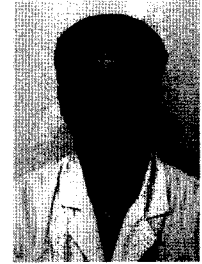


· 论 著 ·

# C 型利钠肽对血管内皮细胞株增殖能力的影响

肖乐 党永明 时德



**【摘要】** 目的 了解 C 型利钠肽(CNP)对血管内皮细胞增殖能力的影响。 方法 将所构建的含人 CNP(hCNP)的重组质粒 pcDNA3.1(+)在聚乙烯亚胺介导下转染人脐静脉血管内皮细胞株。通过反转录-聚合酶链反应、免疫组织化学和蛋白质印迹法检测该质粒的表达,用噻唑蓝法检测该质粒的表达产物对人脐静脉血管内皮细胞株增殖能力的影响。同法转染下列物质作对照:pcDNA3.1(+)(阴性对照)、增强型绿色荧光蛋白质粒(阳性对照,只用于检测转染率)、磷酸盐缓冲液(空白对照)。结果 pcDNA3.1(+)转染 48 h 后人脐静脉血管内皮细胞株的增殖能力为  $0.164 \pm 0.012$ ;与其比较,含 hCNP 的 pcDNA3.1(+)在血管内皮细胞中能高效表达,可使细胞增殖能力达  $0.301 \pm 0.096$  ( $P < 0.05$ )。 结论 CNP 具有促进血管内皮细胞增殖的生物学活性。以聚乙烯亚胺介导转染质粒、检测 CNP 在血管内皮细胞中的表达及测定被转染细胞增殖活性等方法的建立,为开展 CNP 基因治疗提供了物质基础和实验依据。

**【关键词】** 利钠肽,C 型; 质粒; 转染; 内皮细胞; 细胞增殖

**Influence of human C-type natriuretic peptide on vascular endothelial cell proliferation** XIAO Le<sup>\*</sup>, DANG Yong-ming, SHI De. <sup>\*</sup>Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, P. R. China

**【Abstract】** Objective To investigate the influence of human C-type natriuretic peptide (hCNP) on proliferation of vascular endothelial cells (HUVECs). Methods Reconstructed pcDNA3.1(+)/hCNP was transfected into HUVECs with polyethylenimine and its plasmid expression was examined with RT-PCR, immunohistochemistry and Western blot. MTT method was used to determine the effect of expressed protein on proliferation of HUVECs. pcDNA3.1(+)/hCNP transfection was used for control. Results The proliferation of HUVEC 48 h after pcDNA3.1(+)/hCNP transfection was  $(0.301 \pm 0.096)$ , which was obviously higher than that with pcDNA3.1(+) transfection ( $0.164 \pm 0.012$ ). Reconstructed pcDNA3.1(+)/hCNP might be expressed in HUVECs effectively and its protein expression was capable of promoting HUVECs proliferation markedly. Conclusion The successive expression of reconstructed pcDNA3.1(+)/hCNP and the promoting activity of its expressed protein on HUVECs lay the foundation potential therapeutic value of C-type natriuretic peptide.

**【Key words】** C-type natriuretic peptide; Plasmids; Transfection; Endothelial cells; Cell proliferation

缺血缺氧是导致严重创(烧)伤后发生脏器损害和多器官功能衰竭等严重并发症的重要原因。各种致病因素导致的血管内皮细胞损伤,通过降低脏器血液灌流和触发失控性炎症反应造成组织微循环障碍,从而引起组织器官缺血缺氧。因此,血管内皮细胞损伤是导致创(烧)伤严重并发症的关键<sup>[1,2]</sup>。C 型利钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)是 Sudoh 等<sup>[3]</sup>在 1990 年首先从猪脑组织中分离出的一种小分子蛋白。其生理调节作用涉及抑制血管平滑肌细胞增殖、促进血管再生、调节血管紧张性、直接或间

接调节血压、抑制炎症反应等<sup>[4-7]</sup>。提示 CNP 可能具有促进血管内皮细胞修复的作用,但其具体作用环节及机制国内外鲜见报道。因此笔者用已获得的 CNP 表达载体<sup>[8]</sup>转染血管内皮细胞,观察其增殖情况的变化,为进一步探讨 CNP 在创(烧)伤防治中的作用提供物质基础和实验依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料来源

1.1.1 菌株、质粒和细胞株 含人 CNP(hCNP)的重组质粒 pcDNA3.1(+)/hCNP 由重庆医科大学附属第一医院血管外科研究室构建<sup>[8]</sup>,大肠杆菌 DH5α、增强型绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-C<sub>1</sub>)和重

作者单位: 400016 重庆医科大学附属第一医院血管外科研究室(肖乐、时德);第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(党永明)

质粒 pcDNA3.1 (+) 为该单位保存, 人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 株 ECV304 由重庆医科大学李丙蓉博士惠赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 聚乙烯亚胺 (PEI, 相对分子质量为  $6 \times 10^4$ , 分枝状) 浸液购自美国 Sigma 公司; N-三羟甲基甘氨酸 (tricine) 购自北京鼎国生物技术有限公司。PCR 仪购自美国 MJ Research 公司; DU800 型紫外-可见分光光度计为美国 Beckman 公司产品; 凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

**1.2 检测指标**

**1.2.1 pcDNA3.1 (+)/hCNP 的转染效率** 转染前 24 h, 将 HUVEC 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔培养板, 分为: 转染 pcDNA3.1 (+)/hCNP (A) 组 12 孔、转染 pcDNA3.1 (+) (B) 组 12 孔、转染 pEGFP-C<sub>1</sub> 组 (C 组, 阳性对照) 6 孔、磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替质粒组 (D 组, 空白对照) 12 孔。待细胞 90% ~ 95% 融合时开始转染: 将质粒  $10 \mu\text{l}$  ( $4 \mu\text{g}$ ) 和  $9 \mu\text{l}$  PEI ( $10 \text{ mmol/L}$ ) 分别加入  $250 \mu\text{l}$   $9 \text{ g/L}$  NaCl 中混匀, 室温静置 10 min, 质粒中磷与 PEI 中氮的物质的量之比为 1.0:7.5。再将上述 2 种溶液混匀, 室温静置 10 min, 之后置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱继续培养。1 h 后将转染混合液更换为全营养培养液, 继续培养 24 ~ 72 h 待测。根据 C 组测定 PEI 介导法的转染效率。

**1.2.2 hCNP mRNA 表达的检测** 转染 36 h 后取 A、B、D 组细胞, 用反转录-PCR 法检测 hCNP mRNA 的表达, 内参照为  $\beta$  肌动蛋白。

**1.2.3 免疫组织化学法检测 hCNP 的表达** 转染 48 h 后取 A、B、D 组细胞, 用链霉卵白素-过氧化物酶法检测 hCNP 的表达。

**1.2.4 蛋白质印迹法检测 hCNP 的表达** 另取 HUVEC 以  $6 \times 10^6$  个/瓶密度接种于 100 ml 培养瓶, 将其分为: 转染 pcDNA3.1 (+)/hCNP 组 (E 组)、转染 pcDNA3.1 (+) 组 (F 组) 和 PBS 代替质粒组 (G 组), 每组 3 瓶。接种后 24 h 开始转染, 方法同前, 其中质粒  $8 \mu\text{g}$ /瓶、PEI  $18 \mu\text{l}$ /瓶。转染 72 h 后用 Tris-tricine 蛋白电泳缓冲系统检测。

**1.2.5 噻唑蓝 (MTT) 法检测 hCNP 对 HUVEC 增殖能力的影响** 于转染 24、48 h 取 A、B 组细胞培养上清液, 按照每孔 2.5、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{l}$  的梯度体积加入接种有 HUVEC 的 96 孔培养板中, 每个梯度 6 孔, 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h, 用 MTT 法检测各孔吸光度值。

**1.3 统计学处理**

部分实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.0 统计软件行方差分析。

**2 结果**

**2.1 转染效率**

PEI 介导法的转染效率为 60% 左右。

**2.2 hCNP mRNA 的表达**

A、B、D 组均有 hCNP mRNA 的表达, 但 B 组 (0.4640) 和 D 组 (0.4388) 之间的差异无统计学意义 ( $P = 0.91$ ), A 组表达水平 (1.2999) 明显高于 B 组和 D 组 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

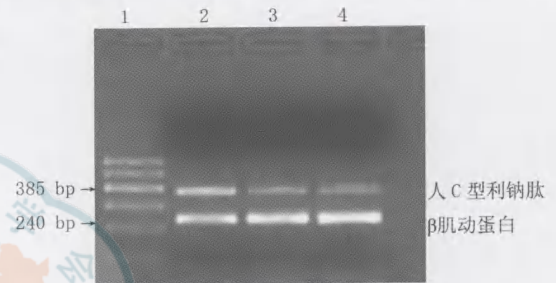


图 1 各组细胞中人 C 型利钠肽的表达。1. marker; 2. 转染 pcDNA3.1 (+)/人 C 型利钠肽组; 3. 转染 pcDNA3.1 (+) 组; 4. 磷酸盐缓冲液代替质粒组

**2.3 免疫组织化学法检测 hCNP 的表达**

hCNP 在 B、D 组均有微弱的表达, 在 A 组表达强度明显增加。见图 2、3。



图 2 转染 pcDNA3.1 (+)/人 C 型利钠肽组的血管内皮细胞呈较强的阳性表达 链霉卵白素-过氧化物酶  $\times 400$



图 3 转染 pcDNA3.1 (+) 组的血管内皮细胞阳性表达较弱 链霉卵白素-过氧化物酶  $\times 400$

### 2.4 蛋白质印迹法检测 hCNP 的表达

hCNP 蛋白在 F、G 组中均有表达 (0.0221、0.0179), 其表达强度无明显差异 ( $P = 0.09$ ), 而在 E 组中表达强度增至 0.0359, 显著高于 F、G 组 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

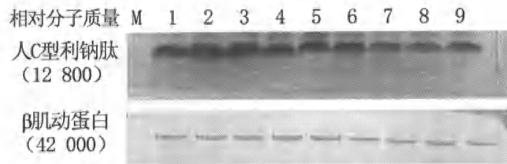


图 4 各组分 C 型利钠肽的表达。M 为 marker; 1~3 为转染 pcDNA3.1(+)/人 C 型利钠肽组; 4~6 为转染 pcDNA3.1(+); 7~9 为磷酸盐缓冲液代替质粒组

### 2.5 hCNP 对 HUVEC 增殖能力的影响

当与 HUVEC 共培养的细胞上清液体积为 2.5、5.0  $\mu\text{l}$  时, A、B 组细胞的增殖能力无明显差异 ( $P > 0.05$ )。当上清液体积增至 20.0  $\mu\text{l}$  时, A 组转染 48 h 所取上清液与 HUVEC 共培养后, 细胞增殖能力明显高于 B 组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 人 C 型利钠肽对人脐静脉血管内皮细胞增殖能力的影响

组别	用于共培养的细胞上清液体积( $\mu\text{l}$ )			
	2.5	5.0	10.0	20.0
转染 pcDNA3.1(+)				
转染 24 h	0.177 $\pm$ 0.036	0.133 $\pm$ 0.010	0.116 $\pm$ 0.003	0.164 $\pm$ 0.032
转染 48 h	0.206 $\pm$ 0.084	0.133 $\pm$ 0.044	0.137 $\pm$ 0.010	0.164 $\pm$ 0.012
转染 pcDNA3.1(+)/人 C 型利钠肽组				
转染 24 h	0.201 $\pm$ 0.072	0.199 $\pm$ 0.101	0.101 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.184 $\pm$ 0.054 <sup>b</sup>
转染 48 h	0.168 $\pm$ 0.044	0.257 $\pm$ 0.202	0.157 $\pm$ 0.033	0.301 $\pm$ 0.096 <sup>a</sup>

注: 数据为吸光度值; 共培养的细胞上清液每个梯度体积加入 6 孔; 与转染 pcDNA3.1(+ ) 组同时相点比较, a:  $P < 0.05$ ; 与本组转染 48 h 比较, b:  $P < 0.05$

### 3 讨论

利钠肽家族是一类结构相似的血管活性肽, 该家族目前已知的成员有 5 个, 分别为: 心房利钠肽、脑利钠肽、CNP、血管利钠肽和利尿素<sup>[9]</sup>。除脑组织外, CNP 主要表达于血管内皮细胞<sup>[10]</sup>。近年的研究表明, 血管内皮细胞除具有血管屏障功能外, 还可通过产生多种生物学活性物质而发挥重要生理调节作用<sup>[11]</sup>。这些物质主要包括: 凝血酶调节蛋白、依前列醇、组织型纤溶酶原激活剂、一氧化氮、肝素样分

子、腺苷二磷酸酶、内皮超极化因子、硫酸肝素等。血管内皮细胞损伤将导致其生理调节作用减弱或丧失, 从而发生一系列的损伤反应<sup>[11]</sup>。

严重创(烧)伤后血管内皮细胞损伤导致组织缺血缺氧的具体机制主要包括: 血管内皮细胞间连接开放或细胞脱落导致屏障功能受损, 从而引起组织灌注不足; 血管内皮调节血管张力功能受损引起血管收缩尤其是微静脉持续收缩, 造成血液淤滞、微循环障碍; 凝血系统失衡导致血液呈高凝状态甚至发生弥漫性血管内凝血; 血管内皮细胞与粒细胞黏附增加从而导致过度炎症反应等<sup>[2]</sup>。因此, 保护血管内皮细胞, 减轻其在严重创(烧)伤后的损伤, 对治疗或减少伤后脏器损害及并发症具有非常重要的意义, 而 CNP 可能发挥关键性保护作用。

基因治疗的载体系统是目前研究的热点, 虽然病毒系统具有高效的转染能力, 但非病毒系统的安全、稳定、经济和易操作等优点逐渐引起人们的兴趣。转染血管内皮细胞常用的非病毒方法包括脂质体、葡聚糖和电穿孔等, 其中脂质体和电穿孔的效率较高。脂质体价格昂贵, 电穿孔法不仅需要专用设备, 而且细胞需求量大。PEI 是一种新型的高密度电荷阳离子多聚物, 有线状和分枝状 2 种结构, 具有大量能被质子化的氨基, 特别是分枝状 PEI 有“质子海绵”的美称<sup>[12]</sup>。氮丙啶基团在酸催化下形成多聚网状结构的 PEI, 容易与 DNA 分子结合。作为细胞正常的防御机制, 转染入的 DNA 会被溶酶体逐渐内吞、降解, 但是 PEI 上的质子化氨基团使其对溶酶体内的低 pH 值环境具备很高的缓冲能力, 这将保护 DNA 免遭溶酶体降解; 同时可诱导溶酶体膜破裂使之将内吞的 DNA 释放入细胞质, 因此 PEI 介导法具有较高的转染效率。本实验中检测到 PEI 介导 pEGFP-C<sub>1</sub> 转染 HUVEC 的转染效率为 60% 左右。

本实验结果证明, CNP 具备促进血管内皮细胞增殖的生物学活性。其作用机制可能是 CNP 与第二信使——鸟苷酸环化酶耦联的细胞膜受体结合后, 催化鸟苷三磷酸转换为环鸟苷一磷酸, 然后活化环鸟苷一磷酸依赖的蛋白激酶, 继而激活下游通路蛋白激酶  $\beta$ 、细胞外信号调节激酶 1 和 2, 从而发挥促进血管内皮细胞修复的生物学效应<sup>[13]</sup>。

### 参考文献

- [1] 杨宗城. 严重烧伤治疗进展与展望. 中华烧伤杂志, 2006, 22(3): 237-240.
- [2] 杨宗城. 烧伤后血管内皮细胞损伤及其在早期脏器损害中的作用. 中华烧伤杂志, 2001, 17(3): 133-135.

[3] Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168(2): 863-870.

[4] Doi K, Ikeda T, Itoh H, et al. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. *Arterio Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(6): 930-936.

[5] Yamahara K, Itoh H, Chun TH, et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6): 3404-3409.

[6] Ono K, Mannami T, Baba S, et al. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertens Res*, 2002, 25(5): 727-730.

[7] Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25(4): 585-590.

[8] 肖乐, 赵渝, 时德. 人 C 型利钠肽基因的克隆及其真核表达载体的构建. *重庆医科大学学报*, 2006, 31(4): 474-477.

[9] Pandey KN. *Biology of natriuretic peptides and their receptors. Peptides*, 2005, 26(6): 901-932.

[10] Pelisek J, Fuchs AT, Kuehn A, et al. C-type natriuretic peptide for reduction of restenosis: gene transfer is superior over single peptide administration. *J Gene Med*, 2006, 8(7): 835-844.

[11] Ijiri Y, Naemura A, Yamashita T, et al. Mechanism of the antithrombotic effect of dietary diacylglycerol in atherosclerotic mice. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006, 35(5): 380-387.

[12] Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(3): 630-648.

[13] Chauhan SD, Hobbs AJ, Ahluwalia A. C-type natriuretic peptide: new candidate for endothelium-derived hyperpolarising factor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1878-1881.

(收稿日期: 2006-07-25)  
(本文编辑: 赵敏)

· 经验交流 ·

## 地震致成批烧伤的特点

崇恩球 张正学 侯经元 陈远

成批烧伤已屡见不鲜<sup>[1-3]</sup>,但地震所致成批烧伤较为罕见。笔者单位 2003 年 2 月收治地震致成批烧伤患者 40 例,现就其特点分析如下。

2003 年 2 月 24 日上午 10:00,新疆巴楚县发生 6.8 级地震,地震致各种损伤住院患者共 1256 例,其中烧伤 40 例占 3.18%。烧伤患者中男 12 例、女 28 例(妊娠 2 例), <13 岁 7 例、13~49 岁 30 例、>49 岁 3 例,Ⅲ度烧伤 17 例、浅Ⅱ、深Ⅱ度烧伤 23 例,总面积均 <50% TBSA。致伤原因:火焰烧伤 13 例、热液烫伤 26 例、电熨斗烫伤 1 例。复合伤情况:脑震荡 4 例、肋骨骨折 1 例、右锁骨骨折 1 例。烧伤部位:四肢 31 例、躯干 2 例、躯干及四肢 6 例、颈部及躯干 1 例。伤后转入笔者单位时间:第 3 天 7 例、第 4 天 8 例、第 5 天 9 例、第 6 天 8 例、第 7 天 8 例。患者均治愈出院。

**讨论** 本批烧伤患者以妇女和儿童为主,所占比例为 80%。地震时间在冬季正是本地居民做早饭的时间。做饭一般是女性承担的家务,学龄前儿童多随其母左右,因此本组中有 6 例学龄前儿童与母亲同时受伤。当地震发生时男性相对女性反应较快,可及时跑出房间,而女性及小儿动作相对缓慢,加之有 2 例女性为中晚期妊娠。

其他原因导致的成批烧伤,患者相对集中,收治较容易。但由于本地地域广阔,本批烧伤患者分布较零散,加上交通落后及非烧伤患者亦较多,很难做到明确分类并及时救治<sup>[4]</sup>。本组 40 例患者均在伤后 3~7 d 陆续收入笔者单位。

瓦斯、油罐、液化气、火药燃爆所致的烧伤原因比较单一,烧伤时间、地点及模式基本相同,且以暴露的四肢及面部烧伤为主,合并吸入性损伤者偏多<sup>[5-6]</sup>。而本批地震烧伤虽

发生在同一时间,但具体致伤原因及模式有别,以四肢烧伤为主,无一例头面部烧伤及吸入性损伤。本组患者烧伤总面积均在 50% TBSA 以下,Ⅲ度烧伤的患者共 17 例,占 42.5%。原因可能有以下几点:地震时患者正在做饭、进餐或烤火,慌乱中倒下或被碰翻的热源多种多样;本地区经济落后,房屋均为平房,一旦倒塌后其内部即与外界相通,且家中一般无易燃物品,未发生较大火情,吸入性损伤和大面积烧伤的可能性较小;患者肢体被倒塌的房屋压住、无法及时离开受伤现场,易导致深度烧伤。

本批烧伤患者普遍存在恐惧、焦虑、悲哀的心理状态。强烈地震致房屋瞬间倒塌,使患者对地震产生极度恐惧,住院期间发生余震时,其他患者反应不大,但本批患者表现为狂奔或吼叫,有 2 例年轻女性患者听到响声即吼叫。因地震造成财产重大损失或家中亲人遇难,患者入院后不免担心日后的生活,表现为睡眠不佳、食欲差、不安心住院,部分患者病情一旦好转、生活能够自理即要求出院。

### 参考文献

[1] 詹剑华,张红艳,李国辉,等.成批烧伤的临床分析及早期处理. *中华烧伤杂志*, 2004, 20(3): 181-182.

[2] 李建洪,刘东,李发富,等.成批烧伤患者救治体会. *医药论坛杂志*, 2006, 27(7): 48.

[3] 李天宇,赵俊祥.成批大面积烧伤救治的经验. *中国烧伤创疡杂志*, 2005, 17(3): 196-198.

[4] 孙志刚.地震灾害医疗救援的特点及误区. *医学与社会*, 2003, 16(5): 7-8.

[5] 王海林,宋斌.治疗成批特重烧伤复合伤伴吸入性损伤 16 例. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(2): 135.

[6] 黄静,陈晓武,尹敬光,等.成批特重烧伤伴吸入性损伤的救治. *实用医学杂志*, 2005, 21(8): 852-853.

(收稿日期: 2006-06-26)  
(本文编辑: 赵敏)

作者单位: 844200 新疆维吾尔自治区疏勒县,解放军第十二医院烧伤整形科