

作用。

关键词: 眼镜蛇毒 直接溶解因子 细胞内游离钙 人肝癌细胞株 粘附式细胞仪

参 考 文 献

- [1] 李秋菊等, 1991, 动物学杂志, 26(1): 49-52.
- [2] 关永源等, 1990, 中国药理学通报, 6(5): 296-299.
- [3] 张薇等, 1994, 第一军医大学学报, 14(1): 43-45.
- [4] 顾本贤等, 1989, 生物化学与生物物理学报, 21(1): 27-33.
- [5] Huang SJ et al., 1996, *Life science*, 59(4): PL55-60.
- [6] Huang SJ et al., 1996, *Res Commun Molecular Pathol Pharmacol.*, 94(2): 103-110.
- [7] Fletcher JE et al., 1993, *Toxicon*, 31(6): 669-695.
- [8] Schanne FAX et al., 1979, *Science*, 206(4419): 700-702.
- [9] 龚海云等, 中国病理生理杂志, 1998, 14(1).

EFFECT OF DIRECT LYTIC FACTOR FROM NAJA NAJA ATRA VENOM ON INTRACELLULAR FREE CALCIUM DYNAMIC CHANGES IN HUMAN HEPATIC CANCER CELL LINE

GONG Hai Yun LE Yi* YU Qing Sheng GUAN Jing Xia

(Guangzhou Research Institute of Snake Venom, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182,

*Department of Biochemistry, First Military Medical University, Guangzhou)

ABSTRACT

The free calcium in human hepatic cancer cell line H₇₄₀₂ was labelled with fluorescent dye Fluo-3 and its dynamic changes were observed by using Adherent Cell Analysis and Sorting Cytometer 570 (ACAS 570). When the cells were in a calcium-free environment, the level of intracellular Ca²⁺ elevated rapidly after the stimulation of direct lytic factor (DLF). When it reached the peak, then soon decreased. The level of intracellular Ca²⁺ elevated constantly after the stimulation of DLF when 1 mmol/L CaCl₂ was added into the culture dish. No obvious elevation could be seen in the level of intracellular Ca²⁺ after the stimulation of DLF when 10 mmol/L CaCl₂ was added into the culture dish. The results show that DLF can cause intracellular Ca²⁺ release and extracellular Ca²⁺ influx, and the effect of the elevation of intracellular Ca²⁺ caused by DLF can be blocked by high level of extracellular Ca²⁺ concentration.

Key words: Cobra snake venom Direct lytic factor Intracellular free calcium Human hepatic cell line Adherent cell analysis and sorting cytometer

NO 供体(SIN-1)损伤内皮细胞的实验研究*

杨自力 白涛 吴恒义

(广州军区总医院危重病研究所 广州 510010)

王正国 朱佩芳

(第三军医大学野战外科研究所 重庆 400042)

研究表明,一氧化氮是一种活性很强的自由基,具有广泛的生物学作用,既是细胞信使分子,又是细胞毒性分子^[1]。一氧化氮作用的多样性,决定了其在内皮细胞损伤中的复杂性。炎性刺激下内皮细胞产生大量 NO,可与超氧阴离子(O₂⁻)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

主要机制^[2]。研究一氧化氮对内皮细胞的毒性作用有助于进一步探讨内皮细胞的损伤机制。

材 料 和 方 法

一、主要材料与试剂

* 国家、广东自然科学基金资助项目。

胰蛋白酶(GIBCO, 1:250 USA), RPMI-1640(GIBCO, USA), SIN-1(受赠于第三军医大学高原研究室王培勇博士), SOD, CAT(SIGMA, USA), VIII因子相关抗原抗体及其试剂盒(福建迈新生物技术开发公司), 其他试剂均为国产或进口AR级, 所用培养器皿为COSTAR产品, 所有脐带为我院妇产科提供。

二、静脉血管内皮细胞(HUVEC)培养及鉴定^[3]

常规培养人脐静脉内皮细胞。调整细胞浓度为 $1-2 \times 10^5/\text{ml}$, 采用贴壁后生长稳定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(见图版图1)。显微镜下可见内皮细胞正常生长情况(见图版图2)。

三、指标测定

1. 乳酸脱氢酶(LDH)测定 按常规生化法。
2. 死亡细胞计数 常规台盼蓝染色。每个样本任取4个视野, 计数死亡细胞, 取其均值(镜下放大倍数为40倍)。

四、分组

贴壁后生长稳定的HUVEC分为以下两大组:

1. 不同浓度SIN-1对HUVEC的损伤:
 - (1) 正常对照组; (2) SIN-1(50 $\mu\text{mol/L}$)组; (3) SIN-1(100 $\mu\text{mol/L}$)组; (4) SIN-1(500 $\mu\text{mol/L}$)组。
2. 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)对SIN-1损伤HUVEC的保护作用:

选择500 $\mu\text{mol/L}$ SIN-1继续实验, 分为下列各组:

表1 不同浓度SIN-1对内皮细胞的损伤作用

	n	死亡细胞数/视野	LDH活性(U/ml)
正常对照组(C)	6	9.25±3.25	22.63±14.56
SIN-1(50 μM)组	6	11.31±4.52	27.15±15.47
SIN-1(100 μM)组	6	46.53±15.47+++	164.59±42.13+++
SIN-1(500 μM)组★	6	128.76±46.18+++**	372.67±141.30+++**

++ $P < 0.01$ vs C; ### $P < 0.01$ vs SIN-1(50 μM); ** $P < 0.01$ vs SIN-1(100 μM).
★组为共用数据。

表2 SOD、CAT对内皮细胞的保护作用

	n	死亡细胞数/视野	LDH活性(U/ml)
正常对照组(C)	6	9.25±3.25	22.63±14.56
SIN-1组★	6	128.76±46.18+++	372.67±141.30+++
SIN-1+SOD组	6	56.45±26.59+++	136.16±42.38+++
SIN-1+CAT组	6	72.67±31.69+++*	184.12±56.19+++**
SIN-1+SOD+CAT	6	15.86±10.62###**	27.86±17.18###**

++ $P < 0.01$ vs C; ### $P < 0.01$ vs SIN-1; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SIN-1+SOD.
★组为共用数据。

讨 论

研究表明, 一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一

- (1) 正常对照组; (2) SIN-1(500 $\mu\text{mol/L}$)组; (3) SIN-1+SOD组(SIN-1和SOD终浓度分别为500 $\mu\text{mol/L}$ 和50u/ml); (4) SIN-1+CAT组(SIN-1和CAT终浓度分别为500 $\mu\text{mol/L}$ 和50u/ml); (5) SIN-1+SOD++CAT组(SIN-1、SOD、CAT终浓度分别为500 $\mu\text{mol/L}$ 、50u/ml、50u/ml)。

以上各组经4小时培养后, 终止培养, 收集上清液待测, 同时用0.4%台盼蓝染色细胞。

五、统计学处理

所有数据以均数±标准差表示, 并用EXCEL软件进行t检验分析。

结 果

HUVEC加入低浓度SIN-1(50 $\mu\text{mol/L}$)后, 上清LDH活性及死亡细胞数未有明显改变; 加入中浓度(100 $\mu\text{mol/L}$), 高浓度(500 $\mu\text{mol/L}$)SIN-1后, 死亡细胞数, LDH活性急剧升高($P < 0.001$), 其中与中浓度相比, 高浓度SIN-1能导致更加严重的内皮细胞死亡及LDH活性急剧升高($P < 0.01$)。SOD、CAT均能保护内皮细胞, 减少死亡细胞数($P < 0.01$), 降低LDH活性($P < 0.01$)。SOD、CAT合用, 比单独使用SOD、CAT的保护作用更加明显($P < 0.01$)(见表1, 表2)。

种具双重作用的信使分子和毒性分子^[1]。NO在体内以L-精氨酸作为底物, 在一氧化氮合成酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)催化下反应

而成,1987年Palmer^[4]证实了在血管内皮亦存在这一新的L-精氨酸代谢途径。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导型一氧化氮合成酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)活性,又存在原生型一氧化氮合成酶(Constitute Nitric Oxide Synthase)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主要作用。

生理情况下,内皮细胞持续小量释放NO,这对维持血管内皮细胞的功能具有重要意义^[5]。当内皮细胞受到强烈的炎性刺激时,可诱导i-NOS mRNA表达,结果是NO的大量合成,从而造成对组织细胞的毒性损伤。NO的毒性作用主要缘于它的自由基活性。NO分子中,N原子外层有五个电子,O原子外层有六个电子,形成共价键后,在分子轨道上含有一个不成对电子,它极不稳定,与氧易反应生成NO₂,NO₂也是自由基;NO还可以与O₂反应生成过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻),质子化后很快分解生成·OH和NO₂·自由基,它们还可以相互反应,生成一系列具有重要生物功能的自由基和硝基化合物^[6]。

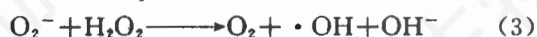
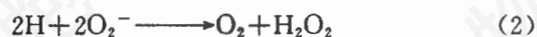
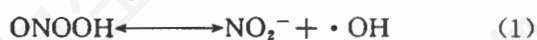
Kooy^[7]的实验表明培养内皮细胞产生的NO与同时产生的O₂⁻进一步反应生成ONOO⁻,从而导致内皮细胞损伤。培养体系中加入SOD及NO抑制剂L-NAME后,可抑制ONOO⁻的产生,其中L-NAME的这种作用能被L-Arg逆转(D-Arg则不能)。在培养体系中加入ONOO⁻抑制剂(如半胱氨酸,蛋氨酸,尿酸盐)可显著抑制O₂⁻的毒性作用,说明NO自由基和O₂⁻自由基互相作用,加重细胞损伤。

LDH是反映细胞膜损伤比较敏感的指标之一。实验结果表明,低浓度(50μmol/L)SIN-1不对内皮细胞构成损害;中(100μmol/L)、高(500μmol/L)浓度SIN-1能迅速造成程度不同的内皮细胞损害,浓度越高,内皮细胞损伤越严重;加入SOD和/或CAT后,能降低SIN-1对内皮细胞的损害,对内皮细胞具一定的保护作用。

用。

SIN-1是NO供体,遇水迅速分解成NO·和O₂⁻,后两者迅速作用生成ONOO⁻,然后再进一步生成NO₂·和·OH。(见反应1)从自由基分子毒理学的角度来看,虽然O₂⁻和NO都是自由基,但两者的氧化性并不很强,细胞毒性也不十分明显,但ONOO⁻在酸性条件下分解生成细胞毒性更强的·OH和NO₂·。

在水溶液中,O₂⁻既可作为还原剂供给电子,又可作为氧化剂接受电子,因此易于歧化生成H₂O₂(反应2);同时O₂⁻能进一步与反应生成的H₂O₂作用生成·OH(反应3),O₂⁻对内皮细胞的损害主要是通过·OH自由基来实现的·OH,CAT的作用是清除反应生成的H₂O₂(反应4)。



就本实验而言,SOD对内皮细胞的保护机制主要是涉及两个方面。一是SOD清除O₂⁻,使·OH减少,从而减轻O₂⁻对内皮细胞的损害;另一方面,由于O₂⁻被清除,ONOO⁻生成减少,从而使内皮细胞损伤减轻。究竟谁为主?谁为次呢?在本实验中,加入CAT,使H₂O₂被迅速清除,H₂O₂与O₂⁻反应生成的·OH急剧减少,使O₂⁻的毒性作用不能发挥。结果表明,SOD对内皮细胞的保护作用远远大于CAT的保护作用,提示SOD保护内皮细胞更多是通过减少ONOO⁻的产生来完成的。但CAT并不直接影响O₂⁻的含量。本实验间接证明,NO和氧自由基形成ONOO⁻是NO损伤内皮细胞的机制之一。

摘 要

选择体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象,研究了不同浓度NO供体

SIN-1 (3-morpholinodnonimine)对内皮细胞的作用以及 SOD、CAT 对内皮细胞的保护作用。结果提示:高浓度 SIN-1 可严重损伤内皮细胞;SOD、CAT 能协同减轻 NO 对内皮细胞的损伤,说明 ONOO⁻的产生可能是 NO 损伤内皮细胞的重要机制。

关键词: SIN-1 内皮细胞 一氧化氮

参 考 文 献

[1] Garthwaite J, et al., 1988, *Nature*, 336:385

-388.

[2] 杨自力等,1997,第三军医大学学报,19(3):202-203.

[3] 安静,1990,第三军医大学学报,12(3):222-224.

[4] Palmer RMJ, et al., 1987, *Nature*, 327:524-529.

[5] Forstermann U, et al., 1994, *Hypertension*, 23(pt2):1121-1131.

[6] Royall JA, et al., 1995, *New Horiz*, 3(1):113-122.

[7] Kooy NW, et al., 1995, *AmJ Respir Crit Care Med*, 151(4):1250-1254.

THE STUDY OF DAMAGES OF NO DONOR (SIN-1) ON ENDOTHELIAL CELL

YANG Zi Li WANG Zhen Guo* ZHU Pei Fang* BAI TAO WU Heng Yi

(Critical Care Institute Liuhuaqiao Hospital, Guangzhou 510010,

*The third army medical college)

ABSTRACT

The different effect of SIN-1 with different concentration and the protect effect of SOD and CAT on endothelial cells were studied in this paper. It was found that high-dose, rather than low dose of SIN-1 could induce severe endothelial cells injury, which might be related to the formation of ONOO⁻.

Key words: SIN-1 Endothelial Cell Nitric Oxide

*The Project was Supported by National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能及其影响因素

于力方 陈香美 程庆砾 傅 博

(全军肾脏病研究重点实验室 解放军总医院肾内科 北京 100853)

细胞间隙连接是毗邻细胞间跨膜离子及低分子的通道,其在维持细胞间信息的传递、调节细胞增殖、分化及组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用^[1]。已有的研究证实血管紧张素Ⅰ可以诱导肾小球系膜的增殖、肥大,进而引起肾小球系膜区的病变,最终可导致肾小球的硬化^[2-3],那么外来或系膜细胞局部分泌产

生的血管紧张素Ⅰ对系膜细胞的刺激信号是如何在细胞间进行传导的呢?肾小球系膜细胞间隙连接的信号传递功能在这一过程中的作用如何?间隙连接的通讯功能是否可以被药物抑制或阻断?为此,我们利用激光扫描共聚焦显微镜及荧光漂白回复技术对体外培养的肾小球系膜细胞的间隙连接通讯功能进行了研究。