DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.010

大鼠吸入性损伤血清对肺微血管内皮细胞的损伤作用*

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

提 要 肺微血管内皮细胞(PMVEC)体外培养法的建立对于研究吸入性损伤具有重要意义。以大鼠肺为材料,采用弹力蛋白酶消化法以获取 PMVEC,培养 5 d~6 d后即可融合成片,经Ⅷ因子相关抗原染色鉴定,纯度可达 90%以上。以此为模型,加入大鼠烟雾吸入伤血清,可使 PMVEC分泌功能明显变化,血清 NO及 LDH增高,同时细胞内 cAMP含量降低,$[Ca^{2+}]_i$水平明显升高,即信息传递系统受损。提示 PMVEC是吸入性损伤中肺损伤的重要靶细胞。

关键词 内皮;灼伤,吸入性;细胞培养;血清
中图法分类号 R644

吸入性损伤是烧伤的主要死亡原因之一。肺毛细血管通透性增加所致之通透性肺水肿是吸入性肺损伤的重要特征,也是导致呼吸功能衰竭的主要病理基础。决定肺微血管通透性的核心因素是肺微血管内皮细胞(Pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC)即是损伤的主要靶细胞。因此 PMVEC体外培养法的建立对于研究吸入性损伤后肺功能损害具有十分重要的意义。

PMVEC体外细胞培养国内尚未见报道。我室酶消化法得以建立,可收获纯度较高,数量较多的 PMVEC,加入同种动物烟雾吸入伤血清刺激正常体外培养的 PMVEC后,分别测定致伤前后细胞释放乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)以及胞内信息传递系统环一磷酸腺苷(CAMP)及$[Ca^{2+}]_i$的含量变化,为研究烟雾吸入伤对 PMVEC的损伤情况,提供了一个新的手段。

1 材料与方法

1.1 PMVEC体外细胞培养

Wistar大鼠(200 g~250 g) 1只,用 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,同时用肝素钠 5000 IU抗凝。无菌条件下行气管插管。剖开腹腔自腹主动脉放血活杀,开胸,钳闭上、下腔静脉。左心室开口,右心室进针,用等渗盐水(含肝素钠 125 IU/ml) 50 ml灌洗出肺循环淤血。游离全肺,用等渗盐水灌洗肺气道,每次 10 ml,共 5次。弹力蛋白酶(0.015%, 37℃,常州生化试剂厂) 10 ml注入肺气道内,置 37℃等渗盐水中孵育 20 min,此间每 5 min再加注 3 ml酶液。弃消化液,取肺叶表面及周边组织(远离肺门)剪碎,加入 DNAI酶液(0.006%,华美生化试剂公司) 10 ml,置 37℃水浴,150次/min恒温振荡 10 min。此后加入小牛血清终止反应(终浓度为 20%)。经单层纱布及 50目、200目的不锈钢滤网过滤。收集滤液,加入 DMEM培养液(美国 GIBCO公司,含 20%小牛血清), 500× g离心 10 min离心洗涤。弃上清,收集细胞接种于 50 ml塑料培养瓶内,见图 1, 37℃, 5% CO_2条件下孵育培养。4 h后,将未贴壁的细胞移至另一培养瓶中继续培养,每 2天换液 1次。待细胞融合成片后,用兔抗鼠Ⅷ因子抗血清(Sigma)、羊抗兔荧光标记抗体(军科院微生物流行病研究所)染色鉴定,阳性率可达 90%以上。实验选用融合后 2 d的细胞。

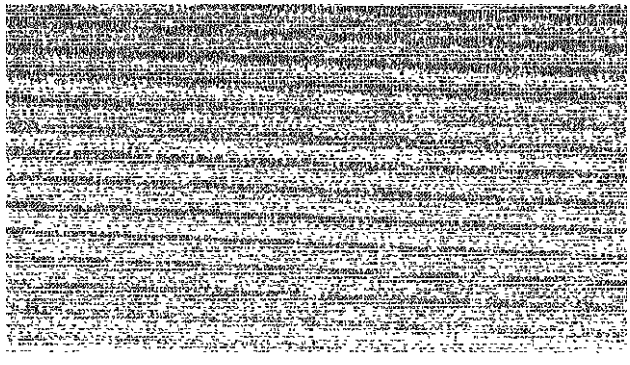


图 1 消化后准备培养的肺组织单细胞悬液中,可见多种细胞混合,均呈圆形 (光镜× 100)

Fig 1 The mixed cells of pulmonary tissue before purification (LM× 100)

* 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

1.2 烟雾吸入伤大鼠血清的制备

烟雾吸入致伤 Wistar大鼠(采用本所建立的烟雾吸入伤致伤法),伤后6 h乙醚麻醉,无菌条件下自腹主动脉采血,分离血清,4℃保存。正常大鼠正常对照血清制备同上法。这两组血清于 PMVEC收获前 12 h分别加入其培养液中(终浓度为10%)。实验前,收集培养液及 PMVEC备用。

1.3 PMVEC培养液 NO测定

取培养液 0.5 ml,加已活化的活性碳(0.25%) 0.1 ml,混匀后 2000× g离心 10 min,取全部上清备用。采用本所建立的NO测定法检测[1]。

1.4 PMVEC培养液乳酸脱氢酶(LDH)的测定

采用常规的生化比色法,以2,4-二硝基苯肼为显色剂。

1.5 PMVEC cAMP的测定

PMVEC计数后,用沸水变性法提取 cAMP,-20℃保存。采用放射免疫分析法进行测定[2]。

1.6 PMVEC$[Ca^{2+}]_i$测定

调整 PMVEC浓度为 1× 10^6 cell/ml进行测定[3]。

2 结果

2.1 PMVEC体外培养

细胞接种2 d后,置于倒置显微镜下观察,可见大量散在的细胞集落,每个集落由7~10个细胞组成,细胞呈卵石样,边界清晰;3 d~4 d后细胞明显增殖,镜下观察可见细胞集落扩大且胞体趋于多边形,扁平状,见图2;5 d~6 d时可见细胞完全融合。此时细胞单层生长,大、薄而扁平,呈多边形,胞核圆形或椭圆形,见图3 部分细胞可见封闭性窗孔,见图4 7 d以后细胞老化,呈树皮样外观,胞体变大。细胞经Ⅷ因子相关抗原染色鉴定呈阳性,纯度可达90%以上。

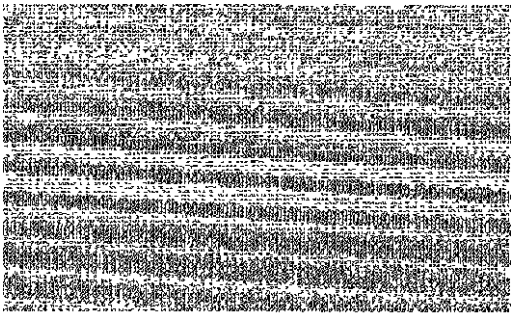


图2 经过贴壁筛选后第2天的 PMVEC
(Ⅷ因子荧光染色× 200)

Fig 2 The PMVEC cells on the 2nd day after purification
(Factor Ⅷ fluorescent staining× 200)

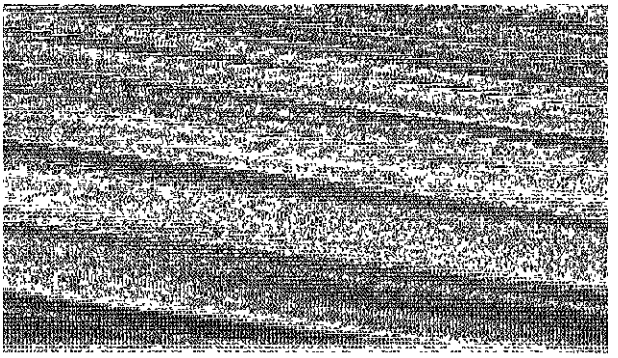


图3 培养第7天的 PMVEC,细胞呈多边形,连接紧密,边界清晰,可见细胞中尖区颗粒样突起,其中的黑色颗粒为Ⅷ,PAP染色后的颗粒
(Ⅷ因子荧光染色× 400)

Fig 3 The normal cultured PMVEC on 7th day, the black particles on the cellular surface are stained by anti-Ⅷ munocytochemical method
(Factor Ⅷ fluorescent staining× 400)

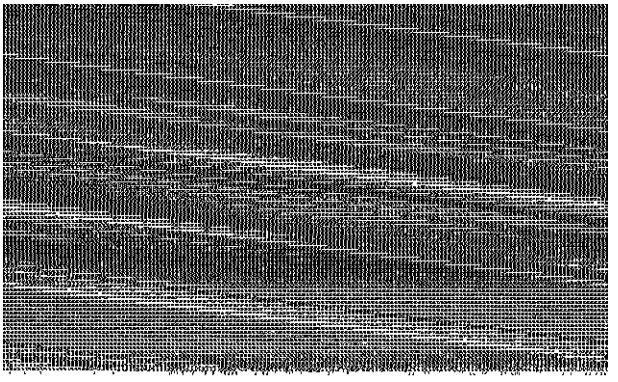


图4 部分细胞可见表面形成的嵴样突起及凹陷,类似活体肺毛细血管的闭合性窗孔
(Ⅷ因子荧光染色× 400)

Fig 4 The projective crests distribute on some cell surface (Factor Ⅷ fluorescent staining× 400)

2.2 烟雾吸入伤血清对 PMVEC释放 LDH及 NO的影响

表1 烟雾吸入伤血清刺激的 PMVEC释放 LDH及 NO的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The changes of the activity of LDH and the content of NO in PMVEC medium caused by inhalation sera($\bar{x}\pm s$)

	LDH(μg/ml)	NO(μg/ml)
Control sera	34.2± 5.8	1.18± 0.31
Inhalation sera	226.7± 54.0*	3.67± 0.64*

*: $P<0.05$ *vs* control sera

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

从表 1可见,烟雾吸入伤血清与 PMVEC一起孵育 12 h,可使其释放 LDH及 NO明显增加。

2.3 烟雾吸入伤血清对 PMVEC cAMP含量及 $[Ca^{2+}]i$的影响

表 2 烟雾致伤血清对 PMVEC刺激后其内 cAMP、$[Ca^{2+}]i$的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The changes of cAMP and $[Ca^{2+}]i$ in PMVEC medium caused by inhalation sera ($\bar{x}\pm s$)

	cAMP c_B/pmol·$(10^7 cell)^{-1}$	$[Ca^{2+}]i$ c_B/nmol·L^{-1}
Control sera	10.20± 1.36	89.9± 10.2
Inhalation sera	6.58± 1.1**	226.3± 46.4**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control sera

由表 2可见,烟雾吸入伤血清与 PMVEC一起孵育 12 h可使 PMVEC内 cAMP含量明显降低,$[Ca^{2+}]i$却显著升高。

3 讨论

自 70年代 Jaffe, Gimbrone等在体外成功地培养内皮细胞以来,某些大血管内皮细胞的体外培养已陆续建立。但血管内皮细胞分布广泛,具有异质性,大血管内皮细胞并不适用于人们对微循环的研究。于是体外微循环内皮细胞培养法的建立十分迫切。

PMVEC体外分离培养法国外已有报道。Nancy[4]等人建立了牛 PMVEC培养法。大致为:取新鲜离体牛肺肺叶周边组织,剪碎,反复冲洗后用 0.5%胶原酶室温消化 1 h,反复离心清洗,经尼龙网过滤而得。我们的方法与之相比有以下改进:① 肺组织取材前先行在体灌洗,可将肺循环内血细胞大量洗去,避免直接取材后出现的肺循环血细胞淤积,提高分离纯度。② 改用比胶原酶价格低廉的弹力蛋白酶和 DNA酶。③ 弹力蛋白酶行从气道灌入的封闭式消化,直接作用于肺泡壁与微血管;DNAI酶可降解破碎细胞所释放的 DNA链,减少缠绕形式的细胞团。由此可获大量单细胞形成的 PMVEC,较胶原酶由表及里地消化肺组织更为彻底,且缩短消化时间。

我们在实验中用 0.25% Trypsin替换弹力蛋白酶作对照,所获 PMVEC在数量、纯度上均不及前者。此外我室曾采用第二军医大学报道的组织贴块法培养 PMVEC,在数量、纯度及缩短培养周期等方面,效果不及酶消化法。

我室建立的酶消化法在实验中尽管充分灌洗肺组织,仍有一定血细胞混和在细胞悬液内。红细胞可随换液而逐次除去;白细胞则可先于 PMVEC贴壁。实验表明,所获细胞悬液接种后 4 h以内,混合于其中的白细胞绝大部分附壁,故以此为时相点,换瓶培养,将细胞悬液分为前后两部分,4 h前贴壁的细胞弃去;4 h后另瓶培养的细胞以 PMVEC为主,可通过多次换液除去白细胞(换液时轻微吹打瓶壁使残留的少数白细胞脱落)。由此获 PMVEC纯度可达 90%以上。

烟雾吸入伤血清对 PMVEC释放 LDH、NO和其内 cAMP及 $[Ca^{2+}]i$的影响如下。

LDH广泛存在于人体各组织细胞内,当细胞受损时可释放出来,损伤越重,所释放量越多,实验中我们观察了此项指标,LDH增高显著说明了烟雾吸入伤血清作用 12 h可致 PMVEC严重损伤。内皮细胞具有分泌内皮衍生舒缩因子(EDRF)的功能。近年来多数学者认为 EDRF主要是 NO[5]。生理情况下,内皮细胞产生基础量的 EDRF-NO来维持血管平滑肌对血管活性物质的正常反应性[6]。当 NO产量增加或减少都可引起血管张力异常从而引起各种损伤。实验中烟雾吸入伤血清刺激下 PMVEC NO合成量显著增高提示 PMVEC分泌功能异常,且对血管弹力的维持起破坏作用,从而介导了脏器损伤。

目前发现,受体介导的细胞内信息传递系统主要有以 cAMP为第二信使的信息传递系统;以 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)、1,2-二酰基甘油(DG)为第二信使的肌醇脂质信息传递系统;以 Ca-CaM为核心的信息传递系统(CPK系统)及以酪氨酸蛋白激酶为核心的信息传递系统(TPK系统)。前三大系统主要传递激素、递质及炎症介质、细胞因子等刺激信号,与疾病状态下微血管通透性及组织损伤有关。本实验选择了 cAMP和 $[Ca^{2+}]i$作为检测指标观察烟雾吸入伤后 PMVEC胞内信使系统的破坏情况正是基于此理。伤后 12 h PMVEC内 cAMP显著降低而 $[Ca^{2+}]i$显著升高提示信息传递系统的变化是烟雾吸入伤对 PMVEC产生毒性作用的重要介导机理之一。

上述研究表明,烟雾吸入伤血清可就其体液因素直接引起 PMVEC分泌功能异常,并且破坏胞内信息传递系统的正常功能。这一系列反常反应都将导致伤后肺功能从多方面发生严重损害,这为研究烟雾吸入伤提供了一个角度,而这一切又是基于体外 PMVEC培养法建立之上的。

参考文献

1 罗向东,杨宗城,黎　鳌.一种简捷、敏感的 EDRF-NO间接测定法.中华创伤杂志,1994;10(3):185

2 牛惠生,李怀芬,叶文忠.$^{60}Co_r$射线对肿瘤细胞内 cAMP含

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

量和质膜腺苷酸环化酶活力的影响.中华放射医学与防护杂志,1992; 12(4): 311
3 Kwan C Y, Takemara H, Putnen Jr' Jw.用荧光剂 Fura-2连续测定大鼠泪腺细胞浆内 Ca^{2+} 浓度的变化.中国药理学通报,1989; 5(5): 384
4 Nancy C W, David S, Bernadette D. Prostacyclin and prostaglandin E_2 secretions by bovine pulmonary microvessel endothelial cells are altered by changes in culture conditions. J Cell Physiol, 1988; 135(2): 224
5 储国祥,郭兆贵.一氧化氮及其医学前景.国外医学: 分子生物学分册,1992; 14(6): 281
7 Persson M G, Gustafsson L E, Wiklund N P. Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation *in vivo*. Br J Pharmacol, 1990; 100(3): 463

(收稿: 1996-01-25;修回: 1996-09-12)
(编辑 刘 鹏)

The injurious effects of inhalation injury serum on pulmonary microvascular endothelial cells in rats*

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

Abstract The establishment of the method to culture pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) is important for the study of inhalation injury. In this study, PMVECs were isolated from the murine lungs with elastinase digestion and cultured for 5 d~ 6 d to result in fusion of the cells. After the cultured PMVECs were stained with immunohistochemical technique, it was found that 90 out 100 cells were PMVECs. Then the serum of the rats with smoke inhalation injury was added to the cultured PMVECs. It was found that the levels of NO and LDH were increased and the serum could induce obvious changes of secretory function of PMVECs. Meanwhile, there was a significant decrease of intracellular cAMP and an increase of calcium ions, which indicates the impairment of the messenge-mediation system. These findings suggest that PMVECs are the important target of inhalation injury.

Key words pulmonary microvascular endothelial cell; inhalation injury; cell culture; rat

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

大剂量复合微量营养素制剂对快速提高人体微光近视力的作用

The effect of oral administration of large dose micronutrient complex on rapid increase of visual acuity reduced light

黄国荣 杨家驹 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室)重庆,630038

为了改善和提高低照度作业部队的暗适应功能,我们已试验了 3种供平时每日补充的营养制剂(生理剂量),其中以复合维生素加锌的效果最好[1],为此,本实验采用该配方组合,但加大剂量,查明其对快速提高人体微光近视力的作用。

1 实验方法

选择视力正常,身体健康,年龄 18岁~ 20岁,男性战士 10名。进行 3 d膳食调查,以了解受试者营养情况。以微光近视力(夜间视力)测定为检查人体暗适应功能指标。实验前测定一次作为基础值,然后一次口服大剂量复合微量营养素制剂(V_A 5万 IU、V_{B1} 9 mg、V_{B2} 10 mg、V_{PP} 30 mg、V_C 300 mg、锌 30 mg)。于服药后 2、4、8、11、21、45、69和 93 h分别测定上述指标,以观察其效果。膳食调查用称量法,查食物成份表[2]计算主要营养素摄取量。微光近视力用 YAK-1型暗适应客观检查仪测定,该仪器由空军第四研究所研制。测定时减光旋扭转至 1,记录看清视标中 E表(第 4行, 0.4)缺口方向的时间(s)。

2 结果

2.1 膳食调查结果见表 1

表 1 每人每日膳食营养素摄取量

热能(KCal)	蛋白质(g)	维生素 A(IU)	维生素 B_1(mg)	维生素 B_2(mg)	维生素 C(mg)	锌(mg)
2960	80.6	1600	1.4	1.02	105	6.54

(下转 435页)

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