DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.007

一氧化氮在内毒素致细胞损伤过程中的变化及意义*

杨自力** 王正国 朱佩芳 白 涛** 吴 恒** (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室)
重庆, 630042

提 要 目的: 观察内毒素损伤内皮细胞过程中一氧化氮(NO)的变化及其意义。方法: 选择体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象,分别用内毒素及硝基左旋精氨酸(LNNA)对之进行处理,并检测其上清液中 NO_2^-/NO_3^- 丙二醛(MDA)含量及乳酸脱氢酶(LDH)活性变化。结果: LNNA可使内皮细胞 NO 合成降低, MDA含量和 LDH活性下降,而 LPS组上述各项指标则明显上升。结论: 内毒素可导致内皮细胞, NO增多并与氧自由基相互作用,从而引发内皮细胞损伤。

关键词: 内毒素;内皮细胞;一氧化氮
中图法分类号 R329

研究表明,内皮细胞的损伤与内毒素的作用有密切关系[1,2],但其机理尚未完全明确。NO既是一种信使分子,又是一种毒性分子[3]。炎性或免疫性刺激下产生大量 NO,可与超氧阴离子(O_2^-)等氧自由基反应,生成毒性更强的过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$),是为 NO 毒性作用的主要机理。研究 NO对内皮细胞的毒性作用有助于了解内皮细胞的损伤机理。

1 材料和方法

1.1 静脉血管内皮细胞(HUVEC)培养及鉴定[4]

常规培养人脐静脉内皮细胞。调整细胞浓度为(1.5~2)×10^5/ml,采用融合后5 d~10 d的内皮细胞进行实验。抗辣根过氧化物酶法(PAP)检测Ⅷ因子相关抗原,倒置显微镜下观察见培养细胞呈铺路石状相嵌单层排列。

1.2 分组

将培养已融合5 d~10 d的 HUVEC分为下列各组:① 正常对照组(C1)组;② 内毒素致伤组(LPS组): 加入 LPS使其终浓度为0.4 μg/ml;③ LNNA(硝基左旋精氨酸, NOS抑制剂)对照组(C2组): 加入 LNNA使其终浓度为100 μmol/ml;④ LPS+LNNA处理组(LN组): 同时加入 LPS和 LNNA,使其终浓度分别为0.4 μg/ml, 100 μmol/ml。

上述各组在加入处理因素4、16、24 h后,收获上清,贮于-30℃,待测。

1.3 指标测定

NO_2^-/NO_3^-的测定: 参照 Green等[3]的方法改进。MDA(丙二醛)测定: 采用南京建成生物研究所药盒,按其说明书进行。LDH(乳酸脱氢酶)测定: 按常规生化法。

1.4 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并用 EXCEL软件和 SPSS统计程序包进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 上清液中 NO_2^-/NO_3^- 含量变化

LPS可使 HUVEC上清 NO_2^-/NO_3^-迅速上升($P<0.01$),然后逐渐回落至正常水平(24 h); LNNA可抑制 LPS损伤组上清 NO_2^-/NO_3^-的升高,二组之间4 h相差非常显著,之后二组 NO_2^-/NO_3^-含量差逐渐减少,至24 h基本恢复正常,见表1。

表1 培养上清液 NO_2^-/NO_3^-含量变化(C_B/μmol·L^{-1})($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of NO_2^-/NO_3^- in supernatant (C_B/μmol·L^{-1})($\bar{x}\pm s$)

Group	Culture time(t/h)		
	4 (n=6)	16 (n=6)	24 (n=6)
C1	4.86±1.39	5.01±2.36	5.45±3.62
LP	10.06±2.73++	7.31±2.58+	6.13±2.95
C2	2.21±1.56	2.89±1.36	3.43±2.06
LN	5.29±2.33#**	4.30±1.90#*	5.26±1.99

+: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ vs C1; #: $P<0.05$ vs C2;
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs LP

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39470707,广东自然科学基金资助项目 No. G3-960670
** 杨自力,男,32岁,主治医师,博士 广州军区总医院危重病研究所 广州, 510010

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

2.2　上清液中 MDA含量变化

正常 HUVEC加入 LPS后,MDA含量立即迅速上升($P<0.01$)此后逐渐降低,至 24 h,相差仍然显著($P<0.05$),同时加入 LPS和 LNNA,5 h后,能使 MDA含量显著下降($P<0.05$),见表 2

2.3　上清液中 LDH活性变化

HUVEC加入 LPS后,上清 LDH活性急剧进行性升高($P<0.001$),经 LNNA处理后,虽然 LDH活性远高于对照组($P<0.01$),但显著低于 LPS组($P<0.01$),见表 3

表 2　培养上清液中 MDA改变 (C_B /nmol L^{-1}) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of MDA in supernatant (C_B /nmol L^{-1}) ($\bar{x}\pm s$)

Group	Culture time(t /h)		
	4 (n = 6)	16 (n = 6)	24 (n = 6)
C1	3.70± 1.09	3.82± 2.36	4.21± 1.96
LP	7.42± 1.30++	5.31± 1.79+	5.57± 3.68+
C2	4.52± 1.36	4.66± 2.68	4.96± 3.27
LN	5.56± 1.78*	5.34± 1.85	4.87± 2.25

+ : $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* C1; * : $P<0.05$ *vs* LP

表 3　培养上清液中 LDH改变 (ρ_A/μ $m^{-1}\cdot ml^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of LDH in supernatant (ρ_A/μ $m^{-1}\cdot ml^{-1}$) ($\bar{x}\pm s$)

Group	Culture time(t /h)		
	4 (n = 6)	16 (n = 6)	24(n = 6)
C1	23.68± 8.25	36.43± 11.28	106.52± 58.69
LP	205.28± 67.25++	273.25± 103.18++	343.69± 115.27++
C2	18.12± 11.36	25.42± 10.27	89.46± 37.21
LN	125.41± 36.25++##**	172.54± 56.33++##**	206.49± 85.47++##**

++: $P<0.01$ *vs* C1; ## : $P<0.01$ *vs* C2; ** : $P<0.01$ *vs* LP

3　讨论

近年来的研究表明,NO是一种具双重作用的信使分子和毒性分子。NO在体内以 L-精氨酸作为底物,在一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS)催化下反应而成。NO对机体的生理作用主要取决于刺激因素的性质、强弱、剂量的大小、反应的部位,而血管内皮细胞既存在诱生型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性,又存在原生型一氧化氮合酶 (Constitute nitric oxide synthase, cNOS)活性,因此,血管内皮细胞在调控 NO产生,发挥生理、病理作用等方面起着重要作用。

生理条件下,血管内皮持续释放小剂量的 NO作为信使分子,作用于紧邻的血管平滑肌,使后者处于一定的舒张状态;此外,小剂量的 NO还能抑制血细胞粘附,血小板聚集[6]。这种条件下产生的 NO主要受 cNOS调控,影响因素为血流搏动,机械性牵拉,剪切力等。当内皮细胞受到内毒素,白细胞介素-1(IL-1),肿瘤坏死因子 (TNF)等为炎性因子作用时,诱导 iNOS mRNA表达,NO合成便大量增加。

实验结果表明,内皮细胞在正常情况下合成少量 NO,可能对于维持内皮细胞功能的稳定具有一定作用;用内毒素脂多糖处理内皮细胞 4 h后,上清 NO_2^- / NO_3^- 含量急剧增加,同时氧自由基的生成也增加,反映内皮细胞损伤的指标乳酸脱氢酶 (LDH)亦急剧增加。LNNA是一种 NOS抑制剂,用 LNNA处理内皮细胞,结果发现,LNNA不仅能降低正常内皮细胞 NO的合成,而且能明显降低内毒素损伤内皮细胞过程中 NO的含量,同时上清 MDA含量亦显著降低,LDH亦下降。实验虽然未能直接测定 $ONOO^-$ 的含量变化,但 LNNA抑制 NO增多的同时,MDA减少,故推测 NO和 MDA相互作用生成 $ONOO^-$ 亦减少,在内毒素损伤内皮细胞过程中,NO自由基与氧自由基有某种相互作用的关系,结果导致内皮细胞损伤。

参考文献

1 Varela A F, Runge A, Ignarro J *et al*. Nitric oxide and prostacyclin inhibit fetal platelet aggregation: a response similar to that observed in adults. Am J Obstet Gynecol, 1992; 167(6): 1599

2 Ivanova K, Schaefer M. Drumic oxide and its redox-activated forms. Science, 1992; 258(8): 1898

3 Kooy N W, Royall J A, Ye *et al*. Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. Am J Respir Crit Med, 1995; 151(4): 1250

4 安静.胎儿脐静脉内皮细胞培养.第三军医大学学报, 1990; 12(3): 120

(收稿: 1996-12-21;修回: 1997-04-21)

(编辑　张大春)

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

Changes of nitric oxide during cellular damage by endotoxin and its significance*

Yang Zili, Wang Zhengguo, Zhu Peifang, Bai Tao, Wu Hen (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract **Objective:** The changes of nitric oxide (NO) during cellular damage by endotoxin and its significance were studied. **Methods:** After the cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were handled with endotoxin and LNNA respectively, the contents of NO_2^- /NO_3^- and MDA and the changes of LDH activity in its supernatant were determined. **Results:** LNNA could inhibit the synthesis of NO and decrease the content of MDA and LDH activity. **Conclusion:** The overproduction of NO induced by endotoxin and the interaction between NO and oxygen free radicals might account for the damage of endothelial cells.

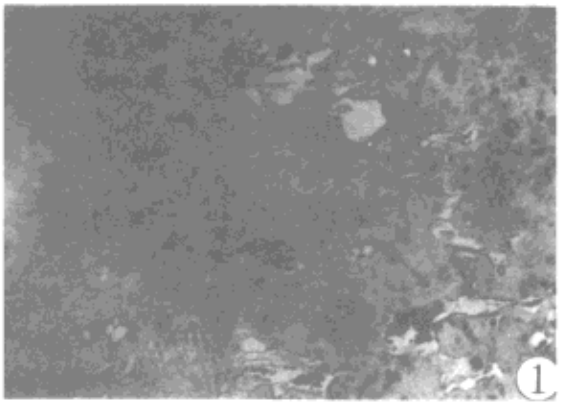
Key words endotoxin; endothelial cell; nitric oxide

* This project was supported by National Natural Science Foundation of China No. 39470707

(上接201页)

检查: T 36℃, P 65次/min, R 18次/min, BP 16 kPa/9 kPa 眼球活动自如,瞳孔等大,对光反射灵敏。右眼数指1 m,左眼视力1.2 外鼻向两侧隆起,鼻甲不大,鼻腔底部积有粘脓性分泌物,鼻中隔中后部向两侧鼻腔膨隆,突起部与下鼻甲相触。新生物表面光滑,触之质韧,不出血。鼻后孔镜下可见新生物充满鼻咽腔,色红呈分叶状。鼻部 CT检查,见鼻腔后部起源于鼻中隔后部有一约4.5 cm× 5.6 cm大小之高密度边缘不规则之包块影,间以小点状、片状低密度区,高低密度值分别为1 179 Hu和67 Hu。鼻中隔右偏,两侧后鼻孔堵塞,右侧鼻腔狭窄畸形,左侧上颌窦内壁受推挤,向窦腔内突入,左上颌窦内下缘粘膜肥厚。意见: 鼻中隔后端骨软骨瘤,左上颌窦炎。入院诊断: 鼻中隔新生物(软骨瘤)。

入院后眼科会诊。右眼数指1 m,左眼视力1.2,眼底检查右眼颞侧乳头色淡,未见水肿及血管体征,左眼底(-)。诊断为右眼视神经萎缩,球后段受压所致。5月12日行气管切开并在全麻下经腭径路行软骨瘤摘除术。摘除肿瘤总体积7 cm× 6 cm× 3 cm。术后病理检查诊断为鼻中隔蝶窦软骨瘤,见图1、2。术后于5月31日痊愈出院。随访1年未见复发。



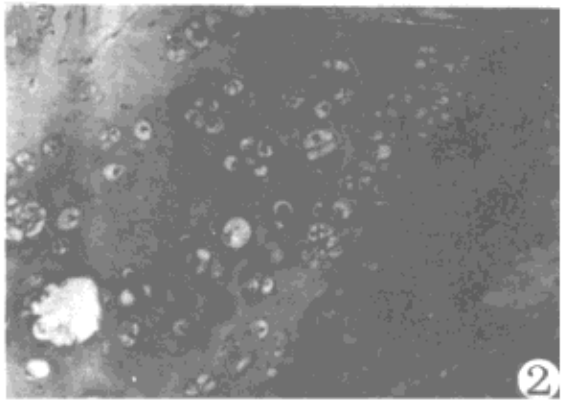


图1 瘤组织由较成熟的透明软骨构成。呈不规则分叶状,基质稀疏或呈小泡沫状,并见有小片状钙盐沉着 (HE× 35)

图2 肿瘤基质中见大小不等的陷窝,陷窝内可见数个瘤细胞,胞核多呈圆形固缩状,胞浆淡或呈空泡状 (HE× 100)

讨论

大的鼻中隔软骨瘤,需与高分化软骨肉瘤相鉴别。此病例术中所见肿瘤边界清楚,无周边浸润现象。病史已数年,也无转移征象。而高分化软骨肉瘤镜下见细胞比较丰富,特别是核的异型性,染色质丰富深染。有作者[1]认为二者鉴别主要由3方面考虑。首先细胞核的异型性,如双核增多,出现多核或巨核软骨细胞等;其次观察肿瘤有无浸润宿主骨,如骨皮质消失,肿瘤性软骨中心出现残存的皮质等;最后要参考临床肿瘤的大小和部位,对位于近心端或体积大于6 cm^3者应警惕。该例软骨细胞分化成熟可与高分化软骨肉瘤鉴别。

关键词 鼻中隔;软骨瘤

中图法分类号 R739.6

参考文献

1 刘彤华,李维华编著.诊断病理学.北京: 人民卫生出版社, 1994 798~ 799

(收稿: 1996-06-05;修回: 1996-12-09)

(编辑 冷怀明)

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