论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1550-03

牛磺酸对肺动脉内皮和肺动脉平滑肌细胞增殖的双向调节作用

许蜀闽[1], 陈 莉[1], 刘 健[2], 王培勇[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038,[2]新桥医院心血管外科 ICU,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨肺动脉高压发生发展的细胞机制和牛磺酸对缺氧性肺动脉高压的防治作用。**方法** 体外培养新生雄性小牛肺动脉内皮细胞(PAECs)及肺动脉平滑肌细胞(PASMCs),用^{3}H-TdR 掺入法比较缺氧时 PASMCs 与 PAECs 的增殖情况,同时测定在培养液中加入牛磺酸后其增殖的改变。**结果** 2.5% O_2 和 <1% O_2 条件下培养 6~24 h,PAECs 的^{3}H-TdR 掺入量均显著低于常氧对照组(降低 15%~48%,$P<0.05$);而 PASMCs 于缺氧 12 h 后^{3}H-TdR 掺入量均显著高于常氧对照组(增加 19%~34%,$P<0.05$)。牛磺酸对细胞增殖的影响与浓度有关,高浓度(10~20 mmol/L)的牛磺酸抑制缺氧的内皮及平滑肌细胞的^{3}H-TdR 掺入,而低浓度的牛磺酸促进缺氧时 PAECs 的 ^{3}H-TdR 掺入($P<0.05$),抑制缺氧时 PASMCs 的^{3}H-TdR 掺入($P<0.05$)。**结论** 缺氧抑制内皮细胞的增殖而促进平滑肌细胞的增殖,适当的牛磺酸可以对抗缺氧对 PAECs 和 PASMs 的作用,减弱缺氧对 PAECs 的增殖抑制作用,抑制缺氧的促 PASMCs 增殖作用,使之接近常氧水平。

关键词: 牛磺酸;缺氧;肺动脉内皮细胞;肺动脉平滑肌细胞

中图法分类号: R322.121; R543.202; R977.4 **文献标识码**: A

Effect of taurine on proliferation of cultured pulmonary artery endothelial cells and pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia

XU Shu-min[1], CHEN Li[1], LIU Jian[2], WANG Pei-yong[1] ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, [2]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of taurine and hypoxia (2.5% O_2 or less than 1% O_2) on proliferation of bovine pulmonary artery endothelial cells (PAECs) and pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). **Methods** ^{3}H-TdR incorporation method was used to detect the proliferation of PAECs and PASMCs and the proliferation changes by adding taurine. The PAECs and PASMCs were respectively cultured under normoxia (21% O_2), hypoxia Ⅰ (2.5% O_2), hypoxia Ⅱ (less than 1% O_2) and the effect of hypoxia on the cell proliferation was observed in 6, 12, 24 h. Meanwhile, the two kinds of cells were cultured under normoxia + taurine (0, 2.5, 5, 10, 20 mmol/L), hypoxia Ⅰ + taurine, hypoxia Ⅱ + taurine. **Results** Taurine inhibited the proliferation of PAECs under normoxia in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Hypoxia Ⅰ and hypoxia Ⅱ inhibited the proliferation of PAECs significantly ($P<0.01$). Low dose of taurine (2.5, 5 mmol/L) attenuated the inhibitory effect of hypoxia on PAECs ($P<0.05$), but high dose of taurine (10, 20 mmol/L) inhibited PAECs proliferation under hypoxia ($P<0.01$). Taurine (2.5, 5 mmol/L) increased the ^{3}H-TdR incorporation of PASMCs, but taurine (20, 40 mmol/L) markly inhibited ($P<0.01$) under normoxia. Hypoxia Ⅰ and hypoxia Ⅱ stimulated proliferation of PASMCs ($P<0.01$). Taurine antagonized the proliferation of PASMCs under hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion** These results suggested taurine (2.5, 5 mmol/L) could stimulate the proliferation of cells that grow slowly and inhibit the proliferation of cells that grow fast, but taurine (>20 mmol/L) could inhibit the proliferation of both the cells that grow fast or slow, indicating that taurine may benefit in the prevention and treatment of hypoxic pulmonary hypertension.

Key words: taurine; hypoxia; pulmonary artery endothelial cells; pulmonary artery smooth muscle cells

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300147)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300147)

作者简介:许蜀闽(1972-),女,四川省广安市人,硕士,实验师,主要从事缺氧病理生理学与高原医学方面的研究。电话:(023)68752339-8209, E-mail:xsm@mail.tmmu.com.cn

通讯作者:王培勇,电话:(023) 68752339-8207, E-mail: pywang@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-09-26;**修回日期**:2006-04-06

急性和慢性缺氧均可导致肺动脉高压，其中肺血管收缩反应增强和肺血管结构改建（remodeling）是其主要血管变化特征，缺氧时肺动脉内皮细胞（pulmonary arterial endothelial cells，PAECs）的生长和功能变化在调节血管张力，各种血管活性因子分泌的内稳态及血管壁细胞的生长和结构改建中起重要作用，而缺氧时肺动脉平滑肌细胞（pulmonary arterial smooth muscle cells，PASMCs）的增生可能是导致肺动脉高压形成的重要环节之一。细胞在体的情况下受多种因素的影响，我们采用体外培养的 PASMCs 和 PACEs 细胞，比较缺氧对 2 种细胞的增殖影响，探讨肺动脉高压发生发展的细胞机制。同时，牛磺酸近年来被认为是一种具有多种生物学功能的含硫氨基酸，可以发挥抗心律失常、降血压和保护心肌等多种作用，并对细胞具有损伤保护作用[1]。牛磺酸是否能调节肺血管细胞的生长增殖，从而参与缺氧肺动脉高压肺血管结构改建过程的防治，尚少见报道。因此我们同时采用体外细胞培养给予牛磺酸的方法，观察其对缺氧肺动脉内皮细胞和肺动脉平滑肌细胞增殖的影响，探讨牛磺酸防治缺氧性肺动脉高压的可能性。

1　材料与方法

1.1　试剂

胰蛋白酶（Sigma），RPMI1640 培养基（JR SI USA），^{3}H-TdR（中国原子能科学研究所），牛磺酸（北京制药厂），其他试剂均为 AR 级。

1.2　PAECs 和 PASMCs 的培养鉴定

无菌条件下取新生公牛的肺动脉，PAECs 的培养采用胰蛋白酶消化法[2]，PASMCs 的培养用贴片法[3]，培养鉴定成功后选用 7～10 代生长良好的 PAECs 和 PASMCs 进行下述实验。

1.3　培养细胞的缺氧培养

由于缺氧培养箱无法达到 0% O_2，所以培养细胞的无氧培养在密闭的真空干燥器内进行，将容器内气体抽出至容器内压力为 200 mmHg，然后通入无氧气体平衡至 760 mmHg，如此抽气-充气反复数次，在实际应用中，若抽气-充气次数≥5，即可使容器内气体浓度接近通入气的浓度，如通入无氧气体并在容器底部加入连二亚硫酸钠溶液，容器内残存的氧能被降到接近无氧[4]，干燥器用乙醇擦拭消毒，气体平衡后放入恒温烤箱内保温。2.5% O_2 缺氧培养在缺氧培养箱中进行。

1.4　^{3}H-TdR 掺入的增殖分析

PAECs 和 PASMCs 按每孔 2 万细胞接种于 96 孔培养板，长成层后换含 1% 透析并灭活过的贫血小板血清 RPMI1640 培养基，分为常氧组（21% O_2）、缺氧 A 组（2.5% O_2）、缺氧 B 组（< 1% O_2），每组又通过 6、12、24 h 3 个时相点来观察缺氧的影响。另外，每组加入牛磺酸（0、2.5、5、10、20 mmol/L）观察 24 h。每组设 5 个样本，向培养液中加入 ^{3}H-TdR（4.625×10^4 Bq/ml），掺入 6 h 后，收集细胞，用 β-液体闪烁计数仪（Rack β LKB-1217，芬兰）测每分钟衰变数（dpm）。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Prism 统计软件行多因素方差分析和 FLSD 方差保护下的显著性检验。

2　结果

2.1　缺氧对 PAECs 和 PASMCs ^{3}H-TdR 掺入的影响比较

缺氧抑制 PASMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入，与常氧组比较，缺氧 A 组 6 h PASMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入受到抑制（$P<0.05$），缺氧 B 组 PASMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入受到显著抑制（$P<0.01$），12 h 后 ^{3}H-TdR 掺入量逐渐增多，其中缺氧 B 组较常氧组 ^{3}H-TdR 掺入量显著增加（$P<0.01$），至 24 h 末缺氧 B 组和缺氧 A 组均较常氧组的 ^{3}H-TdR 掺入量增多（$P<0.05$）；两缺氧组各时相点（6、12、24 h）PAECs 的 ^{3}H-TdR 掺入量均显著低于常氧组（$P<0.05$）（表 1）。

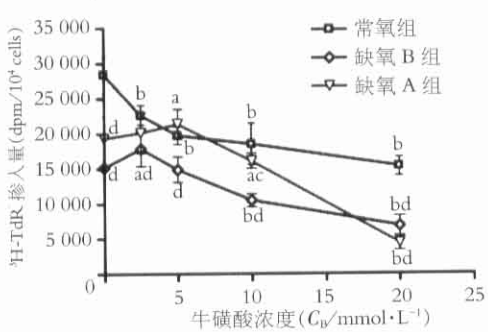
表 1　缺氧对 PAECs 和 PASMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入影响比较

组别	PASMCs ^{3}H-TdR 掺入（dpm/10^4 cell）			PAECs ^{3}H-TdR 掺入（dpm/10^4 cell）		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
常氧组	9 823 ± 54	9 037 ± 42	9 516 ± 65	24 735 ± 186	24 072 ± 198	28 483 ± 164
缺氧 A 组	8 234 ± 47[a]	8 671 ± 51	11 353 ± 43[a]	13 495 ± 123[b]	22 985 ± 135[a]	18 991 ± 132[b]
缺氧 B 组	6 649 ± 68[b]	12 041 ± 57[b]	12 754 ± 139[a]	20 947 ± 164[a]	18 257 ± 107[b]	14 930 ± 129[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与常氧组比较

2.2　牛磺酸对常氧和缺氧培养 PAECs ^{3}H-TdR 掺入的影响

牛磺酸能剂量依赖地抑制常氧 PAECs 的 ^{3}H-TdR 掺入（$P<0.05$），尤以高浓度时为明显。在缺氧 A 组和缺氧 B 组 PAECs 的增殖显著被抑制（$P<0.01$），而 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 浓度的牛磺酸能显著减弱缺氧 A 组和缺氧 B 组 PAECs 的增殖抑制作用（$P<0.05$），高浓度的牛磺酸则进一步显著地抑制缺氧 A 组和缺氧 B 组 PAECs 的 ^{3}H-TdR 掺入（$P<0.05$，$P<0.01$）（图 1）。

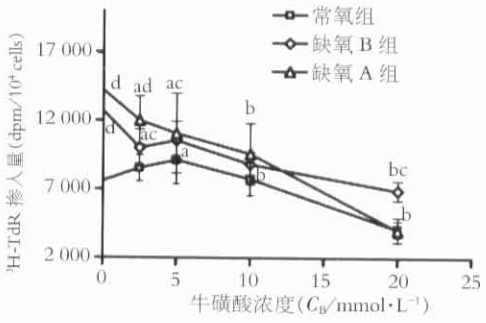


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与牛磺酸 0 mmol/L 比较；
c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与同浓度常氧组比较

图 1　牛磺酸对常氧和缺氧培养 PAECs 增殖的影响

2.3 牛磺酸对常氧和缺氧培养 PASMCs ^{3}H-TdR 掺入的影响

低浓度的牛磺酸(2.5 mmol/L 和 5 mmol/L)对常氧体外培养的 PASMCs 的^{3}H-TdR 掺入有一定的促进倾向作用,但差异无显著性。大于 20 mmol/L 浓度的牛磺酸则显著地抑制常氧 PASMCs 的^{3}H-TdR 掺入($P<0.01$)。缺氧 A 组和缺氧 B 组均显著地促进 PASMCs 增殖($P<0.01$),而牛磺酸能剂量依赖地拮抗缺氧 A 组和缺氧 B 组 PASMCs 的^{3}H-TdR 掺入的促进作用($P<0.05$, $P<0.01$);用量 10 ~ 20 mmol/L 浓度时,缺氧 PASMCs 的^{3}H-TdR 掺入基本恢复至常氧水平(图2)。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与牛磺酸 0 mmol/L 比较;
c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与同浓度常氧组比较

图2 牛磺酸对常氧和缺氧培养 PASMCs 增殖的影响

3 讨论

缺氧时肺动脉平滑肌细胞及内皮细胞发生的改变是肺动脉高压发生发展的细胞机制,在我们以前的研究中观察到缺氧时培养的肺动脉平滑肌及内皮细胞的生长特性、Ca^{2+}、cGMP 等信使分子、自分泌、旁分泌的血管活性物质都有发生改变。本研究观察比较了内皮及平滑肌细胞缺氧时的增殖情况,结果显示缺氧持续抑制内皮细胞的增殖,而平滑肌细胞的增殖在开始时受抑制,随时间的延长逐渐表现为刺激增生。这可能是内皮细胞分泌的一些扩血管因子减少的细胞机制及刺激细胞增生的细胞因子作用的结果。

针对肺动脉高压发生的细胞机制寻找另外的防治方法是崭新的思路。缺氧能损伤 PAECs 细胞膜[5],增加 PAECs 对 H_2O_2 损伤的敏感性[6],缺氧也能引起 PASMCs 胞内钙浓度的增加[3],可导致肺血管收缩反应性增强和肺小血管增殖肌化[7]。牛磺酸来源于食物,多以游离形式存在于所有动物细胞中,是机体内源性抗损伤物质,有调节细胞钙稳态(Ca^{2+} 调节双向作用),稳定细胞膜,清除自由基等多种细胞保护作用[1]。牛磺酸是否对缺氧 PAECs 和 PASMCs 产生细胞保护作用并调节其增殖,尚不清楚。

我们的实验观察到牛磺酸对细胞增殖调节具有双向调节作用。这表现在高浓度时对 PAEC 和 PASM 均表现为抑制增殖作用;在低浓度(2.5 ~ 10 mmo l/L)随情况不一而表现出不同的作用,这主要表现在常氧情况下:①对快速增殖的 PAECs 表现出剂量依赖性抑制增殖作用,对增殖较慢的 PASM 则有一定的促增殖倾向;②对抗缺氧对 PAEC 和 PASM 的影响:减弱缺氧对 PAEC 的增殖抑制作用,抑制缺氧的促 PASMCs 增殖作用,使之接近常氧水平。引起这种高低浓度作用效果不同的机制尚不清楚,可能与对胞内钙浓度的调节有关,研究表明高浓度的牛磺酸对高钾去极化诱发的[Ca^{2+}]升高有抑制作用,而低浓度牛磺酸则无此作用[8]。

缺氧对血管细胞(VEC 和 VSM)的影响是缺氧肺动脉高压(HPH)发生发展的关键环节,在 HPH 的防治方面,至今还没有突破性的预防和治疗措施。目前临床上仍然主要采用血管扩张药物治疗肺动脉高压,但存在肺血管选择性差,有毒副作用等特点。我们从细胞保护的角度选取牛磺酸进行研究,希望找到安全、有效、长期使用的药物来防治肺动脉高压。本研究表明牛磺酸能够在一定程度上对抗缺氧的不良影响,揭示牛磺酸对于高山病缺氧性肺血管收缩和血管结构改建的预防和治疗可能具有广阔的应用前景。此外,由于它能抑制过度增殖的细胞,推测其可用于肿瘤的治疗。

参考文献:

[1] HUXTABLE R J. Physiological actions of taurine[J]. Physiol Rev, 1992, 72(1): 101 - 163.

[2] 王培勇,孙秉庸. 培养的肺动脉内皮细胞生长及生化特性的初步观察[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(3): 212 - 213.

[3] 王培勇,孙秉庸. 缺氧对平滑肌细胞生长特性、细胞内游离钙及环磷酸腺苷浓度的影响[J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(1): 11 - 14.

[4] 许蜀闽,王培勇,马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359 - 360.

[5] BLOCK E R, PATEL J M, EDWARDS D. Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes[J]. Am J Physiol, 1989, 257(2 Pt 1): C223 - C231.

[6] BHAT G B, TINSLEY S B, TOLSON J K, *et al*. Hypoxia increases the susceptibility of pulmonary artery endothelial cells to hydrogen peroxide injury[J]. J Cell Physiol, 1992, 151(2): 228 - 238.

[7] HUREWITZ A N, BERGOFSKY E H. Pathogenetic mechanisms in chronic pulmonary hypertension[J]. Heart Lung, 1986, 15(4): 327 - 335.

[8] 康 毅,林 静. 牛磺酸对大鼠心肌细胞内钙浓度的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 169, 185.

(编辑 王 红)