DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.004

Na^+ /H^+ 交换器在缺氧性肺动脉高压中的作用*

姚 伟** 杨晓静 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 目的:探讨 Na^+ /H^+ 交换器(NHE)在缺氧性肺动脉高压大鼠模型肺动脉平滑肌细胞中的表达。方法:30只 Wistar大鼠,随机分为3组,分别为:正常对照组,缺氧3周组和缺氧8周组。分离肺动脉平滑肌,测定细胞内 pH(pHi),并提取总 RNA,应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,比较各组中 NHE-1 mRNA的表达。结果:缺氧组肺动脉平滑肌细胞 pHi较正常对照组显著增高($P<0.01$),NHE-1 mRNA表达也显著高于正常对照组($P<0.01$),缺氧两组间差异不显著。结论:Na^+ /H^+ 交换器参与调节肺动脉平滑肌细胞 pHi,从而在缺氧性肺动脉高压形成和发展中可能起重要的作用。

关键词 Na^+ /H^+ 交换器;肺动脉高压;血管平滑肌细胞;细胞内 pH
中图法分类号 R544;R563;R845.22

Na^+ /H^+ 交换器(Sodium hydrogen exchange, NHE)是存在于细胞膜上的一种离子交换蛋白,介导1∶1的细胞外钠离子和细胞内氢离子交换,其中NHE-1分布最为广泛,在调节细胞内 pH(pHi)中起着重要作用。近年来的研究发现:NHE-1活性增高与血管平滑肌细胞增殖有着密切关系[1]。本研究拟探讨在缺氧性肺动脉高压时,肺动脉平滑肌细胞 NHE-1信使 RNA(mRNA)的表达变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

BCECF-AM, Nigericin购自美国 Sigma公司,M-MuLV反转录酶和 Taq酶购自美国 Fermentas公司,PCR仪为美国 Bio-Rad公司产品,LS-50B光度计为美国 Perkin Elmer公司生产。

1.2 动物模型复制

雄性 Wistar大鼠30只,体重 200~250 g,随机分为:对照组(CG)、缺氧3周组(I组)和缺氧8周组(II组),每组各10只。参照薛全福等[2]方法复制常压缺氧肺动脉高压模型,缺氧舱内氧气浓度 10%±0.5%,二氧化碳浓度 <1.5%,缺氧 8 h/d,6 d/周。

1.3 检测指标

模型复制后,动物经 10%乌拉坦腹腔麻醉,参照孙波等[3]报道的方法,测定平均肺动脉压(mPAP),并于缺氧舱内经颈动脉抽取动脉血作血气分析。剖胸取动物心脏和肺脏,分离肺动脉干及左右肺动脉,按照 Silverman等[4]方法分离平滑肌层,游离右心室(RV)和左心室加室间隔(LV+S),分别称重。右心室肥大指数为:RV/(LV+S)×100%。肺脏、右心室肌标本常规石蜡制片,HE染色。

1.3.1 肺动脉平滑肌细胞 pHi测定 用荧光探针 BCECF检测法。参照 Silverman等[4]方法,纵行将肺动脉平滑肌剪为 1 mm×8 mm大小,固定于荧光比色杯架上,测定平滑肌细胞 pHi,BECEF-AM及 Nigericin浓度分别为:10 μmol/L和 6.7 μmol/L。激发波长为 495 nm和 440 nm,发射波长为 530 nm。每一平滑肌条测定后均做校正曲线。

1.3.2 PCR引物 根据 Orlowski[5]克隆的大鼠 NHE-1基因序列,PCR软件辅助设计一对引物序列如下:5′端引物 5′-TTCCCCATGTGTGATCTGTTCC-3′,3′端引物 5′-TCTCCATCTTGTGGTAGAAGC-3′,PCR扩增产物为 325 bp;以β-actin为内参照,引物序列如下:5′端引物 5′-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′,3′端引物 5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′,PCR扩增产物为 587 bp。

1.3.3 总 RNA的提取 按照异硫氰酸胍一步法[6]提取肺动脉平滑肌细胞总 RNA,1%甲醛变性凝胶电泳定性分析;紫外分光光度计对 RNA样品进行含量及纯度检测,D_{260}/D_{280}=1.8~2.0。

1.3.4 RT-PCR 取 3 μg总 RNA,反转录按照试剂盒的方法加以改进,MMLV 40U,Oligo(dT)$_{18}$ 2.0 μl,dNTP 2.0 μl,反应总体积为 20 μl,37℃反应 60 min后,95℃变性 5 min;反转录产物全部用于 PCR。PCR 4种引物各 5 μl(终浓度 0.25 μmol/L),Taq酶 2.5 U,总反应体积为 100 μl;变性、退火和延伸条件:94℃ 40 s;56℃ 50 s;72℃ 90 s,共 35循环;末次延时间为 10 min。取 10 μl反应产物在 2%琼脂糖凝胶电泳,以 PCR Marker为分子量标准,电泳后于紫外灯下照相,见图 1,照片经薄层扫描仪扫描后,应用 Adobe Photoshop软件测得电泳条带积分光密度值,以 NHE-1和β-actin电泳条带光密度值之比(e/c)作数据分析,以其比值反映 NHE-1 mRNA的表达程度。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39870352
** 姚 伟,男,26岁,住院医师,硕士研究生
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 1　肺动脉血管平滑肌细胞 NHE-1 mRNA的变化　(RT-PCR)

A: PCR marker　B: 正常对照组

C: 缺氧 3周组　D: 缺氧 8周组

Fig 1　Changes of NHE-1 mRNA expression in pulmonary artery smooth muscle cell (RT-PCR)

A: PCR marker　B: Control group

C: 3 weeks' hypoxic group　D: 8 weeks' hypoxic group

1.4　统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$表示,用 Excel 97软件进行 t检验分析。

2　结果

2.1　肺动脉压、血气分析及右心室变化

如表 1所示,缺氧 3周及 8周组 PaO_2显著低于对照组($P<0.001$),mPAP和右心室肥大指数显著高于对照组,缺氧两组间差异均不显著。心肺病理切片光镜结果提示:缺氧两组肺动脉肌层增厚,管腔变窄,右心室心肌细胞增大,胞核增大,深染。说明本实验成功复制了缺氧性肺动脉高压大鼠模型。

2.2　PHi测定结果

缺氧 3周和 8周组肺动血管平滑肌细胞 PHi分别为:(7.52± 0.10)和(7.57± 0.12),明显高于正常对照组(7.36± 0.12)($P<0.01$),两组间差异不显著,见表 2

2.3　RT-PCR结果

缺氧 3周组和 8周组 e/c分别为: 0.53± 0.10, 0.60± 0.13,显著高于对照组 0.27± 0.20($P<0.001$),提示肺动脉高压大鼠肺动脉血管平滑肌细胞 NHE-1 mRNA表达水平显著提高,见表 2

表 1　肺动脉高压大鼠肺动脉压、右心室重量及血气分析结果变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes in pulmonary artery pressure, weight of right ventricular and blood gas analysis($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PaO_2(ρ/kPa)	$PaCO_2$(ρ/kPa)	mPAP(ρ/kPa)	右心室肥大指数(%)
CG	10	13.7± 0.44	5.41± 0.36	2.58± 0.19	28± 2.0
Ⅰ	10	5.90± 0.45**	4.59± 0.19*	4.12± 0.21**	38± 2.6*
Ⅱ	10	5.98± 0.47**	4.18± 0.28*	3.98± 0.25*	42± 2.1**

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$ *vs* CG

表 2　肺动脉平滑肌细胞 pHi NHE-1 mRNA表达的改变

Tab 2　Changes in pHi and NHE-1 mRNA expression of pulmonary artery smooth muscle cell

Group	n	pHi	e/c (NHE-1/β-actin)
CG	10	7.36± 0.12	0.27± 0.20
Ⅰ	10	7.52± 0.10*	0.53± 0.10**
Ⅱ	10	7.57± 0.12*	0.60± 0.13**

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$ *vs* CG

3　讨论

缺氧性肺血管收缩和肺血管重建在缺氧性肺动脉高压的形成和发展中起着重要的作用,其主要特征为:血管平滑肌细胞增殖所引起的血管壁中层肥厚,而且一旦形成,将很难以治疗。许多学者都强调肺血管各种细胞,尤其是平滑肌细胞,其分化和增殖是肺血管重建的关键。pHi在调节细胞(包括肺动脉平滑肌细胞)增殖中起着"容许性"(Permissive)的作用。人们发现[7]:当 PDGF等有丝分裂原作用后,细胞发生细胞内碱化,而且与其产生的细胞增殖有关;相反,当出现细胞内酸化时,细胞表现为生长抑制或凋亡,甚至死亡。我们的实验证实:肺动脉高压大鼠中,缺氧 3周和 8周组肺动脉血管平滑肌细胞 pHi(7.52± 0.10和 7.57± 0.12)显著高于正常对照组(7.36± 0.12)($P<0.01$),说明在肺动脉平滑肌细胞增殖中,pHi可能也具有相同的调节作用。

NHE与 HCO_3^-/Cl^-等共同参与 pHi的调节,实验证实[1]:在肺动脉血管平滑肌细胞也具有 NHE,并在

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

调节 pHi中起着非常重要的作用。PDGF、EGF等有丝分裂原能够激活 NHE,使 pHi增高,从而诱发离体培养细胞增殖。但尚没有 NHE与缺氧性肺动脉高压中肺血管重建有关的证据。本实验采用 RT-PCR技术,检测了在缺氧性肺动脉高压大鼠,肺动脉平滑肌细胞 NHE-1 mRNA表达的变化,发现缺氧 3周及 8周组 mRNA表达显著高于正常对照组($P < 0.01$),结合其 pHi所发生的变化,我们有理由认为: NHE-1参与调节肺动脉平滑肌 pHi,使细胞内碱化,从而诱导细胞增殖,最终导致肺血管重建和肺动脉高压的发生。

近期, Quinn等[8]采用特异性的 NHE-1抑制剂-DMA及 EIPA,使用药组缺氧性肺动脉高压大鼠的肺动脉压及血管阻抗指数显著低于单纯缺氧组($P < 0.01$),进一步证实了我们的实验结果,为采用 NHE-1抑制剂或基因治疗缺氧性肺动脉高压提供了新的理论依据。

参考文献

1 Quinn D A, Dahlberg C G, Bonventre J P, *et al*. The role of Na^+ /H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14(2): 139

2 薛全福,谢剑鸣,胡长贵,等.常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立.中华结核和呼吸杂志, 1998, 12(6): 350

3 孙 波,刘文利.右心导管测定大鼠肺动脉压的实验方法.中国医学科学院学报, 1984, 6(6): 465

4 Silverman E S, Thompson B T, Quinn D A, *et al*. Na^+ / H^+ exchange in pulmonary artery smooth muscle from spontaneously hypertension and Wistar-Kyotorats. Am J Physiol, 1995, 269(5Pt1): L673

5 Orlowski J. Heterologous expression and functional proterties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na^+ /H^+ exchange. J Biol Chem, 1993, 268(22): 18369

6 Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochemistry, 1987, 162(1): 156

7 Berk B C, Eleder E, Mitsuka M. Hypertrophy and hyperplasia cause differing effects on vascular smooth muscle cell Na^+ /H^+ exchange and intracellular pH. J Biol Chem, 1990, 265(32): 19632

8 Quinn D A, Du H K, Thompson B T, *et al*. Amiloride analogs inhibit chronic pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(4 Pt 1): 1263

(收稿: 1998-11-16;修回: 1999-01-29)

(编辑 冷怀明)

Evaluation of the effects of Na^+ /H^+ exchange in hypoxic pulmonary hypertension in rats*

Yao Wei, Yang Xiaojing, Qian Guisheng (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To evaluate the effects of Na^+ /H^+ exchange (NHE) in hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Methods**: 30 rats were equally randomized into the control, the 3-week hypoxia and the 8-week hypoxia groups. At the end of the study, the rats were killed and the smooth muscle of the pulmonary artery was isolated. Intracellular pH (pHi) of the smooth muscle was determined with fluorescence measurement of the pH sensitive dye BCECF and the expression of NHE-1 mRNA was detected with RT-PCR. **Results**: The pHi value and the expression of NHE-1 mRNA of the myocytes of the pulmonary artery were significantly higher in the hypoxic groups than in the control but no difference was found between the 2 hypoxic groups. **Conclusion**: With the function of adjusting pHi, NHE-1 can play an important role in the remodelling of the pulmonary vasculature in pulmonary hypertension. This finding provides a new therapeutic measure for hypoxic pulmonary hypertension.

Key words Na^+ /H^+ exchange; pulmonary hypertension; myocyte; smooth muscle; intracellular pH; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39870352

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net