文章编号:1000-5404(2013)23-2555-04

论著

胸部撞击伤对声门紧闭和开放状态大鼠肺微血管 VE-cadherin 表达的影响

吴秋平[1],闫 进[2],蒋 力[1],张在永[1],闵家新[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院胸外科[1];463000 河南 驻马店,中国人民解放军第159中心医院心胸外科[2])

[摘要] **目的** 观察撞伤 Wistar 大鼠肺微血管内皮细胞间连接成分血管内皮-钙粘附蛋白(VE-cadherin)的表达,了解撞击伤后肺微血管通透性的改变。**方法** 利用荧光素钠法检测撞击伤后声门紧闭和开放状态 Wistar 大鼠肺组织的微血管通透性,动态观察撞击伤对细胞间连接的特有成分 VE-cadherin 表达的影响。**结果** 撞击侧(右肺)肺微血管通透性均较伤前显著增高,各组在伤后同一时相点的值与正常对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),声门紧闭组荧光素钠的含量高于声门开放组,差异有统计学意义($P<0.01$)。胸部撞击伤后大鼠肺微血管内皮细胞 VE-cadherin 的表达降低,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 声门紧闭状态下撞击伤后肺微血管通透性高于声门开放状态,VE-cadherin 在撞击伤后肺微血管内皮细胞中的表达下调,使得内皮细胞之间的连接疏松,通透性增加。

[关键词] 胸部撞击伤;肺微血管;VE-cadherin
[中图法分类号] R322.13; R642; R655 [文献标志码] A

Expression of VE-cadherin in microvascular endothelial cells in Wistar rats with lung injuries induced by blunt chest trauma under closure of glottis

Wu Qiuping[1], Yan Jin[2], Jiang Li[1], Zhang Zaiyong[1], Min Jiaxin[1] ([1]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Cardiothoracic Surgery, No. 159 Hospital of PLA, Zhumadian, Henan Province, 463000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of endothelial VE-cadherin in pulmonary microvascular endothelial cells in Wistar rats after lung impact injury for the alteration of pulmonary microvascular permeability. **Methods** The alteration of the microvascular permeability after blunt chest trauma (BCT) was examined by fluorescein sodium (FINa) method and by detecting the dynamic expression of endothelial VE-cadherin in pulmonary microvascular endothelial cells. **Results** The content of FINa was significantly higher in the right lung (the impact) than before injury ($P<0.01$), was higher at every time point after impact when compared with the normal control ($P<0.01$), and also higher in the group of glottis closure than in the open one ($P<0.01$). The expression of VE-cadherin in pulmonary microvascular endothelial cells was decreased after chest impact injury, with significant difference compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Closed glottis results in high microvascular permeability in the lung tissue than opened glottis in rats after blunt chest trauma. The decreased expression of VE-cadherin in pulmonary microvascular endothelial cells further leads the loosed conjunctions between endothelial cells and subsequent increase of permeability.

[**Key words**] thoracic trauma; pulmonary microvascular endothelial cells; VE-cadherin

Corresponding author: Min Jiaxin, E-mail: pk0118@163.com

创伤性急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是指由多种创伤引起的急性呼吸衰竭,其主要病理生理特征是弥漫性的肺微血管内皮损伤而导致的肺间质、肺泡水肿,微肺不张以及肺容积减少。ALI 是临床常见的危重急症,发病机制尚未完全阐明。肺微血管通透性增高是其重要的一个病理生理特征,也是其发病的关键环节之一[1]。

胸部撞击伤后内皮细胞屏障功能受损导致大分子物质及血细胞渗出,引起组织、脏器水肿,加重主要脏器的受损,其病理基础即是内皮细胞间连接遭到破坏。血管内皮细胞是覆盖血管内表面的单层细胞,具有多

[通信作者] 闵家新,E-mail: pk0118@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131009.1500.003.html(2013-10-09)

种重要的生物学功能。而肺血管内皮细胞由于其解剖部位的特殊性,在生理病理许多方面与体循环中内皮细胞存在明显的差异。因此通过研究肺微血管通透性的调节机制,对于寻找有效的胸部撞击伤防治措施具有极其重要的意义[2]。本研究利用荧光素钠(fluorescein sodium,FINa)法检测肺组织的微血管通透性,组织贴块法分离培养大鼠肺微血管内皮细胞,动态观察撞击伤血清对细胞间连接的特有成分血管内皮-钙粘附蛋白(VE-cadherin)表达的影响,试图为ALI早期的预防及诊治提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 主要试剂

VE-cadherin一抗(Santa Cruz公司产品),二抗辣根过氧化酶标记的抗羊IgG(中山试剂公司产品),Western blot发光试剂盒(NEN™公司产品,美国),抑蛋白酶肽(Aprotirin,Sigma公司产品),其余为常规实验试剂。

1.2 实验动物及分组

50日龄Wistar大鼠54只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不限,体质量(247±12)g,随机分为9组,每组6只。包括正常对照组:无特殊处理;实验组:大鼠气管插管选用14G的套管针的外套管,改进小儿喉镜片,切掉镜片的一小部分,便于置入大鼠口中及暴露大鼠声门,行气管插管术。大鼠麻醉后仰卧于鼠台,将舌体牵出,将长短两个镜片置入口腔内,使两个镜片分别抵住下上切牙以撑开口腔,逐渐推进长镜片以抵达软腭前。通过下镜片的光导纤维插槽插入光导纤维,可明视下观察会厌、喉咽部结构,利用上镜片推开软腭可见声门,明视下将导管插入。通过开放和夹闭气管导管模拟声门开放和紧闭生理状态,分为声门开放0.5、1、4、8 h 4组,声门紧闭0.5、1、4、8 h 4组。

1.3 致伤装置及原理

动物致伤采用多功能小型生物撞击机。计算机控制电磁阀在所需压力(0~1 500 kPa连续可调)开放,由压缩气体驱动撞击头撞击动物致伤,由于电磁阀开放的时间均由计算机精确控制,因此可以方便准确地复制出稳定的动物撞击损伤模型[3]。

1.4 致伤方法

各组大鼠经戊巴比妥钠30 mg/kg肌肉注射麻醉,取左侧45°卧位,前肢上抬、外展固定,剪去撞击区毛发,取腋前线第4肋间为撞击点。撞击参数设定为驱动压350 kPa[3]。

1.5 FINa检测的主要步骤

利用肺组织内FINa的含量反映肺微血管通透性的变化。分别于伤后各时相点取样,于前15 min经尾静脉注射消毒等渗盐水配制的1% FINa,然后放血活杀取样,开胸剪开左房,经右室流出道压力灌注等渗盐水直至左房流出清亮液体,等量秤取撞击组和正常对照组肺组织,经等渗盐水匀浆,离心、取上清液,在日立L-4000型荧光分光光度计测定荧光强度。制作FINa浓度与荧光强度标准曲线,依据标准曲线得出观测时相点FINa含量[4]。

1.6 Western blot检测

病理证实Wistar大鼠造成撞击伤,12 h后取血离心获得血清,56 ℃灭活补体,用M199培养液配成20%的撞击伤血清。细胞生长为单层融合后用0.25%胰蛋白酶-0.01% EDTA消化,调整细胞2×10^5/mL接种于96孔板(200 μL/孔),细胞完全融合后弃上清,用20%撞击伤血清作用,分为正常对照组(含20%的胎牛血清)和0.5、1、4、8 h 4个时相点,于37 ℃ CO_2培养箱内培养。常规分离、转膜、洗膜、封闭、上样、提取蛋白,将留取的待测标本与上样缓冲液一同在100 ℃水浴中加热3 min,迅速放入冰中冷却,然后离心,上样,经4%积层胶在80 V电压下电泳约30 min后,经12%分离胶在100 V电压下电泳约2 h,取下分离胶进行电转印。转印后的PVDF膜用于杂交,先将PVDF膜在室温下晾干,用封闭液在37 ℃水浴箱内封闭2 h,将膜用PBS摇洗15 min,重复3次,加入一抗(抗$I_\kappa B_\alpha$多抗,1∶1 000稀释),37 ℃孵育1 h,用PBS摇洗15 min,重复3次;将膜与二抗(1∶5 000稀释)在37 ℃孵育1 h,用PBS摇洗15 min,重复3次,按说明书将发光试剂A、B等体积混匀后与杂交后的PVDF膜一同孵育约1 min,然后与X线片共同放入暗盒内曝光10 min,常规显影,定影。将X线片置于图像扫描仪下,对目的条带进行密度分析,结果用灰度×面积表示。分析结果时以每张膜各时相点与正常对照的相对值(%)进行统计分析。

1.7 统计学分析

测量对照组及实验组大鼠伤后不同时间肺FINa含量变化、撞击后VE-cadherin在大鼠肺微血管内皮细胞中的表达,采用SAS 6.12统计软件进行t检验、方差分析。

2 结果

2.1 大鼠伤后不同时间肺FINa含量变化

无论声门开放或紧闭,撞击侧(右肺)肺微血管通透性均较伤前显著增高,各组在伤后同一时相点的值与正常对照组相比均有显著差异($P<0.01$);声门紧闭组FINa的含量高于声门开放组,二者相比有显著差异($P<0.01$)。非撞击侧(左肺)的情形与右肺类似。见表1。

2.2 撞击后VE-cadherin在肺微血管内皮细胞中的表达

胸部撞击伤后0.5 h大鼠肺微血管内皮细胞连接成分VE-cadherin的表达开始降低,到4 h后有明显降低,到8 h仍处于低表达水平(表2、图1)。

表1 各组大鼠伤后不同时间荧光素钠含量变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

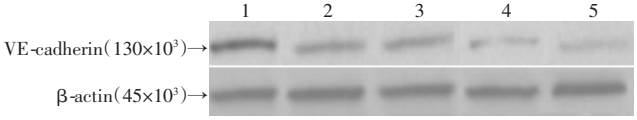
组别	0 h	0.5 h	1 h	4 h	8 h
右肺					
声门开放组	0.92±0.05	2.02±0.17[a]	2.39±0.21[a]	2.47±0.32[a]	2.54±0.27[a]
声门紧闭组	0.99±0.06	3.09±0.23[ab]	3.44±0.38[ab]	4.52±0.41[ab]	4.63±0.39[ab]
左肺					
声门开放组	0.87±0.14	0.91±0.10[a]	0.97±0.12[a]	1.88±0.16[a]	3.20±0.35[a]
声门紧闭组	0.94±0.09	1.44±0.06[ab]	1.98±0.18[ab]	2.96±0.15[ab]	3.67±0.31[ab]

右肺对照组=0.85±0.07;左肺对照组=0.86±0.11;a:$P<0.01$,与同肺对照组比较;b:$P<0.01$,与同肺声门开放组比较

表 2 各组大鼠伤后不同时间 VE-cadherin 在肺微血管内皮细胞中的表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	0.5 h	1 h	4 h	8 h
对照组	0.433 ±0.033	0.456 ±0.071	0.458 ±0.051	0.444 ±0.039	0.432 ±0.065
胸部撞击伤组					
声门开放组	0.421 ±0.031	0.421 ±0.031	0.389 ±0.042	0.321 ±0.026	0.298 ±0.032
声门紧闭组	0.442 ±0.035	0.341 ±0.041[a]	0.329 ±0.029[a]	0.194 ±0.036[a]	0.199 ±0.042[a]

a: $P<0.01$,分别与对照组及声门开放组比较



1:伤后 0 h;2:伤后 0.5 h;3:伤后 1 h;4:伤后 4 h;5:伤后 8 h

图 1 Western blot 检测大鼠伤后不同时间 VE-cadherin 的表达

3 讨论

血管通透性正常是细胞维持正常生理功能的重要保证,正常肺泡与血液之间的屏障包括肺泡表面液体、肌膜、薄层肌体组织、毛细血管肌膜与连续型内皮,这层屏障很薄,总厚度只有约 0.5 μm[5]。血管内皮在循环系统和周围组织之间产生结构型屏障,控制血管中血浆蛋白及血细胞的外渗。在由血管内皮细胞、基底膜和外周细胞构成的血管屏障中,内皮细胞的结构与功能对通透性的调节起着关键作用,同时微血管通透性的增加是许多疾病的共同特征,也是创伤性 ALI 的重要特征之一[6-7]。血管通透性增高一方面使炎症细胞过多聚集于局部组织,通过释放蛋白酶及氧自由基等直接造成组织细胞损伤;另一方面还使大量液体渗入组织间隙,增加毛细血管与细胞间的距离,加重组织细胞缺氧。当胸部受到撞击时,肺是主要的直接受伤器官,同时由于解剖结构等因素,肺是失控的全身炎症反应损伤的主要靶器官,损伤结果是肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞等遭到广泛破坏,表现为 ALI[2]。现阶段对微血管通透性的定量研究方法有同位素标记蛋白定量和近年出现的荧光示踪技术[8]等。

本研究采用荧光素示踪法检测 FINa 的含量,以确定动物肺微血管通透性变化,实验结果显示声门紧闭状态和开放状态下撞击后肺微血管通透性变化存在明显差别,声门紧闭组同一时相点的 FINa 的含量较声门开放组明显增高($P<0.01$),表明声门紧闭状态下撞击伤后肺微血管通透性高于声门开放状态。既往研究显示,肺损伤动物的肺微血管通透性及肺水肿逐渐加重,伴之进行性低氧血症恶化及呼吸功能衰竭,临床患者也呈现类似病理过程,提示存在继发性肺损伤加重的病变规律。

血管内皮细胞在人体分布极其广泛,是具有多种生理功能的特殊细胞群体,其作用主要包括调节血管通透性、维持血管张力、促凝和抗凝、与中性粒细胞相互作用参与炎症免疫反应等。机体严重损伤后会引起毛细血管通透性增高,抗凝与促凝平衡破坏,血栓易于形成;血管舒缩调节功能异常,以及血管内皮细胞功能发生紊乱,释放氧自由基,通过多种炎性介质上调粘附分子的表达,与中性粒细胞相互作用诱导细胞间粘附,导致细胞损伤和炎症反应[9]。钙粘附素(cadherins)是一类依赖于细胞外 Ca^{2+} 的跨膜单链糖蛋白,通过同种亲和性结合介导同种细胞间的粘附反应。VE-cadherin 是内皮细胞特有的一种钙粘附分子,也是内皮细胞间连接所必需的[10]。内皮细胞衬附于血管内表面,功能极为活跃。内皮细胞之间的连接以及细胞-基底膜之间的粘附,对于保证内皮细胞层的连续性及通透屏障功能具有重要的生理意义。VE-cadherin 在内皮细胞间粘附连接和细胞骨架结构蛋白中起非常重要的作用,它和细胞质内的配体 α、β 和 γ-catenin 相连,α、β 和 γ-catenin 又与微管、微丝、肌动蛋白丝相连,构成了内皮细胞的完整骨架,这种连接有锚定作用,可稳固细胞间的粘附、维持组织结构的完整性和极性(polarity)[11]。VE-cadherin 的变化引起内皮细胞间粘附连接变化的同时,也引起细胞骨架结构的变化。我们前期研究发现,对体外培养的肺微血管内皮细胞行免疫组化染色,VE-cadherin 在内皮细胞膜上表达。

本研究结果显示,VE-cadherin 在撞击伤后大鼠肺微血管内皮细胞中的表达下调,使得内皮细胞之间的连接疏松,通透性升高,这种变化发生很快,处理 0.5 h 后即有显著改变,4 h 降到最低,和临床患者早期大量大分子物质和血细胞渗出,导致组织脏器的水肿及损害的加重表现一致。导致 VE-cadherin 减少的具体原因目前尚不清楚,研究发现与动物受撞击后的应激反应有关,例如分泌释放内毒素进入血液[12-13]。

综上所述,损伤后产生多种炎症介质、蛋白酶、自由基等,可直接或间接损伤血管内皮细胞及其他细胞,如粒细胞与血管内皮细胞粘附增强,导致粒细胞聚集释放炎症介质,可造成组织细胞功能障碍,这在急性炎症反应中起核心作用。炎症反应时,炎性细胞及炎性介质通过不同途径最终均导致血管内皮-钙粘附素/连环蛋白复合体解体,造成内皮细胞间连接的分解而增加内皮通透性[14]。关于 VE-cadherin 在撞击伤后内皮细胞中的表达下调从而导致血管内皮细胞通透性升高的机制有待进一步研究。

参考文献:

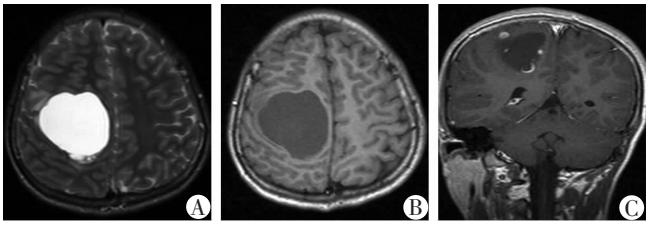
[1] 王建民, 王正国, 朱佩芳, 等. 爆炸冲击波对肺微血管通透性影响的研究[J]. 中国急救医学, 2001, 21(10): 568-570.

[2] McVey M, Tabuchi A, Kuebler W M. Microparticles and acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(5): L364-L381.

[3] 吴秋平, 蒋耀光, 闵家新. 声门关闭与开放状态下兔肺撞击伤的损伤特点[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2005, 12(3): 189-193.
[4] Doyle I R, Nicholas T E, Bersten A D. Partitioning lung and plasma proteins: circulating surfactant proteins as biomarkers of alveolocapillary permeability[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999, 26(3): 185-197.
[5] Mao M, Xu X, Zhang Y, *et al*. Endothelial progenitor cells: the promise of cell-based therapies for acute lung injury[J]. Inflamm Res, 2013, 62(1): 3-8.
[6] Seeley E J. Updates in the management of acute lung injury: a focus on the overlap between AKI and ARDS[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2013, 20(1): 14-20.
[7] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(5): 313-316.
[8] Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, *et al*. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(10): 2286-2297.
[9] Frohlich S, Boylan J, McLoughlin P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(3): 271-279.
[10] Li R, Ren M, Chen N, *et al*. Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37195.
[11] Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 116: 119-144.
[12] Iyer S, Ferreri D M, DeCocco N C, *et al*. VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 286(6): L1143-L1153.
[13] Bieri M, Oroszlan M, Zuppinger C, *et al*. Biosynthesis and expression of VE-cadherin is regulated by the PI3K/mTOR signaling pathway[J]. Mol Immunol, 2009, 46(5): 866-872.
[14] Birukova A A, Tian Y, Dubrovskyi O, *et al*. VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(10): 3405-3416.

(**收稿**:2013-05-10;**修回**:2013-08-08)
(编辑 栾 嘉)

(上接2541页)



A、B:T_2WI、T_1WI示右顶叶类圆形长T_1、长T_2囊性病灶,囊壁光滑,周围见少许斑片状水肿信号;C:T_1增强冠状位示病灶略呈三角形,囊壁周围见小结节状、线状强化

图2 病例2头颅MRI表现

3 讨论

根据2007年WHO中枢神经系统肿瘤分类,DNET在组织学上属于WHO Ⅰ级,并分为单纯型、复合型及非特异型3个亚型。病理学特征[2]:①肿瘤是由少突胶质细胞、星形细胞和成熟神经元组成"特异性胶质神经元成分",细胞比例不均一。②黏液样基质:少突胶质细胞和少量星形细胞间的基质呈黏液样,稀疏处形成微囊变,单个神经元似在黏液湖中漂浮。免疫组化标记物Syn、NF、S-100等可证实成熟神经元及少突胶质细胞成分,对DNET的诊断和鉴别诊断具有重要价值。

DNET发病率占中枢神经上皮肿瘤的0.2%~1.2%,患者以儿童及青少年为主,90%以上发病在20岁以前[3],主要临床表现为顽固性复杂部分癫痫,少数患者出现头痛、颅内压增高等症状,无局部神经系统功能障碍。影像学上DNET大多数发生在颞叶,其次是额叶、顶叶、枕叶,病灶主要累及皮质,可起皮质增厚,少数可见肿瘤周围皮质发育不良;病变内有多发小囊变影,钙化可见,出血较少见。肿瘤占位效应轻,病变边缘清楚,周围无明显水肿和浸润性生长表现;增强扫描肿瘤一般无强化,部分病灶内可有小结节样、斑片状或环状强化。浅表病变可引起邻近颅骨骨质吸收变薄[1,4-5]。本组DNET不典型之处主要表现在两方面:①患者年龄为高峰发病年龄段,但是临床症状以颅内压增高起病和运动功能受损为主要表现,起病急,且既往无癫痫、抽搐病史。②本组肿瘤均发生在右侧顶叶,属DNET发生的少见部位。病例1肿瘤以巨大团块状钙化为主要表现,考虑肿瘤间质中具有较丰富的毛细血管,慢性反复出血、机化,影像学上极易被误诊为单纯血肿的机化;而病灶邻近右侧顶骨骨质吸收变薄,表明肿瘤发生的长期过程中造成邻近颅骨的压迫、重构,应该引起足够的重视。病例2肿瘤以单纯假性囊肿为主,不同于典型DNET多发微小囊变或其内线形分隔,囊壁边缘小结节状、环状强化,表明肿瘤间质中含有肾小球样毛细血管[5],可符合复合型DNET。本组DNET诊断相对困难,认真阅片分析及结合临床可以获得更多有价值的信息,提高诊断准确性,但需与以下疾病鉴别诊断:①少突胶质细胞瘤:多见于成人,钙化率发生高,弯曲条带状钙化具有一定的特征性。②脑室外神经细胞瘤:通常是具有癫痫症状的青年人,肿瘤为边界清楚的囊实性病灶,钙化和出血可见,实性部分强化具有鉴别诊断意义[6]。

总之,DNET的正确诊断需要结合临床及影像学检查,对于临床症状及影像学表现不典型时,应对病理切片进行复诊和免疫组织化学染色,避免术后不必要的放化疗。

参考文献:

[1] 张宗军, 季学满, 李南云, 等. 胚胎发育不良性神经上皮瘤的MRI诊断[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2009, 15(1): 1-6.
[2] 李南云, 周晓军, 金行藻, 等. 胚胎发育不良性神经上皮瘤临床病理观察[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(9): 561-565.
[3] 胡滨, 王进钢, 黄文辉. 胚胎发育不良性神经上皮瘤8例临床分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(21): 2155-2156.
[4] Fernandez C, Girard N, Paz-Paredes A P, *et al*. The usefulness of MR imaging in the diagnosis of dysembryoplastic neuroepithelial tumor in children: a study of 14 cases[J]. AJNR Am J Neuroadiol, 2003, 24(5): 829-834.
[5] 季学满, 张宗军, 张志强, 等. 胚胎发育不良性神经上皮瘤的常规MRI与DWI特征[J]. 中国医学影像技术, 2012, 28(7): 1295-1298.
[6] Osborn A G, Salzman K L, Thurnher M M, *et al*. The new World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors: what can the neuroradiologist really say? [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2012, 33(5): 795-802.

(**收稿**:2013-09-04;**修回**:2013-09-13)
(编辑 汪勤俭)