DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.007
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0831-03

论著

肺微血管内皮细胞的培养液对血管平滑肌细胞的效应

王关嵩,钱桂生,关 崧,陈维中 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 观察缺氧条件下培养的肺微血管内皮细胞(PMEC)培养液对大鼠主动脉平滑肌细胞(ASMC)的作用。方法 应用倒置显微镜和电镜观察细胞形态,同位素放射测定^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)摄取量,流式细胞仪测定细胞的周期和蛋白含量。结果 单纯缺氧可使ASMC G_0/G_1 期数目增多。^{3}H-TdR摄取量降低,蛋白质含量减少;缺氧的PMEC培养液能促进大鼠ASMC从 G_0/G_1 期进入S期,^{3}H-TdR含量升高,使蛋白质含量进一步降低。结论 缺氧可能刺激微血管的内皮细胞分泌某些活性物质,进而促进动脉平滑肌细胞增生。

关键词:主动脉;平滑肌;缺氧;肺微血管;内皮细胞
中图法分类号:R322.121;R329.2 文献标识码:A

Effect of supernant of pulmonary microvascular endothelial cell cultured medium on rat aortic smooth muscle cells

WANG Guan-song, QIAN Gui-sheng, GUAN Song, CHEN Wei-zhong (Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of supernant of pulmonary microvascular endothelial cell cultured medium (SPMECCM) on rat aortic smooth muscle cells (ASMC) in hypoxia condition. Methods The morphology of ASMC was observed with inverted light microscope and electron microscope. ^{3}H-TdR uptake was tested with isotope labelled method. The cell cycle and protein contents were analyzed with flow cytometry (FCM). Results In simple hypoxia group, ASMC in G_0/G_1 phase were increased, but ^{3}H-TdR uptake and protein contents were decreased. While in hypoxics SPMECCM-treated group, more ASMC grow from G_0/G_1 phase to S phase. ^{3}H-TdR uptake was elevated but protein contents were reduced. Conclusion Hypoxia might stimulate microvascular endothelial cells to secrete some growth factors and enhance the proliferation of ASMC.

Key words: aorta; smooth muscle; hypoxia; pulmonary microvessle; endothelial cell

慢性阻塞性肺病作为临床上常见病,严重危害人们健康,对其病理进程有过多年研究,认识到缺氧可以导致肺血管平滑肌细胞增生,肺腺泡及微血管的构型改建。既往人们注意到肺内皮细胞可以分泌一些物质调节平滑肌细胞增生[1,2]。关于肺微血管内皮细胞(Pulmonary microvascular endothelial cell, PMEC)缺氧状态下与平滑肌细胞的关系研究甚少,然而,肺微血管内皮细胞却是最早感受缺氧的细胞之一。故本研究通过离体培养的大鼠PMEC和大鼠主动脉平滑肌细胞(Aortic smooth muscle cell, ASMC),从细胞相互作用的角度研究缺氧对ASMC的作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠PMEC和ASMC的培养及鉴定

取健康成年Wistar大鼠,依我们研究所已经建立的方法培养PMEC[3]和ASMC[4]。

1.2 PMEC缺氧处理及培养液的制备

利用本研究所研制的缺氧舱[5]对PMEC缺氧处理24 h,另备常氧组。收集PMEC的常氧培养液(Normoxia conditioned medium, NM)和缺氧培养液(Hypoxia conditioned medium, HM),-20 ℃冻存备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329)
作者简介:王关嵩(1967-),男,河南省平顶山市,博士研究生,讲师,主要从事低氧肺动脉高压发病机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2000-01-05;修回日期:2000-05-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 ASMC 的处理

将培养至第4代的ASMC用1%小牛血清培养24 h后分为常氧组(Normoxia group, NG)，缺氧组(1%O_2; Hypoxia group, HG)，NM组和HM组。每组24孔样本，观察各组ASMC的生长状况。

1.4 细胞周期的检测

将ASMC悬液以2×10^4/ml细胞密度接种于培养瓶(25 ml)内，培养24 h后，分组处理24 h，收集细胞，冰浴，70%酒精固定后碘化丙锭染色，用流式细胞仪(FAC Star, Becton Dickinson)检测各周期的细胞数及占总细胞数的百分比。用FITC染色后用绿色荧光测蛋白质含量。

1.5 ^{3}H-TdR 摄取量的测定

取ASMC悬液，以5×10^4/ml放入24孔培养板培养24 h，NG和HG换无血清M199培养液，NM和HM组换成NM和HM培养，除HG缺氧外，其余组均为常氧培养。18 h时各孔加1.25 μCi/ml的^{3}H-TdR，24 h时收取样本，用β-液体闪烁计数器(Back β LKB-1217)测定每分钟衰变数(dpm)。

1.6 统计学处理

所得数据采用方差分析，结果以$\bar{x}\pm s$表示。细胞周期数采用总体率假设检验，^{3}H-TdR量采用t检验。

2 结果

2.1 ASMC 的光镜和超微结构

HM组的ASMC在光镜下可见细胞呈棱型，胞体增大，细胞聚集，排列有明显向极性。电镜下可见胞核较大，胞浆内含丰富的粗面内质网，线粒体等细胞器。HG组的细胞也呈棱型增生，细胞均匀分布、无向极性。NG组和NM组细胞的形态相似，均呈现扁平行，有多个胞浆突起，细胞疏松分散。

2.2 HM 组 ASMC ^{3}H-TdR 摄取量的影响

HM组ASMC的^{3}H-TdR摄取量明显升高，与其它3组比均差异非常显著($P<0.01$)。NG组与HG组相比差异显著($P<0.01$)，见表1。

表1 HM组ASMC(1×10^4)^{3}H-TdR摄取量的影响(A/Bq)

Tab 1 The effect of HM on ^{3}H-TdR in ASMC(1×10^4)(A/Bq)

Group	1	2	3	4	5	$\bar{x}\pm s$
NG	58.12	59.05	53.43	56.82	57.78	57.04±2.16
HG	72.73	69.95	72.53	71.30	71.25	71.62±1.22△
NM	67.93	70.58	72.85	69.87	72.02	70.65±1.92△
HM	104.42	108.28	111.40	108.95	112.28	108.05±2.54△△

NG: Normoxia group; HG: Hypoxia group; NM: Normaxia conditioned medium; HM: Hypoxia conditioned medium; △: $P<0.01$ *vs* NG; △△: $P<0.001$ *vs* HG、NG or NM

2.3 HM 对细胞周期和蛋白质含量的影响

HM组的ASMC的S期细胞数目最多，与其它3组比差异非常显著($P<0.001$)。NG和NM组的S期细胞数均和HG差异显著($P<0.01$)。HM组蛋白质含量最低，见表2。

表2 HM对细胞周期和蛋白质含量的影响

Tab 2 The effect of HM on cell phase and protein contents

Group	G_0/G_1	S	G_2/M	Total protein(%)
HG	2 837(85.32%)	412(12.39%)△	76(2.28%)	60.53△
NG	3 975(53.28%)	3 237(43.39%)	248(3.59%)	86.92
NM	3 992(58.11%)	2 217(32.27%)△△	661(9.78%)	80.92
HM	2 465(35.66%)	4 059(59.24%)△	389(5.63%)	52.37△△

△: $P<0.01$ *vs* NG; △△: $P<0.001$ *vs* HG、NG or NM

3 讨论

既往实验结果和临床观察中，发现肺毛细血管床，不仅是进行气体交换的场所，且具有选择性摄取、储存、输送或降解破坏活性递质的能力。因此肺内皮组织在维持机体内环境的平衡稳定中，具有重要的调节和控制能力。形成肺小动脉内皮细胞间连接点的严密度远不如肺泡上皮细胞之间的连接。从静脉毛细血管到达小静脉中，接点的完整性，逐渐显著地减退。故静脉侧的水分、溶质和递质等，能方便地与肺间质相交流。

在慢性缺氧的过程中，ASMC的增殖所受影响的原因很复杂。本实验结果表明，缺氧的肺微血管内皮细胞的培养液可以促进ASMC的增生，使其^{3}H-TdR摄取量明显升高，S期细胞核增多。同时缺氧条件ASMC的细胞也呈增生状态，而且常氧条件下培养的微血管内皮细胞的培养液对ASMC也有轻微的促增殖效应。提示缺氧对ASMC的增生，微血管内皮细胞的旁分泌作用可能处于主导地位。已有研究指出微血管内皮细胞在常氧或缺氧状态下，能够合成和分泌多种生长因子和活性物质，参与免疫反应和物质代谢并调节心血管功能，其中许多物质调节平滑肌细胞增殖，包括内皮素、内皮细胞生长因子(Vascular endothelial cell growth factor, VEGF)、一氧化碳等。而内皮素和VEGF是强烈促平滑肌细胞增殖的物质。此外缺氧还可以使PMEC形成新的毛细血管网络[6]。肺血管内皮细胞能合成和分泌多种生物活性物质，参与免疫反应、物质代谢和心血管功能的调节，从而维持肺循环的稳定，并在多种病变生理过程中起重要作用。肺动脉内皮细胞(PAEC)结构和功能的受损或改变，及其对肺动脉平滑肌细胞(PASM)的调节障碍可能是肺动脉高压发生和发展的基础。

故推测，生理状态下，抑制和促进平滑肌细胞生长的物质处于一种动态的平衡状态。缺氧等病理状态下，可能促进生长的物质或因子处于优势，从而使平滑肌细胞出现异常增生，导致疾病发生。肺血管内皮细胞通过下述不同的机制调节肺血管阻力和肺动脉压：①通过转化和摄取作用调节血液中血管活性物质的质和量，从而影响肺血管平滑肌张力；②通过产生内皮细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞舒张和收缩因子(Endothelium derived relaxing and contracting factors, EDRF 和 EDCF)及其它的血管舒缩因子调节肺血管平滑肌张力;③通过产生生长因子和生长抑制因子而调节平滑肌细胞的增生和肥大,从而参与血管壁的结构改建;④通过内皮细胞表面的作用调节血液流动性;⑤肺动脉平滑肌细胞反应性的改变及其分泌的生物活性物质对于肺动脉平滑肌张力和血管壁的结构改建产生一定作用[7]。

参考文献:

[1] Golden C I, Kohler J P, Nick H S, *et al*. Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cell[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995, 12(5): 503—512.

[2] Dodge A B, Lu X, D'Amore P A. Density-dependent endothelial cell production of an inhibitor of smooth muscle cell growth[J]. J Cell Biochem, 1993, 53(1): 21—31.

[3] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 等. 大鼠肺微血管内皮细胞肺动脉内皮细胞培养的探讨[J]. 当代地方科技杂志, 1997, 12(Suppl): 79—80.

[4] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 等. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(4): 348—350.

[5] 谢崧, 钱桂生, 杨晓静. 一种用于研究的经济适用缺氧小容器[J]. 第三军医大学学报, 1998, 21(1): 92—93.

[6] Phillips P G, Bimby L M, Narendran A, *et al*. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cell[J]. Am J Physiol, 1995, 268(5 Pt 1): L789—800.

[7] Suzuma K, Takag H, Otani A, *et al*. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(6): 1 028—1 035.

(编辑　薛国文)

文章编号: 1000-5404(2000)09-0833-01

经验与短篇

改良上颌𬌗垫矫治器治疗乳牙反𬌗

Treatment of deciduous teeth crossbite with modified maxillary occlusal pad appliance

裘松波, 汪志德, 周正贵, 林景春　(第三军医大学附属新桥医院口腔科, 重庆 400037)

乳牙反𬌗在临床并不少见, 对其施行早期矫治, 可促进颌骨的正常发育, 改善面形容貌, 并对防止恒牙反𬌗有积极作用[1]。作者应用自行设计的改良𬌗垫活动矫治器, 即在上颌𬌗垫矫治器的前牙区增设冠状斜面导板, 已矫治乳牙反𬌗 16 例, 疗效满意, 为临床治疗乳牙反𬌗提供了一种更有效的方法。

1　材料与方法

1.1　临床资料

选择乳牙反𬌗患者 16 例, 其中男性 5 例, 女性 11 例, 开始治疗年龄最小为 2 岁 8 个月, 最大为 5 岁。选择标准: 临床检查乳前牙反𬌗, 轻度 III 类面型, 乳牙列无严重龋病、缺损或松动, 年龄为 2.5～5 岁。所有病例在治疗结束后随访 6 个月。

1.2　矫治器设计与制作

在工作模型上制作常规上颌𬌗垫式活动矫治器后, 再用自凝塑料在 $\frac{\text{IIIII I}}{\text{I II III}}$ 腭侧, 沿牙长轴制作冠状唇向斜导板, 斜度为斜面与水平面夹角大于 45 ℃左右, 斜面超过切缘约 5 mm, 口外完成矫治器后戴入口内调试𬌗垫及导板的厚度, 要求达到: ①𬌗垫厚度在最薄处不小于 2 mm, 否则易被咬碎或咬穿。②导板斜面光滑, 便于下颌自由后退。当下颌后退咬合时, 下后牙尖距𬌗垫约 1～2 mm。下前牙与斜面呈广泛接触。

要求患儿 24 h 不间断戴矫治器, 吃饭时亦戴, 但要进软食; 饭后要取出洗净后再戴。每周复诊 1 次。复诊时检查牙齿咬合关系及是否存在松动牙, 并检查患儿戴矫治器时, 当下颌后退咬合后, 下乳磨牙是否咬及𬌗垫, 若咬及𬌗垫则需磨低𬌗垫或在斜导板斜面增加自凝塑料, 始终使下后牙离开𬌗垫 1～2 mm。连续戴矫治器直到反𬌗被解除。

2　结果

16 例患儿经用改良𬌗垫矫治器治疗后, 反𬌗全部被解除, 磨牙呈广泛接触关系。除 2 例乳前牙呈对刃𬌗关系外, 其余病例覆𬌗覆盖正常。治疗时间最短为 7 d, 最长为 30 d, 平均治疗时间为 14.5 d。在治疗结束 6 个月后, 随访所有病例, 无反𬌗复发现象。

(下转 837 页)

作者简介: 裘松波(1962—), 男, 浙江省宁波市人, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事口腔材料的生物学性能方面的研究。电话: (023)68755114-74645

收稿日期: 1999-12-05; 修回日期: 2000-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net