DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.009

严重多发伤后循环内皮细胞体外培养及其影响因素*

周 健** 林水金 杨映波 冯素珍 简华刚 (第三军医大学附属大坪医院战创伤中心)重庆,400042

提 要 目的:探讨严重多发伤后循环内皮细胞(CEC)的体外培养及其影响因素。方法:对17例严重多发伤(ISS≥20)病人外周血中CEC进行了分离、鉴定和培养。结果:培养总成功率为43.3%,而ISS≥30者为62.5%。伤情愈重,培养成功率愈高。影响CEC体外培养成败的因素是,损伤严重程度、采血时间、分离和培养技术。结论:本研究通过完善CEC分离、培养技术,克服不利影响因素,提高了培养成功率,为进一步研究CEC表面成份奠定了基础,并提供了新的途径。

关键词 创伤和损伤;循环内皮细胞;体外培养
中图法分类号 R641

目前认为,循环内皮细胞(Circulating endothelial cells, CEC)是在活体内唯一可以特异地直接反映血管损伤的指示物,并有自身的生物学特性[1]。为了进一步开展对CEC表面成份的研究,本研究对严重多发伤后CEC的体外培养及其影响因素进行了探讨,现将初步结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

严重多发伤伤员17例。男性14例,女性3例;年龄23~72岁,平均32.8岁。车祸伤12例,高处坠落伤3例,刀伤2例。损伤部位(依据AIS-90)2~5个,平均3.8个。损伤严重度计分按林水金等[2]研究的结果而定,全部病例ISS≥20分,其中2例坠落伤病人伤情最重,分值分别为41和48。全部病例均有不同程度休克,收缩压3.26~12 kPa(26~90 mm Hg)。入院时间最短为伤后28 min,最长为4小时30分钟,平均1小时40分钟。

1.2 CEC分离与培养

入院后立即自周边静脉采血6 ml,注入灭菌试管,枸橼酸钠抗凝。在严格无菌条件下分离CEC,即加入等量RIM 1640,充分混匀,再加入密度为1.050 Percoll分离液2 ml,离心后吸取介面细胞层,加入少量RIM 1640,低速离心洗涤。先取少许行CEC计数,然后将CEC数调整至5×10⁵/ml(含20% FCS完全培养液),加入预先加有0.3%明胶的24孔培养板(内置小玻片),置于二氧化碳箱培养(37℃,5% CO_2),24 h换液半量,48 h取出小玻片,1640洗3次,风干、固定待检。

1.3 培养的CEC鉴定

经冷丙酮固定的CEC片,PBS洗,加Ⅷ因子多抗(Boehrimger mannheim)4℃过夜,PBS洗,加生物素标记的S-P多抗,PBS洗后加链霉卵白素标记有HRP的S-P多抗(Boehrimger mannheim),PBS洗,加DAB(含0.3% H_2O_2)显色、水洗、复染、脱水、封片。

2 结果

2.1 具有活力的CEC计数与伤情的关系

本组CEC计数最少为0.01×10⁴个/ml,最多者为25.5×10⁴个/ml,总的趋势是伤情愈严重,CEC数量愈多。CEC数量(平均数)与伤情严重程度的关系详见附表。ISS 40~49分值段与20~29分值段比较,前者CEC数量显著多于后者,培养成功率亦较后者明显增高($P < 0.05$)。

附表 多发伤严重程度与CEC数量的关系

Table Correlation between severity of multiple trauma and CECs count

ISS	*n*	CEC count ($\bar{x}$, Nos/ml)	Cases of successful culture	Rate of successful culture(%)
20~29	9	0.43×10⁴	3	33.3
30~39	5	0.79×10⁴	3	60.0
40~49	3	1.42×10⁴	2*	66.7*

*: $P < 0.05$ *vs* ISS 20~29

2.2 人脐带血管内皮细胞(HUVEC)形态及鉴定

作为实验对照,对培养的HUVEC形态进行了观察,姬姆沙染色显示,核呈椭圆形,胞浆呈梭形,见图1。S-P免疫组化酶联技术鉴定,细胞显示Ⅷ R:Ag标记为阳性,细胞呈梭形,胞浆呈不均匀分布的黄褐色,胞核通过复染仍有部分不着色,见图2。阴性对照细胞未见着色。

* 国家自然科学基金资助项目,No,39370690
** 周 健,男,33岁,主治医师

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

图 1　培养的 HUVEC　(GIEMSA× 250)

Fig 1　Cultured HUVEC　(GIEMSA× 250)

图 2　循环内皮细胞　(S-P× 400)

Fig 2　CECs　(S-P× 400)

2.3　CEC鉴定

S-P免疫组化酶联技术鉴定显示,培养的 CEC呈现Ⅷ R:Ag阳性。被标记的 CEC呈不均匀黄褐色,且形态与 HUVEC相似,呈长梭形,胞核不着色,见图 3 阴性对照细胞未见着色。

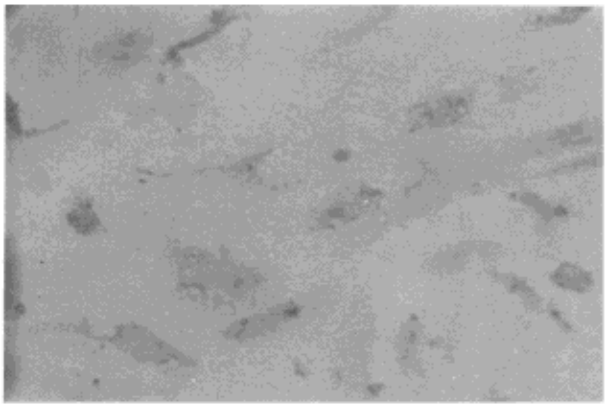


图 3　培养的循环内皮细胞　(S-P× 400)

Fig 3　Cultured CECs　(S-P× 400)

3　讨论

1985年,国外作者[3]从动脉粥样硬化患者的外周血中分离出有活力的 CEC,并在体外培养成功。杨映波等[4]从 1989年起在国内率先开展了创伤过程中 CEC变化及机制研究,证实了创伤后 CEC的明显增多,且从创伤病人外周血中分离出具有活力的 CEC,为体外培养获得成功提供了可靠依据。我们认为,来源于观察对象中的 CEC本身具备由种属、组织和血管来源所决定的某些特征,并在创伤后活体内复杂的病理过程中,可能发生结构、功能、代谢和免疫学特征的变化,这些与致伤因素和伤情严重程度是密切相关的。因此,有活力的 CEC可被视为携带有机体内大量信息的载体。为了能及时有效地获取这些"信息载体",笔者在以往研究的基础上对创伤后 CEC体外培养及影响因素进行了较深入的研究。其结果表明,创伤病例血中确有具有活力的 CEC,并能在体外培养获得成功,为研究 CEC表面成份提供重要途径。在研究过程中,我们体会到影响 CEC体外培养成败因素主要有如下几个方面。

3.1　损伤严重程度

本研究结果表明,总的培养成功率为 47.3%,ISS ≥ 30分者则为 62.5%。而 ISS为 20~ 29分值仅有 33.3%的病例培养成功。这充分说明,培养成功率随着伤情严重程度的增加,培养成功率就越高。

3.2　采血时间

理论上认为,内皮细胞的平均寿命为 3个月。据估计,70kg体重的人约有 EC10^{12}个。因此,每天都有许多 EC脱落进入循环血中成为 CEC,多属无核的 EC残骸;而在病理,尤其是在创伤机械力作用的情况下,自损伤的血管壁上剥脱下进入血中的 EC,则多为有核的、可供体外培养的 CEC。这类细胞转变成衰老的、无核的 CEC需要多长时间目前尚无依据。但有一点是比较明确的,即距受伤时间越短,循环血中具有活力的 CEC越多,如此时采血进行 CEC分离,体外培养容易获得成功。本研究 2例,分别于伤后 4 h和 4.5 h采血,培养未成功。

3.3　分离 CEC技术

本研究采用的是 Percoll密度梯度一步分离法[5]。此法是需采血 3 ml,较国外需采血 30 ml的分离法有较

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

大改进。但我们进一步研究结果表明,如将采血量增至 6 ml,则可明显提高 CEC收集数量和培养成功率。我们还认为,分离 CEC的重要环节是将 Percoll分离液密度标化为 1.050,否则,在分离的细胞中会混有较多量的其它细胞,遭致培养失败。本研究属此种情况仅见一例。

3.4 培养技术

本研究尚未遇及由于培养技术的原因而造成培养失败的问题。但必须强调,在培养 CEC的过程中要很好掌握细胞数调整、培养液配制、二氧化碳浓度和换液等重要环节,方能保证培养成功。

参考文献

1 杨映波,王正国.循环内皮细胞研究进展.生理科学进展, 1993; 24(1): 70

2 林水金,杨映波,朱锡光等.用损伤严重度评分法评价 1488例病人伤情.中华创伤杂志, 1994; 10(1): 31

3 Samaden A, Piovella F, Almacio P *et al*. Isolation and growth of humam endothlial cells from peripheral blood by PVP-silica density gradients. Boll Soc It Biol Sper, 1985; 61: 957

4 杨映波,王正国.创伤时血管内皮细胞损伤机理的实验和临床研究.第三军医大学学报, 1992; 14(1): 102

5 杨映波,王正国.两种方法对血管内皮细胞回收率影响的比较.第三军医大学学报, 1992; 14(6): 587

(收稿: 1996-12-18;修回: 1997-05-05)

(编辑 王 红)

In vitro culture of circulating endothelial cells and its influential factors after severe multiple trauma

Zhou Jian, Lin Shuijin, Yang Yingbao, Feng Suzhen, Jian Huagang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore *in vitro* culture of circulating endothelial cells (CECs) and its influential factors after severe multiple trauma. Methods: After being isolated from the peripheral blood in 17 patients with severe multiple trauma (ISS≥ 20), the CECs were differentiated and then cultured *in vitro*. Meanwhile, the influential factors on the culture were observed and analyzed. Results: The total successful culturing rate was 62.5%. The severer the trauma was, the higher the successful culturing rate was. The influential factors on the culture were severity of trauma, time for blood sampling and techniques of isolation and culture. Conclusion: In this study, the successful rate of in vitro culture of CECs was increased through improving the techniques of isolation and culture and overcoming the unfavorable influential factors. This provides a new method for further study on the surface components of CECs.

Key words multiple trauma; circulating endothelial cell; *in vitro* culture

海马神经化学因素对兔 P3波影响机制的实验研究

An experimental study on hippocampal neurochemical mechanisms responsible for P3 potential changes in rabbits

虞乐华* 吴宗耀 (第三军医大学附属西南医院康复理疗科)重庆, 400038

迄今,P3波电位作为辅助诊断精神、神经性等认知功能损害性疾病、评估病程、疗效及预后的重要指标,为临床提供了有价值的客观定量无创性电生理检测手段,是对既往临床诊治精神、心理性疾病过份依赖于现象描述等行为学指标的可靠补充。P3波的发生是脑内各种神经化学因素,如递质、调质等在不同脑区协同活动的结果。神经化学因素的失衡必然导致电位异

(下转页 23页)

* 虞乐华,男,34岁,主治医师,讲师,博士研究生

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