DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.025
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
422 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0422-03

Sin-1对内皮细胞生长及细胞骨架的影响

刘运来[1],徐伦山[2],姚忠祥[1],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所神经外科,重庆 400042)

提 要:目的 通过观察一氧化氮(Nitric oxide,NO)供体sin-1对内皮细胞生长及细胞骨架的影响,来探讨NO对内皮细胞单层通透性的可能的影响机制。方法 用不同浓度sin-1作用于培养的人脐静脉内皮细胞株ECV 304细胞,观察其对细胞生长及细胞骨架蛋白f-actin的影响。结果 6.25~100 μmol/L的sin-1可不同程度抑制内皮细胞的生长,50~100 μmol/L浓度的sin-1可致细胞死亡。100 μmol/L浓度的sin-1作用4 h后,f-actin的含量明显降低。结论 在某些情况下局部或血液中NO浓度异常增高时,可能通过抑制内皮细胞的生长、直接导致内皮细胞死亡或使细胞骨架蛋白f-actin的含量下降等途径,使血管的通透性增加。

关键词:一氧化氮;内皮;通透性
中图法分类号:R322.123;R914.3 文献标识码:A

Effects of sin-1 on growth and cytoskeleton of endothelial cells *in vitro*

LIU Yun-lai, XU Lun-shan, YAO Zhong-xiang, CAI Wen-qin (Department of Histology and Embryology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism affecting on permeability of vascular endothelial cell by nitric oxide (NO). Methods Series concentration of sin-1(a donor of NO) were added to ECV 304, a cell line of human umbilical vein endothelium. Cell growth and expression of f-actin, a cytoskeleton protein were observed. Results Cell growth was inhibited with a dose from 6.25 to 100 μmol/L and was caused to death at the concentration of 50 to 100 μmol/L by sin-1. The expression of f-actin was suppressed obviously after cultured with 100 μmol/L sin-1 for 4 hours. Conclusion It suggests that anomaly increased NO can increase permeability of blood vessels by suppressing the expression of f-actin, inhibiting cell growth or even resulting in cell death.

Key words: nitric oxide; endothelium; permeability

NO作为一种新型细胞内和细胞间信使分子,具有非常广泛的生物学效应,参与了机体的多项生理、病理过程,其作用受到国内外学者的广泛关注[1,2]。NO浓度升高的意义可能是NO作为一种信息分子参与信息的传递,同时可以扩张局部血管,增加局部血供,有一定的保护局部组织的作用;另一方面NO可以通过自由基途径等导致局部细胞的损伤。关于NO浓度升高对血管通透性可能造成的影响及其详细机制,文献报道较少,有人认为NO通过自由基途径导致内皮的通透性增加[3]。Liu等[4]报道,把NO生成抑制剂L-NAME加入培养的牛主动脉内皮细胞中,可以使其f-actin的含量显著增高并且其空间排列发生改变。f-actin是一种内皮细胞中重要的细胞骨架成分,其含量减少或排列改变,可以导致细胞紧密连接结构不能维持,从而使内皮细胞单层的通透性增加[5]。内皮细胞是毛细血管最重要的屏障结构,本研究拟通过研究一氧化氮供体sin-1对培养的人脐静脉内皮细胞生长代谢及细胞骨架蛋白f-actin影响,以探讨NO影响血管通透性的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂、仪器

ECV 304细胞由西南医院胡厚源博士惠赠。激光共聚焦显微镜由德国徕卡公司生产;自动酶联免疫分析仪由BIO-RAD公司制造。罗丹明标记的鬼笔环肽(Phalloidin,f-actin的特异性亲合物)及DMEM购自SIGMA公司。小牛血清为Hyclone公司产品。MTT购自晶美生物工程有限公司。

1.2 sin-1对ECV 304细胞生长的影响

ECV 304以每孔3 000个细胞接种于96孔培养板中,培养基为DMEM(含10%小牛血清)。各组(每组6孔)中分别加入终浓度为0、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L的sin-1(用DMEM新鲜配置),每孔总体积为200 μl,每天更换培养基并加入其相应浓度的sin-1。用MTT法检测各组0~7 d的D_{490}值,D_{490}值的高低间接代表活细胞数量,具体操作方法参见文献[6]。

1.3 sin-1对ECV 304细胞骨架蛋白f-actin的影响

ECV 304培养于预先涂有Gelatine的盖玻片上,待细胞完全长满整块玻片3 d后,在培养基中加入终浓度为100 μmol/L的sin-1,对照组加入等量普通培养基,继续培养4 h后,用D-Hanks液冲洗干净,4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗3次,每次5 min,0.3% Triton-x100作用20 min后,羊血清孵育30 min,然后用罗丹明标记的phalloidin(5 μg/ml)37 ℃作用1 h,PBS漂洗干净后用磷酸甘油缓冲液封片,在激光共聚焦显微镜下观察[7]。在系统参数保持不变的情况下,对照组和实验组各随机选取面

作者简介:刘运来(1971—),男,湖南省涟源市人,硕士,讲师,主要从事无神经支配血管内皮细胞方面的研究。电话:(023)68752229

收稿日期:2000-06-30;修回日期:2000-10-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

积为15 472.65 μm^2 大小的视野各 5 个, 测量每个视野内的平均荧光强度。

2　结果

2.1　sin-1 对 ECV 304 生长的影响

在倒置显微镜下观察, 正常组 ECV 304 生长良好, 细胞为多角型, 6.25～25 μmol/L 各组均可见一些形态不规则的细胞, 而 50、100 μmol/L 两组的细胞 1 d 后尚不能贴壁, 在随后几天逐渐死亡。经 MTT 法检测各组的 D_λ 值, 见表 1。

各组与正常组(0 μmol/L 组)进行多个均数间两两比较方差分析, 25、50、100 μmol/L 与正常组差别显著($P<0.05$)。虽然 6.25、12.5 μmol/L 组与正常组总体上差异不显著, 但把其每天的 D_λ 值与对应天数的正常组进行 u 检验, 其中部分天数与正常组差异显著(25～100 μmol/L 组没有进行该项分析)。

表 1　MTT 比色法检测各组的 D_{490} 值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　D_{490} of each group detected with MTT method($\bar{x}\pm s$)

Time of culture(d)	sin-1(C_B/μmol·L^{-1})					
	0	6.25	12.5	25 *	50 **	100 **
0	0.132±0.009	0.146±0.010	0.145±0.017	0.131±0.007	0.130±0.010	0.127±0.015
1	0.168±0.011	0.161±0.013	0.170±0.015	0.170±0.009	0.137±0.020	0.064±0.007
2	0.315±0.024	0.203±0.019	0.197±0.011	0.210±0.026	0.109±0.018	0.039±0.006
3	0.392±0.024	0.337±0.037	0.318±0.025	0.264±0.013	0.078±0.012	0.009±0.003
4	0.552±0.044	0.441±0.047	0.402±0.026	0.268±0.012	0.112±0.005	0.042±0.004
5	0.606±0.021	0.432±0.023 *	0.421±0.019 *	0.135±0.017	0.048±0.002	0.052±0.003
6	0.656±0.046	0.502±0.052	0.308±0.027 **	0.136±0.009	0.032±0.009	0.042±0.005
7	0.609±0.038	0.497±0.030	0.273±0.011 **	0.127±0.009	0.055±0.003	0.043±0.002

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 0 μmol/L

2.2　sin-1 对 f-actin 表达的影响

在固定激光共聚焦显微镜系统参数不变的条件下观察, 可见实验组的 ECV 304 细胞含相对较弱的橘红色荧光, 而对照组为非常明亮的橘红色荧光, 见图 1。

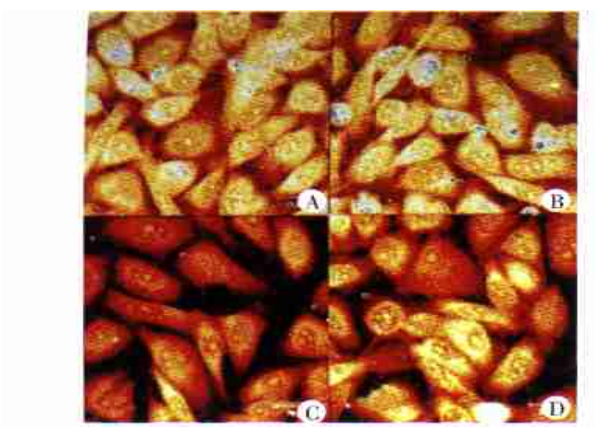


图 1　ECV 304 细胞中 f-actin 的表达

A、B: 对照组; C、D: 实验组

Fig 1　Expression of f-actin in ECV 304 cells

A, B: Control group; C, D: Experimental group

两组分别选取面积为 15 472.65 μm^2 的视野各 5 个, 用激光共聚焦显微镜下检测荧光强度结果如下: 实验组为 54.5±5.96, 对照组为 96.2±4.90, 经两样本均数 t 检验, 两组差别非常显著($t=6.2427$, $P<0.001$)。

3　讨论

NO 是近年来被人们所认识的一种细胞内和细胞间的信使分子, 在机体中起着非常广泛而重要的作用, 其中与组织血液供应有关的包括调节血管张力和心肌收缩力、抑制血小板聚集及粘附、维持内皮细胞的完整性及调节其通透性、调控血管细胞成分的增生等。在多种病理情况下, 体内 NO 能反应性升高。如脑损伤、肺损伤后, 局部组织细胞中一氧化氮合酶(iNOS)的含量显著升高, 使局部组织中的 NO 浓度升高, 甚至血中的 NO 浓度都显著升高[8,9]。由 iNOS 产生的 NO 主要起病理作用, 其对机体造成的不利方面也越来越多的被人们所认识, 比如对局部细胞的毒性作用以及对血管屏障作用的破坏等。

sin-1 是一种 NO 供体, 在 37 ℃的水溶液中, 能自发释放出 NO 和 O_2^-。本研究中用一定浓度的 sin-1 作用于培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV 304, 观察其对内皮细胞生长及细胞骨架蛋白 f-actin 含量的影响, 结果发现, sin-1 在 6.25 μmol/L 到 100 μmol/L 范围浓度内, 可以不同程度抑制内皮细胞的生长, 并且其抑制作用呈现出明显的量效关系, 其中 50、100 μmol/L 组的细胞基本不能生长。用 100 μmol/L 的 sin-1 作用 4 h 后, f-actin 的表达显著降低。

本实验结果提示, 在某些病理情况导致局部或血液中的 NO 浓度升高时, 一方面可能抑制内皮细胞的生长甚至直接促使内皮细胞的死亡, 另一方面可能抑制内皮细胞的 f-actin 的表达, 影响细胞骨架排列, 导致细胞紧密连接结构不能维持, 进而使内皮以及整个血管的通透性增高。

参考文献:

[1] Iadecola C, Zhang F, Xu S, *et al*. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(3): 378－384.

[2] 刘建中. 一氧化氮及其合成酶与脑创伤性损害[J]. 国外医学: 神

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

经病学、神经外科学分册, 1997, 24(3): 122－124.
[3] 种兆忠, 冯亦璞. 脑损伤过程中血脑屏障通透性的变化及其调节机制[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(3): 204－207.
[4] Liu S M, Sundqvist T. Nitric oxide and cGMP regulate endothelial permeability and F-actin distribution in hydrogen peroxide-treated endothelial cells [J]. Exp Cell Res, 1997, 235(1): 238－244.
[5] Maruo N, Morita I, Shirao M, *et al*. IL-6 increases endothelial permeability *in vitro*[J]. Endocrinology, 1992, 131(2): 710－714.
[6] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 186－187.
[7] Rist R J, Romero I A, Chan M W, *et al*. F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors[J]. Brain Res, 1997, 768(1－2): 10－18.
[8] Dawson T M, Snyoler S H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain[J]. J Neurosci, 1994, 14(9): 5 147－5 159.
[9] 杨自力, 王正国, 朱佩芳, 等. 一氧化氮损伤内皮细胞的机制研究[J]. 解放军医学杂志, 1998, 8(4): 245－247.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)04-0424-01

98例宫外孕腹腔镜与开腹手术对比分析

Comparative analysis of laparoscopy and laparotomy on 98 cases of ectopic pregnancy

陈 勇, 史常旭, 李玉艳, 蒋小琴 （第三军医大学附属西南医院妇产科, 重庆 400038）

宫外孕是妇科临床的常见病, 常规的治疗方法是保守治疗和开腹手术治疗, 对术后有生育要求的妇女多采用保留生育功能手术治疗。近年来, 腹腔镜手术在临床的广泛运用, 在宫外孕的治疗上多了一种选择方式。现就开腹术和腹腔镜手术进行对比分析。

1 临床资料与方法

1999年1月至2000年4月, 我院共收治125例宫外孕的病例, 年龄19～40岁, 妊娠38～83 d。腹腔镜手术治疗53例, 开腹手术72例, 采用输卵管开窗术、部分切除术及切除术治疗。腹腔镜组46例, 开腹手术组52例, 共98例纳入分析对象, 占总病例78%。所有病人术后随访4月至1.5年。

采用德国Wisap公司生产腹腔镜。腹腔镜下输卵管切开术和输卵管切除术步骤如下: 用单极电凝纵行切开妊娠部位输卵管浆肌层, 清除孕囊, 双极电凝止血, 局部用生理盐水冲洗, 创缘不缝合。输卵管切除术即用双极电凝钳沿输卵管峡部切断输卵管。开腹手术按常规术式进行。腹腔镜组平均手术时间41 min(30～78 min), 开腹组为65 min(45～118 min); 腹腔镜组平均住院日3.3 d(3～5 d), 开腹组为5.2 d(5～7 d)。术中1例因内出血多造气腹困难改行开腹手术。

术后有生育要求69例, 腹腔镜组32例中对侧输卵管21例通畅, 开腹组37例中对侧输卵管24例通畅。两组对侧输卵管通畅率无统计学差异。于术后3～6月行子宫输卵管碘油造影。数据统计分析采用χ^2和t检验。

2 结果

术后3月行子宫输卵管碘油造影, 行开窗术组68例中, 腹腔镜组35例中手术侧输卵管21例通畅, 14例不通; 开腹组33例中手术侧输卵管17例通畅, 16例不通。对侧输卵管造影通畅情况同术中所见。两组行开窗术后输卵管再通率差异无显著性。术后有生育要求的共69例, 其中46例再次妊娠。腹腔镜组32例中22(69%)例, 开腹组37例中24(65%)例。术后平均受孕时间为6月(5～8月)。两组术后妊娠率差异无显著性($P>0.05$)。

3 讨论

腹腔镜手术组与开腹术组保守性手术治疗后, 术侧输卵管再通率差异不显著。两组术后妊娠率分别为69%和65%, 无统计学差异。对侧输卵管正常与不正常术后妊娠率分别为80%和38%, 差异显著($P<0.05$)。宫外孕术后妊娠与对侧输卵管正常与否密切相关。

腹腔镜组与开腹术组相比, 患者手术时间、住院恢复时间明显缩短, 节省费用。内出血较多患者腹腔镜手术因其手术体位和造气腹等特殊步骤, 为手术增加了难度, 以开腹术更为适宜。宫外孕腹腔镜手术和开腹手术术后妊娠率相当, 对侧输卵管正常者术后妊娠率明显高于对侧不正常者。腹腔镜手术治疗宫外孕缩短了手术及住院时间, 较开腹术有优势。

关键词: 宫外孕; 腹腔镜; 开腹术
中图法分类号: R714.22 文献标识码: B

参考文献:
[1] 华克勤, 金福明, 李 斌, 等. 电视腹腔镜下保守治疗输卵管妊娠[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(10): 627.
[2] Clausen I. Conservaative versus radical surgery for tubal pregnancy: A review[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1996, 75(1): 8－12.
[3] Pouly J L, Chapron C, Manhes H, *et al*. Multifactorial analysis of fertility after conservative laparoscopic treatment of ectopic pregnancy in a series of 233 patients[J]. Fertil Steril, 1991, 56(3): 453－460.
[4] Dubuisson J B, Chapron C, Morice P, *et al*. Radical laparascopic surgery of ectopic pregnancy: Results from a continuous series of 383 interventions [J]. Contracept Fertil Sex, 1996, 24(2): 140－146.

（编辑 郭建秀）

作者简介: 陈 勇(1970－), 男, 重庆市铜梁县人, 硕士研究生, 医师。电话: (023)68752784

收稿日期: 2000-11-07; 修回日期: 2001-02-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net