

大鼠肺微血管内皮细胞通透系数检测的方法

尤青海 高磊 岳扬 孙耕耘

【摘要】 目的 探讨肺微血管内皮细胞(PMVEC)通透系数检测的实验方法。方法 分别在 transwell 小室和聚碳酸酯纤维膜上构建大鼠 PMVEC 单层模型,用电阻抗仪和倒置显微镜观察到细胞单层汇合后,分别应用电阻抗仪监测跨内皮细胞电阻(TER),用异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖法检测通透系数(Pd),用 Hanks 平衡液法检测通透系数(Lp);同时观察脂多糖(LPS)刺激 0.5 h 和 2 h 后的 PMVEC 通透性变化,以测量值与其相应静息状态值的比值表示。结果 倒置显微镜下观察到细胞接种后 3 d 时已汇合成单层时 TER 值为 $(39.45 \pm 3.96) \Omega \cdot \text{cm}^2$, Pd 值为 $(8.52 \pm 0.50) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$;随细胞接种时间增加,TER 值稳定升高,接种后 4 d 达高峰 $(49.84 \pm 3.93) \Omega \cdot \text{cm}^2$ 。静息状态下汇合成 PMVEC 单层的 TER 值、 Pd 值和 Lp 值分别为 $(49.84 \pm 3.93) \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、 $(6.15 \pm 0.63) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 和 $(6.80 \pm 0.62) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$ 。与未刺激组比较,10 mg/L LPS 刺激 PMVEC 0.5 h 和 2 h 后,TER 法测定的通透性均下降 $(0.87 \pm 0.03, 0.45 \pm 0.04$ 比 $1.00 \pm 0.08)$, Pd 法和 Lp 法测定的通透性均增加 (Pd : $1.33 \pm 0.11, 2.43 \pm 0.14$ 比 1.00 ± 0.10 ; Lp : $1.30 \pm 0.07, 2.38 \pm 0.15$ 比 1.00 ± 0.11), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 TER 法、 Pd 法和 Lp 法均能有效检测 PMVEC 通透系数,倒置显微镜联合 TER 和 Pd 法所测值更加精确,从而为体外研究急性肺损伤发病机制提供实验方法。

【关键词】 肺微血管内皮细胞; 通透性; 大鼠; transwell; 电阻抗

Methods for measurement of permeability coefficient of pulmonary microvascular endothelial cells in rat
YOU Qing-hai, GAO Lei, YUE Yang, SUN Geng-yun. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui, China
Corresponding author: SUN Geng-yun, Email: sungengyun@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore an optimal method for the measurement of pulmonary microvascular endothelial cell (PMVEC) permeability coefficient. **Methods** A monolayer of rat PMVEC model was constructed by culturing a cell suspension on transwell filter or polycarbonate filter membrane. After the state of confluence of cells was affirmed with epithelial volt-ohmmeter or inverted microscope, the permeability coefficient was determined by means of transendothelial electrical resistance (TER), fluorescein isothiocyanate-dextran (Pd), and permeation of Hanks solution (Lp) across monolayers. Meanwhile, changes in PMVEC permeability expressed by the ratio of the observed value and the original value were observed after lipopolysaccharide (LPS) challenge for 0.5 hour or 2 hours. **Results** The cells reached the state of confluence as observed under inverted microscope on the third day post-seeding, and the TER and Pd at this time-point were $[(39.45 \pm 3.96) \Omega \cdot \text{cm}^2]$ and $[(8.52 \pm 0.50) \times 10^{-6} \text{ cm/s}]$, respectively. After PMVEC were seeded on transwell filters, the TER increased steadily in a time-dependent manner after seeding of PMVEC, reaching the summit at the fourth day post-seeding $[(49.84 \pm 3.93) \Omega \cdot \text{cm}^2]$. Under the natural state, the TER, Pd and Lp of confluent PMVEC monolayers were $(49.84 \pm 3.93) \Omega \cdot \text{cm}^2$, $(6.15 \pm 0.63) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ and $(6.80 \pm 0.62) \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$, respectively. After PMVEC monolayers were challenged with 10 mg/L LPS for both 0.5 hour and 2 hours, there was significant decrease in the permeability coefficient as measured by TER $(0.87 \pm 0.03, 0.45 \pm 0.04$ vs. 1.00 ± 0.08 , respectively, both $P < 0.05$), and an increase in the permeability coefficient measured by Pd $(1.33 \pm 0.11, 2.43 \pm 0.14$ vs. 1.00 ± 0.10 , respectively, both $P < 0.05$) and the permeability coefficient measured by Lp $(1.30 \pm 0.07, 2.38 \pm 0.15$ vs. 1.00 ± 0.11 , respectively, both $P < 0.05$) when compared with the normal group. **Conclusion** Three methods, namely TER, Pd and Lp are available to use to assess PMVEC permeability coefficient. The combination of an inverted microscope, TER and Pd enhances the accuracy in determining PMVEC permeability coefficient, and it provides an experimental technique for studying the pathogenesis of acute lung injury in vitro.

【Key words】 Pulmonary microvascular endothelial cell; Permeability; Rat; Transwell; Electrical resistance

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.09.008

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070054)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院呼吸内科

通信作者:孙耕耘,Email:sungengyun@yahoo.com.cn

万方数据

肺微血管内皮细胞(PMVEC)通透性增加是急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)的主要发病环节^[1],但在体研究其通透性变化十分困难,

目前的研究结果主要来自体外细胞实验。如本实验室曾将 PMVEC 接种于多孔聚碳酸酯纤维膜上采用 Hanks 平衡液法检测通透系数 (Lp), 虽也能客观反映 PMVEC 通透性, 但需施加额外压力等人为因素、且较为繁琐^[2-3], 故限制了其推广。本研究中拟通过在体外构建 PMVEC 单层模型, 应用电阻抗仪监测跨内皮细胞电阻 (TER) 和改良异硫氰酸荧光素 (FITC)-葡聚糖法检测通透系数 (Pd), 为体外研究 ALI 的发病机制提供更好的实验方法。

1 材料与方法

1.1 实验试剂: Dulbecco 改良 Eagle 高糖培养基干粉 (DMEM) 及胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 内皮细胞生长辅助因子 (美国 Upstate Biotechnology 公司); FITC-异植物凝集素、FITC-葡聚糖、无 FITC 标记葡聚糖、细胞培养级明胶以及脂多糖 (LPS) 均购自美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 大鼠 PMVEC 分离、培养及鉴定: 参考文献^[2-5] 方法进行并改进。取清洁级体重 90~110 g 的雄性 SD 大鼠 (由安徽医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(皖)2010-002), 分离 PMVEC, 用含 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素和 75 $\mu\text{g/ml}$ 内皮细胞生长辅助因子的 DMEM 培养液培养。倒置显微镜下观察, 10~14 d 细胞呈 80%~90% 单层汇合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。第 2 代细胞用于鉴定: 细胞在多聚赖氨酸包被的盖玻片上爬片 3~6 h 后, 冰冷丙酮固定, 在暗室与 25 $\mu\text{g/ml}$ FITC-异植物凝集素反应 40 min 后荧光显微镜下观察; $\text{V}\alpha$ 因子相关抗原鉴定按免疫细胞化学染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司) 说明书进行, 细胞核苏木素复染后在生物显微镜下观察。鉴定标准: 细胞为多边形, 单层汇合呈“铺路石样”排列, 异植物凝集素反应和 $\text{V}\alpha$ 因子相关抗原检测实验阳性。第 3 代细胞用于实验。

1.3 大鼠 PMVEC 通透系数检测

1.3.1 体外 PMVEC 单层模型构建

1.3.1.1 Transwell 上构建 PMVEC 单层模型: 该模型由上、下室两部分构成, 上室是聚脂材料制成的 transwell 小室 (孔径 0.4 μm), 下室是 12 孔细胞培养板。用 0.25% 明胶包被 transwell 小室、风干, 加入 DMEM 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱预孵育 24 h 后用于后续实验。将大鼠 PMVEC 以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于小室, 分别向上、下室加入 0.5 ml、1.5 ml 血清培养液, 常规培养。

1.3.1.2 聚碳酸酯纤维膜上构建 PMVEC 单层模

型: 将大鼠 PMVEC 以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种至经 0.5% 醋酸、0.1% 明胶预处理的聚碳酸酯纤维膜 (孔径 0.45 μm) 上, 置于 6 孔细胞培养板中常规培养。用于 Hanks 平衡液法检测该细胞单层模型 PMVEC 的 Lp ^[2-3]。

1.3.2 电阻抗仪监测 TER: 将电阻抗仪的两个 STX-2 电极分别置于 transwell 上、下室, 测量小室基础电阻值后, 在特定时间检测跨大鼠 PMVEC 电阻值, 减去各自基础电阻值, 再乘以 transwell 小室底面积 (1.12 cm^2) 即获得 TER (单位: $\Omega \cdot \text{cm}^2$), 参照仪器说明书和参考文献评估细胞通透性^[3]。

1.3.3 FITC-葡聚糖法检测 PMVEC 的 Pd : 分别用电阻抗仪和倒置显微镜观察 transwell 上的细胞, 待汇合成单层后再根据 Kelly 等^[6] 和 Tinsley 等^[7] 的方法操作并改进。磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分漂洗含 PMVEC 单层的 transwell 3 次后, 小室中加入无酚红、无血清 DMEM 配制的 0.5 mg/ml FITC-葡聚糖 0.5 ml, 下室加入含等摩尔、无 FITC 标记的葡聚糖 (无酚红、无血清 DMEM 配制) 液 1.5 ml, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱避光孵育 1 h, 分别从上、下室提取 0.3 ml 和 1.2 ml 样品, 荧光分光光度计检测荧光能量值 (激发波长 494 nm, 发射波长 520 nm), 根据标准曲线得出上、下室 FITC-葡聚糖浓度, 按公式计算大鼠 PMVEC 的 Pd 。 $Pd(\text{cm/s}) = ([A]/t) \times (1/A) \times (V/[L])$; 其中: $[A]$ 是下室 FITC-葡聚糖浓度, $t(\text{s})$ 是时间间隔, $A(\text{cm}^2)$ 是 transwell 表面积, $V(\text{m}^3)$ 是下室溶液体积, $[L]$ 是上室 FITC-葡聚糖浓度。

1.3.4 Hanks 平衡液法检测 PMVEC 的 Lp : 参照文献^[2-3] 方法进行, 用苏木素-伊红 (HE) 染色细胞观察大鼠 PMVEC 在聚碳酸酯纤维膜上汇合情况。

1.4 实验分组: 将接种至 transwell 上的 PMVEC 单层模型分成 3 组, 每组 6 个复孔。单独应用 TER 法检测 PMVEC 通透系数 (I 组); 倒置显微镜联合 Pd 法检测 PMVEC 通透系数 (II 组); TER 法联合 Pd 法检测 PMVEC 通透系数 (III 组)。此外, 本研究中还应用 Lp 、TER 和 Pd 法观察 LPS 刺激 0.5 h 和 2 h 后的 PMVEC 通透性变化。

1.5 统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件处理, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析或配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TER 法观察大鼠 PMVEC 汇合及检测细胞通透系数: I 组结果发现, 细胞的电阻值 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) 随

接种时间增加逐步升高,1、2、3 d 分别为 8.83 ± 2.20 、 24.27 ± 3.53 和 39.45 ± 3.96 ,4 d 时迅速升高达峰值(49.84 ± 3.93);前 4 d 电阻值两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);5 d 时(49.65 ± 3.60)与 4 d 时比较无明显变化($P > 0.05$)。同步应用倒置显微镜观察到,将 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ PMVEC 接种到 transwell 后 4 d,细胞已汇合成单层,5 d 时细胞单层无明显变化,所以第 4 日的 TER 即为静息状态下 PMVEC 单层通透系数。

2.2 Pd 法检测静息状态下大鼠 PMVEC 的通透系数: I 组结果发现,接种后 3 d 细胞已汇合成单层,此时应用 Pd 法检测细胞通透系数,并制作标准曲线和曲线方程 [$y = 2.0776x - 30.14 (R^2 = 0.9928)$],计算出 I 组的 PMVEC 通透系数为 $(8.52 \pm 0.50) \times 10^{-6} \text{cm/s}$;而 TER 法评估接种至 transwell 上 PMVEC 汇合成单层后(接种后 4 d)再应用 Pd 法检测的细胞通透系数(II 组)为 $(6.15 \pm 0.63) \times 10^{-6} \text{cm/s}$,此为静息状态下 Pd 值;两组 Pd 比较 $t = -7.376, P = 0.001$,差异有统计学意义。

2.3 多种方法联合评估 LPS 刺激对大鼠 PMVEC 通透系数的影响(表 1):为了统一单位和便于比较,PMVEC 通透性变化用测量值与其相应静息状态值的比值表示。

表 1 各种方法检测 LPS 刺激对大鼠 PMVEC 通透系数的影响($\bar{x} \pm s$)

检测 方法	样本 数	通透系数		
		未刺激	LPS 刺激 0.5 h	LPS 刺激 2 h
TER 法	6	1.00 ± 0.08	0.87 ± 0.03^a	0.45 ± 0.04^{ab}
Pd 法	6	1.00 ± 0.10	1.33 ± 0.11^a	2.43 ± 0.14^{ab}
Lp 法	5	1.00 ± 0.11	1.30 ± 0.07^a	2.38 ± 0.15^{ab}

注:LPS:脂多糖,PMVEC:肺微血管内皮细胞,TER 法:电阻抗监测法,Pd 法:异硫氰酸荧光素-葡聚糖检测法,Lp 法:Hanks 平衡液检测法;与本法未刺激比较,^a $P < 0.05$;与本法 LPS 刺激 0.5 h 比较,^b $P < 0.05$

2.3.1 TER 法和 Pd 法检测 LPS 刺激后大鼠 PMVEC 的通透系数:倒置显微镜联合电阻抗仪观察 transwell 上 PMVEC 单层汇合后,与未刺激组比较,10 mg/L LPS 分别刺激 0.5 h 和 2 h 时,细胞通透系数均下降,Pd 法检测的细胞通透系数显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);且 LPS 刺激 2 h 时更为明显(均 $P < 0.05$)。

2.3.2 Lp 法检测 LPS 刺激后大鼠 PMVEC 的通透系数:HE 染色发现,细胞接种于聚碳酸酯纤维膜后 3 d 细胞未汇合成单层,接种后 9 d 细胞汇合成单

层,此时应用 Lp 法测定静息状态下的通透系数为 $(6.80 \pm 0.62) \times 10^{-7} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}$ 。与未刺激组比较,给予 10 mg/L LPS 刺激 0.5 h 和 2 h 时 PMVEC 通透系数显著增加,且随 LPS 刺激时间延长而进一步增加(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

体外构建 PMVEC 单层模型并检测其通透系数可为研究 ALI 发病机制提供实验依据。既往报道检测 PMVEC 通透系数的方法较多,但所用指标都比较片面,如单独使用 Lp 法、独立应用标记的大分子物质(如白蛋白、葡聚糖)以及只检测细胞单层阻抗值等,此实验都容易丢失细胞单层早期通透性变化信息并可能增加人为因素的干预^[2,8-12]。

本研究中应用电阻抗仪监测 PMVEC 单层汇合过程中电阻值变化,联合倒置显微镜发现,细胞接种早期随着细胞密度增加,电阻值升高缓慢,细胞密集、开始汇合时,电阻值上升迅速,完全汇合后电阻值达高峰,随即在一定范围内波动。此结果与文献^[13]报道的结果一致;所得到静息状态电阻值与 Nwariaku 等^[11]测量的人 PMVEC 单层汇合时电阻值接近;而比 Sedgwick 等^[9]的研究结果高。可能原因是 Sedgwick 使用的是 5~10 代人 PMVEC,并且将细胞培养 2~3 d 后的电阻值作为汇合细胞的静息状态电阻值,此时,显微镜观察细胞已汇合;而本研究使用的是大鼠第 3 代 PMVEC,结果明确提示细胞接种后 3 d,虽然显微镜观察到细胞已汇合成单层,但 Pd 法测得的通透系数(II 组)比接种后 4 d Pd 法测得的通透系数(III 组)高,即细胞并未完全汇合,并且电阻值也可继续上升,致 4 d 时完全汇合成单层时电阻值达高峰。所以,TER 法可用来评估细胞紧密连接的完整性,使实验结果一致,从而减少人为因素对实验结果的干预;此外,TER 法与倒置显微镜联合应用可能更优于两者的单独使用。

TER 只能反映细胞-细胞、细胞-细胞基质间的黏附对通透性的影响。生物大分子通透 PMVEC 除了取决于上述两个因素外,还受内皮细胞多糖-蛋白质复合物的电荷选择、多糖-蛋白质复合物的完整性以及生物大分子穿越内皮细胞过程中多种改变(如小泡运输等)的影响。所以本研究中在 TER 法证实 PMVEC 已汇合成单层后,再选择不易被细胞摄取的大分子物质,即 FITC 标记的葡聚糖来评估细胞通透性。与既往研究^[6-7,12]不同的是,本研究中用无酚红的 DMEM 配制葡聚糖,以及下室加入等摩尔、无 FITC 标记葡聚糖,目的是维持整个细胞单

层的等渗状态。测得的大鼠 PMVEC 通透系数与文献报道的结果^[8,10]相近。存在一定偏差的原因可能为：①PMVEC 屏障自身因素，如细胞来源、细胞单层构建材料等；②方法学差异以及大分子物质的选择等。*Lp* 法是本实验室常规技术^[2-3]，测得大鼠 PMVEC 通透系数与文献报道结果^[10]相近，只是本研究中发现以相同细胞密度分别接种 transwell 和聚碳酸酯纤维膜时细胞汇合速度不一致，如果采用 *Lp* 法检测 PMVEC 通透系数应适当延长接种时间，以减少实验误差。既往研究应用 *Lp* 法已证实 LPS 刺激能增加 PMVEC 通透性^[14]，而本研究也发现 TER 法和 *Pd* 法实验原理虽与之不同，却也能很好反映 LPS 刺激对 PMVEC 屏障功能的损害效应，与文献报道结果^[2-3]一致。

综上所述，本研究证实 TER 法、*Pd* 法同 *Lp* 法均能有效检测 PMVEC 通透系数，从实验经费考虑，*Lp* 法值得推荐；从实验完整性考虑，倒置显微镜联合 TER 法和大分子物质通透法（如 *Pd* 法）值得在 PMVEC 单层体外模型中推广，从而为体外研究 ALI 发病机制提供实验方法。

志谢 感谢安徽医科大学分子生物实验室汪渊教授在电阻抗仪方面的实验指导

参考文献

[1] 尤青海, 孙耕耘. 肺微血管内皮细胞通透性调控的信号转导机制. 生理科学进展, 2008, 39: 375-378.
 [2] 张泓, 孙耕耘. 血管紧张素 I 及其受体拮抗剂对大鼠肺微血管内皮炎性损伤效应的影响. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 608-610.
 [3] You QH, Sun GY, Wang N, et al. Interleukin-17F-induced pulmonary microvascular endothelial monolayer hyperpermeability via the protein kinase C pathway. J Surg Res, 2010, 162: 110-121.
 [4] You QH, Sun GY, Wang N, et al. Role of src-suppressed C

kinase substrate in rat pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability stimulated by inflammatory cytokines. Inflamm Res, 2010, 59: 949-958.
 [5] 陈珊, 孙耕耘, 尤青海, 等. 血小板活化因子诱导大鼠肺微血管内皮细胞 Src 抑制的蛋白激酶 C 底物基因表达. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 135-138.
 [6] Kelly JJ, Moore TM, Babal P, et al. Pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cells; differential regulation of Ca²⁺ and permeability. Am J Physiol, 1998, 274: L810-819.
 [7] Tinsley JH, Teasdale NR, Yuan SY. Involvement of PKCdelta and PKD in pulmonary microvascular endothelial cell hyperpermeability. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286: C105-111.
 [8] Irwin DC, Tissot van Patot MC, Tucker A, et al. Direct ANP inhibition of hypoxia-induced inflammatory pathways in pulmonary microvascular and macrovascular endothelial monolayers. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288: L849-859.
 [9] Sedgwick JB, Menon I, Gern JE, et al. Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110: 752-756.
 [10] Chang YS, Munn LL, Hillsley MV, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on cultured endothelial cell monolayer transport properties. Microvasc Res, 2000, 59: 265-277.
 [11] Nwariaku FE, Rothenbach P, Liu Z, et al. Rho inhibition decreases TNF-induced endothelial MAPK activation and monolayer permeability. J Appl Physiol, 2003, 95: 1889-1895.
 [12] Tinsley JH, Breslin JW, Teasdale NR, et al. PKC-dependent, burn-induced adherens junction reorganization and barrier dysfunction in pulmonary microvascular endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289: L217-223.
 [13] Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, et al. Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. J Artif Organs, 2006, 9: 241-250.
 [14] 朱钟鸣, 孙耕耘. 蛋白激酶 Cδ 亚型抑制剂对脂多糖诱导肺微血管内皮细胞损伤的影响. 中国药理学通报, 2006, 22: 800-803.

(收稿日期: 2011-03-13)

(本文编辑: 李银平)

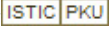
• 科研新闻速递 •

肝素化血液中的活化血小板对创伤失血性休克后肺损伤的发生起“二次打击”作用

肝素作为抗凝剂可以防止血栓，但它对血细胞聚集并无明显的抑制作用，因此，创伤失血性休克模型中回输肝素化血液是否具有潜在的抗炎作用一直存在争论。美国研究人员对创伤失血性休克大鼠模型回输肝素化血液是否会加重急性肺损伤 (ALI) 进行了探讨。研究人员选取了斯普拉格大鼠，用戊巴比妥麻醉后放血，使平均动脉压降 (MAP) 至 30 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)，维持 45 min 即为 ALI 模型复制成功。采用生理盐水 (NS) 或回输血液进行复苏，回输血液中分别加入 80 U/kg 肝素或 800 U/kg 肝素；另一组动物在创伤失血性休克前用血小板 P2Y₁₂ 受体拮抗剂氯吡格雷预处理。测定指标包括：支气管肺泡灌洗液成分、肺髓过氧化物酶 (MPO) 活性、肺部荧光免疫以及血液涂片检测血小板功能。结果显示，肝素化血液回输的动物模型肺泡蛋白含量显著增加 (P<0.000 1)，血小板聚集和血小板活化增强。经氯吡格雷预处理对动物 ALI 具有显著保护作用 (P<0.000 1)。实验还发现肝素化血液回输的动物模型肺中有中性粒细胞扣押现象，免疫荧光法显示只有实施肝素化血液回输的动物肺内才发生微血栓现象 (P<0.000 1)。研究人员认为，肝素化血液回输会对 ALI 的产生起到“二次打击”作用，原因可能是由于血小板聚集形成微血栓和中性粒细胞在肺的聚集反应。

赵莹, 编译自《Med Sci Sports Exerc》, 2011-08-11(电子版); 胡森, 审校

大鼠肺微血管内皮细胞通透系数检测的方法

作者: [尤青海](#), [高磊](#), [岳扬](#), [孙耕耘](#), [YOU Qing-hai](#), [GAOLei](#), [YUE Yang](#), [SUN Geng-yun](#)
作者单位: [安徽医科大学第一附属医院呼吸内科, 合肥, 230022](#)
刊名: [中国危重病急救医学](#) 
英文刊名: [Chinese Critical Care Medicine](#)
年, 卷(期): 2011, 23 (9)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwbjyxx201109008.aspx