DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.028
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1313-03

论著

热应激对培养血管内皮细胞增殖的影响

罗晓凤,罗向东,王仙园 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆,400038)

提 要:目的 探讨热应激条件下血管内皮细胞增殖变化的特点及相关机制。方法 以血管内皮细胞株ECV304受热43 ℃、2 h为热应激实验模型,观察血管内皮细胞的细胞间粘附分子(ICAM-1)、分化抑制因子1(Id1)、P16及P21的蛋白表达变化,^{3}H标记胸腺嘧啶核苷酸(^{3}H-TdR)掺入法测定细胞DNA的合成。结果 热应激后血管内皮细胞ICAM-1表达增强,Id1表达受抑制,P16、P21蛋白的表达增强。^{3}H-TdR掺入实验显示热应激可显著抑制血管内皮细胞的DNA合成。结论 热应激可以活化血管内皮细胞,抑制细胞增殖,从而改变增殖与分化的协调关系,并可能进而影响创伤后组织细胞的修复。

关键词:热应激;血管内皮细胞;增殖
中图法分类号:R322.12;R329.24 文献标识码:A

Effects of thermal stress on proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*

LUO Xiao-feng, LUO Xiang-dong, WANG Xian-yuan (Institute of Burn Research PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of thermal stress on proliferation of human vascular endothelial cells (VECs) and their significance. Methods Protein expressions of ICAM-1, Id1, P16 and P21 were determined with Western Blot after the cells were treated with 43 ℃ for 2 h, while changes of DNA synthesis were determined with ^{3}H-TdR incorporation. Results Expressions of ICAM-1 as well as P16 and P21 enhanced while expressions of Id1 (Inhibitor of differentiation) were inhibited after the thermal stress. ^{3}H-TdR incorporation revealed VECs growth inhibition upon thermal treatment. Conclusion Thermal stress could strongly activate VECs and affect the balanced relationship between proliferation and differentiation through cycline-dependent kinase inhibitor P16 and P21, which might be essential to the recovery of tissues injury upon extraneous stress.

Key words: thermal stress; vascular endothelial cell; proliferation

遍布于全身各个部位的毛细血管内皮细胞是烧伤早期的重要反应细胞。多项研究表明,内皮细胞功能、结构受损是引发多脏器功能不全(MODS)等严重并发症的重要因素。外界多种刺激因子如过氧化物,热,机械及物理因素等都可对血管内皮细胞功能及结构产生影响,但热应激对血管内皮细胞增殖和分化的作用还涉及甚少。已有实验证明,热应激可以改变肿瘤细胞分化和增殖能力[1]。本实验旨在通过研究热应激对血管内皮细胞增殖和分化的影响以对血管内皮细胞增殖和分化的调控机制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

所用血管内皮细胞为人脐静脉内皮细胞株ECV304(购自美国ATCC公司),培养液M199(含10 %小牛血清),培养于37 ℃、5% CO_2浓度及饱和湿度环境,在25 ml玻璃培养瓶中进行传代,48~72 h更换培养液一次。

1.2 热应激模型的制备

热应激时调节培养箱温度为43 ℃,其余条件不变,作用2 h后置于正常(37 ℃, 5% CO_2浓度及饱和湿度)条件继续培养。

1.3 Western Blot检测ICAM-1、Id1、P16和P21蛋白的表达

接种ECV304细胞于直径60 mm培养皿(8×10^5个细胞/皿),43 ℃作用2 h后继续培养至相应时相点以M-PERTM (Pierce Company)蛋白提取液处理细胞,收集细胞总蛋白,BCA法定量后经SDS-PAGE,电转膜,免疫抗体反应,最后化学增强发光法(ECL)显带,具体步骤按文献[3]操作。以正常培养细胞作为对照。

1.4 ^{3}H-TdR掺入测定细胞DNA的合成

接种ECV304细胞于96孔板,热应激(43 ℃, 2 h)后立即更换含^{3}H-TdR(0.5 μCi/孔)的培养液,置正常37 ℃条件培养。分别于应激后2、5、8、12、24、48 h,收集细胞于纤维玻璃纸,液闪计数测定Bq值。每时相各设5孔,另设正常细胞培养组作对照。

1.5 统计学处理

计量资料取三批实验的平均值,以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 热应激使血管内皮细胞ICAM-1表达增强

Western Blot结果见图1.,热应激后即刻就有血管内皮细胞活性标志-ICAM-1的增强表达,其高表达一直持续到应激后2、4、6 h后有所下降。这说明热应激能够激活内皮细胞。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G1999054205)
作者简介:罗晓凤(1974-),女,重庆市人,硕士研究生,护师,主要从事细胞信号传导方面的研究。电话:(023)68753790
收稿日期:2001-11-16;修回日期:2002-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

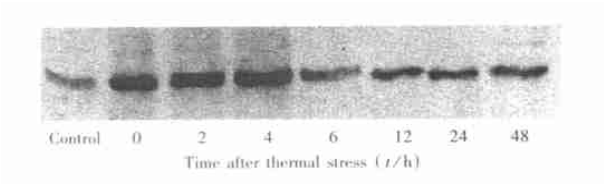


图 1 热应激对血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响(Western Blot)

Fig 1 Effects of thermal stress on the expression on ICAM-1 in ECV304 cells(Western Blot)

2.2 热应激使血管内皮细胞中 Id1 蛋白表达减弱

通过 Western Blot 检测到热应激后血管内皮细胞分化抑制因子 1(Id1)表达逐渐减弱，其减弱趋势较为缓慢，应激后 12 h 减弱明显，至 48 h 已基本完全抑制，图 2。

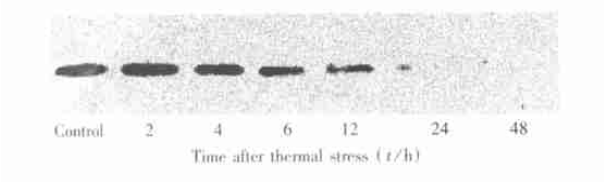


图 2 热应激对血管内皮细胞 Id1 表达的影响(Western Blot)

Fig 2 Effects of thermal stress on the Expression of ID1 in ECV304 cells(Western Blot)

2.3 热应激对血管内皮细胞 P16 蛋白表达的影响

Western Blot 检测发现，P16 蛋白在热应激后表达逐步增强，6 h 明显，12 h 达高峰，48 h 开始减弱，见图 3。

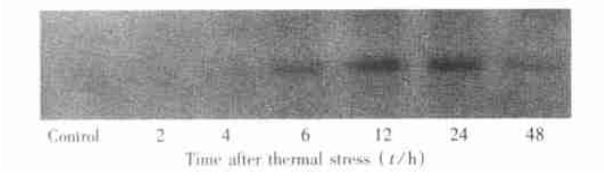


图 3 热应激对血管内皮细胞 P16 表达的影响(Western Blot)

Fig 3 Effects of thermal stress on the expression of P16 in ECV304 cells(Western Blot)

2.4 热应激对血管内皮细胞 P21 蛋白表达的影响

Western Blot 显示，同 P16 趋势基本相一致，P21 蛋白表达在热应激后逐步增强，12 h 增强达高峰，见图 4。而这种现象与 Id1 表达逐步减弱呈相反趋势。

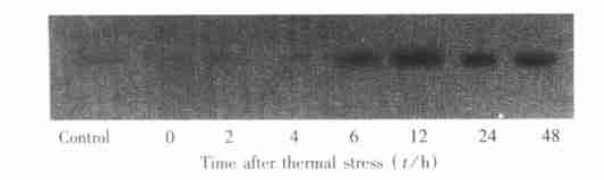


图 4 热应激对血管内皮细胞 P21 表达的影响(Western Blot)

Fig 4 Effects of thermal stress on the expression of P21 in ECV304 cells(Western Blot)

2.5 ^{3}H-TdR 掺入测定热应激对血管内皮细胞增殖的效应

热应激组各时相点 cpm 值均低于正常培养组，见图 5，应激后即有减低，12 h 起两组相差显著，48 h 仍明显($P<0.05$)。

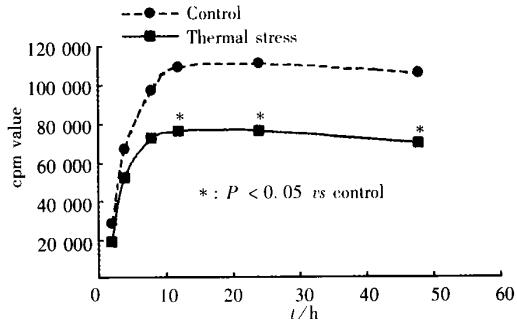


图 5 ^{3}H-TdR 掺入：ECV304 细胞增殖曲线

Fig 5 Growth curve of ECV304 cells with thermal treatment)

3 讨论

热应激是烧伤早期细胞感受的主要刺激，分布于全身各脏器的血管内皮细胞是创伤早期反应明显的组织细胞之一，是机体中少数几种能产生较多细胞因子并对其它细胞产生调节作用的重要细胞种类，它不但是维持血管通透的重要屏障，而且近年研究发现血管内皮细胞损伤可能是引发烧伤后 MODS 的重要因素[4]。血管内皮细胞的分化与增殖的协调作用是调控修复过程的重要因素，因此，研究热应激下内皮细胞的分化增殖改变具有重要意义。本实验观察到热力 43 ℃作用 2 h 可以使内皮细胞活化标志物 ICAM-1 的表达增强，激活血管内皮细胞，。从分化抑制因子 1(Id1)进一步研究活化的血管内皮细胞分化增殖的改变发现，Id1 蛋白在应激后逐步减低，而其负调控的下游增殖相关蛋白 P16 和 P21 在热应激后逐步增强。^{3}H-TdR 掺入实验也表明热应激可以抑制细胞的 DNA 合成。

在众多的调控增殖及相关基因的复杂网络中分化抑制因子(Inhibitor of differentiation，Id)的细胞分化增殖的调控因子。Id 蛋白是一低分子量多肽[(13～20)×10^3]的小家族，迄今发现的 4 个 Id 蛋白中 Id1 和 Id3 几乎表达于所有的细胞，而 Id2 和 Id4 具有细胞特异性[4]。Id1 是碱性螺旋-环-螺旋(Helix-loop-helix)转录因子家族的成员之一，它通过与其家族的其它成员竞争结合含 E-box 的调控序列，阻止增殖相关基因(p15、p16、p21、p53 等)的转录，起负调控作用[5]。P16 和 P21 主要作用于控制细胞 DNA 复制的 G_1/S 期，通过与 cyclin 家族成员竞争性结合 CDK 使其失活，阻止 Rb 蛋白磷酸化，而非磷酸化的 Rb 蛋在细胞周期 G_1—S 过程中起关键性负调控作用，主要是抑制转录因子 E2F 的转录活性，使许多与 DNA 合成有关的基因以及与细胞增殖有关的基因不能及时充分表达，使 G_1 期阻滞，抑制细胞增殖[6,7]。

血管内皮细胞处于机体的重要位置，其应激后分化与增殖的协调关系对损伤修复具有重要意义。以上实

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

验初步证明热应激可以激活血管内皮细胞，通过 Id1→bHLH→含 E-box 的增殖相关蛋白(P16、P21)的信号通路调节细胞的增殖，这一细胞应激反应的意义在于使细胞受到外界不良因素刺激后获得修复损伤 DNA 的机会，即把细胞滞留在 G_1 期或 G_2/M 期，不让细胞进入 DNA 合成 S 期或有丝分裂，以避免遗传信息的错误传递。另一方面，细胞如果不能成功修复 DNA 或有效对抗应激因素的干扰，则胞内自杀防御系统(凋亡)被激活，从而保护整体组织不受进一步的损伤。

参考文献：

[1] Cellier M F M, Taimi M, Chate M T, *et al*. Thermal stress as an inducer of differentiation of U937 cells[J]. Leuk Res, 1993, 17(8): 649－656.

[2] Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, *et al*. Alteration of P16 and P15 genes in human uterine tumours[J]. Brit J Cancer, 1999, 80(3-4): 458－467.

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1992. 888－897.

[4] 杨宗城，罗向东，高建川，等. 严重烧伤后内皮细胞损伤及其在早期脏器损伤发病中的作用[J]. 解放军医学杂志，1999, 21(1): 10－13.

[5] Pagliuca A, Gallo P, De Luca P D, *et al*. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth[J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1 376－1 382.

[6] Fuse T, Yamada K, Asai K, *et al*. Heat shock-mediated cell cycle arrest is accompanied by induction of p21 CKI[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 225(3): 759－763.

[7] 高志安. 肿瘤抑制基因 P16 研究进展[J]. 锦州医学院学报，2000, 21(1): 58－61.

(编辑　郭健秀)

文章编号：1000-5404(2002)11-1315-01

个案与短篇

川崎病合并急性化脓性扁桃体炎 2 例

Report of cases of Kawasaki disease with acute suppurative tonsillitis

刘晓蓉，赵聪敏　　(第三军医大学附属新桥医院儿科，重庆 400037)

例 1，患儿，男，2 岁 7 个月，因“发热 1 d 伴颈部包块半天，抽搐 1 次”于 2000-06-25 入院。查体：右颈后扪及一 3 cm×3 cm×2 cm 大小淋巴结，局部皮肤充血，皮温高，触痛明显。咽充血，双侧扁桃体Ⅱ°，右侧可见黄白色分泌物。神经系统无阳性体征。血象：WBC 21.3×10^9/L；N 0.88；L 0.12。入院初诊：①急性化脓性扁桃体炎；②淋巴结炎；③高热惊厥。经抗感染等治疗，仍持续高热，右颈后淋巴结增大，逐渐出现双侧球结膜充血，唇红，杨梅舌及全身皮肤红色斑丘疹，查肝功、心肌酶谱提示肝脏、心肌损伤。病程第 10 d 患儿指端甲床与皮肤交界处出现膜状脱皮，最后确诊为川崎病合并急性化脓性扁桃体炎，心脏彩超无异常。即予静注丙种球蛋白(IVIG) 1g/kg 冲击治疗，阿斯匹林、潘生丁口服。病程第 14 d，患儿出现右侧周围性面瘫，经综合治疗，住院 45 d，治愈出院。随访半年，未发现心脏后遗症。

例 2，患儿，男，7 岁，因“发热伴颈部包块 2 d，”于 2002-05-17 入院。查体：右颈后扪及一 2 cm×2 cm×1 cm 大小淋巴结，表皮明显充血，皮温高，触痛明显。咽充血，双侧扁桃体Ⅰ°，其上可见黄白色分泌物。血象：WBC 23.5×10^9/L，N 0.90，L 0.10。入院初诊：①急性化脓性扁桃体炎；②淋巴结炎。经抗感染等治疗，仍持续高热，右颈后淋巴结增大，左颈后亦出现一肿大淋巴结，并逐渐出现全身皮肤红色斑丘疹，球结膜充血，唇红，杨梅舌及指端硬性肿胀。考虑川崎病合并急性化脓性扁桃体炎，心脏彩超无异常。病程第 8 天经 IVIG(2 g/kg)冲击治疗及口服阿斯匹林，体温随即降至正常，临床症状渐消失。病程第 12 天，指端甲床与皮肤交界处出现大片膜状脱皮。住院 13 d，临床症状消失，好转出院。

2　讨论

川崎病(Kawasaki disease，KD)是一种以全身血管炎为主要病变的急性发热性出疹性小儿疾病。该病的冠状动脉并发症为小儿时期冠状动脉心脏病最常见的原因。早期(发病 10 d 内)予大剂量 IVIG(1～2 g/kg)治疗，可减少冠状动脉病变发生率[1]。经临床调查发现，＞2g/kg 或在发病第 9 天后开始用 IVIG 者心脏后遗症的比例明显增高，可能解释的原因之一为＞2g/kg 的病人病情较其他组为重，之二为 IVIG 对预防心脏后遗症无效[2]。本组两例均具备 KD 的诊断标准[1]。在早期合并急性化脓性扁桃体炎的 KD 的诊断上，因 KD 缺乏特异的辅助检查手段，诊断主要依靠临床症状和体征，而特征性的指(趾)端膜状脱皮多数在恢复期即病程 10 d 后出现，故往往在此易将 KD 的早期表现分析为急性化脓性扁桃体炎引起全身感染所致，从而延误诊治，引起严重并发症。本组例 1 在病程第 10 天用 IVIG，恢复期并未出现心脏后遗症，可能与患儿病情较轻有关。从本组两例 KD 可以总结出：如临床出现急性化脓性扁桃体炎的表现，伴有持续高热，颈淋巴结肿大，抗生素治疗无显效者，应警惕 KD 可能，并应早期(发病 10 d 内)应用大剂量 IVIG(1～2 g/kg)治疗，以减少患儿冠状动脉病变等严重并发症的发生。

关键词：川崎病；急性化脓性扁桃体炎
中图法分类号：R715.512；R766.18　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴瑞萍. 诸福棠实用儿科学(上)[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，1995. 687－688.

[2] 焦兰萍，王　川，贺志莉，等. 川崎病研究进展[J]. 国外医学：妇幼保健分册，1999, 10(4): 178－181.

(编辑　陈聪连)

作者简介：刘晓蓉(1972－)，女，重庆市人，医师，主要从事小儿内科疾病方面的研究。电话：(023)68755602

收稿日期：2001-06-17；修回日期：2001-09-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net