DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.04.013

内毒素对内皮细胞钙、钙-钙调蛋白复合物的影响

王 毅 朱佩芳 王正国 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 本实验对内毒素(ET)作用前、后的传代内皮细胞(EC)的钙含量和钙-钙调蛋白复合物进行了定量及半定量测定。旨在探索 ET 对 EC 内钙含量和钙-钙调蛋白复合物的影响及其在治疗学上的意义。结果显示,ET 能促使钙-钙调蛋白复合物解离;能使 EC 内钙含量显著性增加。

关键词 内毒素;内皮;钙;钙调素

内毒素(ET)所致的内皮细胞(EC)损伤已被公认为败血症、感染性休克以及 ARDS 等所产生许多症状的病理基础。近年来的研究发现,ET 不但可以通过白细胞、血小板等多种间接因素损伤 EC,而且体外实验也证实了 ET 能直接损伤 EC[1,2],但机制尚待阐明。

由于钙(Ca)和钙调蛋白 (Calmodulin, CaM)与多种细胞生物学过程密切相关[3],故本研究以体外培养的小牛肺动脉内皮细胞(Boring Pulmonary Endothelial Cells,BPEC)为实验对象,试图探讨 ET 致伤 BPEC 时,其 Ca 和钙-钙调蛋白复合物(Ca-CaM)的变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 BPEC 的培养及鉴定

参照我室建立的 BPEC 培养及纯化方法进行[4]。倒置显微镜下,BPEC 呈典型的铺路石相嵌单层排列(图 1),Ⅷ因子相关抗原 SPA-HRP 间接免疫组化染色阳性,透射电镜下可见 Weibal-Palad 小体(图 2)。

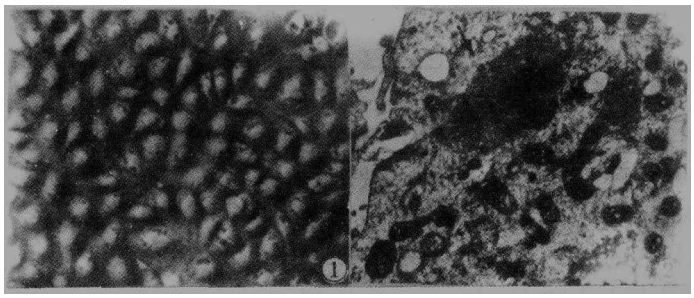


图 1 正常 BPEC 呈铺路石状结构
相差显微镜×100

图 2 ↓Weibel-palad 小体
透射电镜×8 000

根据对传代 BPEC 的形态功能分析结果[5],选 4～9 代 BPEC,用 0.25%柠檬酸胰酶消化,制成细胞悬液,调细胞浓度为 3×10^3 个/ml,按 1ml/孔接种于 16 孔塑料培养板,4～5d 长满融合后,随机进行分组实验。

1.2 ET 剂量的确定

即用 M-199 全培养液将 ET 稀释成 0.05μg/ml、0.1μg/ml、0.15μg/ml、0.2μg/ml 浓度。分别对 4 组 BPEC 进行处理,每组在 1、2、4、8 和 12h 各点进行半数死亡率统计(即按每时相点取两孔细胞,倾掉其原培养液,加入 0.4%台盼蓝 1 滴,M-199 液 9 滴,置倒置显微镜下, 随机计 100 个细胞中的着色细胞数)。以 4h 时达半数死亡率的 ET 剂量为准, 结果是选 0.1μg/ml 为实验剂量。

1.3 实验分组

1.3.1 伤前对照(0h):用 M-199 全培养液。

1.3.2 伤后组 (分 1、2、4 和 8h 等时相点): 用含 0.1 mg/ml ET 的 M-199 全培养液。

1.4 观测指标及测定方法

1.4.1 BPEC 内 Ca 的测定

参照高钰琪等[6]的方法略加改进。各组 BPEC 用吸管吸出其上清液后, 置 37℃ La^{+} 溶液 (组成 mmol/L:NaCl 122,KCl 5.9,Mg 1.25,Glucose 11,LaCl 355,Tris-maleate 15,pH 7.4)温浴 10min,倾掉 La^{+} 溶液,水浴 37℃ 0.5 h 后,加 30%高氯酸 1ml 消化 1h,再加 0.5mol/L H_2NO_3 1ml 消化 12h,离心 3000rpm 10min,取上清液,加 1%LaCl 溶液,用原子

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

吸收分光光度计(IL951,USA)测定 Ca 溶度,根据公式计算其含量。

$$\text{Ca 含量}(\mu g/\text{孔细胞})=\frac{\text{测定 Ca 浓度}(\mu g/ml)}{\text{孔数}}\times\text{加入酸量}(ml)\times\frac{\text{测定液终体积}}{\text{加入样液体积}}\quad(ml)$$

1.4.2 BPEC 内 Ca-CaM 的测定

取各点 BPEC,用 10^{-4} mol/L 的三氟啦嗪(TFP,D-Hank's 液配制,pH7.25)活染 20min,紫外光照射 10min 加强氧化后,用 D-Hank's 液洗两遍后,立即置荧光显微微型机镜(Olympus,日本)下观察,并以统一的光圈和时间(1min)摄影。由其负片经统一光圈、时间和放大倍数制成照片,送 MAS-1 图象分析系统(重大光电精密仪器研究所提供)进行荧光辉度分析。测量参数为辉度点计数。每次测量,计算机以每张照片的非细胞部分辉度值为本底,分别测定核、浆辉度值,最后打印值已扣除本底。

1.5 统计学处理

实验结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组均数间的两两比较用单因素方差分析(NEWMAN-KEUL'S TEST)。程序源于 SPM 系统(第三军医大学数学教研室提供)。

2 结果

2.1 ET 对 BPEC 内 Ca 含量的影响(见表 1)

表 1 ET 孵育前后 BPEC 内钙含量的变化

孵育时间(h)	样本数	Ca 含量(μg/孔细胞)
0	4	0.2935±0.003
0.5	4	0.819±0.071*
1	4	2.137±0.242*

注: *与 0h 比较 $P<0.05$

2.2 ET 对 BPEC 内 Ca-CaM 的影响(见表 2)

表 2 内毒素处理后 BPEC 的 TEP 荧光辉度值

处理时间(h)	样本数	计数点 核	计数点 胞浆	荧光辉度($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$) 核	荧光辉度($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$) 胞浆	核($\bar{x}$)/浆($\bar{x}$)
0	6	59	97	235.902±12.551■	90.356±6.094□■	2.668■
1	5	68	98	129.265±37.490*■	94.701±13.377□■	1.372*■
2	6	101	149	134.591±19.230■	112.425±28.862■	1.248*■
4	4	65	97	130.839±19.230*■	151.613±13.845*■	0.873*
8	6	68	76	49.075±22.017*	61.889±24.493*☆□	0.814*

注: *与 0h 比较 $P<0.05$; ☆与 2h 比较 $P<0.05$; □与 4h 比较 $P<0.05$; ■与 8h 比较 $P<0.05$

3 讨论

3.1 ET 对 BPEC 内 Ca 的影响

细胞内 Ca 包括游离 Ca(Ca^{++})和结合 Ca(Ca-CaM)两种。近年来的研究发现创伤时可以引起细胞内 Ca^{++}浓度增高[7],当细胞内 Ca^{++}浓度持续超过 10^{-4}mol/L,即可导致细胞死亡。通常正常细胞内的 Ca^{++}浓度在 $10^{-6}\sim10^{-8}$ mol/L 之间,当细胞兴奋或 Ca^{++}通道开放时,细胞内 Ca^{++}浓度可达 10^{-5}mol/L[8]。以此可推算出,正常细胞兴奋时胞内的 Ca^{++}浓度和细胞死亡时的 Ca^{++}浓度的临界值相差 10 倍。本实验结果显示,ET 作用后 0.5h,EC 内 Ca 含量就有显著性增高,1h 时已高于伤前的 7 倍多。由于同一培养孔的 BPEC 之间存在着细胞周期不同步和对 ET 毒性作用的耐受性不同等差异,因此可以认为,有的 BPEC 内可能已达到或超过正常细胞内 Ca 含量的 10 倍,如果此

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

时细胞内结合钙没有相应增加，那么这种细胞内 Ca 的增加就等于 Ca^{++} 浓度的增加，也就成了细胞死亡的原因之一。

3.2 ET 对 BPEC 内 Ca-CaM 的影响

细胞内 Ca 主要是通过与 CaM 结合，形成 Ca-CaM，使 CaM 改变其构象而被激活，而产生细胞生物学效应的。本实验结果显示，随 ET 作用时间延长，细胞荧光逐渐减弱，尤以胞核为著(图 3～6)。计算机荧光辉度分析结果表明，伤后 1h 核荧光即有显著性降低，胞浆荧光在伤后 4h 就有显著性降低，核/浆荧光辉度比在伤后 1h 就有显著性降低。由于 TFP 与 Ca-CaM 的结合是特异性的，且在紫外光照射后不再解离[9]。故推测 ET 作用后可能降低了 Ca^{++} 和 CaM 的亲合力，从而促使 Ca-CaM 解离。

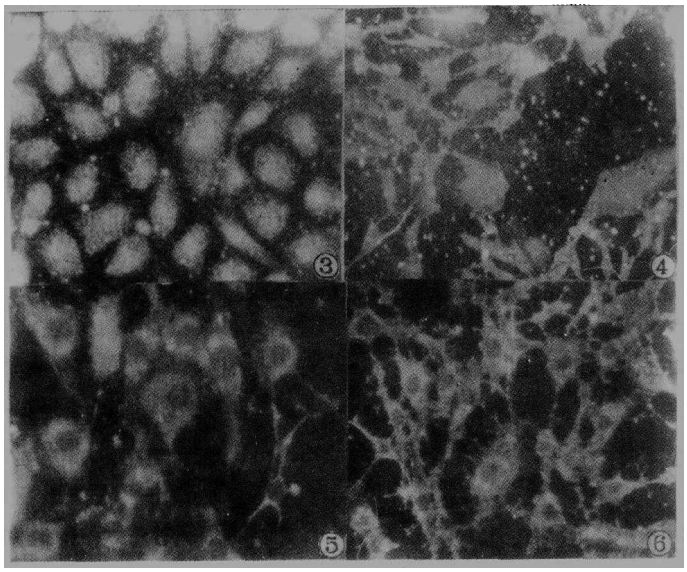


图 3 正常 BPEC
荧光显微镜×250

图 4 ET 作用后 2h 的 BPEC
荧光显微镜×250

图 5 ET 作用后 4h 的 BPEC
荧光显微镜×250

图 6 ET 作用后 8h 的 BPEC
荧光显微镜×250

本实验结果提示：(1) 细胞内 Ca 的增加和结合 Ca(Ca-CaM)的降低，说明伤后胞内 Ca^{++} 浓度增加，并成为细胞的死亡原因之一。(2) Ca-CaM 的减少，使许多细胞生物学过程中断，也成为细胞的死亡原因。

目前，有关 Ca^{++} 和 CaM 的研究已经广泛应用于神经细胞、骨骼肌细胞、巨噬细胞、中性白细胞和红细胞等领域，在 EC 方面应用的研究国外尚少见[10]，国内尚未见报道。

参考文献

1. Tumen J, Meyrick B, Berry JR, et al. Antiproteinase protect cultured lung endothelial cells from endotoxin injury. J Appl Physiol, 1988; 65(2): 835
2. Meyrck B. Endotoxin-mediate endothelial damage. Fed Proc, 1986; 45: 19
3. Means AR, Rasmussen CD. Calcium, calmodulin and cell proliferation. Cell Calcium, 1988; 9: 313
4. 王毅 朱佩芳 王正国。内皮细胞培养中清除成纤维细胞的新方法。细胞生物学杂志，1991；1：47
5. 王毅 朱佩芳 王正国。传代内皮细胞形态和功能变化的关系。细胞生物学杂志，1992；1：27
6. 高钰琪 孙秉庸 杨仲强，等。缺氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞 $^{45}Ca^{++}$ 跨膜内流及细胞内钙含量的影响。中国病理生理学杂志，1989；5(7)：425
7. 包建新。钙结合蛋白。生理科学进展，1987；18(4)：318
8. 赵升皓。钙调节蛋白。徐州医学院学报，1986；6(1)：1
9. 胡卓逸 吴兰儿。钙调素拮抗剂和药物研究。中国医科大学学报，1987；18(4)：312
10. Ryan US, Johns A, Breemen CV. Role of culcium

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

in receptor-mediated endothelial cell responses. Chest,1988;93(3):105

(收稿:1991-09-25;修回:1992-02-10)

Effects of endotoxin on calcium and calcium-calmodulin complex in endothelial cells

Wang Yi, Zhu Peifang, Wang Zhenguo, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Calcium content and calcium-calmodulin complex were determined in endothelial cells before and after they were treated with endotoxin. It was found that endotoxin can promote the disintegration of calcium-calmodulin complex and greatly increase the cacium content in the endothelial cells.

Key words endotoxins; endothelium; calcium; calmodulin

慢性活动性肝炎并发假性肝性脑病误诊为急性重型肝炎 1 例报告

何念海 (第三军医大学西南医院传染科) 630038

慢性活动性肝炎出现肝性脑病少见。本科近期收治 1 例慢性活动性肝炎并发假性肝性脑病误诊为急性重型肝炎。现报告于后:

患者 女,24 岁。因乏力、纳差、头昏 10 天,意识障碍 2 天,皮肤黄染 1 天于 1990 年 12 月 4 日 11 时入院。患者缘于入院前 10d 出现乏力,纳差,头昏,入院前 2 天发现意识障碍,入院前 1 天经过治疗意识障碍无缓解,并发现眼白皮肤可疑黄染。入院当日呈浅昏迷状,黄疸加深。既往无肝炎病史。急诊以"急性重型肝炎,肝性脑病Ⅱ度"收入院。体检:体温、脉搏、呼吸、血压正常、神志不清、呻吟。皮肤巩膜轻度黄染,注射部位可见小块瘀斑,无肝掌蜘蛛痣。肝脾肋下未扪及,肝浊者区无缩小,扑翼样震颤阴性。辅助检查:血 WBC 9.7×10^9/L,N 0.64,血小板 48×10^9/L。血钾 3.4 mmol/L,血 pH 为 7.536, $PaCO_2$ 4 kPa, HCO_3^- 25.7 mmol/L,血糖 7.1mmol/L。PT 21.5 s(对照 14s)。ALT 12833.3 nmol.s^{-1}/L,TB 80.2μmol/L,ALB/G 为 32.3/33.6 g/l,r 球蛋白 0.46,胆固醇 1.3mmol/L,胆固醇酯 1.02 mmol/L。尿胆原阳性。CSF 检查大致正常。HBsAg 阳性,HBeAb 阳性,HBcAb 阳性,抗 HAV-IgM 阳性,HDAg 阴性。ECG 提示低钾,脑电图和脑电阻图检查正常。入院后按急性重型肝炎,肝性脑病Ⅱ度予以输液,纠正电解质和酸碱平衡紊乱及抗肝性脑病等综合支持治疗。入院后 5 h 神志转清,后来又出现反复。至 12 月 7 日神志完全清楚。以后症状逐渐减轻,黄疸减轻。ALT 2766.7 nmol.s^{-1}/L,TB 30 μmol/L,PT 13s(对照 14s)。住院 11d 好转自动出院。肝活检诊断为慢性活动性肝炎(中型)。

讨 论

本例特点 (1) 急性起病,病后劳累,无明确肝炎病史;(2) 消化道症状明显;(3) 病程第 8 天意识改

(下转 385 页)

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