

## 下丘脑、垂体条件培养基对培养的血管内皮细胞 一氧化氮和脂过氧化物代谢的影响

魏波, 吴开云

(江西医学院人体解剖学教研室, 南昌 330006)

[主题词] 动脉粥样硬化; 下丘脑; 脑垂体; 内皮, 血管; 一氧化氮; 脂质过氧化; 联胺

[摘要] 为了探讨下丘脑-垂体内分泌轴对动脉粥样硬化形成的影响。取 5 个月龄水囊引产胚胎的完整下丘脑和垂体组织分别进行细胞培养, 并按下丘脑、垂体和下丘脑+垂体 3 组收集条件培养基。用其条件培养基分别培养加联胺诱导的和未加联胺诱导的内皮细胞, 检测其内皮细胞上清液中的一氧化氮和脂过氧化物的含量变化, 力求阐明下丘脑-垂体内分泌轴在动脉粥样硬化形成中对内皮细胞的影响及调控作用。结果发现, 在无联胺诱导下, 用单纯下丘脑、垂体条件培养基分别作用时, 内皮细胞上清液中的丙二醛含量比用下丘脑+垂体条件培养基作用时升高 ( $P < 0.01$ ), 一氧化氮的含量则三个实验组比对照组明显减少 ( $P < 0.05$ ); 当用联胺诱导内皮细胞时, 下丘脑+垂体条件培养基可使内皮细胞上清液中的丙二醛明显下降, ( $P < 0.05$ ), 单纯下丘脑、及单纯垂体虽也使丙二醛水平有所下降, 但无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 一氧化氮的含量三组均升高, 但以丘脑+垂体组最为明显 ( $P < 0.01$ )。本实验结果提示: 下丘脑-垂体轴的完整性对维持正常内皮细胞的一氧化氮和丙二醛代谢功能具有重要作用, 内皮细胞受到外来伤害性刺激时, 下丘脑和垂体两水平表现出明显的保护性调控作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Influence of the Conditioned Media of Cultured Hypothalamus and Pituitary Tissue on the Metabolism of Nitric Oxide and Lipid Peroxide of Cultured Endothelial Cells

WEI Bo, and WU Kai Yun

(Department of Anatomy, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

MeSH Atherosclerosis; Hypothalamus; Pituitary; Endothelium, Vascular; Nitric Oxide; Lipoperoxide; Diamide

**ABSTRACT** **Aim** To investigate whether hypothalamus-pituitary neuroendocrine pathway influenced the development of atherosclerosis. **Methods** The hypothalamic and pituitary tissue from freshly aborted 5-month human fetuses were taken for cellular culture and the condition media were collected respectively according to hypothalamus, pituitary and hypothalamus+ pituitary groups. The normal endothelial cells and those induced by diamide were cultured respectively with the condition media and the control group with ordinary medium. After culturing with the condition media, all endothelial cells of the experimental and control groups were cultured in serum-free medium. Then collected the serum-free media of the EC separately and detected their content of lipid peroxide and nitric oxide. **Results** The pure hypothalamus or pituitary group had intensive effect of lipid peroxidation on endothelial cells and did not affect the release of nitric oxide from endothelial cells when the pure hypothalamus or pituitary conditioned media were used. The content of lipid peroxide in hypothalamus + pituitary group was significantly lower than that in other experimental groups (hypothalamus group and pituitary group), but the nitric oxide showed an inhibited function. However, the hypothalamus+ pituitary group performed an anti-lipid peroxidation function to the endothelial cells induced by diamide and an increased releasing of nitric oxide. **Conclusion** From the result we deduced that the hypothalamus may play a significant role in keeping normal function of the endothelial cells, and the effect may be through the hypothalamus-pituitary pathway. When meeting with the harmful factors it can play a protective role in maintaining the function of endothelium.

[基金项目] 国家自然科学基金(39660031)及江西省自然科学基金资助项目

[作者简介] 魏波, 男, 汉族, 1970 年 7 月出生, 山东省日照市人, 江西医学院神经解剖学专业硕士研究生毕业, 现在湖南医科大学在读博士生。吴开云, 男, 汉族, 1954 年 11 月出生, 江西安福县人, 北京医科大学硕士研究生毕业, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: “下丘脑神经内分泌中枢对动脉粥样硬化形成的影响及调控研究”。

我们以前的工作证实,损伤大鼠下丘脑弓状核区,可诱发动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的早期病理变化,如内皮细胞(endothelial cell, EC)变性、核肿胀、内皮下层增厚、平滑肌向内皮下层迁移等形态学改变<sup>[1,2]</sup>,而与As形成密切相关的物质如总胆固醇、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)和脂过氧化物(lipid peroxidant, LPO)升高,一氧化氮(nitric oxide, NO)则减少<sup>[3,4]</sup>。这些研究结果基本证实下丘脑对As的形成有重要影响,但这种作用是否通过下丘脑-垂体途径实现的,还难以肯定。因此本文用人胚胎下丘脑和垂体组织作体外细胞培养,并收集其条件培养基作用于正常及用联胺诱导的EC后,检测其培养基中NO和丙二醛的变化,为进一步探讨下丘脑-垂体轴在As形成过程中的影响及调控作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人5个月龄水囊引产胚胎,人脐静脉内皮细胞(细胞株 ECV-304,购自上海细胞生物研究所),小牛血清,胰蛋白酶,DMEM、MEM 和 RPMI1640 培养基,NO 试剂盒、丙二醛试剂盒(均购自南京建成生物研究所)等。

### 1.2 下丘脑、垂体细胞的培养及条件培养基的制备

参照文献[5,6],在无菌条件下,取人胚胎完整下丘脑和垂体组织,用无血清 RPMI1640 培养基洗涤血迹,去除表面血管,将组织块剪碎后分别加入胰蛋白酶使其终浓度为 0.125%,置 37℃温箱中消化约 5 min,用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基终止其消化、100 目铜网过滤,离心后,用含 20% 小牛血清的 DMEM 液悬浮细胞,计数后将细胞悬液分别移入 30 mL 的细胞培养瓶内,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下中静置培养,每天观察细胞的生长情况,待细胞汇合后,开始按下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体 3 组分别收集其 24 h 培养基,作为条件培养基,离心 10 min 去除细胞碎片, - 70℃ 保存。

### 1.3 实验步骤

将传代培养的人脐静脉内皮细胞按  $1 \times 10^8$  个/L 培养于 24 孔培养板中,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h 后,将细胞分成两大组,每大组 32 孔,每一大组又分为 3 个实验组和 1 个对照组,每组 8 孔。第一大组中的 3 个实验组分别加入条件培养基 0.5 mL 和 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL,对照组加无

血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL 和 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 28 h 后,全部弃其培养基,换无血清 MEM 培养基继续培养 36 h 后,收集培养基作 NO 和丙二醛检测。第二大组中 3 个实验组分别加入条件培养基 0.5 mL 和 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL,对照组加无血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL 和 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基 0.5 mL,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后,各组加入联胺使其终浓度为  $0.6 \times 10^{-4}$  mol/L<sup>[7]</sup>,作用 4 h 后,全部弃其培养基,各组同时换无血清 MEM 培养基继续培养 36 h 后,收集 MEM 培养基作 NO 和丙二醛含量检测。

### 1.4 一氧化氮和丙二醛测定

每组 8 个样本均测定 NO 和丙二醛的含量,测定步骤按 NO 和丙二醛试剂盒操作说明进行,最后用 721 型分光光度计在 550 nm 波长测 NO 吸光度,在 532 nm 波长测丙二醛吸光度。根据公式:

$$\text{NO } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times 100 \mu\text{mol} \times \text{样品稀释倍数}$$

换算出 NO 含量。

$$\text{丙二醛 } (\text{nmol/L}) = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times 10 \text{ nmol/L} \times \text{样品稀释倍数}$$

换算出丙二醛含量。

### 1.5 统计学分析

本实验属析因设计,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据用 SAS 软件作方差分析, *F* 检验。

## 2 结果

### 2.1 下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体条件培养基对内皮细胞脂过氧化物代谢的影响

下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体条件培养基作用各实验组 EC 后其丙二醛的含量变化见表 1 (Table 1),从表 1 (Table 1) 可以看出,联胺诱导可使 EC 加重其脂质过氧化作用,在无联胺诱导的情况下,用单纯下丘脑、单纯垂体条件培养基作用于 EC 后,其丙二醛水平高于下丘脑+ 垂体组,说明单纯下丘脑或单纯垂体条件培养基也有加重 EC 的脂质过氧化作用;当用联胺诱导时,EC 的丙二醛水平不但没有升高,反而有所下降,其中下丘脑+ 垂体组下降更为明显 ( $P < 0.01$ )。此结果提示,下丘脑-垂体轴的完

整对内皮细胞的脂质过氧化作用有重要影响,当 EC 受到联胺诱导时,下丘脑+ 垂体组对内皮细胞的脂质过氧化表现出下调作用。

表 1. 内皮细胞上清液中的丙二醛含量测定

Table 1. The MDA content in different serum-free media of EC ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

Groups	n	Norr Diamide	Diamide
Control	8	1.608 $\pm$ 0.216	2.272 $\pm$ 0.493 <sup>a</sup>
Hypothalamus (H)	8	2.204 $\pm$ 0.728 <sup>bc</sup>	1.778 $\pm$ 0.380 <sup>bc</sup>
Pituitary (P)	8	2.204 $\pm$ 0.728 <sup>bc</sup>	1.799 $\pm$ 0.331 <sup>bc</sup>
H+ P	8	1.611 $\pm$ 0.444	1.515 $\pm$ 0.093 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with norr diamide group. b:  $P < 0.05$ , compared with control group. c:  $P < 0.01$ , compared with hypothalamus+ pituitary group

## 2.2 下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体条件培养基对内皮细胞一氧化氮代谢的影响

下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体条件培养基作用 EC 后 NO 含量变化见表 2 (Table 2), 从表 2 (Table 2) 可见, 联胺诱导可使 EC 的 NO 代谢受到抑制, 在无联胺诱导下, 下丘脑、垂体和下丘脑+ 垂体组条件培养基分别作用实验组 EC 后, 其上清液中的 NO 含量较对照组有明显降低 ( $P < 0.05$ ), 说明在正常情况下, 下丘脑和垂体对内皮细胞 NO 的代谢是起抑制作用; 而当用联胺诱导 EC 时, 各实验组 NO 含量不但没有降低, 反而有所升高, 下丘脑+ 垂体组尤为明显 ( $P < 0.01$ )。结果提示: EC 受到联胺诱导伤害性刺激时, 下丘脑- 垂体水平可能通过上调内皮细胞 NO 的释放来起保护作用。

表 2. 内皮细胞上清液中的一氧化氮含量测定

Table 2. The NO content in different serum-free media of EC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu$ mol/L)

Groups	n	Norr diamide	DiamideK
Control	6	4.485 $\pm$ 1.249	3.195 $\pm$ 0.700 <sup>a</sup>
Hypothalamus (H)	6	1.206 $\pm$ 0.481	2.317 $\pm$ 0.394 <sup>b</sup>
Pituitary (P)	6	2.046 $\pm$ 0.749	2.710 $\pm$ 1.352
H+ P	6	1.675 $\pm$ 0.376	2.968 $\pm$ 1.119 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with control norr diamide group. b:  $P < 0.01$ , compared with experimental norr diamide group.

## 3 讨论

内皮细胞受损被认为是 As 的始发因素, 引起内皮细胞损伤的因素很多, 近年来, 内皮细胞脂质过氧

化损伤与 As 的关系日益受到重视。脂质过氧化是一种自由基介导的细胞损伤机制<sup>[8]</sup>, 正常情况下, 细胞内产生的自由基被细胞内抗氧化体系降解, 使细胞内氧化物及抗氧化物得以保持动态平衡<sup>[9]</sup>。用联胺诱导培养内皮细胞脂质过氧化的研究进一步表明, 内皮细胞脂质过氧化是通过诱导内皮细胞高表达血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 及内皮白细胞粘附分子 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1, ELAM-1), 从而增加单核细胞 (monocyte, MC) 及 T 淋巴细胞粘附, 并向内膜下迁移<sup>[7]</sup>, 促进内皮细胞损伤, 且 LPO 代谢终产物丙二醛能与膜蛋白发生交联反应, 使膜结构与功能受到极大损害, 也可造成内皮损伤。内皮细胞合成与释放 NO 是机体一种重要的内源性抗 As 机制, 它具有抑制多种白细胞对内皮的粘附, 平滑肌的增殖和迁移、血小板活化和聚集, 调节血管张力等多种作用。内源性抗 As 机制的减弱, 可能是促进 As 形成的另一重要因素。

神经因素在 As 形成中的影响也越来越被人们所关注。早在 60 年代就有实验证实, 电刺激实验动物的下丘脑外侧区, 能引起其血清胆固醇的升高, 主动脉呈现出 As 病变<sup>[10]</sup>。王天保等<sup>[11]</sup>也证实破坏家兔下丘脑, 可使冠状动脉粥样硬化加重。下丘脑分泌的垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenosine cyclase activation peptide, PACAP) 对高血脂引起的内皮细胞受损有直接保护作用, 可提高内皮细胞抗 As 能力<sup>[12]</sup>。Pozdniakow 等<sup>[13]</sup>认为, 调整神经内分泌的功能, 可降低脂质过氧化, 维持血脂的正常水平, 防止大动脉粥样硬化的发展。吴开云等<sup>[1,2]</sup>毁损大鼠下丘脑弓状核区可诱发 As 早期病理变化, 如内皮细胞的变性、坏死, 内皮下层增厚, 平滑肌向内皮下层迁移等形态学改变, 以及与 As 形成密切相关的物质如总胆固醇、oxLDL、LPO 升高, 而有抗 As 作用的 NO 则减少<sup>[3,4]</sup>, 这些变化与用药物诱发 As 病变极为相似; 在毁损弓状核诱发 As 后, 重新植入胚鼠弓状核可使 As 病灶得以逆转<sup>[14]</sup>。这些研究表明下丘脑对 As 的形成具有一定影响, 但这种影响是否通过下丘脑- 垂体轴来实现还不清楚, 本文是在此基础上, 用人胚胎下丘脑和垂体组织作细胞培养, 按单纯下丘脑、单纯垂体和下丘脑+ 垂体三组收集条件培养基, 用条件培养基培养正常内皮细胞及用联胺诱导的内皮细胞, 检测其培养基中 NO 和丙二醛含量变化, 来进一步探讨下丘脑- 垂体内分泌轴在 As 形成过程中的影响。结果表明: 在无联胺诱导的情况下, 单纯下丘脑和单纯垂体作用于内皮细胞后, 其丙二醛水

平高于下丘脑+垂体组;在用联胺诱导时,内皮细胞的丙二醛水平不但没有升高,反而有所下降,其中下丘脑+垂体组下降更为明显( $P < 0.01$ )。从结果的统计分析可以看出在正常情况下,下丘脑-垂体轴对内皮细胞的脂质过氧化没有表现出调控作用,单纯下丘脑或单纯垂体则表现出促进脂质过氧化作用,也就是说下丘脑-垂体通路受到破坏时,内皮细胞的氧化作用加重;当受到外来伤害性刺激时,下丘脑-垂体轴对内皮细胞的脂质过氧化有明显的下调作用。提示下丘脑-垂体轴的完整性对维持内皮细胞的正常功能和抗外来损伤作用具有重要意义。从NO结果来看,在正常情况下,下丘脑和垂体两水平对内皮细胞NO的代谢起抑制作用;当用联胺诱导内皮细胞时,下丘脑和垂体对内皮细胞NO的代谢却表现出上调作用,说明EC受到外来伤害性刺激时,下丘脑-垂体水平通过上调内皮细胞NO的释放,来起保护作用。提示这种调控作用可能是机体内源性保护机制的一个基础。但这一调控机理的具体路径还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 吴开云,熊俊平,李耀斌,等. 电解毁损弓状核对动脉粥样硬化的影响[J]. 中国学术期刊文摘,1998,4(10):1254-255
- [2] 吴开云,高摄渊. 切断下丘脑漏斗后对动脉壁的影响[J]. 解剖学报,1999,30(1):35-36
- [3] 吴开云,高摄渊. 毁损弓状核对总胆固醇、高密度脂蛋白、氧化性低密度脂蛋白的影响[J]. 中国学术期刊文摘,1998,4(10):1256-257
- [4] 吴开云,李耀斌,熊俊平,等. 毁损弓状核对一氧化氮和过氧化脂质的影响[J]. 中国学术期刊文摘,1998,4(10):1257-258
- [5] 洪庆涛,唐一鹏. 新生大鼠大脑皮层神经细胞的体外原代培养[J]. 神经解剖学杂志,1994,10(3):259
- [6] 华玥,吴希如. 大鼠胚胎大脑皮层神经细胞原代分离培养方法[J]. 北京医科大学学报,1984,18(4):288
- [7] 尹鸿操,陈铁真,董玉兰,等. 脂质过氧化对培养内皮细胞表达细胞粘附分子的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,1998,6(2):120-124
- [8] Cheeseman KM. Mechanisms and effects of peroxidation [J]. *Molec Aspects Med*, 1993, 14(2):191-197
- [9] Dargel R. Lipid peroxidation: a common pathogenetic mechanisms [J]? *Exp Toxic Pathol*, 1992, 14(4):169-181
- [10] Gunn CG, Friendmann M, Byers SO. Effect of chronic hypothalamic stimulation upon cholesterol induced atherosclerosis in the rabbit [J]. *J Clin Invest*, 1960, 39:1963-972
- [11] 王天保,周其善,唐秀梅,等. 破坏家兔下丘脑对实验性动脉粥样硬化的影响[J]. 中华心血管病杂志,1983,11(2):144-146
- [12] 常青. 垂体腺苷环化酶激活肽对血管壁成分的作用等机制的实验研究-PACAP与动脉粥样硬化关系探讨[J]. 生理科学进展,1997,78(2):132-134
- [13] Pozdniakow OM, Kobozeva LP, Michunskaia AB, et al. The correction of the pathological changes in the neuroendocrine system in hyperlipoproteinogenic microangiopathy [J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 1997, 2:9-11
- [14] 吴开云,高摄渊,熊俊平,等. 移植胚鼠弓状核细胞后对动脉粥样硬化形成的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2000,8(2):118-120

(此文2000-11-16收到,2001-08-23修回)

(此文编辑 胡必利)

(上接第⑤页)

1986年起相继承担国家“七五”、“八五”科技攻关项目,进一步就我国家族性高胆固醇血症的特点、发病机理、诊断和治疗方面,从整体、器官和细胞分子各个水平开展全方位深入研究。在国内最早制备成功载脂蛋白B-100单克隆抗体;在国际上首次采用人胎肝分离纯化LDL受体,成功制备高特异性单克隆抗体;完成对中国人LDL受体基因限制性片段长度多态性与血脂水平关系的分析研究、LDL受体基因表达调控和LDL受体基因cDNA在受体缺陷CHO细胞的表达研究;对我国10名FH纯合子患者LDL受体基因突变位点的分析结果表明我国FH患者LDL受体基因的突变类型与国外其他民族有异,一系列重要研究结果除国内杂志外,也发表于国外Arteriosclerosis、Atherosclerosis、BBA、Biochemistry和Hepatology等知名杂志,先后参加1988、1994和1997

年召开的第8、10、11届国际动脉粥样硬化学术会议和其他国际性学术会议交流。1986年获国家级有突出贡献专家称号,并获得了我国卫生部科技进步二、三等奖各一项(1985、1992年),国家教委科技进步二等奖一项(1996年),江苏省政府科技进步二等奖两项(1992、1997年)和三等奖三项(1986、1989、1992年)。与此同时,蔡教授积极领导和参加中国病理生理学会动脉粥样硬化专业委员会的工作,协力创办“中国动脉硬化杂志”,为我国动脉硬化研究事业作出了卓越贡献。

蔡海江教授的辉煌业绩是与她的刻苦和勤奋分不开的。“梅花香自苦寒来”是她人生经历的真实写照。

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心供稿)