DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.011

缺氧复合失血性休克动物血浆对血管内皮细胞形态及活力的影响*

王培勇 许蜀闽 孙秉庸 (第三军医大学基础部病理生理学教研室 高原医学研究室)重庆,630038

提 要 为了探讨缺氧情况失血性休克的发生发展的机理,我们观察了在模拟海拔4000 m高原失血性休克山羊的血浆(shock plasma,SP)对培养的肺动脉内皮细胞(pulmonary arterial endothelial cell,PAEC)的作用。PAEC在含不同SP培养液中培养24 h后进行观察,在高浓度SP条件下细胞收缩变圆、脱落,大部分细胞死亡,细胞活力明显降低,以上变化具有明显的浓度依赖关系($r=0.985$, $P<0.001$)。加热灭活的SP或经鱼精蛋白沉淀的SP毒性作用明显减弱。PAEC在含50%SP培养液中培养1～3 h后,细胞活力明显升高,3 h达高峰,3～6 h后明显降低,6 h末降至最低值,12～24 h末逐渐回升。上述结果表明,缺氧复合血性休克动物血浆中含有对PAEC激活和损伤作用的成份,其作用具有浓度依赖和时间依赖关系。该成份对热敏感,可被鱼精蛋白沉淀。本实验提示血管内皮细胞的"激活－损伤"可能参与缺氧复合失血性休克的发展过程。

关键词 缺氧;失血;休克;肺;内皮细胞
中图法分类号 R605.971

血管内皮细胞不仅构成血管的屏障和衬里,而且是重要的内分泌细胞,在生理和病理过程中起着非常重要的作用。内皮细胞与功能受损见于创伤、烧伤、休克和感染等多种病理生理过程。血管内皮细胞在缺氧复合失血性休克发展过程中的作用尚不清楚。我们推测缺氧复合失血性休克动物血浆可能对内皮细胞有毒性作用,为此我们观察了缺氧复合失血性休克山羊血浆对培养的肺动脉内皮细胞形态及细胞活力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

肝素、鱼精蛋白(上海生化试剂厂)、二甲基甲酰胺(DMF,上海化学试剂厂)、RPMI－1640和Trypsin(Difico)、噻唑蓝(Thiazole blue,MTT,Sigma)、SDS(Sigma),其它试剂均为国产AR级,96孔培养板为丹麦产品。

1.2 缺氧复合失血性休克血浆的制备及处理

成年山羊8只,雄雌各半,体重10～15 kg,预先在低压舱内模拟海拔4000 m高原缺氧24 h后复制失血性休克动物模型。动物麻醉固定全身肝素化后,经股动脉放血使血压维持在6.0 kPa 1 h,然后回输放出的血液,继续观察直至动物死亡。采集休克后16 h血液,离心(12000 g ×30 min,4℃)分离血浆,即为缺氧复合失血性休克血浆(shock plasma,SP)。另备缺氧前山羊血浆(plasma,P)及缺氧24 h末山羊血浆(hypoxic plasma,HP)作为对照。血浆经0.22 u微孔滤膜过滤除菌分装,低温冰箱保存备用。SP于必要时进行下述处理:①热灭活SP(heat denatured SP,HDSP):SP于56℃加热30 min;②鱼精蛋白沉淀SP(protamine precipitated SP,PPSP):加入适量鱼蛋白,37℃温育30 min后离心收集上清;③热灭活鱼精蛋白沉淀SP(HD+PP)将PPSP于56℃加热30 min。

1.3 休克血浆对肺动脉内皮细胞作用的观察

1.3.1 浓度依赖效应 新生小牛肺动脉内皮细胞(pulmonary arterial endothelial cell,PAEC)长满汇合成单层后传代,按10^4/孔浓度接种于96孔培养板,所用的培养基为含20%小牛血清的RPMI－1640,培养2～3 d细胞汇合呈单层后,更换不含小牛血清的培养基。向培养基中加入1∶2^0～1∶2^6不同稀释度的血浆,培养24 h后在相差显微镜下观察并照像然后每孔加入20 μl MTT溶液(5 mg/ml),37℃温育4 h后加入50%DMF＋20%SDS溶液显色18～20 h,在酶标仪上以650 nm为参考波长测定595 nm的A(OD)值,A(OD)值代表细胞活力。

1.3.2 时间依赖效应 细胞接种同上,培养24 h后每孔加入50%浓度的上述血浆,于1、3、6、12及24 h 5个时点进行观察,MTT细胞活力计数同上。

1.4 统计学处理

所得数据采用多因素方差分析,结果以$\bar{x}\pm s$表示(但因图中曲线太多,故未标明s),并进行方差保护下的显著性检验。对PAEC的A(OD)值与SP浓度做了相关分析。

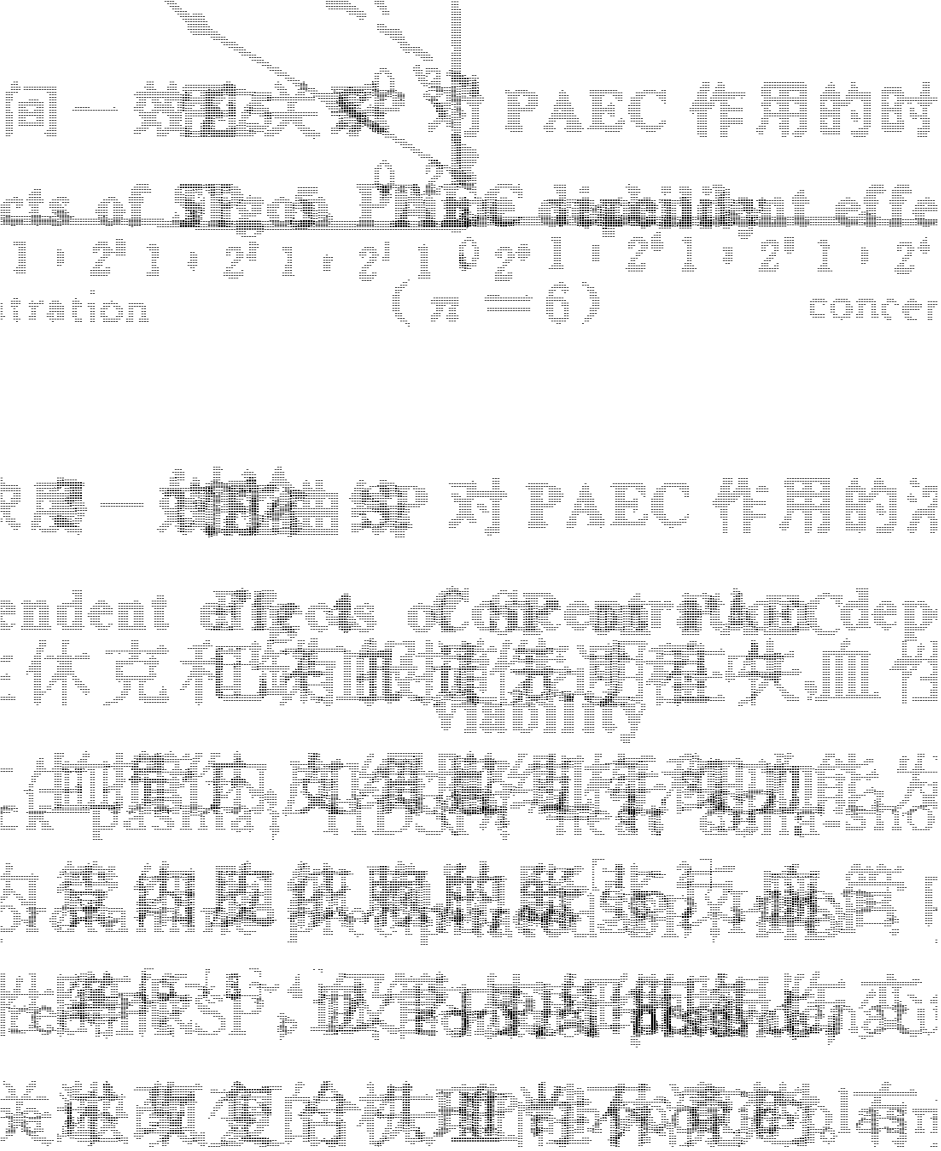
2 结果

2.1 SP对PAEC形态的影响

相差显微镜下观察,P和HP对PAEC形态无明显影响,细胞呈单层排列紧密、无脱落,部分细胞为梭形。向PAEC培养基中加入SP培养24 h后观察,发现SP浓度越高,细胞损伤越重。在100%SP作用下,大部分细胞死亡脱落,少部分残存细胞收缩变圆。在25%SP作用下,出现大片脱落区,其余部分细胞贴壁,呈长梭形,胞浆内颗粒增多,部分细胞的胞浆有空泡(图1)。随着SP浓度降低,贴壁细胞逐渐增多(图2、3)。热灭活SP及鱼精蛋白沉淀SP对PAEC损伤作用明显减弱,在同一浓度下,比SP组贴壁细胞多,但胞浆内仍可见颗粒和空泡。鱼精蛋白处理后再加热灭活能进一步减弱SP对PAEC的损伤作用。

* 全军"八五"攻关项目

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



肺血管内皮细胞活力和形态改变及其机理的研究尚未见报道，我们采用细胞培养的方法，从细胞形态及活力两个方面观察了缺氧复合失血性休克血浆对PAEC的作用。

MTT法细胞活力测定能快速、准确地反映细胞活力的高低。MTT被细胞摄取后经线粒体内的脱氢酶类作用转化为甲臜(Formazan)，后者在595 nm有吸收峰。甲臜产量与细胞数量及细胞功能状态成正比。因通过测定595 nm的A(OD)值即可反映细胞活力[7]。本实验观察到SP对PAEC具有明显的毒性作用，其作用具有浓度依赖关系。加热灭活及鱼精蛋白处理均能减弱SP的毒性。上述结果提示SP含有对PAEC发生毒性作用的物质。该物质不耐热，因而并不是内毒素或血小板激活因子；该物质可被鱼精蛋白沉淀(鱼精蛋白是一种阳离子蛋白，它可沉淀负离子成份)，提示它可能属于对热敏感的带负电荷的蛋白质或肽类。P和HP在低浓度时对PAEC活力有一定的抑制作用，而高浓度时则可增强PAEC的活力，其机理有待于进一步探讨。

SP对PAEC活力的影响的时间效应呈双相。早期(1～3 h)细胞活力明显升高。因细胞数量在短期内不会明显增多，细胞活力的增高表明PAEC被激活产生更多的甲臜。后期细胞活力降低，至6 h达最低水平。从形态上看，仅有少部分细胞收缩变圆，贴壁细胞内颗粒增多，细胞活力的降低表明PAEC受抑制和/或损伤，产生甲臜能力降低。12～24 h细胞活力趋于正常。上述PAEC活力的时间依赖性变化可能反映了内皮细胞在SP作用下从激活到抑制和/或损伤的一个连续发展的过程。因为PAEC在含20%山羊血清培养基中生长良好(资料未列出)，所以P组PAEC活力随时间延长逐渐增加可能是由于细胞总数逐渐增加所致。HP组PAEC活力的时间依赖变化也呈双相趋势，但变化幅度较小。以上结果表明，缺氧24 h山羊血浆中存在少量对PAEC有激活和抑制作用的成份，该类物质在失血性休克16 h后大幅度增加，从而激活PAEC，进而导致PAEC损伤，甚至造成PAEC死亡脱落。许多细胞因子如干扰素、肿瘤坏死因子、白介素－1等可激活血管内皮细胞[8]。内皮细胞激活后发生形态、功能和代谢的改变，如胞体变长、高尔基体和内质网增多，细胞表面粘附分子表达增加。SP中是否含有上述细胞因子尚不清楚。在体外PAEC能被SP激活和损伤，由此推测在失血性休克动物内，血管内皮细胞也可能发生从激活到抑制和损伤的变化。这些改变可能在休克发生发展过程中起重要作用。

通过本实验的结果可得出以下结论：缺氧复合失血性休克动物血浆中存在对培养的血管内皮细胞有激活和损伤作用的成份。这些物质产生于休克过程，单纯缺氧所起的作用较弱，其性质有待于进一步研究。血管内皮细胞"激活－损伤"可能参与与缺氧复合失血性休克的发展过程。

参考文献

1 Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M et al. Lumenal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal capilliaries during hemorrhagic shock. Circ Shock, 1989; 29(1): 27

2 Mazzoni MC, Intaglietta M, Cragoe EJ et al. Amiloride－sensitive Na^+ pathways in capillary endothelial cell swelling during hemorrhagic shock. J Appl Physiol, 1992; 73(4): 1467

3 Lefer AM, Tsao PS, Na XL. Shock－ and ischemia－induced mechanisms of impairment of endothelium－mediated vasodilation. Chest, 1991; 100(3S): 160S

4 Szabo C, Farago M, Horvath I et al. Hemorrhagic hypotension impairs endothelium－dependent relaxations in the renal artery of the cat. Circ Shock, 1992; 36(3): 238

5 Eversole RR, Smith SL, Beuving LJ et al. Protective effect of the 21－aminosteroid lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U74006F) on hepatic endothelium in experimental hemorrhagic shock. Circ Shock, 1993; 40(2): 125

6 Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Endothelial cell dysfunction occurs after hemorrhage in nonheparinzized but not in preheparinized models. J Surg Res, 1993; 54(5): 499

7 Hansen MB, Nielsin SE. Rexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods, 1989; 119: 203

8 Pober JS. Cytokine－mediated activation of vascular endothelium. Am J Pathol, 1988; 133(3): 426

(收稿：1994-12-17；修回：1995-07-28)

The effect of plasma from goats in hypoxia complicated with hemorrhagic shock on the activation of vascuar endothelia cells in vitro

Wang Peiyong, Xu Shuming, Sun Bingyong (Research Lab of High Altitude Medcine, Third Miitary Medica University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of plasma from the goats in hypoxia complicated with hemorrhagic shock on the

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

cultured endothelial ces of pullmonary artery (PAEC) were observed. It was found that the goat pasma damaged, devitaized or decreased the viabiity of PAEC in a concentration-dependent parttern. The toxic effects of goat plasma was significantly decreased after heating (56℃ for 30 minutes) or precipitation with protamine. Goat pasma exerted diphasic time-dependent effects on PAEC, that is, the activation phase which lasted from the 1st to 3rd hour after the administration of goat pasma and in whihc the viabiity of PAEC was increaeed and the damage phase which extended from the 3rd to 6th hour. These findings suggest that goat pasma during hypoxia compicated hemorrhagic shock may contain certain substances which can activate and damage PAEC and the activation phase of PAEC may pay an important roe in the pathoogica process of hemorrhagic shock.

Key words hypoxia; hemorrhage; shock; lung; endothelial cell

****

呼吸道感染性疾病病原体的基因诊断研究

Use of polymerase chain reaction in the detection of respiratory infections pathogens

黄文杰 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,630037

在本文第一部分,我们建立了三种细菌的PCR检测方法。其反应体积为20 μl,其中引物量为10 pmol/L,模板量为ng水平,4种dNTPs各200 μmol/L,10×PCR缓冲液(含Mg^{H})2 μl,Taq酶0.5 U。反应条件:94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,最后72℃延伸10 min,35个循环。扩增产物进行Southern转印杂交和直接测序。结果示三种细菌PCR检测的特异性良好,彼此间无交叉反应。检测下限均为fg水平,相当于几个细菌基因组DNA。10例模拟阳性痰标本结果亦均为阳性,扩增产物的特异性还通过Southern杂交和测序得到了证实。

接着又建立了复合PCR方法并对30例临床痰标本进行了检测。在实验中我们采用了摇摆扩增和加入不等量引物的方法,解决了大片段扩增产物量少的问题。结果示复合PCR对三种细菌的检测方法成功。在对30例痰标本的检测中,检出绿脓杆菌13例,流感嗜血杆菌10例,肺炎链球菌7例,其中三种细菌PCR检测均为阳性者3例,二种阳性者5例与绿脓杆菌培养阳性结果相符合者7例,另有2例虽反复多次经PCR检测仍为阴性。复合PCR方法的建立使得一次性从呼吸道标本中检测出常见可疑病原体成为可能,既经济又快速简便。

然后又建立了用微量荧光计测定PCR产物的方法。将三种细菌DNA模板进行倍比稀释,各自单独行PCR扩增。反应体系及反应条件同第一部分,取10 μl扩增后样品进行测定,每一样品测二次,取其平均值为纵坐标,模板浓度为横坐标作图。此法所需样品少(可少至2 μl),对于产量微少的PCR产物,无疑可大大节省样品。操作熟练者,2～3 min便可获得样品中DNA的含量,是一种简单、快速、灵敏准确和重复性好的检测方法,易于在临床实验室推广使用。

由于竞争PCR才是可靠的PCR定量方法,本文通过PCR重组DNA技术构建内参模板后,将之与检测模板一同行PCR,二模板产物采用荧光测定,以其比值为纵坐标,标准模板浓度为横坐标作图。标准曲线建立之后,可据此推算待测模板的量,达到定量的目的。

最后,我们应用RAPD技术对几种呼吸道常见菌和军团菌的几个血清型进行了DNA扩增。反应体系为10 μl,引物加量为5 nmol。反应条件:94℃ 60 s,34℃ 60 s,72℃ 120 s,45个循环。单引物扩增五种细菌基因组DNA的结果示每个样品均可见多条扩增片段,军团菌6种血清型的扩增结果也同样示扩增片段的数量大小不等。

在本实验中,我们将文献报道的方法做了改进,将反应体系变小到仅为10 μl,引物量减少到5 nmol,这样节约了试剂,缩短了反应时间,亦可得到满意的结果。RAPD技术简便易行,省力省时,所需样品也少,仅需ng级DNA,尤其适用于那些生长缓慢、大量培养造价高或有危险的微生物的检测。

关键词 多聚酶链反应;肺炎链球菌;流感嗜血杆菌;绿脓杆菌;基因诊断

中图法分类号 R517.6

(收稿:1995-07-01;修回:1995-07-27)

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