

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)20-1843-03

脱氢表雄酮对内皮细胞 NO, ET-1 生成及 ICAM-1 表达的影响

周娟¹ 杨予白¹ 奥沛源² 雷立权¹¹西安交通大学医学院病理生理学教研室 陕西 西安 710061, ²宝鸡市中医医院骨科 陕西 宝鸡 721001)

Influence of dehydroepiandrosterone on production of NO, ET-1 and expression of ICAM-1 in endothelial cells

ZHOU Juan¹, YANG Yu-Bai¹, AO Pei-Yuan², LEI Li-Quan¹¹Department of Pathophysiology, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ²Department of Orthopedics, Baoji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji 721001, China

【Abstract】 AIM: To investigate the influence of dehydroepiandrosterone on the synthesis of NO, secretion of ET-1 and the expression of ICAM-1 in endothelial cells.

METHODS: The cultured human umbilical vein endothelial cells ECV304 was treated by DHEA and the level of NO and ET-1 in medium was detected by nitrite/nitrate colorimetric method and radioimmunoassay. The surface expression of ICAM-1 on cells was detected immunohistochemically.

RESULTS: In comparison with those of control, the content of NO in medium decreased from (387 ± 12) to (242 ± 11) μmol/L ($P < 0.05$), but the concentration of ET-1 in medium increased from (397 ± 13) to (626 ± 29) ng/L ($P < 0.05$) along with the increase of concentration of DHEA. The content of NO in medium of control group was similar at every time point ($P > 0.05$), but DHEA time-dependently decreased the content of NO ($P < 0.05$). The concentration of ET-1 in medium time-dependently increased both in control group and in DHEA group ($P < 0.05$), and it was higher in DHEA group. Higher concentration of DHEA or longer treatment time, DHEA did not affect the ICAM-1 expression. **CONCLUSION:** DHEA can adjust the function of vessels by regulating the production of NO and ET-1 of endothelial cells.

【Keywords】 dehydroepiandrosterone; ECV304 cells; nitric oxide; endothelin-1; intercellular adhesion molecule-1

【摘要】目的:观察脱氢表雄酮对内皮细胞 NO 合成、ET-1

收稿日期 2004-05-11; 修回日期 2004-06-18

作者简介:周娟(1973-),女(汉族),陕西省西安市人,硕士,讲师。

Tel. (029) 82655164 Email. zj7332@sina100.com

分泌及细胞表面 ICAM-1 表达的影响。方法:培养的人脐静脉内皮细胞系 ECV304 经不同浓度和不同作用时间 DHEA 处理后,采用硝酸还原酶及放免法分别测定培养液中 NO 及 ET-1 水平,用 SABC 免疫组化法观察细胞表面 ICAM-1 的表达。结果:与对照组相比,随着 DHEA 浓度的增加,培养液中 NO 的含量从(387 ± 12)降至(242 ± 11) μmol/L ($P < 0.05$),而 ET-1 的浓度却从(397 ± 13)增至(626 ± 29) ng/L ($P < 0.05$)。随着时间的延长,各对照组培养液中 NO 含量均无明显变化 ($P > 0.05$),而 DHEA 组 NO 生成量却逐渐降低 ($P < 0.05$) 呈时间依赖。培养液中 ET-1 浓度无论是对照组还是 DHEA 组均随着时间的延长而升高 ($P < 0.05$),但 DHEA 组升高的更为明显。无论是增加浓度还是延长作用时间, DHEA 均不影响细胞表面 ICAM-1 的表达。结论: DHEA 可通过调节内皮细胞 NO 及 ET-1 生成量对血管功能进行调控。

【关键词】 脱氢表雄酮; ECV304 细胞; 一氧化氮; 内皮缩血管肽-1 胞间粘附分子-1

【中图分类号】 R363.2 **【文献标识码】** A

0 引言

血管内皮细胞的损伤及功能改变在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生中意义重大。脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)是性激素合成过程的中间产物,主要由肾上腺皮质网状带分泌,是血浆中浓度最高的类固醇激素。研究表明, DHEA 可能是人体的一种内源性抗 AS 因子^[1,2],因而具有治疗及预防 AS 的应用前景。但目前对其作用机制知之甚少。我们采用培养的人脐静脉内皮细胞系 ECV304 观察脱氢表雄酮对其一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)生成水平及细胞表面细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响,以期从内皮细胞的角度说明 DHEA 的抗 AS 作用,并为从性激素稳态角度探讨男性内源性抗 AS 机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ECV304 人脐静脉内皮细胞系购自中科院协和基础研究所, RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司,胰蛋白酶及 DHEA 均来自 Sigma 公司, NO 含量试剂盒购自南京建成生物工程研究所, ET-1 含量试剂

盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, SABC 免疫酶标试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 其他相关试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞经 2 g/L 胰蛋白酶与 0.2 g/L EDTA 的消化液消化后, 用含 100 mL/L 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液, 接种在培养瓶内, 置于 50 mL/L CO₂ 的培养箱中 37℃ 培养, 每 2~3 d 更换培养液, 生长融合的细胞, 经消化后进行传代培养。

1.2.2 NO 及 ET-1 水平的测定 生长良好的内皮细胞经消化后, 以 5×10^7 个/L 接种于放有盖玻片的 12 孔培养板, 待细胞贴壁, 弃去旧培养液, 用无血清培养液冲洗 2 遍, 加入各种实验用液, 继续培养相应时间后, 收集上清, 采用硝酸还原酶法测 NO 含量, 放免法测 ET-1 含量。

1.2.3 细胞表面 ICAM-1 的表达 收集完上清, 取出附着有细胞的盖玻片, PBS 冲洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛固定, 按 SABC 免疫酶标法进行。细胞中呈现棕褐色或棕黑色颗粒者为阳性细胞, 每张切片选取 5 个视野, 计算 200 个细胞中的阳性细胞数, 取其均值。

1.2.4 实验分组

1.2.4.1 不同浓度 DHEA 对内皮细胞功能的影响 对照组为无血清培养基组, 实验组为含终浓度分别为 1, 10, 100, 1000 nmol/L DHEA 的无血清培养基组, 作用时间为 24 h。

1.2.4.2 不同作用时间 DHEA 对内皮细胞功能的影响 对照组为无血清培养基组, 实验组为加入终浓度 10 nmol/L 的 DHEA, 作用时间分别为 12, 24 和 36 h。

统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS11.0 统计软件分析, 不同浓度 DHEA 对内皮细胞功能影响的结果采用单因素方差分析; 不同作用时间 DHEA 对内皮细胞功能影响的结果采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 DHEA 对内皮细胞功能的影响 与对照组相比, DHEA 可明显抑制细胞 NO 的合成, 同时促进 ET-1 的分泌 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖。但各种浓度的 DHEA 对细胞表面 ICAM-1 的表达均无影响 (Tab 1)。

2.2 不同作用时间 DHEA 对内皮细胞功能的影响 随着时间的延长, 各对照组培养液中 NO 含量均无明显变化, 而 DHEA 组 NO 生成量却逐渐降低 ($P <$

0.05), 呈时间依赖。培养液中 ET-1 浓度无论是对照组还是 DHEA 组均随时间的延长而升高 ($P < 0.05$), 但 DHEA 组升高的更为明显。各时段 DHEA 组与对照组细胞表面 ICAM-1 的表达均较低, 且无统计学意义 (Tab 2)。

表 1 不同浓度的 DHEA 对内皮细胞功能的影响

Tab 1 Influence of different concentrations of DHEA on function of endothelial cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

| DHEA (nmol/L) | NO ($\mu\text{mol/L}$) | ET-1 (ng/L) | ICAM-1 (%) |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| Control | 387 \pm 12 | 397 \pm 13 | 4.1 \pm 1.5 |
| 1 | 371 \pm 10 ^a | 428 \pm 17 ^a | 5.3 \pm 3.7 |
| 10 | 334 \pm 10 ^a | 464 \pm 19 ^a | 3.9 \pm 1.4 |
| 100 | 291 \pm 12 ^a | 545 \pm 26 ^a | 3.2 \pm 2.1 |
| 1000 | 242 \pm 11 ^a | 626 \pm 29 ^a | 6.7 \pm 3.2 |

^a $P < 0.05$ vs control. DHEA: Dehydroepiandrosterone; NO: Nitric oxide; ET: Endothelin-1; ICAM: Intercellular adhesion molecule-1.

表 2 不同作用时间的 DHEA 对内皮细胞功能的影响

Tab 2 Influence of different treatment courses of DHEA on function of endothelial cells in different times ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

| t/h | NO ($\mu\text{mol/L}$) | | ET-1 (ng/L) | | ICAM-1 (%) | |
|-----|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | Control | DHEA | Control | DHEA | Control | DHEA |
| 12 | 366 \pm 13 | 329 \pm 8 | 18 \pm 5 | 28 \pm 18 | 4.1 \pm 2.8 | 3.6 \pm 1.9 |
| 24 | 366 \pm 17 | 300 \pm 24 ^a | 435 \pm 55 ^a | 547 \pm 5 ^a | 6.3 \pm 2.9 | 5.7 \pm 4.2 |
| 36 | 400 \pm 48 | 276 \pm 12 ^a | 612 \pm 46 ^a | 951 \pm 50 ^a | 5.7 \pm 3.1 | 4.7 \pm 3.3 |

^a $P < 0.05$ vs control. DHEA: Dehydroepiandrosterone; NO: Nitric oxide; ET-1: Endothelin-1; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1.

3 讨论

本实验结果表明, ET-1 的基础分泌量在 12 h 内较低, 24 及 36 h 后浓度逐渐增加, 且 DHEA 组升高的更明显。对照组培养液中 NO 含量不随时间的延长而变化, 但 DHEA 组 NO 生成量却逐渐降低, 并呈时间依赖。阮骥韬等^[3]的研究结果也提示 ET-1 的产生是一种累积过程。由于体外实验没有清除 ET-1 的场所, 随着不断的分泌, 培养液中 ET-1 的浓度也将不断升高。由于 NO 合成的减少可增加 ET-1 的分泌。因此, 本实验中 DHEA 组的 ET-1 较对照组高, 很可能是由于 DHEA 一方面直接促进 ET-1 的分泌; 另一方面也可通过减少 NO 的合成, 从而使 NO 抑制 ET-1 分泌的作用减弱, 最终导致培养液中 ET-1 的含量逐渐增加。但 DHEA 为何会抑制细胞 NO 的生成, 本实验未作进一步探讨。

ET-1 主要由内皮细胞合成、释放, 并以旁分泌的形式作用于附近的平滑肌细胞, 引起平滑肌细胞的收

缩和增殖。而 NO 则可导致平滑肌的扩张及增殖受抑。目前关于 ET-1 与 NO 间的相互关系及其在疾病发生中作用的具体机制仍不明确。推测二者之间可能存在反馈性调节。在生理情况下,内皮细胞释放的舒张因子占优势,抑制血管的收缩和血小板的激活。在病理情况下,ET-1 和 NO 释放失衡,收缩因子占优势。但过多的 NO 生成又可因局部自由基的产生而造成组织损伤^[4]。由于内皮细胞上 ICAM-1 表达的增多具有明显的促 AS 作用,而本实验结果表明 DHEA 不影响细胞 ICAM-1 的表达。因此,本实验结果似可解释为:DHEA 通过对 ET-1 分泌及 NO 合成的调节而间接影响血管平滑肌细胞的代谢及增殖,并与其他调节因子一起对生理条件下的血管功能进行调控。

对 DHEA 作用受体机制的研究还表明,由于 DHEA 在体内是性激素的前体物质,它可能转化为睾酮和雌激素而发挥其生物学效应^[5],DHEA 的作用也可能通过直接与细胞上特异性位点相结合而引发,与其在外周组织的代谢、转化无关^[6]。我们的实验证实(资料未列出)DHEA 也不大可能通过雌激素受体通路发挥其生物学效应。

【参考文献】

- [1] Bernini GP, Sgro' M, Moretti A, et al. Endogenous androgens and carotid intimal-medial thickness in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84(6): 2008-2012.
- [2] Okamoto K. Distribution of dehydroepiandrosterone sulfate and relationships between its level and serum lipid levels in a rural Japanese population [J]. *J Epidemiol*, 1998; 8(5): 285-291.
- [3] 阮骊韬, 曹铁生, 段云友. 同型半胱氨酸对体外人脐静脉内皮细胞 ET 的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2002; 23(22): 封 2. Ruan LT, Cao TS, Duan YY, et al. The changes of ET in cultured HUVEC with Hcy in different concentration [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002; 23(22): Cover 2.
- [4] Walia M, Kwan CY, Grover AK. Effects of free radicals on coronary artery [J]. *Med Princ Pract*, 2003; 12(1): 1-9.
- [5] Hayashi T, Esaki T, Muto E, et al. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: The possible role of nitric oxide [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20(3): 782-792.
- [6] Furutama D, Fukui R, Amakawa M, et al. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by dehydroepiandrosterone sulfate [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998; 1406(1): 107-114.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)20-1845-01

声学造影在介入性超声定位中的应用

曹晓桦 陈春艾 史亚军

(解放军第 157 医院超声科 广东 广州 510510)

【关键词】声学造影 介入性超声 定位

【中图分类号】R692.5 【文献标识码】B

1 临床资料 我科行介入性超声操作患者 55 例,其中肾囊肿 16 例,肝囊肿 10 例,肾穿刺造影 8 例,肝脓肿 8 例,肝癌 < 3 cm 5 例,心包积液 8 例。采用东软 NAS2000a、ATL 超 9-HDI 彩超诊断仪及其配套的穿刺导架,探头频率 3~7 MHz、2~4 MHz。采用日本八光 18~23 G EV 针或 21~23 G PTC 针。造影剂液体采用 500 g/L 葡萄糖注射液或生理盐水注射液,气体采用一次性注射器内少量残留无菌气体。方法参见文献 [1],当注入上述配制的造影剂 2 mL 时,二维超声见喷射样高回声光束,其喷射点即是针尖位置(图 1)。彩色多普勒则显示为明亮喷射样彩流束,能清晰显示喷射点即针尖位置。此外通过观察造影剂分布,也有助于针尖位置的确定。上述病例介入操作中,针尖显示较清晰 17 例,显示模糊不清 16 例,不能显示 22 例,采用声学造影全部病例均能清晰显示喷射点位置。在显示清晰的病例中,同样注入造影剂,其喷射点位置与针尖位置完全相符。在针尖不能显示或显示模糊不清的病例中,采用本方法,并据此对针尖位置做出调整,都能准确到达目的点,达到满意的诊治效果,无一例因声学造影而造成并发症。



图 1 箭头所指亮点为针尖位置,即造影剂喷射点

2 讨论 超声引导下穿刺针针尖显示主要是通过增加针尖表面粗糙程度或是刻痕,增强回声显示效果,基本声学原理尚不很清楚。这种方法易对软组织促成损伤,还有一种带闪光针尖,专为超声显像用的穿刺针,效果虽好,但价格昂贵。我们的声学造影方法简便、易行,实践证明这种方法安全、实用,提高了介入操作的准确性和成功率。

【参考文献】

- [1] 罗支农. 经静脉手振 50% 葡萄糖氟碳微泡能量多普勒增强造影在附件区肿块诊断中初步应用 [J]. *中国超声医学杂志*, 1999; 15(10): 74-75.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-08-15; 修回日期 2004-09-20

作者简介:曹晓桦(1956-),女(汉族),山东省龙口市人,副主任医师。

Tel. (020) 61657143