

·综述·

创伤失血性休克动物淋巴液的内皮细胞毒性作用

张萍 林兆奋

【关键词】 创伤失血性休克； 淋巴液； 内皮细胞

血管内皮细胞是最早接触到体内炎症因子的部位，血管内皮细胞损伤在脓毒症和多器官功能障碍的发生发展中起十分重要的推动作用^[1]，近年来针对血管内皮细胞的研究越来越广泛和深入。临床上创伤及失血性休克(HS)易进展为脓毒症和多器官功能障碍，普遍认为这一过程与肠-淋巴循环密切相关^[2]，并观察到创伤失血性休克(T/HS)动物的淋巴液能够损伤内皮细胞^[3]。研究表明，人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和大鼠肺微血管内皮细胞(RPMVEC)对T/HS大鼠淋巴液的损伤反应同样敏感^[4]，而相对于原代RPMVEC来说，HUVEC更易获得。因此，在研究淋巴液对内皮细胞作用时多选择HUVEC，为更直接地观察到淋巴液对肺组织本身的损伤，但也不乏有选择RPMVEC^[5]和人肺微血管内皮细胞(HMVEC或HLMVEC)的。本文就T/HS动物淋巴液对内皮细胞的损伤类型及机制进行综述。

1 动物模型

T/HS动物模型多以大鼠为主。T/HS制备的简要过程^[6]如下：大鼠麻醉成功后，分离右侧股动脉，置入预充0.1 ml肝素盐水的无菌PE-50导管，用于连续监测动脉压；从右侧颈外静脉置入50 G硅胶导管(预充0.1 ml肝素盐水)；开腹(即创伤)，肠系膜淋巴管置管；从右侧颈外静脉导管放血，使血压降至30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并维持90 min，抽出的血液以肝素抗凝备用，此为休克期；低血压维持90 min后，回输血液及晶体

液使血压恢复至失血前水平。假手术组(T/SS)动物只经历开腹和肠系膜淋巴管置管，不放血或输液。有研究者未把开腹手术作为创伤打击，则该模型只能称为HS模型^[7]。

2 T/HS淋巴液对内皮细胞的损伤

研究淋巴液对内皮细胞的损伤，主要通过细胞存活率、单层细胞对分子探针的通透性以及细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量变化等作为评价指标。细胞存活率的检测早先以锥虫蓝染色，近年多采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法。常以10 000~40 000的右旋糖酐罗丹明(dextran rhodamine)作为单层细胞通透性指标的分子探针，也有以白蛋白为探针的^[8]。LDH位于细胞内，在细胞损伤后释放出来，细胞培养上清液中的LDH可作为细胞损伤的标志物^[7]。另外，细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达增加也作为细胞损伤的标志物之一。

Adams的研究小组针对T/HS淋巴液进行了大量研究。他们发现经-80℃冻存的淋巴液(离心后的上清或未离心的淋巴液)与新鲜淋巴液具有相同的内皮细胞毒性，其毒性来自液性成分，与淋巴液内的细胞无关^[9]。不同时间点采集的HS或T/HS大鼠肠系膜淋巴液细胞毒性差异很大：休克复苏后1~3 h的淋巴液毒性最强^[10]，与HUVEC共同孵育3 h即能使其存活率下降至20%左右，而且即使在与HUVEC接触0.5 h后中止作用，仍对细胞的生存产生影响，间隔18 h再测细胞存活率仅有61%；若共同作用时间延长至18 h，休克复苏期最初3 h采集的淋巴液仍然显示出最强的细胞毒性，但休克期和休克复苏后4 h的淋巴液毒性显著增加，也能使HUVEC存活率降至20%左右；而复苏后5 h和6 h的淋巴液毒性最弱，与HUVEC作用3~6 h并未展现出细胞毒性，至18 h HUVEC存活率仍有70%左右^[6]。

不同时间点的HS或T/HS淋巴液对HUVEC单层细胞通透性的影响也不尽相同^[11]。将HUVEC接种于一个特殊的细胞培养系统中，待其铺满单层细胞后加入不同时间点采集的T/HS淋巴液，作用一定时间后再加入分子探针，用分光光度法进行检测。10%HS淋巴液与HUVEC作用1 h，其单层细胞通透性指数最高达到25%，作用3 h通透性指数可高达40%。休克期及休克复苏后6 h内的淋巴液均能增加HUVEC单层细胞通透性，其中复苏后2 h和3 h的淋巴液使单层细胞通透性达最高值^[11]。

HUVEC与HS大鼠淋巴液孵育2 h后收集上清液检测LDH发现，与休克前相比，休克期和休克后1~3 h淋巴液组的LDH含量明显升高，尤其休克后2 h淋巴液使LDH含量增加4倍以上^[7]；如作用时间延长至18 h，HS后1~3 h采集的淋巴液能使LDH含量较正常淋巴液组增加8~10倍^[9]。

HMVEC与HS大鼠肠系膜淋巴液共同孵育后加入脂多糖(LPS, 20 ng/ml)，检测到ICAM-1表达较同样条件下的正常淋巴液组增加近3倍^[13]。

除啮齿类动物的HS或T/HS淋巴液表现出内皮细胞毒性作用外，其他如猪、犬甚至灵长类动物的淋巴液均有类似的效应。HS复苏后2 h的犬淋巴液可使HMVEC对白蛋白的通透性增加2倍，ICAM-1表达增加2.5倍^[8]。T/HS猪的淋巴液可使HUVEC单层细胞对40 000右旋糖酐罗丹明通透性增加，休克后4 h淋巴液使其通透性达最大，而HUVEC的存活率却是在休克期淋巴液作用下最低，其次是休克后最初的2 h内，此后各时间点取得的淋巴液作用下HUVEC的存活率反而逐渐回升^[14]。T/HS狒狒胸导管淋巴液与HUVEC作用18 h，HUVEC存活率下降至16%，而T/SS组HUVEC存活率为100%^[15]。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.08.021

基金项目：上海市公共卫生重点学科建设项目(08GWZX1103)

作者单位：200003 上海，第二军医大学长征医院急救科

通信作者：林兆奋，Email: linzhaofen@sina.com

3 细胞损伤途径

研究者认为, 单层细胞通透性增加以及细胞存活率下降都与 T/HS 淋巴液诱导细胞凋亡有关^[8,16], 但细胞发生凋亡是通过什么途径还不能确定, 可能涉及到天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 和 (或) 非 caspase 途径。人们研究 T/HS 大鼠淋巴液致 HUVEC 死亡的形态学、生化及 DNA 分析的结果发现, 休克期和 T/HS 后 1~3 h 的淋巴液混合后与 HUVEC 共同作用 4 h, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察到细胞呈现出胞质皱缩、肌动蛋白细胞骨架瓦解、核固缩及胞膜表面突起等一系列典型的细胞凋亡的形态学改变; 凝胶电泳可见到典型的“DNA 梯型”(DNA ladder) 碎片; 生化检测游离核小体明显增多, 与 T/HS 淋巴液作用的细胞 caspase-3 活性比 T/SS 组升高 4 倍左右; 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 分析显示, T/HS 淋巴液作用后 HUVEC 内可检测到活化的 caspase-3、caspase-8、caspase-9 和 BID (bcl-2 家族成员之一), 泛 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 能消除与凋亡相关的这些蛋白质的活性改变, 但如果 HUVEC 与 T/HS 淋巴液作用时间足够长 (如 6 h), z-VAD-fmk 将失去此保护作用。作者由此认为, T/HS 淋巴液能诱导 HUVEC 发生凋亡, 其发生机制与 caspase 途径部分相关^[16]。但是同一组成员另一项关于 T/HS 淋巴液损伤内皮细胞的细胞通路实验却得到完全不同的结果^[17]。他们发现 T/HS 大鼠体内发生凋亡的 RPMVEC 和股静脉内皮细胞的凋亡诱导因子 (AIF) 呈现高表达, 其中肺内皮细胞 AIF 表达较对照组升高 35 倍, 而 caspase-3 表达没有变化; 体外实验结果也得出相似的结论, T/HS 淋巴液诱导 HUVEC 和 HLMVEC 发生 AIF 核转位, 敲除 AIF 基因能够逆转 T/HS 对内皮细胞的毒性作用, 而抑制这些细胞的 caspase 不能起到细胞保护作用。在 2011 年 8 月发表的一篇文章中, 研究者推断 T/HS 动物肠系膜淋巴液中的各种损伤因子通过激活 Toll 样受体 4 (TLR4) 通路导致肺损伤^[18]。T/HS 淋巴液的内皮细胞毒性是否也涉及 TLR4 通路目前还未见报道。

4 淋巴液中的毒性成分

现在还不清楚淋巴液中究竟哪一种

或哪些成分产生内皮细胞毒性, 可以肯定的是淋巴液包含具有生物活性的脂类和蛋白质。通过检测淋巴液中的促炎细胞因子水平发现, 不同时间点 T/HS 淋巴液的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 水平变化都不明显, 且与对照组无差异, 故认为 T/HS 淋巴液导致的 HUVEC 损伤与细胞因子无关^[6]。提取淋巴液上清中的脂质和非脂质分别进行细胞毒性验证, 发现 T/HS 淋巴液上清中的脂质和非脂质成分具有不同程度的内皮细胞毒性, HUVEC 与 T/HS 淋巴液的脂质萃取物作用 18 h 后测得的细胞存活率为 (65 \pm 11)%, 细胞与非脂质萃取物作用同样长的时间, 存活率仅为 (19 \pm 4)%, 同时观察到淋巴液非脂质萃取物对 HUVEC 的毒性效应与萃取前的全淋巴液上清毒性效应相似, 由此认为 T/HS 淋巴液的细胞毒性物质主要为其所含的非脂质成分^[19]。然而对大鼠淋巴液进行固相萃取, 分别用 T/HS 大鼠的全淋巴液上清和固相萃取的不同成分与 HUVEC 共同作用, 再把抑制 HUVEC 生长的成分经凝胶电泳或质谱分析, 发现淋巴液中具有 HUVEC 毒性作用的是脂类和少量蛋白质^[10]。还有研究者推测休克后肠系膜淋巴液之所以具有细胞毒性作用, 是因为正常情况下淋巴液的脂蛋白中含有保护性的抗炎成分, HS 复苏后这些保护性脂蛋白含量减少, 因而淋巴液失去原有的保护效应^[13]。

随着生物技术的发展, 人们对淋巴液成分的研究也不断深入。通过差异凝胶电泳和质谱分析等蛋白质组学技术, Peltz 等^[20]和 Zurawel 等^[21]找到 T/HS 大鼠淋巴液的差异蛋白质, 按其生物学功能可以分为以下五大类: 组织损伤、溶血、蛋白酶抑制剂、凝血/纤溶和脂类载体。这与急性胰腺炎大鼠淋巴液的蛋白质组学结果截然不同, 后者的差异蛋白质都是具有分解代谢活性的酶^[22]。这些差异蛋白质的发现为探索 T/HS 淋巴液在脓毒症和多器官功能障碍中的作用提供了新的思路和视角。

5 展望和有待解决的问题

在 T/HS 的进展及危重阶段都能观察到诸如毛细血管渗漏、组织间隙水肿、

浆膜腔积液或微血栓形成等血管内皮细胞功能障碍的征象, 而且常常伴随或加重休克。血管内皮细胞功能受损的机制往往涉及细胞死亡或细胞间连接破坏等诸多方面, 针对细胞间连接的保护措施在某些动物模型上已证实有一定的治疗效果^[1]。现有的证据已经表明病理状态下的淋巴液对内皮细胞具有毒性作用, 而且不同病理状态下淋巴液中具有细胞毒性作用的物质有所不同, 研究淋巴液对内皮细胞的损伤类型、机制及其中的毒性成分将可能有助于找到一个潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*, 2010, 363:689-691.
- [2] Deitch EA, Xu D, Lu Q. Gut lymph hypothesis of early shock and trauma-induced multiple organ dysfunction syndrome: a new look at gut origin sepsis. *J Organ Dysfunc*, 2006, 2:70-79.
- [3] 赵自刚, 牛春雨, 张静, 等. 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺损伤的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19:274-278.
- [4] Deitch EA, Adams CA, Lu Q, et al. Mesenteric lymph from rats subjected to trauma-hemorrhagic shock are injurious to rat pulmonary microvascular endothelial cells as well as human umbilical vein endothelial cells. *Shock*, 2001, 16:290-293.
- [5] 赵自刚, 陈瑞华, 牛春雨, 等. 休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮细胞炎症介质表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21:266-269.
- [6] Davidson MT, Deitch EA, Lu Q, et al. A study of the biologic activity of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph over time and the relative role of cytokines. *Surgery*, 2004, 136:32-41.
- [7] Adams CA Jr, Magnotti LJ, Xu DZ, et al. Acute lung injury after hemorrhagic shock is dependent on gut injury and sex. *Am Surg*, 2000, 66:905-912.
- [8] Diebel LN, Liberati DM, Ledgerwood AM, et al. Systemic not just mesenteric lymph causes acute lung injury following hemorrhagic shock. *Surgery*, 2008, 144:686-694.
- [9] Adams CA Jr, Xu DZ, Lu Q, et al. Factors

larger than 100 kd in post-hemorrhagic shock mesenteric lymph are toxic for endothelial cells. *Surgery*, 2001, 129: 351-363.

[10] Kaiser VL, Sifri ZC, Dikdan GS, et al. Trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph from rat contains a modified form of albumin that is implicated in endothelial cell toxicity. *Shock*, 2005, 23: 417-425.

[11] Deitch EA, Adams C, Lu Q, et al. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. *Surgery*, 2001, 129: 39-47.

[12] Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, et al. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg*, 1998, 228: 518-527.

[13] Cheng AM, Moore EE, Masuno T, et al. Normal mesenteric lymph blunts the pulmonary inflammatory response to endotoxin. *J Surg Res*, 2006, 136: 166-171.

[14] Senthil M, Brown M, Xu DZ, et al. Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model. *J Trauma*, 2006, 60: 958-967.

[15] Deitch EA, Forsythe R, Anjaria D, et al. The role of lymph factors in lung injury, bone marrow suppression, and endothelial cell dysfunction in a primate model of trauma-hemorrhagic shock. *Shock*, 2004, 22: 221-228.

[16] Davidson MT, Deitch EA, Lu Q, et al. Trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph induces endothelial apoptosis that involves both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Ann Surg*, 2004, 240: 123-131.

[17] Barlos D, Deitch EA, Watkins AC, et al. Trauma-hemorrhagic shock-induced pulmonary epithelial and endothelial cell injury utilizes different programmed cell death signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296: L404-417.

[18] Reino DC, Pisarenko V, Palange D, et al. Trauma hemorrhagic shock-induced lung injury involves a gut-lymph-induced TLR4 pathway in mice. *PLoS One*, 2011, 6: e14829.

[19] Dayal SD, Hauser CJ, Feketeova E, et al. Shock mesenteric lymph-induced rat polymorphonuclear neutrophil activation and endothelial cell injury is mediated by aqueous factors. *J Trauma*, 2002, 52: 1048-1055.

[20] Peltz ED, Moore EE, Zurawel AA, et al. Proteome and system ontology of hemorrhagic shock: exploring early constitutive changes in postshock mesenteric lymph. *Surgery*, 2009, 146: 347-357.

[21] Zurawel A, Moore EE, Peltz ED, et al. Proteomic profiling of the mesenteric lymph after hemorrhagic shock: differential gel electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Clin Proteomics*, 2010, 8: 1.

[22] Mittal A, Phillips AR, Middleditch M, et al. The proteome of mesenteric lymph during acute pancreatitis and implications for treatment. *JOP*, 2009, 10: 130-142.

(收稿日期: 2012-02-06)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

严重脓毒症/脓毒性休克的早期目标导向治疗: 在社区急诊科哪些措施更加难以实施?

早期目标导向治疗(EGDT)已被证明可以显著降低严重脓毒症/脓毒性休克患者的病死率,但是,在急诊科实施 EGDT 时是很困难的。最近美国学者就脓毒症 EGDT 在社区急诊科的实施情况进行了一项队列研究。研究对象为 2008 年 7 月至 2009 年 3 月在社区急诊科接受 EGDT 的 98 例成年脓毒症患者。研究的内容包括:晶体液注射、抗菌药物使用、中心静脉置管、动脉置管、血管升压药应用、中心静脉血氧饱和度监测和标准化流程的应用。研究结果显示:EGDT 各流程实施最多的是血管升压药物使用[比例 79%, 95% 可信区间(95%CI)为(69%, 89%)]和抗菌药物应用[比例 78%, 95%CI(68%, 85%)],实施最少的措施包括动脉置管[比例 42%, 95%CI(32%, 52%)],中心静脉压监测[比例 27%, 95%CI(18%, 36%)],中心静脉血氧饱和度监测[比例 15%, 95%CI(7%, 23%)]。共有 57 例患者存活,病死率 33%。所有研究的 EDGT 措施中只有推注晶体液这一措施在存活与死亡患者间存在统计学差异[79%比 46%, 相对危险度(RR)=1.76, 95%CI(1.11, 2.58)]。据此研究人员认为,在社区医院条件下脓毒症 EDGT 较难开展的措施为动脉置管、中心静脉压监测和中心静脉血氧饱和度监测,而给予晶体液能提高患者生存率。

喻文,编译自《J Emerg Med》, 2012, 42: 503-510; 胡森, 审校

在社区教学医院实施脓毒症管理指南教育是否使脓毒症患者获益?

在社区教学医院实施脓毒症管理指南教育能否使脓毒症患者从中获益?最近美国研究人员对此进行了一项观察性队列研究。研究对象为某社区教学医院 2003 年 7 月至 2004 年 6 月以及 2005 年 7 月至 2006 年 7 月收治的严重脓毒症或脓毒性休克患者。在其中一个时间段实施以“拯救脓毒症运动”(SSC)指南为基础的综合性脓毒症教育计划,并比较实施该计划前后的临床疗效差异。结果共有 96 例患者(对照组 34 例和 SSC 组 62 例)纳入研究。两组住院时间和机械通气时间差异均无统计学意义;而 SSC 组患者的生存率高于对照组(73%比 45%, P=0.006)。对照组和 SSC 组患者抗菌药物使用情况也没有差异(85%比 90%, P=0.459),对照组和 SSC 组之间的主要区别是前 3 h 的早期液体复苏量(2 L 和 3 L, P=0.006),且在入院 6 h 这一差异仍具有统计学意义(4.2 L 比 6.3 L, P=0.013)。因此,研究人员认为,在社区教学医院通过一个教育计划实施 SSC 指南是可行的,这能使患者在早期接受更积极的液体复苏方案,并提高患者生存率。

喻文,编译自《Int J Clin Pract》, 2012, 66: 705-710; 胡森, 审校