

体外细胞炎症性损伤模型的建立

王丽娜 江 红 王兴友 陈晓琳 宋何煜 金帮明

摘要 **目的** 体外复制细胞炎症性损伤模型用于体外炎症研究。**方法** 将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养后分组,用不同浓度(0、0.1、1、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的脂多糖(LPS)刺激,在不同时间点(4、12、24、48h)收样品,检测细胞上清中的白介素-6(IL-6)水平。**结果** 每个时间点的HUVEC:LPS(0.1、1、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)比LPS(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激后IL-6分泌明显增高($P < 0.05$);48h内随时间增加,IL-6分泌增加,呈线性关系;相同时间点不同LPS浓度(0.1、1、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激细胞产生的IL-6分泌差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 体外LPS刺激HUVEC是理想的细胞炎症性损伤模型。

关键词 细胞炎症性损伤模型 脂多糖 白介素-6

Establishment of Cell Inflammatory Injury Model in vitro. Wang Lina, Jiang Hong, Wang Xingyou, Chen Xiaolin, Song Heyu, Jin Bangming. The Military General Hospital of Beijing, Beijing 100700, China

Abstract Objective To construct cell inflammatory injury model in vitro for inflammation research. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) were cultured and groned, cells then were stimulated with different concentrations of lipopolysaccharide (LPS). cells were Collected at different time points(4,12,24,48h) and interleukin-6 (IL-6) levels of cell supernatant were detected. **Results** HUVEC in any time points; IL-6 secretion of different concentration of LPS(0.1,1,10,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was significantly higher than the negative control (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($P < 0.05$). The secretion of IL-6 increased linearly with time in 48h. No statistically significant differences in secretion of IL-6 stimulated by different concentration of LPS (0.1,1,10 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at the same time($P > 0.05$). **Conclusion** HUVEC stimulated by LPS is a cell inflammatory injury model available in vitro.

Key words Cell inflammatory injury model; LPS; IL-6

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是严重威胁人类生命的一个常见的呼吸科急危重症,其发病的基本机制是机体在各种损伤因子的诱导下发生的以肺血管内皮为主要靶点的炎症反应。血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)在血管通透性屏障、免疫防御及炎症反应中起着极其重要的作用^[1,2]。能够合成并分泌多种活性因子,其中白介素-6(interleukin-6, IL-6)、细胞黏附分子-1(the intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1)较有代表性,而IL-6则被认为是内皮炎症反应的最佳标志分子。目前认为血管内皮功能障碍及凋亡是脓毒症、休克等应激下发生ARDS的重要原因^[3]。在ARDS发生过程中,血管内皮细胞既是靶

细胞也是效应细胞,它的损伤与激活是机体发生失控性炎症反应及高通透性肺水肿的根本环节^[1]。ARDS的抗炎作用必然会以血管内皮细胞作为一个主要靶点^[2]。革兰阴性杆菌产生的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种引起炎症、休克的重要介质,无论是体内还是离体,细胞对LPS的反应是机体所固有的,不依赖于免疫系统的反应。拟体外用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)做科研中内皮细胞替代株,本实验在体外用不同浓度LPS分别刺激HUVEC,观察不同时间IL-6的分泌水平,从而建立体外炎症性损伤模型,为ARDS及其他的炎症研究奠定基础。

材料与方法

1. 材料:原代人脐静脉内皮细胞HUVEC购自美国ScienCell公司,ECM培养基购自美国ScienCell公司,脂多糖LPS(L-2880)购自美国Sigma公司,IL-6的ELISA试剂盒(Cat. No. 555220)购自美国BD公司,胎牛血清购自HyClone,细胞培养瓶、培养皿、6孔板、96孔板均为康宁公司产品。

2. 方法:(1)细胞的复苏、培养、计数、分组:用ECM培养基培养HUVEC细胞,复苏,传代,细胞生长状态良好时分别将每种细胞铺6孔板,细胞计数,每孔细胞数量 1×10^5 个,并进行实验分组^[4,5],每组6孔:①LPS致伤组:浓度分组分为:

基金项目:军队医药卫生“十一五”科技攻关研究基金资助项目(08G006)

作者单位:100700 北京军区总医院呼吸内科(王丽娜、王兴友、陈晓琳);北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院(江红、宋何煜);西南大学生命科学学院(金帮明)

通讯作者:王兴友,副主任医师,电子信箱:wangxy20096@gmail.com

0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 4组。作用时间分组:观察4、12、24、48h 4个时间点;②致伤对照组:采用等量无LPS的完全培养液加入细胞中作为对照,同样观察4、12、24、48h 4个时间点。(2)脂多糖刺激细胞:将购买的脂多糖10mg溶于无血清的培养基中,过滤,分装,冻存于 -20°C 。细胞铺板24h候按照分组分别将脂多糖加入细胞中,轻轻摇匀后将细胞放回培养箱中。(3)ELISA检测细胞上清中IL-6:收取细胞上清到EP管中,离心之后,将上清转移到另外一个EP管中冻存于 -20°C 备用。稀释ELISA试剂盒中标准品,做出标准曲线。将收取的细胞上清按照ELISA试剂盒说明书测定IL-6含量。步骤包括,用100 μl 一抗包被酶标板 4°C 过夜,洗板3次后用200 μl 封闭液室温封闭1h,洗板3次后稀释样品至100 μl 室温2h,洗板5次后加入100 μl 二抗和表面抗原标志物的混合物室温孵育1h,洗板7次后加入100 μl BD显色液室温避光0.5h,加50 μl 终止液,用酶标仪在450nm处读出吸光值并记录。试验共重复5次。

3. 统计学方法:数据应用SPSS 12.0统计分析软件处理结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,相同时间点、不同浓度间的两两比较用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。不同浓度、不同时间点之间用线性相关。

结 果

1. 不同浓度LPS刺激HUVEC,不同时间点时测得细胞上清中IL-6分泌量:4、12、24、48h时,LPS浓度0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 时IL-6分泌量与阴性对照相比较, t 均 >1.96 , $P<0.05$,差异有统计学意义,可以认为LPS浓度为0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 刺激HUVEC时分泌IL-6比0 $\mu\text{g/ml}$ LPS刺激HUVEC分泌IL-6分泌高,见表1。

表1 不同浓度LPS刺激下,不同时间点时HUVEC细胞上清中IL-6分泌量

浓度	4h	12h	24h	48h
0.1 $\mu\text{g/ml}$	137.6 \pm 4.9	190.4 \pm 7.3	250.8 \pm 8.7	335.0 \pm 7.8
1 $\mu\text{g/ml}$	154.8 \pm 4.4	191.2 \pm 7.6	252.2 \pm 8.2	342.8 \pm 9.2
10 $\mu\text{g/ml}$	141.2 \pm 12.1	180.8 \pm 5.0	248.4 \pm 10.1	339.8 \pm 5.8
20 $\mu\text{g/ml}$	133.8 \pm 5.1	185.0 \pm 4.1	246.6 \pm 7.2	339.4 \pm 8.9
阴性对照	35.6 \pm 3.8	39.6 \pm 6.5	46.4 \pm 6.1	62.8 \pm 5.0

2. 不同浓度LPS刺激HUVEC,不同时间点时测得细胞上清中IL-6分泌趋势:4、12、24、48h时0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ LPS比0 $\mu\text{g/ml}$ LPS刺激后IL-6分泌明显增高,48h内随时间增加,IL-6分泌增加,相同时间点不同LPS浓度刺激细胞产生的IL-6分泌量变化不大,见图1。

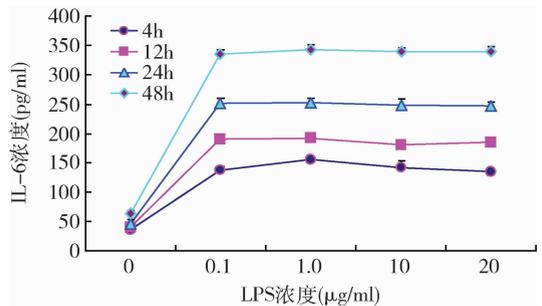


图1 不同浓度LPS、不同时间点时HUVEC细胞上清中IL-6分泌量比较

讨 论

血管内皮细胞的损伤在脏器炎症和休克等病理过程起着关键的作用^[6],动物模型固然有接近人体病理生理的优势,但由于其受影响因素多及动物养殖时间等原因,炎症相关细胞的体外培养也是研究炎症调控机制的重要方法。内皮细胞能够合成并分泌多种活性因子,其中IL-6、ICAM-1较有代表性,而IL-6则被认为是内皮炎症反应的最佳标志分子^[7,8]。众多研究表明,内皮细胞作为LPS作用的靶细胞,在内毒素脂多糖LPS引起的脓毒症、脓毒性休克、多器官功能衰竭等病理过程中起着关键的作用^[9]。革兰阴性杆菌产生的LPS是一种引起炎症及休克重要介质,离体或在体内,细胞都能对LPS产生反应,不依赖于动物体内的免疫反应。LPS的分子结构主要由3部分组成:O-抗原、核心多糖和脂质A,其中脂质A和LPS都有引发炎症的作用,两者统称为内毒素^[10,11]。LPS是临床上引起脏器炎症的主要启动因子,因此有关研究炎症的动物模型大多是用LPS来复制的。

微血管内皮细胞获取、培养、纯化十分复杂,尤其传代次数稀少,成活率低,HUVEC比微血管内皮细胞的分离和培养较为简便,传代次数相对高,且新生儿脐带来源充足,因此脐静脉内皮细胞成为血管内皮细胞体外实验的主要材料。但由于HUVEC不能无限传代,且培养过程中必须加入内皮生长因子,其价格昂贵。血管内皮细胞既是靶细胞也是效应细胞,它的损伤改变是机体发生炎症反应及高通透性肺水肿的根本环节^[12,13]。研究ARDS的炎症调控,故体外建立合理的炎症调控模型十分关键^[14,15]。

本实验中用HUVEC培养后分组,用不同浓度的LPS刺激HUVEC,在不同时间点收样品,检测IL-6水平。发现在不同时间点用0.1、1、10、20 $\mu\text{g/ml}$ LPS比0 $\mu\text{g/ml}$ LPS刺激HUVEC后IL-6分泌明显增高

($P < 0.05$),随着时间增加,IL-6分泌水平也明显增加。相同时间点不同LPS浓度刺激细胞产生的IL-6分泌差异无统计学意义($P > 0.05$)。发现HUVEC被LPS刺激之后,所以通过本实验,选定HUVEC细胞(原代细胞培养到第3代或第4代)为目标细胞,可用LPS浓度 $1\mu\text{g/ml}$,时间刺激HUVEC 48h作为体外炎性损伤模型。HUVEC作为原代内皮细胞中相对容易培养的,可传代到7代左右,本实验可以为体外研究ARDS的炎症调控机制,为后续研究奠定基础,也为其他炎症性疾病的体外研究提供新的思路。

参考文献

- Huang DT, Angus DC. Designing clinical trials in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2006, 12(1):32-36
- Reinhart K, Bayer O, Brunkhost F, et al. Markers of endothelial damages in organ dysfunction and sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(5 Suppl):S302-S312
- Belvisi MG, Brown TJ, Wicks S, et al. New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? [J]. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutic*, 2001, 14:221-227
- Sun BW, Zou XQ, Chen YL, et al. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived co at -tenuates LPS-induced activation of HUVEC [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2008, 4(5):270-278
- Grandel U, Heygster D, Sibelius U, et al. Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil-synthesis in non cocultures[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7:1729-1735
- Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, et al. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2011, 5(1):115-126
- Bedirli N, Demirtas CY, Akkaya T, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuated sepsis induced lung inflammation[J]. *J Surg Res*, 2012, 178(1):e17-e23
- Shah T, Zabaneh D, Gaunt T, et al. Gene-Centric Analysis Identifies Variants Associated with Interleukin-6 Levels and Shared Pathways with Other Inflammation Markers[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013, Mar 16
- Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(6):L899-L914
- Kondakova AN, Novototskaya-Vlasova KA, Arbatsky NP, et al. Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Psychrobacter cryohalolentis* K5 (T) containing a 2,3,4-triacetamido-2,3,4-trideoxy-L-arabinose moiety [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(12):2236-2240
- Wu YH, Chuang SY, Hong WC, et al. Berberine reduces leukocyte adhesion to LPS-stimulated endothelial cells and VCAM-1 expression both in vivo and in vitro[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(3):741-750
- Zeng H, Pappas C, Belser JA, et al. Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(2):667-678
- Inoue K, Takano H, Sakurai M, et al. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances coagulatory disturbance with endothelial damage and systemic inflammation related to lung inflammation[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, 231(10):1626-1632
- Morgan D. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. [M] New Jersey: Humana Press, 1996:104-109
- Geerts WJ, Vocking K, Schoonen N, et al. Cobblestone HUVECs: a human model system for studying primary ciliogenesis[J]. *J Struct Biol*, 2011, 176(3):350-359

(收稿日期:2013-03-22)

(修回日期:2013-04-01)

皮瓣穿支血管二维及三维超声探查

何发伟 姜颖 戴晴

摘要 目的 观察皮瓣穿支血管的二维、三维超声表现及血流动力学参数特点。方法 应用高频二维(2D)和三维(3D)探头对20例正常人、3处皮瓣部位、共47支皮瓣穿支血管进行2D和3D超声成像,观察穿支血管的解剖位置、走行特点、可显示长度、内径,并测量各穿支血管血流动力学参数。结果 超声成像探查穿支血管最小内径可达0.5mm;其走行方式有:斜行59.6%(15°~75°)、垂直17%(>75°)、螺旋17%、平行浅出6.4%(<15°);2D成像中4支(8.5%)穿支血管显示分支,显示的穿支血管长度均值为 $8.1 \pm 1.3\text{mm}$,3D成像中33支(66%)显示分支,显示长度均值为 $11.7 \pm 0.8\text{mm}$,3D超声成像显示穿支血管长

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院超声科

通讯作者:姜颖,电子邮箱:hefawei081025@163.com