

· 论 著 ·

下丘脑-垂体轴反馈调节方式对内皮细胞 MDA 代谢和 NOS 表达的影响*

徐能全¹, 邱启祥¹, 周小龙¹, 吴开云^{2△}

(1. 赣南医学院解剖教研室, 江西赣州 341000; 2. 苏州大学基础医学与生命科学学院解剖教研室 215006)

摘要:目的 探讨下丘脑-垂体轴对动脉粥样硬化(AS)形成的反馈调节方式。方法 将联胺损伤内皮细胞(EC)的信息分别反馈于下丘脑(H)、垂体(P)、下丘脑-垂体(HP),制成 HP 轴条件培养液并作用于正常和受损 EC,检测 EC 丙二醛(MDA)含量和一氧化氮合酶(NOS)的表达。结果 3 种条件培养液(H、P、HP)对正常内皮细胞(N-EC)MDA 代谢、NOS 表达的影响无明显变化($P>0.05$);而对受损内皮细胞(D-EC),H 和 P 的作用也不明显($P>0.05$),但 HP 能使其 MDA 含量下降,NOS 表达显著增强($P<0.01$)。结论 HP 轴对 EC MDA 代谢、NOS 的表达的反馈调控作用依赖于轴的完整性。

关键词:反馈;动脉粥样硬化;丙二醛;一氧化氮合酶;下丘脑-垂体轴

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)08-0742-02

Influence of feedback methods of hypothalamus-pituitary axis on MDA and NOS of cultured endothelial cells*

Xu Nengquan¹, Qiu Qixiang¹, Zhou Xiaolong¹, Wu Kaiyun^{2△}

(1. Department of Anatomy, Gannan Medical College, Ganzhou, Jiangxi 341000, China;

2. Department of Anatomy, College of Basic Medicine and Life Science, Suzhou University, Suzhou, Jiangxi 215006, China)

Abstract: Objective To investigate the feedback methods of hypothalamus-pituitary axis influencing the development of atherosclerosis. **Methods** The hypothalamus (H), pituitary (P) and hypothalamus-pituitary cells (HP) were cultured respectively with feedback message from endothelial cells damaged by diamide, then the conditioned media were used to culture endothelial cells, and the supernatants were collected separately for detecting the content of MDA and the endothelial cells were stained by immunocytochemical method to observe the expression of NOS. **Results** It was shown that the conditioned media of three experimental groups had no effect on the metabolism of MDA and NOS expression of normal endothelial cells ($P>0.05$). But for damaged endothelial cells, the HP intensively down-regulated the metabolism of MDA and up-regulated the NOS expression ($P<0.01$), the H and P groups showed no effect ($P>0.05$). **Conclusion** The hypothalamus-pituitary axis with feedback message can regulate the metabolism of MDA and NOS expression of endothelial cells, and depends on its wholity.

Key words: feedback; atherosclerosis; malondialdehyde; nitric oxide synthase; hypothalamus-pituitary axis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种发病机制复杂的心血管疾病,下丘脑-垂体(HP)神经内分泌因素在其发生、发展中起着重要作用^[1-2]。前期研究表明 HP 轴对内皮细胞(EC)丙二醛(malondialdehyde, MDA)代谢、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的表达有反馈调控作用^[3],本文用体外细胞培养方法,将受损内皮细胞(D-EC)的信息反馈于 HP 轴的各个环节,观察这些条件培养液对 EC MDA 代谢和 NOS 表达的影响,进一步探讨 HP 轴在 AS 形成过程中的反馈调控方式。

1 材料与方 法

1.1 材料 选取 5 个月胎龄的水囊引产人胎,人胎的使用经本院医学伦理委员会批准,并征得家属同意及签订《胎儿捐献用于科学研究同意书》。人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-304,上海细胞所),DMEM、MEM 和 RPMI 1640 培养基(HyClone, USA),联胺(Sigma 公司),MDA 试剂盒(南京建成生物制品有限公司),小鼠抗人 NOS 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc),SABC 免疫细胞化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)等。

1.2 方 法

1.2.1 EC 条件培养液的制备 复苏 EC 并传代扩增,按 1×10^5 个/mL 密度接种至 30 mL 培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 条件

下用 10% 小牛血清 RPMI1640 培养 24 h,加入联胺,使其终浓度为 1×10^5 mol/L,作用 4 h,弃液换成无血清 MEM 培养液,培养 24 h 后分别收集上清液,离心去细胞碎片制成 EC 条件培养液。

1.2.2 HP 轴条件培养液的制备 参照文献[4],在无菌条件下快速取人胎下丘脑(H)、垂体(P)组织,用 pH 为 7.4 (0.01 mol/L)的 PBS 液洗涤并剥除血管、脑膜,剪碎,再用 0.125% 胰蛋白酶消化 5 min,终止后 200 目铜网过滤,1 000 r/min 离心 5 min,用 20% 小牛血清的 DMEM 制成单细胞悬液,以 1×10^5 个/mL 密度分下丘脑组(H 组)、垂体组(P 组)和 HP 组移入 30 mL 培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养 7 d 左右,倒置显微镜下细胞透亮,颗粒少或无,而且下丘脑细胞突起多时,另取样本作甲苯氨蓝染色,如显示下丘脑细胞胞体中尼氏体丰富则表明细胞处于代谢旺盛期,即可进行换液培养;3 组(H、P、HP)分别加入 EC 条件培养液和 20% 小牛血清 DMEM 培养液各 50%,24 h 后换成无血清 MEM 培养液,继续培养 24 h,分别收集上清液,离心后即 EC 信息反馈后的 HP 轴条件培养液。

1.2.3 EC 分组实验 将 EC 按 1×10^5 个/mL、每孔 1 mL 移入 24 孔培养板,分成 D-EC 和正常内皮细胞(N-EC)两大组,每

大组又分为 1 个对照组和 3 个实验组(H、P、HP), 每小组各 6 孔。EC 贴壁后 D-EC 组加联胺, 使其终浓度为 1×10^5 mol/L, N-EC 组加入与联胺等量的无菌生理盐水, 作用 4 h, 各孔换入相应的 HP 轴条件培养液及 10% 小牛血清 RPMI1640 各 0.5 mL, 对照组换入无血清 MEM 及 10% 小牛血清 RPMI1640 各 0.5 mL。24 h 后全部换成无血清 MEM 培养液各 1 mL, 继续培养 24 h, 收集上清液离心后作 MDA 测定; EC 用 4% 多聚甲醛固定 0.5 h 后检测 NOS 的阳性表达。

1.2.4 MDA 的检测 用硫代巴比妥酸法按 MDA 试剂盒说明书操作, 最后用 721 型分光光度计在 532 nm 波长测定 MDA 的吸光度。根据以下公式换算出 MDA 含量: $MDA(nmol/L) = (\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度} / \text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}) \times 10 \text{ nmol/L} \times \text{样品稀释倍数}$ 。

1.2.5 NOS 免疫细胞化学染色和图像分析 按 SABC 免疫细胞化学试剂盒说明书操作, 用 PBS 液洗涤, H_2O_2 甲醇溶液灭活, 经正常羊血清封闭, 1:150 工作浓度的 NOS 一抗, 加生物素化羊抗小鼠/兔 IgG, SABC 和 DAB 室温下显色, 脱水透明, 封片。用计算机图像分析系统(CMIAS)半定量检测各组 EC 胞浆 NOS 的表达, 其含量用积分光密度(integral optical density, IOD)表示。

1.3 统计学处理 实验结果用 SPSS10.0 for windows 统计软件作方差分析(F 检验), 两样本均数间比较用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EC 上清液中 MDA 含量的变化 联胺能使 EC MDA 的生成量显著增加($P < 0.01$); 把不同的 HP 轴条件培养液(即 H、P、HP)分别作用 N-EC 后, 其 MDA 含量变化差异无统计学意义($P > 0.05$); 而作用 D-EC 后, 3 个实验组与对照组相比, MDA 含量虽呈下降趋势, 但只有 HP 组的下调作用最为显著($P < 0.01$), H 组和 P 组的效应不明显($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 EC 上清液中 MDA 含量($\bar{x} \pm s$, nmol/L)

组别	n	D-EC	N-EC
对照组	6	1.374 ± 0.231 Δ	1.102 ± 0.153
H 组	6	1.276 ± 0.107	1.093 ± 0.052
P 组	6	1.257 ± 0.209	1.210 ± 0.138
HP 组	6	1.112 ± 0.097 \blacktriangle	1.106 ± 0.223

Δ : $P < 0.01$, 与对照组中 N-EC 比较; \blacktriangle : $P < 0.01$, 与对照组中 D-EC 比较。

2.2 EC NOS 阳性表达的变化 联胺可诱导 EC NOS 的阳性表达明显减弱($P < 0.05$); 分别用 H、P、HP 条件培养液培养 EC 后, N-EC 组 NOS 的阳性表达呈递减特征, 但无统计学意义($P > 0.05$), 而 D-EC 组 NOS 阳性表达均高于对照组, 其中 HP 组升高显著($P < 0.01$), 但 H 组和 P 组的作用不明显($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 EC NOS 阳性表达的 IOD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D-EC	N-EC
对照组	6	87.153 ± 0.204*	89.095 ± 0.317
H 组	6	87.425 ± 0.348	89.087 ± 0.526
P 组	6	87.393 ± 0.121	88.761 ± 0.622
HP 组	6	89.382 ± 0.265 \blacktriangle	88.539 ± 0.516

*: $P < 0.05$, 与对照组中 N-EC 比较; \blacktriangle : $P < 0.01$, 与对照组中 D-EC 比较。

3 讨 论

AS 的主要病理特征是血管 EC 受损、平滑肌增生^[5]。脂

质过氧化是 EC 的主要损伤因素, 细胞脂质过氧化的终产物 MDA 含量可以反映脂质过氧化物的水平^[6-7]。一氧化碳(NO)是一种细胞信使分子, 有抗氧化和抑制炎症反应中细胞因子的产生等生物学效应, 是内源性抗 AS 的重要机制^[8-9]。Gutstein^[10]通过实验发现刺激猴下丘脑外侧区可造成 EC 的损伤, 表现出 AS 早期的病理特征, 并分析其神经机制可能为: (1) 直接途径, 即神经核团直接调控血管壁; (2) 间接途径, 即神经体液途径, 中枢神经系统产生的物质通过血液作用于血管壁。有研究证实 HP 神经内分泌因素有抗氧化作用, 通过调整 HP 神经内分泌功能可调节动物的血脂代谢^[11-12], H、P 组织条件培养液对 EC 的 NO 和脂质过氧化物的代谢有明显调控作用^[13-14]。本实验也发现 HP 轴接收 EC 受损反馈信息以后, 能对 EC MDA 代谢和 NOS 表达作出显著的调节作用, 而接收其它无关反馈信息的作用不明显^[3], 但这种反馈调节作用是通过何种途径实现还有待于进一步证实。本研究结果显示, 将联胺损伤 EC 的信息分别反馈刺激 H、P 和 HP, H、P 对 N-EC 和 D-EC 的 MDA 代谢和 NOS 表达几乎不起作用, 但 HP 对 D-EC 有明显的调节效应, 能使其 MDA 含量下降, NOS 阳性表达升高, 而对 N-EC 的作用却不明显。这表明当 EC 受到损伤时, 信息反馈到 HP 轴, 单独的 H 或 P 并不能起明显的调节作用, 只有二者联合才能抑制 EC 的脂质过氧化, 减少 MDA 的产生, 同时上调 NOS 的阳性表达, 使 NO 生成增加, 增强 NO-NOS 系统的内源性保护功能^[15-16], 以恢复 EC 的正常状态。由此可以认为机体存在 EC→下丘脑→垂体→EC 的信息反馈调节机制, 而且这种反馈调节机制必须在 HP 轴完整的情况下才起效, 轴上的任何环节都不能单独起作用, 这在 AS 形成过程中具有重要意义, 也为临床预防和治疗 AS 提供新的思路。

参考文献:

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.
 [2] 刘建康, 邓漪平. 内皮细胞和神经系统间相互作用与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 272-276.
 [3] 徐能全, 吴开云. 内皮细胞信息反馈下丘脑-垂体条件培养液对内皮细胞丙二醛代谢和一氧化氮合酶表达的影响[J]. 解剖学杂志, 2005, 28(3): 281-283.
 [4] 洪庆涛, 唐一鹏. 新生大鼠大脑皮层神经细胞的体外培养[J]. 神经解剖学杂志, 1994, 10(3): 259-261.
 [5] 蔡海江. 动脉粥样硬化研究的若干进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(2): 81-83.
 [6] 徐少平, 孙静平. 动脉粥样硬化脂质过氧化损伤机制的实验研究[J]. 中国循环杂志, 1994, 9(7): 419-421.
 [7] 刘虹彬, 温进坤, 韩梅. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(4): 360-362.
 [8] 焦鸿莉, 杨和平, 杨永宗. 一氧化氮及其对心血管的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(4): 333-338.
 [9] 邓俊, 向贵平, 黄骥. HO-1/CO 与 NOS/NO 系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2146-2148, 2150.
 [10] Gutstein WH. Effect of hypothalamic stimulation on the endothelial morphology of the aorta in the conscious squirrel monkey[J]. Atherosclerosis, 1981, 39(3): 329-344.
 [11] Nishida M, Miyagawa JI, Tokunaga K, (下转第 751 页)

的糖类抗原而引起 CA19-9 水平升高,但当肿瘤比较小,不引起或者引起的梗阻性黄疸较轻,或者肿瘤本身由于酶的缺乏而无法分泌糖类抗原时^[15],患者 CA19-9 水平可处于正常范围内,而使得阴性预测值较低。同时由于良性病变的影响,使得 CA19-9 的诊断特异性不强。对于大部分的胰腺癌来说,在早期利用血清 CA19-9 水平诊断胰腺癌敏感性较低,但随着肿瘤的增大、侵犯、转移,CA19-9 水平不断升高,其敏感性也相应增高^[13]。而¹⁸F-FDG PET/CT 是利用肿瘤自身对葡萄糖的代谢与正常组织的代谢差异来诊断病变,即使原发病灶较小、分期较早的胰腺癌亦可出现葡萄糖摄取增多而表现为高代谢灶,从而弥补了肿瘤标志物在诊断上的不足。但某些显像呈高摄取的胰腺良性病变本身并不引起肿瘤标志物的升高,二者联合应用可以提高¹⁸F-FDG PET/CT 诊断的特异性。

随着影像技术及检验医学的发展,将为临床提供更多辨别肿瘤良、恶性的方法,多种方法的联合应用,也将对肿瘤定性诊断中起着越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Kauhanen SP, Komar G, Seppanen MP, et al. A prospective diagnostic accuracy study of ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, multidetector row computed tomography, and magnetic resonance imaging in primary diagnosis and staging of pancreatic cancer[J]. *Ann Surg*, 2009, 250(6): 957-963.
- [2] Tang S, Huang G, Liu J, et al. Usefulness of ¹⁸F-FDG PET, combined FDG-PET/CT and EUS in diagnosing primary pancreatic carcinoma: a meta-analysis[J]. *Eur J Radiol*, 2009, 9(26): 1-9.
- [3] Saif MW, Cornfeld D, Modarresifar H, et al. ¹⁸F-FDG positron emission tomography CT (FDG PET-CT) in the management of pancreatic cancer: initial experience in 12 patients[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2008, 17(2): 173-178.
- [4] Meller J, Sahlmann CO, Gurocak O, et al. FDG-PET in patients with fever of unknown origin: the importance of diagnosing large vessel vasculitis[J]. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 53(1): 51-63.

(上接第 743 页)

- et al. Early morphologic changes of atherosclerosis induced by ventromedial hypothalamic lesion in the spontaneous diabetic Goto-Kakizaki rat[J]. *J Lab Clin Med*, 1997, 129(2): 200-207.
- [12] 巫国辉, 吴开云, 袁铿. 离体下丘脑-垂体对内皮细胞的保护性调节作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2004, 20(4): 398, 414.
 - [13] 魏波, 吴开云. 下丘脑-垂体条件培养基对血管内皮细胞一氧化氮和脂质过氧化物代谢的影响[J]. *中国动脉硬化*

- [5] Ozaki Y, Oguchi K, Hamano H, et al. Differentiation of autoimmune pancreatitis from suspected pancreatic cancer by fluorine ¹⁸fluorodeoxyglucose positron emission tomography[J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43(2): 144-151.
- [6] Xin L, Liao Z, Hu L H, et al. The sensitivity of combined IgG4 and IgG in autoimmune pancreatitis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(8): 1902.
- [7] Baiocchi GL, Portolani N, Bertagna F, et al. Possible additional value of ¹⁸FDG-PET in managing pancreas intraductal papillary mucinous neoplasms: preliminary results[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 10(27): 10.
- [8] 汤厚阔, 陈炯. 肿瘤标志物 CA19-9、CA242、CEA 和 CA125 联合检测在胰腺癌诊断中的意义[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2009, 21(2): 95-97.
- [9] 沈剑虹, 陆品相. 血清 CA199 检测对消化道恶性肿瘤的临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2008(20): 3056-3057.
- [10] 刘珊玲, 彭芝兰, 何斌, 等. 血清 CA19-9 联合 CA125 检测在卵巢肿瘤中的应用价值[J]. *四川肿瘤防治*, 2001, 14(2): 81-83.
- [11] Yu HY, Bao YQ, Zhang L, et al. Relation between the level of serum CA19-9 and glucose control in inpatients with diabetes[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010, 90(6): 394-396.
- [12] 罗峰, 王凤婷. 血清 CA199 在阻塞性胆管疾病中的临床分析[J]. *黑龙江医药科学*, 2009, 32(6): 84.
- [13] 任大宾. CA19-9 在消化系统疾病诊断中的价值[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [14] Waraya M, Yamashita K, Katagiri H, et al. Preoperative serum CA19-9 and dissected peripancreatic tissue margin as determiners of long-term survival in pancreatic cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(5): 1231-1240.
- [15] Okusaka T, Yamada T, Maekawa M. Serum tumor markers for pancreatic cancer: the dawn of new era? [J]. *JOP*, 2006, 7(4): 332-336.

(收稿日期: 2010-09-09 修回日期: 2010-12-22)

化杂志, 2001, 9(4): 285-288.

- [14] 徐能全, 符信清, 罗滨等. 大鼠下丘脑-垂体反馈调节对内皮细胞 MDA 及 NO 的影响[J]. *赣南医学院学报*, 2004, 24(5): 515-517.
- [15] 周玫, 陈瑗. 体内一氧化氮和过氧亚硝酸的生成及其生物学效应[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6(2): 178-181.
- [16] 景冬樱, 王树人. 一氧化氮系统功能障碍与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6(2): 182-184.

(收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-17)