DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.06.003

肿瘤坏死因子对培养内皮细胞影响的实验研究*

杨映波 王正国** 朱佩芳** (第三军医大学大坪医院创伤急救科) 630042

提 要 本文以原代培养的脐静脉内皮细胞(HUVEC)为材料,研究了肿瘤坏死因子(TNF)对其产生组织型纤溶酶原激活物抑制物(PAI)活性的影响,并观察了细胞的形态变化。结果表明,100、250 和 500U/ml 的 TNF 可以刺激 HUVEC 产生较高的 PAI 活性,但 2500U/ml TNF 则能明显抑制 PAI 活性,并可造成 HUVEC 的损伤和形成与循环内皮细胞(CEC)极为相似的细胞形态。提示 TNF 可以刺激 HUVEC 产生 PAI 活性,并且,高浓度 TNF 可造成 HUVEC 功能和结构的损害。

关键词 内皮;细胞,培养的;肿瘤坏死因子;血纤维蛋白溶酶原激活物抑制物

分类号 R322.12;R730.3

肿瘤坏死因子(TNF)是一种主要由单核-巨噬细胞产生的细胞因子,具有十分广泛的生物学作用[1]。血管内皮细胞(VEC)表面存在 TNF 受体,为其作用的主要靶细胞之一[2]。临床调查表明,创伤后败血症患者血中可检出循环 TNF,而且 TNF 阳性组的死亡率是 TNF 阴性组的2倍[3],提示 TNF 可能在创伤感染过程中起重要作用。因而,研究 TNF 对 VEC 的影响十分必要。据文献报道,TNF 在诱发 VEC 的促凝活性[2]和抑制其纤溶活性[4]方面的生物学效应比较突出;但对 TNF 造成的细胞形态学改变尚少有报道。因此,研究 TNF 对培养内皮细胞组织型纤溶酶原激活剂抑制物(PAI)活性及细胞形态的影响对探讨 TNF 的作用机理有着重要的意义。本文采用原代培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)研究了 TNF 对其 PAI 活性及形态的影响。

1 材料与方法

1.1 HUVEC 的原代培养

按 Jaffe[5]的方法施行,主要步骤如下:

1.1.1 收集健康胎儿脐带30~50cm,排尽残血,剪去钳夹部分,投入灭菌保存液(0.14mol/L NaCl、4mmol/L KCl、15mmol/L Hepes、11mmol/L 葡萄糖、pH 7.3)中,4℃保存,24 h 内使用。

1.1.2 反复灌洗脐静脉,排尽淤血。注入0.25%胰蛋白酶液5ml。夹闭脐带两端。将整根脐带置入无菌容器内,37.0℃温育10min。

1.1.3 收集消化液,然后以5ml 完全培养液[RPMI-1640培养基(GIBCO,美国),临用前加青霉素100U/ml、链霉素100U/ml、L-谷氨酰胺2mmol/L 和20%灭活小牛血清]灌洗脐静脉,并将其收集到同一刻度离心管中,室温下离心10min(1 000rpm)。

1.1.4 制备细胞悬液后,吸该液少许,用0.4%台盼蓝染色并计数活细胞,然后加入适量培养液,将细胞浓度调至4~5×10⁵/ml。

1.1.5 把细胞悬液均匀分装于35mm 细胞培养皿(面积约10cm²)内。使细胞培养密度为4~5×10⁴/cm²培养面积。部分皿内盛有约0.3cm×0.5cm 盖玻片一块。

1.1.6 将培养皿置入37℃、5% CO_2细胞培养箱(1875TC,SHEL-LAB,美国)中,每天定时观察培养液的颜色和透明度。倒置显微镜(XSJ-D,重庆)下观察细胞形态改变。第1个24 h 后更换原培养液的1/2,此后每隔48 h 换液1次。一般72 h 后汇合,即可开始实验。

1.2 制备待测培养液

待 HUVEC 生长呈典型的单层铺石样镶嵌融汇状后,吸除培养液,用 D-Hanks 液轻轻洗2遍,分别加入2.0ml 新鲜培养液或含100U/ml、250U/ml、500U/ml和2500U/ml人重组肿瘤坏死因子(rhTNF,上海复旦大学遗传所提供。临用前,以美国 Sigma 公司的 rhTNF 标准品进行测定,其比活为1.54×10⁵U/ml)的新鲜培养液(均含10%小牛血清),继续孵育8 h 后收集培养液。低速离心(2 000rpm,5min),去除残存的细胞碎屑,贮存于-22℃备用。

* 国家自然科学基金资助课题

** 野战外科研究所四室

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

1.3 测定培养液中 PAI 活性

按上海医科大学分子遗传室的说明进行。各观测点重复3次。主要步骤为：(1)准备待测样品和配制系列浓度的 PAI 标准溶液后，分别加入40孔酶标板中。100μl/孔并以100μl TB 缓冲液作空白对照，均作双复孔；(2)将纤溶酶原和发色底物分别溶于2.0ml TB 缓冲液中，混合两者，另取0.1μl TB 缓冲液溶解加速剂，并用纤溶酶原-发色底物液混合。混匀后，立即加100μl 至各孔中。然后置入湿盒，在37℃温浴中保温3.5 h(湿盒已预温30min)。此后用20μl 50%冰醋酸终止反应，进行测定；(3)测定在 GXM-200型酶标仪(四川分析仪器厂)上完成。405nm 比色读 OD 值，以空白对照孔调零。然后，以各点 A405的均值对 PAI 标准活性作标准曲线。按以下公式求得被测样品的 PAI 活性：待测样品 PAI 活性＝标准曲线上查得数值×4(AU/ml)

1.4 形态学观察

将培养于盖破片上的各观测点 HUVEC 经冷丙酮固定后，以 Giemsa 染色，观察并摄像。

2 结果

2.1 PAI 活性的变化

本实验观察了100、250、500和2500U/ml TNF 对 HUVEC 产生 PAI 活性的影响(见附表)。

附表 TNF 对 HUVEC 产生 PAI 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab Effects of TNF on PAI activity derived from HUVEC

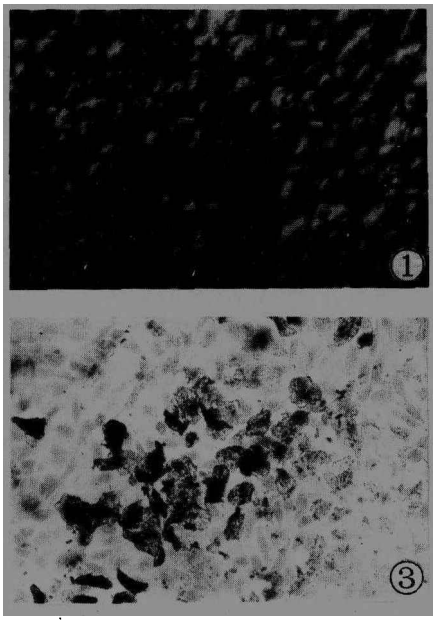
TNF concentration (U/ml)	0	100	250	500	2 500
PAI activity (AU/ml)	1.61±0.74	6.34±1.04△△	10.72±2.38△△	13.49±2.99△△	7.95±2.82△※

Compared with control, △: $P<0.05$; △△: $P<0.01$; compared with 500U/ml, ※: $P<0.05$

由附表中可见，当 TNF 浓度在500U/ml 以下时，PAI 活性随 TNF 浓度增加而呈升高趋势，但继续增加为2 500U/ml，PAI 活性明显降低。

2.2 形态学变化

EC 接种培养72 h 后，细胞大部分汇合，呈典型的单层铺石样镶嵌排列(图1)。100U/ml，250U/ml，500U/ml TNF 作用于原代培养的 EC 8 h 以后，细胞呈长梭形，胞核清晰，胞膜完整，胞质不肿大，细胞大小分布比较均匀。图2显示500U/ml TNF 作用8 h 后的 EC 形态。当2 500U/ml TNF 作用相同时间后，可见成片的细胞肿大，形态僵硬，有的折叠、扭曲，绝大多数无核(图3)。形成与 CEC 极为相似的细胞形态[6]。



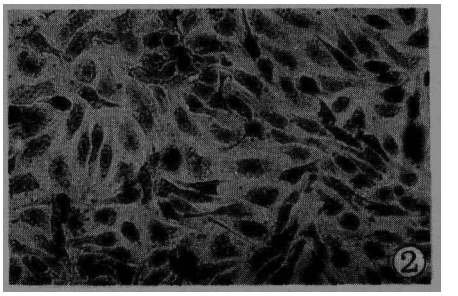


图 1 培养的 HUVEC(微分干涉相衬图像、IMT-2 倒置显微镜 OLYMPUS) ×250

Fig 1 Cultured HUVEC (Differential interference contrast image, IMT-2) ×250

图 2 TNF 对 HUVEC 的影响(500u/ml，8 h) ×250

Fig 2 Effects of TNF on HUVEC (500u/ml, 8 h) ×250

图 3 TNF 对 HUVEC 的影响 (2 500u/ml，8 h) ×250

Fig3 Effects of TNF on HUVEC (2 500u/ml, 8 h) ×250

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

3 讨论

PAI 至少可以分成三类。即 EC 型 PAI (PAI-1)、胎盘型 PAI(PAI-2)和蛋白酶 Nexin-1[7]。但在生理情况下，血浆 PAI 水平主要与 EC 有关[8]。目前，有关测定 PAI 活性的方法各异，基础值也不尽相同[9,10]。最近，我国建立了 PAI 活性的测定方法[11]。其基本原理为 PAI 能快速与 t-PA 结合，形成1:1分子比的无活性复活物。测定 PAI 活性时，先于样本(血浆或内皮细胞培养液)中加入过量已知的标准 t-PA 活性。这样，就可以推算血浆中 PAI 的活性。其单位为 AU(arbitrary unit)。1.0AU 的 PAI 定义为在25℃，20min 能抑制 1.0IU 的 t-PA。我国陈灏珠等[12]采用这一方法测得心肌梗塞病人发作后2～4周的 PAI 活性为9.5±8.9AU/ml。

近来，随着对多种病理状态时 PAI 活性变化的调查，发现 PAI 在创伤过程中可能具有重要作用[10]。Kluft 等[13]观察到手术的严重创伤后，血浆 PAI 活性如同急性反应蛋白一样迅速增加。由于血浆 PAI 的活性主要来源于 EC，研究促使 EC 分泌 PAI 的机制对阐明创伤过程中 PAI 活性的变化很有必要。

Hanss 等[9]指出，人的 EC 培养对评价血管内皮在纤溶调节中的作用和调查药物制剂对 t-PA 和 PAI 产生的作用来说，是一个有用的模型。最近，Van Hinsbergh 等[4]分100、250、500和2 500U/ml 等4个浓度研究了 TNF 在调节 VEC 产生 PAI 活性中作用，并证实 TNF 在体外可促使培养 EC 产生 PAI 活性，在体内可促使大鼠血浆中 PAI 活性增加，但未对 TNF 所致的 EC 形态学变化进行观察。本文采用与 Van Hisbergh 相同的 TNF 浓度，研究了 TNF 对 EC 的 PAI 活性及形态学的影响。结果表明，在一定浓度范围内，TNF 可提高 EC 的 PAI 活性，而且 PAI 随 TNF 浓度的增加而增加，显示出明显的量效关系。这种现象与通常所见的受体介导的生物效应类似，而且，已经证实 EC 表面存在着 TNF 受体。因而，我们推测，TNF 促使 EC 产生 PAI 活性的作用可能是通过 TNF 与 EC 表面的 TNF 受体作用而启动的。

如附表中所示，在本实验条件下，100～500U/ml TNF 使 EC 产生了较高的 PAI 活性，但当 TNF 浓度增至2 500U/ml 时，EC 产生的 PAI 活性明显降低。提示高浓度 TNF 使 EC 在功能上遭到了损害。对培养 EC 的形态学观察表明，低于500U/ml 时，TNF 未能导致明显的EC脱落和形态学改变。但在 2 500U/ml TNF 作用下，则出现了明显的细胞损伤，表现为培养的 EC 大片脱落。并形成与 CEC 极为相似的细胞形态。我们先前的工作表明，正常人外周血中 CEC 来自 VEC 的老化和脱落[6]。本文结果提示，高浓度 TNF 造成的 EC 结构的损害可能是病理条件下 CEC 增多的原因之一。

通过本实验研究，我们认为，在创伤感染等过程中，体内单核-巨噬细胞分泌 TNF 增多。TNF 与 EC 表面的相应受体结合，启动了特异的蛋白质合成机制，使 PAI 活性生成增多；增多的 PAI 可与 t-PA 以1:1的分子比结合而使其失活。从而导致纤溶活性低下，有利于血栓形成，当 TNF 的生成量达到一定程度时，可造成 EC 结构受损，蛋白质合成机能遭到破坏，因而出现 PAI 活性陡降。严重者可致大片 EC 脱落，细胞形态改变，成为病理条件下 CEC 增多的原因之一。因而，检测创伤感染患者血浆中 PAI 活性对监测病情，预防并发症可能具有重要意义。

参考文献

1. Goldblum SE, Sun WL. Tumor necrosis factor-alpha augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. Am J Physiol, 1990; 258 (2 ptl): L57

2. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothe-

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

lia cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med,1986;163:740
3. Debets JM, Kampmeijer R, Van den Lindn MP. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill spetic patients. Crit Care Med,1989;17:489
4. Van Hinsbergh VWM, Kooistra T, Van den Berg EA, et al. Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vivo and in rats in vivo. Blood,1988;72:1467
5. Jaffe EA. Culture of human endothelial cells. Transplant Proc,1980;12(suppl 1):49
6. 杨映波 王正国。循环内皮细胞来源的实验研究。第三军医大学学报,1992;14(3):251
7. Collen D. Report of the meeting of the subcommitee on fibrinolysis, San Diego, July 13, Thromb Haemost,1985;54:893
8. Sprengers ED, Akkerman JW, Jansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two diffrent pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood. Thromb Haemost,1986;55:325
9. Hanss M, Collen D. Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by cultured human endothelial cells: modulation by thrombin, endotoxin and histamine. J Lab Clin Med,1987;109:97
10. Emeis JJ, Kooistra T. Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce and inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. J Exp Med,1986;163:1260
11. 王结义 贾海燕 宋后燕。人血浆组织型纤溶酶原激活剂及其抑制物活性的测定。中华医学检验杂志,1989;12:163
12. Chen HZ, Jia HY, Song HY, et al. Changes in plasma levels of tissue plasminogen activator and its inhibitor in aged myocardial infarction patients. Chinese Medical Journal, 1990; 103: 541
13. Kluft C, Verheijen JH, Jie AFH, et al. The postoperative fibrinolytic shutdown: a rapidly reverting acute phase pattern for the fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator after trauma. Scand J Clin Lab Invest,1985;45:605

(收稿:1993-03-08;修回:1993-06-10)

Experimental study on the effects of tumor necosis factor on the cultured human umbilical vein endothelial cells

Yang Yingbo, Wang Zhengguo, Zhu Peifang (Department of Traumatology, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The effects of tumor necrosis factor (TNF) on the activity of plasmogen acitvator inhibitor (PAI) and the morphology of the cells were observed in the original passage of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). It was found that the TNF effect on the PAI was determined by the dosage of TNF, that is, 500U/ml of TNF could significantly activate PAI activity while 2500U/ml markedly inhibit it. Morphdogical observation canfirmed that 2500U/ml of TNF could injure HUVEC to form a kind of cells whose morphology was quite similar to that of circulating endothelial cells originating from peripheral blood.

These findings suggest that TNF can stimulate HUVEC to increase the PAI acivity but too large a dosage of TNF could injure the metabolic function and structure of HUVEC.

Key words endothelium; cells, cultured; tumor necrosis factor; plasminogen activators inhibitor

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