

联胺诱导内皮细胞的条件培养基对内皮细胞脂质过氧化物和诱导型一氧化氮合酶的影响

吴开云, 许国安¹

(苏州大学医学院解剖学教研室, 江苏省苏州市 215006; 1. 解放军第 94 医院)

[主题词] 动脉粥样硬化; 下丘脑; 垂体; 内皮, 血管; 一氧化氮; 脂质过氧化作用

[摘要] 为了探讨内皮细胞的自分泌和旁分泌对受损内皮细胞的影响, 以及下丘脑—垂体参与后对其的作用, 将正常内皮细胞条件培养基、联胺诱导内皮细胞的条件培养基及下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导内皮细胞的条件培养基分别作用正常内皮细胞和受损内皮细胞, 并检测其脂质过氧化物丙二醛和诱导型一氧化氮合酶表达的变化。结果发现, 联胺诱导的内皮细胞条件培养基对受损内皮细胞丙二醛代谢有明显下调作用 ($P < 0.01$); 而下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导的内皮细胞条件培养基对正常内皮细胞和受损内皮细胞丙二醛代谢均有下调作用 ($P < 0.01$), 其中对受损内皮细胞下调更明显。联胺诱导的内皮细胞条件培养基对正常内皮细胞诱导型一氧化氮合酶的表达无明显调节作用, 而对受损内皮细胞诱导型一氧化氮合酶的表达有上调作用; 下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导的内皮细胞条件培养基对正常内皮细胞和受损内皮细胞诱导型一氧化氮合酶均有上调作用 ($P < 0.05$), 其中对受损内皮细胞上调更明显 ($P < 0.01$)。结果提示, 内皮细胞受到联胺脂质过氧化损伤时, 其自分泌和旁分泌作用能下调其丙二醛的代谢和上调诱导型一氧化氮合酶的表达, 这种调节作用可能是内皮细胞自身抗外来伤害的调节机制之一。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

Influence of the Conditioned Media of Endothelial Cells Induced by Diamide and Affected by Hypothalamus-Pituitary Cells on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Metabolism of Lipid Peroxide in Cultured Endothelial Cells

WU Kai Yun, and XU Guo An

(Department of Anatomy, Medical College, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

[MeSH] Atherosclerosis; Hypothalamus; Pituitary Gland; Endothelium, Vascular; Nitric Oxide; Lipid peroxidation

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether the autocrine and paracrine secretion of the damaged endothelial cells (EC) can regulate the damaged EC and the effect of hypothalamus-pituitary neuroendocrine axis on the autocrine and paracrine secretion of the damaged EC. The changes in the metabolism of lipid peroxide (LPO) and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected through the influence of conditioned media of endothelial cells (EC-CM) induced by diamide and affected by hypothalamus-pituitary cells on injured EC respectively. **Methods** The normal EC-CM was used in the control group.

In the experimental group, the EC-CM induced by diamide and the EC-CM induced by both conditioned medium of hypothalamus-pituitary cells and diamide were prepared. The EC injured by diamide were cultured respectively with the above three EC-CM.

After culturing with the three EC-CM, all EC of the experimental and control groups were cultured in serum-free medium.

Then the supernatant of the above serum-free media and cultured EC were collected for detecting the content of LPO and iNOS.

Results It was shown the EC-CM induced by diamide and the EC-CM induced by both conditioned medium of hypothalamus-pituitary cells and diamide had down regulative effect on the metabolism of LPO and up regulative effect on iNOS expression of injured EC. However, the medium containing hypothalamus-pituitary tissue showed more intensive anti-lipid peroxidation effect.

Conclusion It is suggested that when EC was damaged by diamide, its autocrine and paracrine secretion can regulate its LPO metabolism down and regulate its iNOS expression up, which might be one of the mechanisms in EC for defending against external injury.

内皮细胞 (endothelial cells, EC) 的自分泌和旁分泌有抑制 EC 和平滑肌细胞增殖作用^[1], 受损 EC

自分泌和旁分泌作用促进平滑肌增殖^[2], 但受损 EC 自分泌和旁分泌对其自身的调节如何? 受损 EC 之间是否存在相互保护的调节机制? 还未见文献报导。另外, 近年来人们已关注神经内分泌因素对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成的影响, 我们实验室以前的工作也证实下丘脑神经内分泌中枢对 As 的形成具有重要影响^[3-5], 因此, 本文通过用联胺

[收稿日期] 2001-11-19 [修回日期] 2002-07-10

[基金项目] 江西省自然科学基金资助。

[作者简介] 吴开云, 男, 汉族, 1954 年 11 月出生, 江西安福人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为下丘脑神经内分泌中枢对动脉粥样硬化形成的影响及调控研究。许国安, 男, 汉族, 1966 年出生, 江苏扬州人, 硕士研究生。

诱导 EC 的条件培养基及下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导 EC 的条件培养基分别作用正常和受损 EC, 检测其脂过氧化物代谢变化中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 表达的变化, 以探讨受损 EC 自分泌和旁分泌以及下丘脑—垂体内分泌对受损 EC 是否有影响或调节作用?

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂

人 3~5 个月龄水囊引产的胚胎 (本院附属第一医院妇产科提供), 人脐静脉 EC (细胞株 ECV-304, 上海细胞所购买), 丙二醛试剂盒 (南京建成生物制品有限公司购买), SABC 免疫细胞化学染色试剂盒和 iNOS 抗体 (博士德公司)。

1.2 下丘脑—垂体细胞培养及条件培养基的制备

参照文献 [6], 选用人 3~5 个月龄水囊引产胚胎, 在无菌条件下取下丘脑、垂体组织, 剪碎, 加入终浓度为 0.125% 胰蛋白酶消化约 5 min 后, 加入含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 低速离心后, 弃上清液, 再用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基制成 1×10^8 /L 细胞悬液, 分别移入 30 mL 细胞培养瓶内, 在 37℃、5% CO₂ 条件下静置培养一周后, 将下丘脑无血清条件培养基移入弃培养液的垂体培养瓶内, 继续培养 24 h 后, 收集细胞培养液, 即为下丘脑垂体条件培养基, -70℃ 保存。

1.3 正常内皮细胞条件培养基的制备

将传代人脐静脉 EC 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基按 1×10^8 个/L 培养于 6 孔培养板中, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 于 52 h 后弃其培养基, 换 MEM 无血清培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 收集上清液, 即为正常 EC 条件培养基 (NEC-CM), -70℃ 保存。

1.4 联胺诱导内皮细胞条件培养基的制备

将传代人脐静脉 EC 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基按 1×10^8 个/L 培养于 6 孔培养板中, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后, 加入终浓度为 6×10^{-3} mol/L 联胺, 继续培养 4 h, 弃其培养基, 换无血清 MEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 收集上清液, 即为联胺诱导 EC 条件培养基 (DEC-CM), -70℃ 保存。

1.5 下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导内皮细胞条件培养基的制备

将传代人脐静脉 EC 用含 10% 小牛血清的 RP-

MI 1640 培养基按 1×10^8 个/L 培养于 6 孔培养板中, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 弃培养基, 每孔加下丘脑垂体细胞培养液和 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基各 2 mL, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 加入终浓度为 6×10^{-3} mol/L 联胺, 继续培养 4 h, 弃其培养基, 换无血清 MEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 收集上清液, 即为下丘脑垂体细胞培养基加联胺诱导 EC 条件培养基 (HDEC-CM), -70℃ 保存。

1.6 实验方法及分组

实验组分别为 DEC-CM 组和 HDEC-CM 组, 对照组为 NEC-CM 组, 三组条件培养基分别作用正常 EC 和受损 EC。操作步骤如下: 将传代人脐静脉 EC 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基按 1×10^8 个/L 培养于 24 孔培养板中 (每个培养孔底平置一块 5 mm × 5 mm 盖玻片), 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h, 受损 EC 加入终浓度为 6×10^{-3} mol/L 联胺, 正常 EC 不加联胺, 继续培养 4 h 后, 弃培养基, 实验组分别加入 DEC-CM、HDEC-CM 0.5 mL, 对照组加 NEC-CM 0.5 mL, 另加 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基 0.5 mL, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 弃其培养基, 换无血清 MEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 分别收集 EC 上清液检测丙二醛含量, 取出培养孔底放置的盖玻片, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用于 iNOS 免疫细胞化学染色。

1.7 丙二醛含量测定

用硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量, 测定步骤按丙二醛试剂盒操作说明进行。

1.8 诱导型一氧化氮合酶免疫细胞化学染色

按 SABC 免疫细胞化学试剂盒说明书操作: 将培养的 EC 入 0.5% H₂O₂ 甲醇阻断内源性过氧化物酶, 37℃, 30 min; ④正常羊血清, 37℃, 20 min; ⑤入 1:150 iNOS 一抗, 4℃, 24 h; 生物素化羊抗小鼠免疫 IgG, 37℃, 30 min; SABC, 37℃, 20 min; DAB 显色, 室温, 显微镜下控制显色时间; 以上每步之间用 0.01 mol/L PBS 洗三次; ⑧脱水, 封片, 自然干燥。用计算机图像分析系统作半定量分析, 其含量用积分光密度 (integral optical density, IOD) 表示。

1.9 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作方差分析 F 检验, 组间比较用 q 检验。

2 结果

2.1 三种条件培养基对内皮细胞丙二醛代谢影响

联胺诱导内皮细胞条件培养基(DEC-CM)对受损 EC 丙二醛代谢有明显下调作用($P < 0.01$);而 HDEC-CM 对正常 EC 和受损 EC 丙二醛代谢均有下调作用($P < 0.01$),其中对受损 EC 下调更明显($P < 0.01$);两个实验组相比,HDEC-CM 作用又更明显(表 1, Table 1)。

表 1. 内皮细胞上清液丙二醛含量的测定。

Table 1. The content of MDA in the supernatant of EC ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, nmol/L)。

Groups	NEC	DEC
NEC-CM	2.074 \pm 0.342	2.068 \pm 0.351
DEC-CM	2.075 \pm 0.340	1.315 \pm 0.343 ^a
HDEC-CM	1.437 \pm 0.127 ^a	0.902 \pm 0.091 ^a

a: $P < 0.01$, compared with their own control group respectively.

2.2 三种条件培养基对内皮细胞诱导型一氧化氮合酶表达的影响

从表 2(Table 2)中可以看出,DEC-CM 对受损 EC iNOS 表达有上调作用($P < 0.05$);HDEC-CM 对正常 EC 和受损 EC iNOS 表达均有上调作用($P < 0.05$),其中对受损 EC 上调更明显($P < 0.01$)。

表 2. 内皮细胞 iNOS 阳性表达积分光密度值。

Table 2. The IOD of value iNOS expressed in EC ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, nmol/L)。

Groups	NEC	DEC
NEC-CM	15.873 \pm 3.234	21.283 \pm 3.177
DEC-CM	16.665 \pm 3.435	26.934 \pm 3.078 ^a
HDEC-CM	22.953 \pm 3.654 ^a	32.573 \pm 3.432 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with their own control group respectively.

3 讨论

内皮细胞(EC)受损是 As 发生的早期事件^[7,8],引起 EC 受损的因素很多,在诸多因素中脂质过氧化引起 EC 的损伤与 As 形成的关系日益受到重视,脂质过氧化是一种由自由基介导的细胞损伤机制。联胺是一种巯基氧化剂,可降低细胞内谷胱甘肽过氧化物酶活性,使细胞内抗氧化能力减弱,致发生脂质过氧化损伤^[9]。本文用联胺诱导 EC 脂质过氧化损伤,作为 EC 损伤模型来研究受损 EC 自分泌和旁分泌作用以及下丘脑垂体条件培养基对其的影响。Rubanyi 等^[1]提出内皮是一种兼有感应与效应的细胞,EC 接受各种不同外来的刺激后,可分泌多种活

性物质,如 NO 和 CO 小分子血管活性物质和生长抑制素、内皮素、血管紧张素等肽能物质,这些物质可通过旁分泌方式调节血管壁张力和抑制血管平滑肌细胞增殖^[10]。研究正常 EC 和平滑肌细胞自分泌和旁分泌对正常细胞的影响已有文献^[11,12]报道,但受损 EC 的自分泌和旁分泌对其自身的调节如何?受损 EC 之间是否存在相互保护的调节机制?还未见文献报导,本文首先用联胺诱导脂质过氧化损伤的 EC 条件培养基作用受损 EC 和正常 EC,检测其丙二醛代谢和 iNOS 表达的变化来探明受损 EC 自分泌和旁分泌以及下丘脑—垂体内分泌对受损 EC 的影响。结果发现,联胺诱导脂质过氧化损伤的 EC 条件培养基对受损 EC 有下调丙二醛的代谢($P < 0.01$)和上调 iNOS 阳性表达的作用($P < 0.05$),表明 EC 受到联胺脂质过氧化损伤时,其自分泌和旁分泌作用可通过下调受损 EC 的丙二醛代谢和上调受损 EC iNOS 的表达来调节细胞的抗损伤作用,并且这种旁分泌调节作用与下丘脑垂体分泌的参与有重要关系。本实验是体外细胞模型实验,下丘脑—垂体神经内分泌轴对 EC 自分泌和旁分泌是否存在真正意义上的调控作用,还有待进一步研究证实。本文结果提示,EC 受到外来伤害性刺激时,通过其自分泌和旁分泌局部调节作用可能是 EC 内源性抗损伤机制之一。

[参考文献]

- [1] Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **22** (Suppl 4): 1-14
- [2] 夏春枝,邓仲端. 内皮细胞脂质过氧化损伤与平滑肌增殖的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (3): 181-184
- [3] 吴开云,高摄渊. 毁损弓状核对动脉硬化形成的影响. *神经解剖学杂志*, 1999, **15** (1): 79-81
- [4] 吴开云,高摄渊,熊俊平,等. 移植胚鼠弓状核细胞后对动脉粥样硬化形成的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (2): 118-120
- [5] 魏波,吴开云. 下丘脑-垂体条件培养基对培养血管内皮细胞一氧化氮和脂质过氧化物代谢的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 285-288
- [6] 洪庆涛,唐一鹏. 新生大鼠大脑皮层神经细胞的体外原代培养. *神经解剖学杂志*, 1994, **10** (3): 259-261
- [7] Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 2153-2157
- [8] Pepine CJ. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol*, 1997, **79** (5): 3-8
- [9] 尹鸿操,陈铁真,董玉兰,等. 脂质过氧化对培养内皮细胞表达细胞粘附分子的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (2): 120-124
- [10] Douglas SA, Hiley CR. Endothelium dependent vascular activities of endothelin-like peptides in the isolated superior mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol*, 1990, **101**: 81-88
- [11] 徐仓宝,张亚萍,王亚文. 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基抑制血管平滑肌细胞增殖. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 17-20
- [12] Xu CB, Stavenow L, Pessier Rasmussen H. Interactions between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells: Studies on the release of prostacyclin by endothelial cells. *Artery*, 1992, **19**: 94-111

(此文编辑 文玉珊)