维普资讯 http://www.cqvip.com

牛磺酸抗缺氧及防治肺动脉高压的研究及其细胞机制初探

许蜀闽[1],郑绿珍[2],刘福玉[1],陈 莉[1],王培勇[1] (1.第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,重庆 400038;2.温州医学院病理生理学教研室,浙江 温州 325035)

[摘 要] **目的** 通过动物模型观察牛磺酸对缺氧性肺动脉高压的治疗作用,同时观察其对体外培养牛肺动脉平滑肌细胞(PASMC)和内皮细胞(PAEC)增殖的影响。**方法** 采用模拟高原5 000 m制作缺氧大鼠模型,缺氧2周。设平原(C组)及缺氧对照组(H组),观察牛磺酸治疗后(T组)的肺动脉压(mPAP)、血浆乳酸脱氢酶(LDH)活性、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)、肺匀浆一氧化氮(NO)含量、右心室肥大指数的变化。体外培养PASMC和PAEC用^{3}H-TdR掺入法比较牛磺酸对缺氧PASMC和PAEC增殖的影响。**结果** H组大鼠LDH活性升高为C的10.1倍(P<0.01);肺匀浆NO含量降低为C组的32%(P<0.01);血浆MDA含量显著升高为C组的1.64倍(P<0.01);mPAP显著增高,约为C组的2.74倍(P<0.01);右心室肥大指数是C组的1.56倍(P<0.01)。T组与H组相比较:LDH活性、血浆MDA、右心室肥大指数均显著降低(P<0.01);mPAP显著降低(P<0.05)。高浓度(10~20 mmol/L)的牛磺酸抑制缺氧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PAEC的^{3}H-TdR掺入(P<0.05),抑制缺氧时PASMC的^{3}H-TdR掺入(P<0.05)。**结论** 牛磺酸有抗缺氧及防治肺动脉高压的作用。缺氧抑制内皮细胞的增殖而促进平滑肌细胞的增殖,适当剂量的牛磺酸可以对抗缺氧对PAEC和PASMs的作用;减弱缺氧对PAEC的增殖抑制作用,抑制缺氧的促PASMC增殖作用,使之接近常氧水平。这可能是牛磺酸防治肺动脉高压的细胞机制。提示牛横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。

[关键词] 牛磺酸;肺动脉;平滑肌细胞;内皮细胞;缺氧
[中图分类号] R541.9; R363 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2006)05-0295-03

Prevention effects of taurine on hypoxic pulmonary hypertension

XU Shu-min, ZHENG Lv-zhen, LIU Fu-yu, CHEN Li, WANG Pei-yong (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 430038, China)

Abstract: Objective Exposure to hypoxia induces hypoxic pulmonary hypertension (HPH), the effects of taurine(T) on prevention of HPH were investigated. **Methods** Male Wistar rats were divided into three groups: Hypoxia 2 weeks, and control (C). Hypoxia 2 weeks + Taurine groups (T). The Taurine therapy groups were given drugs every day orally. After exposed (12 hours every day) 2 weeks in hypobaric chamber at simulated high altitude of 5 000 meters, the effects of taurine were evaluated. **Results** The rats of H groups developed remarkable HPH and right ventricle hypertrophy, with an elevated pulmonary artery pressure (mPAP) of about 25 mmHg and the right ventricle index of 1.56 folds higher (P<0.01 vs control group). Taurine group administered emolliated the elevation of mPAP and right ventricle index, with mPAP14.2% and right ventricle index about 20% lower than those of hypoxic group without drug administered (P< 0.01) .The activities of LDH and levels of MDA in H groups were 10.1 and 1.64 folds higher than those of respective C groups (P<0.01), therapy group showed decreases in activities of LDH and levels of MDA (P<0.01). NO productions of H was 32% lower than those of C (P<0.01). As well effects of taurine and hypoxia (2.5%O2 and 0%O2) on proliferation of bovine pulmonary artery endothelial cells (PAEC) and pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) were investigated using ^{3}H-TdR incorporation method. Taurine dose-dependently inhibited ^{3}H-TdR incorporation of PAEC in normoxic condition (P<0.05). Anoxia and hypoxia inhibited PAEC proliferation significantly (P<0.01). taurine (20 and 40 mmol/L) markly inhibited the PASMC ^{3}H-TdR incorporation (P<0.01) under normoxia. Anoxia and hypoxia stimulated proliferation of PASMC (P<0.01). **Conclusion** The results suggest that taurine have effects on hypoxic injury, inhibit lipidperoxidation, mitigate hypoxic pulmonary hypertension and reduce right ventricle hypertrophy.

Keywords: taurine; pulmonary artery; smooth muscle cell; endothelial cell; hypoxia

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是其主要血管变化特征,肺动脉内皮细胞受损及代谢障碍和平滑肌细胞增殖及表型改变是其重要细胞机制,目前尚缺乏简便有效的防治措施。近年来牛磺酸被认为是一种具有多种生物学功能的含硫氨基酸,具有调节

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30300147)
[作者简介] 许蜀闽(1972-),女,四川省广安市人,实验师,硕士,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
[通讯作者] 王培勇,男,山东省诸城市人,副教授,博士,主要从事心血管病理生理学方面的研究。电话:(023) 68752339-8207
[收稿日期] 2006-07-31 [修回日期] 2006-08-30

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞内钙稳态及良好的细胞保护功能，可以发挥抗心律失常、降血压和保护心肌等多种作用。它是否能对抗缺氧对肺血管细胞的损伤，从而用于缺氧肺动脉高压肺血管结构改建过程的防治，尚未见报道。本文运用整体动物缺氧模型及体外培养细胞，探讨牛磺酸的抗缺氧损伤、保护细胞、抗脂质过氧化从而达到较好的对肺动脉高压的防治效果，为肺动脉高压的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

牛磺酸(taurine,Tau,北京制药厂),NO检测试剂盒(南京建成公司),RM-6200四道生理记录仪(成都仪器厂),多功能紫外分光光度扫描仪UV240(日本岛津)。胰蛋白酶(Sigma),RPMI-1640培养基(JR SI USA),^{3}H-TdR(中国原子能科学研究所),其它试剂均为AR级。

1.2 动物模型建立

雄性Wister大鼠,体重为150 g左右,随机分为平原对照组(C组)、单纯缺氧组(H组)、缺氧+牛磺酸(T组),每组8只大鼠。药物通过喂水途径给予,牛磺酸剂量为每天每公斤体重2 g。C组常压下饲养,自由饮水饮食。H组和T组置于减压舱内,模拟高原5 000 m减压,每天12 h,减压2周,自由饮水饮食。C组在常氧下,其余各组在模拟4 000 m高度,动物以10%乌拉坦腹腔麻醉后于右侧颈外静脉及颈总动脉进行肺动脉导管插管,以RM-6200四导生理记录仪测定肺动脉压(mPAP)。取血液标本测定乳酸脱氢酶(LDH)活性和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)水平。处死动物取肺组织测定肺组织一氧化氮(NO)含量;取心脏,剪离右心室(KV)和左心室加室间隔(LV+Sep),称重后,计算右心室肥大指数(RVHI),RVHI=RV/(LV+Sep)×100%。

1.3 LDH、MDA和NO的测定

LDH活性检测按朱忠勇所著《临床医学检验》的方法,采用丙酮酸钠为底物,当丙酮酸钠与还原型辅酶I在乳酸脱氢酶的催化作用下生成乳酸,同时吸光度发生变化来计算乳酸脱氢酶的活性。按改良的八木国夫法[1]测定血浆MDA。按NO检测试剂盒说明书用比色法测定肺组织匀浆NO含量。

1.4 PAEC和PASMC的培养鉴定

无菌条件下取新生公牛的肺动脉,PAEC的培养采用胰蛋白酶消化法[2],PASMC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PAEC和PASMC分组进行下述实验。

1.5 ^{3}H-TdR掺入的增殖分析实验

PAEC和PASMC按每孔2万细胞接种于96孔培养板,长成层后换含1%贫血小板血清RPMI-1640培养基,设常氧(21%O_2)+牛磺酸(0、2.5、5、10、20 mmol/L)组,缺氧A(2.5%O_2)、缺氧B(0.5%O_2)+牛磺酸(0、2.5、5、10、20 mmol/L)组,观察24 h。每组设5个样本,向培养液中加入^{3}H-TdR(1.25 μCi/ml),掺入6 h后,收集细胞,用β-液体闪烁计仪检测dpm。无氧(0%O_2)培养按文献[2]的方法在密闭的真空干燥器内进行。

1.6 统计学分析

实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS10.0统计软件包处理,多组数据采用单因素方差分析(ANOVA),多组间两两比较采用q检验,以$P<0.05$为统计学有显著性差异,$P<0.01$为统计学有非常显著性差异。

2 结果

2.1 牛磺酸对缺氧大鼠整体指标的影响

各检测指标见表1。H组大鼠LDH活性升高为C组的10.1倍($P<0.01$);肺匀浆NO含量降低为C组的32%($P<0.01$);血浆MDA含量显著升高为C组的1.64倍($P<0.01$);mPAP显著增高,约为C组的2.74倍($P<0.01$);RVHI是C组的1.56倍($P<0.01$)。T组与H组相比较:LDH活性降低24.4%($P<0.01$);肺匀浆NO含量升高10%但无统计学意义;血浆MDA含量显著降低($P<0.01$);mPAP降低14.2%($P<0.05$);RVHI降低20%($P<0.01$)。

表1 牛磺酸对缺氧大鼠的整体指标影响($\bar{x}\pm s$)

分组	LDH (U/L)	MDA (nmol/ml)	NO (nmol/ml)	mPAP (mmHg)	RVHI
C组	211±26	1.92±0.36	9.7±1.1	14.1±0.8	0.28±0.02
H组	2152±190*	3.15±0.84*	3.1±0.5*	38.6±1.4*	0.45±0.03*
T组	1626±148#	2.30±0.44#	3.4±0.5	33.1±1.5△	0.38±0.05#

*:与C组比较,$P<0.01$; #:与H组比较,$P<0.01$; △:与H组比较,$P<0.05$

2.2 牛磺酸对培养PAEC ^{3}H-TdR掺入的影响

牛磺酸能剂量依赖地抑制常氧PAEC的^{3}H-TdR掺入($P<0.05$),尤以高浓度时为明显。缺氧A和缺氧B时PAEC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和缺氧B对PAEC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和缺氧B PAEC的^{3}H-TdR掺入($P<0.01$),见图1。

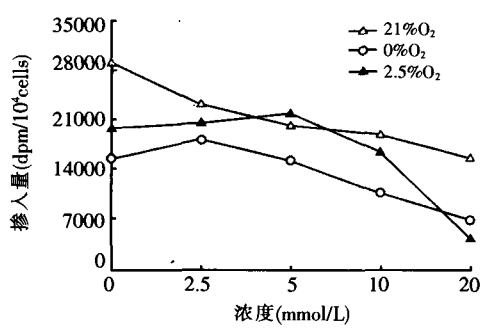


图1 牛磺酸对常氧和缺氧培养PAEC增殖的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 牛磺酸对培养 PASMC ^{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 PASMC 的 ^{3}H-TdR 掺入有一定的促进倾向，但无显著性差异。大于 20 mmol/L 浓度的牛磺酸则显著地抑制常氧 PASMC 的 ^{3}H-TdR 掺入($P<0.01$)。缺氧 A 和缺氧 B 均显著地促进 PASMC 增殖($P<0.01$)，而牛磺酸能剂量依赖地拮抗缺氧 A 和缺氧 B 对 PASMC 的 ^{3}H-TdR 掺入的促进作用 ($P<0.05$)；用量 10~20 mmol/L 浓度时，缺氧 PASMC 的 ^{3}H-TdR 掺入基本恢复至常氧水平(图 2)

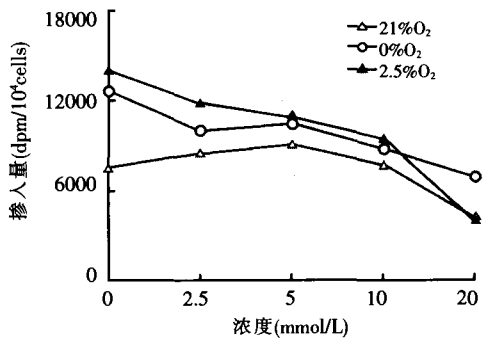


图 2 牛磺酸对常氧和缺氧培养 PASMC 增殖的影响

3 讨论

HPH是缺氧引起的疾病之一。HPH 的发生机制复杂，其中肺血管内皮细胞活性物质分泌的改变和平滑肌细胞表型和舒缩特性改变备受重视。肺血管内皮细胞具有复杂的代谢功能，除可以灭活一些生物活性物质间接影响血管张力以外，还可以产生血管活性物质，直接调节平滑肌的舒缩，影响平滑肌细胞增殖，参与血管结构的调节。缺氧时，内皮细胞的损伤及功能紊乱和平滑肌细胞的增殖是缺氧性肺血管收缩、肺血管改建及肺动脉高压发生、发展的重要环节。

在 HPH 的防治方面，至今还没有突破性的预防和治疗措施。临床主要采用血管扩张药物治疗肺动脉高压，多数药物的肺血管选择性差，有些还有毒副作用。牛磺酸是广谱的细胞保护药[3]，可抑制缺氧大鼠 ET-1 和 ACE 分泌，增加 NO 和 SOD 水平，降低肺动脉压力，减轻心肺组织损伤[4]。本实验结果表明牛磺酸能对抗缺氧损伤，在整体水平上降低缺氧大鼠血浆 LDH 活性、MDA 水平，这可能与牛磺酸具有稳定细胞膜，清除自由基等多种细胞保护作用有关[5]。本实验观察到牛磺酸对细胞增殖调节具有双向调节作用。①高浓度时对 PAEC 和 PASMC 均表现为抑制增殖作用。②在低浓度(2.5~10 mmol/L)随情况不一而表现出不同的作用。在常氧情况下对快速增殖的 PAEC 表现出剂量依赖性抑制增殖作用，对增殖较慢的 PASMC 则有一定的促增殖倾向；对抗缺氧对 PAEC 和 PASMC 的影响，减弱缺氧对 PAEC 的增殖抑制作用，抑制缺氧的促 PASMC 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是很清楚，可能与对胞内钙浓度的调节有关，有报道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[6]。

本文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，调节肺动脉内皮、平滑肌细胞的增殖，防治缺氧性肺血管收缩和血管结构改建，从而对缺氧性肺动脉高压和高山病有一定的防治功能，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，也许可用于肿瘤的治疗。

[参考文献]

[1] 齐凤菊. 血浆丙二醛含量测定方法-改良的八木国夫法[J]. 第一军医大学学报，1986,6(2):152.

[2] 许蜀闽，王培勇. 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.

[3] 王丽娟，王 勇. 牛磺酸对心血管系统作用的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报，2004,25(11):1270-1272.

[4] 李志斌，邹霞英. 牛磺酸对大鼠慢性缺氧性肺动脉高压的预防作用[J]. 中国病理生理杂志，1999,15(5):453-455.

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

[6] 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.

(编辑：余汇洋)