

严重烧伤后中性粒细胞对血管内皮细胞形态与功能的影响及参麦注射液对其作用的实验研究

黄金华 赵风景 刘亦峰 徐刚 周杰



【摘要】 目的 了解严重烧伤后中性粒细胞(PMN)对血管内皮细胞形态与功能的影响及参麦注射液对内皮细胞的保护作用。方法 从健康体检者和烧伤患者(伤后 6、24、48 h)静脉血中分离出 PMN,与血管内皮细胞株 ECV304 体外共培养,采用噻唑蓝法检测 ECV304 细胞活力,放射免疫法检测培养上清液中内皮素 1、一氧化氮(NO)的含量,并计算两者的比值(内皮素 1/NO)。另取伤后 24 h 血液标本与 ECV304 共培养,分别加入等渗盐水及 0.5、2.0、8.0 g/L 参麦注射液各 100 μ L,观察参麦注射液对上述指标及 ECV304 形态的影响。结果 与健康体检者比较,在伤后 6 h 的 PMN 刺激下 ECV304 活力明显下降、内皮素 1 含量明显上升($P < 0.01$),伤后 24 h 的 PMN 刺激时尤为显著;而伤后 6 h 在 PMN 刺激下 NO 含量明显上升达峰值[(48.9 ± 2.6) μ mol/L, $P < 0.01$],伤后 24、48 h PMN 刺激 ECV304 的 NO 含量与健康体检者比较,无明显差异($P > 0.05$);内皮素 1/NO 的变化趋势同内皮素 1。加入不同浓度参麦注射液共培养后,可使内皮细胞活力明显上升、内皮素 1 含量明显下降、NO 含量明显升高,其中中浓度参麦注射液可使体系中内皮细胞形态近似正常。结论 严重烧伤后 PMN 对血管内皮细胞形态、细胞活力、内皮素 1/NO 均有不同程度的影响,且以伤后 24 h 的 PMN 刺激最明显;参麦注射液可以改善上述情况,对严重烧伤后血管内皮细胞损伤具有保护作用。

【关键词】 烧伤; 内皮细胞; 内皮缩血管肽类; 一氧化氮; 参麦注射液; 中性粒细胞

Influence of neutrophils from severe burn patients on morphology and function of vascular endothelial cells and the protective effect of intervention with Shenmai concoction HUANG Jin-hua, ZHAO Feng-jing, LIU Yi-feng, XU Gang, ZHOU Jie. Department of Burn and Plastic Surgery, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou University Medical Academy, Yangzhou 225001, P. R. China

【Abstract】 **Objective** To study the influence of neutrophils from severe burn patient on the morphology and function of vascular endothelial cells (VEC), and the protective effect of Shenmai concoction on VEC. **Methods** Neutrophils were isolated from the venous blood of healthy volunteers and burn patients [at 6, 24, 48 post burn hour (PBH)], and they were cocultured with VECs (ECV304) in vitro. The viability of VECs was assessed by MTT. The contents of endothelin (ET) 1 and nitric oxide (NO) in supernatant were determined by radioimmunoassay, the ratio between ET-1 and NO (ET-1/NO) was also calculated. Blood samples from burn patients were collected at 24 PBH to repeat experiment as above, but 100 μ L isotonic saline or 100 μ L Shenmai concoction in concentrations of 0.5, 2.0, 8.0 g/L was added to the cultures respectively. The effect of Shenmai concoction on above indices and morphology of ECV304 were also observed. **Results** Compared with neutrophils from healthy volunteers, the activity of VECs cocultured with neutrophils from burn patients at 6 PBH was obviously decreased, the content of ET-1 obviously increased, especially with neutrophils obtained at 24 PBH ($P < 0.01$). The content of NO in supernatant of VEC co-cultured with neutrophils from burn patients at 6 PBH was increased obviously (48.9 ± 2.6 μ mol/L, $P < 0.01$). There were no obvious difference in the content of NO under the stimulation of neutrophils between that of healthy volunteers and burn patients blood obtained at 24, 48 PBH ($P > 0.05$). With different concentrations of Shenmai, the activity of VECs and the content of NO were obviously increased, while the content of ET-1 was significantly decreased. The morphology of VECs after treatment of neutrophils of 24 PBH and 2.0 g/L Shenmai was similar to normal VECs. **Conclusion** The morphology, activity of VEC, and ET/NO can be affected by neutrophils after severe burn, especially that of 24 PBH in vitro. Shenmai concoction can ameliorate above indices, thus might possibly exert protective effects on VECs after severe burn.

【Key words】 Burns; Endothelial cells; Endothelins; Nitric oxide; Shenmai injection; Neutrophils

作者单位: 225001 江苏扬州, 扬州大学临床医学院苏北人民医院烧伤整形科(黄金华、刘亦峰、徐刚、周杰); 杭州整形医院(赵风景)

以往的研究表明, 炎症反应介导的血管内皮细胞损伤在烧伤脏器损害过程中起关键作用^[1]。参麦注射液由人参和麦冬两味药组成, 具有防治冠心病与抗肿瘤的作用^[2], 为当今治疗心血管疾病的常用药物。本实验拟观察严重烧伤后中性粒细胞(PMN)对血管内皮细胞形态和功能的影响, 以及参麦注射液对内皮细胞的保护作用, 为减少严重烧伤后早期并发症提供实验依据。

1 对象与方法

1.1 临床资料

选择 2006 年 3—9 月入院的严重烧伤患者 9 例, 其中男 7 例、女 2 例, 烧伤总面积(62 ± 18)%、其中Ⅲ度(28 ± 19)% TBSA, 年龄(45 ± 22)岁, 均于伤后 6 h 内入院(烧伤组)。取同期健康查体者 10 名作为正常对照组, 其中男 8 例、女 2 例, 年龄(38 ± 10)岁。组间年龄相似($P > 0.05$), 均排除自身免疫性疾病、原发感染性疾病、恶性肿瘤、肝肾功能障碍、外伤等可能对本研究有影响的疾病。

1.2 材料来源

人脐静脉血管内皮细胞株 ECV304(中国科学院上海药物研究所), M199 培养基(美国 Gibco 公司), 超级新生胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司), 胰蛋白酶(1:250, 上海实生细胞生物有限公司, 进口分装), 噻唑蓝(MTT, 华美生物工程公司, 进口分装), 二甲亚砜(DMSO, 分析纯, 上海生工生物工程有限公司), 聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分离液(上海华精生物与科技有限公司), 参麦注射液(杭州正大青春宝药业有限公司)。

1.3 内皮细胞的培养

常规复苏 ECV 304 细胞株, 收集细胞悬浮于含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素和体积分数 10% FBS 的 M199 培养液, 接种于培养瓶中常规培养。取传至第 3~8 代的细胞备用。

1.4 人外周血 PMN 的制备

抽取健康体检者和烧伤组患者伤后 6、24、48 h 静脉血(供者均知情同意)3~5 mL, 加入 1/4 体积的等渗盐水(含 6 g/L 右旋糖酐), 室温斜置 30~45 min, 使红细胞下沉。取上层细胞按体积比 1:1 叠加到聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分离液面上, 离心半径 20 cm, 5000 r/min 离心 30 min。将沉淀细胞用 8.3 g/L NH_4Cl 溶液去除红细胞, 离心洗涤后悬浮于 2~3 mL 含 1 g/L 白明胶的 Hank 溶液中, 计数并调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL。取细胞涂片, 分类计数

确认 PMN 大于 0.95, 锥虫蓝染色活细胞大于 95%。

1.5 内皮素 1、一氧化氮(NO)的测定

将 ECV304 接种于 96 孔板(1×10^5 个/孔), 隔夜培养后, 用 M199 培养基冲洗 2 次, 加入烧伤后各时相点的中性粒细胞悬液 100 μL (1×10^6 个/孔), 常规培养半小时。提取培养板上清液, 按照内皮素放射免疫试剂盒(解放军总医院科技开发中心放射免疫所)、NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书测定内皮素 1、NO 含量, 并计算两者的比值(内皮素 1/NO)。

1.6 细胞活力的测定

选取对数生长期 ECV304 细胞, 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 再加入 PMN 悬液(1×10^4 个/mL) 100 μL 。连续培养 3 d 后加入 MTT 溶液, 使其终浓度达 20 g/L, 继续培养 4 h。小心吸去培养液, 以 150 μL DMSO 溶解结晶物, 振荡 10 min, 采用自动酶标分析仪(上海天呈科技有限公司)测量波长 490 nm 处吸光度值。

1.7 参麦注射液对血管内皮细胞的影响

经前述实验得知, 伤后 24 h 静脉血分离培养的 PMN 与内皮细胞共培养时上述指标变化最显著。取伤后 24 h 静脉血重复上述实验时分别加入等渗盐水及 0.5、2.0、8.0 g/L 参麦注射液各 100 μL , 培养 30 min, 观察参麦注射液对细胞形态、细胞活力及培养上清液内皮素 1、NO 含量的影响。

1.8 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞活力及内皮素 1、NO 含量

与烧伤后 6、24、48 h 的 PMN 共培养后, ECV304 细胞活力依次为 2.04 ± 0.23 、 1.90 ± 0.21 、 1.85 ± 0.21 , 较与正常人 PMN 共培养时显著下降; 内皮素 1 含量依次为 (131 ± 9)、(204 ± 16)、(155 ± 11) pg/mL, 较与正常人 PMN 共培养时显著升高($P < 0.01$)。伤后 24、48 h 的 PMN 刺激下 ECV304 NO 含量无明显变化($P > 0.05$)。将 2.0 g/L 参麦注射液加入共培养体系后, 内皮细胞活力(2.44 ± 0.27)、NO 含量[(50.1 ± 2.0) $\mu\text{mol/L}$]显著上升而内皮素 1 含量[(109 ± 11) pg/mL]显著下降($P < 0.01$), 与加入 8.0 g/L 参麦注射液的效果相似。内皮素 1/NO 的变化同内皮素 1。见表 1, 2。

表 1 正常人及烧伤患者 PMN 对血管内皮细胞功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

刺激因素	样本数	细胞活力	内皮素 1 (pg/mL)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	内皮素 1/NO
正常人 PMN	10	2.19 ± 0.21	75 ± 5	39.0 ± 1.7	1.92 ± 0.14
烧伤患者不同时相点的 PMN					
伤后 6 h	9	2.04 ± 0.23 ^a	131 ± 9 ^a	48.9 ± 2.6 ^a	2.69 ± 0.23 ^a
伤后 24 h	9	1.90 ± 0.21 ^a	204 ± 16 ^a	40.2 ± 1.7	5.07 ± 0.42 ^a
伤后 48 h	9	1.85 ± 0.21 ^a	155 ± 11 ^a	37.7 ± 1.5	4.11 ± 0.32 ^a

注:细胞活力以吸光度值表示;PMN 为中性粒细胞;NO 为一氧化氮;与正常人 PMN 刺激比较,^a*P* < 0.01

表 2 参麦注射液对共培养体系中血管内皮细胞功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

培养添加剂	样本数	细胞活力	内皮素 1 (pg/mL)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	内皮素 1/NO
等渗盐水	9	1.85 ± 0.22	282 ± 16	38.3 ± 1.4	4.75 ± 0.44
参麦注射液					
0.5 g/L	9	1.96 ± 0.23	159 ± 16 ^a	38.6 ± 2.0	4.13 ± 0.45 ^a
2.0 g/L	9	2.44 ± 0.27 ^b	109 ± 11 ^b	50.1 ± 2.0 ^b	2.18 ± 0.28 ^b
8.0 g/L	9	2.37 ± 0.23 ^b	102 ± 13 ^b	48.9 ± 2.6 ^b	2.09 ± 0.21 ^b

注:细胞活力以吸光度值表示;NO 为一氧化氮;与等渗盐水比较,^a*P* < 0.05,^b*P* < 0.01

2.2 细胞形态学观察

正常 ECV304 贴壁生长状态良好。与烧伤组伤后 24 h PMN 共培养后,ECV304 胞体变小,细胞间隙增大,细胞间连接消失,少数细胞脱落。0.5 g/L 参麦注射液刺激下,ECV304 数量、密度增加,细胞间隙减小,细胞间连接恢复;2.0 g/L 参麦注射液刺激下,细胞壁完整、胞质饱满、立体感显著,与正常 ECV304 形态相似;8.0 g/L 参麦注射液刺激下,细胞生长密度适中,贴壁生长状态良好,细胞连接紧密。图 1~5。



图 1 正常血管内皮细胞呈铺路石状镶嵌排列 倒置相差显微镜 × 200



图 2 与烧伤组伤后 24 h 中性粒细胞培养 30 min 后,血管内皮细胞间隙增大 倒置相差显微镜 × 200



图 3 0.5 g/L 参麦注射液加入共培养体系后,血管内皮细胞间隙减小,细胞密度增加 倒置相差显微镜 × 200



图 4 2.0 g/L 参麦注射液加入共培养体系后,血管内皮细胞形态近似正常 倒置相差显微镜 × 200



图 5 8.0 g/L 参麦注射液加入共培养体系后,血管内皮细胞生长密度适中 倒置相差显微镜 × 200

3 讨论

严重烧伤后早期发生广泛的微血管通透性增强,凝血、抗凝血功能紊乱和血管功能失调,均与血管内皮细胞受损有着密切关系。正常生理状态下,内皮细胞产生缩血管物质(如内皮素)与舒血管物质(如 NO),两者比值保持在一个稳定的水平上,维持着血管正常的舒缩功能和正常的脏器血流量。烧伤后早期物理因素和体液因子引起广泛的毛细血管通透性增强,大量的体液丢失,微循环发生障碍,组织血液灌注不足,血管内皮细胞因缺氧性损害使内皮素和 NO 分泌增加且比例失调。本研究结果表明,内皮素分泌的增加比 NO 更有意义,缩血管物质的过量加重了组织缺血缺氧性损害,且在一定程度上导致复苏治疗失败。

研究表明,内皮素是迄今已知作用最强的缩血管物质,主要由血管内皮细胞合成^[3]。烧伤后内皮素水平异常增高,除发挥其强大的缩血管作用外,还直接促进了毛细血管通透性的增强^[1]。本实验结果表明,伤后内皮素 1 水平显著升高,24 h 达峰值,与烧伤后体液渗出高峰基本一致。本实验中,伤后 6 h 烧伤组 NO 水平明显高于正常对照组,伤后 24、48 h 时则与正常对照组相似。分析原因可能与下列因素有关:(1)休克。伤后 6 h NO 浓度明显升高,它有强大的扩血管作用,同时损伤血管内皮细胞,使毛细血管通透性增强,创面组织液大量外渗,有效循环血量显著减少容易产生休克。Shultz 和 Raji^[4]的研究证明,烧伤后诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性增加,NO 合成量增多,对渗出有促进作用。(2)感染。烧伤渗出液在创面内积聚,为细菌提供了充足的养分。本研究伤后 48 h NO 浓度下降,减轻了对中性粒细胞、单核细胞、酸性粒细胞的趋化作用^[5],从而抑制了机体免疫系统对细菌、真菌的诱杀能力,导致创面感染。烧伤后虽然 iNOS 活性增加,但体内结构型一氧化氮合酶大量减少,致内源性 NO 合成少。

本实验中,烧伤后各时相点内皮素 1/NO 的比值高于正常对照组。在体内,内皮素通过其 β 受体

促进 NO 释放,而 NO 则经环鸟苷一磷酸途径抑制内皮素的产生,并且 NO 还可能通过参与调节内皮素受体对内皮素产生反馈作用,使两者比值保持在稳定水平^[6],这对于维持脏器血供相对恒定极为重要。

参麦注射液中人参及总皂甙有增强心肌收缩力的作用,能促进损伤心肌 DNA 合成,加速心肌修复;麦冬为百合科多年生草本植物,能提高缺氧耐受能力,增加冠状动脉流量,对心肌有明显保护作用。参麦注射液能抑制心肌膜腺苷三磷酸酶的活性,减少细胞内钠泵出,促进细胞内外 Na⁺-Ca²⁺ 交换,使 Ca²⁺ 进入细胞内增加心肌收缩力。研究表明,加入参麦注射液后内皮素 1 水平明显降低;加入中、高浓度参麦注射液后 NO 水平明显升高,且 2.0 g/L 参麦注射液对保护血管内皮细胞功能的效果最佳,可能与它对内皮细胞选择性抑制作用有关^[7]。虽然严重烧伤患者的内皮素 1/NO 比值较健康人升高,但加入参麦注射液后该比值较加入等渗盐水降低,提示它能减少严重烧伤后内皮素 1 的生成和释放,降低内皮素 1/NO 比值,改善微循环,维持血流动力学的稳定。

参考文献

- [1] 杨宗城, 高建川. 血管内皮细胞在烧伤脏器损害发病中的作用. 中华整形烧伤外科杂志, 1995, 11(3): 225-227.
- [2] 宋建丽. 参麦注射液治疗冠心病的临床分析. 药学进展, 1999, 23(1): 44-46.
- [3] 郑红, 韩之勋. 烧伤早期血浆肾上腺髓质素及内皮素的含量变化. 中华烧伤杂志, 2001, 17(5): 279-281.
- [4] Shultz PJ, Raji L. Endogenously synthesized nitric oxide prevent endotoxin-induced glomerular thrombosis. J Clin Invest, 1992, 90(5): 1718-1725.
- [5] 冯俊明, 刘友生, 王晓东, 等. TNFα、NO 在烧伤复合内毒素血症早期肾损害中的作用及其意义. 中华烧伤杂志, 2000, 16(2): 89-92.
- [6] 彭浩, 罗成群. 复方紫草油对烧伤创面一氧化氮、内皮素、丙二醛含量的影响. 中国现代医学杂志, 2002, 12(9): 17-19.
- [7] 尹丽慧, 高承贤, 丁志山, 等. 参麦注射液对牛内皮细胞增殖抑制作用的实验研究. 浙江中医学院学报, 2002, 26(2): 48-50.

(收稿日期: 2007-06-26)

(本文编辑: 莫愚)

· 消息 ·

欢迎浏览《中华烧伤杂志》网站

为加快期刊信息的传递速度,中华烧伤杂志编辑部已建立网站,网址为 <http://web.swhospital.com/zhszz>。建议通过“Google”、“百度”等搜索引擎查找“西南医院”,从西南医院主页下方“科室网站”栏目点击“中华烧伤杂志”进行访问。内容设有本期导读、往期回顾、杂志简介、学术动态、通知公告等,欢迎广大读者和作者上网浏览。

本刊编辑部