doi:10.11659/jjssx.04E016053

CaSR 在大鼠血管收缩/舒张反应性调节中的作用

彭小勇,李 涛,刘良明,杨光明 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

[**摘 要**] **目的** 研究钙敏感性受体(CaSR)激动剂对大鼠肠系膜动脉收缩和舒张反应性的影响、以及内皮在其中的作用。**方法** 采用内皮完整和内皮去除的大鼠肠系膜动脉,观察 CaSR 特异性激动剂 cinacalcet 对血管基础张力和预收缩的血管张力的影响、以及不同剂量 cinacalcet 预处理对去甲肾上腺素(NE)诱导的血管收缩反应性和乙酰胆碱诱导的舒张反应性的影响。**结果** CaSR 激动剂 cinacalcet 对静息状态下内皮完整和内皮去除的血管基础张力均无明显影响。在内皮完整的血管环,cinacalcet 对预收缩血管有明显的舒张作用,并呈剂量依赖性;内皮去除取消了 cinacalcet 的舒张作用。Cinacalcet 预处理 30 min,使内皮完整的血管的收缩反应性明显降低,而对舒张反应性无明显影响。对去除内皮的血管环,cinacalcet 预处理对血管收缩/舒张反应性均无明显影响。**结论** CaSR 在血管收缩反应性调节中有重要作用,并有明显的内皮依赖性。

[**关键词**] 钙敏感性受体;cinacalcet;内皮;收缩反应性;舒张反应性

[**中图分类号**] R392 [**文献标识码**] A [**收稿日期**] 2016-04-13

Effects of CaSR on vascular relaxation/constriction in rats

PENG Xiao-yong, LI Tao, LIU Liang-ming, YANG Guang-ming (Second Laboratory, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medial University, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of calcium sensing receptor (CaSR) on vasorelaxation/vasoconstriction of superior mesenteric artery (SMA) in rats and its relationship to endothelium. **Methods** With endothelium-intact and endothelium-denuded SMA rings of rats, the effects of CaSR-specific allosteric modulator cinacalcet on the SMA rings pre-contracted with norepinephrine (NE), and vascular contractile response/relaxation reactivity were observed. **Results** Cinacalcet had no effects on resting tension of SMA rings with or without endothelium. Cinacalcet caused a significant relaxation in the endothelium-intact SMA rings pre-contraction with NE in a dose-dependent manner. Endothelium denudation abolished cinacalcet-induced vasorelaxation. Pretreatment with cinacalcet for 30 minutes decreased the contractile response of endothelium-intact SMA rings to NE, but had no significant influence on relaxation reactivity. In the endothelium-denuded SMA rings, cinacalcet did not affect both vasoconstriction and vasorelaxation. **Conclusion** CaSR plays an important role in the regulation of the vascular reactivity, and this effect is endothelium-dependent.

Keywords: calcium sensing receptor; cinacalcet; endothelium; vasoconstriction; vasorelaxation

钙敏感受体(Calcium-sensing receptor, CaSR)属于 G 蛋白耦联受体 C 家族,Brown 等[1]在 1993 年首次从牛的甲状旁腺细胞中克隆到了 CaSR。随后的研究发现 CaSR 具有多种生物学作用,包括调节全身钙平衡、激素分泌、基因表达、细胞增殖、分化和凋亡等[2]。从 2003 年 Wang 等[3]第一次证实心肌细胞中有功能性的 CaSR 表达以来,CaSR 在心血管系统中的作用得到了广泛的关注。但是,CaSR 对血管功能的调节作用目前尚不完全清楚,现有研究报道的结果也相互矛盾[4-6]。为此,本研究采用 CaSR 特异性的激动剂 cinacalcet,观察 cinacalcet 对内皮完整和内皮去除的大鼠肠系膜动脉的收缩/舒张反应性的影响,以及对基础血管张力和预收缩的血管张力的作用。

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81571886);军队医学科技青年培育项目(13QNP118);教育部留学回国人员科研启动基金(2014)

[**通信作者**] 杨光明,E-mail:yanggm971@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

80 只 SD 大鼠,雌雄各半,体质量 170~210 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 去除内皮血管环的制备及验证

戊巴比妥钠麻醉大鼠,开腹暴露出腹主动脉及肠系膜动脉,在肠系膜动脉远端 2~3 级分支处用眼科剪剪断,用小动脉夹夹闭腹主动脉近心端,用 1 mL 注射器抽取 1% 的 Triton X-100 溶液,针头刺入腹主动脉远心端,将 Triton X-100 溶液匀速推注入血管,此时液体将主要通过肠系膜动脉、并从其远端分支断端流出,处理过程约 10 s,然后再推注 5 mL 生理盐水,以排出 Triton X-100 溶液。随后分离肠系膜动脉,制成长约 2~3 mm 的血管环。将血管环挂于恒温离体器官灌流浴槽中,按本实验室常规技术测定血管环张力[7]。乙酰

胆碱(Ach)检验内皮是否去除:血管环充分平衡后,加入去甲肾上腺素(norepinephrine,NE) 10^{-6} mol/L 诱导收缩,待收缩曲线升至平台期后加入 Ach 10^{-5} mol/L,记录张力变化;以 Ach 诱导的血管舒张程度反应内皮完整性,舒张程度大于 80% 为内皮完整、小于 20% 为内皮去除。

1.3 CaSR 对预收缩的血管张力的影响

内皮去除($n=8$)和内皮完整($n=8$)的血管环,在离体器官灌流浴槽中平衡 2 h 后,加入 NE 10^{-6} mol/L,待收缩平稳后,梯度加入 cinacalcet(0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/L),记录张力曲线变化。以加入 cinacalcet 后血管张力与 NE 诱导的最大收缩张力之间的比率来反映血管张力的变化。

1.4 CaSR 预处理对血管收缩与舒张反应性的影响

内皮去除($n=32$)和内皮完整($n=32$)的血管环各自又分为 4 组,每组 8 个血管环:对照组、cinacalcet 1、3、10 μmol/L 组。平衡后,cinacalcet 组按照分组分别加入 cinacalcet 1、3、10 μmol/L 孵育 30 min,然后观察 NE(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L)诱导的血管收缩反应性和 Ach(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}和 10^{-5} mol/L)诱导的血管舒张反应性。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

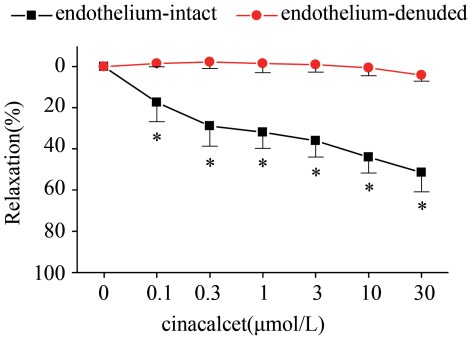
2 结果

2.1 cinacalcet 对预收缩的血管张力的影响

对 NE 预收缩的内皮完整的 SMA 血管环,加入梯度浓度的 cinacalcet 引起了显著的舒张作用,且呈明显的剂量依赖性。而对内皮去除的血管环,加入 cinacalcet 后血管张力先略有升高然后轻度降低,在整个过程中张力变化不显著。结果提示,CaSR 激动剂 cinacalcet 对预收缩血管有明显的舒张作用,并且这一作用是依赖于内皮的(图 1)。

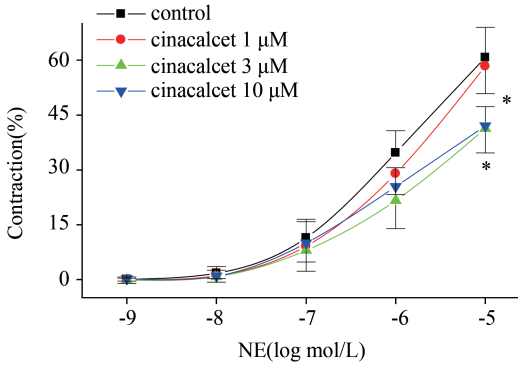
2.2 cinacalcet 预处理对内皮完整血管的收缩/舒张反应性的影响

3 个剂量的 cinacalcet 处理对静息水平的内皮完整血管环的基础张力没有明显影响。在内皮完整的 SMA 血管环,cinacalcet 3、10 μmol/L 预处理 30 min,明显抑制了 NE 诱导的血管收缩反应性,最大收缩张力分别为对照组的 68.1% 和 69.2%($P<0.05$);而 cinacalcet 1 μmol/L 未显示明显作用。各剂量的 cinacalcet 预处理对 Ach 诱导的内皮完整血管的舒张反应性无明显影响(图 2)。



*:与去内皮去除血管组比较,$P<0.01$

图 1 cinacalcet 对预收缩的血管张力的影响



*:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 cinacalcet 预处理对内皮完整血管环的收缩反应性的影响

2.3 cinacalcet 预处理对内皮去除血管的收缩/舒张反应性的影响

对内皮去除的血管环,cinacalcet 处理也未引起静息水平的血管张力变化。各剂量 cinacalcet 预处理 30 min对去内皮血管环的收缩和舒张反应性均无明显影响,各组间差异没有统计学意义($P>0.05$),见图 3。

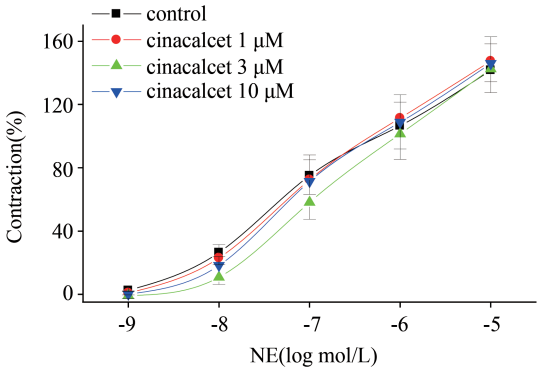


图 3 cinacalcet 预处理对去内皮血管环的收缩反应性的影响

3 讨论

钙敏感受体广泛表达于多种组织器官,如甲状旁腺、肾脏、骨及胃肠道等,在机体钙稳态调控中起关键作用。CaSR 已成为钙代谢异常疾病治疗的重要靶点,

它的激动剂临床上用于治疗甲状旁腺功能亢进,其抑制剂对骨质疏松的治疗作用也在研究中。CaSR 激动剂被称为拟钙剂(Calcimimetics),分为Ⅰ型和Ⅱ型,Ⅰ型是非特异性的激动剂,包括 Ca^{2+} 和其他有机/无机的多价离子;Ⅱ型是特异性的针对 CaSR 的变构激动剂,是一类苯烷基胺类化合物,其代表药物包括美国 NPS 公司的 NPS R-568(第一代)和美国安进公司的 AMG 073/cinacalcet(第二代)。cinacalcet 是第一个、也是目前唯一被美国 FDA 批准用于临床的 CaSR 激动剂,主要用于原发性、继发性甲状旁腺功能亢进和甲状旁腺癌患者的高钙血症[8]。除了参与机体钙稳态调控以外,CaSR 还参与细胞增殖分化与凋亡、以及细胞功能调控等过程,因此 CaSR 可能成为治疗许多疾病的新靶点[2,4,9]。

近来的研究显示,CaSR 在心血管系统中也有表达并具有重要的生物学功能。文献报道,CaSR 激动剂 cinacalcet 和 R-568 能引起甲状腺疾病患者和慢性肾功能不全动物的血管舒张、血压降低和心脏形态学改善[4]。在临床治疗中也发现 cinacalcet 有降低患者血压的作用[10]。然而,Fryer 等[6]报道,急性激活 CaSR 引起了正常和尿毒症大鼠血管收缩、血压升高。在缺氧性肺动脉高压实验中,发现缺氧增加 CaSR 表达,导致细胞内钙离子浓度升高、肺血管收缩[11]。在缺氧/复氧模型中,CaSR 激动剂 R-568 预处理 30 min 使细胞外钙诱导的血管收缩反应增强,而 CaSR 抑制剂 NPS2143 能抑制收缩[12]。这些不同研究结果可能与疾病模型和研究对象有关。为了明确 CaSR 对血管收缩/舒张功能的调节作用,本实验观察了 CaSR 特异性激动剂 cinacalcet 对内皮完整和内皮去除的大鼠肠系膜动脉的收缩/舒张反应性的影响,以及对基础血管张力和预收缩的血管张力的作用。结果显示,无论是否存在内皮,cinacalcet 对静息状态下的血管基础张力没有明显影响。对预收缩的血管,cinacalcet 诱导内皮完整的血管产生舒张,而对去内皮血管无舒张作用。Cinacalcet预处理能降低内皮完整的血管的收缩反应性,对内皮去除的血管无明显影响。此外,Cinacalcet 对血管舒张反应性无明显作用。结果提示,CaSR 激动剂 cinacalcet 对血管收缩反应性有抑制作用,其作用依赖内皮。

血管内皮是由衬于血管内表面的血管内皮细胞(VEC)构成,具有屏障和分泌等多种功能。VEC 能分泌多种血管活性物质,包括血管收缩因子和血管舒张因子,如一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、前列环素(PGI2)和血管紧张素(AngⅡ)等,因此血管内皮在血管张力和血压调节中发挥复杂多变的作用[13-14]。CaSR 作为 G 蛋白耦联受体家族成员,通过与多种 G 蛋白耦联来发挥作用,如 Gαi、Gαq/11 和 G12/13[9,15]。CaSR 通过 Gαq/11 激活磷脂酶 C(PLC)-三磷酸肌醇(IP3)途径,促进内质网释放 Ca^{2+},使细胞内钙离子水平升高,Ca^{2+} 作为第二信使参与细胞内信号传导。CaSR 通过 Gαi 抑制腺苷酸环化酶的活性,使 cAMP 的生成减少。CaSR 通过 G12/13 与小 G 蛋白 Rho 发生作用,调节下游信号转导。此外,有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)、PI3K/AKT、磷脂酶 A 等分子也在 CaSR 信号途径中发挥重要作用。Greenberg 等[16]发现,激活 CaSR 引起血管舒张与内皮细胞 NO 生成增加和钙依赖钾离子通道(IKCa)通道激活有关。王腊梅等[17]报道,在人脐静脉内皮细胞(HUVEC),CaSR 通过钙池操纵性钙通道(SOC)和受体操纵性钙通道(ROC)介导了钙内流和 NO 生成。这些研究提示,CaSR 可能通过调节 NO 生成和激活细胞膜上离子通道来发挥诱导血管舒张的作用。但具体的信号途径有待进一步阐明。已有实验证实血管平滑肌细胞有 CaSR 表达,增加细胞外钙浓度来激活 CaSR 对去内皮的血管有促进收缩作用,其机制为 CaSR 激活引起血管平滑肌细胞内钙离子浓度升高来诱导收缩[17]。但本实验结果并未证实这一现象。Farzaneh-Far 等[18]报道,在人工培养的大鼠动脉血管平滑肌细胞中并未检测到 CaSR 基因的转录,而是存在一种与 CaSR 功能相似、能被细胞外钙调节的受体。那么,CaSR 在血管内皮和平滑肌中的表达和功能是否存在差异,需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid[J]. Nature, 1993, 366(6 455): 575 - 580. doi: 10.1038/366575a0.

[2] Nemeth EF, Goodman WG. Calcimimetic and Calcilytic Drugs: Feats, Flops, and Futures[J]. Calcif Tissue Int, 2016, 98(4): 341 - 358. doi: 10.1007/s00223 - 015 - 0052 - z.

[3] Wang R, Xu C, Zhao W, et al. Calcium and polyamine regulated calcium-sensing receptors in cardiac tissues[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(12): 2680 - 2688. doi: 10.1046/j.1432 - 1033.2003.03645.x.

[4] Toka HR, Pollak MR. The role of the calcium-sensing receptor in disorders of abnormal calcium handling and cardiovascular disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(5): 494 - 501. doi: 10.1097/MNH.0000000000000042.

[5] Schepelmann M, Yarova PL, Lopez-Fernandez I, et al. The vascular Ca^{2+}-sensing receptor regulates blood vessel tone and blood pressure[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 310(3): C193 - 204. doi: 10.1152/ajpcell.00248.2015.

[6] Fryer RM, Segreti JA, Widomski DL, et al. Systemic activation of the calcium sensing receptor produces acute effects on vascular tone and circulatory function in uremic and normal rats: focus on central versus peripheral control of vascular tone and blood pressure by cinacalcet[J].

doi:10.11659/jjssx.03E016034

C5b-9 在胃腺癌中表达与疾病的相关性研究

谭 丹[1],曾小琴[2] (1.第三军医大学新桥医院急诊科,重庆 400037;2.第三军医大学新桥医院呼吸科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨补体活化片段 C5b-9 表达与胃腺癌发病之间的相关性。**方法** 运用组织芯片和免疫组织化学的方式对 32 例胃腺癌患者癌及癌旁组织 C5b-9 的表达进行检测,并用多项逻辑回归和似然比的方法对结果进行分析,评估相关性。**结果** 补体 C5b-9 的表达与胃腺癌疾病的临床分期($P=0.007$)和 TNM 分期($P=0.005$)密切相关,但与年龄、性别及转移程度等因素没有明显关联。**结论** 补体 C5b-9 或可作为临床中诊断胃腺癌疾病分期的标准,为诊断、评估及治疗胃腺癌提供理论依据。

[关键词] 胃腺癌;补体;C5b-9;临床分期

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-06-07

Relevant research on expression of C5b-9 and disease in gastric adenocarcinoma

TAN Dan[1],ZENG Xiao-qin[2] (1. Institute of Emergency Department, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Institute of Respiratory Department, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the correlation between the expression of C5b-9 and the gastric carcinoma. **Methods** In this study, the human gastric adenocarcinoma (HGAC) tissues ($n=32$ cases) from 32 patients were evaluated by immunohistochemistry and tissue chip. The result was analyzed and evaluated by Multinomial logistic regression and likelihood ratio. **Results** Multinomial logistic regression and likelihood ratio testing showed that over-expression of C5b-9 in HGAC tissue was significantly correlated with clinical stage ($P=0.007$) and tumor stage ($P=0.005$), but not with tumor metastasis, lymphoid nodal status, sex or age. **Conclusion** C5b-9 can be the criteria of diagnosis and clinical staging for gastric adenocarcinoma, which may help in diagnosis and assessment disease severity of human gastric carcinoma.

Keywords: gastric carcinoma complement; C5b-9; clinical stages

胃癌是全世界发病率较高的恶性肿瘤,其存活率极低,5 年生存率普查显示只有 20% ~30%,尽管现在的治疗手段可以通过放疗和化疗的方式对患者进行治疗,但一旦出现转移,即使是治疗后的平均生存时间也不会超过1 年[1]。病因预防是提高胃癌生存率的重要因素,由于在后期胃癌转移往往是导致疾病加重的因

J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323(1): 217 - 226. doi: 10.1124/jpet.107.123901.

[7] 雷 艳,杨新征,董昭君. Rho 激酶和 PKC 在环孢素 A 改善休克血管反应性中的作用及与 MPTP 的关系[J]. 局解手术学杂志, 2015, 24(4): 355 - 358. doi: 10.11659/jjssx.03E015007.

[8] Yousaf F, Charytan C. Review of cinacalcet hydrochloride in the management of secondary hyperparathyroidism[J]. Ren Fail, 2014, 36(1): 131 - 138. doi: 10.3109/0886022X.2013.832319.

[9] Alfadda TI, Saleh AM, Houillier P, et al. Calcium-sensing receptor 20 years later[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(3): C221 - 231. doi: 10.1152/ajpcell.00139.2014.

[10] Chang TI, Abdalla S, London GM, et al. The effects of cinacalcet on blood pressure, mortality and cardiovascular endpoints in the EVOLVE trial[J]. J Hum Hypertens, 2016, 30(3): 204 - 209. doi: 10.1038/jhh.2015.56.

[11] Zhang J, Zhou J, Cai L, et al. Extracellular calcium-sensing receptor is critical in hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 17(3): 471 - 484. doi: 10.1089/ars.2011.4168.

[12] Zhao M, He X, Yang YH, et al. Acetylcholine protects mesenteric arteries against hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting calcium-sensing receptor[J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127(4): 481 - 488. doi: 10.1016/j.jphs.2015.03.011.

[13] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium-Gatekeeper of vessel health[J]. Atherosclerosis, 2016, 248: 97 - 109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

[14] Sofronova SI, Borzykh AA, Gaynullina DK, et al. Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats[J]. Nitric Oxide, 2016, 55 - 56: 1 - 9. doi: 10.1016/j.niox.2016.02.005.

[15] Zhang C, Miller CL, Brown EM, et al. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling[J]. Sci China Life Sci, 2015, 58(1): 14 - 27. doi: 10.1007/s11427 - 014 - 4779 - y.

[16] Greenberg HZ, Shi J, Jahan KS, et al. Stimulation of calcium-sensing receptors induces endothelium-dependent vasorelaxations via nitric oxide production and activation of IKCa channels[J]. Vascul Pharmacol, 2016, 80: 75 - 84. doi: 10.1016/j.vph.2016.01.001.

[17] 王腊梅,钟 华,赵 慧,等. Orai3 参与了 HUVECs 外钙敏感受体介导的钙内流和 NO 生成[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1): 1 - 10. doi: 10.3969/j.issn.1000 - 4718.2014.01.001.

[18] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(3): 736 - 740. doi: 10.1006/bbrc.2000.3747.

(编辑:周小林)