DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.045
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0097-02

论著

NAC对体外循环血清致培养内皮细胞ICAM-1表达变化的影响

曾祥君,肖颖彬,王学锋 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察体外循环(CPB)血清对培养血管内皮细胞ICAM-1表达变化的影响,及N-乙酰半胱氨酸(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,以免疫组化方法观察培养血管内皮细胞ICAM-1表达量。结果 CPB血清可致培养血管内皮细胞ICAM-1表达量明显增加,NAC抑制培养内皮细胞ICAM-1的表达。结论 NAC可以抑制CPB血清所致的培养血管内皮细胞ICAM-1表达增加。因此NAC对体外循环后全身炎症反应可能有保护作用。

关键词:血管内皮细胞;细胞间粘附分子1;体外循环;N-乙酰半胱氨酸
中图法分类号:R322.12;R654.1 文献标识码:A

Effect of NAC on the changes of ICAM-1 expression induced by CPB serum on cultured endothelial cells

ZENG Xiang-jun, XIAO Ying-bin, WANG Xue-feng (Department of Cardiovascular Surgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of NAC on the changes of ICAM-1 expression induced by CPB serum cultured endothelial cells. Methods ICAM-1 expression on cultured endothelial cells was detected by immunohistochemical techniques. Results ICAM-1 expression on cultured endothelial cells was increased by CPB serum, NAC inhibited ICAM-1 expression. Conclusion NAC could inhibit ICAM-1 expression on cultured endothelial cells, and might play a role in attenuating systemic inflammatory response syndrome induced by CPB.

Key words: vascular endothelium; intercellular adhesion morcular-1; Cardiopulmonary bypass; N-acetyl-L-cysteine

白细胞与血管内皮细胞的粘附是体外循环(Cardiopulmonary bypass,CPB)后全身炎症反应的关键环节。内皮细胞细胞间粘附分子1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)在形成粘附的过程中起重要作用。本实验采用体外循环血清致伤培养血管内皮细胞,以免疫组化方法探讨CPB血清诱致培养血管内皮细胞ICAM-1表达及N-乙酰半胱氨酸(N-acety-L-cysteine,NAC)的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、器材

RPMI 1640、小牛血清、ICAM-1抗人单克隆抗体(中山生物公司)、兔SAP免疫组化试剂盒(中山生物公司)、NAC(Sigma公司)、2300型恒温CO_2孵箱、培养瓶、六孔塑料培养皿、真彩色医学图像分析仪等。

1.2 血清来源

10例先天性心脏病患儿,于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,-20℃冷冻贮存备用。

1.3 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)培养及鉴定

采用安静等[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(PAP法),检测Ⅷ因子抗原。

1.4 实验分组

(1)小牛血清组;(2)CPB前血清组;(3)CPB血清组;(4)含0.01 mmol/L NAC的CPB血清组;(5)含0.1 mmol/L NAC的CPB血清组;(6)含1 mmol/L NAC的CPB血清组;(7)含10 mmol/L NAC的CPB血清组。

作者简介:曾祥君(1970-),男,四川省新都县人,硕士,医师,主要从事心血管外科方面的研究。电话:(023)65210281

收稿日期:2000-02-24;修回日期:2000-06-13

1.5 实验过程

胰酶消化的内皮细胞,加入20%小牛血清RPMI 1640,细胞密度为(1~2)×10^6/ml。37℃,5% CO_2培养于六孔培养板中,内放盖玻片。按20%的比例将体外循环血清与无血清的RPMI 1640基础培养液混合成人血清培养基。待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,每孔分别加入各组血清2.0 ml。37℃,5%CO_2孵育4 h。

1.6 免疫组化染色

染色方法参照试剂盒说明进行。PBS代替一抗作为阴性对照。

1.7 图像分析

每张细胞免疫组化片在显微镜下随机取3个视野,用真彩色医学图像分析系统分别求出其每个细胞单位面积的平均光密度,取其平均值为该标本免疫组化染色的深度,即表示平均每个内皮细胞ICAM-1的表达量。

1.8 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示,用第三军医大学数理统计程序包分析。

2 结果

小牛血清组血管内皮细胞ICAM-1表达量是0.426±0.02,CPB前血清组血管内皮细胞ICAM-1表达量是0.436±0.01,CPB血清组血管内皮细胞ICAM-1表达量增加为0.62±0.03,CPB血清加入0.01、0.1、1、10 mmol/L NAC各组,血管内皮细胞ICAM-1表达量分别为0.56±0.02、0.48±0.01、0.44±0.02、0.41±0.01。经单因素方差分析:(1)小牛血清组与CPB前血清组无明显差别;(2)CPB血清组与CPB前血清组比较,血管内皮细胞ICAM-1表达量前者明显高于后者($P<0.01$);(3)与CPB血清组比较,加入NAC各组随NAC浓度增加,血管内皮细胞ICAM-1表达量明显依次降低($P<0.01$),其中加入1、10 mmol/L

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

NAC 血清组与 CPB 前血清组已无显著差别。说明体外循环前血清对培养血管内皮细胞无明显激活作用，体外循环后血清明显诱致培养血管内皮细胞 ICAM-1 表达量增加，N-乙酰半胱氨酸对体外循环后血清诱致的培养血管内皮细胞 ICAM-1 表达有抑制作用，剂量越高，抑制越明显。

3 讨论

细胞间粘附分子-1(ICAM-1)又称 CD54，属于免疫球蛋白超基因家族成员，分子量(84～95)×10^3，是一种细胞表面跨膜蛋白抗原。ICAM-1 配体是整合素 CD11/CD18（主要是 CD11a/CD18、CD11b/CD18）[2]。ICAM-1 与 CD11/CD18 相互作用介导的中性粒细胞-内皮细胞(PMN-EC)粘附，在中性粒细胞诱导的内皮细胞损伤中起关键作用[3]。内皮细胞激活后，P-选择素、E-选择素表达、释放增多，激活中性粒细胞上CD11/CD18，使之发生构象改变并与 ICAM-1 结合，加强中性粒细胞与内皮细胞的相互作用，形成牢固粘附[4]。

本实验结果表明，静息状态下培养血管内皮细胞可低水平表达 ICAM-1，体外循环后血清作用于培养血管内皮细胞，诱致其 ICAM-1 表达明显增加。生理情况下，血管内皮细胞结构性表达 ICAM-1，保持着适当的 PMN-EC 粘附，维持机体的正常防御反应[5]。体外循环后血液中炎症细胞因子释放，血管内皮细胞激活，ICAM-1 表达明显增加，PMN-EC 粘附增多，当 PMN-EC 粘附过度时，导致严重的体外循环后全身炎症反应综合征，造成明显的组织损伤[6]。

N-乙酰半胱氨酸(NAC)是抗氧化剂，为含巯基化合物，易于进入细胞内，作为谷胱甘肽(GSH)合成前体，增加细胞内 GSH 的含量，补充细胞内防御缓冲体系中还原型巯基库。本实验在体外循环血清中加入不同浓度 NAC，发现随 NAC 浓度增加，培养血管内皮细胞 ICAM-1 表达量逐渐降低，证明抗氧化剂 NAC 可以抑制体外循环血清诱致的内皮细胞 ICAM-1 过度表达，从而可能减轻 PMN-EC 粘附，缓和体外循环后全身炎症反应。

核转录因子 NF-κB(Nuclear factor kappa B)是一种多向性调节功能的核转录因子，能被 TNFα、IL-1、细菌脂多糖、紫外线等多种因素激活。体外循环后，血液中 IL-1、TNFα、IL-6 及 IL-8 等细胞因子水平迅速提高，内皮细胞激活[7]。许多研究发现，内皮细胞核内 NF-κB 蛋白的活性，与细胞质中 ICAM-1 的 mRNA 含量有显著相关性[8]，提示体外循环血清诱致内皮细胞 ICAM-1 的表达，可能是核转录因子 NF-κB 激活启动 ICAM-1 基因转录的结果。另外，大量实验观察到，几乎所有刺激因素引起的核转录因子 NF-κB 激活，均可被抗氧化剂所抑制[9]，提示抗氧化剂 NAC 抑制内皮细胞 ICAM-1 的表达可能是通过抑制核转录因子 NF-κB 的活化而实现。

参考文献：

[1] 安 静，黎 鳌，杨宗城. 胎儿脐静脉内皮细胞的培养[J]. 第三军医大学学报，1990，12(3)：222－224.

[2] Barnett C C，Moore E E，Moore F A，*et al*. Soluble ICAM-1(sICAM-1) provokes PMN elastase release[J]. J Surg Res，1996，63(1)：6－10.

[3] Elliott M J，Finn A H. Interaction between neutrophils and endothelium [J]. Ann Thorac Surg，1993，56(6)：1 503－1 507.

[4] Verrier E D，Morgan E N. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery[J]. Ann Thorac Surg，1998，66(5 Suppl)：S17－19，S25－28.

[5] Wan S，LeClerc J L，Vincent J L，*et al*. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass：Mechanisms involved and possible therapeutic strategies [J]. Chest，1997，112(3)：676－692.

[6] Edward M，Boyle J R，Timothy H，*et al*. Endotheial cell injury in cardiovascular surgery：The systemic inflammtory response[J]. Ann Thorac Surg，1997，63(1)：277－284.

[7] Sablotzki A，Dehne M，Welters I，*et al*. Alterations of the cytokine network in patients undergoing cardiopulmonary bypass[J]. Perfusion，1997，12(6)：393－403.

[8] Chikawa H，Flores S，Kvietys P R，*et al*. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells [J]. Circ Res，1997，81(6)：922－931.

[9] Chapple I L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases[J]. J Clin Periodontol，1997，24(5)：287－96.

（编辑 王 红）

（上接 96 页）

显效：溃疡面周围充血迅速消失，疼痛消失或明显减轻，溃疡面 4～6 d 愈合；有效：溃疡面周围充血及疼痛明显减轻，溃疡面 7～10 d 愈合；无效：症状无改善，溃疡面 11～14 d 愈合。

2 结果

两组疗效结果见表 1。

表 1 两组疗效比较

组别	n	显效		有效		无效	
		n	%	n	%	n	%
封闭组	30	28	93.3*	2	6.7	0	0
对照组	30	7	23.3	21	70	2	6.7

*：$P<0.05$ 与对照组比较

3 讨论

奴夫卡因除镇痛外，尚能阻断调节局部对病灶的不良刺激。地塞米松为肾上腺皮质激素，能抑制抗体[1]，对已破坏的口腔粘膜上皮细胞起治疗作用，能抑制感染和非感染性炎症，且本身具有较强的抗炎、抗毒、抗过敏和免疫抑制作用，局部应用副作用小。因此，两种药物局部注射能有效地减轻水肿和疼痛。

溃疡面基底部封闭法能使药物迅速渗透到病变区，局部药液有效浓度高，仅用一次可达预期效果。避免了全身用激素药物的副作用。

关键词：封闭；口腔溃疡；疼痛

中图法分类号：R781.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 陈新谦，金有豫 主编. 新编药物学[M]. 第 13 版. 北京：人民卫生出版社，1994. 362

（编辑 陈聪连）

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