

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0636-03

# 尾加压素 $\text{U}$ 在吸烟大鼠脑血管内皮细胞的表达

刘菲<sup>1</sup>, 柳宗兰<sup>2</sup>, 王一沙<sup>1</sup>

(1 沈阳医学院沈洲医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110002)

(2 中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 脑梗死; 尾加压素 $\text{U}$ ; 吸烟; 内皮细胞

[摘要] 目的 观察不同吸烟量大鼠脑内血管内皮细胞尾加压素 $\text{U}$ 的表达, 初步探讨吸烟导致脑缺血的发病机制。方法 健康 Wistar 大鼠 60 只, 分为正常对照组、短期大量吸烟组、长期大量吸烟组、长期少量吸烟组、戒烟组及非吸烟组。通过免疫组织化学法观察大鼠脑血管内皮细胞尾加压素 $\text{U}$ 的表达。结果 正常对照组及非吸烟组尾加压素 $\text{U}$ 表达极少, 余各组可见有不同程度表达, 且与正常对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论 吸烟可致脑血管内皮细胞尾加压素 $\text{U}$ 表达增加, 可能是吸烟致动脉粥样硬化的主要途径之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Expression of Urotensin- $\text{U}$ on Vascular Epithelium in Smoked Rat Brain

LU Fei<sup>1</sup>, LU Zong-Lan<sup>2</sup>, and WANG Yi-Sha<sup>1</sup>

(1 Department of Neurology, Shenzhou Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110002; 2 Department of Neurology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Cerebral Infarction; Urotensin- $\text{U}$ ; Smoking; Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To observe expression of urotensin- $\text{U}$  ( $\text{U-}\text{U}$ ) on vascular epithelium in smoked rat brain and to discuss the mechanism of ischemia in brain caused by smoking. **Methods** 60 health Wistar rats were divided into 6 groups: normal group, short-time and big-dose smoking group, long-time and big-dose smoking group, long-time and small-dose smoking group, giving-up smoking group, control group. We obtained brain following experiment ending and observed expression of  $\text{U-}\text{U}$  in smoked rat by immunohistochemistry stain. **Results** The expression of  $\text{U-}\text{U}$  in normal group and control group was weak. The significant different expression was observed in other groups ( $P < 0.05$ ). Giving up smoking can reduce the expression of  $\text{U-}\text{U}$ . **Conclusion** Smoking can make more  $\text{U-}\text{U}$  expression in endothelial cell. There is prominent dose-dependent and time-dependent relationship between smoking and expression of  $\text{U-}\text{U}$ . Giving up smoking can reduce expression of  $\text{U-}\text{U}$ . The increase of  $\text{U-}\text{U}$  plays an important role in ischemic cerebral vascular disease (ICVD) caused by smoking.

缺血性脑血管病的发病率、致残率及死亡率都很高。吸烟是其重要的可干预的危险因素之一, 越来越受到人们的重视, 但其发病机制尚不清楚。近年来, 随着分子免疫学、分子生物学的深入发展, 缺血性脑血管病的发生与动脉粥样硬化形成密切相关已得到证实。研究证实, 炎症反应贯穿于动脉粥样硬化的整个发生和发展过程, 而泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化形成和发展的重要病理改变。国内外大量的基础和临床研究均表明, 尾加压素 $\text{U}$  (urotensin $\text{U}$ ,  $\text{U-}\text{U}$ ) 作为一种新发现的血管活性肽, 具有强烈的促丝裂作用, 其与动脉粥样硬化的发生和

发展有密切关系<sup>[1,2]</sup>。本实验通过观察不同吸烟量的大鼠脑血管内皮细胞尾加压素 $\text{U}$ 的表达情况, 从而初步探讨吸烟导致脑缺血的发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康 Wistar 大鼠 60 只购于中国医科大学动物实验中心, 尾加压素 $\text{U}$ 单克隆抗体、SABC 试剂盒购于武汉博士德生物制品有限公司, 实验用烟为市售 X 牌香烟。

### 1.2 动物模型制备

健康 Wistar 大鼠 60 只, 分为 6 组。正常对照组, 6 只, 不做任何处理; 短期大量吸烟组, 12 只, 每次吸烟 10 支, 每天 2 次, 连续吸烟 30 天; 长期大量吸烟组, 12 只, 每次吸烟 10 支, 每天 2 次, 连续吸烟 90 天; 长期少量吸烟组, 12 只, 每次吸烟 4 支, 每天

[收稿日期] 2010-07-15 [修回日期] 2010-08-18

[作者简介] 刘菲, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为脑血管病的发病机制。E-mail 为 liufei126@126.com。柳宗兰, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病的发病机制。王一沙, 主任医师, 教授, 研究方向为脑血管病的发病机制。

2次,连续吸烟 90天;戒烟组,12只,每次吸烟 10支,每天 2次,连续吸烟 30天,戒烟 30天;非吸烟组,6只,放入同样烟仓,不吸烟。

### 1.3 切片制备

实验完毕后次日分别从各吸烟组随机取出 10只大鼠,腹腔注射 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后,经左心室-主动脉用 1%肝素化生理盐水 100 mL快速冲洗,使冲洗液变清后,再以 4%的多聚甲醛磷酸盐缓冲液 150 mL灌注固定(PBS 0.1 mol/L, pH 7.4),开颅取脑,放入 4%的多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注液中固定。常规脱水,浸蜡,石蜡包埋,连续于石蜡切片机上自视交叉平面切取冠状切片,片厚 5  $\mu$ m。

### 1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片经二甲苯、乙醇脱蜡至水。经 PBS(0.1 mol/L)反复冲洗 3次,每次 5 min。蒸馏水冲洗,3%  $H_2O_2$  孵育 10 min,微波抗原修复后 PBS冲洗。滴加正常山羊血清工作液室温孵育 40 min 封闭。倾去血清,滴加 U- $\alpha$  抗体 4℃冰箱过夜。PBS冲洗(5 min  $\times$  3),滴加生物素标记的第二抗体,37℃室温孵育 30 min PBS冲洗 3次。滴加 SABC 工作液,37℃孵育 30 min PBS冲洗。DAB 显色,自来水充分冲洗。苏木素轻度复染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。免疫组织化学染色,阴性对照以 PBS代替一抗孵育,余步同上。

### 1.5 统计学分析

在 40 $\times$ 10倍的光镜视野下,对切片的 U- $\alpha$  阳性细胞进行计数,每只鼠每组各 1张切片。每个切

片分别随机取 5个不重叠视野。阳性反应物为突出于或着背景的棕黄色沉积,未见明确棕黄色沉积、色浅淡与背景几乎一致者为阴性。数据结果应用 SPSS13.0 软件包处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间数据的比较依据资料的性质,采用  $t$  检验或方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

尾加压素  $\alpha$  阳性反应物呈棕黄色。U- $\alpha$  定位于血管内皮细胞的细胞浆。正常对照组及非吸烟组 U- $\alpha$  表达极少;长期大量吸烟组 U- $\alpha$  表达明显高于其他各吸烟组;戒烟组 U- $\alpha$  表达明显低于其他各吸烟组,但高于正常对照组和非吸烟组。各组均可见到 U- $\alpha$  阳性细胞表达较正常对照组及非吸烟组增多( $P < 0.05$ , 表 1 和图 1)。

表 1 各组尾加压素  $\alpha$  阳性血管内皮细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	阳性血管内皮细胞数
正常对照组	6	3.050 $\pm$ 1.004
非吸烟组	5	2.650 $\pm$ 0.568
长期大量吸烟组	10	31.750 $\pm$ 4.014 <sup>a</sup>
长期少量吸烟组	10	20.720 $\pm$ 2.512 <sup>ab</sup>
短期大量吸烟组	11	15.700 $\pm$ 2.078 <sup>ab</sup>
戒烟组	11	12.360 $\pm$ 1.298 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组及非吸烟组比较; b 为  $P < 0.05$  与长期大量吸烟组比较。

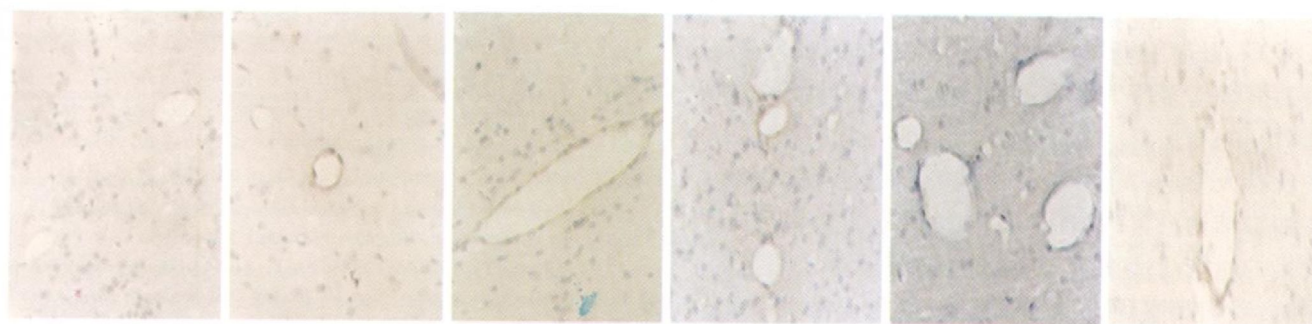


图 1 免疫组织化学染色法检测尾加压素  $\alpha$  在脑血管内皮细胞的表达

从左到右依次为正常对照组、长期大量吸烟组、戒烟组、短期大量吸烟组、非吸烟组和长期少量吸烟组。

## 3 讨论

缺血性脑血管病是目前直接威胁人民生命健康及生活质量的疾病。在流行病学的调查研究中,显示吸烟是缺血性脑血管病的重要危险因素,但其引起脑梗死的发病机制目前尚不清楚。早在 50 年代

到 60 年代,人们普遍认为脑缺血是由于氧的供需不平衡,但近年来认为脑血管张力的增加、血管壁本身的破坏特别是动脉粥样硬化的形成才是脑缺血最重要、最直接的原因。随着动脉粥样硬化发病机制研究的进展,炎症反应在这一过程中的关键作用已得

到共识<sup>[3]</sup>。而泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化形成和发展的重要病理改变<sup>[4-5]</sup>。U- $\epsilon$ 是一种近年在哺乳动物体内新发现的缩血管活性肽,它是一种由11个氨基酸组成的生长抑素样环肽,最早是从鱼脊髓尾部下垂体中分离出来的一种神经激素,C末端6-11的环状六肽保守序列是其功能的最小活性中心<sup>[6]</sup>。U- $\epsilon$ 同其受体结合后可引起多种生物学效应,如收缩血管作用和促丝裂效应等,U- $\epsilon$ 和其受体GPR14广泛存在于机体的多种组织中,包括心脏、脑、肾脏、血管平滑肌细胞、内皮组织和动脉及动脉粥样硬化斑块的单核细胞、巨噬细胞聚集等区域<sup>[6-7]</sup>。U- $\epsilon$ 对循环血流动力学的效应以及对血管壁及其细胞的作用可能是促进动脉粥样硬化发生和发展的一个重要因素之一。其引起动脉粥样硬化的机制如下:U- $\epsilon$ 是一种丝裂原,能够促进血管内皮细胞、平滑肌细胞以及血管外膜成纤维细胞增殖<sup>[8-10]</sup>。有报道,U- $\epsilon$ 能减少基质金属蛋白酶1(MMP-1)的产生,而MMP-1是一种重要的保护因子,它的减少对动脉粥样硬化斑块的形成有促进作用<sup>[9]</sup>。最近,Watanabe等<sup>[11]</sup>通过体外培养人末梢血单核细胞,证实U- $\epsilon$ 能够上调该细胞中胆固醇酰基转移酶1的活性,促进胆固醇酯的积聚,促进单核细胞来源的巨噬细胞向泡沫细胞转化。Watanabe等<sup>[12]</sup>的研究表明,U- $\epsilon$ 能与致动脉粥样硬化危险因素中的过氧化氢、溶血磷脂酰胆碱、氧化型低密度脂蛋白及5羟色胺等发生协同作用,诱导主动脉平滑肌细胞增殖。

本实验中,观察到长期大量吸烟组大鼠的U- $\epsilon$ 有高表达,短期大量吸烟组及长期小量吸烟组U- $\epsilon$ 也有表达,但比长期大量吸烟组显著降低( $P < 0.05$ )。以上三组与正常对照组及戒烟组比较U- $\epsilon$ 表达显著增多( $P < 0.05$ ),这提示随着吸烟量及吸烟时间的增加U- $\epsilon$ 的表达也在上调,这可能与烟草中含有大量尼古丁及一氧化碳等其它有毒物质致内皮细胞结构损害,并且导致内皮细胞分泌和合成了大量的血管活性物质,继发交感神经活动增强有关。同时,我们观察到U- $\epsilon$ 主要表达在毛细血管后微静脉的内皮细胞上,此处多为炎症过程中白细胞游出部位。由此我们推测,吸烟可致内皮细胞表面的U-

$\epsilon$ 表达上调,U- $\epsilon$ 为单核细胞向泡沫细胞转化及平滑肌细胞增殖形成动脉粥样硬化斑块创造了条件,最终致脑内血栓形成。

吸烟引起脑血管疾病是一个复杂多因素共同作用的结果。本实验中揭示了吸烟可能通过引起内皮细胞结构和功能的损害而激发脑内血管内皮细胞上U- $\epsilon$ 表达增加,从而进一步引起动脉粥样硬化形成,最终导致血栓的形成。目前关于吸烟所致U- $\epsilon$ 表达上调的机制尚不清楚,这为我们进一步研究吸烟与血栓的关系提出了新的课题,同时也为临床脑梗死的治疗提供了一定的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Segain JP, RollDerkinderen M, Gervois N, et al. Urotensin  $\epsilon$  is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes [J]. *J Immunol* 2007; **179** (2): 901-909
- [2] 王志坚, 丁文惠, 史立斌, 等. 氧化低密度脂蛋白对大鼠主动脉平滑肌细胞尾加压素  $\epsilon$  受体表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2006; **86** (4): 242-246
- [3] Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, et al. Cellular distribution of immunoreactive urotensin  $\epsilon$  in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries [J]. *Peptides* 2004; **25** (10): 1767-774
- [4] 杨娜娜, 桑慧, 丁国勇, 等. 单个核细胞分化的命运与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (7): 622-623
- [5] 喻红. 巨噬细胞-动脉粥样硬化的治疗靶点 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (7): 619
- [6] Colon JM, Yano K, Waugh D, et al. Distribution and molecular forms of urotensin  $\epsilon$  and its role in cardiovascular regulation in vertebrates [J]. *J Exp Zool* 1996; **275** (2-3): 226-238
- [7] Boussette N, Patel L, Douglas SA, et al. Increased expression of urotensin  $\epsilon$  and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta [J]. *Atherosclerosis* 2004; **176** (1): 117-123
- [8] Shi L, Ding W, Li D, et al. Proliferation and antiapoptotic effects of human urotensin  $\epsilon$  on human endothelial cells [J]. *Atherosclerosis* 2006; **188** (2): 260-264
- [9] Zhang YC, Li YC, Liu BG, et al. Urotensin  $\epsilon$  accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2007; **28** (1): 36-43
- [10] Matsusaka S, Wakabayashi I. Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin  $\epsilon$  [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; **373** (5): 381-386
- [11] Watanabe T, Suguro T, Miyazaki A, et al. Human urotensin  $\epsilon$  accelerates foam cell formation in human monocytederived macrophages [J]. *Hypertension* 2005; **46** (4): 738-744
- [12] Watanabe T, Takahashi K, Kanome T, et al. Human urotensin  $\epsilon$  potentiates the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on vascular smooth muscle cells: comparison with other vasoactive agents and hydrogen peroxide [J]. *Hypertens Res* 2006; **29** (10): 821-831

(此文编辑 许雪梅)