

热打击对体外培养人血管内皮细胞骨架及细胞周期的影响

潘志国 邵玉 耿焱 陈镜合 苏磊

【摘要】 目的 探讨热打击对体外培养人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 细胞骨架及细胞周期的影响。**方法** 体外培养 HUVEC, 并分别置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱 (对照组) 或 43 ℃ 细胞培养箱 (热打击组) 培养 1 h。采用考马斯亮蓝 R-250 染色法, 高倍镜下观察热打击对 HUVEC 细胞骨架的影响。热打击组细胞培养 1 h 后继续置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱孵育, 分别于 0、6、12、18、24 h 采用流式细胞仪检测热打击对 HUVEC 细胞周期的影响。**结果** 镜下观察对照组 HUVEC 细胞骨架形态正常; 热打击组随热打击时间的延长, 细胞骨架逐渐增粗、变短, 且出现明显的应力纤维。对照组细胞 G0/G1 期 DNA 含量为 48.57%, S 期为 44.62%, G2/M 期为 6.81%。在热打击后 HUVEC 细胞各时间点 G0/G1 期 DNA 含量为 38.07%~55.19%, 热打击后 0、6、12、18、24 h 组分别为 54.06%、55.19%、48.23%、38.07% 和 41.03%; S 期 DNA 含量为 35.33%~48.18%, 热打击后 0、6、12、18、24 h 组分别为 35.33%、39.50%、42.50%、48.18% 和 47.99%; G2/M 期 DNA 含量为 5.31%~13.75%, 热打击后 0、6、12、18、24 h 组分别为 10.61%、5.31%、9.27%、13.75% 和 10.98%。说明当 HUVEC 细胞离开热打击环境后, G0/G1 期 DNA 含量在 6 h 内明显高于对照组, 至 12 h 时才恢复至对照组水平。**结论** 热打击可改变 HUVEC 细胞骨架结构, 且细胞周期出现阻滞, 细胞被阻滞在 G0/G1 期。

【关键词】 热打击; 血管内皮细胞; 通透性; 细胞骨架; 细胞周期

The effect of heat stress on the cytoskeleton and cell cycle of human umbilical vein endothelial cell in vitro Pan Zhiguo*, Shao Yu, Geng Yan, Chen Jinghe, Su Lei. * Department of Critical Care Medicine, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, the Military Key Laboratory of Trauma Care in Hot Zone and Tissue Repair in PLA, Guangzhou 510010, Guangdong, China
Corresponding author: Su Lei, Email: slei_icu@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of heat stress on the cytoskeleton and cell cycle of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) in vitro. **Methods** HUVEC was cultured in vitro in 5%CO₂ medium at 37 ℃ (control group) or 43 ℃ (heat stress group) for 1 hour. Coomassie brilliant blue R-250 staining was used to determine the effect of heat stress on the cytoskeleton. The cells in heat stress group were subsequently cultured at 37 ℃ in 5%CO₂ medium after heat stress for 1 hour, and cell cycle of HUVEC was determined at 0, 6, 12, 18 and 24 hours with flow cytometry. **Results** Under light microscopy normal cytoskeleton was observed in control group, but thicker and shorter cytoskeleton was found after a rise of temperature, and stress fibers were found in heat stress group. The DNA content of HUVEC at all time points in G0/G1 stage was 38.07%~55.19% after heat stress. The DNA content in control group was 48.57%, and it was 54.06%, 55.19%, 48.23%, 38.07%, and 41.03% at 0, 6, 12, 18, 24 hours in G0/G1 stage in heat stress group. DNA content in S phase was 35.33%~48.18%. The DNA content in control group was 44.62%, and it was 35.33%, 39.50%, 42.50%, 48.18%, and 47.99% at 0, 6, 12, 18, 24 hours in S stage in heat stress group. DNA content in G2/M phase was 5.31%~13.75%. The DNA content in control group was 6.81, and it was 10.61%, 5.31%, 9.27%, 13.75%, and 10.98% at 0, 6, 12, 18, 24 hours in G2/M stage in heat stress group. It was demonstrated that compared with control group, the DNA content in G0/G1 stage was significantly increased when the HUVEC were separated from heat stress within 6 hours, and it recovered at a similar level as control group at 12 hours. **Conclusion** Heat stress can change the cytoskeleton of HUVEC, and cause stagnation at G0/G1 stage in cell cycle.

【Key words】 Heat stress; Endothelial cell; Permeability; Cytoskeleton; Cell cycle

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.08.004

基金项目: 国家自然科学基金 (81071529, 81101467, 81101406); 全军医学科学技术研究“十二五”发展计划重点项目 (BWS12J018); 广东省自然科学基金 (2014A030313601); 广东省科技计划 (2013B031800010)

作者单位: 510010 广东广州, 广州军区广州总医院重症医学科, 全军热区创伤救治与组织修复重点实验室 (潘志国、耿焱、苏磊); 510010 广东广州, 广州军区广州总医院干部内七科 (邵玉); 510300 广东广州, 广州中医药大学第一附属医院内科 (陈镜合) 通讯作者: 苏磊, Email: slei_icu@163.com

中暑是以中心体温过高,伴随系统炎症反应,并导致多器官包括心、肝、肺、肾、肠、血管、凝血系统和骨骼肌等发生一系列功能障碍为特征的一种严重危及生命的疾病^[1-7]。本课题组既往的临床及基础研究也证实,中暑尤其是重症中暑对于人体多器官如神经系统、横纹肌、胃肠道及机体多种炎症介质均有影响^[8-11]。在我国,重症中暑病死率高达 10%~15%,一旦发展为重症中暑合并多器官功能障碍综合征(MODS),病死率可达 40% 以上^[1,12]。目前的研究进展表明:除热暴露直接损伤外,重症中暑的病理生理学过程更多的是一种继发于热应激损伤之后的全身炎症反应综合征(SIRS),并进一步表现为“类脓毒症”(like-sepsis)诱发 MODS 的过程^[12-16]。遍布于全身各个部位的毛细血管内皮细胞损伤出现最早,且是热打击的重要反应细胞^[4],既是参与炎症应答的主要细胞之一,又是炎症损害的靶标^[17]。本课题组既往研究证实,热打击对机体多种细胞包括血管内皮细胞有增殖抑制作用,同时可促进其释放白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[18-19]。本研究旨在通过观察血管内皮细胞的细胞骨架和细胞周期在热打击后发生的变化,进一步探讨血管内皮细胞在中暑发生发展中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器:人脐静脉血管内皮细胞株(HUVEC)由广州军区广州总医院医学实验科创建并保存。细胞周期与凋亡检测试剂盒(武汉碧云天公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 HUVEC 细胞培养:复苏 HUVEC 细胞后注入离心管离心 10 min 弃上清,用高糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)将细胞混匀,转入 25 mL 培养瓶,37℃、5%CO₂ 浓度及饱和湿度下培养细胞,第 2 日换液后根据细胞生长情况,每 48~72 h 换液 1 次,每周传代 1~2 次。

1.3 热打击对 HUVEC 细胞骨架影响的检测:取对数生长期细胞消化后,按 5×10^3 个/片密度铺入六孔板培养玻片中培养,至单层融合后分组进行处理:对照组将细胞置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 1 h;43℃热打击组将细胞置于 43℃培养箱中培养 1 h。采用考马斯亮蓝 R-250 染色法,用蒸馏水洗涤玻片后孵箱内烘干;将细胞玻片置于载玻片上,光镜下观察。若染色效果较好,再用二甲苯处理,滴加中性树

胶、封片,制成永久切片,于高倍镜下观察并拍照。

1.4 热打击对 HUVEC 细胞周期影响的检测:取对数生长期细胞,按 1×10^4 个/皿密度铺入 60 mm×15 mm 细胞培养皿中培养,至单层融合后分组处理。对照组将细胞置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 1 h;43℃热打击组将细胞置于 43℃细胞培养箱中培养 1 h 后,继续置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育,分别于 0、6、12、18、24 h 取出并用胰酶消化细胞,加入培养液后,用移液管或枪头将所有贴壁细胞轻轻吹打下来并吹散,具体操作按细胞周期与凋亡检测试剂盒说明书进行。碘化丙啶染色后于 24 h 内在激发波长 488 nm 处用流式细胞仪检测红色荧光以及光散射情况。采用细胞周期分析软件对细胞 DNA 含量和光散射进行分析,以每个周期的细胞数占细胞数的百分比表示。

2 结果

2.1 热打击对 HUVEC 细胞骨架的影响(图 1):对照组 HUVEC 细胞骨架生长形态正常;热打击 1 h 后,高倍镜下可见 HUVEC 细胞骨架逐渐变短、变粗,并出现明显的应力纤维。

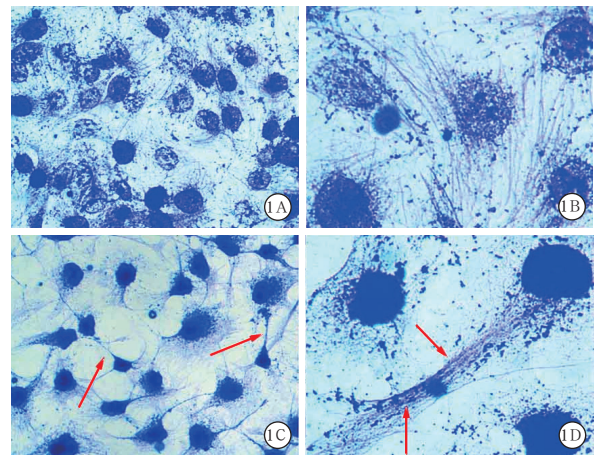


图1 光镜下观察热打击对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)细胞骨架的影响 HUVEC 细胞在 37℃下孵育 1 h,细胞骨架生长形态正常(A 为 $\times 400$, B 为 $\times 1\,000$);43℃热打击 1 h 后,细胞骨架变粗、变短,出现明显的应力纤维;箭头所示为变粗、变短的应力纤维(C 为 $\times 400$, D 为 $\times 1\,000$) 考马斯亮蓝 R-250 染色

2.2 热打击对 HUVEC 细胞周期的影响(图 2;表 1):热打击后 HUVEC 细胞的 G0/G1 期 DNA 含量为 38.07%~55.19%。当细胞离开热打击环境后 6 h 内, G0/G1 期 DNA 含量明显高于对照组, S 期和 G2/M 期 DNA 含量明显降低;12 h 时 G0/G1 期 DNA 含量恢复至对照组水平。

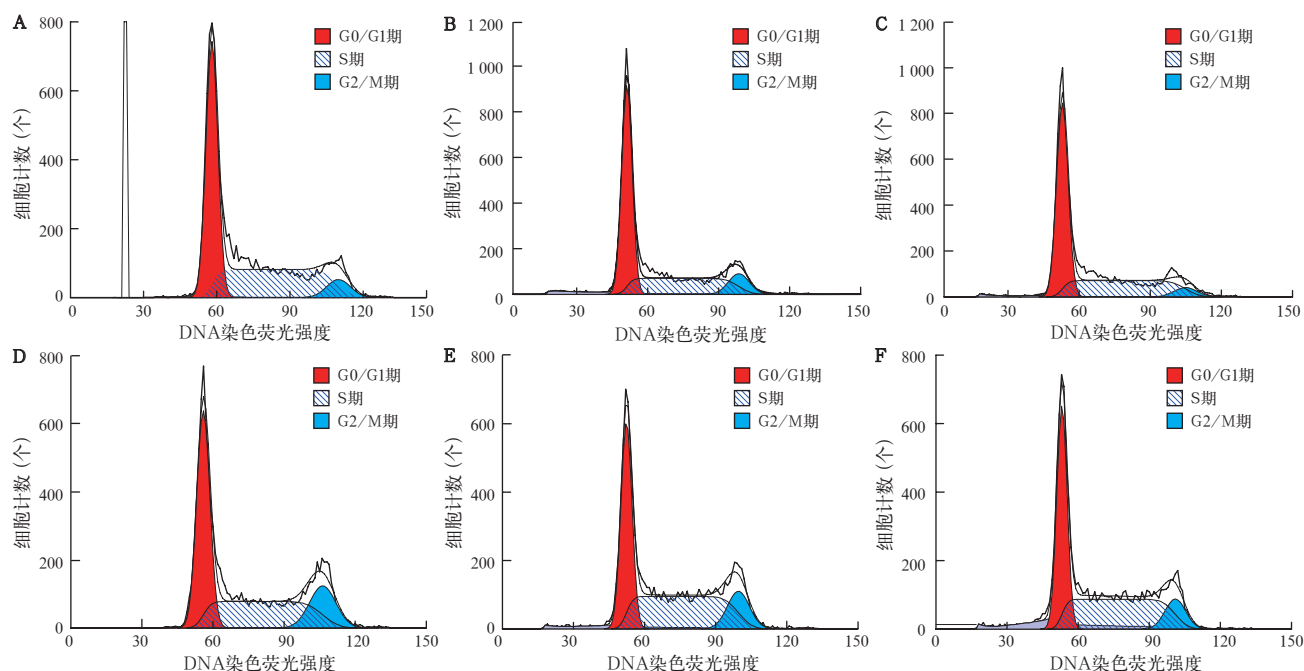


图2 流式细胞仪检测人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 在 37 °C 下孵育 1 h (A) 及热打击 1 h 后 0、6、12、18、24 h (B~F) 细胞周期的变化

表1 热打击 1 h 后不同时间点 HUVEC 细胞周期的变化

组别	细胞周期 (%)		
	G0 / G1 期	S 期	G2 / M 期
对照组	48.57	44.62	6.81
热打击后 0 h 组	54.06	35.33	10.61
热打击后 6 h 组	55.19	39.50	5.31
热打击后 12 h 组	48.23	42.50	9.27
热打击后 18 h 组	38.07	48.18	13.75
热打击后 24 h 组	41.03	47.99	10.98

注: HUVEC 为人脐静脉血管内皮细胞

3 讨论

重症中暑具有高致残率、高病死率、高花费等特点,近年来的研究和本课题组前期实验结果表明:中暑是继发于热打击后出现的伴随全身炎症反应的一种高热疾病,可导致重要器官功能损害,无论在临床表现,还是在病理生理基础上均类似于脓毒症,故称之为“类脓毒症”^[14-15,20]。“类脓毒症”可导致全身多个重要器官功能损害,与 SIRS、MODS 密切相关。我们既往研究发现,热打击可诱导包括肠上皮细胞等释放 IL-8 等炎症因子^[21],重症中暑患者一旦合并多器官功能衰竭 (MOF),病死率为 35%^[22]。

血管内皮细胞广泛存在于全身组织中,是热打击“类脓毒症”的重要反应细胞,既参与了“类脓毒症”的炎症应答,同时又是炎症损害的重要靶标^[17]。血管正常功能的维持依赖于血管内皮细胞的完整,而细胞骨架对于维持细胞正常的形态和完整性有重要意义^[23]。细胞骨架几乎参与了细胞的一切重要生

命活动,是一种与信号传递有关的主要系统^[24]。研究表明,由于细胞骨架的损害先于内皮细胞形态结构的损伤,因此细胞骨架的完整性与内皮细胞结构和功能的完整性密切相关^[25]。热打击损伤不完全由热暴露直接引起,其间接产生的炎症因子也对细胞骨架产生巨大的影响,从而促进细胞内应力纤维形成,导致细胞收缩,使间隙增大,内皮通透性增高。本研究中考马斯亮蓝 R-250 染色结果显示,随着热打击时间延长及程度加强, HUVEC 细胞骨架逐渐变短、变粗,并出现明显的应力纤维。提示热打击可改变机体 HUVEC 细胞骨架结构,最终导致 HUVEC 结构和功能出现改变。

多细胞有机体有赖于细胞增殖、分化和死亡的精密结合进行发生、发育,即细胞周期的正常运行,而在细胞周期中 G1 期是 DNA 合成前期,是决定细胞周期长短的主要阶段。细胞增殖周期中,影响细胞周期进行的控制点在于 G1 期和 S 期之间及 G2 期和 M 期之间,细胞一旦通过这些控制点,将不能阻止其进入和通过 S 期或 M 期。热打击可能正是通过影响细胞周期各环节来抑制细胞增殖的。本实验结果显示:在热打击后, HUVEC 细胞各时间点 G0/G1 期 DNA 含量为 38.07%~55.19%;当细胞离开热打击环境后 6 h 内 DNA 含量明显高于对照组,至 12 h 才恢复至对照组水平。说明在热打击后,细胞内部活动逐渐减慢,甚至处于“休眠”状态,由此,在热打击后 6 h 内, G0/G1 期细胞数显著升高, S 期

细胞数显著降低,提示细胞可能在 G0/G1 期被阻滞,使其向 S 期的过渡出现延缓,从而导致 S 期 DNA 的合成明显减少,最终使 HUVEC 的增殖受到抑制。

综上所述,血管内皮细胞在热打击后出现一系列结构和周期的改变,最终导致细胞周期阻滞甚至结构破坏,继发性血管内皮损伤和通透性增高,使机体出现弥散性血管内凝血(DIC)和毛细血管渗漏综合征,加速了脓毒症及 MOF 的发生,最终使重症中暑患者病死率增加。因此,对于热打击下血管内皮细胞病理生理变化的进一步研究,将有助于提高重症中暑的救治成功率。

参考文献

- [1] Glazer JL. Management of heatstroke and heat exhaustion [J]. Am Fam Physician, 2005, 71 (11): 2133-2140.
- [2] Carter R 3rd, Chevront SN, Williams JO, et al. Epidemiology of hospitalizations and deaths from heat illness in soldiers [J]. Med Sci Sports Exerc, 2005, 37 (8): 1338-1344.
- [3] 刘志锋,唐柚青,徐秋林,等. 热打击后小鼠肺和脑组织病理学的改变[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20 (6): 623-626.
- [4] 袁芳芳,苏磊,刘志锋,等. 热打击对培养肠黏膜上皮细胞 IEC-6 细胞活性和增殖的影响[J]. 感染、炎症、修复, 2012, 13 (2): 70-73.
- [5] 刘志锋,曾平,刘亚伟,等. 脂多糖和热打击联合作用对人肠上皮细胞骨架的影响[J]. 广东医学, 2010, 31 (18): 2346-2348.
- [6] 唐丽群,袁芳芳,刘亚伟,等. 热打击联合脂多糖刺激对人肠上皮细胞 SW480 释放细胞因子的影响[J]. 感染、炎症、修复, 2012, 13 (1): 6-9.
- [7] 殷宗宝,计超,向群,等. 血必净注射液对中暑大鼠血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (5): 360-363.
- [8] 李莉,刘志锋,古正涛,等. 重症中暑中枢神经系统病变机制的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (9): 570-572.
- [9] 肖桂珍,苏磊. 中暑时肠黏膜机械屏障功能的变化[J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24 (9): 568-570.
- [10] 刘志锋,唐柚青,孟繁魁,等. 中暑小鼠多器官横纹肌病理形态学改变的研究[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20 (12): 755-757.
- [11] 苏磊,孟繁魁,刘志锋,等. 重症中暑合并横纹肌溶解综合征患者 3 种炎症介质的初步分析[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20 (11): 699-700.
- [12] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke [J]. N Engl J Med, 2002, 346 (25): 1978-1988.
- [13] Liu Z1, Sun X, Tang J, et al. Intestinal inflammation and tissue injury in response to heat stress and cooling treatment in mice [J]. Mol Med Rep, 2011, 4 (3): 437-443.
- [14] Leon LR, Blaha MD, DuBose DA. Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery [J]. J Appl Physiol, 2006, 100 (4): 1400-1409.
- [15] 苏磊. 重症中暑防治回顾与启示[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36 (9): 883-885.
- [16] 潘志国. 重症中暑横纹肌溶解发病及机制研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
- [17] Roberts GT, Ghebeh H, Chishti MA, et al. Microvascular injury, thrombosis, inflammation, and apoptosis in the pathogenesis of heatstroke: a study in baboon model [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28 (6): 1130-1136.
- [18] 潘志国,耿焱,张剑明,等. 热刺激对体外培养的血管内皮细胞损伤及 IL-6、TNF- α 释放的影响[J]. 山东医药, 2012, 52 (3): 32-35.
- [19] 潘志国,耿焱,刘灏,等. 热打击对培养人骨骼肌细胞的损伤和释放 IL-6、TNF- α 的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28 (9): 1405-1407.
- [20] 潘志国,耿焱,刘云松,等. 重症中暑患者 CD14 单核细胞 HLA-DR 表达的意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28 (10): 1635-1637.
- [21] 刘志锋,唐丽群,曾平,等. 乌司他丁对热打击诱导人肠上皮细胞释放白细胞介素-8 与 p38 信号通路的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (2): 83-86.
- [22] 苏磊,郭振辉,钱洪津. 重症中暑住院病人流行病学调查与分析[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31 (9): 909-910.
- [23] Lee JS, Gottlieb AI. Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair [J]. Histol Histopathol, 2003, 18 (3): 879-887.
- [24] 张永伟,刘卓,左瑾,等. 细胞骨架与血糖调节[J]. 生命科学, 2005, 17 (2): 159-164.
- [25] Yu PK, Yu DY, Cringle SJ, et al. Endothelial F-actin cytoskeleton in the retinal vasculature of normal and diabetic rats [J]. Curr Eye Res, 2005, 30 (4): 279-290.

(收稿日期: 2015-01-07)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

血浆肠脂肪酸结合蛋白和二胺氧化酶与热休克患者疾病严重程度的相关性

国内学者进行了一项研究,探讨血浆肠脂肪酸结合蛋白(iFABP)和二胺氧化酶(DAO)在热休克患者中的作用。该研究纳入住重症加强治疗病房(ICU)的严重热休克患者和健康志愿者各 10 例。入组时分别测定其血浆 iFABP 和 DAO 含量,并留取全血测定内毒素水平,分析 iFABP、DAO 与内毒素水平的相关性;同时还测定了患者的白细胞计数(WBC)、血清降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)以及促炎因子白细胞介素(IL-1 α 、IL-6)等水平。结果显示:与健康对照者相比,热休克患者 iFABP 和 DAO 水平均显著升高(均 $P < 0.05$);动力学曲线表明,热休克患者 iFABP 和 DAO 水平分别在纳入后第 3 天和第 4 天达到峰值。经治疗后,患者 iFABP、DAO 水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。内毒素水平与 iFABP、DAO 水平呈正相关。研究者还观察到,热休克患者血清 PCT、CRP、IL-1、IL-6 等水平显著升高,但 WBC 并未升高。该研究者得出结论: iFABP 及 DAO 水平能很好地反映中暑热休克患者肠黏膜屏障功能,治疗后 iFABP 和 DAO 水平明显下降,因此可能是热休克患者病情严重程度的预测因子。

喻文,罗红敏,编译自《Am J Emerg Med》,2015,33 (7): 867-871