DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.035
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0085-04

论著

缺氧时培养的肺动脉平滑肌细胞的增殖与内皮素自分泌关系的探讨

王培勇[1],刘 健[2],曾 强[3],许蜀闽[1],王俊元[1],孙秉庸[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系高原医学研究室、病理生理学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[3]解放军总医院老年病研究所,北京 100853)

提 要 目的:缺氧能否通过影响血管平滑肌细胞血管活性肽的自分泌功能而参与缺氧性肺动脉高压的发生尚不明确,本实验在培养的新生小牛肺动脉平滑肌细胞(PASM)上探讨内皮素-1(ET-1)自分泌在其中的作用。方法:采用^{3}H-TdR掺入研究PASM增殖,放免测定和斑点杂交技术研究ET-1的分泌和表达。结果:无氧培养(0%O_2)24 h使新生小牛肺动脉平滑肌细胞(PASM)的^{3}H-TdR掺入与常氧组相比增加42.3%($P<0.001$),ETA受体拮抗剂BQ123(10^{-6}mmol/L)使常氧培养的PASM的^{3}H-TdR掺入降低47%($P<0.01$),但对缺氧培养条件下PASM的^{3}H-TdR掺入无显著影响。采用放免测定发现,缺氧培养3~48 h导致PASM的ET-1分泌降低非常显著($P<0.01$)。斑点杂交显示,缺氧同样抑制PASM的ET-1的mRNA表达($P<0.01$)。结论:ET-1参与常氧情况下PASM增殖的调节,而与缺氧引起的PASM过度增殖无关,缺氧可通过抑制PASM的ET-1 mRNA的表达而抑制ET-1的合成和分泌。

关键词 缺氧;肺动脉平滑肌细胞;内皮素-1
中图法分类号 R349.21;R845.22 文献标识码 A

A study on proliferation and endothelin excretion of cultured pulmonary artery smooth muscle cells under anoxia

WANG Pei-yong, LIU Jian, ZENG Qiang, XU Shu-min, WANG Jun-yuan, SUN Bing-yong (Department of pathophysiology, Faculty of High Altitude Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To explore the role of alterations of autocrine function of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMs) in the development of hypoxic pumonary hypertension (HPH). Methods: The effect of hypoxia on proliferation of cultured new born bovine PASMs and its relationship with endothelin-1 (ET-1) autocrine were investigated with ^{3}H-TdR incorporation, immunochemistry, dotting hybridization and radioimmunoassay. Results: In response to hypoxia (0%O_2) for 24 h, ^{3}H-TdR inorporation of PASMs increased significantly by 42% ($P<0.001$ compared with control group). ETA receptor inhibitor BQ123 (10^{-6} mmol/L) inhibited ^{3}H-TdR incorporation by 47% ($P<0.001$) under normoxia, but exerted no effect under hypoxia condition. Immunochemistry showed positive staining of ET-1 in PSAM. ET-1 mRNA expression and ET-1 secretion decreased significantly when PSAMs were incubated under hypoxic condition from the 3rd to 48th h ($P<0.01$ *vs* control). Conclusion: ET-1 autocrine by PASMs regulates proloferation of themselves under nomoxia but not hypoxia. Hypoxia attenuates ET-1 synthesis and release by reducing ET-1 mRNA expression.

Key words hypoxia; pulmonary artery smooth muscle cell; endothelin-1

急性和慢性缺氧均可导致肺动脉高压,肺血管床特别是肺小动脉平滑肌收缩和结构改建(Remodeling)是缺氧性肺动脉高压(Hypoxic pulmonary hypertension, HPH)形成和维持的基础,其中血管壁平滑肌增殖为其主要特征。尽管对其机制进行了大量研究,但仍有许多环节尚不明确。目前已知,除了血管内皮细胞分泌血管活性成份以旁分泌的方式调节血管平滑肌的舒缩

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39270316)
作者简介:王培勇(1966.2),男,山东省清城县人,博士,副教授,主要从事心血管病理生理学方面的研究,发表论文53篇。电话:(023)68752340
收稿日期:1998-09-30;修回日期:1999-07-12

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

和增殖外，血管平滑肌细胞本身也能以自分泌的方式产生许多血管活性成份[1]。研究表明，肺动脉内皮细胞通过旁分泌内皮素-1(Endothelin-1，ET-1)在 HPH 的发生中起重要作用，但缺氧能否通过影响平滑肌细胞自分泌 ET-1 而参与缺氧性肺血管收缩和结构改建尚未见报道。因此，本实验动态观察了缺氧对培养的小牛肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary artery smooth muscle cells，PASM)ET-1 自分泌的影响，并研究其变化的机制，以探讨平滑肌ET-1 自分泌功能的改变在 HPH 发生中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胰蛋白酶 (DIFICO，1∶250)，RPMI 1640(JR SCIENTIFIC INC. USA)，ETA 受体拮抗剂 BQ123 和 ET-1 cDNA 及 ET-1 单克隆抗体 (Penisula Lab，USA)，ET-1 测定试剂盒 (北方免疫试剂研究所)，抑肽酶和地高辛配基标记与检测试剂盒 (德国 Boehringer Mannheim)，无氧混合气 (N_2 中含 5%CO_2，重庆气体制造厂)，^{3}H-标记胸腺嘧啶核苷(中国原子能科学研究所)，S-P 免疫组化染色试剂盒 (福建迈新生物技术开发公司)，其它试剂均为国产或进口 AR 级。所用的培养器皿为 COSTAR 产品。

1.2 细胞培养

取新生小牛活杀后用 5% CO_2 孵箱培养 PASM[2]，培养成功后采用 3～10 代细胞进行试验。采用台盼蓝染色法鉴定细胞活力。取对数生长期的 PASM，以 10^4/cm^2 的密度传代接种于培养瓶后加入含 20%小牛血清的 RPMI 1640 培养 2～3 d，待细胞汇合成单层后换为含 1%透析和灭活的贫血小板小牛血清的培养基，分组进行下述实验。

1.3 ^{3}H-TdR 掺入的增殖分析

PASM 按每孔 2 万细胞接种于 96 孔培养板，长成单层后换含 1%经透析和灭活的贫血小板血清 RPMI 1640 培养基，将细胞分为下述各组：常氧组、缺氧组、常氧＋BQ123 组和缺氧＋BQ123 组。常氧组置 21%O_2 的 CO_2 孵箱培养；缺氧组置于缺氧培养箱内，通入无氧混合气，平衡后测定的氧浓度约为0.034%(0～0.7%，下同)。培养 24 h，最后 6 h 加入 ^{3}H-TdR(0.5 μCi/孔)，收集细胞后用 β-液体闪烁计仪(Rack β LKB-1217，芬兰)测 Bq。

1.4 ET-1 的免疫组化染色

将 PASM 接种于 24 孔培养板内的玻片上，生长成层后换含 1%经透析和灭活的贫血小板血清 RPMI 1640 培养基，分常氧和无氧组，n＝5。培养 24 h 后，将细胞用 4%多聚甲醛固定，应用 S-P 法进行 ET-1 免疫组化染色，以棕黄色为阳性。用真彩色医学图像分析系统 (空军总医院 CMIA S007) 测其积分光密度 (IOD) 值，作为细胞内 ET-1 的相对含量。

1.5 ET-1 放免测定和 ET-1 mRNA 斑点杂交

PASM 按 10^4/cm^2 细胞密度接种于 3025 培养瓶，培养方法同上。将细胞分为常氧组和缺氧组，缺氧方法同上。上述每组又分为 1.5、3、6、12、24 和 48 h 等 6 个不同的时相点，以动态观察 ET-1 的分泌和表达变化。根据上述分组，取培养上清液按药盒说明书测定 ET-1 含量，将细胞用 0.1%胰蛋白酶消化收集，用冷的 PBS 液(pH 7.2)冲洗，离心后速冷于－196 ℃的液氮中保存备用。

1.5.1 PASM 总 RNA 的提取 将液氮中冻存的 PASM 取出复融，按酚-氯仿-异硫氰酸胍法[3]略加改进提取 RNA。所提的 RNA 溶于 0.1% DEPC 处理水中，应用 UV-240 多功能紫外分光光度仪(日本津岛)三复管测定各例总 RNA 的 260 nm、280 nm D 值和二者比值，结果 $D_{260/280}$ 比值均在 1.8 以上，RNA 置－70 ℃冷冻备用。

1.5.2 ET-1 cDNA 探针标记及斑点印迹杂交 将 1.3 kb 人 ET-1 cDNA 煮沸变性后，按照地高辛配基标记与检测试剂盒说明书，用地高辛配基随机引物法标记探针，并冷置备用。从每组 PASM 的 RNA 中分别取 20 μg 用样品稀释液(20× SSC ∶37%甲醛＝1∶1)稀释至 10 μl，65 ℃水浴 15 min 使 RNA 充分变性后点于硝酸纤维素膜上，80 ℃真空烤膜 2 h。烤好的 NC 膜放入 20 ml 预杂交液[50%甲酰胺、5× Denhardt、6× SSPE、0.1%十二烷酰肌氨酸纳(Sarcoayl)、0.02%SDS] 中 42 ℃震荡预杂交 6 h，将膜取出置入杂交液中 (预杂交液成分加地高辛配基标记 cDNA 探针 25 ng/ml 及经超声打碎热变性的鲑鱼精 DNA 100 μg/ml)42 ℃杂交 24～36 h。杂交后的 NC 膜按地高辛配基标记与检测试剂盒说明进行洗膜、10× Denhardt 封阻，之后与抗地高辛抗体 (1∶5 000) 于 37 ℃反应 30 min，再漂洗去多余抗体后进行显色。终止显色，湿膜用薄层色谱扫描仪 (CS-910 日本岛津)和图像分析仪 (C-RIB 日本岛津)进行光密度扫描和分析，测定积分光密度代表 mRNA 相对含量。所得数据以相对于常氧的百分比(100%)表示，求 3 次试验的均值。

1.6 统计学分析

所得数据采用多因素(Super ANOVA)方差分析，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，做方差保护下的最小差值显著性检验。

2 结果

2.1 ET-1 免疫组化染色

缺氧 6～48 h 后，相差显微镜下观察 PASM 的形态无显著变化，台盼蓝染色表明细胞活力均大于 95%。21%O_2 组 PASM 的 ET-1 染色可见密集的阳性反应颗粒，呈黄褐色，与 0%O_2 组 PASM 胞浆内 ET-1 染色阳性反应相似。两组呈阳性反应的细胞数占该组细胞总数的 90%以上。图像分析结果表明常氧 24 h 细胞 ET-1 免疫组化染色积分光密度值(IOD)与无氧组差异不显著(积分光密度值分别为 3 747.23±1 352.9 和 3 854.21±958.38，P＞0.05)。见图 1。

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

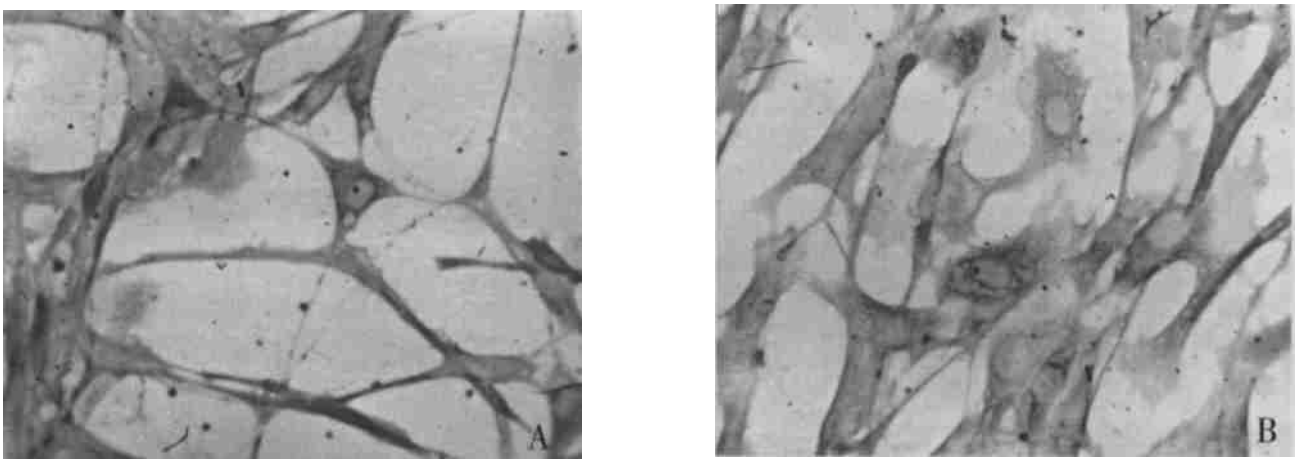


图 1　培养的肺动脉平滑肌细胞 ET-1 免疫组织化学染色　（S-P×250）　A：21%O_2＋5%CO_2；　B：0%O_2＋5%CO_2

Fig 1　Endothelin-1 immunohistochemistry staining in pulmonary arterial smooth muscle cells cultured in normoxic (A) and hypoxic (B) conditions　（S-P×250）

2.2　缺氧对 PASM 细胞 ET-1 自分泌的影响

培养的 PASM 细胞的 ET-1 分泌速度于 3～6 h 达高峰，12 h 后随培养时间的延长而逐渐降低。缺氧情况下，ET-1 分泌显著减少，其减少的程度与孵育时间有关，缺氧 3～6 h ET-1 分泌约降低 58%～66%（$P<0.001$）；缺氧 12～48 h ET-1 分泌约降低 15%～33%（$P<0.01$）。见图 2。

2.3　缺氧对 PASM 的 ET-1 mRNA 表达的影响

斑点杂交显示，缺氧使 PASM 的 ET-1 的 mRNA 表达显著受抑制（$P<0.01$）。见图 3。

2.4　ETA 受体拮抗剂 BQ123 对 PASM 增殖的影响

常氧培养的 PASM 于培养基中加入 10^{-3} mmol／L 的 BQ123 培养 24 h，其 ^{3}H-TdR 掺入显著减少，约减少 47%（$P<0.001$），缺氧（0%O_2）培养条件下培养 24 h 后，PASM 的 ^{3}H-TdR 掺入显著增多，与常氧组相比约增加 42%（$P<0.001$），缺氧培养的 PASM 加入 10^{-3} mmol／L 的 BQ123，其 ^{3}H-TdR 掺入与缺氧组相比无显著变化。见图 4。

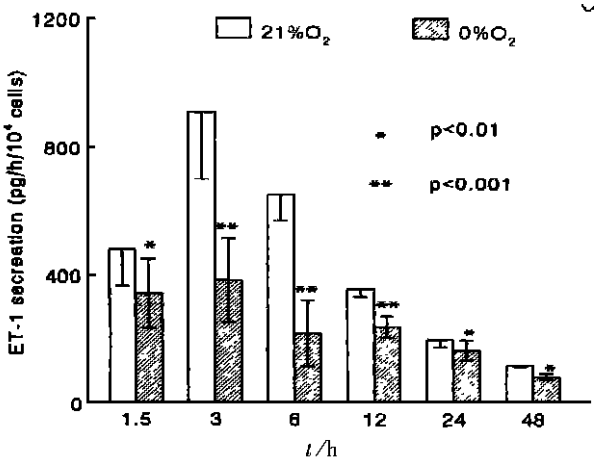


图 2　缺氧对 PASM 自分泌 ET-1 的影响（$n=3$）

Fig 2　Effect of hypoxia on ET-1 autocrine by PASM (n =3)　*：$P<0.01$，　**：$P<0.001$ *vs* 21%O_2

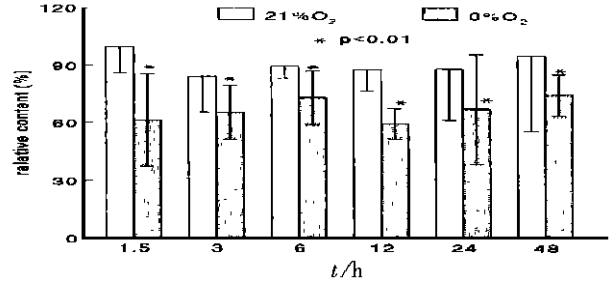


图 3　缺氧对 PASM 的 ET-1 mRNA 表达的影响（$n=3$）

Fig 3　Effect of hypoxia on ET-1 mRNA expression in PASM（$n=3$）　*：$P<0.01$ *vs* 21%O_2

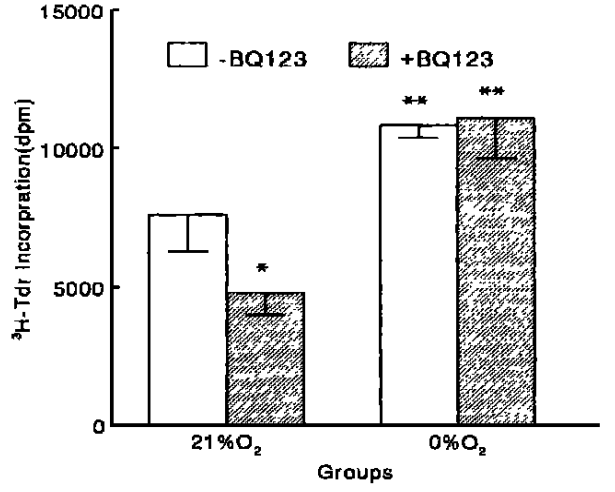


图 4　ETA 受体拮抗剂 BQ123 对常氧和缺氧 PASM 增殖的影响（$n=5$）

Fig 4　Effect of 10^{-3} mmol／L BQ123, ETA receptor inhibitor on PASM proliferation under normoxia and hypoxia (n =5)　*：$P<0.001$ *vs* 21%O_2-BQ123 group；**：$P<0.001$ *vs* 21%O_2 groups

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

3 讨论

通常认为血管内皮细胞调节血管平滑肌细胞舒缩和增殖，前者是调节细胞，后者是效应细胞。但近年来许多研究表明，许多由内皮细胞分泌的活性调节成份也可以由平滑肌分泌[1]。肺血管平滑肌细胞在缺氧条件下的增生及收缩反应增强是导致肺血管壁增厚、非肌性血管肌化是肺动脉高压的重要条件之一，但其发生机制仍不十分清楚。肺血管平滑肌的舒缩和增殖调节失常是 HPH 发生和发展的基础，我们推测缺氧可能通过影响 PASM 血管活性物质的自分泌或旁分泌而参与上述过程。ET-1 是迄今发现的最强的内源性血管收缩肽，且对血管平滑肌细胞（VSMC）具有强的丝裂原作用，它可以由多种组织和细胞表达和分泌。文献[4, 5]报道缺氧可引起血管内皮细胞及肺组织 ET-1 表达增加，而 ET-1 的主要靶细胞是 VSMC，ET-1 通过与其膜上的 ETA 受体结合发挥生物效应。部分研究表明，血管平滑肌能分泌和表达 ET-1。Resink 等[6,7]发现，培养的人血管平滑肌细胞在血管紧张素 Ⅱ、血管加压素（AVP）、转化生长因子、血小板源性生长因子 -AA 等刺激下可分泌生理效应浓度的 ET-1。在培养的大鼠主动脉平滑肌细胞发现分泌的 ET-1 较内皮细胞低 30 倍，它可由氧化血红蛋白所诱导[8]。Cyclosporine A 也刺激培养的平滑肌细胞分泌 ET-1[9]。ET-1 是肺血管结构张力的重要自分泌/旁分泌调节因子。但 PASM 的 ET-1 自分泌及其表达在缺氧时有何改变尚未见报道。

我们的实验发现，缺氧 PASM 的 ^{3}H-TdR 掺入升高，ET-1 的 A 受体拮抗剂 BQ123 显著抑制常氧时 ^{3}H-TdR 掺入，而对缺氧 PASM 的 ^{3}H-TdR 掺入增加则无显著抑制作用。表明常氧情况下，PASM 的 ET-1 自分泌参与其自身增殖的调节，但缺氧时 ET-1 自分泌对其增殖无显著影响。进一步实验证明 PASM 细胞内 ET-1 免疫组化染色可见密集的阳性反应颗粒，提示它能合成 ET-1。采用放免测定发现 PASM 可向培养基中分泌 ET-1。缺氧对 PASM 细胞内的免疫组化染色无显著影响，却使其 ET-1 的分泌显著受抑制，mRNA 斑点杂交发现缺氧促使 PASM 的 ET-1 mRNA 表达显著减少。提示缺氧对 PASM 细胞内 ET-1 的含量无显著影响，但抑制 PASM 的 ET-1 向培养液释放及 ET-1 的 mRNA 的表达，这可能是缺氧性肺血管收缩和 PASM 增殖的一个制约因素。由于缺氧时 PASM 细胞活力无明显改变，ET-1 分泌减少显然不是由于细胞数量或活力改变所引起。其它一些实验证实缺氧可刺激血管内皮细胞的 ET-1 表达和分泌[4]。说明血管内皮细胞与血管平滑肌细胞对缺氧的反应不同。推测缺氧可能通过其它机制而不是通过自分泌 ET-1 促使 PASM 增殖，即可能通过其它促增殖的因子分泌增多、抑制增殖的因子分泌减少或缺氧直接作用于细胞内的某些环节引起增殖，这需要进一步的实验证明。

本实验观察到缺氧虽然可以导致培养的 PASM 增殖，但 ETA 受体的拮抗剂对其无抑制作用，而且缺氧也使 PASM 的 ET-1 的 mRNA 表达及 ET-1 自分泌减少。上述结果提示缺氧可抑制 PASM 的 ET-1 自分泌，ET-1 自分泌不参与体外缺氧性 PASM 增殖。

参考文献

[1] Dzau V J, Gibbons G H. Vascular remodeling: Mechanisms and implications[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1993, 21(Suppl): S1—S5.

[2] 王培勇，孙秉庸. 缺氧对肺动脉平滑肌细胞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—13.

[3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156—161.

[4] Kourembanas S, Marsden P A, McQuillan L P, *et al*. Hypoxia induced endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium[J]. J Clin Invest, 1991, 88(3): 1 054—1 060.

[5] Donahue D M, Lee M E, Suen H C, *et al*. Pulmonary hypoxia increases endothelin-1 gene expression in sheep[J]. J Surg Res, 1994, 57(2): 280—287.

[6] Scott B T, Resink T J, Hahn A W, *et al*. Induction of endothelin secret by AT Ⅱ: effects on growth and synthetic activity of VSMCs[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1991, 17(S7): S96—S103.

[7] Resink T J, Hahn A W, Scott B T, *et al*. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secreton in cultured human vascular smooth muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 168(3): 1303—1309.

[8] Kasuya H, Weir B K, White D M, *et al*. Mechanism of oxyhemoglobin-induced release of ET-1 from cultured vascular endothelial cells and smooth muscle cells[J]. J Neurosurg, 1993, 79(6): 892—897.

[9] Takeda Y, Itoh Y, Yoncola T, *et al*. Cyclosporine A induces ET-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 1993, 233(2~3): 299—305.

（编辑 张大春）

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