DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.024

L-精氨酸和 N^G-甲基-L-精氨酸对血管内皮细胞释放 EDRF 的影响

黄 岚 祝善俊 孟素荣 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科)重庆,630037
陈思聪 张国元 罗在明 (第二军医大学附属长征医院心血管内科)上海,200003
张亚霏 龚肖峙 (第二军医大学基础部病理生理学教研室)上海,200433

提 要 通过培养的大鼠胸主动脉内皮细胞(CEC)及胸主动脉环,利用生物分析法,探讨 CEC 释放内皮源性舒张因子(EDRF/NO)的检测方法,影响 EDRF/NO 分泌的因素。发现单纯 CEC 或经乙酰胆碱(Ach)预处理的 CEC 对去内皮血管环张力无明显影响;而经 L-精氨酸(L-Arg)或 L-Arg 和 Ach 预处理的 CEC 可引起去内皮血管环产生明显舒张;N^G-甲基-L-精氨酸和 Ach 预处理的 CEC 则引起去内皮血管环明显收缩。提示 CEC 在基础状态和经 Ach 预处理后,其合成和分泌 EDRF/NO 的能力很低或丧失,可能存在内源性 EDRF/NO 前体 L-Arg 不足,供给外源性 L-Arg 有增强 CEC 合成和释放 EDRF/NO 的作用。在 L-Arg 供给充足情况下,Ach 可进一步刺激 CEC 释放 EDRF/NO。

关键词 内皮细胞,培养;内皮源性舒张因子;离体动脉环;乙酰胆碱;L-精氨酸;大鼠
中图法分类号 Q26

本研究通过培养的大鼠胸主动脉内皮细胞及离体胸主动脉环,利用生物分析法,探讨培养的血管内皮细胞(CEC)释放内皮源性舒张因子(EDRF/NO)的检测方法。

1 材料与方法

1.1 大鼠胸主动脉内皮细胞培养

大鼠胸主动脉内皮细胞培养采用贴块培养法,参照 Jaffe[1] 方法加以改进。培养的内皮细胞传至第 6 代开始实验。

1.2 大鼠胸主动脉环张力测定

按 Schini[2] 方法记录大鼠胸主动脉血管环的等长张力。血管环被逐渐拉长至对 10^{-6} mol/L 苯肾上腺素(PE)出现最大的等长收缩为最适静息张力(1.73±0.12 g)。去内皮血管环制备:在连接张力测定装置前,用表面粗糙的金属小棒在管腔内滚动 3~4 次,对 10^{-6} mol/L 乙酰胆碱(Ach)舒张反应丧失,此外,形态学观察此方法也能成功的去除内皮。

一旦静息张力调整好后,胸主动脉环用 37℃的 krebs 液冲洗 3 次后,加入 10^{-5} mol/L 消炎痛,以阻止内源性前列环素的产生,平衡 45 min 后开始实验。每个血管环先用 10^{-6} mol/L PE 使其收缩,并将该收缩幅度定为 100%,然后观察各种干预因素对各环张力的影响,张力高于此值为收缩,反之为舒张,张力变化以收缩或舒张百分率表示。

1.3 实验方案和分组

将 CEC 用胰蛋白酶从培养瓶壁上消化下来,加入少量培养液,吹打成单细胞悬液,176×g 离心 10 min 后,弃上清,加 krebs 液 10 ml,细胞浓度为 20×10^6 cells·ml^{-1},持续给予 95%O_2-5%CO_2 气体,维持 37℃。细胞液中分别加入终浓度为 10^{-5} mol/L Ach、10^{-5} mol/L L-精氨酸(L-Arg)、10^{-5} mol/L N^G-甲基-L-精氨酸(L-NMMA)或以上浓度的 Ach+L-Arg、Ach+L-NMMA,孵育 30 min,将经不同预处理的 CEC 悬液再加入去内皮的血管环浴槽中,浴槽中 CEC 终浓度为 10^6 cells·ml^{-1},观察经不同预处理后的 CEC 对去内皮血管环张力的影响。按不同预处理方式的 CEC 分为:①单纯 CEC 组;②Ach 预处理组;③L-Arg 预处理组;④L-NMMA 预处理组;⑤Ach 和 L-Arg 预处理组;⑥Ach 和 L-NMMA 预处理组。

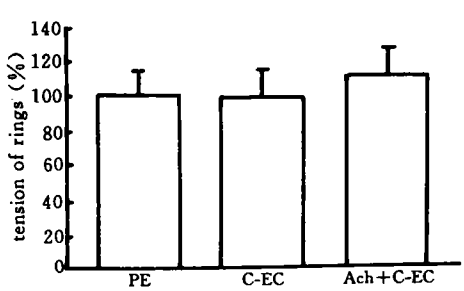
1.4 统计分析

数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,n 代表血管环的数量,方差分析和组间 q 检验作统计学处理,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 单纯及经 Ach 预处理的 CEC 对去内皮血管环的作用

单纯 CEC 加入去内皮血管环浴槽中,对血管环张力未发现明显影响;加入经 Ach 预处理的 CEC,则对该环产生轻微收缩,但未达到显著差异(图 1)。



CEC: culture endothelial cells, $n=10$ in each group

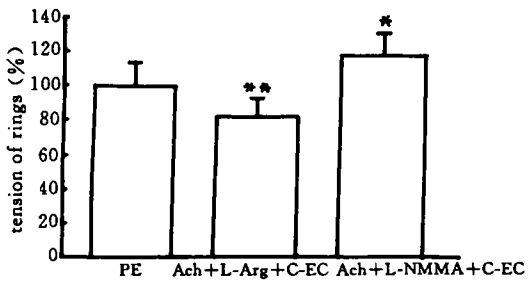
图 1 单纯及经 Ach 预处理的 CEC 对去内皮血管环张力的影响($\bar{x}\pm s$)

Fig 1 Effect of the pure and Ach pretreated culture endothelial cells on the tension in endothelial removed rings ($\bar{x}\pm s$)

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

2.2　L-Arg、L-NMMA 预处理的 CEC 对去内皮血管环张力影响

经 L-Arg 或 L-NMMA 预处理的 CEC，前者对去内皮血管环有明显舒张作用（$P<0.05$），后者对该血管环则有轻度收缩作用，但差异无显著性（$P>0.05$，图 2）。



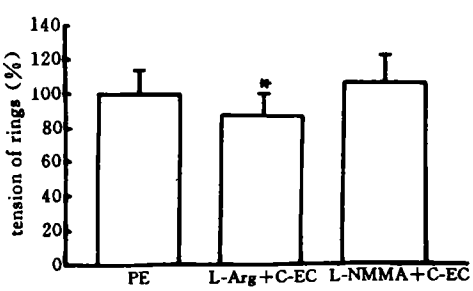
CEC: culture endothelial cells, compared with PE group, *: $P<0.05$, $n=10$ in each group

图 2　L-Arg、L-NMMA 预处理的 CEC 对去内皮血管环张力的影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig 2　Effect of culture endothelial cells pretreated by L-Arg or L-NMMA on the tension in endothelial removed rings ($\bar{x}\pm s$)

2.3　Ach 和 L-Arg、Ach 和 L-NMMA 预处理的 CEC 对去内皮环张力的影响

经 Ach 和 L-Arg 预处理的 CEC 对去内皮血管环产生明显舒张作用（$P<0.01$），而用 Ach 和 L-NMMA 预处理后的 CEC 则对该血管环产生明显的收缩（$P<0.05$，图 3）。



CEC: culture endothelial cells, compared with PE group, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

图 3　Ach 和 L-Arg、Ach 和 L-NMMA 预处理的 CEC 对去内皮血管环张力的影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig 3　Effect of culture endothelial cells pretreated by Ach and L-Arg or Ach and L-NMMA on the tension in endothelial removed rings ($\bar{x}\pm s$)

3　讨论

3.1　Ach 预处理的 CEC 对去内皮血管环张力的影响

为了解单纯 CEC 及经 Ach 预处理的 CEC 是否分泌内皮源性血管活性物质，将单纯 CEC 及经 Ach 预处理的 CEC 加入去内皮的血管环浴槽中，发现单纯 CEC 对该环无明显的作用；而 Ach 预处理的 CEC 对去内皮环不但无舒张作用，反而表现轻微的收缩效应。Mügge[3] 在培养小牛主动脉内皮细胞，同步观察细胞流出液中 EDRF/NO 的量和对去内皮血管环的生物效应，发现培养小牛主动脉内皮细胞于基础状况下就有 EDRF/NO，而经缓激肽处理后，CEC 释放 EDRF/NO 量明显增加，但细胞流出液对去内皮血管环张力并未产生明显影响。本实验单纯 CEC 未发现对去内皮血管环张力有明显影响，可能是基础状态下分泌的 EDRF/NO 不足以使去内皮血管环产生舒张[4]。但 Ach 预处理的 CEC 非但不能使该环舒张，且还有轻度的收缩作用，故难用 Ach 刺激 CEC 分泌 EDRF/NO 来解释，这种现象可能就是 Ach 的直接缩血管作用[5]。提示 CEC 在基础状态和经 Ach 预处理后，合成和分泌 EDRF/NO 的能力很低或缺如。

3.2　L-Arg、L-NMMA 对 CEC 合成、分泌 EDRF/NO 的影响

经 L-Arg 孵育的 CEC 可引起去内皮血管环出现明显舒张，而单独将 L-Arg 加入去内皮血管环浴槽中却未能发现使其舒张，提示作为 EDRF/NO 前体的 L-Arg 有促使 CEC 合成和分泌 EDRF/NO 的作用[6]，并能产生血管舒张效应。而 L-NMMA 预处理的 CEC 则表现为血管收缩趋势，反证了 L-Arg 的内皮依赖作用。虽然 L-NMMA 的这种收缩作用未达到显著差异，可能与本实验所用 L-NMMA 浓度或孵育时间有关。

3.3　L-Arg 和 Ach 致 CEC 合成、释放 EDRF/NO 的协同作用

L-Arg 预处理的 CEC 可使去内皮血管环产生明显舒张（$P<0.05$），再加入 Ach 后，可使舒张作用更加明显（$P<0.01$）；而 L-NMMA 和 Ach 与 CEC 孵育后，则对去内皮血管环产生明显的收缩作用（$P<0.05$）。提示 CEC 合成和释放 EDRF/NO 能力不足[7]，很可能是内源性 EDRF/NO 前体 L-Arg 缺乏，供给外源性 L-Arg 即可使 CEC 合成和释放 EDRF/NO 增加，在 L-Arg 供给充足的情况下，Ach 可刺激 CEC 释放 EDRF/NO，从而产生更明显的血管舒张作用。L-NMMA 通过与 L-Arg 的竞争拮抗，阻止 CEC 合成和释放 EDRF/NO 的作用，加之 Ach 的直接血管收缩效应，叠加的结果致使该两药孵育的 CEC 引起去内皮血管环明显收缩。

参考文献

1　Jaffe VB, Nachman RL, Becker CG *et al*. Culture of human ednothelial cells derived form unbilical veins. J Clinic Invest, 1973; 52: 2745

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

2 Schini VB, Vanhoutte PM. L-Arginine evokes both endothelium-dependent and inependent relaxation in L-arginine depleted aortas of rat. Circ Res, 1991; 68: 209
3 Mügge A, Elwell, JH, Peterson TE *et al*. Release of endothelium-dependent relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. Am J Physiol, 1991; 260: C219
4 Mary DS, Ingrid H, Sarelius F *et al*. L-Arginine-induced conducted signals alter upstream arterial responsivity to L-arginine. Circ Res, 1995; 77: 695
5 Busse R, Mulsch A, Fleming I *et al*. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. Circulation, 1993; 87(Suppl V): V18
6 Fleming I, Gray GA, Stalet JC *et al*. Influence of endothelium on induction of the L-arginine-nitric oxide pathways in rat aortas. Am J Physiol, 1993; 264: H1200
7 Fleming I, Hecker M, Busse R. Intracellular alkalinization induced by bradykinin sustains activation of the constitutive nitric oxide synthase in endothelial cells. Circ Res, 1994; 74: 1220

(收稿: 1995-09-27; 修回: 1996-03-21)
(编辑 仇玉福)

Effects of L-arginine and N^G-monomethyl-L-arginine on the release of endothelium-derived relaxing factor in cultured endothelial cells of rats

Huang Lan, Zhu Shanjun, Meng Surong (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract The purpose of our study was to look for a method for the detection of the release of the endothelium-derived relaxing factor (EDRF) by cultured endothelial cells (CECs) and the factors modulating the release of EDRF by CECs. The endothelial cells of the thoracic aorta of rats were cultured. The thoracic aortic ring of rats was isolated and the endothelium of the aortic ring was removed. The tension of this endothelium-removed aortic ring (ERAR) was determined after treated with various preparations of CEGs. It was found that pure CECs and CECs pretreated with acetylcholine (Ach) exerted no significant effect on the tension of ERAR; CECs pretreated with L-arginine (L-Arg) or L-Arg and Ach was able to result in marked vasodilatation of ERAR; CECs pretreated with N^G-monomethyl-L-arginine and Ach could bring about marked vasoconstriction of ERAR. Our findings suggest that the ability of CECs to synthesize and release EDRF is quite low or is even lost under basic condition or after the pretreatment with Ach due to possibly a shortage of the endogenous precursor of EDRF but the synthesis of EDRF by CECs is significantly promoted by the provision of L-Arg and the addition of Ach after the provision of L-Arg can further increase the release of EDRF.

Key words endothelial cell, culture; endothelium-derived relaxing factor; isolated aortic ring; acetylcholine; L-arginine; rat

(上接 124 页)

3.4 频谱形态的改变

典型性偏头痛多为频宽增大，普通型偏头痛多为频宽变小。多数流速增高者，频谱收缩峰锐利，S_1峰＞S_2峰，流速减慢者，频谱收缩峰圆钝，S_1峰＜S_2峰或S_1、S_2峰融合，α角度＜90°。

3.5 音频异常

表现为收缩期间粗糙而响亮的噪音性杂音，多数呈节段性改变，少数呈持续性改变。

目前认为偏头痛的发病机理是头颅血管及神经递质(5-羟色胺，血小板单胺氧化酶，徐缓激肽，游离脂肪酸等)的变化[3]。亦有文献强调颅内外血管运动障碍是导致偏头痛的重要原因。

偏头痛的 TCD 检测，为偏头痛病人治疗和预防性治疗提供了新依据。血流加速型偏头痛在头痛发作时不宜使用麦角类血管收缩剂，在预防性治疗时则以钙离子拮抗剂为首选，如尼莫地平等。TCD 的研究，可以对偏头痛的诊断，治疗及药物选择提供新的线索。

关键词 偏头痛；颅多普勒(TCD)检查
中图法分类号 R747.204

参考文献

1 徐绍彦，陈保健，张 成. 经颅多普勒超声与临床. 南京大学出版社，1991: 82～83
2 方 都. 经颅多普勒超声诊断颅脑疾患的新进展. 中华超声影像学杂志，1995; 4(1): 41
3 王明礼. 临床头面痛学，北京：中国医药科技出版社，1993: 129

(收稿: 1995-09-17; 修回: 1996-02-29)
(编辑 张大春)

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