

• 论著 •

休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮细胞炎症介质表达的影响

赵自刚 陈瑞华 牛春雨 张静 樊贵

【摘要】 目的 观察休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮细胞(PMVECs)自由基及一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)表达的影响,进一步探讨休克淋巴液损伤PMVECs的机制。方法 原代培养大鼠PMVECs至第3代进行研究。无菌条件下复制大鼠重症失血性休克模型(动脉压40 mm Hg维持90 min, 1 mm Hg=0.133 kPa)。引流正常大鼠和休克大鼠肠系膜淋巴液及门静脉血,与PMVECs孵育6 h,同时以胎牛血清(FBS)和无血清的DMEM培养液作为对照。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、TNF-α和IL-6的mRNA表达;检测培养上清液中丙二醛(MDA)、NO、TNF-α和IL-6的含量。结果 体积分数为4%终浓度的休克淋巴液作用6 h后,PMVECs中iNOS、TNF-α和IL-6的mRNA表达以及培养上清液中MDA、NO、TNF-α和IL-6水平均显著高于空白对照组、正常淋巴液组、休克血浆组、正常血浆组和无血清对照组;且休克血浆作用PMVEC 6 h后的iNOS、TNF-α和IL-6的mRNA表达及培养上清液中NO水平均显著高于空白对照组、正常淋巴液组、正常血浆组和无血清对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 4%终浓度的休克淋巴液可致大鼠PMVECs中iNOS、TNF-α和IL-6的mRNA表达增强,促进自由基释放,从而诱导细胞损伤。

【关键词】 休克; 淋巴液; 肺微血管内皮细胞; 炎症介质

Effect of shock lymph on the expression of inflammatory mediators in pulmonary micro-vascular endothelial cells of rats ZHAO Zi-gang, CHEN Rui-hua, NIU Chun-yu, ZHANG Jing, FAN Gui. Department of Pathophysiology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China
Corresponding author: NIU Chun-yu, Email: ncylxf@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of lymph collected during shock on free radical and expressions of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) mRNA of pulmonary micro-vascular endothelial cells (PMVECs) of rats in order to explore the mechanisms of damaging effect of lymph collected during shock to the PMVECs. **Methods** PMVECs were isolated and cultured, and used at passage 3. The model of serious hemorrhagic shock was reproduced by maintaining the arterial blood pressure of rats at 40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa) for 90 minutes by exsanguination under aseptic condition. Mesentery lymph and portal vein blood were obtained from both shock rats and normal rats. PMVECs were respectively incubated in them for 6 hours, and at the same time, fetal bovine serum (FBS) and serum-free DMEM were used as culture media for comparison. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS), TNF-α and IL-6 mRNA were detected by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the contents of malondialdehyde (MDA), NO, TNF-α and IL-6 in culture supernatants were determined. **Results** After the PMVECs was treated by shock lymph at a final concentration of 4% for 6 hours, the expressions of iNOS, TNF-α and IL-6 mRNA in PMVECs and the contents of MDA, NO, TNF-α and IL-6 in culture supernatant fluids in shock lymph group were significantly increased compared with those of FBS group, normal lymph group, shock plasma group, normal plasma group and DMEM group. At the same time, the expressions of iNOS, TNF-α and IL-6 mRNA in PMVECs and the contents of NO in culture supernatant fluid of shock plasma group were significantly increased compared with those of FBS group, normal lymph group, normal plasma group and DMEM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The results demonstrate that the shock lymph in final concentration of 4% could enhance the expressions of iNOS, TNF-α and IL-6 of PMVECs, reduce the free radical, and as a result, induce damage to PMVECs.

【Key words】 shock; lymph; pulmonary micro-vascular endothelial cell; inflammatory mediator

传统观点认为,休克所致的肺损伤是肠源性毒

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.05.004

基金项目:国家自然科学基金项目(30370561);河北省自然科学基金项目(C2004000649)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院病理生理教研室

通信作者:牛春雨,Email:ncylxf@126.com

性物质由肠道吸收经门静脉回流的肠源性移位的结果。但研究表明,在创伤失血性休克患者的门静脉血中没有发现毒素^[1]。Deitch等^[2]报道,失血性休克复苏后肠系膜淋巴液可活化在体和离体的中性粒细胞,促进急性肺损伤的发生;事先行肠淋巴转流则可

防止肺损伤。本室针对肠源性移位肠淋巴途径的研究发现,结扎肠系膜淋巴管可减轻失血-内毒素二次打击大鼠以及失血性休克大鼠的器官功能障碍及形态学损伤^[3];在针对肠淋巴途径的细胞机制研究发现,休克淋巴液可致原代培养的肺微血管内皮细胞(PMVECs)形态学损伤,降低代谢活性^[4]。这些研究均证明肠淋巴途径在休克发病学中具有重要意义。在此基础上,本研究中拟观察休克淋巴液对大鼠 PMVECs 自由基及一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达的影响,进一步揭示休克淋巴液损伤 PMVECs 的部分机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠 PMVECs 的原代培养及传代:选择体重 50~80 g 的健康雄性 Wistar 大鼠(中国医学科学院动物繁殖中心),按本室改良的植块培养方法进行大鼠 PMVECs 原代培养并进行鉴定,传至第 3 代后,用于本实验研究。

1.2 失血性休克模型复制及淋巴液、血浆的收集:体重 220~300 g 的健康雄性 Wistar 大鼠(中国医学科学院动物繁殖中心),肌肉注射戊巴比妥麻醉大鼠,以 Lamson 法自颈总动脉放血至血压 40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa),维持 90 min,复制重症失血性休克模型^[5]。维持低血压后,以微量注射泵回输放出的血液及林格液。在维持低血压期间行腹部手术,引流肠系膜淋巴液^[4]1 h,引流量约为 0.5 ml,离心后取上清液,备孵育 PMVECs 用。部分大鼠复制重症失血性休克模型后,行腹部手术,门静脉插管,抽取门静脉血,离心取血浆,备孵育 PMVECs 用。同时,取部分正常大鼠,分别引流正常肠系膜淋巴液或抽取门静脉血制备血浆。

1.3 实验分组及标本留取:将含体积分数为 4% 终浓度的正常淋巴液、休克淋巴液、正常血浆及休克血浆的 DMEM 培养液混合作为培养基(分别设为 B、C、D、E 组),同时设 10% 胎牛血清(FBS)作为空白对照以及无血清对照(分别为 A、F 组),分别与第 3 代 PMVECs 共同孵育 6 h 后分离培养上清液,置于 -20 °C 冰箱保存。同时,将共同孵育 6 h 后的 PMVECs 经胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,按照 TRIzol 一步法提取 RNA,进行反转录。反转录反应体积为 40 μ l,包括标本 RNA 2 μ g、随机引物 100 ng、5 \times 反转录缓冲液 8 μ l、10 nmol/L dNTP 1.25 μ l、RNasin 25 U(美国 MBI 公司)、反转录酶 200 U(美国 Promega 公司),70 °C 5 min,37 °C 60 min,95 °C 5 min,将反转录出的 cDNA 保存于

-20 °C 冰箱。

1.4 PMVECs 中诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达检测:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定。 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,根据 GenBank 目的基因序列,通过 Primer Primer 5.0 引物序列设计软件设计目的基因引物序列,iNOS、TNF- α 、IL-6 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。将反转录出的 cDNA 进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 5 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 45 s,35 个循环,终末 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下拍照后进行密度扫描,应用凝胶自动成像分析系统,计算检测基因与 β -actin 的相对比值来表示检测基因的表达强度。

1.5 培养上清液中各指标检测:上清液中蛋白定量采用考马斯亮蓝法;用改良硫代巴比妥酸(TBA)微量法测定丙二醛(MDA)浓度,用硝酸还原酶法测定 NO₂⁻/NO₃⁻ 浓度(试剂盒购自南京建成生物工程研究所),用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- α 、IL-6 的水平(试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司),操作按试剂盒说明书要求进行。

1.6 统计学处理:数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行 *t* 检验和单因素方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMVECs 原代培养与鉴定:体外培养的大鼠 PMVECs 呈梭形或多角形,形成单层后呈典型的鹅卵石样或铺路石样排列,抗 α 因子阳性反应。

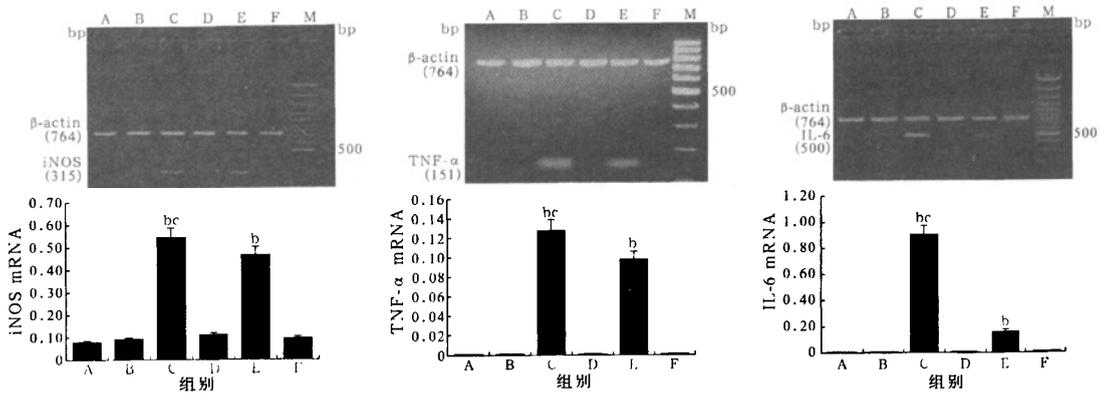
2.2 休克淋巴液对 PMVECs 中 MDA 的影响(表 1):休克淋巴液组上清液 MDA 水平显著高于其他各组(*P* 均 < 0.01);而其他组间比较差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。

表 1 休克淋巴液对大鼠 PMVECs 培养上清液中 体液因子的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA (μ mol/g)	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μ mol/g)	TNF- α (μ g/g)	IL-6 (μ g/g)
A 组	33.15 \pm 8.26	1.02 \pm 0.32	4.07 \pm 0.85	0.85 \pm 0.17
B 组	3.69 \pm 0.59	0.70 \pm 0.21	32.48 \pm 9.33	0.98 \pm 0.30
C 组	9.88 \pm 1.04 ^{bc}	1.46 \pm 0.30 ^{bc}	74.35 \pm 12.61 ^{bc}	2.02 \pm 0.43 ^{bc}
D 组	4.01 \pm 0.96	0.88 \pm 0.15	36.47 \pm 8.99	1.02 \pm 0.43
E 组	4.86 \pm 0.80	1.00 \pm 0.26	48.29 \pm 9.12 ^a	1.21 \pm 0.50
F 组	4.11 \pm 0.83	0.79 \pm 0.18	34.11 \pm 7.91	0.97 \pm 0.48

注:与 A、B、D、F 组比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01;与 E 组比较,^d*P*<0.01

2.3 休克淋巴液对 PMVECs 中 NO 及其合酶的



M:DNA Marker;与 A、B、D、F 组比较,^b*P*<0.01;与 E 组比较,^c*P*<0.01

图 1 大鼠 PMVECs 在不同处理条件下 iNOS、TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 表达

影响(表 1;图 1):休克淋巴液组 NO₂⁻/NO₃⁻ 浓度及 iNOS mRNA 表达均明显高于其他各组(*P* 均 < 0.01);休克血浆组 NO₂⁻/NO₃⁻ 和 iNOS mRNA 表达也均明显高于正常淋巴液组、正常血浆组、空白对照组及无血清对照组(*P* 均 < 0.05);其他各组间比较差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。

2.4 休克淋巴液对 PMVECs 中 TNF-α 及 IL-6 表达的影响(表 1;图 1):休克淋巴液组 TNF-α、IL-6 水平及 TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达均明显高于其他各组(*P* 均 < 0.01);休克血浆组 TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达显著高于空白对照组、正常淋巴液组、正常血浆组及无血清对照组(*P* 均 < 0.01);其他组间比较差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。

3 讨论

肺损伤是休克时器官功能障碍常见、死亡率高的器官损伤,其发病基础是肺泡-毛细血管膜受损,通透性增高^[6-7]。细胞损伤首先发生在生物膜(包括细胞膜、线粒体膜和溶酶体膜等),表现为通透性增高。在生物膜损伤的过程中,除能量代谢障碍造成膜泵功能降低引起细胞内外离子交换失衡外,其膜的稳定性还受氧化应激、炎症介质以及毒性物质直接损伤等多方面影响,进而使细胞代谢停止、功能完全丧失,并出现不可逆的形态学改变。

炎症介质在细胞损伤的过程中具有重要作用。TNF-α 是机体受到致病因素刺激后最先出现的、起关键作用的介质,可诱导其他细胞因子产生和释放;IL-6 也是炎症反应的重要启动因子之一,能诱导 B 淋巴细胞分化,分泌免疫球蛋白;休克时大量 NO 释放可加重炎症反应,导致肺血管内皮细胞损伤,促进肺损伤;结扎肠系膜淋巴管阻断休克淋巴液回流,

可抑制失血性休克大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达,减少 NO 的合成与释放^[5]。氧自由基损伤在细胞损伤过程中也起重要作用。本研究发现,休克淋巴液在损伤 PMVECs、降低代谢增殖活性^[4]的基础上,还表现为 PMVECs 中 TNF-α、IL-6、iNOS 的 mRNA 表达以及培养上清液中 MDA、NO、TNF-α、IL-6 的浓度均显著高于休克血浆、正常淋巴液、正常血浆组,而休克血浆组中 TNF-α、IL-6、iNOS 的 mRNA 表达也有一定程度升高,表明休克淋巴液损伤 PMVECs 的机制与 PMVECs 中促炎介质高表达以及自由基损伤等因素有关。其原因一方面是休克淋巴液含有大量的内毒素等毒性物质^[8],而这些毒素对 PMVECs 有直接的损伤作用,能诱发自由基释放,加重自由基损伤的恶性循环,刺激 PMVECs 中 iNOS、TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达,产生并释放炎症介质 NO、TNF-α、IL-6,引起炎症的“瀑布效应”,加重细胞损伤;另一方面休克淋巴液中含有大量 TNF-α、IL-6 等促炎介质^[8],可直接引起细胞的炎症反应加剧,导致细胞损伤。Deitch 等^[9]以狒狒复制创伤失血性休克模型,发现其肠系膜淋巴液对人脐静脉内皮细胞具有细胞毒作用,并可抑制骨髓祖细胞的生长,故提出在创伤失血性休克灵长类模型中,肠淋巴液中含有能导致肺损伤、内皮功能障碍和抑制骨髓祖细胞生长的淋巴毒性因子。Zaets 等^[10]报道,肠系膜淋巴液断流可预防创伤失血性休克引起的红细胞变形性和形态的改变。本研究结果也提示,在休克致器官功能障碍或衰竭的发病学过程中,肠淋巴途径是肠源性毒性物质经肠道移位至全身导致器官功能障碍的重要原因。因此,Kuebler 等^[11]指出,淋巴系统被认为是肠源性毒物最主要的移位途径。因

此,在重症休克患者的防治中,应重视肠淋巴途径的作用^[12]。

总之,重症休克时肠系膜淋巴液损伤 PMVECs 的分子机制与休克淋巴液诱导 PMVECs 中 iNOS、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 高表达,加剧 PMVECs 的炎症反应,扩大 PMVECs 的自由基损伤等因素有关。肠系膜淋巴管回收内毒素等大分子物质造成的肠淋巴途径移位对休克所引起的肺损伤具有重要的作用。

参考文献

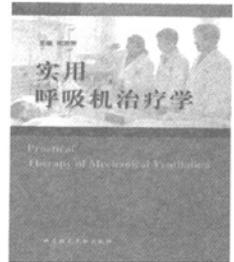
[1] Xu DZ, Lu Q, Adams CA, et al. Trauma-hemorrhagic shock-induced up-regulation of endothelial cell adhesion molecules is blunted by mesenteric lymph duct ligation. Crit Care Med, 2004, 32(3):760-765.
 [2] Deitch EA, Adams C, Lu Q, et al. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. Surgery, 2001, 129(1):39-47.
 [3] Niu CY, Li JC, Zhao ZG, et al. Effect of intestinal lymphatic circulation blockage in two-hit rats. World J Gastroenterol, 2006, 12(36):5805-5812.
 [4] 牛春雨, 赵自刚, 李继承, 等. 休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮

细胞的损伤作用. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2):145-152.
 [5] 牛春雨, 李继承, 赵自刚, 等. 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织一氧化氮及其表达的影响. 中国危重病急救医学, 2006, 18(9):527-530.
 [6] 赵自刚, 牛春雨, 张静, 等. 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺损伤的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5):274-278.
 [7] 杨自建, 张翔宇, 沈菊芳, 等. 不同呼气末正压水平对肺复张患者脑灌注压及血流动力学的影响. 中国危重病急救医学, 2008, 20(10):588-591.
 [8] 牛春雨, 侯亚利, 赵自刚, 等. 肠淋巴途径在休克大鼠肠源性细菌/内毒素移位发病学中的作用. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5):266-269.
 [9] Deitch EA, Forsythe R, Anjaria D, et al. The role of lymph factors in lung injury, bone marrow suppression, and endothelial cell dysfunction in a primate model of trauma-hemorrhagic shock. Shock, 2004, 22(3):221-228.
 [10] Zaets SB, Berezina TL, Caruso J, et al. Mesenteric lymph duct ligation prevents shock-induced RBC deformability and shape changes. J Surg Res, 2003, 109(1):51-56.
 [11] Kuebler JF, Toth B, Rue LW, et al. Differential alterations in intestinal permeability after trauma-hemorrhage. J Surg Res, 2003, 112(2):198-204.
 [12] Anjaria DJ, Mohr AM, Deitch EA. Haemorrhagic shock therapy. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(6):901-911.
 (收稿日期:2008 07-09 修回日期:2009-03-10)
 (本文编辑:李银平)

• 启事 •

第二期机械通气技术临床应用与进展学习班招生通知

上海交通大学医学院附属第三人民医院呼吸科将于 2009 年 6 月 4—8 日举办国家级继续医学教育项目(20090302027)“机械通气技术临床应用与进展学习班”,由宋志芳教授主讲,并以其主编的《实用呼吸机治疗学》第 1 版为教材。学习班结束后授予 I 类学分 10 分。招生对象为从事急诊、急救、危重病、ICU、呼吸、麻醉等专业技术人员,招生名额为 30~50 名,学费暨资料费 600 元、食宿费 600 元(其余费用一律不收)。联系地址:上海交通大学医学院附属第三人民医院科研部 上海市宝山区漠河路 280 号;邮编 201900,科研部张新芳(021-56693614, Email: bgyyzxf@sohu.com)、呼吸科陆静娟、李尧(021-56691101 转 6240, 6241, 6246)。报名截止日期:2009 年 5 月 31 日。
 (上海交通大学医学院附属第三人民医院)



第六次全国危重病与机械通气治疗学术交流暨全国机械通气技术临床应用新进展高级培训班通知

中华医学会继续教育部将于 2009 年 9 月中旬在北京召开第六次全国危重病与机械通气治疗学术交流会暨全国机械通气技术临床应用新进展高级培训班(国家继续教育项目编号 2009-03-02-084),欢迎各级医院有关人员参加征文或报名参会。

会议日期:报到日期 2008 年 9 月 18 日,会期:19—21 日。

会议地点:众晶鑫酒店新楼(复兴路 26 号,解放军总医院正门辅路往东 150 m);电话:010-88272999(总机)。

主要内容:会议将邀请知名的危重病及机械通气专家就机械通气治疗领域(无创和有创技术)的理论和实践中的新进展、热点难点问题、不同类型的危重病患者机械通气问题,机械通气治疗关键技术、疑难危重病及肺部疾病诊疗进行重点培训、示教和深入探讨。授课专家及讲学内容请在中华医学会网(www.cma.org.cn)继续教育栏目查找。

征文内容与要求:危重病的诊疗,机械通气问题,病例报道等。全文 2 000 字左右,或 600 字左右摘要 1 份,务必注明工作单位、科室、姓名及邮编。来稿请寄 100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“机械通气会议”梁鸿收。Email: jxjy@vip.163.com, 欢迎使用 Email 发稿(务必注明会议名称)。征文截止日期:邮局:8 月 20 日前,Email:8 月 31 日前。每位代表需交纳会务费 980 元,住宿费 150 元/d。请于会议 1 周前办理好报名后直接参会。联系方式:杨桂芳:010-88820399, 51798200;梁鸿:010-85158402;短信报名:13611002300。

(中华医学会继续教育部)