

· 论著 ·

严重烧伤患者休克期肝素结合蛋白的变化及其对人脐静脉血管内皮细胞和中性粒细胞的影响

戚欣欣¹ 刘璐¹ 杨云稀² 黄佳敏² 孙炳伟²¹江苏大学医学院, 镇江 212001; ²南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科, 苏州 215002

通信作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com



【摘要】 目的 探讨严重烧伤患者休克期肝素结合蛋白(HBP)的变化及其在体外对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)和中性粒细胞的影响。方法 采用前瞻性观察性研究与实验研究方法。将2020年8—11月南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科收治的符合入选标准的20例严重烧伤患者纳入严重烧伤组[男12例、女8例,年龄为44.5(31.0, 58.0)岁],同期招募该单位体检中心体检结果正常的20名健康志愿者纳入健康对照组[男13例、女7例,年龄为39.5(26.0, 53.0)岁]。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测健康对照组志愿者血浆与严重烧伤组患者伤后48 h内血浆中HBP和组织金属蛋白酶抑制物1(TIMP-1)蛋白表达水平,分别对2组血浆中HBP和TIMP-1蛋白表达的相关性进行Pearson相关分析。取第4代对数生长期HUVEC进行实验,将细胞按随机数字表法(分组方法下同)分为常规培养的正常对照组(处理下同)与进行相应处理的重组HBP(rHBP)处理12 h组、rHBP处理24 h组、rHBP处理48 h组,采用实时荧光定量反转录PCR法检测细胞中TIMP-1的mRNA表达;将细胞分为正常对照组与进行相应处理的rHBP处理48 h组,采用蛋白质印迹法检测细胞中TIMP-1蛋白表达;将细胞分为正常对照组与加入相应试剂处理的单纯rHBP组、单纯抑蛋白酶多肽组、rHBP+抑蛋白酶多肽组(rHBP终物质的量浓度为200 nmol/L,抑蛋白酶多肽终质量浓度为20 μg/mL),培养48 h,采用ELISA法检测细胞培养上清液中TIMP-1蛋白表达水平。采用免疫磁珠分选法从前述10名健康志愿者外周静脉血中分离中性粒细胞,将细胞分为正常对照组与加入相应试剂处理的单纯重组TIMP-1(rTIMP-1)组、单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组(rTIMP-1终质量浓度为500 ng/mL,佛波酯终物质的量浓度为10 nmol/L),培养1 h,采用免疫荧光法观测细胞中CD63蛋白表达,采用流式细胞术检测细胞中CD63蛋白阳性表达率,采用ELISA法检测细胞培养上清液中HBP和髓过氧化物酶(MPO)蛋白表达水平。正常对照组均于适宜时间点进行前述相关检测,细胞实验中各组样本数均为3。对数据行 χ^2 检验、Mann-Whitney *U*检验、Kruskal-Wallis *H*检验、Tamhane T2检验。结果 严重烧伤组患者血浆中HBP、TIMP-1蛋白表达水平分别为404.9(283.1, 653.2)、262.1(240.6, 317.4)ng/mL,均明显高于健康对照组志愿者的61.6(45.0, 68.9)、81.0(66.3, 90.0)ng/mL(*Z*值分别为-5.41、-5.21, *P*<0.01)。健康对照组志愿者血浆中HBP和TIMP-1蛋白表达相关性不强(*P*>0.05),严重烧伤组患者血浆中HBP和TIMP-1蛋白表达呈明显正相关(*r*=0.64, *P*<0.01)。与正常对照组比较,rHBP处理12 h组、rHBP处理24 h组、rHBP处理48 h组HUVEC中TIMP-1 mRNA表达水平均显著升高(*t*值分别为-3.58、-2.25、-1.26, *P*<0.05)。蛋白质印迹法检测显示,与正常对照组比较,rHBP处理48 h组HUVEC中

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210805-00269

本文引用格式:戚欣欣,刘璐,杨云稀,等.严重烧伤患者休克期肝素结合蛋白的变化及其对人脐静脉血管内皮细胞和中性粒细胞的影响[J].中华烧伤与创面修复杂志,2022,38(2):147-155. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210805-00269.

Qi XX, Liu L, Yang YX, et al. Changes of heparin-binding protein in severe burn patients during shock stage and its effects on human umbilical vein endothelial cells and neutrophils[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(2): 147-155. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20210805-00269.



TIMP-1 蛋白表达明显增强。培养 48 h, 与正常对照组比较, 单纯 rHBP 组 HUVEC 培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平显著升高 ($t=9.43, P<0.05$), 单纯抑蛋白酶多肽组、rHBP+抑蛋白酶多肽组 HUVEC 培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平无明显变化 ($P>0.05$); 与单纯 rHBP 组比较, rHBP+抑蛋白酶多肽组 HUVEC 培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平显著下降 ($t=4.76, P<0.01$)。培养 1 h, 免疫荧光法和流式细胞术检测的各组中性粒细胞 CD63 蛋白表达结果趋势一致。培养 1 h, 与正常对照组比较, 单纯 rTIMP-1 组中性粒细胞中 CD63 蛋白阳性表达率及细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均无明显变化 ($P>0.05$), 单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组中性粒细胞中 CD63 蛋白阳性表达率及细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均明显升高 (t 值分别为 2.41、3.82、5.73、1.05、4.16、1.08, $P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与单纯佛波酯组比较, rTIMP-1+佛波酯组中性粒细胞中 CD63 蛋白阳性表达率及细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均明显下降 (t 值分别为 5.26、2.83、1.26, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。 **结论** 严重烧伤患者休克期血浆中 HBP 表达水平增加; HBP 可在体外诱导 HUVEC 分泌 TIMP-1, TIMP-1 可降低人中性粒细胞 CD63 分子表达。

【关键词】 烧伤; 金属蛋白酶 1 组织抑制剂; 人脐静脉内皮细胞; 细胞脱颗粒; 肝素结合蛋白; 中性粒细胞

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81772135、82072217); 江苏省自然科学基金 (BK20201178)

Changes of heparin-binding protein in severe burn patients during shock stage and its effects on human umbilical vein endothelial cells and neutrophils

Qi Xinxi¹, Liu Lu¹, Yang Yunxi², Huang Jiamin², Sun Bingwei²

¹School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; ²Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of heparin-binding protein (HBP) in severe burn patients during shock stage and its effects on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and neutrophils in vitro. **Methods** Prospective observational and experimental research methods were used. Twenty severe burn patients who met the inclusion criteria and were admitted to the Department of Burns and Plastic Surgery of Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University from August to November 2020 were included in severe burn group (12 males and 8 females, aged 44.5 (31.0, 58.0) years). During the same period, 20 healthy volunteers with normal physical examination results in the unit's Physical Examination Center were recruited into healthy control group (13 males and 7 females, aged 39.5 (26.0, 53.0) years). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the protein expression levels of HBP and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in plasma of patients within 48 hours after injury in severe burn group and in plasma of volunteers in healthy control group. The correlation between protein expression of HBP and that of TIMP-1 in the plasma in the two groups was analyzed by Pearson correlation analysis. The fourth passage of HUVECs in logarithmic growth phase were used for the experiment. The HUVECs were divided into normal control group with routine culture (the same treatment below) and recombinant HBP (rHBP)-treated 12 h group, rHBP-treated 24 h group, and rHBP-treated 48 h group with corresponding treatment according to the random number table (the same grouping method below), and the mRNA expression of TIMP-1 in cells was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The HUVECs were divided into normal control group and rHBP-treated 48 h group with corresponding treatment, and the protein expression of TIMP-1 in the cells was detected by Western blotting. The HUVECs were divided into normal control group, rHBP alone group, aprotinin alone group, and rHBP+aprotinin group treated with the corresponding reagents (with the final molarity of rHBP being 200 nmol/L and the final concentration of aprotinin being 20 μ g/mL, respectively), cultured for 48 h, and ELISA was used to detect the protein expression of TIMP-1 in the culture supernatant of cells. The neutrophils were isolated from the peripheral venous blood of the aforementioned 10 healthy volunteers by immunomagnetic bead sorting, and the cells were divided into normal control group, recombinant TIMP-1 (rTIMP-1) alone group, phorbol acetate (PMA) alone group, and rTIMP-1+PMA group treated with corresponding reagents (with the final concentration of rTIMP-1 being 500 ng/mL and the final molarity of PMA being 10 nmol/L, respectively). After being cultured for 1 h, the expression of CD63 protein in cells was detected by immunofluorescence method, the positive expression rate of CD63 protein in cells was detected by flow cytometry, and the protein expression levels of HBP and myeloperoxidase (MPO) in the

culture supernatant of cells were detected by ELISA. The normal control group underwent the above-mentioned related tests at appropriate time points. The number of samples was 3 in each group of cell experiment. Data were statistically analyzed with chi-square test, Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis *H* test, and Tamhane's *T2* test. **Results** The protein expression levels of HBP and TIMP-1 in the plasma of patients in severe burn group were 404.9 (283.1, 653.2) and 262.1 (240.6, 317.4) ng/mL, respectively, which were both significantly higher than 61.6 (45.0, 68.9) and 81.0 (66.3, 90.0) ng/mL of volunteers in healthy control group (with *Z* values of -5.41 and -5.21, respectively, $P < 0.01$). The correlation between the protein expression of HBP and that of TIMP-1 in the plasma of volunteers in healthy control group was not strong ($P > 0.05$). The protein expression of HBP was significantly positively correlated with that of TIMP-1 in the plasma of patients in severe burn group ($r = 0.64$, $P < 0.01$). Compared with that in normal control group, the mRNA expression of TIMP-1 in HUVECs was significantly increased in rHBP-treated 12 h group, rHBP-treated 24 h group, and rHBP-treated 48 h group (with *t* values of -3.58, -2.25, and -1.26, respectively, $P < 0.05$). Western blotting detection showed that compared with that in normal control group, the protein expression of TIMP-1 in HUVECs in rHBP-treated 48 h group was significantly enhanced. After 48 h of culture, compared with that in normal control group, the protein expression level of TIMP-1 in the culture supernatant of HUVECs in rHBP alone group was significantly increased ($t = 9.43$, $P < 0.05$), while the protein expression level of TIMP-1 in the culture supernatant of HUVECs didn't change significantly in aprotinin alone group or rHBP+aprotinin group ($P > 0.05$); compared with that in rHBP alone group, the protein expression level of TIMP-1 in the culture supernatant of HUVECs in rHBP+aprotinin group was significantly decreased ($t = 4.76$, $P < 0.01$). After 1 h of culture, the trend of CD63 protein expression in neutrophils detected by immunofluorescence method and that by flow cytometry were consistent in each group. After 1 h of culture, compared with that in normal control group, the positive expression rate of CD63 protein in the neutrophils and the protein expression levels of HBP and MPO in the culture supernatant of cells in rTIMP-1 alone group all had no significant changes ($P > 0.05$), while the positive expression rate of CD63 protein in the neutrophils and the protein expression levels of HBP and MPO in the culture supernatant of cells were all significantly increased in PMA alone group and rTIMP-1+PMA group (with *t* values of 2.41, 3.82, 5.73, 1.05, 4.16, and 1.08, respectively, $P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with that in PMA alone group, the positive expression rate of CD63 protein in the neutrophils and the protein expression levels of HBP and MPO in the culture supernatant of cells in rTIMP-1+PMA group were all significantly decreased (with *t* values of 5.26, 2.83, and 1.26, respectively, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** The expression level of HBP in the plasma of severe burn patients is increased during shock stage. HBP can induce HUVECs to secrete TIMP-1 in vitro, and TIMP-1 can reduce the expression of CD63 molecule in human neutrophils.

【Key words】 Burns; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Human umbilical vein endothelial cells; Cell degranulation; Heparin binding protein; Neutrophils

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (81772135, 82072217); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK20201178)

烧伤是世界范围内最常见的创伤之一,每年有上千万人因烧伤寻求治疗。烧伤的病死率与很多因素有关,包括烧伤总面积、深度、年龄以及是否有吸入性损伤等^[1-3]。严重烧伤往往导致患者出现低血容量性休克^[4]。目前对于严重烧伤休克早期的救治主要聚焦于液体复苏,对于血管微环境的病理生理尚需进一步研究。

肝素结合蛋白(HBP),也称为天青素或CAP37,是一种主要由中性粒细胞分泌的颗粒蛋白^[5]。HBP储存在中性粒细胞的分泌小泡和嗜天青颗粒中,当中性粒细胞表面的 β_2 整合素交联并激活中性粒细胞时,细胞表面CD63分子表达增加,HBP被释放^[6]。大量的研究已经证明HBP可以增加血管内皮通透性,诱导血管渗漏^[7-9]。组织金属蛋白酶抑制物1

(TIMP-1)是TIMP家族的成员之一,是基质金属蛋白酶(MMP)的天然内源性抑制剂^[10]。TIMP-1最早是被观察到能刺激红系祖细胞生长,后来的研究显示TIMP表达水平的变化与包括癌症和心力衰竭在内的多种疾病的发生和发展有关^[11-14]。TIMP可以不依赖于对MMP的抑制作用,直接与靶细胞表面受体结合来诱导细胞反应,包括调节细胞增殖、凋亡、分化和血管生成^[15-17]。双酵母杂交筛选证实TIMP-1分子可与CD63分子相互作用^[18],但这种相互作用在疾病中的具体意义仍未被阐述。本研究通过对严重烧伤患者休克期HBP变化的分析以及对血管内皮细胞的体外实验,探讨严重烧伤早期血管内皮细胞抑制中性粒细胞脱颗粒的相关机制。

1 资料与方法

本前瞻性观察性研究经南京医科大学附属苏州医院(以下简称苏州医院)医学伦理委员会批准(批号:2017-2-28),所有健康志愿者和烧伤患者在采血前都签署了知情同意书;所有实验均按照批准的实验操作指南进行。

1.1 临床研究

1.1.1 烧伤患者入选标准 纳入标准:烧伤总面积 $\geq 30\%$ TBSA,深度为深Ⅱ~Ⅲ度,烧伤指数 $\geq 20\%$ TBSA,年龄24~60岁,符合严重烧伤诊断标准^[19],伤后24 h内入院。排除标准:合并复合伤、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、心肺肾功能不全、明显严重精神障碍、癫痫、糖尿病、神经系统疾病等可能影响本研究结果的疾病。

1.1.2 临床资料与分组 2020年8—11月苏州医院烧伤整形科收治20例符合入选标准的严重烧伤患者,将其纳入严重烧伤组,患者入院时Ⅲ度烧伤面积为45.5%(19.0%,72.0%)TBSA,合并吸入性损伤者11例,合并其他病症(肺水肿、急性肾功能障碍、应激性溃疡和胃扩张等)者8例,脓毒症相关性器官功能衰竭评价评分为7.5(5.0,10.0)分;伤后48 h液体总入量为7 286(5 160,9 412)mL、尿量为2 432(2 046,2 818)mL。同期招募苏州医院体检中心体检结果正常的20名健康志愿者,将其纳入健康对照组。严重烧伤组患者与健康对照组志愿者的性别、年龄、平均动脉压比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);严重烧伤组患者中性粒细胞计数明显多于健康对照组志愿者($P<0.05$)。见表1。

1.1.3 血浆中HBP、TIMP-1蛋白表达水平检测与分析 使用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管采集严重烧伤组各例患者伤后48 h内的外周静脉血2 mL,采集健康对照组每名志愿者外周静脉血2 mL,室温下400 $\times g$ 离心10 min,仔细取出血浆的上2/3,按照HBP、TIMP-1的ELISA检测试剂盒(英国Abcam公司)说明书检测血浆中HBP和TIMP-1的蛋白表达水平。在30 min内使用Multiskan FC型酶标仪(美

国Thermo Fisher公司)分别测定450 nm最大吸收波长和570 nm参考波长的吸光度值,并以标准对数为横坐标、测量的吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,计算HBP、TIMP-1的蛋白表达水平。本实验重复3次。另分别对2组中HBP和TIMP-1蛋白表达水平的相关性进行分析。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞及主要试剂与仪器来源 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)购自上海中乔新舟生物科技有限公司(货号DFSC-EC-01)。1001型内皮细胞培养基购自美国ScienCell公司,重组HBP(rHBP)购自上海近岸生物科技有限公司,抑蛋白酶多肽、重组TIMP-1(rTIMP-1)、兔抗人CD63单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)及髓过氧化物酶(MPO)的ELISA检测试剂盒购自英国Abcam公司,快速SYBR Green荧光定量PCR试剂盒、实时荧光定量PCR仪购自美国Thermo Fisher公司,兔抗人TIMP-1单克隆抗体和兔抗人 β 肌动蛋白单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,蛋白检测化学发光试剂盒购自美国Pierce公司,中性粒细胞磁珠分选试剂盒、130-104-434型中性粒细胞阴选试剂盒购自德国Miltenyi Biotec公司,佛波酯购自美国MCE公司,藻红蛋白标记的小鼠抗人CD63单克隆抗体购自美国Biolegend公司,RPMI-1640培养基、T0303型胰蛋白酶购自美国Sigma公司。Mini-PROTEIN型蛋白电泳槽和蛋白转膜系统购自美国Bio-Rad公司,Tanon-2500型化学发光仪购自上海天能科技有限公司,FACSCanto II型流式细胞仪购自美国BD公司,LSM900型激光扫描共聚焦显微镜购自德国Zeiss公司。

1.2.2 HUVEC培养与相关检测

1.2.2.1 细胞培养 在底面积25 cm²的培养瓶中接种5 $\times 10^5$ ~1 $\times 10^6$ 个细胞,使用内皮细胞培养基培

表1 严重烧伤组患者与健康对照组志愿者一般资料比较

组别	例数/人数	性别(例)		年龄[岁, $M(Q_1, Q_3)$]	平均动脉压[mmHg, $M(Q_1, Q_3)$]	中性粒细胞计数 [$\times 10^9/L$, $M(Q_1, Q_3)$]
		男	女			
严重烧伤组	20	12	8	44.5(31.0,58.0)	92.8(85.1,100.5)	17.70(12.16,23.24)
健康对照组	20	13	7	39.5(26.0,53.0)	87.1(74.8,99.4)	7.35(6.48,8.21)
统计量值		$\chi^2=0.11$		$Z=-0.21$	$Z=-0.66$	$Z=-3.17$
P值		0.744		0.827	0.513	0.034

注:1 mmHg=0.133 kPa

养(培养基下同)。隔天弃去上清液, PBS 清洗细胞 2 遍后, 加入 6 mL 新鲜培养基, 继续培养至接近 85% 融合时进行传代。后续使用第 4 代对数生长期细胞进行实验。

1.2.2.2 TIMP-1 mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 RT-PCR 法。将细胞以每皿 1×10^6 个接种到直径为 35 mm 培养皿中培养。将细胞按随机数字表法(分组方法下同)分为正常对照组(不行其他处理, 下同)、rHBP 处理 12 h 组、rHBP 处理 24 h 组、rHBP 处理 48 h 组(每组 1 皿), 后 3 组细胞培养基中加入终物质的量浓度 200 nmol/L rHBP 分别孵育 12、24、48 h。各组处理完成(正常对照组于适宜时间点进行检测, 下同)后弃去培养基, 加入 1 mL TRIzol, 提取细胞总 RNA, 测定 RNA 纯度和浓度, 按照 20 μ L 反转录体系合成互补 DNA, 采用实时荧光定量 PCR 仪检测 TIMP-1 mRNA 表达。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成, TIMP-1 上游引物为 5'-CTTCTGCAATTCGACCTCGT-3', 下游引物为 5'-ACGCTGGTATAAGGTGCTCTG-3', 产物大小为 79 bp; GAPDH 上游引物为 5'-GTGAAGGTCGGAGT-CAACG-3', 下游引物为 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3', 产物大小为 112 bp。以 GAPDH 为内参照, 基于 Δ 循环阈值(Ct)的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 TIMP-1 mRNA 表达进行定量。以正常对照组结果为 1, 其余各组与其比值为 TIMP-1 mRNA 表达量的相对值。本实验重复 3 次。

1.2.2.3 TIMP-1 蛋白表达检测 采用蛋白质印迹法检测细胞中 TIMP-1 蛋白表达。同 1.2.2.2 接种细胞与培养, 将细胞分为正常对照组与 rHBP 处理 48 h 组(每组 1 皿), 同 1.2.2.2 相应组别进行处理。各组细胞处理完成后弃去培养基, 收获各组细胞总蛋白, 常规检测蛋白浓度, 取 5 μ g 总蛋白上样, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 用 5 g/L 牛血清白蛋白溶液室温封闭 1 h。加入一抗兔抗人 TIMP-1 单克隆抗体(稀释比为 1:1 000)和兔抗人 β 肌动蛋白单克隆抗体(稀释比为 1:2 000), 摇床 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆二抗(稀释比为 1:5 000), 室温孵育 1 h。增强化学发光法显影, 采用 ImageJ 1.8.0 图像分析软件(美国国立卫生研究院)分析图像。本实验重复 3 次, 选择最有代表性的 1 次结果进行展示。

采用 ELISA 法检测细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达。同 1.2.2.2 接种细胞与培养, 将

细胞分为正常对照组、单纯 rHBP 组、单纯抑蛋白酶多肽组、rHBP+抑蛋白酶多肽组(每组 1 皿), 后 3 组细胞培养液中加入相应试剂培养, 其中 rHBP 终物质的量浓度为 200 nmol/L、抑蛋白酶多肽终质量浓度为 20 μ g/mL。培养 48 h, 同 1.1.3 检测上清液中 TIMP-1 蛋白表达。本实验重复 3 次。

1.2.3 外周血中性粒细胞分选与相关检测

1.2.3.1 细胞分选与分组处理 采用免疫磁珠分选法, 应用中性粒细胞磁珠分选试剂盒与中性粒细胞阴选试剂盒, 分选外周血中性粒细胞。使用 EDTA 抗凝管采集前述 10 名健康对照组志愿者外周静脉血(每人 2 mL), 将血液与等体积的磁珠分选缓冲液混合。加入磁珠避光孵育 15 min, $300 \times g$ 离心 10 min 后弃去上清液。将细胞重新悬浮于磁珠分选缓冲液中, 随后加入磁柱中, 用磁珠分选缓冲液冲洗 3 次, $300 \times g$ 离心 10 min 后弃去上清液, 收集中性粒细胞。在直径 35 mm 培养皿中, 将中性粒细胞以 1×10^7 个/mL 重新悬浮于含有体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(每皿 1 mL), 将细胞分为正常对照组、单纯 rTIMP-1 组、单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组, 后 3 组细胞培养基中加入相应试剂培养, 其中 rTIMP-1 终质量浓度为 500 ng/mL、佛波酯终物质的量浓度为 10 nmol/L。培养 1 h, 进行以下检测。

1.2.3.2 CD63 蛋白表达检测 采用免疫荧光法。取各组细胞, 每组 1 皿, $400 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 清洗。4 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 常规清洗 2 次。加入一抗兔抗人 CD63 单克隆抗体(稀释比为 1:1 000), 室温孵育 1 h。清洗后加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆二抗(稀释比为 1:5 000), 室温孵育 30 min。常规清洗后加入 DAPI 室温孵育 15 min, 清洗后于 630 倍激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞中 CD63 蛋白表达, CD63 阳性染色呈黄绿色。本实验重复 3 次, 选择最有代表性的 1 次结果进行展示。

采用流式细胞术。另取各组细胞, 每组 1 皿, 弃去上清液, PBS 清洗。加入 5 μ L 藻红蛋白标记的小鼠抗人 CD63 单克隆抗体(稀释比为 1:1 000), 冰上孵育 20 min 后, 常规清洗。以 $400 \times g$ 离心 10 min, 弃去上清液, 用 500 μ L PBS 重新悬浮细胞后, 采用流式细胞仪检测细胞中 CD63 蛋白阳性表达率。本实验重复 3 次。

1.2.3.3 HBP、MPO 蛋白表达检测 采用 ELISA

法。取各组细胞,每组 1 皿。取细胞培养上清液,同

1.1.3 检测 HBP 和 MPO 蛋白表达。本实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据。计量资料数据均不符合正态分布,以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,2 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间总体比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,多组间多重比较采用 Tamhane T2 检验;指标间相关性分析采用 Pearson 相关分析。计数资料数据以频数表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆中 HBP 与 TIMP-1 蛋白表达

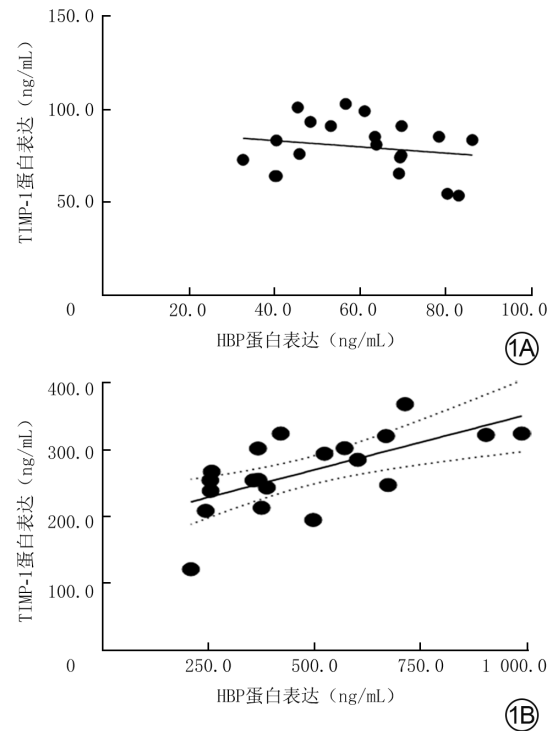
严重烧伤组患者伤后 48 h 血浆中 HBP、TIMP-1 蛋白表达水平分别为 404.9(283.1, 653.2)、262.1(240.6, 317.4) ng/mL,均明显高于健康对照组志愿者 61.6(45.0, 68.9)、81.0(66.3, 90.0) ng/mL (Z 值分别为 -5.41、-5.21, $P < 0.001$)。健康对照组志愿者血浆中 HBP 和 TIMP-1 蛋白表达相关性不强 ($P > 0.05$),严重烧伤组患者血浆中 HBP 和 TIMP-1 蛋白表达呈明显正相关 ($P < 0.01$),见图 1。

2.2 HUVEC 的 TIMP-1 表达

4 组细胞中 TIMP-1 mRNA 表达水平总体比较,差异有统计学意义 ($H=9.97, P=0.019$)。与正常对照组比较, rHBP 处理 12 h 组、rHBP 处理 24 h 组、rHBP 处理 48 h 组细胞中 TIMP-1 mRNA 表达水平均显著升高 (t 值分别为 -3.58、-2.25、-1.26, P 值分别为 0.017、0.038、0.024)。与 rHBP 处理 12 h 组比较, rHBP 处理 24 h 组、rHBP 处理 48 h 组细胞中 TIMP-1 mRNA 表达水平均无明显变化 (t 值分别为 0.82、1.37, P 值分别为 0.458、0.244); rHBP 处理 24 h 组与 rHBP 处理 48 h 组细胞中 TIMP-1 mRNA 表达水平相近 ($t=0.25, P=0.812$)。见图 2A。因此,后续任选一个时间点(48 h)进行实验。

蛋白质印迹法检测显示,与正常对照组比较, rHBP 处理 48 h 组细胞中 TIMP-1 蛋白表达明显增强。见图 2B。

ELISA 法检测显示,培养 48 h,4 组细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平总体比较,差异有统计学意义 ($H=11.25, P=0.012$)。与正常对照组比较,单纯 rHBP 组细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平显著升高 ($t=9.43, P=0.010$),单纯抑蛋白酶多肽



注:TIMP-1 为组织金属蛋白酶抑制物 1, HBP 为肝素结合蛋白

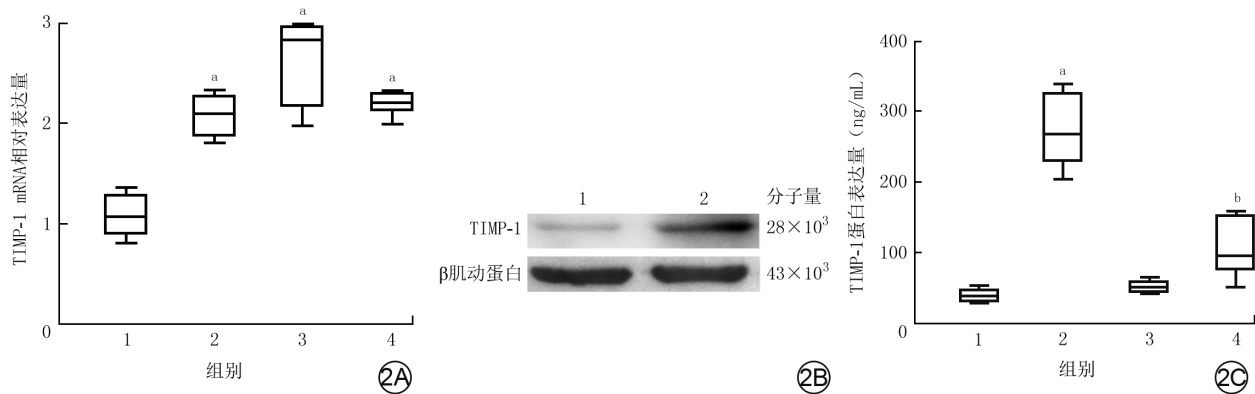
图 1 健康对照组 20 名志愿者血浆与严重烧伤组 20 例患者伤后 48 h 血浆中 HBP 和 TIMP-1 蛋白表达的相关性。1A. 健康对照组,二者表达相关性不强, $r=-0.19, P=0.434$; 1B. 严重烧伤组,二者表达呈明显正相关, $r=0.64, P=0.002$

组、rHBP+抑蛋白酶多肽组细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平均无明显变化 (t 值分别为 3.71、2.41, P 值分别为 0.116、0.133);与单纯 rHBP 组比较, rHBP+抑蛋白酶多肽组细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达水平显著下降 ($t=4.76, P=0.009$)。见图 2C。

2.3 中性粒细胞的 CD63 和 HBP 与 MPO 蛋白表达

培养 1 h,与正常对照组比较,单纯 rTIMP-1 组细胞中 CD63 蛋白表达情况无明显变化,单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组细胞中 CD63 蛋白表达明显增加;与单纯佛波酯组比较, rTIMP-1+佛波酯组细胞中 CD63 蛋白表达明显减少。见图 3。

培养 1 h,4 组细胞中 CD63 蛋白阳性表达率总体比较,差异有统计学意义 ($H=14.12, P=0.024$)。与正常对照组比较,单纯 rTIMP-1 组细胞中 CD63 蛋白阳性表达率无明显变化 ($t=0.72, P=0.457$),单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组细胞中 CD63 蛋白阳性表达率均明显升高 (t 值分别为 2.41、1.05, P 值分别为 0.017、0.031);与单纯佛波酯组比较, rTIMP-1+佛波酯组细胞中 CD63 蛋白阳性表达率明



注:TIMP-1 为组织金属蛋白酶抑制物 1;图 2A 中横坐标 1、2、3、4 分别为正常对照组(于适宜时间点检测,后同)、重组肝素结合蛋白(rHBP)处理 12 h 组、rHBP 处理 24 h 组、rHBP 处理 48 h 组;与正常对照组比较, $P < 0.01$;图 2B 中 1、2 分别为正常对照组、rHBP 处理 48 h 组;图 2C 中横坐标 1、2、3、4 分别为正常对照组、单纯 rHBP 组、单纯抑蛋白酶多肽组、rHBP+抑蛋白酶多肽组,与正常对照组比较, $P < 0.05$;与单纯 rHBP 组比较, $P < 0.01$

图 2 3 种分组处理后人脐静脉血管内皮细胞的 TIMP-1 的 mRNA 和蛋白表达。2A.4 组细胞中 TIMP-1 mRNA 表达箱式图[样本数为 3, $M(Q_1, Q_3)$];2B. 蛋白质印迹法检测的 2 组细胞中 TIMP-1 蛋白表达条带图;2C. 培养 48 h 后 4 组细胞培养上清液中 TIMP-1 蛋白表达箱式图[样本数为 3, $M(Q_1, Q_3)$]

显下降($t=5.26, P=0.005$)。见图 4A。

培养 1 h, 4 组细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平总体比较, 差异均有统计学意义(H 值分别为 18.78、18.62, $P < 0.001$)。与正常对照组比较, 单纯 rTIMP-1 组细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均无明显变化(t 值分别为 1.41、1.75, P 值分别为 0.188、0.111), 单纯佛波酯组细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均显著升高(t 值分别为 3.82、5.73, P 值分别为 0.007、0.003), rTIMP-1+佛波酯组细胞培养上清液中 HBP、MPO 蛋白表达水平均显著升高(t 值分别为 4.16、1.08, P 值分别为 0.006、0.031); 与单纯佛波酯组比较, rTIMP-1+佛波酯组细胞培养上清液中 HBP 和 MPO 蛋白表达水平均显著下降(t 值分别为 2.83、1.26, P 值分别为 0.037、0.046)。见图 4B、4C。

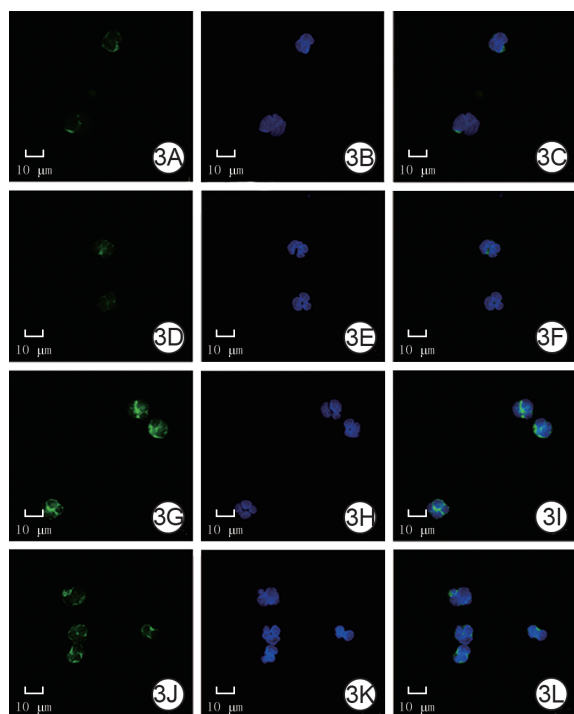
3 讨论

严重烧伤早期患者会出现明显的休克, 血管通透性增加, 大量液体从血管内向组织间隙转移造成循环血量下降, 进而导致心输出量减少, 形成恶性循环加重休克^[20-22]。此外, 过程中迅速液体复苏很容易从“适宜”转变为“过量”, 进而产生包括肺水肿、消化道水肿、腹腔间隙综合征等在内的一系列并发症^[21, 23-25]。关于烧伤早期血管通透性增加的机制仍未被阐明, 导致有效的干预措施缺乏。因此, 对于严重烧伤早期血管渗漏机制的研究非常重要。

脂质介质、过氧化物、P 物质、缓激肽、组胺和

HBP 等都被观察到可以显著诱导血管渗漏^[26-28]。前期研究已经证实, 严重烧伤早期异常升高的 HBP 是引起患者血管通透性增加、诱导血管渗漏的重要因素^[8, 29-30]。因此, 烧伤早期抑制中性粒细胞脱颗粒、减少 HBP 释放是抗休克可能的干预靶点。如何在烧伤早期对中性粒细胞异常脱颗粒进行调控, 将是未来严重烧伤救治的潜在治疗靶点。中性粒细胞与血管内皮细胞间的联系涉及黏附分子表达、ECM 重塑、多种蛋白酶原激活等多种细胞生物学活动^[31], 对于内皮细胞与中性粒细胞相互作用的深入研究有利于更好地理解两者之间复杂的作用关系。

本研究显示, 严重烧伤早期患者血浆 HBP 和 TIMP-1 蛋白表达均显著增加, 两者之间具有明显正相关关系, 说明严重烧伤早期 HBP 和 TIMP-1 之间可能存在联系。相关研究已经证实某些刺激物可以诱导 TIMP-1 的表达, 如 LPS 可以上调小鼠多个器官 TIMP-1 表达^[32], 这提示 HBP 可能也存在类似的作用。本研究显示大剂量 rHBP 可以显著上调 HUVEC 中 TIMP-1 mRNA 和蛋白水平表达, 增加 TIMP-1 向细胞外的分泌; 使用抑蛋白酶多肽可显著抑制 rHBP 对 HUVEC 中 TIMP-1 蛋白表达水平的上调。以上结果说明 HBP 正向调控血管内皮细胞转录、合成和释放 TIMP-1。在此基础上, 本课题组推測, TIMP-1 抑制中性粒细胞活化可能是通过结合中性粒细胞表面 CD63 分子实现的。CD63 分子是中性粒细胞嗜天青颗粒的标志物, CD63 表达上调提示中性粒细胞被活化并脱颗粒, 释放嗜天青颗粒中的



注:CD63 阳性染色为黄绿色,细胞核阳性染色为蓝色

图 3 4 组从健康志愿者外周静脉血分离的中性粒细胞培养 1 h 后 CD63 蛋白表达 异硫氰酸荧光素-4',6-二脒基-2-苯基吲哚×630,图中标尺为 10 μm。3A、3B、3C.分别为正常对照组(于适宜时间点检测)CD63 染色、细胞核染色、CD63 与细胞核染色重叠图片,细胞核完整,CD63 蛋白表达较多;3D、3E、3F.分别为单纯重组组织金属蛋白酶抑制物 1(rTIMP-1)组 CD63 染色、细胞核染色、CD63 与细胞核染色重叠图片,细胞核完整,图 3D 中 CD63 蛋白表达与图 3A 相近;3G、3H、3I.分别为单纯佛波酯组 CD63 染色、细胞核染色、CD63 与细胞核染色重叠图片,细胞核完整,图 3G 中 CD63 蛋白表达明显多于图 3A;3J、3K、3L.分别为 rTIMP-1+佛波酯组 CD63 染色、细胞核染色、CD63 与细胞核染色重叠图片,细胞核完整,图 3J 中 CD63 蛋白表达明显多于图 3A 但明显少于图 3G

HBP 和 MPO 等颗粒蛋白^[33-34]。先前的一项研究使用双酵母杂交实验证实 TIMP-1 和 CD63 分子可以直接结合,抑制整合素 β_1 的激活,从而抑制中性粒细胞的活化^[18]。本研究进一步表明,rTIMP-1 可以显著下调佛波酯诱导的中性粒细胞 CD63 分子表达,抑制中性粒细胞脱颗粒释放 HBP 和 MPO。这说明通过 TIMP-1 下调 CD63 分子抑制中性粒细胞脱颗粒可能是血管内皮细胞负向调控中性粒细胞持续释放 HBP,减轻血管渗漏的机制之一。

总之,本研究进一步揭示了中性粒细胞释放增加的 HBP 可以同时诱导血管内皮细胞释放 TIMP-1,后者反作用于中性粒细胞,抑制了中性粒细胞嗜天青颗粒的释放,进而抑制 HBP 释放,这是一个重要的负反馈调节机制。本研究结果反映了严重烧伤

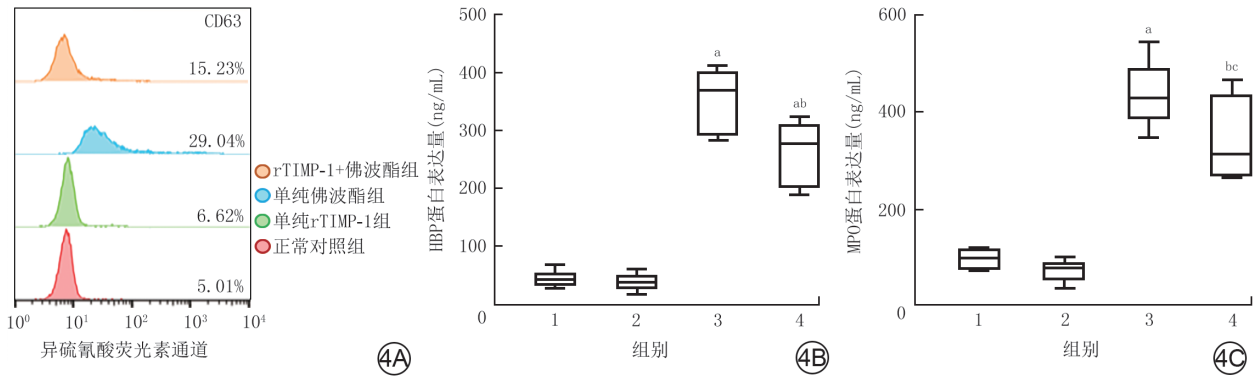
早期 TIMP-1 的表达水平是该负反馈调节机制的关键因素,精准监测 TIMP-1 水平可以在一定程度上反映血管渗漏的病理进展。因此,这种负向调控机制可能是未来对严重烧伤早期血管渗漏进行干预的重要靶点之一,具有重要的临床研究价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 戚欣欣、刘璐:实验操作、论文撰写;杨云稀、黄佳敏:数据整理与分析;孙炳伟:研究指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] Greenhalgh DG. Management of burns[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(24): 2349-2359. DOI:10.1056/NEJMra1807442.
- [2] Pavoni V, Giancesello L, Paparella L, et al. Outcome predictors and quality of life of severe burn patients admitted to intensive care unit[J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2010, 18: 24. DOI: 10.1186/1757-7241-18-24.
- [3] 戚欣欣, 杨云稀, 孙炳伟. 严重烧伤患者早期外周血中性粒细胞趋化功能变化及影响因素[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(3): 204-209. DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20190801-00329.
- [4] Zhang P, Zou B, Liou YC, et al. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury[J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkaa047 [2021-12-05]. <https://academic.oup.com/burnstrauma/article/doi/10.1093/burnst/tkaa047/6128653?login=true>. DOI: 10.1093/burnst/tkaa047.
- [5] Persson BP, Halldorsdottir H, Lindbom L, et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37) - a link to endothelin-1 in endotoxemia-induced pulmonary oedema? [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2014, 58(5):549-559. DOI:10.1111/aas.12301.
- [6] Gierlikowska B, Stachura A, Gierlikowski W, et al. Phagocytosis, degranulation and extracellular traps release by neutrophils-the current knowledge, pharmacological modulation and future prospects[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 666732. DOI: 10.3389/fphar.2021.666732.
- [7] Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability[J]. *Nat Med*, 2001, 7(10): 1123-1127. DOI: 10.1038/nm1001-1123.
- [8] Yang Y, Liu L, Guo Z, et al. Investigation and assessment of neutrophil dysfunction early after severe burn injury[J]. *Burns*, 2021, 47(8):1851-1862. DOI:10.1016/j.burns.2021.02.004.
- [9] Li L, Pian Y, Chen S, et al. Phenol-soluble modulin $\alpha 4$ mediates *Staphylococcus aureus*-associated vascular leakage by stimulating heparin-binding protein release from neutrophils[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29373. DOI:10.1038/srep29373.
- [10] Vincent ZL, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Regulation of TIMP-1 in human placenta and fetal membranes by lipopolysaccharide and demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13:136. DOI:10.1186/s12958-015-0132-y.
- [11] Xiao W, Wang L, Howard J, et al. TIMP-1-mediated chemoresistance via induction of IL-6 in NSCLC[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8): 1184. DOI:10.3390/cancers11081184.
- [12] Jung K. A strong note of caution in using matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1 in serum as biomarkers in systolic heart failure[J]. *J Intern Med*, 2008, 264(3):291-293. DOI:10.1111/j.1365-2796.2008.01952.x.
- [13] Jordán A, Roldán V, García M, et al. Matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor, TIMP-1, in systolic heart failure: relation to functional data and prognosis[J]. *J Intern Med*, 2007, 262(3):



注:rTIMP-1为重组组织金属蛋白酶抑制物1,HBP为肝素结合蛋白,MPO为髓过氧化物酶;图4B、4C横坐标中1、2、3、4分别为正常对照组(于适宜时间点检测)、单纯rTIMP-1组、单纯佛波酯组、rTIMP-1+佛波酯组;图4B中,与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与单纯佛波酯组比较,^b $P<0.05$;图4C中,与正常对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与单纯佛波酯组比较,^c $P<0.05$

图 4 4组从健康志愿者外周静脉血分离的中性粒细胞培养1 h后细胞的CD63、HBP和MPO蛋白表达。4A.细胞中CD63蛋白阳性表达率流式直方图;4B.细胞培养上清液中HBP蛋白表达箱式图[样本数为3, $M(Q_1, Q_3)$];4C.细胞培养上清液中MPO蛋白表达箱式图[样本数为3, $M(Q_1, Q_3)$]

385-392.DOI:10.1111/j.1365-2796.2007.01823.x.

[14] Jayasankar V, Woo YJ, Bish LT, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity by TIMP-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): SII180-186. DOI: 10.1161/01.CIR.0000138946.29375.49.

[15] Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. J Hypertens, 2012, 30(1): 3-16. DOI:10.1097/HJH.0b013e32834d249a.

[16] Würtz SO, Schroll AS, Mouridsen H, et al. TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update[J]. Acta Oncol, 2008, 47(4): 580-590. DOI:10.1080/02841860802022976.

[17] Lambert E, Dassé E, Haye B, et al. TIMPs as multifacial proteins[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 49(3): 187-198. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.008.

[18] Jung KK, Liu XW, Chirco R, et al. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein[J]. EMBO J, 2006, 25(17): 3934-3942. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601281.

[19] Orban C. Diagnostic criteria for sepsis in burns patients[J]. Chirurgia(Bucur), 2012, 107(6):697-700.

[20] White CE, Renz EM. Advances in surgical care: management of severe burn injury[J]. Crit Care Med, 2008, 36(7 Suppl):S318-324. DOI:10.1097/CCM.0b013e31817e2d64.

[21] Blinderman C, Lapid O, Shaked G. Abdominal compartment syndrome in a burn patient[J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4(10): 833-834.

[22] 宋明明,刘璐,戚欣欣,等.肝素结合蛋白增加烧伤早期血管通透性的机制研究[J].中华危重病急救医学, 2020, 32(3): 330-335. DOI:10.3760/cma.j.cn121430-20200123-00248.

[23] Peeters Y, Vandervelden S, Wise R, et al. An overview on fluid resuscitation and resuscitation endpoints in burns: past, present and future. Part 1 - historical background, resuscitation fluid and adjunctive treatment[J]. Anaesthesiol Intensive Ther, 2015, 47 Spec No:s6-14. DOI:10.5603/AIT.a2015.0063.

[24] Peeters Y, Lebeer M, Wise R, et al. An overview on fluid resuscitation and resuscitation endpoints in burns: past, present and future. Part 2 - avoiding complications by using the right endpoints with a new personalized protocolized approach[J]. Anaesthesiol Intensive Ther, 2015, 47 Spec No: s15-26. DOI: 10.5603/AIT.a2015.0064.

[25] 黄跃生.严重烧伤脏器损害综合防治的思考[J].中华烧伤杂志, 2020, 36(8):647-650. DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20200521-00278.

[26] Mufson MA. Pneumococcal pneumonia[J]. Curr Infect Dis Rep, 1999, 1(1):57-64. DOI:10.1007/s11908-999-0011-9.

[27] Conte MS, Desai TA, Wu B, et al. Pro-resolving lipid mediators in vascular disease[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3727-3735. DOI: 10.1172/JCI97947.

[28] Mikelis CM, Simaan M, Ando K, et al. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock[J]. Nat Commun, 2015, 6:6725. DOI:10.1038/ncomms7725.

[29] Liu L, Shao Y, Zhang Y, et al. Neutrophil-derived heparin binding protein triggers vascular leakage and synergizes with myeloperoxidase at the early stage of severe burns (with video) [J/OL]. Burns Trauma, 2021, 9:tkab030[2021-12-05]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34646891/. DOI:10.1093/burnst/tkab030.

[30] 何兴凤,伍国胜,罗鹏飞,等.脓毒症血管通透性分子调控机制研究进展[J].中华烧伤杂志, 2020, 36(10):982-986. DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20190724-00308.

[31] Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis[J]. Nat Med, 2012, 18(8): 1217-1223. DOI: 10.1038/nm.2843.

[32] Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, et al. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice[J]. Am J Pathol, 2000, 157(1):197-210. DOI:10.1016/S0002-9440(10)64531-2.

[33] Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils[J]. Immunol Rev, 2016, 273(1): 11-28. DOI: 10.1111/imr.12440.

[34] Fisher J, Linder A. Heparin-binding protein: a key player in the pathophysiology of organ dysfunction in sepsis[J]. J Intern Med, 2017, 281(6):562-574. DOI:10.1111/joim.12604.

(收稿日期:2021-08-05)