DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.030
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
784 2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)08-0784-03

蜕皮甾酮对TNF所致脐静脉内皮细胞损伤的保护作用的初步观察

石富胜[1],杨日高[1],狄桂平[1],罗向东[2],杨宗城[2],吴 旭[3] ([1]解放军322医院烧伤科,大同 037006;第三军医大学:[2]附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038;[3]附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042)

提 要:目的 观察肿瘤坏死因子(TNF)对体外培养的脐静脉内皮细胞(HUVEC)分泌功能及能量代谢的影响,及应用植物药物成分蜕皮甾酮(EDS)进行防治的效果。方法 ①MTT法检测TNF对培养内皮细胞琥珀酸脱氢酶活性的影响。②内皮细胞培养上清液ET、NO、MDA、LDH、SOD测定。③采用反相高效液相色谱分析法测定内皮细胞ATP、ADP、AMP及能荷。结果 TNF与内皮细胞孵育后低浓度、早期内皮细胞被激活,随着TNF浓度增高MTT明显降低;TNF刺激后培养上清液ET、MDA、LDH、NO明显升高,EDS治疗后降低。TNF低浓度刺激VEC培养上清液SOD明显降低,EDS治疗后SOD升高;TNF同一浓度刺激后,随刺激时间延长HUVEC能量负荷降低,与正常比较12 h后明显降低,而用EDS治疗后各时相点能量负荷明显增加。结论 TNF在无血清状态下刺激后,培养HUVECs分泌功能、能量代谢出现紊乱,EDS治疗后上述紊乱得到一定程度的改善;提示TNF对体外培养的HUVECs可以直接损伤,EDS有一定的抗损伤作用。

关键词:肿瘤坏死因子;HUVEC;NO;MDA;ET;LDH;能荷;蜕皮甾酮
中图法分类号:R392.11;R977.1 文献标识码:A

Protective effect of ecdysterone on TNF-induced HUVEC *in vitro*

SHI Fu-sheng, YANG Ri-gao, DI Gui-ping, LUO Xiang-dong, YANG Zhong-cheng, WU Xu (Department of Burn Injury, No. 322 Hospital of PLA, Datong 037006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of TNF on the secretion and energy metabolism of cultured human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and the protective effect of ecdysterone (EDS) on the damages resulting from TNF in vascular endothelial cell (VEC). Methods The effect of TNF on amber acid dehydrogenase activity in cultured VEC was studied with MTT assay. The concentrations of ET, NO, MDA, LDH and SOD were determined. The levels of ATP, ADP and AMP in the supernatant of the VEC culture medium and energy charge (EC) in VEC were measured. Results MTT assay demonstrated that VECs were activated at first and then inhibited after TNF-stimulation. The concentration of ET, NO, MDA and LDH in the supernatant were significantly increased while that of SOD was decreased on the 24 h after TNF-stimulation and EDS could attenuate the increase and decrease above with TNF-stimulation of same concentration. EC of HUVEC was reduced along with the elapse of time and it was significantly lowered compared with normal control, but EDS could markedly increase the EC at every time points. Conclusion The secretion and energy metabolism of cultured HUVEC were in disturbance after serum-free TNF-stimulation, while EDS can improve the disturbance. This indicates TNF can damage cultured HUVECs while EDS can prevent this event.

Key words: tumor necrosis factor; human umbilical vein endothelial cell; NO; MDA; ET; LDH; EC; ecdysterone

血管内皮细胞损伤在烧伤脏器损害的发生发展中具有极重要的作用,是导致"缺血再灌注"损伤、最终引起全身多脏器功能损害的重要原因。肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF)在中毒性休克、全身多脏器功能不全的病理过程中发挥重要作用。因此,如何针

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830400)
作者简介:石富胜(1964—),男,山西省大同市人,硕士研究生,主治医师,主要从事烧伤病人血管内皮细胞损伤防治方面的研究,发表论文10余篇。电话:(0352)2014198
收稿日期:1999-12-24;修回日期:2000-03-07

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

对 TNF 对体外培养血管内皮细胞损伤的防治, 对烧伤治疗具有非常重要的意义。蜕皮甾酮(Ecdysterone, EDS)为一种植物药物成分, 具有促进上皮增生的作用。我们已经报道 EDS 在抗凋亡方面的作用, 但在 TNF 对体外培养脐静脉内皮细胞(HUVECs)能量代谢及分泌功能影响中的作用未见报道。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及检测仪器

人脐静脉内皮细胞株(ECV-304)购于 ATCC 公司; M199 细胞培养液、TNF 购自军事医学科学院; 细胞培养瓶、96 孔培养板购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶为 DIFCO1∶250; 噻唑蓝为 FLUKA 公司产品; 内皮素(ET)试剂盒由北京东亚免疫研究所提供; 一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京铁道医学院; 荧光分光光度计(美国 Beckman)、酶联仪(日本 BIO RAD-450); 低温离心机 Biofuge 28 RS(Heraeus 公司)。

1.2　细胞株的培养和实验前准备

1.2.1　内皮细胞培养　　本实验采用人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 细胞常规复苏后接种于 75 ml 培养瓶中传代, 培养液 M199 含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、2 mg 谷氨酰胺, 每 48 h 更换培养液 1 次, 培养 24～48 h 用于实验。实验开始前将细胞接种于细胞培养板, 在无血清培养液中于 37 ℃ 5%CO_2 培养 24 h。

1.2.2　实验细胞分组　　将培养板中的细胞随机分成正常对照组(Control): 细胞在无血清 M199 培养; EDS 药物对照组(EDS): 无血清培养液中只加 EDS(终浓度 10 μg/ml); TNF 致伤组(TNF): 无血清培养液中加 TNF(终浓度 5 000 μ/ml); EDS 药物治疗组(TNF+EDS): 无血清培养液同时加 TNF、EDS(终浓度分别 5 000、10 μg/ml); 细胞于 37 ℃ 5%CO_2 孵育箱中共同孵育 6、12、24 h, 最后收集培养上清液待测指标。每组样本数 $n=6$。

1.3　观察指标及方法

1.3.1　TNF 对内皮细胞琥珀酸脱氢酶活性的影响[1]　　ECV-304 细胞培养在 96 孔板(Costar 产品)上, 用 TNF 刺激 6～48 h, 治疗组同时加 EDS 10 μg/ml, 弃培养上清液后加入噻唑蓝(FLUKA 产品, 5 mg/ml, PBS) 20 μl/每孔, 37℃ 孵育 4 h, 显微镜下可见黑色结晶形成, 加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μl, 混悬使结晶溶解后, 避光 10 min 酶标仪上 570 nm 波长计光密度(D_{570})值。

1.3.2　内皮细胞培养上清液 NO 测定[2]　　取全部上清液加 200 μl 0.1%Rivanol 及 400 μl 12 mol/L 盐酸, 加双蒸水至总体积 2 ml, 520 nm 测定吸光度, 根据标准曲线计算样本 NO 含量, 以 μl/L 表示。

1.3.3　细胞培养上清液丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力测定　　具体操作按南京铁道医学院 MDA、SOD 测试药盒说明书进行。

1.3.4　培养上清液乳酸脱氢酶(LDH)活性测定　　常规生化法, 最后计算 10^5 细胞中 LDH 活性, 以光密度值表示。

1.3.5　培养上清液 ET 测定　　ET 试剂盒由东亚免疫研究所提供, 操作按说明书进行。

1.3.6　内皮细胞 ATP、ADP、AMP 及能荷(Energy charge, EC)测定　　采用反相高效液相色谱分析法测定: 细胞取自 75 ml 细胞培养瓶, 常规消化后离心, 置预冷的玻璃匀浆器中加入 2 ml 10%高氯酸冰浴匀浆, 于 4℃、15 000× g 离心 15 min, 取上清 0.5 ml 加入 60 μl K_2CO_3 摇匀, 4℃ 15 000× g 离心 15 min, 取上清上柱测定。Glison 高效液相色谱分析仪工作条件: 色谱柱 Sephrisorb C_{10} 250× 4.6 mm; 流动相: 50 mm PBS, pH 6.5; 检测器: UV 260 nm; 流速 1 ml/min; 进样量 20 μl。根据 ATP、ADP、AMP 标准曲线, 通过色谱工作站软件计算标本 ATP、ADP、AMP 含量, 以 μmol/mg Protion 表示, 能量负荷则按公式计算。能量负荷(EC)=(ATP+0.5× ADP)/(ATP+ ADP+AMP)。

1.4　统计学分析

采用华西医科大学医学统计程序包 PEMS 进行样本均数 t 检验, 结果用 $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$ 表示。

2　结果

2.1　TNF 刺激后培养 HUVEC 线粒体琥珀酸脱氢酶的变化(MTT 法)

TNF 与内皮细胞孵育后内皮细胞琥珀酸脱氢酶随着 TNF 浓度增高而明显下降, 在 TNF 浓度为 5 000 U/ml 刺激 24 h 后线粒体酶活性下降趋势差异显著($P<0.05$, $n=6$)。以后的实验中 TNF 浓度采用 5 000 U/ml。

2.2　TNF 刺激 24 h 后培养 HUVEC 上清液 ET、LDH、NO、MDA、SOD 变化及 EDS 的作用

TNF 刺激 24 h 后培养 HUVEC 上清液 ET、LDH、NO、MDA 明显升高, SOD 降低; 而 EDS 治疗后 ET、LDH、NO、MDA 降低, SOD 则明显升高, 见表 1。

表 1　**TNF 刺激 24 h 后培养 HUVEC 上清液 ET、LDH、NO、MDA、SOD 变化及 EDS 作用**

Tab 1　Change of ET, LDH, NO, MDA, SOD in supernatant of cultured HUVECs after stimulation with TNF for 24 hours and treatment with EDS

	Control	EDS	TNF	TNF+EDS
ET	126.1±11.95	134.45±8.69	314.21±4.63 *	224.64±1.12 ##
LDH	82.308±3.31	84.23±4.3	236.35±8.36 *	151.8±7.74 ##
NO	34.248±1.17	34.238±1.8	68.09±1.38 *	65.53±0.51 ##
MDA	0.748±0.03	0.65±0.02	1.79±0.01 *	0.87±0.01 ##
SOD	55.53±1.8	55.52±1.6	37.06±0.19 *	47.58±0.6 ##

*: $P<0.05$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* TNF

2.3　TNF 刺激培养 HUVEC 后不同时间其 EC 变化及 EDS 的作用

TNF 刺激后 HUVEC 的 EC 在 6 h 即降低, 随着刺激时间的延长 EC 降低显著, 用 EDS 治疗后 EC 明显升高, 尤其治疗后 6 h 其 EC 升高显著, 以后随刺激时间延长 EDS 治疗后的 EC 虽较

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

0 h 组有所降低，但与损伤组比较仍相差显著，见表 2。

表 2 TNF 不同时间刺激培养 HUVEC 后其 EC 的改变及 EDS 的调节作用

Tab 2 Change of energy charge in cultured HUVECs stimulation with TNF and treatment with EDS

	TNF stimulation time(h)			
	0	6	12	24
TNF	0.866±0.02	0.577±0.03*	0.5±0.01*	0.463±0.02*
TNF+EDS	0.889±0.03	1.0±0.02##	0.887±0.12##	0.696±0.02##

*：$P<0.01$ *vs* 0 h；##：$P<0.05$ *vs* TNF

3 讨论

3.1 TNF 使培养 HUVECs 损伤，EDS 有一定的保护作用

TNF 是由单核-巨噬细胞应答各种刺激时所产生的一种细胞因子，其生物活性广泛，与炎症关系密切[3]，许多研究已经证实，TNF 在感染性休克、恶病质、器官损伤及器官功能衰竭的一系列病理损伤过程中均起着非常重要作用[4]。其作用机制有两种观点：一种认为TNF 单独作用能引起内毒素样休克[5~7]；另一种观点则认为 TNF 对机体的损伤作用有赖于内毒素及其它因子的存在[8]。本实验将 TNF 与 HUVEC 在无血清的培养液中进行培养，结果培养上清液 LDH、ET、MDA、NO 均不同程度升高，SOD 明显降低，而 EDS 治疗后 LDH、ET、MDA、NO 降低，SOD 明显升高。提示 TNF 对培养 HUVEC 有直接的损伤作用，而 EDS 对 TNF 的损伤有一定的保护作用。LDH 是一种糖酵解酶，广泛存在于细胞浆中，只有当在细胞膜受到损伤，通透性增高时，胞浆中 LDH 才大量释放到细胞外，因此 EDS 治疗后培养液中 LDH 降低，可能与 EDS 稳定细胞膜的作用有关。氧自由基对细胞的损害是许多疾病的病理基础之一，氧自由基可与生物膜中的主要成分多价不饱和脂肪酸作用，引发脂质过氧化反应，产生大量脂质过氧化物（LPO）及醛类产物（如丙二醛 MDA），进一步损害生物膜；SOD 是机体抗自由基的防御系统的主要酶，通过歧化作用消除自由基，SOD 的多少反映组织细胞抗自由基氧化损害的能力。EDS 治疗后培养液中 MDA 降低，SOD 增加，可能是 EDS 的抗脂质过氧化作用[9]。

3.2 TNF 对培养 HUVEC 能量代谢的影响及 EDS 保护作用的研究

细胞 EC 是含高能磷酸键的腺苷的比值，作为测定细胞高能磷酸状态的指标，可有效评估组织细胞的能量储备状态，机体生命活动都需要生物能量维持，由食物氧化生成的能量大多以 ATP 形式储备，严重烧伤后体内能量消耗急剧增加，实质脏器由于血循环障碍和内皮细胞受损以致能量代谢失常，能量储备不足而发生损害。本实验观察了无血清状态下 TNF 对体外培养的脐静脉内皮细胞的 ATP 及 EC 的影响及 EDS 的保护作用。实验证明：同一浓度的 TNF（5 000 U/ml）不同时间刺激培养 HUVEC，刺激后 6 h ATP、EC 就有下降趋势，随时间的延长而降低，刺激 24 h 能荷值降到最低。而用 EDS 治疗后培养的 HUVEC 的 EC 明显增加，尤其用药早期其能荷增加显著，几乎接近正常。提示 TNF 对培养 HUVEC 有直接的损伤作用。而 EDS 治疗后损伤减轻，能荷增加，说明 EDS 有一定的膜稳定的作用。EDS 最初的发现是昆虫、甲壳动物及其它节肢动物体内分泌的一种蜕皮激素，具有淘汰角质层，代之以新生皮层的作用，后来发现许多植物如牛膝等含有该成分。研究脊椎动物的内分泌学家证明这是类固醇激素样的作用及 EDS 的抗氧化功能。由于 EDS 是一种较新的植物药物成分，对其在医学上的应用仍处于实验阶段，其机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] 罗小凤，梁光萍，罗向东，等. 类脂 A 和内毒素对人肾小球内皮细胞线粒体脱氢酶活性的影响[J]. 第三军医大学学报，1999，21(4)：253－255.

[2] 石富胜，杨正国，张明卿，等. 山莨菪碱治疗后烧伤病人血管内皮细胞及其功能变化的临床研究[J]. 解放军医学杂志，1998，(2)：101－102.

[3] 孙耕耘，毛宝龄，吕宝璋. 白细胞介素-1、肿瘤坏死因子与炎症[J]. 生理科学进展，1993，24(1)：23－28.

[4] Fong Y，Lowry S F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis[J]. Clin Immunol Immunopathol，1990，55(2)：157－170.

[5] Maish G O 3rd，Shumate M L，Ehrlich H P，*et al*. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates TNF-induced alterations in wound breaking strength[J]. J Trauma，1999，47(3)：533－537.

[6] Krecic Shepard M E，Shepard D R，Mullet D，*et al*. Gallium nitrate suppresses the production of nitric oxide and liver damage in amurine model of LPS-induced septic shock[J]. Life Sci，1999，65(13)：1 359－1 371.

[7] Skinner R A，Tucker V L，Curry F R，*et al*. Acute effects of TNF on hydraulic conductivity of mammalian postcapillary venules[J]. J Trauma，1999，47(3)：486－491.

[8] 宋新明，白 涛，凌 云，等. 肿瘤坏死因子静脉注入对大鼠多器官功能影响的实验观察[J]. 中国病理生理杂志，1995，11(4)：349－352.

[9] 吴 旭，蒋耀光，范士志，等. 蜕皮甾酮对缺血缺氧致 HUVEC 损伤的影响[J]. 第三军医大学学报，1998，20(4)：358－359.

（编辑 陈聪连）

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