DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.001

烧伤病人血清对培养脐静脉内皮细胞的影响*

论著

罗向东 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,630038

提 要 用培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为模型,加入体表烧伤面积 30%~50%和 70%~90%两组病人的血清,观察培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、前列环素(PGI_2)和一氧化氮(NO)的变化,并测定 HUVEC 中纤维状聚合体(F-actin)含量和内皮素-1(ET-1)斑点杂交半定量。结果表明,加入烧伤血清后 1 h,ET-1 mRNA量增加 3倍,并持续到 12 h,NO产量在 3 h开始显著升高($P<0.05$),持续到 12 h。12 h后 HUVEC损伤显著,LDH升高($P<0.01$),PGI_2产量增加($P<0.05$),F-actin显著下降($P<0.01$),HUVEC形态变圆收缩,连接分离和部分脱落。证明烧伤血清加入后首先刺激 HUVEC的 ET-1表达,随后 NO合成开始增多,以维持血管舒缩功能的平衡。12 h后 HUVEC开始出现明显的损伤表现。提示烧伤血清对静脉内皮细胞 VEC的作用是一由激活逐渐到损伤的过程。

关键词 脐静脉;内皮;乳酸脱氢酶;前列环素;肌动蛋白类;mRNA;一氧化氮
中图法分类号 R644.02

严重烧伤后,全身性血管通透性增加,证明了构成血管通透屏障的内皮细胞对血管内外物质交换的控制功能丧失或部分丧失。

作者在家兔烧伤模型研究中已证明烧伤早期白细胞在各脏器的滞留对内皮细胞损伤有重要作用[1,2]。因此,本研究试图证明 Z烧伤病人血清中的体液因素对内皮细胞血管调节功能的影响和在内皮细胞损伤中的作用及意义。

1 材料与方法

1.1 实验分组

1.1.1 分离培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 按文献[3]方法,并经Ⅷ因子染色鉴定。用 35 mm塑料培养皿,每皿加入(1~1.5)×10^3个细胞,待 HUVEC融合成片后 5 d~10 d使用。

1.1.2 将已培养融合的 HUVEC分成 3组 对照组($n=15$),加 30%~50% TBSA血清组($n=15$),加 70%~90% TBSA血清组($n=15$)。烧伤面积分别为 30%~50%,70%~90%两组病人,各 3例,于伤后 48 h内抽股静脉血 10 ml,无菌分离血清,56℃ 30 min灭活补体。组内混合,按 15%比例与 M199培养液混合后分别加入已融合的 HUVEC中(每组 $n=15$),并观察 3、6、12 h时相点。对照组,加入正常人血清。

1.2 观察指标

1.2.1 培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性测定 用常规生化方法测定。

1.2.2 前列环素(PGI_2)代谢产物 6-酮-$PGF_{1\alpha}$定量 用放免法测定。药盒为解放军总医院生产。

1.2.3 HUVEC内微丝蛋白定量 根据 Phalloidin与 F-actin具有很强亲合力的特点,采用 TRITC荧光标记 phalloidin,与 F-actin结合,测定 F-actin含量,同时测定细胞的总蛋白量。结果用 F-actin/细胞蛋白的比值表示。

1.2.4 培养液中 NO代谢产物 NO_2^- 的测定[4] 由于 EDRF-NO半衰期短,测定较困难。本实验利用 2-乙氧-6,9-二氧基吖啶与亚硝酸根在盐酸作用下生成樱桃红色的原理测定。

1.2.5 HUVEC中内皮素(Endothelin, ET) mRNA斑点杂交半定量

1.2.5.1 用异硫氰酸胍一步法,提取 HUVEC中的总 RNA。

1.2.5.2 在 DNA合成仪上合成内皮素 cDNA探针,探针序列以人 ET-1 7~15氨基酸残基的 cDNA编码为准。用末端转移酶将生物素标记在 3′-OH末端。

1.2.5.3 mRNA点膜与探针杂交,显色。

1.2.5.4 在薄层扫描仪上分析各组内皮素-1(Endothelin-1, ET-1) mRNA半定量。每个时相点用占该组总表达量的百分率表示。

1.2.6 HUVEC的形态学观察 将各时相点培养细胞分两份,一份用 2%甲醛和 1%戊二醛(0.02 mol/L PB pH 7.3)固定,再用 0.02 mol/L PB洗两次,加入 60∶40的 0.5%乙醇酸伊红和 0.25%卡马斯蓝染 20 min,再用 0.25%卡马斯蓝复染 5 min,光镜观察。另一份 HUVEC,用 3%戊二醛固定,漂洗、脱水、干燥后,镀膜,用扫描电镜观察。

1.3 统计学处理

所得数据用 58c/59专用统计微机(美国德克斯仪器公司)处理,数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间进行显著性 t 检验。

2 结果

2.1 HUVEC培养液中 LDH活性和 6-酮-$PGF_{1\alpha}$含量变化

加入烧伤血清后 12 h,HUVEC培养液中 LDH活性和 6-酮-$PGF_{1\alpha}$含量明显升高,见表 1、2

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700-03

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

表 1 加入烧伤血清后 HUVEC培养液中 LDH 的变化 ($\bar{x}\pm s$, u/ml)

Tab 1 Changes of LDH activity in HUVEC medium after adding burn patient sera ($\bar{x}\pm s$, u/ml)

Postburn (h)	Control sera	30% ~ 50% TBSA burn sera	70% ~ 90% TBSA burn sera
3	195.41± 78.69	225.45± 107.60	283.12± 97.90
6	231.76± 112.70	278.66± 132.60	327.54± 143.65
12	257.54± 118.52	846.33± 194.41**	995.82± 288.46**

** : $P < 0.01$ *vs* control

表 2 加入烧伤血清后 HUVEC培养液中 6-酮-$PGF_{1\alpha}$ 的变化 ($\bar{x}\pm s$, ρ_B /pg·ml^{-1})

Tab 2 Changes of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in HUVEC medium after adding burn patient sera ($\bar{x}\pm s$, ρ_B /pg·ml^{-1})

Postburn (h)	Control sera	30% ~ 50% TBSA burn sera	70% ~ 90% TBSA burn sera
3	481.43± 69.54	483.26± 96.02	564.12± 167.19
6	811.54± 124.57	876.66± 176.40	933.46± 213.71
12	983.1± 326.04	1474.24± 188.02*	1511.63± 342.1*

* : $P < 0.05$ *vs* control

2.2 加入烧伤血清后 12 h, HUVEC中 F-actin含量见表 3

表 3 加入烧伤血清后 HUVEC中 F-actin的变化 ($\bar{x}\pm s$, C_B /pg·μg^{-1})

Tab 3 Changes of F-actin in HUVEC after adding burn patient sera ($\bar{x}\pm s$, C_B /pg·μg^{-1})

Postburn (h)	Control sera	30% ~ 50% TBSA burn sera	70% ~ 90% TBSA burn sera
3	10.20± 1.68	11.23± 1.67	9.53± 2.15
6	11.82± 2.73	9.7± 2.07	9.36± 2.57
12	10.53± 2.13	6.97± 0.74**	6.4± 1.55**

** : $P < 0.01$ *vs* control

2.3 烧伤血清对 HUVEC培养液中 NO_2^- 的影响见图 1

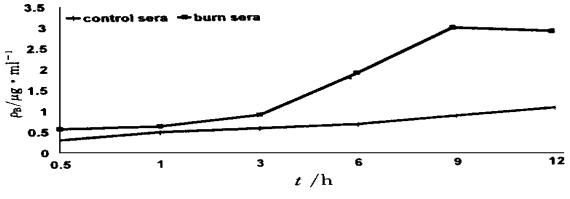


图 1 加烧伤血清后培养液中 NO_2^- 含量的变化

Fig 1 Changes of NO_2^- in medium after adding burn patient sera

2.4 烧伤血清对 HUVEC ET-1 mRNA的影响见图 2

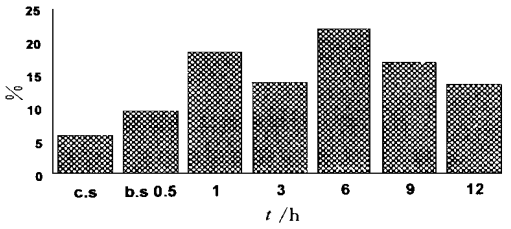


图 2 加入烧伤血清后培养 HUVEC中 ET-1 mRNA的变化

Fig 2 Changes of ET-1 mRNA in HUVEC after adding burn patient sera

2.5 形态学改变

烧伤血清对 HUVEC的损伤非常明显,两组血清加入后,均在 12 h左右出现光镜下的形态学改变,见图 3 4 主要变化为细胞体收缩,细胞间连接分离,随时间的延长甚至出现细胞脱落。扫描电镜亦可见细胞收缩,细胞间连接分离和细胞脱落。

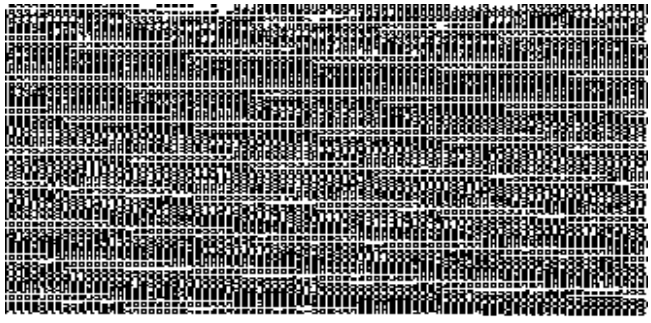


图 3 加入正常人血清培养的 HUVEC (卡马斯蓝染色× 200)

Fig 3 The HUVEC cultured in medium containing normal human sera (Coomassie brilliant blue× 200)



图 4 加入烧伤血清后 12 h, HUVEC的形态变化,细胞间连接分离 (卡马斯蓝染色× 400)

Fig 4 Morphologic changes of HUVEC cultured in medium containing burn patient sera, the cell junctions seperated (Coomassie brilliant blue× 400)

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

3 讨论

3.1 烧伤血清对 HUVEC的损伤作用显著

烧伤后引起 VEC损伤的机理十分复杂。以往研究发现,烧伤后许多体液因子,如细胞因子(TNF、IL-1)、炎性介质(LT、5-HT,缓激肽)、水解酶类(组织蛋白酶、弹性蛋白酶等)、降解产物(FPA、B)、氧自由基、补体和血细胞成份,如中性粒细胞(PMN)、血小板、单核巨噬细胞等均有明显升高或激活[5,6],这些对 VEC可能都有一定的损伤作用。

在体内,由于多因素的相互干扰,难于区分血细胞与体液因素的作用。因此,本实验采用体外培养 HUVEC模型,拟观察烧伤后多种体液因子的综合影响。

烧伤血清中存在着大量的炎性介质和细胞因子等可损伤 VEC。从表 1、2可看到,加入烧伤血清的两组 HUVEC培养液中 LDH和 $PGF_{1\alpha}$与对照组比均有显著增高($P < 0.01$和 0.05)。

LDH是一种糖酵解酶,广泛存在于组织细胞浆中,只有在细胞膜受到损伤,胞浆中的 LDH才大量释放到细胞外。培养液中 6酮-$PGF_{1\alpha}$是 PGI_2的代谢产物,通常认为内皮细胞在受到机械刺激、化学因素刺激以及一些内源性介质作用下,磷脂酶 A_2作用于细胞膜上的磷脂而生成 PGI_2。

表 3显示烧伤血清对 HUVEC中的 F-actin含量亦有明显的影响。Actin是细胞内含量最丰富的蛋白成份,在细胞内它以游离的球状单体(G-actin)或纤维状聚合体(F-actin)两种互换形式存在,F-actin的下降标志着微丝降解。由于微丝的主要功能是维持 VEC特殊的扁圆形态,并与细胞间的紧密连接及细胞外基质附着有关[7]。因此,微丝的降解是 VEC受到刺激时产生收缩反应、细胞间连接分离、细胞脱落的原因。

本实验结果证明了烧伤血清中的某些成份对 HUVEC具有损伤作用。两组烧伤血清(30%~ 50% TBSA和 70%~ 90% TBSA)对 HUVEC的损伤作用均在加入后 12 h左右表现。从形态上观察发现此时 HUVEC细胞体回缩,细胞间形成许多裂隙,部份 VEC脱落。细胞大部分仍呈圆形,少数呈梭形,见图 3、4。F-actin含量降低是 HUVEC产生这些变化的物质基础。

3.2 烧伤血清对 HUVEC产生 EDCF和 EDRF的影响

VEC产生的 EDRF和 EDCF对组织灌流和组织缺血、缺氧具有重大影响。本实验首先观察了正常血清可以诱导 HUVEC产生一定量的 NO,随着培养时间的延长,培养液中 NO_2^- 逐渐增加。但在 9 h以后的 NO_2^- 的含量不再明显增加,见图 1。表明 VEC的 NO分泌有一基础水平,并具自身反馈调节机理。因为更换新培养液后,NO_2^- 又会逐渐增加重复以前的变化。

加入烧伤血清后,NO_2^- 的增加幅度在 3 h以后即明显地超过正常血清,并在 9 h左右停止增长,而维持在一较高水平。这一结果揭示烧伤血清中有较强的 NO合成刺激物质存在。这种刺激作用在 9 h左右使 NO在一较高水平达成新的平衡。

本实验结果表明,未加刺激的 HUVEC有少量的 ET mRNA表达。烧伤血清加入后,HUVEC ET-1 mRNA在 1 h以后即开始增加明显(3倍于对照)。以后的时相点均波动在高于对照 2~ 3倍的水平。但在 12 h,下降明显,见图 2。这一结果说明烧伤血清中所含物质能显著地诱导 ET基因表达。

根据本实验结果,烧伤血清刺激 HUVEC ET表达在 1 h升高 3倍,而 NO_2^- 的增加在 3 h才开始出现显著性。说明 ET表达增多先于 NO增多。烧伤血清引起 ET表达增强和随后的 NO合成增多可能是 VEC受到刺激时的一种调节反应。

从实验结果可以看出,随着 HUVEC明显损伤(LDH升高,细胞微丝降解)ET表达和 NO合成均出现减弱趋势。提示烧伤血清作用一定时间后对 ET表达和 NO合成有抑制作用。

参考文献

1 杨宗城,罗向东,高建川等.血管内皮细胞在烧伤后脏器损害中的作用.解放军医学杂志,1996;21(1):10

2 罗向东,杨宗城,黎　鳌.家兔烧伤早期内脏血管内皮细胞损伤的变化.第三军医大学学报,1995;17(4):279

3 安　静,黎　鳌,杨宗城等.胎儿脐静脉内皮细胞的培养.第三军医大学学报,1990;12(3):222

4 罗向东,杨宗城,黎　鳌等.简捷、灵敏的一氧化氮间接测定法.中华创伤杂志,1994;10(4):185

5 Friedl H P, Till G O, Trentz O *et al*. Role of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. Am J Pathol, 1989;135(1):203

6 安　静,黎　鳌,杨宗城.烧伤血清、纤维蛋白肽 A、B对血管内皮细胞的影响.第三军医大学学报,1990;12(4):275

7 Schniffler H, Franke R P, Drenckhahm D. Role of the endothelial actin filament cytoskeleton in rheology and permeability. Z Kardiol, 1989;78(suppl 6):1

(收稿:1996-02-01;修回:1996-09-10)

(编辑　冷怀明)

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

Effects of burn patient sera on cultured endothelial cells of human umbilical vein*

Luo Xiangdong, Yang Zongcheng, Li Ao (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The systemic pathophysiological changes in the early stage postburn are closely related to the activation and damages of vascular endothelial cells (VECs). In order to study the effects of humoral substances on VECs, the sera of 2 groups of burn patients (with burn area of 30% ~ 50% and 70% ~ 90% TBSA respectively) were added to the cultured VECs of human umbilical vein. The content of lactic dehydrogenase (LDH), prostacyclin (PGI_2) and nitric oxide (NO) in the culture fluid was determined. In addition, the content of F-actin in VECs was measured and that of endothelin-1 (ET-1) was semiquantitatively measured with spot hybridization. It was found that ET-1 mRNA was increased 3-fold in the 1st h after the addition of burn sera and this increase was maintained to the 12th h. In the 12th h, the damages of VECs were quite prominent showing elevation of LDH ($P < 0.01$), increased production of PGI_2 ($P < 0.05$) and significant decrease of F-actin ($P < 0.01$). The VECs became round in shape and shrunken. These findings indicate that burn sera stimulated ET-1 expression of VECs first, followed by increased synthesis of NO to maintain vascular tone and then damages of VECs occurred in the 12th h, which suggests that the effects of burn sera on VECs proceed through a course from activation to damage.

Key words vascular endothelial cell; burn serum; nitric oxide

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39290700-03

科研简报

重庆市庚型肝炎病毒(HGV)感染的初步观察

Preliminary observation on hepatitis G virus (HGV) infection in Chongqing

张绪清 陈国致 顾长海 (第三军医大学附属西南医院传染病中心)重庆,630038

采用酶联免疫法(ELISA)检测 58例病毒性肝炎患者血清中甲、乙、丙、丁、戊、庚 6种肝炎病毒的感染标志,并用聚合酶链反应(PCR)技术检测其血清中的 HBV DNA和 HCV RNA 58例肝炎患者血清抗-HGV阳性率为 12.1%,其中急性非甲-戊型肝炎患者血清抗-HGV阳性率为 25%,慢性重型肝炎患者血清抗-HGV阳性率为 26.3%、明显高于慢性肝炎(2.9%, $P < 0.05$);在 7例抗-HGV阳性者中,有 4例(57.1%)是与 HBV重叠感染;非甲-戊型肝炎患者血清抗-HGV阳性率为 30.0%, HBsAg阳性肝炎患者血清抗-HGV阳性率为 8.3%; HBsAg阳性的慢性重型肝炎和慢性肝炎患者血清抗-HGV阳性率分别为 17.6%和 3.1%;抗-HGV阳性重型肝炎患者的病死率为 100.0% (5/5),单纯 HBV感染者的病死率仅为 36.4% (4/11)。结果表明:重庆市存在 HGV感染; HGV感染是非甲-戊型肝炎患者的重要病因,并在重型肝炎中起重要作用; HGV可与 HBV重叠感染,重叠感染者可能更易发生重型肝炎,重叠感染所致重型肝炎患者的预后可能更差。

关键词 病毒性肝炎;庚型肝炎病毒

中图法分类号 R512.6

(收稿: 1996-10-21;修回: 1996-11-01)

(编辑 王 红、沈锡庚)

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