

烧伤大鼠血清对血管内皮细胞通透性的影响

段声梁¹, 胡子健², 孟承颖¹, 黄海良³, 蒋智永¹, 蒋薇¹, 王欢¹, 余又新¹, 孙业祥¹, 方林森¹, 胡德林¹

摘要 目的 探讨烧伤大鼠血清对血管内皮细胞(EC)通透性的影响及作用机制。方法 将原代培养的大鼠主动脉EC根据是否应用烧伤血清干预分为正常组和血清干预组,血清干预组应用烧伤12 h大鼠血清干预大鼠主动脉内皮细胞24 h,应用细胞通透性实验检测单层细胞膜通透性变化,实时荧光定量PCR(RT-PCR)和Western blot分别检测细胞通透性相关基因内皮素-1(ET-1)、内皮因子受体A(ETA)、ETB和带状闭合蛋白1(ZO-1)的mRNA和蛋白表达的变化。结果 与正常组相比,烧伤大鼠血清干预组EC通透性系数明显升高($P < 0.01$),血清干预组ET-1、ETA和ETB的mRNA和蛋白表达均显著升高($P < 0.01$),ZO-1的mRNA和蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。结论 烧伤大鼠血清可引起血管EC通透性的增加,通透性增加可能与ET-1、ET-A、ET-B表达升高和ZO-1表达降低有关。

关键词 烧伤; 内皮细胞; 血管通透性; ET-1; ZO-1

中图分类号 R 644

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0930-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.019

血管通透性增加是导致体液渗出、组织水肿、机体酸碱失衡和休克发生的重要因素,如何降低烧伤早期血管通透性、减少体液丢失对于预防烧伤早期组织器官损害均有重要意义。然而,烧伤后血管内皮细胞(endothelial cells, EC)通透性变化的机制及调控途径目前尚不明。该实验通过烧伤大鼠血清干预血管EC,分别检测EC通透性变化及细胞通透性相关基因内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、内皮因子受体A(endothelin receptor A, ETA)、ETB和带状闭

合蛋白1(zona occluden-1, ZO-1)的mRNA和蛋白表达变化,探讨烧伤大鼠血清对血管EC通透性的影响,为深入研究烧伤早期血管通透性改变的机制及为烧伤的临床治疗提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级雄性SD大鼠,体质量150~180 g,共20只,每组10只,正常饮食水,饲养1周,环境温度在22~25℃,相对湿度60%~70%,购自安徽医科大学实验动物中心;RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;实时荧光定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)反应试剂盒购自大连宝生物公司;ET-1、ETA、ETB和ZO-1抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠烧伤模型复制及血清留取 雄性SD大鼠,体质量150~180 g,适应性喂养7 d。参照人与动物烧伤面积换算公式,以人体烧伤面积30%Ⅲ度烧伤为标准,应用沸水烫伤法复制大鼠烧伤12 h模型。腹主动脉取血后留取血清,以备后续实验所需。

1.2.2 实验分组 将原代培养的大鼠主动脉EC根据是否应用烧伤血清干预分为正常组和血清干预组,正常组仅为原代培养的大鼠主动脉EC,血清干预组为应用烧伤12 h大鼠血清干预大鼠原代主动脉内皮细胞24 h。

1.2.3 细胞培养 应用含10%胎牛血清的培养基于37℃、5% CO₂培养箱中培养原代大鼠主动脉EC,隔天换液、观察细胞生长状况,当细胞汇合度约为90%时,进行消化、传代、种板,按 1×10^5 /孔接种于6孔细胞培养板。继续培养细胞至汇合度为80%时,将培养基更换为无血清RPMI1640培养基,进行后续实验。

1.2.4 单层细胞通透性系数检测 将大鼠主动脉EC按 1×10^5 /孔接种于24孔Transwell小室,37℃、5% CO₂培养8 h待其形成细胞单层。正常组按常规进行换液,血清干预组加入烧伤12 h大鼠血清,继续培养24 h。双层小室的顶室加入FITC-albu-

2019-03-04 接收

基金项目: 2015年度第二批安徽省自然科学基金项目(编号: 1508085SMH231);安徽省2018年度重点研究与开发计划项目(编号: 1804h08020230)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院烧伤科,合肥 230022

²安徽医科大学第一临床医学院2018级临床医学,合肥 230022

³安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230022

作者简介: 段声梁,男,硕士研究生;

胡德林,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: hdl0522@163.com

min, 底室加入 D-Hank's 液, 37 °C、5% CO₂ 孵育 45 min, 吸取双层小室的顶室和底室液体, 在荧光分光光度计测定各样品荧光强度, 计算单层细胞通透性系数。

1.2.5 RT-PCR 应用预冷的 PBS 洗涤细胞 2~3 次, 参照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板, 参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板, 使用 ABI7500 RT-PCR 仪检测相关基因的表达。RT-PCR 反应程序为: 95 °C、5 s; 60 °C、34 s, 设置循环数为 40。以 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较分析各基因表达, PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
β -actin	F: CCCGCGAGTACAACCTTCTTG	71
	R: GTCATCCATGGCGAACTGGTG	
ET-1	F: CGTTGCTCTGCTCCTCC	163
	R: GGTCTGTGGTCTTTGTGGG	
ETA	F: ACTGGTGGCTCTTTGGATT	137
	R: ACGCTGCTTGAGGTGTTTCG	
ETB	F: GATGATGCCTAGCACGAACA	211
	R: GACGCCACCCACTAAGACC	
ZO-1	F: TCCAGTCCCTTACCTTTTCGC	202
	R: CGGCAATGACACTCCTTCG	

1.2.6 Western blot 应用 RIPA 细胞裂解液(强)提取细胞总蛋白, 按 30 μ g/孔的标准加样、电泳。转膜结束后, 封闭液封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 min。参考抗体说明书进行操作, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。相应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 发光、显影。Quantity One 灰度分析软件检测各目的蛋白灰度值, 以 β -actin 为内参计算其相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较两组是否存在差异时采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 烧伤大鼠血清干预对单层 EC 通透性的影响

以正常组为对照, 并将细胞通透系数均一化为 100%, 应用烧伤 12 h 大鼠血清干预大鼠原代主动脉内皮细胞 24 h, 荧光分光光度计比色法(检测波长为 488 nm)检测正常组和血清干预组样品的荧光强度值(OD_{488 nm}), 计算单层 EC 膜通透性系数。结果显示, 与正常组比较, 血清干预组荧光强度明显增

强, 单层细胞通透性系数为(1.933 $\pm$ 0.261), 单层细胞通透性系数为正常组的 1.933 倍, 明显升高($t = 10.030$, $P < 0.001$), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 1。

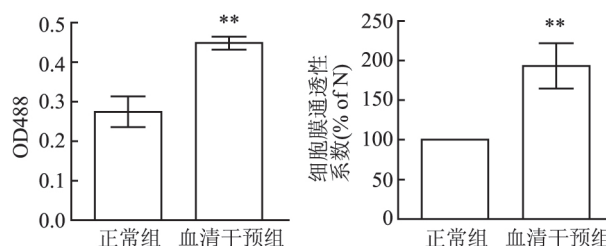


图 1 烧伤大鼠血清干预对单层 EC 通透性的影响
与正常组比较: ** $P < 0.01$

2.2 烧伤大鼠血清干预对 EC 相关的 mRNA 表达影响

应用烧伤 12 h 大鼠血清干预大鼠原代主动脉内皮细胞 24 h, RT-PCR 分别检测血管通透性相关的 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 的 mRNA 表达变化, 结果显示: 与正常组比较, 血清干预组 ET-1、ETA 和 ETB 的 mRNA 表达显著升高($t = 37.190$, $P < 0.001$; $t = 78.580$, $P < 0.001$; $t = 28.750$, $P < 0.001$), 而 ZO-1 的 mRNA 表达则明显降低($t = 13.400$, $P < 0.001$), 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 见图 2。

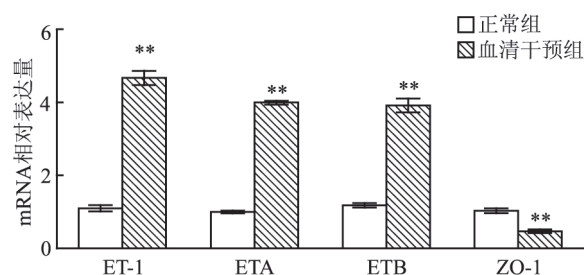


图 2 烧伤大鼠血清干预对 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 mRNA 表达的影响
与正常组比较: ** $P < 0.01$

2.3 烧伤大鼠血清干预对 EC 相关蛋白表达影响

应用烧伤 12 h 大鼠血清干预大鼠原代主动脉内皮细胞 24 h, Western blot 分别检测血管通透性相关的 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 蛋白表达变化, 结果显示: 与正常组相比, 血清干预组 ET-1($t = 7.139$, $P = 0.002$)、ETA($t = 6.343$, $P = 0.003$) 和 ETB($t = 7.648$, $P = 0.002$) 的蛋白表达显著升高, 而 ZO-1($t = 8.743$, $P = 0.001$) 的蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 见图 3。

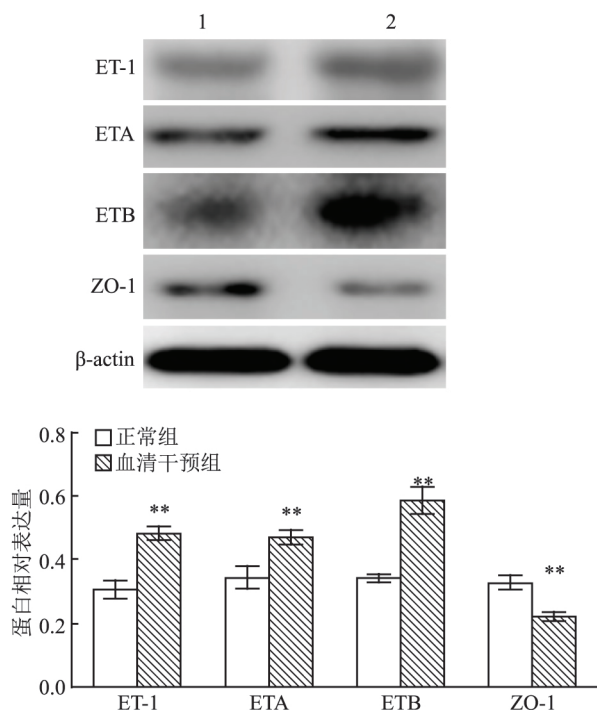


图3 烧伤大鼠血清干预对 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 蛋白表达的影响

1: 正常组; 2: 血清干预组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

烧伤后出现组织水肿、体液外渗的重要病理生理基础是血管通透性的改变,而血管通透性的改变是 EC 损害的主要表现之一^[1-2],促炎性细胞因子、氧自由基等炎症介质的释放及相关转导通路的活化是 EC 损伤的主要病理机制^[3]。

目前针对减轻血管通透性的治疗,尚无有效措施。血管通透性增高主要发生在微静脉,而微静脉的血管壁主要由 EC、周细胞、基底膜和少量平滑肌细胞构成,其中血管 EC 在微静脉通透性改变中起主要作用^[3]。本研究显示,将烫伤大鼠 12 h 血清干预大鼠的内皮细胞 24 h,与正常组相比,血清干预组的 EC 细胞通透性系数明显升高,表明烧伤血清干预后的血管 EC 的通透性明显增加。

ET-1 是由血管的 EC 合成和分泌,是一种缩血管的多肽类物质^[4],烧伤后引起 EC 的缺血缺氧,是 ET-1 分泌的强烈刺激因素,并加重局部和全身循环的损害,ET-1 在生物体内主要存在两种受体: ETA 和 ETB^[5]。近几年来针对血管通透性方面的研究,主要有 EC 间裂隙、穿细胞通道途径、与紧密连接相关蛋白的发现、细胞骨架的重构和应力纤维的形成、骨架蛋白的磷酸化等^[6]。其中 EC 的收缩性改变是

各种因素引起血管通透性增加的共同通路,而 EC 的裂隙是血管通透性增高和大分子物质透出的重要途径,内皮间的连接及相关蛋白是当前研究热点之一,紧密连接是由特异蛋白使相邻的两个 EC 之间的间隙完全闭锁,而 ZO-1 是参与紧密连接的重要蛋白之一^[7-8]。本研究显示,血清干预组的血管通透性相关因子 ET-1、ETA、ETB 表达升高,ZO-1 表达降低,Chu et al^[9] 研究发现使用浓度为 20% 的烧伤血清培养的人脐静脉 EC 间隙增加,即脐静脉的 EC 通透性增强,表明烫伤大鼠血清能够增加血管 EC 的通透性,烫伤大鼠血清中可能存在某种因子调控 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 的表达,使血管 EC 的结构发生改变,导致了血管 EC 通透性的增加。

综上所述,本实验通过烫伤大鼠血清干预血管 EC,结果显示血管 EC 的通透性显著增加,血管通透性相关因子 ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 表达发生改变,具体作用机制需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Tian K Y, Liu X J, Xu J D, et al. Propofol inhibits burn injury-induced hyperpermeability through an apoptotic signal pathway in microvascular endothelial cells[J]. Braz J Med Biol Res, 2015, 48(5): 401-7.
- [2] Johansson J, Steinvall I, Herwald H, et al. Alteration of leukocyte count correlates with increased pulmonary vascular permeability and decreased PaO₂: FiO₂-Ratio early after major burns [J]. J Burn Care Res, 2015, 36(4): 484-92.
- [3] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(4): 549-53.
- [4] Chester A H, Yacoub M H. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension [J]. Glob Cardiol Sci Pract, 2014, 2014(2): 62-78.
- [5] Cox R A, Enkhabaatar P. Effects of a dual endothelin-1 receptor antagonist on airway obstruction and acute lung injury in sheep following smoke inhalation and burn injury [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 108(3): 265-72.
- [6] 孙改霞, 刘圣君, 赵自刚, 等. 血管通透性增高发生机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(2): 487-9.
- [7] Jiao X Y, He P, Li Y, et al. The role of circulating tight junction proteins in evaluating blood brain barrier disruption following intracranial hemorrhage[J]. Dis Markers, 2015, 2015: 860120.
- [8] Alkabie S, Basivireddy J, Zhou L, et al. SPARC expression by cerebral microvascular endothelial cells in vitro and its influence on blood-brain barrier properties [J]. Neuroinflammation, 2016, 13(1): 225.
- [9] Chu Z G, Zhang J P, Song H P, et al. P38 MAP kinase mediates burn serum-induced endothelial barrier dysfunction: involvement of F-actin rearrangement and L-caldesmon phosphorylation [J]. Shock, 2010, 34(3): 222-8.

网络出版时间: 2019-5-30 10:51 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.014.html>

基于 cell-SELEX 技术筛选高转移胃癌细胞系 HGC-27 核酸适配体

刘涛¹, 王进军², 方晓娜², 何磊², 杨伟丽², 罗昭锋², 王亚雷¹

摘要 目的 筛选针对高转移胃癌细胞(HGC-27)的核酸适配体。方法 以 HGC-27 为靶细胞,以 AGS 为反筛细胞,利用 Cell-SELEX 技术逐轮次筛选,从文库中挑选能与 HGC-27 结合的核酸适配体 LW-25。用流式细胞术检测核酸适配体测富集程度,核酸适配体与 HGC-27 的亲合力及特异性。结果 流式细胞仪显示随着筛选轮数的增加,次级文库与靶细胞结合的荧光强度增强。从次级文库中成功挑选出一条能与 HGC-27 结合的核酸适配体 LW-25。并且 LW-25 能特异性识别 HGC-27。胰蛋白酶处理 HGC-27 后,LW-25 与 HGC-

27 的结合能力较处理前明显下降。结论 核酸适配体 LW-25 能特异性识别 HGC-27,是潜在具有诊断胃癌转移的分子探针。

关键词 核酸适配体;胃癌;转移

中图分类号 R 735

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0933-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.020

胃癌是消化系统的常见的恶性肿瘤,转移与侵袭是患者死亡的主要原因。大约 50% 患者在胃癌确诊时已经发生了转移^[1]。由于胃癌主要通过淋巴结转移^[2],因此及时准确的判断有无淋巴结转移对于胃癌的治疗方式选择及预后评价至关重要。CT 及 MRI 是目前临床上判断胃癌是否发生转移最常用的检测手段。然而,这种诊断方法主要根据病变部位形态学特征,不能从分子水平早期判断是否发生转移。核酸适配体(aptamer)是一类人工合成

2019-03-05 接收

基金项目:安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:15011d04043)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

²中国科学技术大学生命科学院,合肥 230027

作者简介:刘涛,男,硕士研究生;

王亚雷,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: alei416@163.com

Effect of burned-rat serum on the permeability of vascular endothelial cells

Duan Shengliang¹, Hu Zijian², Meng Chengying¹, et al

(¹Dept of Burn, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Clinical Medicine, First Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of burned-rat serum on the vascular permeability and its mechanism. **Methods** Primary cultured rat aortic endothelial cells were divided into normal group and serum intervention group according to whether or not to apply burn serum intervention, serum intervention group was used to treat rat aortic endothelial cells for 24 h with burned 12 h serum. Cell permeability test was used to detect changes in monolayer cell membrane permeability. The expressions of the mRNA and protein of cell permeability-related genes ET-1, ETA, ETB and ZO-1 were detected by Real-time PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the normal group, the cell permeability coefficient in serum intervention group was significantly increased ($P < 0.01$), the expressions of the mRNA and protein of cell permeability-related genes ET-1, ETA and ETB in serum intervention group were significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of the mRNA and protein of ZO-1 in serum intervention group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The serum of burned rats can increase the permeability of vascular endothelial cells, and the increase of permeability may be related to the increased expression of ET-1, ET-A, ET-B and the decrease of ZO-1 expression.

Key words burns; endothelial cells; vascular permeability; ET-1; ZO-1