DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.019

VIP对体外培养人脐静脉内皮细胞释放 ANP、ATⅡ和 EDLS的影响

姚忠祥 蔡文琴 徐有奇* (第三军医大学基础部组织学与胚胎学教研室) 重庆, 630038

提 要 采用放射免疫法(RIA)测定了体外原代培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)上清液,证实其中含有一定量的心钠素(ANP)、血管紧张素Ⅱ(ATⅡ)和内源性类洋地黄物质(EDLS),它们从 HUVEC释放到培养上清液中的量受血管活性肠肽(VIP)的调节,即 VIP使培养上清液中具有舒张血管作用的 ANP含量增加,具有收缩血管作用的 ATⅡ和 EDLS含量减少。结果说明 HUVEC能释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质到胞外,VIP具有调节其释放的作用,并对其意义进行了初步探讨。

关键词 内皮,血管;人脐静脉;内皮细胞;血管活性肠肽;心钠素;血管紧张素Ⅱ;内源性类洋地黄物质
中图法分类号 R322.12

人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)能合成心钠素(ANP)、血管紧张素Ⅱ(ATⅡ)和内源性类洋地黄物质(EDLS)等多种血管活性物质[1~4]。血管活性肠肽(VIP)具有舒张血管的功能,其途径之一是通过内皮细胞实现的。我们推测 VIP可能通过调节血管内皮细胞释放多种血管活性物质,从而导致血管舒张,为此我们应用放射免疫法(RIA)测定体外原代培养的 HUVEC上清液,以观察 HUVEC释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质的量及 VIP对其释放的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

VIP、RPMI-1640培养基、小牛血清(以上均为 Sigma产品),胰蛋白酶(Trypsin, 1:250,为 Difco产品),ANP与 ATⅡ放射免疫测定盒(由北京中国同位素公司北方免疫试剂研究所提供),EDLS放射免疫测定盒(由上海放射免疫分析技术研究所提供),第Ⅷ因子相关抗原抗血清(为上海生物制品研究所产品),其余试剂均为国产 AR级。

1.2 体外原代培养 HUVEC

无菌取9例足月(胎龄为月经龄37周~40周)的健康顺产新生儿脐带(长约15 cm~20 cm),D-Hanks液冲洗脐静脉管腔,0.25%胰蛋白酶37℃消化10 min,收集消化液,1000 r/min离心10 min,弃上清,将沉淀物即内皮细胞用含20%小牛血清的RPMI-1640培养液制成细胞悬液,将细胞浓度调至 1×10^5/ml,分装于直径为35 mm的玻璃培养皿,静置于 CO_2孵箱培养,48 h换液并用第Ⅷ因子相关抗原抗血清进行免疫细胞化学染色鉴定为内皮细胞。

1.3 实验分组

正常组为体外原代培养的 HUVEC 48 h换液,换液后72 h(培养第5天)取上清液,-20℃保存待测。加 VIP组在换液时加入终浓度为2.5 ng/ml的 VIP,其余同正常组。空白对照组则未加细胞,其余同正常组。

1.4 RIA测定

将换液后72 h(培养第5天)的上清液及空白对照组培养液均置于经预处理的试管中,预处理方法如下:测 ANP者加入终浓度为1%的抑肽酶和10% EDTA-2Na,测 ATⅡ和 EDLS者加入50μl 0.3 mol/L EDTA-2Na,50μl 0.34 mol/L 8-羟基喹啉,25μl 0.32 mol/L二巯基丙醇。均采用平衡加样程序:加样后混匀,4℃静置24 h,加分离剂并混匀后于4℃静置15 min,然后在低温(4℃)条件下离心15 min(3500 r/min),最后测沉淀物的放射性(用西安262厂生产的 FJ2008自动γ免疫计数器测定)。

1.5 统计学处理

所得数据以 $\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析,并对各组均数进行显著性检验。

2 结果

体外原代培养的 HUVEC 48 h换液,换液后72 h(培养第5天)取上清液进行 RIA测定,结果发现:空白对照组均未测得 ANP、ATⅡ和 EDLS;与空白对照组相比,正常组培养上清液中 ANP、ATⅡ和 EDLS的含量均显著升高($P<0.01$);加 VIP组与正常组相比,ANP的含量显著升高,ATⅡ和 EDLS的含量显著降低,其差异在统计学上均具有非常显著性意义($P<0.01$),见附表。

* 附属大坪医院同位素室 重庆, 630042

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

附表 体外原代培养 HUVEC释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质的量 [ρ_B /ng·(10^5 cells)$^{-1}$]

Table The quantity of vasoactive substances released by cultured *in vitro* [ρ_B /ng·(10^6 cells)$^{-1}$]

Groups	*n*	ANP	ATⅡ	EDLS
Control	8	0	0	0
Normal	8	25.2± 7.9△	36.7± 8.3△	22.6± 1.8△
Add VIP	8	62.7± 27.5※	4.1± 1.1※	0※

△: $P < 0.01$ *vs* control group;
※: $P < 0.01$ *vs* normal group

3 讨论

目前的资料显示[1,4], ANP、ATⅡ和 EDLS均具有调节血管张力的功能, ANP能舒张血管, ATⅡ和 EDLS则能收缩血管。作者应用 RIA法测定了体外原代培养的 HUVEC上清液,发现空白对照组不含 ANP、ATⅡ和 EDLS,而与空白对照组相比,正常组测得的 ANP、ATⅡ和 EDLS的含量显著升高 ($P < 0.01$),分别达到 (25.2± 7.9) ng/10^5个细胞、(36.7± 8.3) ng/10^5个细胞和 (22.6± 1.8) ng/10^5个细胞。说明体外原代培养的 HUVEC能释放 ANP、ATⅡ和 EDLS到胞外 (上清液中)。应用原位杂交组织化学染色显示 HUVEC中含有 ANP、ATⅡ的 mRNA[1,2],加之培养液 (空白对照组)中不含 ANP、ATⅡ和 EDLS,表明培养上清液中的 ANP、ATⅡ和 EDLS主要由 HUVEC合成并释放到胞外。人脐静脉系缺乏神经支配的肌性血管[5],在人胚胎发育过程中脐静脉是如何调节其自身的张力一直存在疑问[6,7],本实验结果说明 HUVEC可能在脐静脉张力的调节中起非常重要的作用,其可能机理是通过 HUVEC释放具有调节血管张力的 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质。

VIP源于中枢及外周神经,文献 [1]报道在体内注射 VIP或在细胞培养上清液中加入 VIP可产生许多生理效应,包括对心血管、呼吸道和消化道平滑肌、血糖、激素释放、胃肠分泌、肝脏脂肪代谢和中枢神经系统的调节作用等。VIP能引起多数血管扩张,其作用方式有两种:即内皮依赖性的和非内皮依赖性的舒张血管效应。作者为观察 VIP的内皮依赖性的舒张血管效应,采用体外原代培养的 HUVEC,在 48 h换液时加入一定量的 VIP,换液后 72 h(培养第 5天)取上清液进行 RIA测定,结果发现 ANP含量明显升高 ($P < 0.01$),,即从正常组的 (25.2± 7.9) ng/10^5个细胞上升至加 VIP组的 (62.7± 27.5) ng/10^5个细胞; ATⅡ和 EDLS的含量则明显下降 ($P < 0.01$),分别从正常组的 (36.7± 8.3) ng/10^5个细胞、(22.6± 1.8) ng/10^5个细胞降至加 VIP组的 (4.1± 1.1) ng/10^5个细胞和 0(未测出)。此结果说明 HUVEC释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质的量受 VIP的调节,亦即 VIP对 HUVEC的代谢活动产生影响。VIP作用后, HUVEC释放具有舒张血管作用的 ANP的量增加,具有收缩血管作用的 ATⅡ和 EDLS的量减少,其总的效应是协同作用导致脐静脉舒张。因此,调节 HUVEC释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质可能是 VIP对人脐静脉调节作用的一个途径。

通过本实验的结果可得出如下结论: HUVEC可能通过释放 ANP、ATⅡ和 EDLS等血管活性物质,从而实现调节脐静脉张力的功能, VIP对 ANP、ATⅡ和 EDLS的释放具有调控的作用,换而言之,在人脐静脉中 VIP的内皮依赖性舒张血管效应可能是通过影响 HUVEC释放具有舒张血管作用的 ANP与具有收缩血管作用的 ATⅡ和 EDLS,即增加 ANP的释放,减少 ATⅡ和 EDLS的释放,从而导致脐静脉舒张。

参考文献

1 毕万里,汤 健.血管内皮细胞的内分泌功能.见:汤 健,唐朝枢编著.循环系统的内分泌功能.北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1989: 76~92

2 Cai W Q, Terenghi G, Bodin P *et al*. *In situ* hybridization of atrial natriuretic peptide mRNA in the endothelial cells of human umbilical vessels. Histochemistry, 1993; 100(2): 277

3 姚忠祥,蔡文琴.体外培养人脐静脉内皮细胞合成与分泌心钠素的初步观察.第三军医大学学报, 1995; 17(4): 326

4 徐有奇,姚忠祥,蔡文琴等.血管内皮细胞中类洋地黄物质的初步研究.中国病理生理杂志, 1993; 9(5): 564

5 Fox S B, Khong T Y. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistochemical and histochemical study. Placenta, 1990; 11(1): 59

6 Cai W Q, Bodin P, Loesch A *et al*. Endothelial cells of human umbilical vessels. Chinese J of Histo-and Cytochemistry, 1993; 2(suppl): 3

7 Yao Z X, Cai W Q, Wang R P. An ontogeny study about the localization of atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human umbilical vessels. Chinese J of Histo-and Cytochemistry, 1993; 2(suppl): 179

(收稿: 1995-12-05;修回: 1996-08-04)

(编辑 汪勤俭)

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

Effects of vasoactive intestine peptide on release of atrial natriuretic peptide, angiotensinⅡ and endogenous digitalis-like substance of cultured umbilical vein endothelial cells

Yao Zhongxiang, Cai Wenqin, Xu Youqi (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) can synthesize many kinds of vasoactive substances and vasoactive intestine peptide (VIP) can relax blood vessels in endothelium-dependent and endothelium-independent manners. In order to clarify the mechanisms of VIP's vascular relaxation in endothelium-dependent manner, the supernatant of cultured HUVEC was examined with radioimmunoassay (RIA). It was found that there were certain amounts of atrial natriuretic peptide (ANP), angiotensinⅡ (ATⅡ) and endogenous digitalis-like substance (EDLS) in the supernatant and the releasing quantities from HUVEC into the supernatant were regulated by VIP. That is to say, VIP increased the quantity of the vasodilator ANP and decreased those of the two vasoconstrictors ATⅡ and EDLS. Our findings suggest that HUVEC can release ANP, ATⅡ and EDLS to outside of the cell bodies, which is regulated by VIP. This may be one of the mechanisms of VIP's relaxation of human umbilical vein.

Key words umbilical vein; endothelial cell; vasoactive intestine peptide; atrial natriuretic peptide; angiotensinⅡ; endogenous digitalis-like substance

(上接 412页)

3 讨论

阴虚阳亢为中风(脑血管意外)发病前的重要临床表现,对此方面的研究将有助于对脑溢血,脑血栓等疾病的早期预防和治疗。

肾素是由肾脏近球体分泌的蛋白水解酶,它作用于血管紧张素原产生血管紧张素Ⅰ(AⅠ),AⅠ在转换酶酶的作用下形成血管紧张素Ⅱ(AⅡ),肾素活性及血管紧张素的升高可使血管收缩,血压升高,从而出现阴虚阳亢的一系列表现。从本实验结果得知,此证型的实验动物也存在着肾素活性、血管紧张素系统的变化。

红细胞通过免疫粘附作用来清除循环免疫复合物,使之不易沉积在易感组织中造成病理损害[3]。同时红细胞表面有过氧化物酶,是典型的溶解酶,能直接消毁粘附的抗原物质[4]。而此证型的实验动物其红细胞 c3b受体活性降低,其粘附功能下降,使循环免疫复合物易沉积在体内,造成病理损害。T淋巴细胞亚群与红细胞 c3b受体花环率呈正相关[5],红细胞不仅粘附免疫复合物,还可粘附自身 T细胞,增加自身 T细胞免疫功能,更有效地清除免疫复合物[6]。T淋巴细胞功能降低,势必造成循环免免疫复合物更易沉积在血管内皮及其它组织中,造成血流不畅,血液粘滞性增高,血管壁弹性降低,血压上升,故易呈现阴虚阳亢的客观表现。

镇肝熄风汤具有镇肝熄风、滋阴潜阳之功效,主要用于肝肾阴亏、气血逆乱之证。方中怀牛膝归肝肾之经,重用以引血下行,并有补益肝肾之效,为君药。代赭石与生龙骨、生牡蛎相配,降逆潜阳、镇熄肝风,是为臣药。重用龟板、玄参、天冬、白芍滋养阴液以制阳亢。茵陈、川楝子、生麦芽三味配合君药,清泄肝阳之有余,条达肝郁之气,甘草调和诸药,配麦芽和胃,防止金石类药物碍胃,均为佐使。此方诸药合用,共凑滋阴潜阳之功效,能迅速改善阴虚阳亢的客观表现,同时此方能调节肾素、血管紧张素系统,提高红细胞免疫及 T淋巴细胞亚群功能,为治疗阴虚阳亢的有效方剂。

关键词　镇肝熄风汤;红细胞免疫;T淋巴亚群;PR-A;AⅡ
中图法分类号　R289.5

参考文献

1 黄文权,肖　鸿,袁林贵.阴虚阳亢证型实验动物模型研究初探.中国中医急症,1996;(1):43
2 黄文东.实用中医内科学.上海:上海科学技术出版社,1985:414-415
3 郭　珍.红细胞免疫功能及其检测意义.西安医科大学学报,1990;3:282
4 Israel S, Liu T L, Norrert G. The red-cell immune system. Lancet, 1981; 12:556
5 范国荣.益肾健脾方对老年虚证 T细胞亚群、可溶性白细胞介素-2受体及红细胞免疫的影响.中国中西医结合杂志,1995;15(1):18
6 项一萍.红细胞的免疫功能.国外医学:输血与血液学分册,1985;8(4):206

(收稿:1995-12-11;修回:1996-09-20)
(编辑　刘　鹏)

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