

巨噬细胞对内皮细胞系同源盒 B2 基因和血管内皮生长因子受体 mRNA 及整合素 $\alpha\nu\beta 3$ 表达的影响

刘亮 刘畅 张晓启 明佳 刘旭盛 徐辉 程天民

【摘要】 目的 体外观察巨噬细胞(M ϕ)对血管内皮细胞同源盒(HOX)B2 基因 mRNA 和血管内皮生长因子(VEGF)受体 KDR mRNA 及整合素 $\alpha\nu\beta 3$ 表达的影响。方法 体外培养人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304,分为(1)ECV304 组;(2)ECV304 + 伴刀豆球蛋白 A(conA,终浓度 25 mg/L)组;(3)ECV304 + 人 M ϕ 系 U937 组;ECV304 细胞中加入 1×10^5 /ml U937 细胞;(4)ECV304 + U937 + conA 组;ECV304 中加入 1×10^5 /ml U937 细胞及终浓度 25 mg/L 的 conA。反应 48 h 后,用免疫荧光技术检测各组 ECV304 细胞整合素 $\alpha\nu\beta 3$ 的表达情况,并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测细胞 KDR mRNA 和 HOXB2 基因 mRNA 的表达水平。结果 ECV304 组细胞的整合素 $\alpha\nu\beta 3$ 、KDR mRNA 及 HOXB2 基因 mRNA 的表达水平分别为 6.7 ± 1.5 、 0.633 ± 0.012 、 0.674 ± 0.004 。ECV304 + U937 + conA 组细胞上述指标较 ECV304 组均明显上调($P < 0.01$),分别为 10.2 ± 1.7 、 0.879 ± 0.003 、 0.947 ± 0.003 。其余两组细胞上述指标与 ECV304 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 被 conA 活化的 M ϕ 通过影响内皮细胞的 KDR mRNA、HOXB2 mRNA 基因及整合素 $\alpha\nu\beta 3$ 的表达,来促进内皮细胞增殖、迁移及与基质黏附,从而调节血管生成。

【关键词】 U937 细胞; 基因,同源盒; 受体,玻连蛋白; 内皮生长因子; 内皮细胞

Influence of macrophages on the expression of vascular endothelial growth factor receptor mRNA, homeobox B2 mRNA, and integrin $\alpha\nu\beta 3$ in vascular endothelial strain LIU Liang*, LIU Chang, ZHANG Xiao-qi, MING Jia, LIU Xu-sheng, Xu Hui, CHENG Tian-min. *State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: LIU Xu-sheng, Email: Liuxusheng2002@hotmail.com, Tel: 023-68752865

【Abstract】 Objective To investigate the influence of macrophages on the expression of the vascular endothelial growth factor(VEGF) receptor (KDR) mRNA, homeobox B2 (HOXB2) mRNA, and integrin $\alpha\nu\beta 3$ in vitro in vascular endothelial strain. Methods Human umbilical vein cells (ECV304) were cultured in vitro and divided into 4 groups, i. e. (1) ECV304 group, (2) ECV304 + conA group [with conA (25 μ g/ml in culture) added to ECV304], (3) ECV304 + U937 group (with 1×10^5 /ml of U937 cells added to 1×10^5 /ml ECV304), (4) ECV304 + U937 + conA group [with 1×10^5 /ml of U937 cells and conA (25 μ g/ml in culture)] groups. Forty-eight hours after culturing, the expression of integrin receptor $\alpha\nu\beta 3$ and the changes in the expression of KDR mRNA and HOXB2 mRNA in each group were determined by immunofluorescent technique and RT-PCR, respectively. Results The expression of integrin receptor $\alpha\nu\beta 3$, KDR mRNA, and HOXB2 mRNA in ECV304 group were 6.7 ± 1.5 , 0.633 ± 0.012 , and 0.674 ± 0.004 , respectively, while those in ECV304 + U937 + conA group (10.2 ± 1.7 , 0.879 ± 0.003 , 0.947 ± 0.003) were obviously more upregulated when compared with those in ECV304 group ($P < 0.01$). No difference in the above indices was found between ECV304 and ECV304 + conA, ECV304 + U937 groups ($P > 0.05$). Conclusion Macrophages activated by ConA can accelerate the proliferation, migration and adhesion to the basement membrane matrix of vascular endothelial cells through the influence on the expression of KDR mRNA, HOXB2 mRNA and integrin $\alpha\nu\beta 3$, and through this pathway the angiogenesis is modulated.

【Key words】 U937 cells; Genes, homeobox; Receptors, vitronectin; Endothelial growth factor; Endothelial cell

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054205)

作者单位:400038 重庆,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[刘亮(现在南方医科大学南方医院烧伤科,510515)、刘旭盛、明佳];南京军区总医院干部肿瘤科(刘畅);第三军医大学全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(程天民、徐辉);解放军第二三四医院烧伤科(张晓启)

通信(讯)作者:刘旭盛,Email:Liuxusheng2002@hotmail.com,电话:023-68752865

巨噬细胞(Mφ)在创伤愈合过程中具有重要作用^[1],参与了包括病理性和生理性创伤愈合以及肿瘤在内的多种情况下的新生血管生长^[2]。Mφ可以分泌许多对血管内皮细胞产生作用的物质,但以往的研究多局限于单一细胞因子对内皮细胞的影响。本实验通过建立人 Mφ 系 U937 与人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304 体外共培养模型,并加入伴刀豆球蛋白 A(concanavalin A, conA)刺激,探讨 Mφ 对内皮细胞同源盒(homeobox, HOX) B2 基因 mRNA 和血管内皮生长因子(VEGF)受体 KDR mRNA 及整合素 αvβ3 表达的影响。

材 料 与 方 法

一、细胞来源及培养

人 Mφ 系 U937 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,人脐静脉血管内皮细胞系 ECV304 购自美国 ATCC 公司。均用 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,加入体积分数 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素、链霉素)于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养,换液 1 次/3 d。

二、整合素 αvβ3 表达情况的检测

1. 实验分组:常规消化对数生长期的 ECV304 细胞,接种于 6 孔培养板中。待细胞 60% 融合时,分为 4 组,每组 3 孔:(1) ECV304 组:正常条件下培养 ECV304 细胞,作为实验对照。(2) ECV304 + conA 组:ECV304 中加入 conA(美国 Sigma 公司,终浓度 25 mg/L),48 h 后终止反应。(3) ECV304 + U937 组:ECV304 中加入 1 × 10⁵/ml U937,共同培养 48 h 后洗去 U937。(4) ECV304 + U937 + conA 组:ECV304 中加入 1 × 10⁵/ml U937 及终浓度 25 mg/L conA,反应 48 h 后洗去 U937 及 conA。

2. 整合素 αvβ3 表达的检测:反应结束后,常规消化以上各组 ECV304 细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)离心洗涤,调整细胞密度为 1 × 10⁶/ml。取此细胞悬液 0.2 ml,离心半径 22 cm,4 000 r/min 离心 3 min。弃上清,加入 1 g/L 的牛血清白蛋白重悬细胞,室温下放置 10 min。PBS 离心洗涤 3 遍,加入稀释度为 1:1 000 的整合素 αvβ3 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),4 ℃ 孵育 40 min。PBS 离心洗涤 3 遍,加入稀释度为 1:80 的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗 IgG(武汉博士德生物工程公司),4 ℃ 孵育 30 min。PBS 离心洗 3 遍,加入 0.6 ml PBS 重悬沉淀,用流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司, FACS420 型)检测各组细胞整合素 αvβ3 的表达水平。

三、KDR mRNA 和 HOXB2 mRNA 表达的检测

1. 实验分组:常规消化对数生长期的 ECV304 细胞,接种于 50 ml 培养瓶中。待细胞 60% 融合时,同上分为 4 组,每组 3 瓶。反应终止后,立即加入裂解液裂解各组细胞,按文献[3]用瑞士 Roche 公司的 Tripure 分离试剂盒提取细胞总 RNA, -20 ℃ 保存。

2. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):采用美国 Promega 公司的 RT-PCR 试剂盒,按说明书操作。HOXB2 引物参照文献[4]设计,由日本 TaKaRa 公司合成。β 肌动蛋白和 KDR 引物用 Primer Select 软件自行设计。HOXB2(558 bp):上游引物 3'-AGAAA-TCCGCCAAGAAACCCAGCC-5',下游引物 3'-GAGA-AGACGTCTTCTGGCAATGGC-5'。KDR(213 bp):上游引物 3'-TGGGGATTGACTTCAACTGG-5',下游引物 3'-GGACCCTGACAAATGTGCTG-5'。β 肌动蛋白(348 bp):上游引物 3'-TGGAATCCTGTGGCATC-CATGAAAC-5',下游引物 3'-TAAAAACGCAGCT-CAGTAACAGTCCG-5'。以 β 肌动蛋白作为内参照,配制总反应体系,加入相应的 RNA 模板进行扩增后于 15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶图像分析系统(美国 Image System 公司, SX-100 型)分析电泳结果。用目的基因与 β 肌动蛋白的积分吸光度(A)值之比表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

四、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验及方差分析。

结 果

与 ECV304 组比较, ECV304 + U937 + conA 组细胞整合素 αvβ3 以及 KDR mRNA、HOXB2 mRNA 的表达水平均明显上调(P < 0.01);而 ECV304 + conA 组、ECV304 + U937 组细胞上述指标无明显变化(P > 0.05)。见表 1、图 1~3。

表 1 各组内皮细胞整合素 αvβ3、KDR mRNA、HOXB2 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the expression of KDR mRNA, HOXB2 mRNA and integrin αvβ3 in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	整合素 αvβ3 荧光强度	KDR mRNA 相对表达量	HOXB2 mRNA 相对表达量
ECV304	6.7 ±1.5	0.633 ±0.012	0.674 ±0.004
ECV304 + conA	8.0 ±1.6	0.629 ±0.009	0.689 ±0.009
ECV304 + U937	7.6 ±0.9	0.652 ±0.005	0.687 ±0.016
ECV304 + U937 + conA	10.2 ±1.7*	0.879 ±0.003*	0.947 ±0.003*

注:每组每一指标 3 个样本;与 ECV304 组比较,* P < 0.01

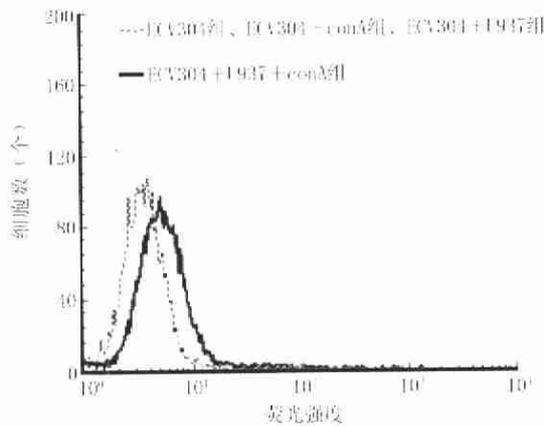
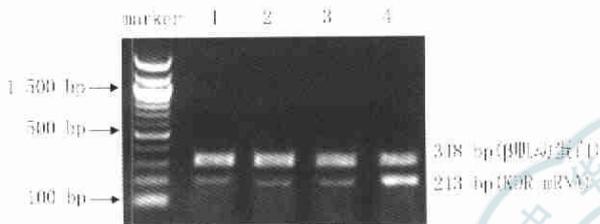
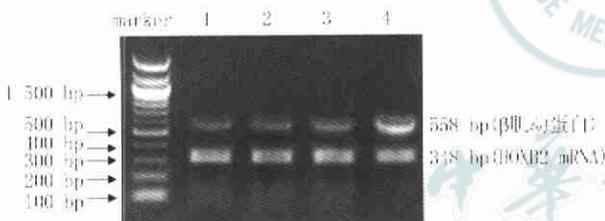


图 1 各组内皮细胞整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达水平的比较
Fig 1 Comparison of integrin $\alpha v \beta 3$ expression in each group



注: 1. ECV304 组; 2. ECV304 + conA 组; 3. ECV304 + U937 组;
4. ECV304 + U937 + conA 组

图 2 各组内皮细胞 KDR mRNA 表达情况的比较
Fig 2 Comparison of the KDR mRNA expression in each group



注: 1. ECV304 组; 2. ECV304 + conA 组; 3. ECV304 + U937 组;
4. ECV304 + U937 + conA 组

图 3 各组内皮细胞 HOXB2 mRNA 表达水平的比较
Fig 3 Comparison of the HOXB2 mRNA expression in each group

讨 论

创伤愈合过程受多种因素的调节和影响。Mark 等¹⁵指出,在创伤后早期(伤后 24—48 h)受损组织中有大量 M ϕ 和淋巴细胞浸润,进而参与创面修复。此外,有血管内皮细胞参与的血管生成亦是创伤修复的重要环节。M ϕ 被某些物质如细菌内毒素、conA、纤维连接蛋白以及佛波醇、氨苯蝶啶刺激后产生巨噬细胞源性生长因子 (macrophage-derived growth factor, MDGF), 其中包含多种对内皮细胞起作用的血管生成因子¹¹。KDR 是 VEGF 的受体之一。本研究中,经 conA 刺激的 U937 细胞可以使 ECV304 KDR mRNA 表达水平明显上调,说明 M ϕ 不仅可以分泌 VEGF 促进内皮细胞的增殖、迁移和

形成管样结构,还可以通过上调 VEGF 受体的表达来加强这一效应,从而在创伤愈合过程中发挥促进血管生成的作用。

整合素是介导细胞与细胞基质黏附、细胞迁移、细胞骨架形成、细胞增殖与分化的主要受体。在发育过程中, αv 整合素广泛表达于多种细胞,而且与不同 β 亚基结合的 αv 整合素有着不同的表达方式。血管生成的关键之一是内皮细胞黏附到细胞外基质上并迁移。整合素 $\alpha v \beta 3$ 是玻基结合素受体 (vitronectin receptor), 在介导细胞与细胞基质黏附、细胞迁移和血管生成中具有关键作用。通过检测保守的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列观察到,它可以介导细胞黏附到许多细胞外基质蛋白上(如纤维蛋白原、胶原和层粘连蛋白)⁶¹。正常情况下,血管处于静止状态, $\alpha v \beta 3$ 也处于低表达水平;在肿瘤和创伤愈合过程中的活跃新生血管内, $\alpha v \beta 3$ 呈高表达⁵。它也可以被某些生长因子作用后出现高表达。实验证实,拮抗整合素 $\alpha v \beta 3$ 可以抑制血管生成⁵。本实验结果表明,conA 刺激后的 U937 细胞使 ECV304 细胞表面的整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达增强。提示活化的 M ϕ 能够激活血管内皮细胞,进而促进血管内皮细胞和基质的黏附及迁移,有利于血管形成,但其具体分子机制尚有待进一步研究。

HOX 基因最初由 McGinnis 等¹⁹在果蝇中发现,既往研究表明其为胚胎发育的主控基因¹⁰¹。有学者利用反义寡核苷酸技术检测到,HOXB2 反义寡核苷酸可明显抑制内皮细胞的增殖,表现出剂量依赖效应,并延缓了内皮细胞向 S 期转变,在作用后 24—48 h 可抑制目的基因的表达,说明 HOXB2 在内皮细胞增殖中发挥着重要作用^{111,121}。本实验结果显示,conA 刺激的 U937 可以使 ECV304 细胞的 HOXB2 mRNA 表达明显上调,表明 M ϕ 可通过调节 HOXB2 基因的表达来调控内皮细胞的增殖,也进一步证实 HOXB2 在内皮细胞增殖中有重要作用,其具体机制和信号转导途径有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 崔彩彬,王德文. 创伤修复中主要的细胞成分及其作用. 见:付小兵,王德文,主编. 现代创伤修复学. 北京:人民军医出版社,1999. 91—93.
- 2 Pettet G, Chaplain MA, McElwain DL, et al. On the role of angiogenesis in wound healing. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1996, 263: 1487—1493.
- 3 基本分子生物学技术. 见:司徒镇强,吴军正,主编. 细胞培养. 西安:西安图书出版公司,1996. 247—249.
- 4 Domenico F, Marie FP, Clemente C, et al. Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in

small cell lung cancers. FEBS Letters, 1996, 380: 103-107.

5 Mark W, Lingen DDS. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. Arch Pathol Lab Med, 2001, 125: 67-71.

6 Horton MA. The $\alpha\beta 3$ integrin "ventronectin receptor". Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29: 721-725.

7 Clark RAF, Tomnesen MG, Gailit J, et al. Transient function expression of $\alpha\beta 3$ on vascular cells during wound repair. Am J Pathol, 1996, 148: 1407-1421.

8 Sheu JR, Yen MH, Kan YC, et al. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo; comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha\beta 3$ integrin monoclonal antibody. Biochem Biophys Acta, 1997, 1336: 445-454.

9 Meginnis W, Levine MS, Hafen E, et al. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. Nature, 1983, 308: 428-429.

10 Akam M. Hox genes and the evolution of diverse body plans. Biol Sci, 1995, 349: 313-319.

11 张晓启, 刘旭盛, 刘亮. 同源盒基因 B2 反义寡核苷酸对内皮细胞的影响. 中华烧伤杂志, 2001, 17: 348-350.

12 张晓启, 刘旭盛. B2 同源盒基因反义寡核苷酸对原代脐静脉内皮细胞增殖及细胞周期的影响. 中华创伤杂志, 2002, 18: 47-48.

(收稿日期: 2004-04-19)
(本文编辑: 罗勤)

· 病例报告 ·

特大面积深度烧伤合并吸入性损伤一例

高黎明 亓红英 刘希锋 李雪芹 刘法生

患者男, 59 岁。铁水烧伤后 1 h 入院。查体: 患者意识清楚, 体温 36.4℃, 心率 110 次/min, 呼吸 30 次/min, 血压 120/75 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 烦躁, 口渴, 声音嘶哑, 双肺呼吸音粗, 可闻及哮鸣音。既往有慢性支气管炎、冠心病史。除小腹有 2% 的正常皮肤, 头、双足底、左手掌有 6% TBSA II 度烧伤外, 其余均为 III 度创面。诊断: (1) 烧伤总面积 98%, 其中深 II 度 6%, III 度 92% TBSA。 (2) 吸入性损伤。见图 1。



图 1 患者入院时情况

图 2 伤后 120 d 创面愈合

患者入院后立即行高位大隐静脉切开快速补液, 3 h 共补液 5 200 ml。随后患者出现严重喘憋, 行气管切开后得以缓解, 同时施行胸腹部焦痂切开减张术, 留置导尿管, 给予吸氧、全身保暖等治疗。第 1 个 24 h 补液 13 000 ml, 电解质与胶体比为 1.00:0.75, 平均尿量 50 ml/h。伤后 3 d, 查血肌酐 86 $\mu\text{mol/L}$, 尿素 9 mmol/L, 行前胸及左下肢切痂, 整张异体皮 + 自体微粒皮 (取自小腹正常皮肤) 覆盖创面。伤后第 5 天, 行双上肢、右下肢切痂, 整张异体皮 + 自体微粒皮移植术。术后患者喘憋加重, 尿素上升至 14 mmol/L, 肌酐上升至 156 $\mu\text{mol/L}$, 诊断为呼吸功能不全, 肾功能不全。给予扩张支气管、雾化吸入、利尿、护肾、肾上腺皮质激素治疗后好转。伤后 25 d 患者出现血便, 每日约 800 ml, 胃镜检查见十二指

肠球部溃疡出血, 局部喷注孟氏液 (主要成分: 碱式硫酸亚铁) 后出血停止。12 h 后又便血不止, 急诊行胃肠道动脉造影见十二指肠球部有出血征象。给予胃、十二指肠动脉明胶海绵栓塞, 肠系膜上动脉给予小剂量垂体加压素 (加入硝酸甘油) 持续静脉滴注, 24 h 后出血停止。伤后四十余天异体皮脱落, 留有部分肉芽创面, 先后取自体头、足底、手掌皮行小片皮移植术, 行手术共 14 次。同时给予抗生素抗感染, 采用营养支持疗法, 如少量多次静脉输入白蛋白、红细胞、血浆、脂肪乳剂、复方氨基酸注射液、生长激素及口服谷氨酰胺等药物。伤后 50 d 患者出现左下肢肿胀, 是因其长期卧床及血液的高凝状态引起的左下肢深静脉血栓, 给予低分子肝素钙、复方丹参及扩张血管的药物治疗后好转。伤后 120 d 创面愈合 (图 2), 患者出院。

讨论 本例特大面积深度烧伤患者救治成功的体会如下: (1) 积极抗休克治疗使患者平稳度过休克期。 (2) 气管切开保持呼吸道通畅, 及时有效地治疗吸入性损伤以减轻或避免低氧血症, 保护了重要脏器的功能。 (3) 由于患者既往有慢性支气管炎及冠心病史, 故于休克期后分期切痂, 采用整张异体皮 + 自体微粒皮移植方式, 消灭了大部分创面, 有效地减少了毒素的吸收并控制了全身侵袭性感染。 (4) 重视支持治疗。

本例患者自体皮源严重不足, 部分于足底取皮, 微粒皮质量差, 致异体皮脱落后残余创面相对较多, 只能选择小片皮移植以消灭残余肉芽创面。治疗过程中患者出现了呼吸功能不全、肾功能不全、少尿、消化道出血、左下肢深静脉血栓等并发症, 经积极治疗均恢复正常。特别是消化道出血量大, 经胃、十二指肠动脉, 明胶海绵栓塞, 持续应用垂体加压素并加入硝酸甘油保护心脏, 达到了止血的目的。

作者单位: 271100 莱芜市人民医院外一科 (高黎明, 亓红英, 李雪芹, 刘法生); 鹏泉医院外科 (刘希锋)

(收稿日期: 2004-02-16)
(本文编辑: 莫愚)