维普资讯 http://www.cqvip.com

10-13

文章编号：0253-3626（2000）01-0010-04

Q516
Q577

影响大鼠主动脉肾上腺髓质素和肾上腺升压素释放的因素

周 兰[1]、叶 赤[2]、邱宗荫[3]、唐朝枢[4]、赵云涛[4]

（1. 重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室 400046； 2. 广东医学院解剖教研室 524023；
3. 重庆医科大学中心实验室 400016； 4. 北京医科大学心血管基础所 100083）

摘 要 用放射免疫法测定离体大鼠主动脉孵育或灌流介质中肾上腺髓质素(AM)和肾上腺升压素(AT)，发现：① 1～100nmol/L AⅡ和ET-1呈剂量依赖性增加AM的释放率；1和10nmol/L AⅡ和ET-1对AT的释放无明显影响，100nmol/L AⅡ和ET-1则增加AT释放率；这六组的AM/AT比值均增大；②10nmol/L 肾上腺素增加AM和AT的释放率，10nmol/L CGRP则降低两者的释放率，它们的AM/AT比值不变；③ 1μg/ml LPS对两者的释放无影响，但5和10μg/ml LPS则增加AM、AT释放率39%和74%以及AM/AT比值；④ 缺氧只抑制AT的释放，致比值增大；⑤ 流速加快增加AM和AT的释放率，但比值不变；流速减慢对两者的释放无影响。提示：AⅡ、ET-1、肾上腺素、CGRP、LPS、流速和氧供可能是AM和AT释放的调节因素。

关键词 肾上腺髓质素；肾上腺升压素；释放调节 大鼠

中国图书分类法分类号：R335.4；Q95-33 **文献标识码**：A **收稿日期**：1998-11-12

Effects of some factors on the release of adrenomedullin and adrenotensin from rat aorta

ZHOU Lan, et al

Department of Molecular Biology, The College of Basic Medical Sciences

Abstract: Incubation and perfusion of isolated rat aorta and radioimmunoassay of adrenomedullin(AM) and adrenotensin(AT) in the media were used to investigate the factors which influence the release of AM and AT from rat aorta. We found that: ①angiotensin Ⅱ(AⅡ) and endothein-1(ET-1) at doses of 1～100 nmol/L increased AM release rate in a dose-dependent manner; 1 and 10 nmol/L AⅡ and ET-1 had no obvious effects on AT release, 100 nmol/L AⅡ and ET-1 increased AT release rate; the six AM/AT ratios increased; ② 10 nmol/L epinephrine augmented release rates of AM and AT and 10nmol/L calcitonin gene related peptide(CGRP) decreased the release rates in same degree; the two AM/AT ratios were not changed; ③ 1 μg/ml lipopolysaccharide(LPS) had no effect on the release rates; but 5 and 10 μg/ml LPS increased release rates of AM and AT and the AM/AT ratios; ④ Hypoxia inhibited only AT release, thus increasing the AM/AT ratio; ⑤ Increase of flow rate augmented release rates of AM and AT, but did not change their ratio; decrease of flow rate had no effect on their release rates. These data suggest that AⅡ, ET-1, epinephrine, CGRP, LPS, oxygen supply and flow rate may be the factors participating in the regulation of AM and AT release from rat aorta.

Key Words: Adrenomedullin; Adrenotensin; Release regulation

来自肾上腺髓质素(adrenomedullin,AM)基因编码的肾上腺髓质素原(pro-AM)的AM是一新的舒血管降压多肽[1,2]，其在正常人血浆中有较高浓度[2]；内皮细胞(EC)和血管平滑肌细胞(VSMC)中富含其mRNA，并大量产生和分泌AM,而且VSMC上又有其特异受体,因此AM被认为既是一种循环激素，更是一种旁/自分泌-激素,参与血压调节和血管的局部调节[3,4]。肾上腺升压素(adrenotensin,AT)是来自pro-AM的另一肽段，可能具有缩血管升压活性[5]。因此,我们认为AM和AT可能在心血管自稳态的维持上起着积极作用，研究VSMC和EC中AM和AT产生及释放的调节机制将有助于阐明来自同一前体却具相反血管活性的这对多肽的生理功能。

作者介绍：周兰（1963-01出生），女，副教授，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 方 法

1.1 离体大鼠主动脉孵育 Wistar大鼠由北京医科大学动物中心提供，雌雄不拘，200～220g。分离的主动脉分为13组（n=5),各在含有相应试剂(美国凤凰公司或Sigma产品)或特定条件下的3.0 ml Krebs-Henseleit缓冲液（即K-H液：pH7.4, 37℃，持续通入95%O_2+5%CO_2混合气)中振荡孵育1h。① 对照组：纯K-H液；② 血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ,AⅡ)组:K-H液中分别含1、10和100nmol/L AⅡ；③ 内皮素-1(endothelin-1,ET-1)组：K-H液中分别含1,10和100nmol/L ET-1；④ 肾上腺素(epinephrine,Ep)组和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)组：K-H液中分别含10 nmol/L 的Ep和CGRP；⑤脂多糖(LPS)组：K-H液中分别含1, 5和10 μg/ml LPS；⑥缺氧组：用纯氮气取代95%O_2+5%CO_2混合气持续通入K-H液。水浴煮沸孵育介质10min,离心收集上清液,并加入Apotinin抑制肽酶活性，-20℃存放；主动脉称重(g 湿重, g ww)。

1.2 离体大鼠主动脉灌流 主动脉分为3组（n=6),分别以20、55和80 ml/min的速度用5 ml K-H液(pH7.4, 37℃, 持续通入95% O_2+5% CO_2混合气)进行循环灌流；以55 ml/min组作为对照组(正常大鼠的血流速度为56.2ml/min)；主动脉称重及介质处理同"1.1"。

1.3 孵育及灌流介质中AM和AT的放射免疫测定 按相应试剂盒(美国凤凰公司)要求进行操作：释放率单位是pmol/g ww/h。

1.4 资料分析 实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用t检验和单因素方差分析(one-way ANOVA)作统计处理。

2 结 果

2.1 AⅡ的作用 AⅡ呈剂量依赖性促进AM释放,3个组的释放率分别较对照组增加79%、172%和203%(P<0.01)；1和10nmol/L AⅡ对AT的释放无明显影响,100nmol/L AⅡ则增加AT释放率达128%(P<0.01)；3个组的AM/AT比值(反映两者释放率的相对变化)分别增加47%、76%和36%(P<0.05或0.01)。见表1。

2.2 ET-1的作用 ET-1呈剂量依赖性刺激AM释放,3个ET-1组的释放率分别较对照组增加70%、233%和300%(P<0.01)；1和10 nmol/L ET-1对AT的释放无明显影响,100nmol/L ET-1则增加AT释放率达117%(P<0.01)。这三组的AM/AT比值分别增加

表1 血管紧张素Ⅱ、内皮素-1、肾上腺素、降钙素基因相关肽、脂多糖和缺氧对大鼠主动脉肾上腺髓质素和肾上腺升压素释放的作用

(pmol/g ww/h，$\bar{x}\pm s$，n=5)

Groups	AM	AT	AM/AT
Control	0.210±0.038	0.252±0.060	0.844±0.115
AⅡ(nmol/L)			
1	0.375±0.041**	0.303±0.048	1.239±0.144*
10	0.572±0.120**#	0.399±0.120	1.482±0.322**
100	0.636±0.058**#	0.575±0.132**#▲	1.148±0.207*
ET-1(nmol/L)			
1	0.356±0.019	0.242±0.029	1.482±0.101**
10	0.699±0.065**#	0.399±0.068**#	1.778±0.209**
100	0.840±0.132**#▲	0.547±0.077**#▲▲	1.541±0.170**
Epinephrine			
10nmol/L	0.423±0.102**	0.472±0.114**	0.899±0.043
CGRP			
10nmol/L	0.122±0.007**	0.146±0.020**	0.847±0.104
Hypoxia			
	0.223±0.036	0.144±0.060**	1.577±0.367*
LPS(μg/ml)			
1	0.239±0.019	0.207±0.015	1.131±0.143
5	0.581±0.068**#	0.350±0.012*#	1.665±0.203**#
10	0.712±0.056**#▲▲	0.439±0.092**▲	1.675±0.343**#

or: P<0.05or0.01 vs control; #: P<0.01vs1nmol/Lor 1 μg/ml;*

▲ or ▲▲. P<0.05 or 0.01 vs 10 nmol/L or 5 μg/ml

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 流速对大鼠主动脉肾上腺髓质素和肾上腺升压素释放的作用

Groups	AM	AT	AM/AT
55 ml/min(control)	0.226±0.025	0.282±0.068	0.835±0.192
20 ml/min	0.235±0.100	0.279±0.090	0.829±0.126
80 ml/min	0.504±0.082*	0.646±0.098*	0.781±0.078

* $P<0.01$ vs control

76%、111%和83%($P<0.01$)。见表1。

2.3 Ep、CGRP和缺氧的作用 10 nmol/L Ep分别增加AM和AT释放率达101%和87%($P<0.01$),AM/AT比值不变；10nmol/L CGRP则使两者的释放率均降低42%($P<0.01$),其比值不变；缺氧对AM的释放无影响,但使AT的释放率降低43%($P<0.01$),其比值增加87%($P<0.01$)。见表1。

2.4 LPS的作用 1 μg/ml LPS对两者的释放均无明显影响；5 μg/ml和10 μg/mlLPS分别增加AM释放率达177%和239%($P<0.01$)、AT释放率39%和74%以及AM/AT比值97%和98%($P<0.01$)。见表1。

2.5 流速的作用 20 ml/min的流速不影响两者的释放；80ml/min的流速则分别增加AM和AT的释放率达123%和129%($P<0.01$),但不影响AM/AT比值。见表2。

3 讨 论

AM和AT是由同一前体分子pro-AM酶解后形成的两个不同肽段[1]。AM具有扩血管降血压、抑制VSMC增殖、排钠利尿、扩张支气管等广泛的生物学效应[1,6]。血浆AM浓度较高，并且AM mRNA、AM和AM的特异受体广泛存在于心、肺、肾、主动脉等器官和组织，表明AM不仅作为一种循环激素，而且也作为旁/自分泌因子，参与了多个器官和组织的功能调节[6,7]。血管EC和VSMC均以较高水平表达AM mRNA，并可积极分泌AM[3,4]，而且EC和VSMC上有AM的特异受体：AM直接作用于VSMC上的受体，以cAMP为第二信使介导血管扩张；AM作用于EC上的受体，激活NO合酶，增加NO产生，再以cGMP为第二信使介导血管舒张；而AT则具有缩血管、升血压和刺激VSMC增殖的活性[6]。因此，血管组织既是产生AM和AT的组织，也是AM和AT的效应组织；AM和AT可能参与了血管结构和功能的生理调节以及血管疾病的病理生理过程。

本工作通过测定离体大鼠主动脉孵育液和灌流液中的AM和AT，发现多种因素可影响主动脉AM和AT的产生和/或释放。扩血管因子CGRP抑制两者的产生/释放，但其比值不变；缩血管因子AⅡ、ET-1和肾上腺素及LPS和灌流速度增加均在不同程度上刺激两者的产生/释放，其中AⅡ、ET-1和LPS的作用具有浓度依赖性，而且对AM的促进作用大于AT，因而AM/AT比值增大,而肾上腺素和流速的加快不影响AM/AT比值；缺氧不影响AM产生/释放，但对AT的产生/释放具有抑制作用，AM/AT比值增大。上述结果表明,大鼠主动脉AM和AT的产生/释放受多种理化因素的调控,而且同一因素对AM和AT的作用可以平行，也可不平行。

多因素影响主动脉AM和AT的产生/释放可能具有重要的病理生理意义。如，LPS是内毒素休克的主要致病因素，它促进AM产生/释放的作用大于AT，因而AM/AT比值增大，致扩张血管的力量相对强大，这可能积极参与了内毒素休克时血压降低的发生机制；再如AⅡ、ET-1均可致AM的绝对和相对(相对于AT)增加，这可能是高血压时血浆AM明显增高的原因之一；而AM既可以抑制AⅡ、ET-1产生，也可拮抗两者的缩血管作用。因此，这可能是心血管系统自稳态调节的重要机制，是机体防御和拮抗血压升高的重要代偿性反应的组成部分[6,8~10]。

多因素影响主动脉AM和AT产生/释放的机制尚不明确。据文献报道，肿瘤坏死因子、LPS和ET-1等可增加VSMC中AM mRNA的表达。因此，AM基因转录的激活可能是主动脉AM和AT的诱导性产生增加的主要机制；但AM和AT对同一因素反应的不平行，以致两者释放比值改变的机制则不明了，我们推测可能与多肽翻译后修饰以及pro-AM的复杂的

维普资讯 http://www.cqvip.com

分子内调节机制有关[10]，但有待证实。

综上，AⅡ、ET-1、肾上腺素、CGRP、LPS、氧供和流速均参与了对离体大鼠主动脉AM和AT产生/释放的调节。

参 考 文 献

[1] Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al.Cloning and characterzation of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin[J].Biochem Biophys Res Commun,1993; 194: 720～725

[2] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993; 192:552～560

[3] Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, et al. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994;201:1160～1166

[4] Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al. Production and secetion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor- α [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994; 203:719～726

[5] Gumusel B,Chang JK,Hao QZ,et al. Adrenotensin :an adrenomedullin gene product contrects pulmonary blood vessels. [J] Peptides, 1996;17:461～465

[6] 周 兰，石湘芸，唐朝枢，等. 肾上腺髓质素原酶解产物及其研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验分册. 1998；19：85～89

[7] Kapas S,Catt KJ, Clark AJL. Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor[J]. J Bio Chem, 1995;270:25344～25347

[8] 周 兰，叶 赤，李绍波，等. 运动大鼠和高血压大鼠血浆ADM和ADT水平的变化[J].重庆医科大学学报, 1998；23 (2)：121～122

[9] Sugo S,Minamino N,Shoji H,et al. Effects of vasoactive substances and cAMP related compounds on adrenomedullin production in caltured vascular smooth cells[J]. FEBS Lett , 1995;369:311～314

[10] 汤 健，唐朝枢，陈光慧，等. 心血管活性多肽的分子内调控[J]. 科技导报, 1996：10：3～7

（上接第109页）

ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro [J]. J Immuno ,1990;145(7):2110～2122

[11] Lee LA,Salo E and Perkonen P.Circulation IL-1bete in patients with kawasaki disease[J].N Eng J Mwd, 1988;308(3): 1664～1671

[12] Wang CR,Liu MR,Tshi RT et al.Circulating intercellular adhesion molecules-1 and antibodies including anti-endothelial cell,anti-cardiolipin and anti-neutrophil cytopasma antibodies in patients with vasculitis[J]. Clin Rheumatol, 1993;12(3):376～380

[13] Yokota S,Tsubaki K,Kuriyama T,et al.Presence in kawasaki disease of antibodies to myeobaterial heat-shock protein HSP65 and autoantibodies to epitopes of human HSP65 cognate antigen[J].J Clin Immuno & Immunopathol ,1993：87(2)：167～170

[14]. Leung DYM,Collins T,Lapieper LA,et al.Immunoglobulin M antibodies present in the acute phase of kawasaki disease lyse cultured vascular endothlial cells stimulated by gama interferon [J].J Clin Imvest ,1986;77(4):1428～1435

[15] Leung DYM, Gela RS,Newburger JW,et al.Two monokines, IL-1 and TNF,render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during kawasaki syndrom[J].J Exp Med, 1989；164(2):1958～1972

[16] ergely P.The pathogenesis of autoimmune disease[J]. Immunol Today, 1992；13(8):A21～A23

[17] Radvanyi LG,Wesselborg S,Janssen O et al.Induction of activation-driven death(apoptosis)in activated but not resting peripheral blood T cells[J]. J Immunol, 1993；150(10)：4378～4345

[18] Kolzim BL，Leung DY,Kappler J,et al. Superantigens and their patential role in human disease[J].Adv Immunol ,1993；64 (5)：99～166

[19] Yonish-Rouach E,Resnitzky D,Lotern J,et al. Wild-type P_{53} induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by IL-6[J].Nature, 1991；352：345～347

[20] 刘 佳，李 宏，Hamou MF，等. IL-6对小鼠(B杂交瘤)7TD1细胞凋亡的调控作用[J]. 中华微生物和免疫学杂志，1995：15(6)：382～385