DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.012

局部血管组织一氧化氮合酶活性与高血压发病关系的研究

陈 宇* 刘光耀 (第三军医大学附属大坪医院心血管内科)重庆,400042

提 要 目的:探讨局部血管张力调节过程中,一氧化氮合酶(NOS)活性在原发性高血压(EH)发病机理中的作用。方法:选择腹部手术患者18例,其中EH患者9例,正常血压(NT)者9例,取肠系膜动脉组织检测离体血管壁组织中NOS活性,并消化后行离体血管平滑肌细胞(VSMC)培养,检测培养上清一氧化氮(NO),内皮素(ET-1)水平,应用NOS诱导剂白介素-1(IL-1),NOS阻断剂 N^G单甲基-L精氨酸(L-NMMA)干预。结果:EH患者血管壁组织中,去内皮和未去内皮组的NOS活性均较NT组低;培养VSMC上清中,NO_2^-水平EH组较NT组低;IL-1诱导后,EH组仍低于NT组($P<0.01$),而ET-1水平较NT组高;L-NMMA干预后,EH组和NT组ET水平均升高。结论:EH患者血管张力增高,血管阻力增大可能与局部血管壁组织中,NOS活性降低,NO产生减少,ET产生较多有关。

关键词 原发性高血压;一氧化氮合酶
中图法分类号 R544.1

原发性高血压(EH)患者血管痉挛,周围血管阻力增高是高血压发病的结构基础。随着血管生物学研究的不断深入,人们认识到血管内皮细胞,血管平滑肌细胞(VSMC)对于调节血管张力、结构、自稳定状态、炎症反应起着重要作用。一氧化氮(NO)在心血管系统、免疫系统、神经系统中作为一种信使分子发挥重要作用。在心血管系统中,NO具有舒张血管及抗血小板聚集粘附的功能[1]。本研究采用EH患者离体血管壁组织及培养的VSMC进行实验,检测局部血管壁组织中一氧化氮合酶(NOS)活性及培养的VSMC上清中NO、内皮素(ET-1)水平,探讨局部张力调节因子在EH发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象与分组

高血压(EH)组:病人来源于因腹部手术住院的EH患者9例,均为男性,平均年龄62.3±5.9岁(53~72岁),高血压Ⅰ~Ⅱ型,除外继发性高血压、冠心病和其他急、慢性心肾疾患。

正常血压(NT)组:选择因腹部手术住院,血压正常的男性患者9例,年龄60.5±5.5岁(52~67岁),无高血压家族史,手术治疗的部位与EH组相似,除外急、慢性心肾疾患。

1.2 NOS活性测定

根据组织抽提物中NOS作用产生的NO与氧合血红蛋白反应,生成高铁血红蛋白的原理,用双波长分光光度计在401 nm与421 nm连续检测,测出高铁血红蛋白吸收系数的变化值。NOS活性用NO产生的速率代表,其步骤参照Knowles[2]的方法进行。

1.3 VSMC的分离、消化、培养和鉴定

VSMC的分离、消化、培养参照Yamori[3]的方法略加修改。VSMC的计数采用台盼蓝法在光学显微镜下计数;鉴定采用特异的抗人Actin免疫组化鉴定和透射电镜观察。

1.4 NO水平测定

根据NO_2^-与Greiss试剂反应生成樱红色的原理,应用酶标仪在520 nm波长下测定其吸光度的值,其步骤参照Pascual[4]的方法进行。用亚硝酸钠绘制标准曲线。

1.5 ET-1水平测定

采用均相竞争法直接测定培养上清液中的ET-1含量,ET-1放免药盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所生产,测定方法按使用说明书的步骤进行。

1.6 统计学处理

检测结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

2.1 血管壁组织中NOS活性测定

表1所示,EH组NOS活性较NT组低($P<0.01$)。去内皮后,EH组与NT组的NOS活性均有降低($P<0.01$),而EH组又较NT组降低更明显。

表1 血管组织中NOS活性(λ_B/nmol·min^{-1}·g^{-1} tissue)

Tab 1 NOS activity of vascular tissue

(λ_B/nmol·min^{-1}·g^{-1} tissue)

Group	n	None endothelium	With endothelium
EH	9	6.5±1.20△△	14.5±2.79△△**
NT	9	9.47±2.37	19.4±2.83**

△△: $P<0.01$ vs NT; **: $P<0.01$ vs none endothelium

* 陈 宇,男,34岁,主治医师,硕士

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

2.2　VSMC培养上清 NO_2^- 水平测定

表 2所示,EH组与 NT组比较,EH组 VSMC产生的 NO_2^- 较 NT组低($P<0.01$),加入 NOS诱导剂 IL-1后,与诱导前比较,在 6 h达到较高水平($P<0.01$),24 h达到最高值,但 6 h后 NO_2^- 产生的速度减缓,与 NT组比较,EH组低于 NT组($P<0.01$)。

表 2　IL-1诱导后 VSMC产生 NO_2^- 值 (μmol)

Tab 2　NO_2^- content in medium of cultured VSMC after induced by IL-1 (μmol)

Group	n	Control	After induced by IL-1 (t /h)		
			6	12	24
EH	9	0.654± 0.148△△	1.523± 0.720△△**	1.887± 0.655△△**	2.170± 0.777△△**
NT	9	0.968± 0.118	2.737± 1.068**	3.182± 0.793**	3.384± 0.554**

△△: $P<0.01$ *vs* NT;** : $P<0.01$ *vs* control

2.3　VSMC培养上清 ET水平检测

表 3所示,EH组 VSMC分泌的 ET较 NT组高($P<0.05$),应用 NOS阻断剂 L-NMMA后,EH组和 NT组 VSMC培养上清中 ET水平随 L-NMMA浓度的增高而增高,EH组升高水平较 NT组更明显。

表 3　培养 VSMC上清 ET-1值 (ρ_B /mg L^{-1})

Tab 3　ET-1 Content in supernatant of cultured VSMC (ρ_B /mg L^{-1})

Group	n	Control	L-NMMA content(C_B /mol L^{-1})		
			10^{-1}	10^{-4}	10^{-3}
EH	9	20.5± 5.92△	25.7± 5.78*	27.2± 6.03△**	30.1± 5.95**
NT	9	15.7± 4.73	21.6± 5.21	21.4± 6.12	29.6± 6.31**

△: $P<0.05$ *vs* NT;* : $P<0.05$,** : $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

NO具有广泛的生物学效应,其中最主要的作用是调节血管舒缩功能,参与机体的免疫反应和在神经系统中作为信息传递分子。在心血管系统中,NO具有舒张血管与抗血小板聚集及粘附功能。随着对 NO研究的不断深入,人们发现除了内皮细胞可以产生 NO外,VSMC也可以产生 NO。Zehetgruber等[5]应用化学发光法,在猪动脉去内皮的平滑肌条上测出持续释放的 NO。Yeh等[6]认为 VSMC通过钙调素依赖的 NOS以自分泌方式产生 NO,反馈调节血管平滑肌收缩。本研究进一步证实 EH患者局部血管壁组织中 NOS活性较正常血压者低。另外,我们应用 NOS阻断剂 L-NMMA干预后,VSMC培养上清中 ET水平随 L-NMMA浓度的增高而增高。因此,我们认为除了 NO的反馈机理以外,NO与 ET的平衡机理在 EH的发病中,也起着重要的作用。局部血管壁组织中内皮细胞、VSMC产生的 NO维持着血管的舒张状态,ET维持着血管的收缩状态,正常时两者维持动态平衡。EH患者由于舒张因子 NO产生减少,相应地收缩因子 ET占优势,引起血管张力增高。NOS活性降低的原因可能与 EH患者存在着遗传缺陷,使之 NOS的结构异常有关。

参考文献

1 Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. Nitric Oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, 43(2): 109

2 Knowles R G, Salter M, Roods S *et al*. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 172(3): 1042

3 Yamori Y, Mano M, Nara Y *et al*. Catecholamine-induced polyploidization in vascular smooth muscle cells. Circulation, 1987, 75(suppl I): 92

4 Pascual D W, Pascual V H, Bost K L *et al*. Nitric oxide mediates immune dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension, 1993, 21(2): 185

5 Zehetgruber M, Conforto A, Bing R J. Vascular smooth muscle and nitric oxide. Life Science, 1993, 52(17): 1397

6 Yeh S L, Whitney E G, Lamb S *et al*. Nitric oxide is an autocrine feedback inhibitor of vascular smooth muscle contraction. Surgery, 1996, 119(1): 104

(收稿: 1996-12-29;修回: 1997-09-25)

(编辑　汪勤俭)

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

Relationship between activity of nitric oxide synthase and pathogenesis of essential hypertension in local vascular tissue

Chen Yu, Liu Guangyao (Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore the role of the activity of nitric oxide synthase (NOS) in pathogenesis of essential hypertension (EH) in the regulative process of local vascular tension. Methods: 18 patients undergoing abdominal operation were selected. Of the patients, 9 were hypertensive and 9 normotensive (NT). Specimen of the mesenteric artery in all the patients was extracted to determine NOS activity in local vascular wall in vitro. After digestion, the culture of vascular smooth muscle cells (VSMCs) of the isolated mesenteric artery was conducted with the induction of interleukin-1 (IL-1) and intervention of NG-monomethy-L-arginine (L-NMMA) to determine the levels of NO and endothelin-1 (ET-1) in the supernatant. Results: NOS activity in local vascular tissue was lower in hypertensive patients than in NT ones. NO_2 level in supernatant of cultured VSMCs was lower in hypertensive patients than in NT ones. After the induction with IL-1, the NO_2 level was increased in both kinds of patients but still lower in hypertensive patients than in NT ones. After intervention with L-NMMA, the level of ET-1 was increased in both kinds of patients. Conclusion: The increased vascular tension resistance in patients with EH might be related to the decrease of NOS activity and increase of ET level in local vascular tissue.

Key words essential hypertension; nitric oxide synthase

肝硬变大鼠肝部分切除术后肝细胞再生机理的实验研究

An experimental study on the mechanism of liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats

陈 平* 韩本立 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 400038

弥漫性肝损害如在肝硬变情况下,广泛肝切除术常常引起手术后肝功能衰竭。病人肝脏基础的好坏,决定病人的预后,随着肝脏基础病变的加重,其手术死亡率增高。肝硬变状态下,肝细胞再生功能会发生变,影响细胞的增殖。因此了解肝细胞再生机制对于有效地防治术后肝功能衰竭,更大程度地发挥肝部分切除术的作用,有非常重要的意义,同时可以通过过对肝细胞再生机理的研究,为更好地防治术后肝功能衰竭寻找新的治疗方法和手段。

用健康雄性 Wistar大鼠,体重220~250 g用于本实验,大鼠肝硬变模型参照吴孟超的方法,即皮下注射 CCl_4+口服乙醇的方法;肝部分切除术参照 Higgin的方法,即切除大鼠左肝和中肝,观察时相为大鼠术后6 24 48 72 h和1周。

本实验的主要结果和结论如下:① 采用在 CCl_4诱导肝硬变的大鼠模型,切除大鼠左肝和中肝叶,能很好的诱导肝细胞再生。模型制作所需时间短,死亡率低,手术耐受性好。② 肝硬变大鼠肝部分切除术后肝再生过程出现明显变化,肝细胞再生启动时间和再生周期明显延长,增殖速度减慢,这可能是术后肝功能衰竭的重要原因,提示肝切除术后肝功能衰竭与残肝细胞再生能力之间有密切的关系。③ KC在肝细胞再生过程中发挥重要作用,KC再生的启动为肝细胞增殖创造了条件。KC能被 LPS活化,但活化后对肝细胞再生产生不同的效应。④ HGF TGF-α EGF和 TNF等细胞因子是肝细胞再生启动的信号,通过与相应的受体结合,引起 NORs相关蛋白的变化,改变 rRNA基因活性,从而诱导肝细胞再生,这些细胞因子可作为肝细胞再生状况的标志。TGF-α EGF等在再生过程中含量的变化,可能与再生的能力有关。⑤ HGF和 TGF-α mRNA表达与肝硬变大鼠的肝细胞再生密切相关,而 TGF-α是肝细胞再生中最重要的物质。IGFBP-1s mRNA表达降低反应了肝硬变大鼠术后肝细胞代谢明显受损,而 PCNA mRNA表达可提示肝细胞增多殖能力。在肝细胞再生过程中,细胞因子相互作用,共同推动肝细胞再生,细胞因子作为诱导细胞 DNA合成的基本刺激信号。⑥ 肝细胞增殖不仅受细胞因子的影响,更受细胞周期蛋白的调控。肝细胞在生长因子的刺激之下,使 Cyclin D和 Cyclin A在 G_1期适量的表达,从而启动肝细胞再生。Cyclin和 RB等癌基因产物共同作用,调节细胞周期的进程。⑦ 肝细胞可通过 RB蛋白影响 Cyclin功能的活性,从而调节肝细胞再生;而肝细胞再生过程中,TGF-β的高表达将促使肝细胞 p27的活化,从而抑制肝细胞再生。

关键词 肝再生;肝硬变;细胞周期;细胞因子;肝部分切除术;大鼠

中图法分类号 R575.2

(收稿: 1997-10-22;修回: 1997-12-06)

(编辑 王红)

* 陈 平 男, 32岁, 主治医师, 讲师, 博士研究生

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