DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.017

缺氧对培养的肺动脉内皮细胞血管紧张素转换酶释放的影响*

王培勇 刘 健 于中和** 罗德成 孙秉庸 (第三军医大学基础部高原医学研究室)重庆,630038

提 要 肺血管局部的肾素血管紧张素系统在缺氧性肺动脉高压的发生中所起的作用尚不清楚。为此,动态观察了缺氧对培养的新生小牛肺动脉内皮细胞(PAEC)的血管紧张素转换酶(ACE)活性的影响。结果发现:培养的PAEC在2.5% O_2缺氧1.5 h末,培养液ACE活性明显增高(与常氧组及0% O_2组相比 $P < 0.001$);随缺氧时间延长,3 h~12 h, ACE活性与1.5 h相比有所降低,但仍高于常氧组($P < 0.05$);24和48 h, ACE活性又大幅度升高(与常氧组及0% O_2相比 $P < 0.001$)。0% O_2缺氧条件下,ACE活性仅在6 h和12 h高于常氧组,而在24 h低于常氧组($P < 0.05$),其它时点与常氧组相比差异不明显。0% O_2条件下培养24 h后,PAEC细胞内的cGMP含量明显降低(与常氧组相比 $P < 0.05$)。上述结果表明缺氧可引起PAEC的ACE活性改变,这种改变可能参与缺氧性肺动脉高压的发生过程。

关键词 缺氧;内皮细胞;肺血管;血管紧张素转换酶
中图法分类号 R594.3

近年来的研究表明,心血管系统局部肾素血管紧张素系统(Renin angiotensin system, RAS)参与许多病理生理过程[1~2]。血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)是RAS的关键酶,它也是血管内皮细胞的标志酶。肺血管内皮细胞是ACE重要的生成部位,但有关肺血管内皮ACE在缺氧性肺动脉高压(Hypoxic pulmonary artery hypertension, HPAH)发生中所起的作用尚不清楚。因此,本实验动态观察了缺氧对培养的小牛肺动脉内皮细胞(Pulmonary artery endothelial cells, PAEC)的ACE活性的影响,并研究其变化的机理,以进一步探讨HPAH的发生机理。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胰蛋白酶(DIFICO, 1:250), RPMI-1640(J R Scientific Inc. USA),马尿酰甘氨酰甘氨酸,消炎痛和3-isobutyl-1-methyl-xanthime(Sigma),cAMP和cGMP测定试剂盒(上海第二医科大学),低氧混合气(含5% CO_2和所需要浓度的氧气,其余以氮气平衡)。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

取新生小牛活杀后按文献[3]的方法培养PAEC,培养成功后采用3~10代细胞进行实验。取对数生长期的PAEC,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培养基培养2 d~3 d,待细胞汇合成单层后换为不含小牛血清的培养基,分组进行下述实验。

1.3 培养上清液ACE释放的测定

将细胞分为21% O_2(常氧组)、2.5% O_2和0% O_2 3组,常氧组置21% O_2的CO_2孵箱中培养,缺氧组置于缺氧培养箱内,分别通入2.5% O_2和0% O_2的低氧混合气,平衡后测定氧的浓度分别为2.54%和0.03%(下同)。上述每组又分为1.5、3、6、12和48 h等6个不同的时点,以动态观察ACE活性的变化。根据上述分组,取培养上清按文献[4]介绍的方法测定ACE的活性。

1.4 环核苷酸测定

为了进一步探讨缺氧引起PAEC的ACE活性变化的机理,将细胞分为21% O_2和0% O_2组,分别在21%和0% O_2条件下培养24 h,然后吸弃培养液,加入孵育缓冲液[5](组成如下:137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8 mmol/L Na_2HPO_4, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.5 mmol/L $CaCl_2$, 1 mmol/L 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.01 mmol/L消炎痛),继续在21% O_2和0% O_2条件下培养1 h后,取样本按药盒说明书测定细胞内cAMP和cGMP含量。孵育缓冲液中含有磷酸二酯酶抑制剂3-isobutyl-1-methyl-xanthine和前列环素合成抑制剂消炎痛,故环核苷酸含量的变化反映其生成的多少。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270316
** 北京军医总医院呼吸内科 北京,100083

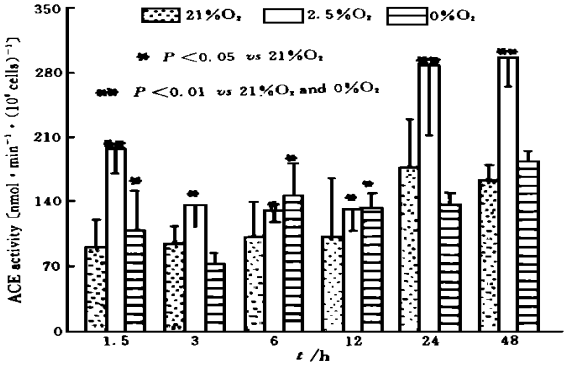
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 统计方法

所得数据采用多因素或单因素方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并做方差分析下的最小差异显著性试验。

2 结果

培养的 PAEC在常氧条件下,培养液 ACE释放在 24 h后有所上升。2.5% O_2缺氧 1.5 h末,培养液 ACE明显高于常氧组和 0% O_2组($P < 0.001$);随缺氧时间延长,3 h~ 12 h, ACE与 1.5 h相比有所降低,但仍高于常氧组($P < 0.05$); 24和 48 h, ACE释放又大幅度升高($P < 0.001$)。0% O_2缺氧条件下,培养液 ACE释放仅在 6 h和 12 h高于常氧组,而在 24 h低于常氧组($P < 0.05$),其它时点与常氧组相比差异不明显,见附图。



附图　缺氧对培养的 PAEC条件培养基 ACE活性的影响
(每条下端数字为标本数)

Fig　The changes of ACE activity of conditioned medium from PAECs exposed under hypoxic conditions　(The number in each bar is the number of samples)

培养的 PAEC在 0% O_2条件下培养 24 h后,其细胞内的 cAMP含量略微升高,与对照组相比无显著性; cGMP含量明显降低(与对照组相比 $P < 0.05$), cAMP/cGMP比值明显升高,见附表。

附表　缺氧对 PAEC的环核苷酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table　Concentration of cyclic nucleotide in PAEC cultured in normoxic and hypoxic condilions

[C_B /pmol·(10^6 cells)$^{-1}$] ($\bar{x} \pm s$) ($n = 3$)

Group	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP
21% O_2	65.76± 6.96	17.56± 0.12	3.81± 0.42
0% O_2	71.06± 2.53	13.38± 3.26*	5.84± 1.62*

*: $P < 0.05$ *vs* 21% O_2 group

3 讨论

缺氧导致的肺血管收缩和肺血管结构重塑的机理尚不清楚。肺血管内皮细胞能合成和分泌多种血管活性物质, PAEC结构和功能的受损或改变及其对肺血管平滑肌的调节障碍可能是 HPAH发生和发展的基础,我们推测缺氧可能通过影响 PAEC血管活性物质的自分泌或旁分泌而参与上述过程。特别是自从发现血管壁上存在一个独立于肾脏的局部 RAS以来,越来越多的证据表明,局部 RAS在血管张力和血管结构重塑中起重要作用[6]。PAEC和肺血管平滑肌上均有大量的血管紧张素II 受体分布。这些证据间接提示,局部 RAS是肺血管结构和张力的重要调节系统。ACE是影响血管活性肽最有力的蛋白水解酶,其活性的变化反映血管内皮细胞的功能状态。PAEC的 ACE在 HPAH中所起的作用尚不清楚。因此有必要对此进行深入研究。

有关缺氧条件下 ACE活性变化的研究结果不尽一致。一些作者观察到急性缺氧可使离体肺或体外培养的内皮细胞的 ACE活性降低[7],而另一些作者则观察到相反的结果[8]。本实验观察到缺氧能引起 PAEC的培养上清 ACE释放发生改变,这种变化与缺氧程度及缺氧时间有关。轻度缺氧早期,培养上清的 ACE大幅度升高,然后有所降低,后期则进一步升高;严重缺氧 6和 12h ACE活性明显增加,而 24 h ACE活性降低。提示轻度缺氧能促进 PAEC的 ACE释放,严重缺氧 24 h则抑制 ACE释放。ACE活性的变化可以引起局部血管紧张素分泌发生改变,从而通过旁分泌机理作用于肺动脉平滑肌,引起后者的舒缩和增殖的变化。缺氧引起 ACE活性的变化可能与内皮细胞产生的内皮细胞舒张因子 NO减少有关, NO与细胞内可溶性鸟苷酸环化酶结合,使 GTP环化为 cGMP,后者参与细胞内的信息传递。有些实验证实缺氧可抑制血管内皮细胞舒张因子的活性[9]。本实验也观察到,缺氧 24 h后 PAEC细胞内 cGMP明显降低, cAMP/cGMP比值增高,提示内源性 NO的产生受抑制。上述观察提示缺氧一方面抑制内皮细胞舒张因子产生,另一方面加强缩血管物质的分泌,从而参与 HPAH的发生发展过程。

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

本实验观察到缺氧可以导致培养的 PAEC的ACE释放和分泌增多,这种改变具有缺氧程度和时间依赖性。上述结果提示缺氧可能通过影响 PAEC的ACE的活性而参与缺氧性肺血管收缩和肺血管结构重塑。

参考文献

1 Cohn J N. Structural basis for heart failure: ventricular remodeling and its phamacological inhibition. Circulation, 1995; 91(7): 2504

2 Unger T, Gohlke P. Converting enzyme inhibitors in cardiolvascular therapy: current status and future potential. Cardiovas Res, 1994; 28(1): 146

3 王培勇,孙秉庸.培养的 PAEC生长生化特性初步研究.第三军医大学学报, 1995; 17(3); 212

4 Neels H M, Sande M E, Scharpe S L. Sensitve colorimetric assay for angiotensin converting enzyme in serum. Clin Chem, 1983; 29(4): 1399

5 Yokokawa K, Tahare H, Kohno M *et al*. Heparin regulates endothelin production through endothelial derived NO in human endothelial cells. J Clin Invest, 1993; 92(6): 2080

6 Dzau V J. Local expression and pathophsiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. Basic Res Cardiol, 1993; 88(S1): 1

7 Oparils W, Stalcup L. Effect of hypoxia on the convertion of angiotensin Ⅰ to Ⅱ in the isolated perfused rat lung. Biochem Pharmacol, 1982; 31(3): 1375

8 Krukewitz H A, Meydick T. The effect of oxygen tension on the *in vitro* production and release of angiotension converting enzyme by bovine pulmonary artery endothelial cells. Am Rev Respir Dis, 1984; 130(1): 866

9 Shaul P W, Wells L B. Oxygen modulates NO production selectively in fetal pulmonary endothelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991; 11(4): 433

(收稿: 1996-03-08;修回: 1996-09-28)

(编辑 张大春)

Effects of hypoxia on the discharge of angiotensin converting enzyme in cultured pulmonary arterial endothelial cells

Wang Peiyong, Liu Jian, Yu Zhonghe, Luo Decheng, Sun Bingyong (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of hypoxia on the angiotensin converting enzyme (ACE) secretion were dynamically observed in cultured pulmonary arterial endothelial cells (PAECs) of new born bovine to explore the role of local renin angiotensin system in local pulmonary artery playing in the occurrence of hypoxic pulmonary arterial hypertension. It was found that: The ACE activity was significantly decreased when PAECs were incubated under 2.5% O_2 hypoxic condition for 1.5 h ($P < 0.001$ *vs* control and 0% O_2 groups) and further decreased from 3 to 12 h but still remained high ($P < 0.05$ *vs* the control) but significantly increased from 24 to 48 h ($P < 0.001$ *vs* control and 0% O_2 groups). Under 0% O_2 hypoxic condition, it was only significantly higher at the 6th and 12th hour and lower at the 24th hour after incubation than that in the control group ($P < 0.05$) and the cGMP content in PAECs was significantly 24 hours after the incubation ($P < 0.05$ *vs* the control). Our findings suggest that hypoxia can cause the changes of ACE activity in PAECs, which might participate in the occurrence of hypoxic pulmonary arterial hypertension.

Key words hypoxia; endothelial cell; pulmonary artery; angiotensin converting enzyme

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39270316

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