

[文章编号] 1000-4718(2008)10-2051-04

休克淋巴液对肠系膜微淋巴管内皮细胞炎症介质表达的影响*

赵自刚, 牛春雨[△], 陈瑞华, 侯亚利, 张玉平, 张静
(河北北方学院病理生理教研室, 河北 张家口 075029)

[摘要] 目的: 观察休克淋巴液对大鼠肠系膜微淋巴管内皮细胞(MMLEC)诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)表达的影响,探讨休克淋巴液损伤MMLEC的机制。方法:正常大鼠MMLEC原代培养,应用第三代MMLEC进行研究。无菌条件下复制大鼠重症失血性休克模型(血压40 mmHg,维持90 min),引流休克时肠淋巴液及门静脉血,并以正常肠淋巴液、门静脉血作为对照。以4%终浓度的休克淋巴液作用MMLEC 6 h,以休克血浆、正常淋巴液、正常血浆、胎牛血清(FBS)、DMEM培养液作为对照。提取MMLEC的cDNA,RT-PCR检测iNOS、TNF- α 及IL-6 mRNA的表达;同时检测培养上清液MDA、NO、TNF- α 及IL-6含量的变化。结果:4%终浓度的休克淋巴液作用6 h后,MMLEC的iNOS、TNF- α 、IL-6 mRNA表达以及培养上清液MDA、NO、TNF- α 和IL-6水平显著高于正常淋巴液组、休克血浆组、正常血浆组、FBS组以及DMEM组;且休克血浆作用MMLEC 6 h后的iNOS、TNF- α 、IL-6 mRNA表达以及培养上清液的MDA、NO、TNF- α 及IL-6水平显著高于正常淋巴液组、正常血浆组、FBS组以及DMEM组。结论:休克淋巴液可使大鼠MMLEC的iNOS、TNF- α 及IL-6 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;肠系膜微淋巴管内皮细胞;炎症介导素类;基因表达

[KEY WORDS] Shock; Lymph; Mesentery micro-lymphatic endothelial cells; Inflammatory mediators; Gene expression

[中图分类号] R363; R364.1⁺4 **[文献标识码]** A

研究表明,淋巴微循环与休克的发生、发展及转归关系密切,淋巴微循环障碍是促进休克恶化的重要因素^[1]。肠系膜微淋巴管内皮细胞(mesentery micro-lymphatic endothelial cells, MMLEC)是微淋巴管的主要结构,对于淋巴微循环的功能具有重要作用。然而,对MMLEC与淋巴微循环以及与休克恶化之间的相互关系,国内外研究较少。本研究在发现休克淋巴液可导致MMLEC损伤^[2]的基础上,进一步观察肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)以及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达,探讨休克淋巴液损伤MMLEC的作用机制。

材 料 和 方 法

1 大鼠 MMLEC 的原代培养

体重50-80 g的健康Wistar雄性大鼠(中国医学科学院动物繁殖中心),消毒麻醉后腹部手术,轻轻拉开十二指肠下端的肠襻,在1.5 \times 10倍手术显微镜下找到肠襻上的肠系膜微淋巴管,用血管钩卷起微淋巴管,按我室改良的植块培养

方法进行大鼠MMLEC的原代培养^[2],传至第三代后,用于实验研究。

2 休克淋巴液及血浆的收集

体重220-300 g的健康Wistar雄性大鼠(中国医学科学院动物繁殖中心),肌肉注射2%的戊巴比妥钠(50 mg/kg)全身麻醉,以Lamson法自颈总动脉放血至血压40 mmHg,维持90 min,复制重症失血性休克模型^[3]。维持低血压后,以微量注射泵回输放出之血液及林格氏液(为全血量),时间 \geq 20 min。在维持低血压期间,行腹部手术,引流肠系膜淋巴液^[4],引流时间为3 h,引流量为0.5-1.5 mL左右。离心取上清液,备孵育MMLEC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,于休克复苏后1 h抽取门静脉血,离心制备门静脉血浆。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。

3 实验分组

分别将含休克淋巴液、休克血浆、正常淋巴液和正常血浆与DMEM培养液混合作为培养基,使不同处理因素的终浓度调至4%。同时设10%胎牛血清(FBS)及空白对照,与第三代MMLEC共同孵育。实验分为6组:A组(10% FBS);培

[收稿日期] 2007-02-16 [修回日期] 2008-05-29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370561; No. 30770845);河北省自然科学基金资助项目(No. C2004000649; No. C2008000503)

[△]通讯作者 Tel:0313-8045195; E-mail:ncylxf@126.com

培养液为 DMEM + FBS; B 组(正常淋巴液组):培养液为 DMEM + 正常淋巴液; C 组(休克淋巴液组):培养液为 DMEM + 休克淋巴液; D 组(正常血浆组):培养液为 DMEM + 正常血浆; E 组(休克血浆组):培养液为 DMEM + 休克血浆; F 组(无血清对照组):培养液为 DMEM。

4 标本留取

4% 终浓度的休克淋巴液、正常淋巴液、正常血浆、休克血浆与 MMLEC 共同孵育 6 h 后,分离培养上清液,置 -20 °C 冰箱保存。同时,将共同孵育 6 h 后的 MMLEC,经胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,Trizol 一步法提取 RNA,逆转录:反应体积为 40 μL,包括标本 RNA 2 μg、随机引物 100 ng、5 × 逆转录 buffer 8 μL、10 nmol/L dNTP 1.25 μL、RNasin 25 U(MBI)、逆转录酶 200 U(Promega)。70 °C 5 min,37 °C 60 min,95 °C 5 min,将逆转录出的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱。

5 培养上清液检测

严格按照试剂盒说明书要求,应用改良硫代巴比妥酸(TBA)微量法测定 MDA 浓度、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);ELISA 法测定 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);上清液蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

6 iNOS、TNF-α、IL-6 mRNA 表达

用 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。iNOS 引物:上游 5'-TCC CGA AAC GCT ACA CTT-3';下游 5'-GGT CTG GCG AAG AAC AAT C-3',扩增

片段长度 315 bp。TNF-α 引物:上游 5'-ACA GAA AGC ATG ATC CGC-3';下游 5'-CTA GAC CTG CCC GGA CTC-3',扩增片段长度 692 bp。IL-6 引物:上游 5'-GCC ACT GCC TTC CCT ACT TC-3';下游 5'-TTG GTC CTT AGC CAC TCC TT-3',扩增片段长度 500 bp。β-actin 引物:上游 5'-TTG TAA CCA ACT GGA CGA TAT GG-3';下游 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3',扩增片段长度 764 bp。将逆转录出的 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 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,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,计算待测基因与 β-actin 的相对比值表示待测基因的表达强度。

7 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。SPSS 11.0 版统计软件程序对每组数据进行 t 检验和单因素方差分析。

结 果

1 休克淋巴液对 MMLEC 培养上清液 MDA、NO、TNF-α、IL-6 水平的影响

MMLEC 与 4% 终浓度的休克淋巴液共同孵育 6 h 后,休克淋巴液组培养上清液 MDA、NO₂⁻/NO₃⁻、TNF-α、IL-6 水平高于正常淋巴液组、休克血浆组、正常血浆组、FBS 组以及 DMEM 组 ($P < 0.01, P < 0.05$);休克血浆作用 MMLEC 6 h 后培养上清液 MDA、NO₂⁻/NO₃⁻、IL-6 水平高于正常淋巴液组、正常血浆组、FBS 组以及 DMEM 组 ($P < 0.01, P < 0.05$),见表 1。

表 1 休克淋巴液对 MMLEC 培养上清液中体液因子的影响

Tab 1 Effects of shock lymph on humoral factors in the supernatant fluid of MMLEC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	MDA (μmol/g protein)	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μmol/g protein)	TNF-α (μg/g protein)	IL-6 (μg/g protein)
FBS (A)	0.781 ± 0.204	35.67 ± 9.45	1.145 ± 0.404	2.51 ± 0.74
Normal lymph (B)	0.881 ± 0.191	33.28 ± 8.17	1.081 ± 0.417	2.88 ± 0.79
Shock lymph (C)	1.642 ± 0.267**△△	79.82 ± 15.63**△△	1.916 ± 0.509**△	7.65 ± 1.12**△△
Normal plasma (D)	0.775 ± 0.216	31.22 ± 7.54	0.952 ± 0.412	3.01 ± 0.96
Shock plasma (E)	1.151 ± 0.263*	52.64 ± 10.25**	1.256 ± 0.479	4.56 ± 0.88*
DMEM (F)	0.846 ± 0.249	36.66 ± 8.16	0.988 ± 0.394	3.10 ± 0.81

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A, B, D, F group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs E group.

2 休克淋巴液对 MMLEC iNOS mRNA 表达的影响

MMLEC 与 4% 终浓度的休克淋巴液共同孵育 6 h 后,休克淋巴液组 iNOS mRNA 表达水平高于正常淋巴液组、休克血浆组、正常血浆组、FBS 组以及 DMEM 组 ($P < 0.01$),休克血浆作用 MMLEC 6 h 后 iNOS mRNA 表达水平显著高于正常淋巴液组、正常血浆组、FBS 组以及 DMEM 组 ($P < 0.01$);其它组间无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1。

3 休克淋巴液对 MMLEC TNF-α mRNA 表达的影响

休克淋巴液作用组 TNF-α mRNA 表达显著高于其它各组 ($P < 0.01$),且休克血浆作用 MMLEC 6 h 后 TNF-α

mRNA 的表达水平高于正常淋巴液组、正常血浆组、FBS 组以及 DMEM 组 ($P < 0.01$);其它组间无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 2。

4 休克淋巴液对 MMLEC IL-6 mRNA 表达的影响

MMLEC 与 4% 终浓度的休克淋巴液共同孵育 6 h 后,休克淋巴液作用组 IL-6 mRNA 的表达显著高于其它各组 ($P < 0.01$),休克血浆作用组 IL-6 mRNA 的表达水平也高于正常淋巴液组、正常血浆组、FBS 组及 DMEM 组 ($P < 0.01$),见图 3。

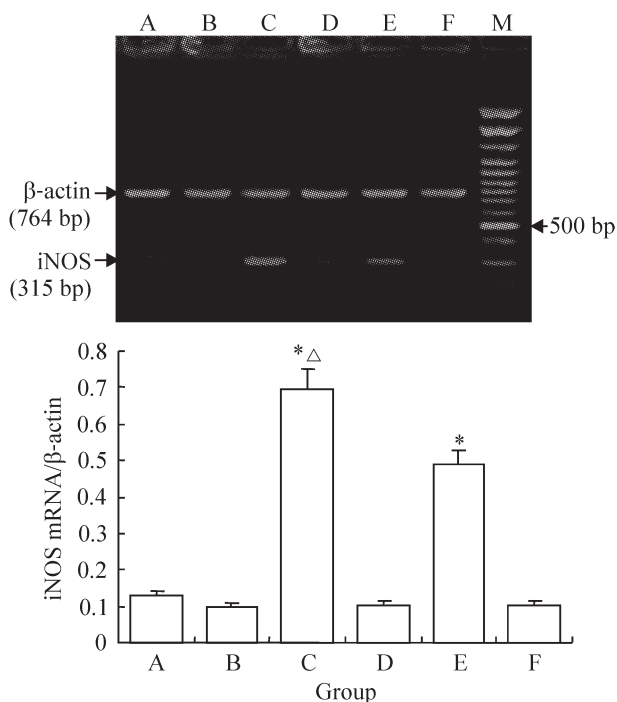


Fig 1 Effect of different treatment factors on iNOS mRNA expression of MMLEC. A: FBS; B: normal lymph; C: shock lymph; D: normal plasma; E: normal plasma; F: DMEM without serum; M: DNA marker. * $P < 0.01$ vs A, B, D, F group; $\Delta P < 0.01$ vs E group.

图1 不同处理条件下 MMLEC iNOS mRNA 表达

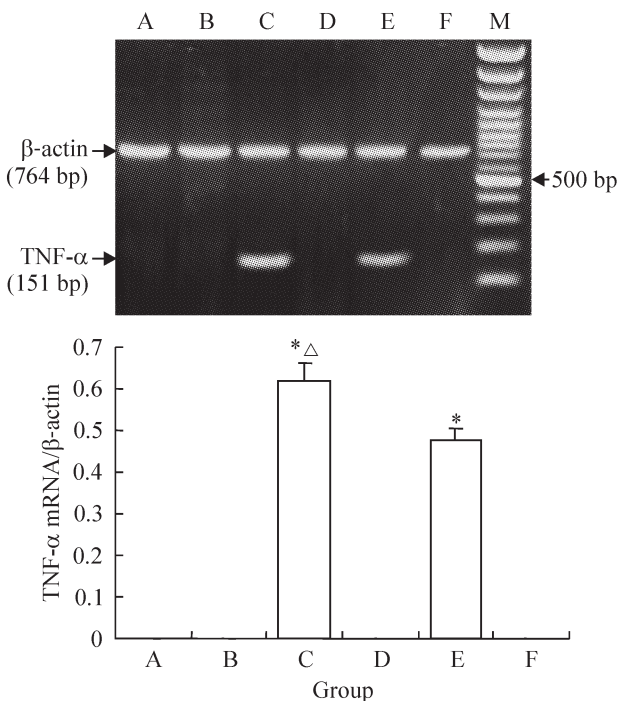


Fig 2 Effect of different treatment factors on TNF-α mRNA expression of MMLEC. A: FBS; B: normal lymph; C: shock lymph; D: normal plasma; E: normal plasma; F: DMEM without serum; M: DNA marker. * $P < 0.01$ vs A, B, D, F group; $\Delta P < 0.01$ vs E group.

图2 不同处理条件下 MMLEC TNF-α mRNA 表达

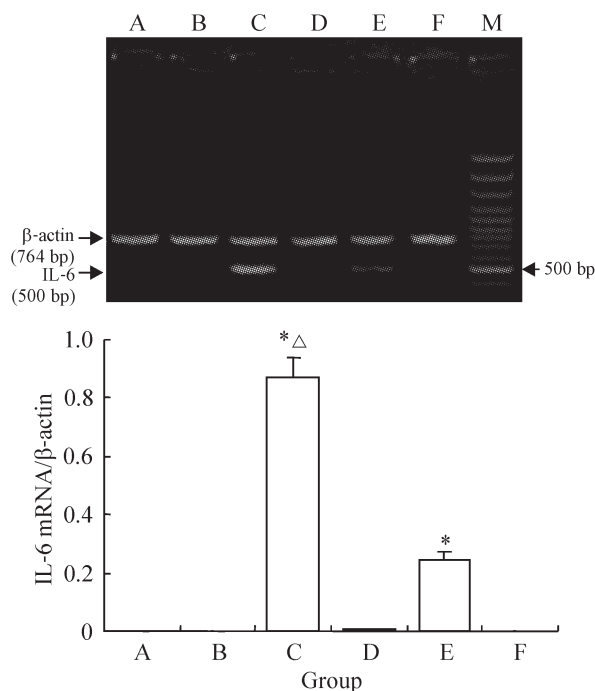


Fig 3 Effect of different treatment factors on IL-6 mRNA expression of MMLEC. A: FBS; B: normal lymph; C: shock lymph; D: normal plasma; E: normal plasma; F: DMEM without serum; M: DNA marker. * $P < 0.01$ vs A, B, D, F group; $\Delta P < 0.01$ vs E group.

图3 不同处理条件下 MMLEC IL-6 mRNA 表达

讨 论

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,膜稳定性还受氧化应激、炎症介质以及毒性物质的直接损伤等多方面的影响,进而使细胞的代谢停止、功能完全丧失,并出现不可逆的形态学改变。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,可诱导其它细胞因子产生和释放,造成机体损伤的同时,可通过再激活炎症效应细胞,释放更多的炎症因子,使炎症信号进一步放大和加强,产生“级联放大”作用^[5]。IL-6 也是炎症反应的重要启动因子之一,能够诱导 B 细胞分化,分泌免疫球蛋白。同样,大量的 NO 释放可加重细胞的炎症反应,过量的 NO 可致组织细胞损伤,降低 NO 含量可减轻组织器官损伤^[6]。

为了深入探讨肠淋巴途径在休克发病学中的作用及休克淋巴液引起淋巴微循环障碍的细胞分子机制,以作为淋巴微循环障碍重要靶标的 MMLEC 为观测点,观察了休克后肠系膜淋巴液对体外培养的 MMLEC 某些体液因子及炎症介质表达的影响。研究发现,终浓度为 4% 的休克淋巴液作用于大鼠 MMLEC 6h 后, TNF-α、IL-6、iNOS mRNA 表达显著高于其它各组,培养上清液中 NO、TNF-α、IL-6 的水平显著升高;提示休克淋巴液损伤 MMLEC 的机制与炎症介质的高

现其对细胞凋亡的调控作用, survivin 与 caspase-3 特异性结合使其在细胞内失活;同时 survivin 也能阻止 caspase-3 的自发激活,从而抑制细胞凋亡^[9]。在促进细胞分裂增殖中, survivin 通过与细胞周期依赖性激酶 CDK₄ 结合,使 CDK₄/P₂₁ 复合物中的 P₂₁ 释放并与线粒体的 caspase 相互作用而抑制 Fas 介导的细胞凋亡;survivin 与 CDK₄ 结合后还可促使 P₂₇ 脱离 CDK₂/cyclinE 复合体,诱导 Rb 磷酸化并启动细胞周期,促进细胞分裂增殖^[10]。随着 survivin 的过表达及 caspase-3 表达的下调,两者相互调节,共同发挥抑制细胞凋亡及促进细胞增殖的作用,从而促使子宫肌肉组织的凋亡障碍,而肌肉细胞增殖失控,最终导致子宫肌瘤的发生。

[参 考 文 献]

- [1] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[Ⅲ][J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1995,4(1):89-92.
- [2] 李静岩. Caspase-3 与肿瘤关系的研究[J]. 医学综述,2005,11(5):430-432.
- [3] 徐玉生,苗金红,王利民,等. TRA1L 和顺铂对横纹肌肉瘤细胞凋亡时 caspase-3 活性和线粒体膜电位的影响[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(1):142-145.
- [4] 任文霞,弓清梅,赵 鹰,等. 胆红素对大鼠急性肺损伤形成过程中氧自由基以及 caspase-3 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(2):293-296.
- [5] Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis [J]. Eur Biochem, 2003,252(1):1-15.
- [6] Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, et al. C-jun and CPP32(caspase-3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death [J]. Pancreas, 2003, 26(1):65-72.
- [7] Chakravarti A, Noll E, Black PM, et al. Quantitatively determined surviving expression levels are of prognostic value in human gliomas[J]. J Clin Oncol, 2002,20(4):1063-1068.
- [8] Vollboher D, Peter JH, Oh D, et al. Survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma [J]. Surgery,2005,138(4):701-707.
- [9] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7[J]. Biochemistry,2001,40(4):1117-1123.
- [10] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase 3/P21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas-mediated cell death [J]. Oncogene,2000,19(10):1346-1353.

(上接第 2053 页)

表达与释放有关。其原因一方面可能为休克淋巴液含有大量的毒性物质,而这些毒素对 MMLEC 有直接的损伤作用,刺激 MMLEC iNOS、TNF- α 、IL-6 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;另一方面可能为休克淋巴液中含有大量的 TNF- α 、IL-6 等促炎介质^[7,8],直接引起细胞的炎症反应加剧,导致细胞损伤。研究表明,未稀释的休克淋巴液 TNF- α 、IL-6 水平仅为 $(0.174 \pm 0.023) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.395 \pm 0.077) \mu\text{g/L}$ ^[8],这也证明了培养上清液中炎症介质并非完全来源于休克淋巴液,而是引起炎症反应加剧的结果。

氧化应激所引起的氧自由基损伤在细胞损伤过程中起重要作用,研究结果显示,终浓度为 4% 的休克淋巴液作用于大鼠 MMLEC 6 h 后,培养上清液中 MDA 浓度显著高于休克血浆、正常淋巴液、正常血浆等对照组;结果表明,休克淋巴液促进了 MMLEC 的氧化应激,加速了 MMLEC 的自由基损伤。过量的氧自由基可激活补体,刺激内皮细胞释放细胞因子及大量的炎症介质生成,炎症介质又进一步加剧细胞损伤。

研究结果提示,重症休克时肠系膜淋巴液回流加重了 MMLEC 损伤,这是休克时淋巴微循环障碍发生的重要结构基础,是促进淋巴微循环障碍致休克恶化的主要因素,也是促进肠系膜微淋巴管通透性升高的重要原因;而微淋巴管通透性的增高又加重了毒性物质的吸收和回流,成为内毒素等大分子物质通过肠系膜淋巴管导致肠淋巴途径移位、促进多器官损伤、加速休克恶化的发病学基础。研究结果表明肠淋巴途径在休克的发病学中具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] 张 静,刘艳凯,姜 华,等. 肠淋巴液对大鼠血压的影响[J]. 生理学报,1997,49(4):433-438.
- [2] 陈瑞华,侯亚利,牛春雨,等. 构建肠系膜微淋巴管内皮细胞培养技术并观察休克淋巴液环境中内皮细胞的形态变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(27):5424-5428.
- [3] 赵自刚,牛春雨,张 静,等. 肠系膜淋巴管结扎对休克大鼠肾功能不全的干预机制[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(4):743-748.
- [4] 牛春雨,赵自刚,陈瑞华,等. 休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(2):294-297.
- [5] Bone RC. Sirisaac newton, sepsis, SIRS and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7):1125-1128.
- [6] Niu CY, Li JC, Zhao ZG, et al. Effect of intestinal lymphatic circulation blockage in two-hit rats[J]. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(36):5805-5812.
- [7] 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 [J]. Shock, 2004, 22(3):221-228.
- [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[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(5):266-269.