文章编号:1000-5404(2008)17-1615-03

论著

内皮脂肪酶对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达的影响及量效关系

方玉强,黄 岚,赵晓辉,尹扬光,康华丽,邓梦杨 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 研究内皮脂肪酶(endothelial lipase, EL)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)黏附分子 ICAM-1 表达的影响及量效关系。**方法** 以 TNF-α(10ng/ml)刺激 HUVEC,用 RT-PCR 检测黏附分子 ICAM-1 mRNA 表达的变化;以 50 ng/ml EL 抗体进行预处理,再检测黏附分子 mRNA 表达的变化;再用 0~50 ng/ml 不同浓度 EL 抗体对 HUVEC 进行预处理,检测不同浓度 EL 抗体作用后 ICAM-1 mRNA 表达的变化。**结果** HUVEC 受 TNF-α 作用后,ICAM-1 表达显著增加($P<0.01$),该作用可为 EL 抗体所拮抗,这种拮抗作用呈现剂量依赖性增强($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** EL 可呈剂量依赖性的促进内皮细胞表达 ICAM-1,提示 TNF-α 作用于 HUVEC 产生的 EL 可促进黏附分子 ICAM-1 的表达。

关键词:内皮脂肪酶;HUVEC;ICAM-1;TNF-α
中图法分类号:Q556;R322.123;R392.11 **文献标识码:**A

Effects of endothelial lipase on ICAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells

FANG Yu-qiang, HUANG Lan, ZHAO Xiao-hui, YIN Yang-guang, KANG Hua-li, DENG Meng-yang (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective Endothelial lipase (EL) modulates the monocyte adhesion to the endothelial cells. We explore the effect of EL on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. Methods Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with TNF-α (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) + anti-EL antibody (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 ng/ml, respectively) or serum-free media, then the expression levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA were detected by RT-PCR. Results After treated with TNF-α, the ICAM-1 mRNA levels expressed by HUVECs were significantly increased. These effects were significantly antagonized by anti-EL antibody in a dose-dependent manner. Conclusion EL expressed in HUVECs stimulated by TNF-α can promote the expressions of adhesion molecules in endothelial cells, indicating EL may participate in the pathophysiologic progress of coronary artery disease.

Key words: endothelial lipase; HUVEC; ICAM-1; TNF-α

在冠心病动脉粥样硬化(artherosclerosis, AS)的发病过程中,内皮细胞受损、黏附分子表达、单核细胞等炎性细胞与血管内膜黏附并引起血管炎症反应是 AS 的关键和始动环节[1]。细胞间黏附分子(intercellur adhesion molecule,ICAM)能介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间相互黏附,对炎性细胞的渗出、迁移等有重要作用,因而在冠心病发病中起着重要作用。内皮脂肪酶(endothelial lipase,EL)是 1999 年发现的脂肪酶家族成员[2],是体内高密度脂蛋白代谢的关键酶[3]。当受到致炎因素如 TNF-α、IL-1β 作用后,内皮细胞可高表达 EL[4]。研究表明 EL 可促进单核细胞与血管内皮细胞黏附,而此作用与酶促作用无关[5]。但 EL 是否通过影响内皮细胞黏附分子 ICAM-1 的表达而参与 AS 的形成,目前尚不清楚。为此,本研究以 TNF-α 和 EL 抗体为工具,研究人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)表达 ICAM-1 与 EL 的关系,以期了解 EL 在内皮细胞表达 ICAM-1 中的作用及剂量依赖关系。

基金项目:国家自然科学基金(30470729)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470729)
作者简介:方玉强,男,四川省资阳市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事冠心病发病机制及防治方面的研究。E-mail:yuqfang@163.com
通信作者:黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail:huanglans@21cn.com
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-09-21

1 材料与方法

1.1 实验材料、药品和试剂

HUVEC 购自美国 ACTT 公司，TNF-α 购自美国 Sigma 公司，RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司，RNArose 购自上海华舜生物工程有限公司。

1.2 引物序列

设计黏附分子的引物序列。① ICAM-1（943 bp），正向 5′-GTCCCCCTCAAAAGTCATCC-3′；反向 5′-AACCCCATTCAGCGTCACCT-3′。② GAPDH（309 bp，内参照），正向：5′-CATCACCATCTTCCAGGAGC-3′；反向：5′-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3′。

1.3 TNF-α 诱导 HUVEC 表达 ICAM-1 及不同浓度 EL 抗体对 ICAM-1 表达的影响

1.3.1 细胞样品的制备 复苏 HUVEC 细胞株，采用 10% FCS DMEM-L，37℃ 5% CO_2 培养，细胞生长至对数生长期，分成 3 瓶（直径为 8 cm 的培养瓶）继续培养，待细胞生长至 80% 融合时，A 瓶中加入 TNF-α（终浓度为 10 ng/ml），B 瓶中同时加入 TNF-α（终浓度为 10 ng/ml）和 EL 多克隆抗体（终浓度为 50 ng/ml），C 瓶中加入同样量的无血清培养基，继续培养 16 h，收获细胞提取总 RNA。再取对数生长期的 HUVEC，分为 7 瓶（直径为 8 cm 的培养瓶），继续培养至 80% 融合时，第 1 瓶中加入 TNF-α（终浓度为 10 ng/ml），第 2～6 瓶中同时加入 TNF-α（终浓度为 10 ng/ml）和 EL 多克隆抗体（终浓度依次为 2.5、5、10、25、50 ng/ml），第 7 瓶中加入同样量的无血清培养基，继续培养 16 h，收获细胞提取总 RNA。

1.3.2 RNA 的提取纯化（RNArose 法） 根据 RNArose 试剂说明书进行细胞总 RNA 提取及纯化，并采用紫外分光光度仪测定浓度及纯度。

1.3.3 逆转录（RT）合成 cDNA 根据 TaKaRa RT-PCR 试剂盒说明书建立逆转录反应体系，并按 30 ℃ ×10 min、42 ℃ ×30 min、99 ℃ ×5 min、5 ℃ ×5 min 进行 RT 反应，总计 1 个循环。

1.3.4 聚合酶链反应（PCR） 根据试剂盒说明书建立 PCR 反应体系，并按如下条件进行 PCR 扩增。94 ℃ ×2 min，1 个循环；94 ℃ ×30 s、60 ℃ ×30 s、72 ℃ ×30 s，40 个循环；72 ℃ ×10 min，1 个循环。反应完毕取出反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。每 1 次反应体系均设 GAPDH（单独反应管）内参对照。

1.3.5 凝胶成像分析 利用凝胶成像系统进行拍照，分析软件进行分析，以 GAPDH 灰度值进行标准校正计算黏附分子产物相对含量。计算公式：黏附分子相对量 = 黏附分子 mRNA 条带灰度值/GAPDH mRNA 条带灰度值。

上述实验重复 3 次

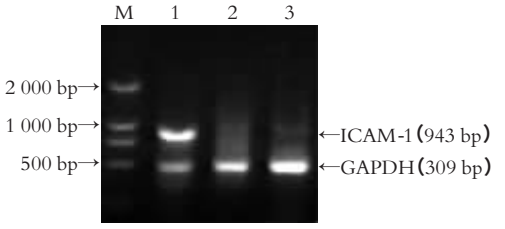
1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析，组间差异比较用 t 检验。

2 结果

2.1 EL 抗体对 TNF-α 诱导 HUVEC 表达 ICAM-1 的影响

正常 HUVEC 低水平表达黏附分子 ICAM-1（0.30 ± 0.06），10 ng/ml 的 TNF-α 能显著增强 ICAM-1 mRNA 的表达（1.38 ± 0.11）（$P < 0.01$），约 3.6 倍，50 ng/ml 的 EL 抗体可显著抑制 TNF-α 引起的 ICAM-1 mRNA 表达的增强（0.27 ± 0.03），抑制率约 80%，其表达甚至低于正常细胞（$P < 0.05$），见图 1。

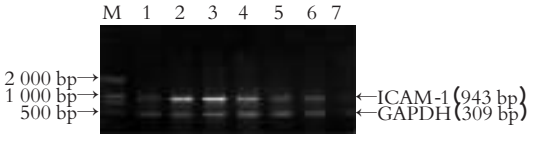


M：标准；1：TNF-α 刺激组（10 ng/ml）；2：TNF-α（10 ng/ml）+ EL 抗体组（50 ng/ml）；3：对照组

图 1 ICAM-1 mRNA 电泳图

2.2 不同剂量 EL 抗体对 TNF-α 诱导的 ICAM-1 基因表达的抑制作用

EL 抗体对 TNF-α 诱导 HUVEC 高表达 ICAM-1 的抑制作用呈剂量依赖性，与 0 ng/ml EL 抗体组比较，2.5 ng/ml EL 抗体作用既明显抑制 TNF-α 引起的 ICAM-1 mRNA 表达［（2.50 ± 0.18）与（3.85 ± 0.23），$P < 0.05$］，50 ng/ml EL 抗体作用对 TNF-α 引起 ICAM-1 表达的抑制作用更为明显［（0.43 ± 0.10）与（3.85 ± 0.23），$P < 0.01$］。不同浓度抗体的抑制率从 2.5～50 ng/ml 分别为 35%、61%、70%、75%、87%。见图 2。



M 标准；1：对照组；2：TNF-α 刺激组（10 ng/ml）；3－7：TNF-α（10 ng/ml）+ EL 抗体组（浓度依次为 2.5、5、10、25、50 ng/ml）

图 2 不同剂量 EL 抗体对 TNF-α 诱导的 ICAM-1 mRNA 表达影响的电泳图

3 讨论

Ishida 等[6] 发现 Apo E 和 EL 双基因敲除小鼠的 AS 发生率较 Apo E 基因下降 70%；体外血管单核细胞黏附实验显示 EL 缺乏的小鼠血管中巨噬细胞数量下降。Kojma 等[5] 发现高表达 EL 的 COS7 和 Pro5 细胞可增强单核细胞的黏附作用，转 EL 基因小鼠动脉带上黏附的单核细胞数显著高于野生型小鼠，而在 EL 基因敲除鼠中明显低于野生型小鼠。这些结果均提示 EL 可促进单核细胞黏附到血管内膜，引起 AS 的早期反应。本研究采用促进内皮细胞表达 EL 的 TNF-α 浓度（10 ng/ml）作用于培养的 HUVEC，同时以 50 ng/ml 的 EL 多克隆抗体进行干预。结果显示：TNF-α 可使 HUVEC 显著增加 ICAM-1 mRNA 表达，约增高 3 倍；50 ng/ml 的 EL 抗体可抑制此作用，抑制率约 87%。再以

2.5 ~ 50 ng/ml 的 EL 抗体浓度对 TNF-α(10 ng/ml)的诱导作用进行干预,结果显示 EL 抗体可呈剂量依赖性抑制 TNF-α 诱导的 ICAM-1 表达,抑制率从 2.5 ~ 50 ng/ml 分别为 35%、61%、70%、75%、87%。

在 AS 发病过程中,内皮细胞受损和功能障碍是其中心环节。受损内皮细胞表达黏附分子,促进单核细胞等与血管内膜黏附是 AS 发病的重要始动环节[7],在冠心病的发生、发展中有着重要的作用。我们的研究发现内皮细胞表达的 EL 可呈剂量依赖的促进黏附分子表达,推测 EL 可通过促进单核细胞等炎性细胞与血管 EC 胞黏附,从而参与 AS 的发病。

参考文献:

[1] Aird W C. Endothelial cell heterogeneity and atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(1): 69 - 75.

[2] Jaye M, Lynch K J, Krawiec J, *et al*. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism[J]. Nat Genet, 1999, 21(4): 424 - 428.

[3] Jin W, Sun G S, Marchadier D, *et al*. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase[J]. Circ Res, 2003, 92(6): 644 - 650.

[4] Hirata K, Ishida T, Matsushita H, *et al*. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 272(1): 90 - 93.

[5] Kojma Y, Hirata K, Ishida T, *et al*. Endothelial lipase modulates monocyte adhesion to the vessel wall. A potential role in inflammation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54032 - 54038.

[6] Ishida T, Choi S Y, Kundu R K, *et al*. Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2004, 279(43): 45085 - 45092.

[7] Selwyn A P, Kinlay S, Ganz P. Atherogenesis and ischemic heart disease[J]. Am J Cardiol, 1997, 80(8B): 3H - 7H.

(编辑　薛国文)

文章编号:1000-5404(2008)17-1617-01

个案与短篇

输尿管镜下钬激光内切开术治疗后尿道狭窄

朱　亮,姬西宁,刘　锋,严春晖,邱国光,郭　征,周　帆　　(解放军第 161 医院泌尿外科,武汉 430010)

我院于 2002 年 3 月至 2006 年 6 月采用输尿管镜下钬激光内切开术治疗后尿道狭窄 35 例,疗效满意。现报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

本组 35 例,年龄 18 ~ 76 岁,平均 51.2 岁。骨盆骨折后 22 例,前列腺切除术后 13 例。病程 2 ~ 5 年,平均 3.2 年。术前均行顺行和逆行尿道造影检查,显示狭窄长度 1.5 ~ 4.0 cm,平均 2.1cm。其中完全闭索 2 例,术前已行耻骨上膀胱造瘘。

1.2　手术方法

采用连续硬膜外麻醉,患者取膀胱截石位。应用 $F_{8.0/9.8}$ Wolf 硬性输尿管镜(德国 Richard-wolf 公司生产,8705.402 型),进镜后即插入 F_3 输尿管导管引导,利用输尿管镜镜体纤细、易于通过狭窄段的特点,避开假道,找到真道,将输尿管导管插入膀胱,徇其引导,用钬激光(1.5J,10Hz)做狭窄段 12 点切开,并行 3、9 点放射状切开,边切边进镜,使其顺利进入膀胱,再退镜窥视整个狭窄段,仔细切除多余瘢痕组织,使管腔光滑。2 例尿道闭索患者于膀胱造瘘口处置入尿道探子,并经直肠用手指引导,在输尿管镜最明显触碰尿道探子处用钬激光缓慢渐进切通闭索段,在尿道探子引导下进入膀胱,留置 F_3 输尿管导管。再退镜,在输尿管导管引导下行放射状切开及瘢痕切除。

1.3　术后处理

本组患者术后均留置 F_{20} 三腔气囊导尿管,应用抗生素预防感染 1 周,术后留置导尿 2 ~ 4 周。拔管后定期行尿道扩张。

2　结果

本组 35 例患者均成功留置 F_{20} 三腔气囊导尿管。随访 1 年。其中 33 例排尿状况满意,最大尿流率 12 ~ 19 ml/s,平均(14.6 ± 1.8) ml/s,膀胱剩余尿量 0 ~ 40 ml,平均(16.8 ± 3.4) ml。2 例患者分别于术后 3 月、6 月出现再次狭窄,患者拒绝再次治疗,行耻骨上膀胱造瘘。

3　讨论

后尿道狭窄的治疗一直是临床上的一个棘手问题,近年来,随着腔内泌尿外科技术的发展,经尿道内切开术(direct vision internal urethrotomy, DVIU)已成为治疗后尿道狭窄的首选方法[1]。以往,DVIU 术通常以普通 F_{18-24} 膀胱镜为窥镜,以冷刀或电刀为切开器械。自 2002 年起,我们采用输尿管镜下钬激光内切开术治疗后尿道狭窄,取得了一些经验。

后尿道狭窄的腔内治疗,首先要识别真假通道。输尿管镜通常为 F_8,比普通 F_{18-24} 膀胱镜要细得多,输尿管镜仅为 5°,方向性好[2]。这些特点使其能较容易进入并观察狭窄部的真假

(下转 1621 页)

作者简介:朱　亮,男,湖北省宜昌市人,硕士,主治医师,主要从事腔内泌尿外科方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(027) 50166464,E-mail: wszhuliang@126.com

收稿日期:2008-04-28;修回日期:2008-05-16