论著

文章编号:1000-5404(2007)13-1326-03

体外循环血清孵育及NAC干预对血管内皮细胞凋亡的影响

曾祥君,肖颖彬,王学锋,陈 林,钟前进 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

提 要:目的 观察体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)血清对培养血管内皮细胞凋亡的影响及N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine,NAC)的干预作用。**方法** 采用CPB血清致伤培养血管内皮细胞模型,以TUNEL方法及流式细胞术观察培养血管内皮细胞凋亡的改变。**结果** CPB血清可致培养血管内皮细胞凋亡明显增加,0.1、1 mmol/L NAC减少CPB血清诱致的培养内皮细胞凋亡,10、100 mmol/L NAC加重CPB血清诱致的培养内皮细胞凋亡。**结论** CPB血清诱致培养血管内皮细胞凋亡增加,低浓度NAC对CPB血清诱致的内皮细胞凋亡有保护作用,高浓度NAC加重CPB血清诱致的内皮细胞凋亡。

关键词:血管内皮细胞;体外循环;N-乙酰半胱氨酸;凋亡

中图法分类号:R322.12;R329-33;R329.28 **文献标识码**:A

Effect of NAC on apoptosis induced by CPB serum of *in vitro* cultured endothelial cells

ZENG Xiang-jun, XIAO Ying-bin, WANG Xue-feng, CHEN Lin, ZHONG Qian-jin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of NAC on the apoptosis of cultured endothelial cells induced by CPB serum. Methods The endothelial cells were co-cultured with serum before PBC, serum after PBC, serum after PBC added with NAC (0.1, 1, 10, 100 mmol/L). The apoptosis of cultured endothelial cells was detected by TUNEL techniques and flow cytometry. Results The apoptosis of cultured endothelial cells was increased by serum after CPB. NAC (0.1, 1 mmol/L) inhibited the apoptosis of cultured endothelial cells induced by CPB serum, while NAC at the concentration of 10, 100 mmol/L increased the apoptosis. Conclusion Proper concentration of NAC is important in preventing the endothelial cells from apoptosis induced by CPB serum.

Key words: vascular endothelium; cardiopulmonary bypass; N-acetyl-L-cysteine; apoptosis

体外循环导致全身炎症反应,N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine,NAC)可补充细胞内还原型巯基库,对抗氧自由基的细胞损伤作用,从而缓解体外循环后全身炎症反应。既往研究证明,炎症反应时氧化应急可以诱导细胞凋亡,然而NAC对体外循环诱致的血管内皮细胞凋亡的影响尚少见报道。为了更好地保护体外循环后的血管内皮细胞,减轻血管内皮细胞损伤,本实验观察了体外循环血清孵育及NAC干预对培养血管内皮细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、器材

RPMI1640(Gibco,美国),小牛血清、NAC(Sigma,美国),PCD凋亡检测试剂盒(德国宝灵曼公司),2300型恒温CO_2孵箱,流式细胞仪及真彩色医学图像分析仪等。

1.2 血清来源

研究对象为2006年3月在我院接受心脏手术的5例先天性心脏病患儿,体外循环前及体外循环结束时无菌分离血浆,离心,去纤维蛋白原,得血清,-70 ℃冷冻贮存备用。

1.3 人脐静脉血管内皮细胞培养及鉴定

采用姚磊等[1]介绍的胎儿脐静脉内皮细胞培养法。实验用融合后1~2 d的血管内皮细胞。内皮细胞的鉴定采用辣根过氧化物酶抗辣根过氧化物酶法(PAP法),检测Ⅷ因子抗原。

1.4 实验分组

①CPB前血清孵育组;②CPB后血清孵育组;③含0.1 mmol/L NAC的CPB血清孵育组;④含1 mmol/L NAC的CPB血清孵育组;⑤含10 mmol/L NAC的CPB血清孵育组;⑥含100 mmol/L NAC的CPB血清孵育组。

1.5 内皮细胞凋亡的观察

1.5.1 细胞准备 按20%的比例将体外循环血清与无血清的RPMI1640基础培养液混合成人血清培养基;待脐静脉内皮细胞呈现单细胞层,吸出含20%小牛血清的细胞培养液,以无血清的细胞培养液清洗2次,每孔分别加入体外循环前人血清培养液及含100、10、1、0.1、0 mmol/L NAC体外循环后人血清

作者简介:曾祥君(1970-),男,四川省乐山市人,博士,主治医师,讲师,主要从事心血管疾病的基础及临床方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)66313898,E-mail:wundt123@sina.com

收稿日期:2006-09-07;修回日期:2007-01-16

培养基 2.0 ml，37 ℃，5% CO_2 孵育 4 h。

1.5.2　TdT 介导的末端标记（TUNEL）的染色　　标记采用德国宝灵曼 PCD 检测试剂盒参照说明书介绍的方法进行，在倒置显微镜下观察结果，每个样本观察 5 个不相重叠的视野，计数每个高倍镜下 TUNEL 标记阳性细胞与总细胞数之比（凋亡指数）。

1.5.3　流式细胞仪检测细胞凋亡　　分别收集各组细胞，PBS 洗细胞 2 次，用预冷的 70% 乙醇固定，4 ℃过夜，离心并将细胞重悬于 1 ml PBS 调整细胞浓度为 5×10^6/ml，加 Rnase 及 PI，避光 4 ℃染色 30 min。流式细胞仪检测凋亡细胞的百分比，用 Cell Quest 软件对结果进行分析。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

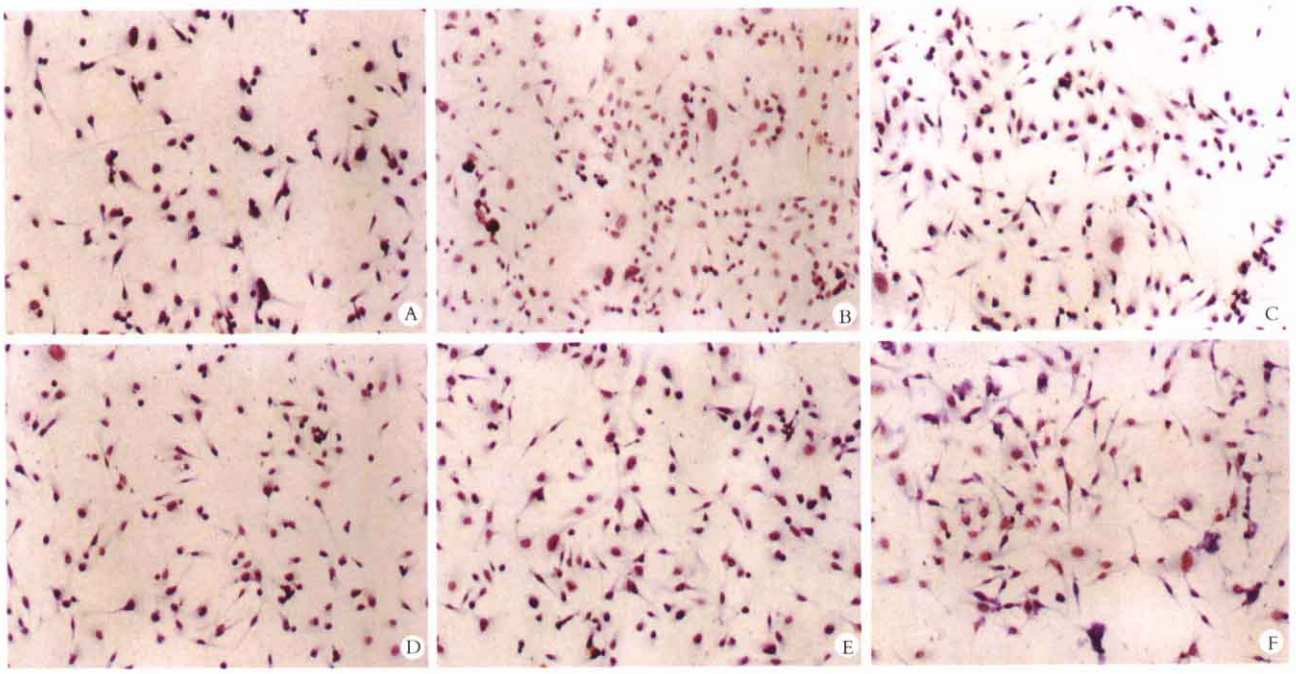
2　结果

2.1　细胞形态观察

倒置显微镜下观察可见 CPB 前血清组细胞紧密贴壁，呈铺路石状生长；CPB 后血清孵育组可见较多细胞呈圆形，细胞膜空泡，核浓缩；含 0.1、1 mmol/L NAC 的 CPB 血清孵育组见上述细胞较 CPB 后血清孵育组明显减少；含 10、100 mmol/L NAC 的 CPB 血清孵育组见上述细胞较 CPB 后血清孵育组有所增加，培养上清液中见较多散在的单个脱落细胞，体积缩小，细胞体致密。

2.2　NAC 对 CPB 血清致培养血管内皮细胞凋亡的观察

TUNEL 法及流式细胞仪检测显示：①体外循环血清孵育明显导致培养血管内皮细胞凋亡增加（$P < 0.01$）；②含 0.1、1 mmol/L NAC CPB 血清孵育组内皮细胞凋亡低于 CPB 后血清孵育组（$P < 0.05$）；③含 10、100 mmol/L NAC CPB 血清孵育组内皮细胞凋亡明显高于 CPB 后血清孵育组（$P < 0.01$）。表明体外循环可以导致血管内皮细胞凋亡增加，低浓度 NAC 对体外循环导致的血管内皮细胞凋亡有一定保护作用，高浓度 NAC 加重血管内皮细胞凋亡的发生。见图 1，表 1。



A：CPB 前血清孵育组；B：CPB 后血清孵育组；C：含 0.1 mmol/L NAC CPB 血清孵育组；D：含 1 mmol/L NAC CPB 血清孵育组；E：含 10 mmol/L NAC CPB 血清孵育组；F：含 100 mmol/L NAC CPB 血清孵育组

图 1　CPB 血清孵育及 NAC 干预对血管内皮细胞凋亡的影响　（TUNEL × 100）

表 1　体外循环血清诱致培养血管内皮细胞凋亡及 NAC 的影响（$n = 5$，$\bar{x} \pm s$）

组别	TUNEL 凋亡指数（%）	细胞凋亡率（%）
CPB 前血清孵育组	4.6 ± 0.3[b]	3.2 ± 0.3[b]
CPB 后血清孵育组	24.4 ± 3.0	21.4 ± 0.6
0.1 mmol/L NAC 血清孵育组	17.5 ± 4.1[a]	18.7 ± 0.5[a]
1 mmol/L NAC 血清孵育组	16.0 ± 3.0[a]	15.4 ± 0.6[a]
10 mmol/L NAC 血清孵育组	33.9 ± 1.9[b]	31.5 ± 0.6[b]
100 mmol/L NAC 血清孵育组	58.5 ± 7.7[b]	48.6 ± 1.1[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 CPB 后血清孵育组比较

3　讨论

本实验结果表明：体外循环后血清孵育的血管内皮细胞凋亡较体外循环前血清孵育明显增高，低浓度 NAC 在一定程度上减少血管内皮细胞凋亡，但高浓度 NAC 加重内皮细胞凋亡。

体外循环中大量炎性介质的释放必然导致体外循环后全身炎症反应，对于婴幼儿患者和经历长时间转流的患者，严重的全身炎症反应容易引起术后多器官

功能衰竭,危及患者生命[2]。N-乙酰半胱氨酸(NAC)是含巯基化合物,易于进入细胞内,增加细胞内谷胱甘肽(GSH)的含量[3]。NAC可补充细胞内缓冲体系中还原型巯基库,对抗氧自由基的细胞损伤作用。大量的实验的表明,NAC具有缓解全身炎症反应的作用[4]。

细胞凋亡是一种具有形态学特点的细胞死亡形式,是细胞发育程序中的一个组成部分,往往是短暂的细胞活动过程中的最终结果,故被称为程序性死亡(PCD)。既往研究证明,氧化应激可以诱导细胞凋亡[5]。本实验中CPB血清孵育的血管内皮细胞凋亡指数较CPB前血清孵育明显增高,表明体外循环后的炎性因子激活可以导致血管内皮细胞凋亡增加。实验进一步探讨了具有抗炎作用的NAC对体外循环后血管内皮细胞凋亡的保护作用,结果表明NAC对血管内皮细胞凋亡的保护具有一定的剂量范围,低浓度NAC减少血管内皮细胞凋亡,但高浓度NAC加重内皮细胞凋亡。

综上所述,NAC用于缓解体外循环后全身炎症反应,必须注意对血管内皮细胞的保护。低浓度的NAC既能发挥抗炎作用,又能减轻体外循环后血管内皮细胞凋亡。较高浓度的NAC可加重内皮细胞凋亡的程度,造成血管内皮细胞损伤。

参考文献:

[1] 姚 磊,盛 鹏,朱德钟. 培养人脐静脉血管内皮细胞的研究[J]. 实用医技杂志,1999, 6(12): 915-916.

[2] Schauser K, Larsson L I. Programmed cell death and cell extrusion in rat duodenum: a study of expression and activation of caspase-3 in relation to C-jun phosphorylation, DNA fragmentation and apoptotic morphology[J]. Histochem Cell Biol, 2005, 124(3-4): 237-243.

[3] Li S, Price R, Phiroz D, *et al*. Systemic inflammatory response during cardiopulmonary bypass and strategies[J]. J Extra Corpor Technol, 2005, 37(2): 180-188.

[4] Olanders K, Borjesson A, Sun Z W, *et al*. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine and platelet activating factor inhibition are not linked to intercellular adhesion molecule-1 expression after intestinal ischemia and reperfusion injury in rats[J]. Scand J Gastroenterol, 2003, 38(6): 618-625.

[5] Porter A G, Urbano A G. Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells? [J]. Bioessays, 2006, 28(8): 834-843.

(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)13-1328-01

肾透明细胞癌术后10年空肠转移1例

王立明[1],郑 灵[2],杨 华[1],张朝军[1],马 丹[1] ([1]第三军医大学新桥医院普通外科,重庆 400037;[2]成都军区324中心医院五官科,重庆 400020)

1 临床资料

患者,女性,54岁,因间歇性中上腹隐痛不适2个月,加重伴黑便5 d入院。体格检查:中度贫血貌,腹平软,右侧肾区见长约20 cm手术疤痕,中上腹压痛明显,无反跳痛。全腹未扪及肿块。辅助检查:Hgb 64 g/L;胃镜及肠镜未发现异常;全消化道钡餐提示空肠下段有不规则环状狭窄和充盈缺损,黏膜破襞破坏,中断,考虑空肠下段新生物。既往史:患者于10年前因右肾肿瘤在我院行右肾切除术,术后病理诊断为肾透明细胞癌。入院诊断:①空肠肿瘤伴出血;②右肾切除术后。入院后经消炎、止血及改善营养等对症治疗,1周后在全麻下行剖腹探查,空肠肿瘤切除术。术中探查发现小肠距曲氏韧带约180 cm处肠管高度扩张,肠腔内可扪及大小约7 cm×5 cm×4 cm肿块,质地坚实,有蒂形成,边界清楚,供血丰富,表面溃烂出血,未侵及浆膜。手术完整切除肿瘤及两侧各20 cm肠管,将剩余空肠对端吻合,彻底清扫肿大淋巴结。术后病理诊断:小肠透明细胞癌,肿瘤侵犯浅肌层,形态符合肾透明细胞癌转移。患者术后2周康复出院。

2 讨论

肾透明细胞癌是肾腺癌的一种类型,可以转移至身体几乎任何部位,包括很少发生肿瘤转移的器官及部位,如鼻腔、口腔、喉、甲状旁腺、心脏、脑垂体、肾上腺等[1]。其远处转移常通过淋巴和血道转移,常见转移部位为肺,其次为骨等器官,临床较早发生远处转移[2]。本例肾透明细胞癌10年后发生远处转移,临床较为少见,其转移至空肠则更为罕见。

关键词:肾透明细胞癌;空肠转移
中图法分类号:R73-37 文献标识码:B

参考文献:

[1] 郭 华. 肾透明细胞癌术后13年气管内转移1例[J]. 诊断病理学杂志, 2001, 8(4): 212.

[2] 饶植谋,罗光明,杨 强. 肾透明细胞癌8年后转移1例[J]. 肿瘤防治研究, 1997, 24(5): 321.

(编辑 郭建秀)

作者简介:王立明(1965-),男,湖北省武汉市人,博士,副教授,主要从事消化道肿瘤的发病机制方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68774405,E-mail:wangliqi500@msn.com

收稿日期:2007-04-19;修回日期:2007-05-15