DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.001

论著

肿瘤坏死因子对血管内皮细胞合成组织因子的影响

蒋建新 汪江淮 陈惠孙 刁有芳 田昆仑 （第三军医大学野战外科研究所二室）630042

提 要 胎儿脐静脉内皮细胞(EC)培养。应用光镜、电镜进行鉴定。探讨人重组 TNF 对 1～3 代 EC 合成组织因子的调节作用。TNF 与 EC 孵育 4h，EC 内组织因子的活性明显增加($P<0.05$)，至 12h，升至峰值，随后逐渐减少。EC 内组织因子的合成还随 TNF 浓度的增加而增多。表明 TNF 能促进 EC 内组织因子的合成，并有浓度和时间的依赖性。提示 TNF 在感染性休克时播散性血管内凝血的发病中可能起重要作用。

关键词 内皮；细胞；肿瘤坏死因子；凝血酶致活酶

正常的血管内皮细胞(EC)是维持血管内血液正常流动的重要基础。一般认为，内源性凝血和外源性凝血的发生均与 EC 的损伤息息相关。播散性血管内凝血(DIC)是感染性休克过程中常见的病理现象，但其发病机制尚有争论。

近年来实验证实，肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor，TNF)是感染性休克发生的原发体内介质[1,2]。迄今国内尚无这方面文献报道。本文采用体外培养的胎儿脐静脉 EC，探讨 TNF 对 EC 合成组织因子(tissue factor)的调节作用，旨在进一步阐明感染性休克时 DIC 的发病机制以及 TNF 在感染性休克发病过程中的重要地位。

1 材料与方法

1.1 EC 的培养及鉴定

按照董玉兰等人[3]方法改良。无菌取胎儿脐带。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗净静脉内血液。0.15%胰酶消化 EC，37℃、12min，共消化 2 次。将细胞-酶液引入无菌锥形离心管内，加入少量小牛血清。离心。用 RPMI-1640 培养液洗 1 次。加入 RPMI-1640 培养液(含 20%小牛血清，L-谷氨酸 2mmol/L，内皮生长因子 200μg/ml，肝素 100μg/ml，青霉素 100u/ml，链霉素 100μg/ml)，种植于用 0.3%明胶覆膜的 35mm 塑料培养皿中，按种活细胞数 2～$3\times10^4/cm^2$，5%CO_2，37℃培养。每周换液 2 次。待 EC 形成单层后，用 0.15%胰酶消化进行传代培养，培养液同上。采用倒置显微镜和透射电镜观察和鉴定 EC。

1.2 EC 内组织因子活性的测定

按 Nawroth[4]等人方法改良，选用 1～3 代 EC。每个培养皿内平均种植活细胞数为 1×10^6/皿。待细胞融合单层后，用 A 液（10mmol/L HEPES，137mmol/L NaCl，4mmol/L KCl，11mmol/L 葡萄糖）洗细胞层。用 B 液（5mmol/L EDTA，5mmol/L 盐酸利多卡因，0.1mol/L 巴比妥）消化细胞，37℃，5min。轻轻吹打成细胞悬液后，移入硅化玻璃试管内。加入 0.1ml 0.3mol/L $CaCl_2$，1 000rpm 离心 6min，用 B 液选 2 次，同上离心。最后用 B 液制成 0.1ml 细胞悬液。加入 0.1ml 新鲜正常兔血浆和 0.1ml 30mmol/L $CaCl_2$，在 37℃水浴锅内不断摇动，从加入 $CaCl_2$ 起到出现凝固止，记录其时间。根据标准曲线计算组织因子含量，单位以 ng/ml/10^6 cell 表示。

用生理盐水将组织因子标准品（兔脑提取物）分别配制成各种浓度，取 0.1ml，加入 0.1ml 兔血浆和 0.1ml $CaCl_2$，记录凝固时间，作直线回归，绘制标准曲线。

按 Student's t 检验分析组间差异显著性。结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。

2 结果

2.1 EC 生长及形态特征

EC 原代培养时，细胞种植后 4～6h，即附壁生长，至 36～48h，融合为单层。EC 传代培养时，细胞种植后

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

2～3h 即附壁生长。但传至 7～8 代，细胞数渐少，至 10 余代，细胞不融合为单层，脱落。光镜下 EC 呈铺石状镶嵌排列，互不重叠。细胞呈多角形，边界清楚，胞浆丰富，核圆形或椭圆形。电镜下 EC 呈多角形，表面有绒毛，胞浆内有丰富的线粒体、内浆网、核糖体以及 Weibel-Palade 小体等。

2.2 组织因子的标准曲线

将各组织因子标准浓度的凝固时间进行直线回归，其回归方程：Y＝236-80X，回归系数与 0 有显著差异性（$P < 0.001$）。

2.3 TNF 对 EC 合成组织因子的影响

如图 1、2 所示，各 EC 对照组组织因子的活性均很低。但是，培养皿内分别加入 TNF10^2u/ml、10^3u/ml、10^4u/ml 培养液，并孵育 12h 后，EC 内组织因子活性则迅速升高，较对照值分别升高 241%（$P < 0.05$）、359%（$P < 0.005$）和 899%（$P < 0.001$）。而且 TNF 对 EC 生成组织因子的影响还与 EC 的作用时间有关。TNF（1000 u/ml 培养液）与 EC 孵育 4h，EC 内组织因子活性较对照值升高 100%（$P < 0.05$），至 12h，增加 360%（$P < 0.002$），但孵育 24h，组织因子活性较 12h 减少 50%（$P < 0.001$），仍较对照值明显升高（$P < 0.001$）（图 3）。

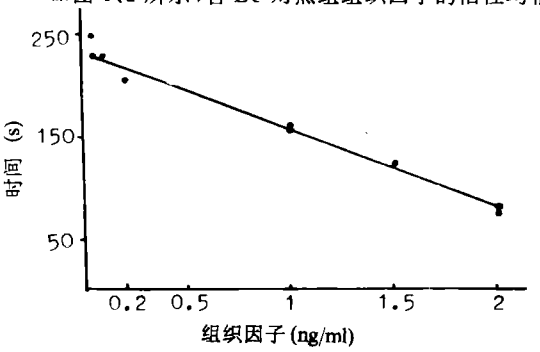


图 1 组织因子的标准曲线

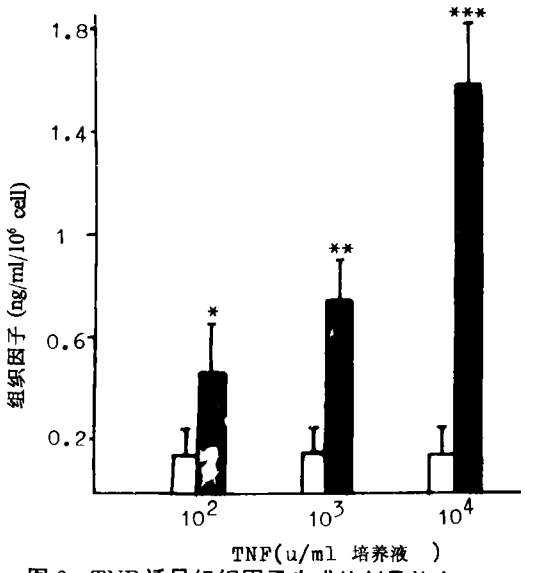


图 2 TNF 诱导组织因子生成的剂量效应

对照组（EC＋培养液，□，n ＝6）；实验组（EC＋TNF，■，n ＝6）；* 与对照组相比：* $P < 0.05$，* * $P < 0.005$，* * * $P < 0.001$

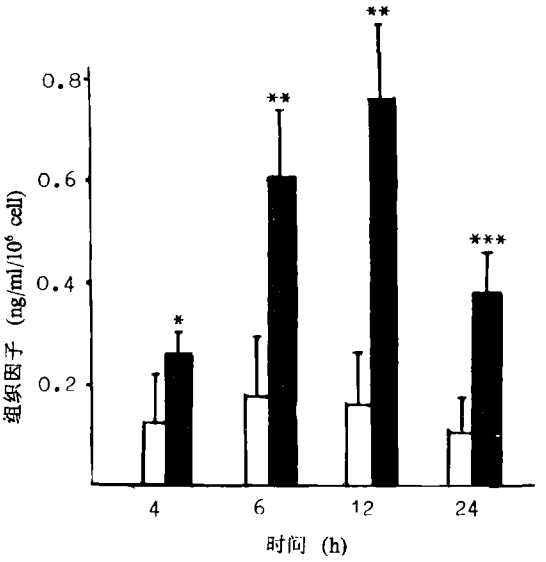


图 3 TNF 诱导组织因子（TF）生成的时间效应

TNF（1×10^3u/ml 培养液），对照组（□，EC＋培养液，n ＝6），实验组（■，EC＋TNF，n ＝6），* 与对照组相比，* $P < 0.05$，* * $P < 0.002$，* * * $P < 0.001$

3 讨论

体外 EC 的培养是研究 EC 生理功能以及 EC 与疾病发病关系的必要手段。因而近年来有关 EC 培养方法及其病理研究已引起医学界各方面的注意和重视。虽然胎儿脐静脉 EC 较动物 EC 难于培养，但由于它更接近于临床，因此我们首先着手建立胎儿脐静脉 EC 的培养。培养细胞的形态、生长特征与有关文献报道一致[3,5]，说明本室 EC 的培养方法是可靠的。本

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

实验并初步探讨了 TNF 对 1～3 代 EC 凝血作用的影响。

一般认为，体内内源性和外源性凝血途径都与血管 EC 损伤有关。EC 释放的组织因子是外源性凝血途径的始动环节。首先，组织因子与 Ca^{++}、第Ⅶ凝血因子结合，激活第 X 凝血因子，形成凝血酶原激活物，进而使凝血酶原转化为凝血酶，从而导致血管内血栓形成。以前实验曾认为[6,7]，感染性休克时，内毒素(LPS)能直接导致EC 损伤，通过 EC 下胶原纤维暴露而诱发内源性凝血的。但近年来体外 EC 培养发现[8,9]，LPS 并不能直接引起 EC 损伤。

本实验发现，人重组 TNF 与人 EC 孵育 4h，EC 内组织因子活性即明显增加，至 12h 升至峰值，孵育 24h 后，EC 内组织因子活性明显减少。说明 TNF 具有促进 EC 合成组织因子的作用，但其作用具有一定的时间性。此外，对 TNF 的作用还与 TNF 浓度有关，随 TNF 浓度增加而明显增强。由此推测，感染性休克时，LPS 首先刺激体内单核巨噬细胞产生大量 TNF，后者不仅可引起组织细胞的代谢紊乱，而且还通过刺激 EC 合成释放组织因子而启动外源性凝血。因此，TNF 可能是休克过程中 DIC 诱发的重要因素。

参考文献

1. Beutler B, Passive immunization against cachectin tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. Science 1985; 229:869～871
2. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. Surg Gynecol Obste 1989;164:415～422
3. 董玉兰 陈铁真王铁吉，等. 人脐带静脉内皮细胞的继代培养。中国医科大学学报 1989;18:81～85
4. Nawroth PP, Stern DM. Kisiel W, et al. Cellular requirement for tissue factor generation by bovine aortic endothelial cells in cultu culture. Throm Res 1985; 40:667～691
5. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973;52:2745～2756
6. Morrison DC, Ulevith RJ. The effect of bacterial endotoxin on host mediation systems. Am J Pathol 1978;93:526～617
7. Semeraro N. Interactions of palatelets, leukocytes, and endothelium with bacterial endotoxins: possible relevance in kidney disorders. In Hemostasis, Prostaglandins, and Renal Disease. Remuzzi G, et al. editor. Raven Press, New York. 1980:99～116
8. Harlan JN, Harker LA, Striker GE, et al. Endotoxin-mediated endothelial injury in vitro. Thromb Haemostasis 1981;46:200～204
9. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, et al. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to emdotoxin. J Clin Invest 1983;71:1893～1896

(收稿：1991-08-02；修回：1992-02-14)

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

The modulation effects of tumor necrosis factor on endothelial cells in their synthesis of tissue factor in vitro

Jiang Jianxin, Wang Jianghuai, Chen Huisun, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Endothelial cells (EC) from human umbilical vein have been subcultured for 10 passages as identified with optical and electron microscopy. The modulation effects of recombinant human tumor necrosis factor (rHTNF and TNF) on the 1st to 3rd generation of ECs in their synthesizing tissue factor were studied. It was found that when rHTNF and ECs were cocultured to the 4th hour, the activity of the tissue factor synthesized by ECs was significantly elevated ($P < 0.05$). The activity of tissue factor reached the peak in the 12th hour of culture and then decreased gradually. The tissue factor synthesized by ECs increased in amount with the increase of rHTNF concentration, which implies that rHTNF can promote the synthesis of tissue factor by ECs with evident concentration-and time-dependence. Our findings suggest that tumor necrosis factor plays an important role in the pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in septic shock.

Key words endothelium; cell; tumor necrosis factor; thromboplastin

个案与短篇

急性白血病引起血型变异一例报告

马贵山 吴全忠 （第三军医大学新桥医院输血科）630038

血型是一种终身不变的遗传性状，但 1957 年 Van Loghem 报告了两例白血病病人血型抗原减弱后，引起了人们的重视，对白血病病人出现血型变异的病例时有报道。我们发现一例急性非淋巴细胞白血病病人血型发生变异现象，报告如下：

邓某 女，35 岁，四川籍，工人，1988 年 12 月因劳累后周身酸痛，乏力，面部浮肿，食欲不振，贫血等给予一般对症治疗，至 1989 年 3 月症状加重并伴有发热住某地区医院经抗感染及输 O 型血 2 次共 600ml（检查血型为 O 型），无不良反应，因疗效不佳于 1989 年 4 月 15 日经我院检查诊断为急性非淋巴细胞白血病 M_2 型收住血液内科治疗，血红蛋白 58g/L，红细胞 2×10^{12}/L，白细胞 14.7×10^{9}/L，骨髓检查：原粒 0.175，早幼粒 0.175 中幼粒 0.125，粒系增生明显活跃，原粒可见 Auer 氏小体，血型检查为 O 型，交叉配血试验阴性，入院当日输 O 型全血 300ml，无不良反应，4 月 21 日用 O 型献血员再次做交叉配血时发现次端呈混合外观现象，复查病人血型，病人红细胞与抗-A、抗-B、抗-A+B 不凝集而病人血清则与 B 型红细胞发生凝集，由于病人急需输血，放先输 O 型红细胞 150ml，为进一步确证病人血型，吸收释放试验证实病人红细胞可吸收抗-A 并释放出抗 A 抗体。抗人球蛋白试验阴性，与 A 型献血员交叉配血不凝集，即改输 A 型血液，在治疗过程中又先后输 A 型全血 17 次（5700ml），血小板悬液 4 次（32 单位），均无不良反应。

讨论

（1）血型变异亦有作者称为血型抗原减弱，多发生于白血病及肿瘤病人，发生原因一般认为由于白血病病人红系统增生受抑，红细胞发育不成熟，其胞膜上的抗原位点减少或红细胞呈病理性增生，抗原减弱所致。而其血清中抗体尚属正常，本例病人我们观察到其血清中的抗-B 抗体变化不大，故给病人鉴定血型时同时做反定型实属必要。 （下转 219 页）

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