



## 烧伤血清和痂下水肿液对内皮细胞凋亡和坏死的影响

血管内皮细胞衬覆于血管内壁，构成血管通透性的主要屏障，能合成和分泌调节血管舒张和凝血—纤溶系统等的多种因子，并在血管形成、创伤愈合和炎症反应中起重要作用[1]。血管内皮细胞损伤是烧伤后脏器损害发生的病理基础[2]，既往研究表明烧伤血清和痂下水肿液可损伤内皮细胞[3]。本研究观察了烧伤血清和痂下水肿液诱导下的内皮细胞凋亡和坏死情况。

### 1 材料和方法

#### 1.1 烧伤血清和烧伤痂下水肿液(STF)的制备

10例本院收治的严重烧伤病人，男性7名，女性3名，年龄(24.7±6.7)岁，烧伤总面积占体表总面积(TBSA)的(42.8±11.5)%，其中III度烧伤面积均超过20% TBSA。每例病人均在烧伤后3~4 d 切痂前取外周静脉血5 ml并分离血清，手术中用无菌注射器收集STF，以8例健康成人外周静脉血血清为对照。STF和血清按20%比例与M199培养液混合，分别刺激内皮细胞。

#### 1.2 内皮细胞培养

常规方法复苏ECU304内皮细胞株，接种于细胞培养板中，当细胞生长达亚融合时弃培养液，加入无血清培养液RPMI 1640 培养24 h，再弃去培养液。将血清分为正常血清组、烧伤血清组、STF组，在各组培养板中加入血清或STF，继续培养12和24 h后分别收集细胞，用70% 乙醇固定。

#### 1.3 流式细胞仪检测

采用Annexin-V-Fluos 和PI 双标法流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死百分率。步骤如下：收集血清和STF刺激后的内皮细胞，调整细胞密度为 $10^6$  个/ml，PBS液冲洗， $200\times g$ 离心5 min，加入预先配制好的双标液100  $\mu$ l(1 ml HEPES 缓冲液+20  $\mu$ l A-V+20  $\mu$ l PI，购自德国宝灵曼公司)，室温孵育10~15 min，上机检测。

#### 1.4 统计处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间数据比较采用两样本均数t检验。

### 2 结果

烧伤血清和STF刺激体外培养的人脐静脉内皮细胞12 h后，内皮细胞凋亡和坏死百分率均明显增多，尤以STF诱导更明显，24 h后内皮细胞凋亡和坏死百分率进一步上升(表1、2)。

表 1 烧伤血清或痂下水肿液刺激内皮细胞 12 h 后细胞凋亡和坏死的百分率(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Percentage of apoptotic and necrotic endothelial cells after incubated with burn serum or STF for 12 h (% , *Mean ± SD*)

Group	Apoptosis	Necrosis
Normal serum	1.7±0.5	1.1±0.4
Burn serum	9.4±1.6*	2.6±0.5*
STF	13.8±2.7* <sup>△</sup>	3.1±0.8* <sup>△</sup>

STF: Subeschar tissue fluid; \* $P < 0.01$  vs normal serum group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs burn serum group

表 2 烧伤血清或痂下水肿液刺激内皮细胞 24 h 后细胞凋亡和坏死的百分率(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Percentage of apoptotic and necrotic endothelial cells after incubated with burn serum or STF for 24 h (% , *Mean ± SD*)

Group	Apoptosis	Necrosis
Normal serum	2.1±0.6	1.8±0.7
Burn serum	15.3±3.8*	7.3±0.9*
STF	21.5±5.6* <sup>△</sup>	13.2±4.1* <sup>△</sup>

\* $P < 0.01$  vs normal serum group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs burn serum group

### 3 讨论

血管内皮细胞并不仅仅是被动的靶细胞,其本身具有屏障和分泌等功能,在严重烧伤后脏器损伤中起重要作用。严重烧伤后损伤内皮细胞的因素众多,但大多数为循环血液中异常增多的物质(如内毒素、 $TNF\alpha$ 等)。既往研究[3]表明烧伤血清和痂下水肿液均可导致内皮细胞形态、功能和通透屏障的变化,本实验进一步发现烧伤血清和痂下水肿液不但可诱导内皮细胞坏死,也可导致内皮细胞凋亡,而且凋亡百分率高于坏死百分率,提示烧伤血清和STF损伤内皮细胞,部分可能是以细胞凋亡的方式进行。有研究表明内毒素所致的血管内皮细胞损伤是以细胞凋亡形式出现的,大鼠被注入内毒素或 $TNF-\alpha$ 后6 h,肠、肺等脏器在非内皮细胞组织损伤前即出现内皮细胞凋亡,内皮细胞凋亡在内毒素休克发病中起重要作用[4]。由于血管内皮细胞不属于快速自我更新的细胞群体,内皮细胞凋亡后降低了内皮细胞储备[5],造成血管管腔表面内皮细胞丢失,其屏障及分泌功能也受影响,从而加重组织微循环障碍,导致组织缺血缺氧。虽然烧伤血清和痂下水肿液可诱导体外培养内皮细胞凋亡和坏死,但内皮细胞凋亡在机体烧伤后内皮致细胞和脏器损伤中的机制尚有待进一步研究。

烧伤痂下水肿液诱导内皮细胞坏死和凋亡作用较烧伤血清强,可能与痂下水肿液中内毒素、 $TNF\alpha$ 等含量较高有关。因烧伤血清和烧伤痂下水肿液可诱导内皮细胞凋亡和坏死,临床上我们应尽早切痂,切除坏死烧伤组织同时引流痂下水肿液,并可用血液交换、滤过等手段,减轻烧伤血清和痂下水肿对内皮细胞的损伤。

#### 参考文献:

- [1] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium [J]. N Engl J Med, 1990, 323:27-36.
- [2] 杨宗城. 烧伤早期脏器损害发病机制的探讨[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23:84-7.

[3] 李志清, 任加良, 周一平, 等. 烧伤痂下水肿液对内皮细胞单层通透性的影响[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15:357-9.

[4] Haimovitz FA, Cordon CC, Bayoumy S, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation[J]. J Exp Med, 1997, 186:1831-41.

[5] Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, et al. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- $\alpha$  in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin[J]. Blood, 1995, 85:4184-93.

#### 参考文献:

[1] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium [J]. N Engl J Med, 1990, 323:27-36.

[2] 杨宗城. 烧伤早期脏器损害发病机制的探讨[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23:84-7.

[3] 李志清, 任加良, 周一平, 等. 烧伤痂下水肿液对内皮细胞单层通透性的影响[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15:357-9.

[4] Haimovitz FA, Cordon CC, Bayoumy S, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation[J]. J Exp Med, 1997, 186:1831-41.

[5] Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, et al. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- $\alpha$  in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin[J]. Blood, 1995, 85:4184-93.