

内皮细胞屏障与烧伤后血管通透性的关系及机制

黄巧冰

Relationship between the endothelial barrier and vascular permeability after burns and its mechanism HUANG Qiao-bing. Department of Pathophysiology, Key Laboratory for Shock and Microcirculation Research of Guangdong, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China
Corresponding author: HUANG Qiao-bing, Email: bing@fimmu.com, Tel: 020-61648186

【Abstract】 Massive burn trauma is characterized by hypovolemic shock induced by the loss of plasma from vessels. The major reasons for this systemic microvascular leakage in burns include an increase in vascular permeability triggered by inflammatory mediators and the increase of vascular hydrostatic pressure caused by vessel dilation. The maintenance of normal vascular permeability depends on the integrity of endothelial barrier function regulated by the interaction of intracellular junctions, cell-matrix adhesion and the cytoskeleton contractile force. This review summarizes some recent discovery in endothelial mechanisms during burn-induced vascular hyperpermeability.

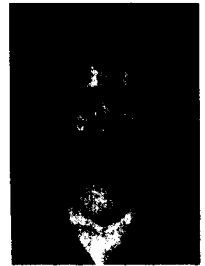
【Key words】 Burns; Endothelial cells; Permeability; Cytoskeleton; Tight junctions; Actins

【关键词】 烧伤; 内皮细胞; 通透性; 细胞骨架; 紧密连接部; 肌动蛋白类

正常血管通透性的维持有赖于血管内皮细胞屏障的完整性,内皮细胞与内皮细胞间、细胞与基底膜间的连接以及胞内骨架蛋白收缩这 3 种力量,经蛋白质相互作用,在功能和调节上互相关联^[1,2]。烧伤休克的主要临床特点是低血容量性休克,其主要原因之一是毛细血管扩张,血管通透性增加,毛细血管静水压增加,促进了血浆样液体的渗出,导致血容量锐减。关于内皮细胞屏障功能在烧伤后血管通透性变化中的作用,我们近年来做了一些研究工作。

1 烧伤后血管通透性变化的特点

较大面积烧伤患者水肿发生的高峰期集中在伤后 4~12 h^[3],并持续较长时间。烧伤后早期血管通透性的改变可缘于:热损伤的直接作用;热损伤产



生的变性蛋白激活了凝血和补

体系统;缺血再灌注产生的氧自由基;炎性细胞释放的各种炎性介质和细胞因子。本实验室利用离体和体模型证明:烧伤局部和远隔组织器官中,血管通透性的增高均远早于明显水肿的形成。在体测定大鼠皮肤烧伤局部微血管和远隔组织肠系膜微静脉的通透性,两者在伤后半小时内对白蛋白的通透性即明显增高^[4,5]。烧伤后 3~4 h 发生的水肿主要来自于继发的延迟通透性反应,炎性介质等损伤血管内皮屏障的完整性,加重了烧伤局部并通过血液循环引起远隔部位血管通透性的变化,此为体液外渗、组织水肿的主要因素。游离正常大鼠的肠系膜微静脉,再用烧伤后 3 h 的大鼠血浆进行微血管灌注并测定其通透性,结果显示其对白蛋白的通透性在 10 min 后即明显增强^[5]。

2 烧伤后内皮细胞间连接和骨架蛋白功能的变化

正常生理状态下,内皮细胞的纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F 肌动蛋白)位于细胞边缘,并与紧密连接蛋白如带状闭合蛋白 1(zonula occludens 1, ZO-1)等共存。Murphy 和 Duffy^[6]证明,用体积分数 20% 的烧伤患者血清刺激体外培养的人肺血管内皮细胞 4 h,细胞通透性明显增加,伴有细胞 F 肌动蛋白应力纤维形成和 ZO-1 离散,且 ZO-1 的蛋白含量明显降低。本实验室用体积分数 15%~20% 的烧伤血清刺激体外培养的大鼠皮肤内皮细胞和人脐静脉内皮细胞,经采用原子力显微镜、扫描电镜和荧光双重染色等观察到,细胞明显收缩、体积变小,细胞间隙增大,原来位于细胞周边的 F 肌动蛋白转化为应力纤维,ZO-1 则离开细胞周边,出现明显内化^[7]。游离大鼠烧伤局部皮肤和远隔器官肠系膜的微静脉,并进行双重染色和激光共聚焦显微镜观察,在组织水平证明:烧伤可导致血管内皮细胞骨架蛋白和紧密连接蛋白结构的改变^[8]。正常血管内皮细胞的 F 肌动蛋白和 ZO-1 分布于细胞边缘,二者形成重叠度非常高的共存图像,“勾勒”出边缘清晰且与少量平滑肌走向垂直的内皮细胞结构。用烧伤

基金项目:国家重点基础研究发展规划(2005CB522601)

作者单位:510515 广州,南方医科大学病理生理学教研室(广东省医学休克微循环重点实验室)

通讯作者:黄巧冰, Email: bing@fimmu.com, 电话:020-61648186

血清刺激血管内皮细胞 1 h 后, F 肌动蛋白和 ZO-1 的分布明显离散, 细胞结构粗糙、边缘模糊^[8]。用烧伤血清刺激体外培养的内皮细胞单层 1 h, 细胞通透性即升高了 18%, 并随着时间的延长呈上升趋势, 6 h 时较正常值增高了 63%, 其功能变化与形态学改变平行一致^[8]。

3 烧伤后内皮细胞屏障功能变化的机制

烧伤这一刺激信号是如何在内皮细胞内传递的? 大量研究提示, 小 G 蛋白家族的 Rho 蛋白、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路都参与这一过程, 并通过作用于效应蛋白如肌球蛋白轻链 (MLC) 等, 进一步影响肌动蛋白的排列和分布, 导致其与紧密连接蛋白如 ZO-1 等结构的变化。

3.1 Rho 蛋白的作用

小 G 蛋白 Ras 同源家族 Rho 蛋白是内皮细胞屏障功能的重要调节因子, 它们通过影响细胞内以肌球蛋白为主的收缩成分和内皮间连接的功能, 调节内皮细胞的通透性^[9]。RhoA 的下游效应器是 Rho 激酶, 其被激活后, 一方面使分割肌动蛋白的丝切蛋白失活, 从而促进肌动蛋白应力纤维的形成; 另一方面通过磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶亚单位 1/2 (myosin phosphatase target subunit 1/2, MYPT1/2) 抑制肌球蛋白磷酸酶活性, 以及直接磷酸化 MLC。研究证实, 用 Rho 激酶的特异性抑制剂 Y-27632 预处理或在烧伤后早期给予 Y-27632, 均能不同程度恢复体外培养的内皮细胞 F 肌动蛋白的正常分布, 减轻细胞间隙的形成, 保护内皮细胞屏障功能^[10]。用 Y-27632 孵育游离的烧伤皮肤微血管, 其通透性明显低于未经此处理的烧伤血管, 从而在组织水平验证了 Rho 蛋白在烧伤后血管通透性增高中的作用^[4]。

3.2 MAPK 的作用

MAPK 信号转导通路是真核细胞的重要调控系统^[11]。不同的 MAPK 通路甚至同一 MAPK 通路的不同亚型, 在细胞功能调节中起着不尽相同的作用^[12]。研究证明, 烧伤血清刺激能使 p38、细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 3 种 MAPK 通路发生磷酸化^[7]。p38 通路特异性抑制剂 SB203580 能明显抑制烧伤大鼠游离微静脉内皮和烧伤血清刺激的内皮细胞应力纤维形成及 ZO-1 的解离内化, ERK 通路的特异性抑制剂 PD98059 能部分抑制上述变化, 而 JNK 通路抑制剂 SP600125 则无此作用。结果提示 MAPK 对内皮细

胞功能的调节具有多样性。在整体水平, 用 p38 的上游激酶——MAPK 激酶 3/6 的无活性突变体腺病毒转染大鼠, 24 h 后制成烧伤大鼠模型, 可见烧伤局部皮肤微静脉通透性明显降低; 进一步的研究证明是 p38 的 α 和 δ 亚型而非 β 和 γ 亚型参与了对烧伤后内皮细胞功能的调节^[7,8]。研究提示, p38 MAPK 通路参与了烧伤后内皮细胞骨架重排、ZO-1 内化、细胞变形、裂隙形成及通透性增高的全过程; 阻抑该通路, 可明显逆转内皮细胞屏障功能紊乱。

3.3 MLC 激酶的作用

肌动蛋白和肌球蛋白分别是细胞内分子移动系统中的轨道和运动成分。由 MLC 激酶介导的 MLC 磷酸化, 活化肌球蛋白重链头部的腺苷三磷酸酶, 产生的能量使细胞骨架肌动蛋白微丝滑动, 导致肌动-肌球蛋白复合体形成及细胞收缩力增强, 细胞收缩。应力纤维形成是这一过程的标志^[13]。研究表明, MLC 的磷酸化水平参与了体外培养的内皮细胞或完整微静脉通透性的调节^[14,15]。提取烧伤大鼠伤后 3 h 的血浆, 立即刺激游离的大鼠肠系膜微静脉, 可导致其通透性升高; 而给予 MLC 激酶选择性抑制剂 ML-7 能够抑制这一变化^[5]。细胞水平的研究也证实, 用 ML-7 预处理细胞, 能够抑制烧伤血清所致内皮细胞收缩性应力纤维的形成^[16]。

研究证明, ML-7 能够剂量依赖性地降低静息条件下游离冠状微静脉的通透性, 表明 MLC 的磷酸化可能参与了血管通透性的生理性调节过程, 提示肌动蛋白纤维的排列是可逆的^[15]。进一步的研究结果显示, 先用烧伤血清刺激内皮细胞 30 min, 再用 ML-7 处理 30 min, 细胞内应力纤维的形成被逆转。对于这个现象可能的解释是: 当烧伤血清仅仅导致内皮细胞的功能性形态学改变时, ML-7 抑制了 MLC 的进一步磷酸化; 同时, 已发生磷酸化的 MLC 在磷酸酶的作用下发生去磷酸化, 从而导致肌动-肌球蛋白复合物的解离^[16]。这些研究结果显示, MLC 激酶介导的 MLC 磷酸化, 在烧伤血清诱导的内皮屏障功能不全过程中发挥了重要作用。

还有许多非内皮细胞因素可影响烧伤后血管通透性, 如毛细血管周细胞、基底膜的各种基质成分功能的变化、血流动力学改变等。对烧伤后血管通透性增高的内皮细胞机制进行研究, 将进一步丰富对这一严重病理过程的理解。将之与其他领域研究获得的信息结合在一起, 深入认识烧伤后血管通透性增高所致血容量降低的机制, 可为临床治疗提供新的思路。

参考文献

[1] Dudek SM, Garcia JGN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 2001, 91(4): 1487 - 1500.

[2] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(4): 549 - 553.

[3] Demling RH. The burn edema process; current concepts. *J Burn Care Rehabil*, 2005, 26(3): 207 - 227.

[4] Zheng HZ, Zhao KS, Huang QB, et al. Role of Rho kinase and actin filament in the increased vascular permeability of skin venule in rat after scalding. *Burns*, 2003, 29(8): 828 - 833.

[5] Huang Q, Xu W, Ustinova E, et al. Myosin light chain kinase-dependent microvascular hyperpermeability in thermal injury. *Shock*, 2003, 20(4): 363 - 368.

[6] Murphy JT, Duffy S. ZO-1 redistribution and F-actin stress fiber formation in pulmonary endothelial cells after thermal injury. *J Trauma*, 2003, 54(1): 81 - 90.

[7] Huang QB, Zhao M, Wang SY, et al. Cytoskeletal regulation of vascular endothelial barrier function in burn shock // Abstracts symposia in for 12th ICB/5th ICCH. Amsterdam: Biotheology, 2005, 42(1/2): 87.

[8] Hang Q, Zhao M, Wang SY, et al. The role of p38 α and p38 δ MAP kinases in the genesis of increased vascular permeability in burns // Abstracts for the 8th world Congress for Microcirculation. New York: Microcirculation, 2007, 14(4/5): 506.

[9] Hirase T, Kawashima S, Wong E, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160 ROCK-dependent and independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 10423 - 10431.

[10] 郑惠珍, 黄巧冰, 赵克森. Rho 激酶抑制剂 Y-27632 部分预防烧伤血清诱导的内皮屏障功能损害. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(7): 1157 - 1162.

[11] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995, 9(9): 726 - 735.

[12] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK - activated protein kinases; a family of protein kinases with diverse biological functions. *J Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2): 320 - 344.

[13] Geeve MA, Holmes KC. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 687 - 728.

[14] Sheldon R, Moy A, Lindsley K, et al. Role of myosin light chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 1993, 265(6): 606 - 612.

[15] Yuan Y, Huang Q, Wu HM. Myosin light chain phosphorylation; modulation of basal and agonist-stimulated venular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1997, 272(41): 1437 - 1443.

[16] Chen B, Guo X, Wang S, et al. Myosin light chain kinase contributes to cytoskeletal alteration of endothelial cells by rat burn serum. *J Firs Mil Med Univ*, 2004, 24(5): 481 - 484.

(收稿日期: 2007-06-26)
(本文编辑: 罗勤)

· 病例报告 ·

重度吸入性损伤后气管支气管狭窄一例

田晓东 何友德 肖晓兰 阳宏 李登伦 陈向光 鲁正鲜

患者男, 31 岁, 不慎掉入煤窑炉内烧伤, 伤后 2 h 送入笔者单位。查体: 生命体征平稳, 无明显声音嘶哑, 口腔内有大量煤灰, 头、面、颈、躯干、四肢、臀部、外阴烧伤 92%, 其中浅 II 度 22%、深 II 度 33%、III 度 37% TBSA, 合并重度吸入性损伤、口腔黏膜烧伤。入院后行气管切开及常规抗休克、抗感染等治疗。气管切开吸痰时未见气管内有煤灰。患者休克度过不平稳, 伤后 5 d 行四肢切削痂 + 微粒皮移植 + 异体皮覆盖术。伤后 11 d 见气管导管有食物流出, 行纤维支气管镜检查, 确定无气管食管瘘, 系会厌部严重烧伤致吞咽功能障碍所致, 声带亦被烧伤。此后患者进食、饮水呛咳, 并发双肺吸入性肺炎, 给予留置鼻胃管营养。经 4 次植皮手术, 伤后 60 d 患者创面基本愈合, 但气管导管处仍常有食物溢出, 暂不拔管。伤后 70 d 气管导管堵塞, 患者不能呼吸。伤后 80 d 翻身俯卧时患者全身发绀, 几乎窒息, 立即翻身仰卧, 呼吸囊按压约 2 ~ 3 min 后面色转红润。纤维支气管镜检查见气道瘢痕挛缩、狭窄; CT 检查证实气管、左右主支气管显著狭窄, 段支气管以下未见明显狭窄。吸痰时插入外径为 3.3 mm 的吸痰管较困难, 患者多次出现极度呼吸困难、窒息。伤后 189 d 患者意识恍惚, 大小便失禁, 床旁胸部 X

线片提示双肺感染。伤后 192 d 患者吸痰时突然窒息, 经气囊辅助呼吸、胸外心脏按压等抢救无效死亡。

讨论 吸入性损伤是烧伤患者死亡的主要原因之一^[1], 重度吸入性损伤的病死亡率高达 80% 以上。该损伤引起的气管、支气管狭窄, 多由于伤及气管黏膜基底层以下, 又因气管导管套囊长期压迫气管黏膜加重了黏膜损伤, 形成瘢痕并挛缩所致^[2]。气管支气管狭窄一旦形成, 较难治疗, 因此预防很重要。本例患者伤后由瘢痕组织挛缩引起的气管、支气管环形狭窄逐渐加重, 加之并发吸入性肺炎, 排痰困难, 感染反复发作, 虽然加强抗感染等治疗措施, 但未能从根本上解决问题, 最终导致患者死亡。笔者认为, 对于气道烧伤后瘢痕狭窄可采取扩张术, 狭窄范围为 4 ~ 6 cm 者, 可将病灶切除后修复或吻合, 有时可安装支架; 但对于从气管到 2、3 级支气管均广泛狭窄者, 目前尚无有效解决方法。

参考文献

[1] 路卫, 夏照帆, 陈旭林. 吸入性损伤后预防性气管切开与紧急气管切开的临床研究. *中华烧伤杂志*, 2003, 19(4): 233 - 235.

[2] 曾勇, 张文奎. 吸入性损伤致气管狭窄并发窒息一例. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(3): 148.

(收稿日期: 2007-05-23)
(本文编辑: 罗勤)

作者单位: 617023 四川攀枝花钢铁有限责任公司职工总医院烧伤科