓朝霞,周长喜 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察不同剂量重组 Shh(recombinant sonic hedgehog, rShh)因子对海水浸泡肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cell,PMVEC)的促进增殖及抗凋亡作用。**方法** 组织块法原代培养大鼠 PMVEC,建立大鼠 PMVEC 海水浸泡模型,加入不同剂量重组 Shh 因子,采用 TUNEL 法检测 PMVEC 凋亡率。采用 2,3-苯基溴化四唑(MTT)染色计数法测定细胞增殖活性。**结果** 海水浸泡可导致 PMVEC 损伤,表现为 PMVEC 细胞增殖受到抑制以及凋亡发生率增加。重组 Shh 能降低海水所致 PMVEC 增殖抑制率和其凋亡率,在实验剂量范围内,其促增殖和抗凋亡作用呈剂量依赖性。**结论** 重组 Shh 可促进海水浸泡 PMVEC 增殖和抑制其凋亡。

关键词: Shh;海水;肺微血管内皮细胞;急性肺损伤

中图法分类号: R322.35; R329.28; R835 **文献标识码:** A

Recombinant sonic hedgehog promotes proliferation and suppresses apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells exposed to seawater

YANG Yu, QIAN Gui-sheng, WANG Guan-song, DENG Zhao-xia, ZHOU Chang-xi (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of recombinant sonic hedgehog (rShh) on the proliferation and apoptosis of cultured pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) after exposure to seawater. **Methods** After PMVECs were primarily isolated from SD rats and cultured, and then the cells were exposed to seawater (from the South China Sea) and treated with 50,100, 200 and 400 ng/ml rShh respectively for 24 h. Apoptotic rate of PMVECs was detected by TUNEL. The proliferation of PMVECs was examined by MTT assay. **Results** Seawater caused the proliferation of PMVECs inhibited and the apoptotic rate increased. rShh suppressed the inhibited proliferation and inhibited apoptosis of the cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** RShh can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of PMVECs exposed to seawater.

Key words: sonic hedgehog; seawater; pulmonary microvascular endothelial cell; acute lung injury

海水淹溺是航海事故、海上作业和海上作战中引起死亡的常见原因[1,2]。海水淹溺后引起渗透性肺水肿,绝大部分继发海水淹溺型急性肺损伤(seawater acute lung injury,SWALI)甚至发展成为海水型呼吸窘迫综合征(seawater respiratory distress syndrome,SWRDS),其基本病理生理改变是肺微血管通透性增高,血管内液外渗,从而导致肺水肿。肺微血管内皮细胞是肺泡毛细血管屏障的重要组成部分,在急性肺损伤过程中,肺泡毛细血管的完整性和通透性与 PMVEC 损伤密切相关。有研究表明,Hedgehog 信号通路的激活可促进创伤后微血管内皮细胞的增殖和抑制其凋亡,有利于损伤毛细血管的修复[3]。而 Shh 是 Hedgehog 信号通路激活的始动因子。据此,我们推测,重组 Shh 因子可通过激活 Hedgehog 信号通路,促进 PMVEC 的增殖和抑制其凋亡,从而促进肺泡毛细血管屏障的修复和降低其通透性。本研究通过建立体外培养大鼠 PMVEC 海水损伤模型,观察重组 Shh 因子对海水浸泡 PMVEC 增殖和凋亡的影响,为海水型急性肺损伤的临床防治提供实验依据。

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G083,08G093);国家自然科学基金(30770928)
Supported by the Key Program of "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci&Tech Research of PLA(06G083 and 08G093); the National Natural Science Foundation of China(30770928)

作者简介: 杨 昱,女,四川省达州市人,博士研究生,助教,主要从事急性肺损伤的发病机制及防治方面的研究,发表论文 5 篇。E-mail:yangyukj@163.com

通信作者: 钱桂生,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn
王关嵩,E-mail:wanggs2003@gmail.com

收稿日期: 2009-03-25;**修回日期:** 2009-04-24

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物　　雄性 SD 大鼠 12 只,体质量(180 ± 20)g,动物许可证号:SCXK(军)2007-017,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2　实验试剂　　海水(取自南海海域,主要成分:Na^+ 10.77 g/kg、K^+ 0.402 g/kg、Mg^{2+} 1.284 g/kg、Ca^{2+} 0.412 g/kg、Cl^- 19.353 g/kg、SO_{42}^- 2.712 g/kg、HCO_3^- 0.123 g/kg)、重组 Shh 因子(sigma 公司)、DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清(Hyclone 公司)、胰蛋白酶(Hyclone 公司)、Tunnel 凋亡检测试剂盒(中杉公司)、MTT(sigma 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2　实验方法

1.2.1　大鼠 PMVEC 原代培养　　参照文献[4],采用组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞。SD 大鼠麻醉后,75% 乙醇消毒,切断颈动脉放血处死,开胸暴露心肺,夹闭上下腔静脉,用无血清培养液自右心室灌洗肺循环至双肺发白,剪取肺叶。在超净台下剪除肺叶脏层胸膜,剪取胸膜下肺组织(厚度小于 1.5 mm),切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块,无血清培养液漂洗 3 次,均匀贴入预先用明胶包被的 25 cm^2 培养瓶,置孵箱固化 2 h 后,加入含 20% 优等胎牛血清、肝素钠 90 U/ml、ECGS 50 μg/ml、青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 培养液 2 ml 静置培养。60 h 后小心吸除组织块,追加培养液 2 ml 继续培养,隔天半量换液。10 d 左右细胞融合成单层,0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 1∶1混合消化液消化后按 1∶2传代。2 代细胞进行鉴定,3 ~ 4 代细胞用于实验。

1.2.2　干预剂量分组　　细胞分为以下 6 组:空白对照组、海水组、Shh50 + 海水组、Shh100 + 海水组、Shh200 + 海水组、Shh400 + 海水组。Shh 组终浓度分别为 50、100、200、400 ng/ml,37 ℃孵育 1 h,再加入 250 μl 海水,培养液总容积为 1 ml(渗透压相当于 350 mOsm/L)。

1.2.3　TUNEL 法检测细胞凋亡　　按 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。细胞培养 24 h 后,制备细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗后用 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 30 min,0.1% Triton X -100 4 ℃渗透 2 min,PBS 洗涤后加 TUNEL 反应混合液 50 μl,37 ℃ 孵育 1 h 后,PBS 洗涤,荧光显微镜下,激发光波长 450 ~ 500 nm,在 515 ~ 565 nm 处观察到绿色荧光,用 Image-proplus 4.5 软件分析绿色荧光强度。

1.2.4　MTT 法检测细胞增殖活性　　调整细胞数为 5×10^4/ml,将细胞接种到 96 孔板,培养 24 h 后吸去培养液,按上述方法分别加入含海水和 Shh 的培养液,分别于培养 24、48、72 h 后,加入 5 mg/ml MTT(用 PBS 液配制)20 μl,继续孵育 4 h,小心吸去上清液,每孔加 150 μl DMSO,振荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测定光密度值[$D(490)$]。细胞增殖抑制率(%) = 1 - [$D(490)_{实验孔} - D(490)_{空白孔}$]/[$D(490)_{对照孔} - D(490)_{空白孔}$] × 100%。

1.3　统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,计量资料有 TUNEL 法检测凋亡细胞的荧光强度以及 MTT 法测定细胞光密度值和增殖抑制率,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用配对 t 检验。

2　结果

2.1　大鼠 PMVEC 原代培养及鉴定

倒置相差显微镜下观察细胞呈梭形或多角形,铺路石样排列,单层贴壁生长。见图 1。CD34 免疫荧光染色结果显示,细胞膜出现亮绿色荧光,空白对照组未见荧光。见图 2。FITC-植物凝集素(FITC-BSI)结合实验结果显示,荧光显微镜下观察,细胞与 FITC-BSI 结合,呈明亮的绿色荧光。空白对照及培养的人脐静脉内皮细胞未见绿色荧光。见图 3。结合细胞形态观察和 CD34 以及 FITC-BSI 结合实验鉴定,培养细胞为 PMVEC。

2.2　重组 Shh 对海水浸泡 PMVEC 凋亡的影响

海水浸泡内皮细胞 24 h 后,荧光显微镜下观察到细胞核出现明显的绿色荧光,荧光强度(78.356 3 ± 8.362 8)明显高于对照组(12.784 1 ± 5.371 9)($P < 0.05$),说明细胞凋亡明显增强,应用重组 Shh 各组细胞绿色荧光强度显著低于海水组($P < 0.05$),其抑制凋亡作用呈剂量依赖性。各组凋亡细胞荧光染色情况见图 4。

2.3　重组 Shh 对海水浸泡 PMVEC 增殖的影响

与对照组相比,海水组细胞增殖能力明显降低,而 Shh 处理各组细胞增殖虽较对照组缓慢,但明显比海水组快,并呈剂量依赖性增加。见表 1。

表 1　重组 Shh 对海水浸泡 PMVEC 增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	光密度值	增殖抑制率	光密度值	增殖抑制率	光密度值	增殖抑制率
对照组	0.678 ± 0.046	—	0.836 ± 0.058	—	0.892 ± 0.065	—
海水组	0.365 ± 0.043	0.462^{b}	0.358 ± 0.036	0.572^{b}	0.246 ± 0.019	0.725^{b}
海水 + Shh50 组	0.402 ± 0.031	0.401^{b}	0.432 ± 0.041	0.483^{b}	0.412 ± 0.038	0.530^{b}
海水 + Shh100 组	0.446 ± 0.038	0.342^{ace}	0.563 ± 0.046	0.327^{ac}	0.625 ± 0.033	0.299^{ade}
海水 + Shh200 组	0.523 ± 0.041	0.229^{ace}	0.634 ± 0.053	0.242^{ace}	0.681 ± 0.048	0.237^{adf}
海水 + Shh400 组	0.589 ± 0.045	0.131^{dfgi}	0.682 ± 0.049	0.184^{dfgh}	0.732 ± 0.053	0.179^{dfgh}

a:$P < 0.05$, b:$P < 0.01$,与对照组比较;c:$P < 0.05$, d:$P < 0.01$,与海水组比较;e:$P < 0.05$, f:$P < 0.01$,与海水 + Shh50 组比较;g:$P < 0.05$, 与海水 + Shh100 组比较;h:$P < 0.05$, i:$P < 0.01$,与海水 + Shh200 组比较

3　讨论

海水淹溺后,淹溺性肺水肿的发生率高达 80%,是引起死亡的主要原因[1]。淹溺性肺水肿的发生与海水的高渗性、肺泡毛细血管屏障通透性升高密切相关,而肺泡毛细血管屏障破坏、通透性增高是肺水肿发生的始动环节[5]。肺微血管内皮细胞的完整对肺泡毛细血管屏障的完整性极为重要,海水淹溺时,海水吸入肺泡,由于海水的直接损伤以及继发的炎症反应,损伤肺微血管内皮细胞,肺泡毛细血管屏障的完整性破坏、通透性增高,导致高度肺水肿[6]。本实验表明,海水可引起体外培养的肺微血管内皮细胞凋亡。

肺微血管内皮细胞的增殖和分化是修复肺泡毛细血管屏障损伤的重要途径。受损的肺泡毛细血管屏障延迟修复与肺水肿的发展直接相关。因此,探讨在 ALI

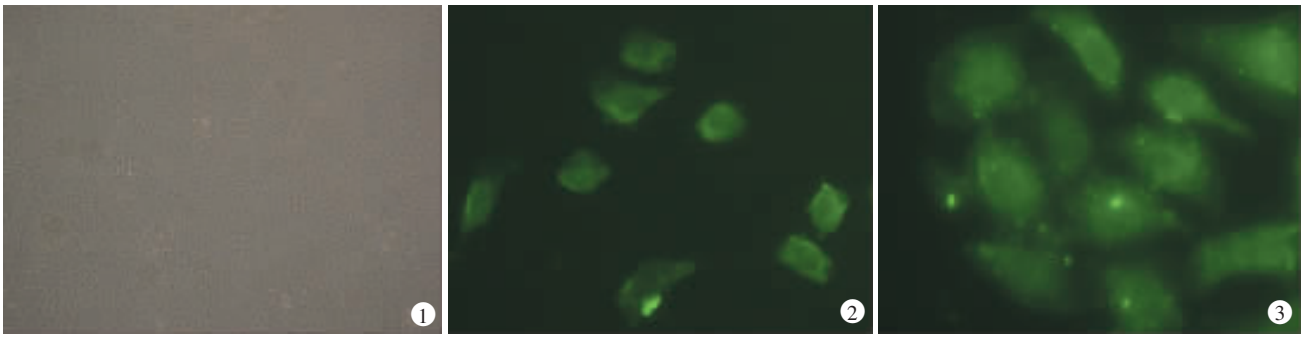


图1 大鼠 PMVEC 原代培养及鉴定 （倒置相差显微镜×100）
图2 大鼠 PMVEC CD34 免疫荧光鉴定结果 （荧光显微镜×200）
图3 大鼠 PMVEC FITC-BSI 结合实验观察 （荧光显微镜×400）



A:对照组 PMVEC;B:海水组 PMVEC;C Shh200 + 海水组 PMVEC
图4 TUNEL 法检测各组细胞凋亡差异观察 （荧光显微镜×200）

早期促进肺微血管内皮细胞的增殖和分化,可能在 ALI 的治疗中具有重要意义。目前,有关 Shh 在调控细胞的增殖和分化以及促进创伤后血管重建的重要作用的研究正在被关注。

Sonic hedgehog (Shh)是 Hedgehog(Hh)信号通路的一员。Hh 信号通路是与胚胎形成及形态发生有关的信号途径,主要由胞外的 Hedgehog 蛋白、细胞膜表面的特异性受体 Patched (Ptch)及相关蛋白 Smoothened (Smo)、胞内的转录因子 Ci/Gli 组成。Hh 是一种分泌型蛋白,在哺乳动物中包括 Shh(Sonic hedgehog)、Ihh(Indian hedgehog)和 Dhh(Desert hedgehog)3 种家族成员[7-9]。Shh 作为一种促有丝分裂素和形态发生素,调控细胞的增殖和分化[10]。在肺的发育过程中,Shh 参与调控血管平滑肌细胞和内皮细胞的分化,诱导肺血管形成,从而促进肺的发育成熟和器官形成[11]。近年发现,Hh 家族蛋白在许多成熟组织也有表达,调节细胞的增殖和自我更新,参与组织的损伤修复,并与多种疾病的发生、发展相关。在创伤愈合过程中,Hh 信号通路的激活可促进微血管内皮细胞增殖,诱导微血管重建,从而恢复缺血区的血供,有利于创伤愈合[3]。但是,Shh 对于海水处理 PMVEC 增殖和凋亡的影响国内外尚少见相关报道。

本实验结果显示,重组 Shh 可降低海水所致的肺微血管内皮细胞的增殖抑制率和细胞凋亡率,对于肺泡毛细血管屏障的修复以及减轻肺水肿可能有积极意义。重组 Shh 的这一效应是通过与其受体 Ptch 特异性结合后,Smo 与 Ptch 解离而被激活,启动细胞内一系列信号转导的瀑布式反应,最终激活 Ci/Gli 转录因子,进入细胞核启动一系列目的基因的转录,产生相应的细胞效应[12]。其促进细胞增殖的机制可能与上调血管生成素和 VEGF 的表达有关[13],而 Shh 能抑制细胞凋亡则可能是由于 Shh 抑制了 Ptch1 胞内区被 caspase-3 分解产生 C-端凋亡结构域,从而抑制凋亡发生。当 Shh 被抑制时,大量未与 Shh 结合的 Ptch1 则被 caspase-3 分解,产生较多的 C-端凋亡结构域,诱导细胞发生凋亡[14]。但其具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Kringsholm B, Jakobson J, Sejrson B, *et al*. Unidentified bodies/skulls found in Danish waters in the period 1992-1996[J]. Forensic Sci Int, 2001, 123(2-3): 150-158.

[2] Saidel-Odes L R, Almog Y. Near-drowning in the Dead Sea: a retrospective observational analysis of 69 patients[J]. Isr Med Assoc J, 2003, 5(12): 856-858.

[3] Jacob L, Lum L. Deconstructing the hedgehog pathway in development and disease[J]. Science, 2007, 318(5847): 66-68.

[4] 徐顺贵, 吴国明, 徐 智, 等. 组织块法培养大鼠肺微血管内皮细胞的综合鉴定[J].第三军医大学学报, 2007, 29(1): 39-42.

[5] 毛宝龄, 钱桂生, 陈正堂. 急性呼吸窘迫综合症[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 141-148.

[6] 赵增荣. 海水淹溺肺水肿的实验研究展望[J]. 中华航海医学杂

志, 1999, 6(3): 133.
[7] Wang Y, McMahon A P, Allen B L. Shifting paradigms in Hedgehog signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007,19(2): 159-165.
[8] Lum L, Beachy P A. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers[J]. Science, 2004, 304(5678): 1755-1759.
[9] Suzuki H, Minegishi Y, Nomoto Y, *et al*. Down-regulation of a morphogen (sonic hedgehog) gradient in the gastric epithelium of Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils[J]. J Pathol, 2005, 206(2): 186-197.
[10] Watkins D N, Berman, D M, Burkholder S G, *et al*. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer[J]. Nature, 2003, 422(6929): 313-317.
[11] Asai J, Takenaka H, Kusano K F, *et al*. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling[J]. Circulation, 2006, 113(20): 2413-2424.
[12] Hochman E, Castiel A, Jacob Hirsch J, *et al*. Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling[J]. J Biol Chem, 2006, 281(45): 33860-33870.
[13] Pola R, Ling L E, Silver M, *et al*. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors[J]. Nat Med, 2001, 7(6): 706-711.
[14] Thibert C, Teillet M A, Lapointe F, *et al*. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by Sonic hedgehog[J]. Science, 2003, 301(5634): 843-846.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2009)13-1271-01

个案与短篇

HIV抗体阳性伴PICC相关感染1例

陈 萍,周全宇,胡中华,胡义德 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所,重庆 400037)

经外周中心静脉置管(peripherally inserted central catheter, PICC)为肿瘤患者的化疗开辟了一条安全、高效、无痛苦给药途径,临床上已广泛使用[1]。但如何解决PICC引起的相关感染是目前临床研究的重要课题。现就我科救治1例HIV抗体阳性伴PICC相关感染患者的过程与体会报告如下。

1 临床资料

患者,男性,52岁,2006年4月确诊为原发性肝细胞癌,2008年1月开始入我科行GP方案(GEM 1.8 g,d1、8,L-OHP 200 mg,d1)化疗3个周期,并行肝动脉介入灌注化疗1个周期(THP 30 mg,DDP 80 mg,5-FU 1 000 mg)。分别于第1、2周期化疗前检测血清HIV抗体为阴性,然后行PICC置管术,穿刺部位分别于左右手肘正中静脉,2次化疗期间导管使用良好,未发现导管相关性感染等术后并发症。第2周期化疗结束后带管出院,完成第3周期化疗后拔管出院。2008年7月患者要求再次入院化疗,次日在严格无菌操作下行第3次PICC置管,术后第5天开始出现寒战、持续发热,体温最高至39.1 ℃。查体发现PICC穿刺部位皮肤无红肿,也无分泌物,管道通畅,经第3代头孢菌素正规抗感染治疗5 d效果不明显,考虑存在PICC导管相关性感染的可能。复查血清HIV抗体结果为阳性,反复追问病史,患者自诉化疗结束后在院外曾有多次不洁性生活史。2008年7月18日拔除导管送导管前端行细菌学培养,结果有表皮葡萄球菌生长。发热期间抽2次血细菌培养,结果发现金黄色葡萄球菌生长。立即改用万古霉素、泰能控制感染,1周后复查血细菌培养为阴性,体温逐步恢复正常。

2 讨论

导管相关感染以发热、寒战和全身衰竭症状为主要临床表现。本例患者的临床症状典型,结合细菌学检测结果,诊断为PICC相关感染败血症。目前认为中心静脉导管相关性感染与患者内在因素如年龄、体质、多部位感染、置管前住院时间长、营养不良、有严重疾病等有关[2,3]。除此之外,患者自身的免疫机能状况也不容忽视,HIV携带或发病者容易发生PICC相关感染[4]。因此,为了减少PICC相关感染,临床上对初次置管的患者在术前会常规检测血清HIV抗体。本例患者在前2次置管前均进行了血清HIV抗体检测,但第3次置管前却忽略了此项检测,尽管术中、术后均进行了严格的无菌处理,结果还是出现了导管相关性感染。

本病例提示我们,首先应严格把握PICC的适应证和禁忌证,对可能发生中心静脉导管相关性感染的高风险患者要严格把关;若病情需要置管时,应该提前检查与感染相关的指标,如血清HIV抗体、血液细菌培养等。其次是因化疗周期多,许多患者不愿带管出院,往往一次置管不能完成所有周期的化疗,需要反复置管,在每次置管前均需完善相关血液感染指标检查,正如本例患者前2次置管时检查HIV抗体是阴性,但5个月后就变成了阳性。随着目前HIV感染率的上升,对中晚期癌症患者的血清HIV抗体动态检测及相关知识健康教育显得日益重要。最后是PICC置管后需专人进行导管维护,尤其是对容易出现导管相关性感染的高危患者更应严密监测体温及各种感染迹象,发现异常及时处理。同时建议医生在置管期间给予患者相应的免疫、营养支持治疗,提高患者免疫力,减少导管感染机会。

关键词: HIV抗体;PICC;导管相关感染
中图法分类号: R730.5 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 孙守红. PICC在肿瘤患者化疗中的优势[J]. 医学理论与实践, 2008,21(6):670-671.
[2] 王恩艳,刘素杰. PICC导管感染的防治[J]. 吉林医学,2008,29(12):1010-1011.
[3] 吴 亿,赵洪雯,王殿珍,等. 不同途径中心静脉置管对血液透析并发症的影响[J]. 第三军医大学学报,2008,12(30):1206-1208.
[4] 吕 毅,邵树军,董晓锋. 恶性肿瘤患者HIV感染分析[J]. 郑州大学学报:医学版,2005,40(4):765.

(编辑 汪勤俭)

作者简介:陈 萍,女,重庆市人,主管护师,主要从事肿瘤护理及导管相关性感染研究。电话:(023)68774483, E-mail: xinqiaochenping@163.com

收稿日期:2009-02-24;**修回日期**:2009-04-22