DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.005

缺氧对平滑肌细胞生长特性、细胞内游离钙及环磷酸腺苷浓度的影响*

王培勇 孙秉庸 (第三军医大学基础部病理生理学教研室 高原医学教研室) 630038

提 要 文中报道了缺氧条件下培养的肺动脉平滑肌细胞(PASM)的形态特点、生长曲线和蛋白质含量的变化,测定了缺氧时PASM游离钙浓度([Ca^{2+}])和环磷酸腺苷(cAMP)含量的变化。主要结果与结论如下:(1)培养的PASM能在2%O_2缺氧条件下生长,其光镜形态、生长情况与细胞蛋白质含量与21%O_2常氧条件下相似;(2)向PASM的无钙细胞悬液中分别通入0%O_2、3%O_2和5%O_2 1 min,细胞内[Ca^{2+}]均明显升高($P<0.001$),随着通气时间延长,[Ca^{2+}]持续升高至400～513 nmol/L;(3)通入N_2缺氧1 min末PASM的cAMP含量与对照组相比明显升高($P<0.05$),5 min末高峰($P<0.01$),10 min末有下降趋势,但仍高于正常水平($P<0.05$)。以上结果提示:缺氧(2%O_2)不能导致培养的PASM增生或肥大;培养的PASM对缺氧有较强的耐受力;缺氧可直接影响PASM的第二信使传递系统。

关键词 缺氧症;肺动脉;肌,平滑;钙;cAMP
中图法分类号 R594.3

急慢性缺氧均可导致肺动脉高压(pulmonary artery hypertensin,PAH),急性缺氧导致的PAH主要是由缺氧性肺血管收缩(hypoxic pulmonary vasoconstriction,HPV)引起,而慢性缺氧导致的PAH既有肺动脉收缩也有肺血管壁结构构建(包括动脉中膜肌层肥厚、外膜纤维化等)[1]。对PAH的发生机制已进行了数十年的研究,但仍不完全清楚。第二信使传递系统与PAH的发生关系密切,但仍有许多问题有待解决。本实验旨在观察缺氧对于体外培养的小牛肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells,PASM)的直接作用,特别是对第二信使传递系统的作用,以进一步探讨HPV和PAH发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

RPMI-1640(JR Scientific Inc. USA),Trypsin(Difico),EGTA(Sigma),Fura-2和Fura-2/AM(中国科学院药物研究所),cAMP放免测定试剂盒(上海第二医科大学同位素室),其它试剂均为国产AR级。

1.2 PASM培养[2]

选择雄性健康新生小牛,在无菌操作下取出肺动脉,用D-Hank's液冲洗数次后纵行剖开血管壁,用钟表摄子撕去内膜,然后小心将中膜撕成薄条。将中膜剪成1～2 mm^2小块,用RPMI-1640冲洗三次,将小块加入培养瓶均匀铺开,于37℃、5%CO_2下培养。约7～14 d后,在相差显微镜下观察可见PASM从组织块边缘长出,呈放射状排列。此时用0.125% Trypsin消化分散细胞,进行传代培养。常规培养基为含20%的新生小牛血清RPMI-1640。细胞鉴定采用相差显微镜细胞呈梭形、呈"峰谷"长势及透射电镜可见肌丝与致密体为培养成功。

1.3 生长曲线和蛋白质含量测定

选择生长良好的PASM,以Trypsin消化后使细胞分散,以10^4个/cm^2密度接种,随机分为常氧组和缺氧组,每组20瓶细胞,分别置于21%O_2和2%O_2培养。每天定时取上述各2瓶细胞,于相差倒置显微镜下观察细胞形态和生长状况,然后将细胞消化分散计数,并以Lowry法测定蛋白质含量。以培养天数为横座标,以细胞数和蛋白质含量为纵座标,绘制生长曲线和蛋白质含量变化曲线。

1.4 细胞内钙释放的动态测定[3]

取长满成层的PASM,弃培养液后用平衡盐(buffer salt solution,BSS)将瓶底细胞冲洗3次,然后用无钙镁含1 mmol/L EDTA的BSS温育5 min,细胞从瓶底分离后用BSS洗涤3次,用RPMI-1640制成细胞悬液(10^6个/ml),并用台盼兰检查细胞存活率>95%者置4℃保存备用。

以Fura-2为荧光指示剂测定细胞内钙释放。负载Fura-2时,向细胞悬液内加入5 mmol/L的Fura-2/Am,37℃温育15 min,离心弃上清后加新鲜BSS,37℃温育20 min,以使细胞内的Fura-2/Am完全水解为Fura-2。离心弃上清后将细胞悬浮于无钙BSS(内含1 mmol/L EGTA)中,于2 h内测定。另备未负载Fura-2的细胞以测自身荧光。

测定时将细胞悬液随机分为3组:N_2组、3%O_2组和5%O_2组,以观察3种不同浓度的低氧气体对细胞内钙释放的影响。于37℃恒温稳定后测试。测定激发波长380 nm、340 nm时发射波长为500 nm的荧光强度。然后通入低氧气体,测定缺氧1、5、10、15 min的[Ca^{2+}]。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39270316

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

1.5 cAMP 含量测定

于100 ml 玻璃培养瓶内接种 PASM，细胞汇合成"峰谷"长势后随机分为常氧组和缺氧组。对照组于37℃通入21%O_2 10 min。缺氧组通入121%O_2 10 min 后通入 N_2于1、5、10 min 3个时点取样。取样时，吸弃培养液，立即向瓶内加入1 ml冰冷的0.24 mol/L 高氯酸，用橡皮刮器刮取收集细胞，冰浴下超声破碎，离心取上清以3 mol/L KOH 中和至 pH6.3左右，离心除去高氯酸钾沉淀，冰冻干燥后于－20℃贮存备测。cAMP 测定按药盒说明书进行。

1.6 统计处理

所得数据采用多因素或单因素方差分析，结果以均值±标准差表示（$\bar{x} \pm s$），并做方差保护显著性检验。

2 结果

2.1 缺氧对 PASM 形态、生长状况和蛋白质含量的影响

在相差显微镜下观察，缺氧组（2%O_2）PASM 形态及生长情况与对照组类似。缺氧组和对照组的生长曲线和蛋白质含量无明显差别，二者均于4～8 d 达高峰，然后有降低趋势（图1）。

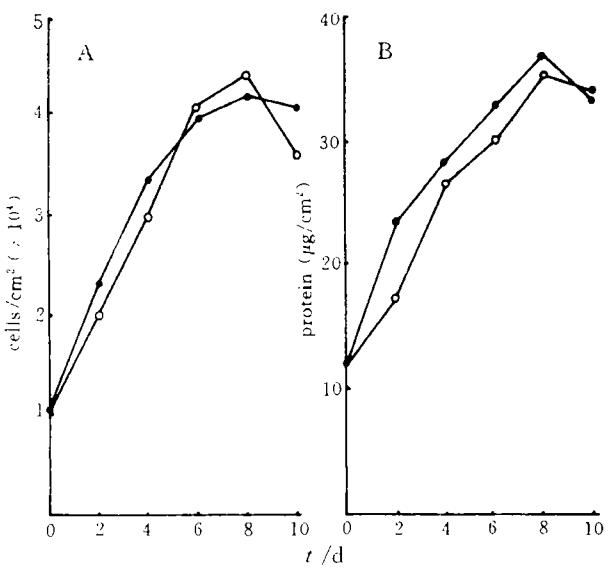


图1 2%O_2（·——·）和21%O_2（○——○）条件下 PASM 的生长曲线（A）和蛋白质含量（B）的变化

Fig 1 Growth curves (A) and protein content (B) of PASM cultured in 2%O_2 (·——·) and in 21%O_2 (○——○). ($n=2$)

2.2 缺氧对 PASM 内钙释放的影响

向细胞悬液内通入低氧混合气体1 min，PAEC 的[Ca^{2+}]即开始升高（$P<0.001$），随着通气时间延长，[Ca^{2+}]持续升高至400～513 nmol/L。0%O_2组和3%O_2组在同一时点的[Ca^{2+}]无明显差别，但0%O_2组和3%O_2组的[Ca^{2+}]于缺氧1 min、5 min 末[Ca^{2+}]比5%O_2组的[Ca^{2+}]高（$P<0.05$），三组的[Ca]在10 min 和15 min 两个时点无明显差别（图2）。

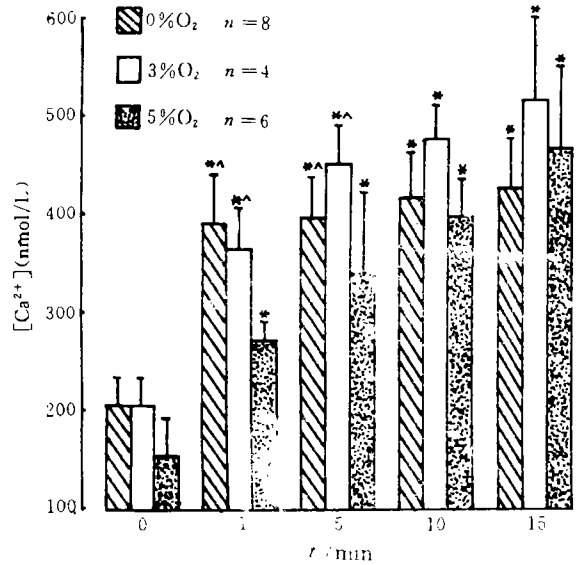


图2 缺氧对 PASM 的[Ca^{2+}]的影响

Fig 2 The effect of hypoxia on [Ca^{2+}] in PASM ($\bar{x} \pm s$) * $P<0.01$ vs base value, ∧ $P<0.05$ vs 5%O_2 group at the same time point.

2.3 缺氧对 PASM 的 cAMP 含量的影响（图3）

缺氧1 min 末，PASM 的 cAMP 含量与对照组相比明显升高（$P<0.05$），5 min 末进一步升高（$P<0.01$），10 min 有降低趋势，但仍高于对照水平（$P<0.05$）。

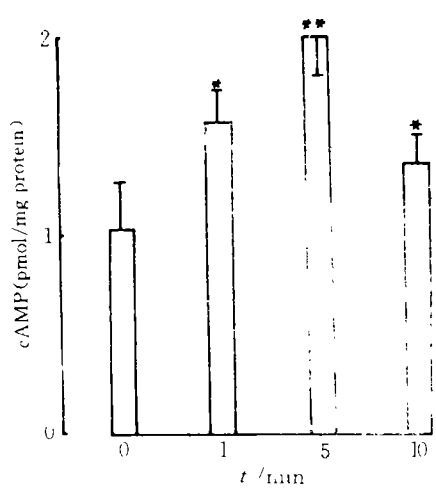


图3 缺氧对 PASM 的 cAMP 含量的影响

Fig 3 The effect of hypoxia on cAMP concentration in PASM ($\bar{x} \pm s$, $n=8$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control value.

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

3 讨论

研究表明HPV主要是由于肺血管壁平滑肌收缩引起，PAH即有肺动脉平滑肌的收缩又有肺动脉平滑肌的增生，这些改变是否由于缺氧直接作用于PASM所致需进一步研究。

本文观察到，体外培养的PASM能在低氧状态（2%O_2）下生长，其生长情况与常氧状态下的类似，这似乎说明体外培养的PASM能耐受低氧。其它学者于其它类型的细胞也观察到体外培养的细胞能耐受低氧[4]，可能与缺氧刺激糖酵解途径的酶有关[5]。低氧并不能直接使培养的PASM增生或收缩，说明HPV或PAH的发生和发展并不是缺氧直接作用于血管平滑肌引起的，可能有其它因素的参与。

缺氧可促进肺动脉平滑肌细胞钙跨膜内流，从而使细胞内[Ca^{2+}]升高[6]。但用异博定、硝苯吡啶等钙通道阻断剂抑制钙跨膜内流可以减轻但不能完全阻止缺氧性肺血管收缩[7]。有人认为PASM内钙释放在缺氧肺血管收缩中起重要作用[8]。但缺氧刺激PASM内释放的直接证据尚乏报道。

本文实验证明，虽然PASM可在低氧环境中生长，但急性缺氧（向PASM无钙细胞悬液内通入低氧气体）1～20 min，PASM的[Ca^{2+}]持续上升至400～513 mmol/L。因细胞悬浮于无钙介质中，细胞内[Ca^{2+}]升高只能来自于PASM肌浆网的释放。同时也观察到，急性缺氧（1～10 min）也使PASM的cAMP含量升高。缺氧作为直接刺激，使培养原PASM的内钙释放增加可能与缺氧导致的细胞内ATP缺乏使内质网钙泵对Ca^{2+}摄取降低[9]及缺氧使磷脂酶C激活产生1,4,5-三磷酸肌醇有关[10]。三磷酸肌醇可作用于内质网膜的受体，促使钙释放。Ca^{2+}可激活腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶，这可能是缺氧时PASM细胞内cAMP先升高然后有下降趋势的原因。

cAMP和Ca^{2+}是细胞内重要的第二信使，它们介导许多重要的病理生理过程。缺氧直接作用于PASM，可能通过第二信使系统参与缺氧性肺血管收缩和肺动脉高压的形成。

参考文献

1 Sun Bing-Yong. Mechanism of hypoxic pulmonary hytertension. Physiological Science, 1991, 7(3): 249

2 Campbell JC, Ross R. The smooth muscle cell in culture. Physiol Rev, 1979, 59: 1

3 Elwood ER, Dubyak GR. Agonist-induced calcium transients in cultured smooth muscle cells: measurement with Fura-2 loade monolayers. Biochem Biophysi Res Commun, 1986, 136: 927

4 Lee SL, Fanburg BL. Glycolytic activity and enhance of serotonin uptake by endothelial cell expose to hypoxia and anoxia. Cir Res, 1987, 60: 653

5 Robin ED, Murphy GJ, Theoore J. Coorinate regulation of glycosis by hyppoxia in mamalian cells. J Cell Physiol, 1984, 118: 287

6 Cornfield DN, Stevens T, Mc Murtry IF, et al. Acute hypoxia causes membrane depolarization an calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Physiol, 1994, 266(4pt1): L469

7 王肇文，孙秉庸. 哨苯吡啶对幼猪缺氧性肺动脉增高和右心室肥大的影响. 中国病理生理杂志, 1986, 2(1): 19

8 Hoshino Y, Obara H, Kusunok M, et al. Hypoxia contractile response in isolated hyman pulmonary artery: role of calcium ion. J Appl Physiol, 1988, 65(6): 2468

9 Arnould T, Michiels C, Alexandre I, et al. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. J Cell Physiol, 1992, 152(1): 215

10 杜军英，孙秉庸. 缺氧幼猪离体肺小动脉^{3}H-磷酸肌醇及组织多胺含量的变化. 中国病理生理杂志, 1994, 10(3): 270

（收稿：1994-10-04；修回：1994-11-28）

Effects of hypoxia on the growth and the calcium and cAMP contents of the cultured smooth muscle cells of bovine pulmonary artery

Wang Peiyong, Sun Bingyong (Research Lab of High Altitue Medicine, Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of hypoxia on the growth and the cAMP and cytosolic calcium ions (Ca^{++}) contents of the cultured smooth muscle cells of bovine pulmonary artery (PASMCs) were investigated. The findings were as follows: (1)When cultured under an atmosphere containing only 2% oxygen, PASMCs showed similar growth, morphology under optical microscopy and cellular protein content as those under normoxic condi-

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

tion of 21% oxygen. (2)When PASMC suspension in calcium-free medium was exposed to 0%, 3% and 5% oxygen for one minute, intracellular Ca^{++} level was increased significantly and the increase was more significant when the exposure was prolonged. (3)At the 1st minute of anoxia (0% oxygen), cAMP level of PASMCs was significantly increased and the elevation reached the peak at the 5th minute of exposure. At the 10th minute, cAMP level went down but remained higher than the normal control. These findings suggest that PASMCs can relatively withstand hypoxia of 2% oxygen, hypoxia along cannot result in hypertrophy or hyperplasia of PASMCs and hypoxia exerts influence directly on the second messenger system of the cultured PASMCs.

Key words anoxia; pulmonary artery; smooth muscle; calmcium; cAMP

膜脂质微环境改变对淋巴细胞功能及 CD_{71} 分子特性影响的研究

Influence of lipid microenvironment on lymphocyte function and CD_{71} molecule properties

糜浸天 朱锡华 (第三军医大学基础部免疫学教研室) 630038

细胞膜是细胞内外环境的屏障,众多研究显示膜脂质组成及膜生物物理特性(统称膜脂微环境)与细胞许多功能变化有关,它可控制不同的细胞膜特性、调节物质转运、配体与受体的结合、跨膜信号传递、细胞分化与细胞识别。膜脂微环境改变诱导的细胞功能的变化常常与它们影响了膜蛋白的结构和功能有关。

本实验通过磷脂酰胆碱/胆固醇(PC/Ch)摩尔比不同的小单片层人工脂双层膜(SUV)与淋巴细胞孵育,将外源性 PC 和 Ch 导入淋巴细胞,进而研究膜脂质组成及膜生物物理特性的变化,对淋巴细胞膜蛋白结构,Ca^{2+} 通道蛋白活性,淋巴细胞增殖活化功能,CD_{71} 分子表达、CD_{71} 分子与配体亲和特性及内在化运动的影响;膜脂质微环境改变是否伴有 CD_{71} 分子二级结构和空间构象的变化。实验结果显示:(1)SUVs 处理淋巴细胞经 ConA 或 TPA 活化后,细胞均出现超极化反应,膜内侧负电荷增加,膜电位(负值)平均增加9～30 mV,膜电位的变化随膜中磷脂/胆固醇(PL/Ch)摩尔比升高而降低,且加用20 μmol/L 异博定阻断 Ca^{2+} 通道蛋白活性后,超极化反应减弱或消失。另外,胞浆膜中 Ch 增多可致 $[Ca^{2+}]i$ 和 $^{45}Ca^{2+}$ 内流增加,阻断 Ca^{2+} 内流,可消除膜脂组成改变所诱导的 $[Ca^{2+}]i$ 和 $^{45}Ca^{2+}$ 内流的差异,提示膜脂组成改变,膜微粘滞性升高影响了 Ca^{2+} 通道蛋白活性,后者与伴随的膜电位改变有关;(2)膜蛋白内源性荧光光谱扫描显示胞浆膜中 PL/Ch 的变化可以影响膜蛋白结构或其在膜上的分布,活化不同时间光谱图的差异,提示淋巴细胞活化,伴随着多种膜蛋白在膜上的激活,或重新分布,在不同活化阶段,它们在膜上的表达、结构与功能或膜上分布不同;(3)SUVs 处理淋巴细胞活化48 h 后,其膜表面 CD_{71} 分子数量、CD_{71} 分子与配体亲和特性及内在化运动均不同,胞浆膜 Ch 增加,PL/Ch 比降低,CD_{71} 分子数量增加,其与配体亲和力下降,但内在化运动却加快。加用 HMG－CoA 还原酶抑制剂抑制内源性 Ch 合成,CD_{71} 分子数量明显减少,CD_{71} 与配体亲和力升高。斑点杂交,FCM 分析及细胞功能检测也显示 CD_{71} mRNA、CD_{71} 阳性淋巴细胞和细胞增殖转化功能的变化与上述受体分析结果基本吻合,提示膜上 Ch 高低对膜表面 CD_{71} 数量的影响主要与基因转录活性改变有关,而非 CD_{71} 分子在膜上的重新分布或 CD_{71} 配体可结合部位暴露明显变化所致。膜上 Ch 增加,CD_{71} 与配体亲和力降低,可能是膜脂液相区减少,CD_{71} 分子不易形成高亲和性配体结合位点结构的缘故。(4)将分离纯化的 CD_{71} 分子与不同的合成磷脂、胆固醇构成的人工脂膜重组,结果不同脂双层膜对 CD_{71} 分子二级结构及空间构象有明显影响,膜中 Ch 增加,可以诱导出更多的 α－螺旋结构和无规卷曲;另外 DMPC/Ch 膜对 CD_{71} 分子结构影响较 DOPC/Ch 膜显著。TrP 内源性荧光光谱扫描及 KI 淬灭效应也提示,在 DMPC/Ch 膜上随 Ch 比例升高,CD_{71} 分子胞外区结构可能变得疏松,推测后者与淋巴细胞胞浆膜中 Ch 改变所致 CD_{71} 分子与配体结合特性变化有关。(5)SUVs 作用后胞浆膜中 PL/Ch 比增高,G_2＋M 期细胞减少,细胞增殖转化功能降低,反之,G_2＋M 期细胞增多,细胞增殖活跃,但 Ch 含量过多(膜中 PL/Ch 活化前达1:0.826),G_2＋M 期细胞反而减少,用 Lovastatin 抑制内源性 Ch 合成后,淋巴细胞大部分受阻于 G_0/G_1 期,细胞增殖受抑,且这种抑制作用不能被外源性 rIL－2有效逆转。另外,活化标志物 CD_{71} 表达的分析也显示同样的变化趋势,提示静息淋巴细胞膜中 PL/Ch 高低与细胞活化有关,而后续内源性 Ch 的合成则是细胞大量增殖,分裂所必需的。

综上所述,本研究淋巴细胞功能活性的变化可能主要与不同膜脂质微环境影响了某些膜受体,离子通道蛋白(如 Ca^{2+} 通道蛋白)等结构与功能,进而使淋巴细胞膜信号接收,跨膜信号传递及细胞功能活性改变。这些变化可能与脂质,尤其是胆固醇的直接作用有关,另外,膜特性如膜脂质流动性,跨膜电位等改变可能也起重要作用。

关键词 细胞膜;淋巴细胞;CD_{71};跨膜电位;细胞周期;Ca^{2+} 通道

中图法分类号 R392.12

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