DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.029

缺氧时培养的心内膜内皮细胞活性肽分泌的改变

王培勇* 刘 健** 许蜀闽 高文祥 孙秉庸 罗德成 (第三军医大学基础医学部病理生理学教研室)重庆, 400038

曾 强 (解放军总医院)北京, 100853

提 要 目的: 观察培养的新生小牛右心室心内膜内皮细胞(EEC)血管活性物质的分泌功能及缺氧对其分泌的影响。方法: EEC采用刮取法培养,用放免法测定培养液中血管活性肽的含量。结果: 缺氧24 h(P_{O_2}约为0.8 kPa)使EEC的内皮素(ET-1)和心钠素(ANP)分泌显著增加($P < 0.01$),其分泌分别是常氧的1.9倍和1.6倍;缺氧也使EEC分泌内源性洋地黄因子(EDLF)显著增加($P < 0.05$),其分泌是常氧的1.7倍,但缺氧使EEC分泌血管紧张素(ATⅡ)降低18%($P < 0.05$)。结论: 缺氧可引起EEC多种血管活性因子的分泌发生改变。

关键词 缺氧;心内膜内皮细胞;心钠素;内皮素;血管紧张素;内源性洋地黄因子

中图法分类号 R542.4

心内膜内皮细胞(Endocardial endothelial cell, EEC)一直被认为仅仅是心脏内腔的衬里和屏障。但近年的研究发现,它与血管内皮细胞同样是一种多功能的细胞,除屏障功能和跨膜转运功能外,EEC能分泌血管活性物质,以旁分泌的方式调节心脏结构与功能;同时,经过血液循环,以循环内分泌的方式可作用于肺血管。此外,体液中的物质如神经递质、代谢产物等也可通过影响EEC的功能而调节心脏舒缩活动[1]。缺氧对机体的影响主要表现为缺氧性肺动脉高压(HPAH)和右心肥大(RVH)。缺氧情况下,右心静脉血氧分压是体内最低的部位,我们推测缺氧可能影响右心EEC的血管活性因子的分泌,从而参与HPAH和RVH的发生发展过程。本研究通过EEC体外培养的方法,在排除体内神经体液等因素的影响下,观察缺氧对右心室EEC心钠素(ANP)、内皮素(ET-1)、血管紧张素(ATⅡ)和内源性洋地黄因子(EDLF)等血管活性肽分泌功能的影响,旨在探讨缺氧因素与EEC活性物质分泌的关系。

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 Scientificinc USA), ET-1测定试剂盒(东亚免疫试剂研究所),心钠素、地高辛和血管紧张素测定试剂盒(北方免疫试剂研究所),无氧混合气(含5% CO_2+ N_2,由重庆气体制造厂制备),内皮素-1心钠素单克隆抗体(Penisula Lab, USA),Ⅷ因子相关抗原抗体和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。抑肽酶(Aprotenin, Boehringer Mannheim, Germany),所用的培养器皿为COSTAR产品。

1.2 EEC培养方法

新生小牛由牛奶厂提供,出生后禁食,于10 h内活杀。无菌下开胸,取出心脏。按以下方法培养EEC:将右心室用D-Hanks液冲洗3~5次,以洗净残存血液,然后将心室纵行剖开,翻出心内膜面,用10号手术刀轻轻刮取EEC,注意每个部位只能刮一次,收集细胞置入3025培养瓶中,用吸管吹打分散,加入含20%新生小牛血清的培养基,置CO_2孵箱37℃培养。长成单层后及时传代。用相差显微镜观察细胞的生长和形态特点。用0.4%台盼蓝检查细胞的活性,并应用S-P法[2]行ET-1、ANP和Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色,以棕黄色为阳性。

1.3 缺氧对EEC血管活性肽分泌的影响

将EEC按4×10^4/cm^2密度接种于3025培养瓶,加入10 ml含20%新生小牛血清的RPMI-1640培养基。37℃培养24 h,细胞贴壁伸展后吸弃培养液,更换含1%灭活并透析过的去血小板新生小牛血清培养基(10 ml),分常氧组和缺氧组。常氧组置于5% CO_2孵箱中培养,缺氧组置于含无氧混合气的密闭容器中培养。气体与培养液平衡后采用血气分析仪测定常氧组和缺氧组细胞培养液的氧分压分别为19.5±0.7 kPa(146.5±5.3 mmHg)和0.8±0.3 kPa(5.97±2.2 mmHg)。各组于培养的24 h收集培养液,加入抑肽酶(100 u/ml),置-70℃备测。同时用台盼蓝染色法计数每瓶的细胞数,并计算存活率。样本收齐后按药盒说明书测定ANP、ATⅡ、EDLF和ET-1,其分泌量以Pg/10^5 cells(活细胞)表示。

* 王培勇,男,30岁,讲师,博士研究生,现在北京医科大学心血管基础研究所,北京,100083

** 附属新桥医院心血管内科 重庆,400037

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

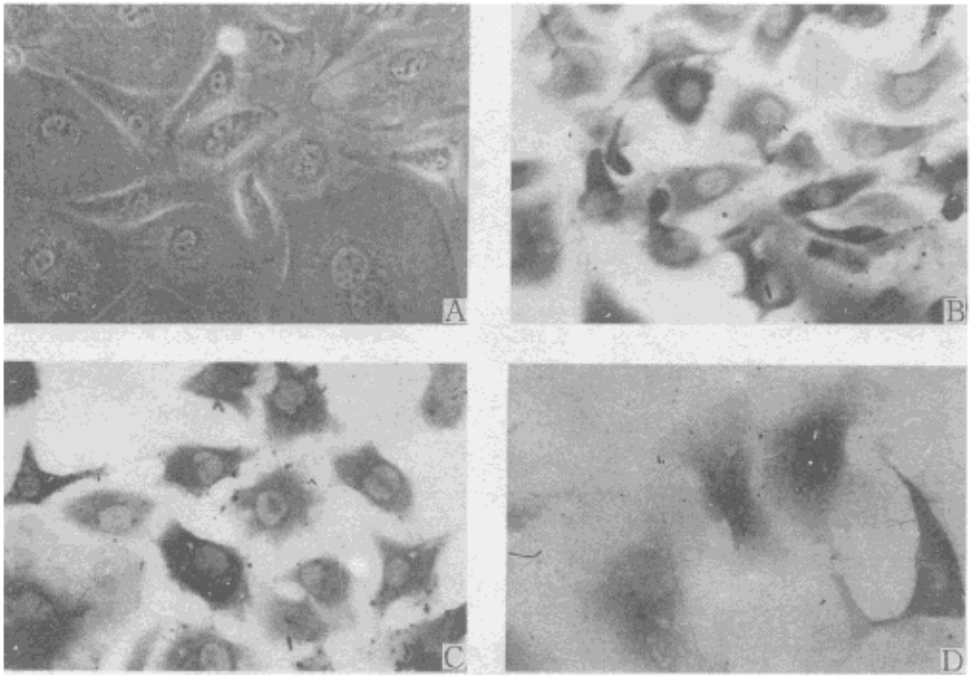
1.4 统计学分析

所得数据采用方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,做 Weltch t 显著性检验。

2 结果

培养的右心室 EEC于相差显微镜下观察呈单层生长,细胞大小不一致,多角形排列,细胞间以细小突起相交叠,细胞核周围颗粒丰富。台盼蓝染色发现,细胞存活率均大于 95%。免疫组化染色发现,ET-1和Ⅷ因子相关抗原染色均为阳性,ANP染色均为弱阳性。Ⅷ Ag染色在胞浆内分布较均匀,而 ET-1阳性颗粒多分布于核周围,证明培养成功。见附图。

缺氧情况下,EEC的细胞活性无显著变化,但是 ET-1和 ANP分泌显著增加($P < 0.01$),其分泌量分别是常氧的 1.9倍和 1.6倍,但缺氧使 EEC分泌 AT降低($P < 0.05$),见附表。



附图　常氧培养的右心室 **EEC**及免疫组化染色

A:培养的 EEC单层包含不同形态的细胞:梭型、大而扁平(相差× 100)

B:内皮素-1(ET-1)　C:Ⅷ因子相关抗原　D:心钠素(ANP)

Fig　Morphology and immunochemistry of cultured endocardial endothelial cell(EEC) from right ventricle

A: cultured EEC monolayer consists of heteroshaped cells: large flat, spindle(phase contrast× 100)　B: immuochemistry staining of endothelin-1(ET-1)　C: Ⅷ factor related antigen　D: atrial natriuretic peptide(ANP)(× 100)

附表　缺氧对 **EEC**分泌 **ET　ANP　EDLF**和 **AT**的影响(**pg/10⁶ cells**)

Table　Effect of hypoxia on ET-1, ANP, EDLF and AT autocrine by EEC

Group	*n*	Viability(%)	ET	ANP	EDLF	AT
Normoxic	6	98.6± 5.4	449.6± 157.2	22.77± 11.76	91.59± 37.86	129.78± 13.20
Hypoxic	6	98.0± 4.6	859.1± 148.8**	37.13± 8.49**	156.25± 73.80*	114.62± 13.65*

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* normoxic group

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

3 讨论

心血管系统不仅仅是血液循环的管道,而且是具有感受环境变化、传导信号、合成并释放旁分泌/自分泌生物活性物质、调节自身功能与结构从而维持机体循环内稳态的多功能的复杂器官。近年研究表明,EEC同样是一种多功能细胞,缺氧是否影响右心EEC活性因子的分泌及其是否参与HPAH和RVH的发生发展过程,经检索国内外均无报道。缺氧情况下,静脉血氧分压和氧含量最低,血流经右心房、右心室射血进入肺动脉,因此,右心EEC是全身缺氧最严重的部位。由于右心EEC在心血系统中处于这种特殊地位,我们推测右心EEC可能起着缺氧传感器的作用,即缺氧和缺氧后血液中的某些成份作用于EEC,使后者的活性因子分泌发生变化,经旁分泌方式作用于心肌组织,调节心肌舒缩,经循环内分泌方式作用于肺动脉,调节肺循环,从而参与缺氧性肺动脉高压(HPAH)和右心室肥大(RVH)的发生发展过程。

我们的实验中所培养的EEC无论在常氧还是缺氧情况下,细胞活力均大于95%,研究发现右心EEC具有活跃的分泌功能,它能分泌ET-1、ANP、EDLF和AT等血管活性因子。缺氧使EEC的ET-1和EDLF分泌显著增加。ET-1具有很强的缩血管和促VSMC增殖作用,并能刺激PAEC血管紧张素转换酶的活性。EDLF也是具有强大缩血管作用的活性多肽,可由心血管肺等组织分泌,EDLF通过抑制血管平滑肌细胞钠钾ATP酶,增加胞内钙,使血管收缩[3],而且EDLF可促进培养的PAEC ET-1的分泌[4]。推测缺氧时EEC分泌增多的ET-1和EDLF,可能随血液到肺循环,从而在缺氧肺血管收缩反应发生中起重要促进作用。有人观察到,EEC的ET基础释放水平调节心肌功能,而心肌毛细血管内皮细胞则无ET释放迹象[5]。ET-1和EDLF能对心脏产生强大的正性肌力作用[6],说明缺氧EEC分泌ET-1和EDLF的增多,在缺氧心肌代偿收缩增强和肥大中起重要作用。

ANP具有强大的舒血管作用,且能对抗多种血管收缩因子如AT、5羟色胺、去甲肾上腺素等的缩血管作用,吴建明等[7]报道ANP能显著地抑制ET-1和AT对VSMC的促增殖作用,也可cGMP依赖地抑制AT刺激的ET-1分泌,ANP还能抑制PAEC血管紧张素转换酶的活性并在血管结构改建中拮抗肾素血管紧张素醛固酮系统(RAS)的作用[8]。而AT可促进血管收缩和SMC增殖。实验发现缺氧使EEC分泌AT降低和ANP增加,可能是对EEC分泌ET-1和EDLF增多的一种拮抗机制。

本实验表明缺氧可改变EEC血管活性肽的分泌功能,使EEC的ANP、ET-1和EDLF分泌显著增加,AT的分泌降低,推测其活性肽一方面经旁分泌直接作用于心肌,调节心肌功能,另一方面可随血液到肺循环和体循环,调节血管细胞舒缩和增殖。有关这些活性因子分泌的变化与缺氧性右心室肥大和肺动脉高压的关系尚需在今后的实验中进一步研究。

参考文献

1 Bartunek J, Mohan P, Paulus W J *et al*. Paracrine modulation of coronary vasomotor tone and myocardial performance by vascular and endocardial endothelium. Bratisl Lek Listy, 1995; 96(2): 69

2 施作榕.链霉菌亲和物素蛋白-生物酶标免疫组化染色法的初步研究.中华免疫学杂志, 1986; 2(3): 169

3 Poston L. Endogenurs sodium pump inhibitors: a role in essential hypertension? Clin Sci, 1987; 72: 647

4 Yamada K, Goto A, Sugmoto T. Effect of EDLF on ET secretion from bovine endothelial cells. J Cardiovas Pharmacol, 1991; 17(S7): S163

5 Evans H G, Lewis M J, Shah A M. Modulation of myocardial relaxation by basal release of endothelin from endocardial endothelum. Cardio Vasc Res, 1994, 28(11): 1694

6 Dekeulenaer G W, Andies L J, Sys S U *et al*. ET-mediated positive inotropic effect induced by reactive oxygen species in isolated cardial muscle. Cir Res, 1995; 76(5): 878

7 吴建明,程 彤,孙双丹等.内皮素、血管紧张素和心钠素对血管平滑肌细胞增殖的影响.中国科学, 1993; 36(8): 948

8 Itoh H, Nakao K. Antagonism between the vascular renin angiotensin system and natiuretic peptide system in vascular remodeling. Blood Press Suppl, 1994; 5: 49

(收稿: 1997-02-18;修回: 1997-12-27)

(编辑 汪勤俭)

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

Effects of hypoxia on secretion of vascular activated peptide by cultured endocardial endothelial cells

Wang Peiyong, Liu Jian, Xu Shumin, Gao Wenxiang, Sun Binyong, Luo Decheng, Zeng Qiang (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the effects of hypoxia on secretion of vascular activated peptide by cultured endocardial endothelial cells (EECs). Methods: After EECs were extracted from the right ventricule with scraping and cultured, the content of vascular activated peptides in the culture liquid was determined. Results: At the 24th h after hypoxia, the secretion of endothelin-1 (ET-1) and atrial natriuretic peptide (ANP) by EECs was significantly increased ($P < 0.01$) to levels which were respectively 1.9 and 1.6 fold of those under normoxia. The secretion of endogenous digitalis-like factor (EDLF) by EECs was also markedly increased ($P < 0.01$) to a level which was 1.7 fold of that under normoxia but the secretion of angiotensin II (AT II) was decreased by 12%. Conclusion: Hypoxia results in changes of the secretion of various vascular activated factors by EECs.

Key words hypoxia; endocardial endothelial cell; atrial natriuretic peptide; endothelin-1; angiotensin II; endogenous digitalis-like factor

(上接 55页)

体基因中的 gIII基因,随机取 10个克隆进行可溶性抗肺癌抗体 Fab段的表达和鉴定。细胞 ELISA结果显示,10个克隆表达的 Fab段均能与 2株肺癌细胞结合,而不与人淋巴细胞结合,其中仅 2个克隆表达的 Fab段与人成纤维细胞和 1株肝癌细胞也能结合,表明大多数克隆表达的 Fab段有较好的特异性。对此 10个克隆中的 9个克隆表达的 Fab段进行了蛋白质变性电泳和斑点免疫印迹试验,结果显示 8个克隆可见新增的蛋白带,分子量约 50 kDa,与 Fab段分子量相符。同时这 8个克隆斑点免疫印迹试验显示较强的阳性结果。有 1个克隆未见明显的新增蛋白带,可能为 Fab段表达量不足或表达的 Fd段和轻链未在细菌周质腔中组装成 Fab段。对上述 10个克隆中的 Clone 2、Clone 5和 Clone 7等 3个克隆进行抗体可变区基因序列分析,结果显示 3个克隆的重链可变区基因和轻链可变区基因均不相同,以各互补决定区 (CDR区)差异最大,其中以 CDR 3区的核苷酸序列差异最大。基因同源性检索结果显示,3个克隆的抗体可变区基因序列均与人免疫球蛋白可变区基因同源,其中, Clone 2和 Clone 7的重链可变区基因属 VH 1基因家族,轻链可变区基因属 VK 1基因家族。Clone 5的重链可变区基因属 VH 3基因家族,轻链可变区基因属 VK4基因家族。

以噬菌体抗体库技术制备人源性抗肿瘤抗体是可行的。尽管淋巴结中的结缔组织难以被裂解,以硫氰酸胍-酸酚一步法提取淋巴结总 RNA,可以保证 RNA的完整性。且经逆转录-聚合酶链反应从肿瘤患者局部引流淋巴结总 RNA扩增 Fd段和轻链基因是完全可行的。以活肿瘤细胞为抗原对噬菌体抗体库进行亲和筛选,再以人成纤维细胞进行吸附,可筛选出抗肿瘤抗体。在目前尚未发现肿瘤特异性抗原和令人满意的肿瘤相关抗原的情况下,以这种方法筛选抗肿瘤抗体很有价值。不同克隆抗肺癌抗体可变区基因序列的差异主要存在于各 CDR区,以 CDR 3区差异最明显。本研究通过基因序列分析鉴定的 3个克隆抗肺癌抗体中,有 2个克隆的重链可变区基因属 VH 1基因家族,轻链可变区基因属 VK 1基因家族;另 1个克隆的重链可变区基因属 VH3基因家族,轻链可变区基因属 VK 4基因家族。本研究结果再次证明,肿瘤患者局部引流淋巴结内存在着抗肿瘤体液免疫。

关键词　噬菌体抗体;人源性抗体;肺肿瘤;重组,遗传
中图法分类号　R373.9
(收稿: 1997-11-20;修回: 1997-12-10)
(编辑　张大春)

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