

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0151- 03

• 实验研究 •

内皮素对离体肺动脉及肺动脉平滑肌细胞的作用

冉丕鑫¹, 杜志强², 陈颜芳³, 钟南山¹

(广州医学院 1. 广州呼吸疾病研究所, 2. 附属第二医院肿瘤所, 广东省广州市 510180

3. 广东省心血管病研究所, 广东省广州市 510100)

[关键词] 内皮素; 肺动脉; 肌, 平滑, 血管; 大鼠; 家兔

[摘要] 通过发现内皮素对肺动脉及肺动脉平滑肌细胞功能的可能影响, 以便进一步探讨内皮素在缺氧性肺动脉高压发病中的作用。取大鼠肺动脉制成 3 mm 长的血管环, 让血管环在最佳静息张力下平衡一段时间后, 按累积法向浴槽内加入内皮素 1, 用二道生理记录仪记录不同浓度的内皮素 1 对血管环收缩功能影响。另采取单层贴壁培养家兔肺动脉中膜平滑肌细胞, 在低血清培养条件下, 加入不同浓度的内皮素 1, 分别用氘标胸腺嘧啶和氘标亮氨酸掺入率来评估内皮素 1 对肺动脉平滑肌细胞 DNA 和蛋白质合成的促进作用。结果发现: 内皮素 1 能引起肺动脉剂量依赖性收缩($r = 0.935$, $P < 0.05$), 在 $(1 \sim 12) \times 10^{-9}$ mol/L 浓度范围内, 内皮素 1 所引起的血管张力迅速上升, 由 40 ± 6 mg 上升至 347 ± 12 mg, 当浓度高于 12×10^{-9} mol/L 时, 收缩张力上升速度减慢。④当内皮素 1 浓度为 $1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-8}$ mol/L 时, 肺动脉平滑肌细胞氘标胸腺嘧啶脱氧核苷和氘标亮氨酸掺入率呈现剂量依赖性增加(r 分别为 0.756 和 0.840, $P < 0.05$), 其 EC_{50} 分别为 10.87 mol/L 和 8.54 mol/L。结果提示, 内皮素具有较强的肺血管活性。

[中图分类号] R543.2

[文献标识码] A

Effects of Endothelin 1 on Pulmonary Artery of Rat in Vitro and Cultured Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells of Rabbit

RAN Pei- Xin¹, DU Zhi- Qiang², CHEN Yan- Fang³, and ZHONG Nan- Shan¹

(1. Guangzhou Institute of Respiratory Disease, 2. the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180; 3. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100, China)

MeSH Endothelin; Pulmonary Artery; Muscle, Smooth, Vascular; Rat; Rabbit

ABSTRACT **Aim and Methods** Endothelin 1 (Et- 1) is a potent vasoconstriction peptide which was firstly isolated from the conditioned medium of porcine aortic endothelial cells. Hypoxia can induce Et- 1 gene expression in rat lung tissue and pulmonary artery. In order to assess the role of Et- 1 in processes of pulmonary vasoconstriction and pulmonary vessel remodeling induced by hypoxia, the effects of ET- 1 on contraction of pulmonary artery in rat and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells in cultured of rabbit are investigated. **Results** ET- 1 at concentrations ranged from 1×10^{-9} to 12×10^{-9} mol/L caused- depended contraction of vessel rings of rat pulmonary artery ($r = 0.935$, $P < 0.05$). When rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells were cultured in the presence of 0.5% fetal calf serum (FCS), ET- 1 at concentrations ranged from 1×10^{-11} to 1×10^{-8} mol/L also stimulated 3H - thymidine and 3H - leucine incorporation in confluent quiescent monolayers in a dose- dependent manner ($r = 0.756$ and 0.840, respectively), with EC_{50} being 10.87 nmol/L and 8.54 nmol/L. **Conclusion** Endothelin- 1 may play a certain role in the hypoxic pulmonary hypertension.

内皮素是一种最强大的血管活性物质, 它在血管性疾病中的作用已为人共知^[1]。我们以前的实验发现, 慢性缺氧时, 大鼠肺组织及肺动脉表达内皮素

1 量明显增加^[2,3], 离体培养的内皮细胞在急性缺氧时, 内皮素 1 的表达较对照增加^[4]。为进一步探索内皮素 1 在缺氧性肺动脉高压发病中的作用, 本实验观察了内皮素 1 对离体肺动脉及肺动脉平滑肌细胞的作用。

[作者简介] 冉丕鑫, 男, 1963 年出生, 湖南省澧县人, 1985 年毕业于衡阳医学院, 医学博士, 副教授, 主要从事呼吸系疾病的基础和临床研究, 现任广州呼吸疾病研究所副所长, 广州医学院副院长。陈颜芳, 男, 1987 年毕业于衡阳医学院, 医学博士, 副研究员, 主要从事心血管疾病的基础和临床研究工作。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

内皮素 1 为美国 Bachem 公司产品; M199 培养基和胎牛血清为美国 Gibco 公司产品, 胰蛋白酶为 Sigma 公司产品; Krebs 等普通试剂购自市售商店。

1.2 大鼠肺动脉环收缩实验

取体重 300~350 g 的雄性 SD 大鼠(由中山医科大学实验动物中心提供), 断头处死后取出肺总动脉, 制成 3 mm 长的血管环, 置入盛有 37°C Krebs 氏液的浴槽内, 通入 95% O₂~5% CO₂ 混合气体, 借助张力传感器、八道生理记录仪(日本光电公司)等记录血管环的张力, 给药前血管环在最佳静息张力 800 mg 下稳定 1 h, 此间每隔 15 min 更换一次新鲜 Krebs 液, 之后依次向浴槽内加入不同浓度的内皮素 1(以浴槽内最终浓度表示), 观察血管环的收缩反应。

1.3 培养的家兔肺动脉平滑肌细胞 DNA 及蛋白质合成实验

处死家兔(第一军医大学动物室提供), 立即在无菌操作下分离出肺动脉。小心分离血管壁中膜并剪成 0.1~0.3 mm² 大小块状, 于 100 mL 卡氏培养瓶中置二氧化碳培养箱培养。当原代细胞融合达 3/4 培养面即传代, 将 3~5 代的细胞传代于 24 孔培养板上继续培养, 每孔接种的细胞数为 4.5 × 10⁷/L, 待细胞融合时, 将培养基换成含 2% 胎牛血清的 RPMI1640, 24 h 后再换成含 0.5% 胎牛血清的培养基, 同时加入不同浓度的内皮素 1, 培养 12 h 后分别向培养孔内加入 0.5 μCi/孔氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-thymidine, ³H-TdR) 或 2 μCi/孔氚标亮氨酸(³H-leucine, ³H-Leu), 继续培养 12 h, 吸去培养液用 0.25% trypsin 与 0.02% EDTA 混合液消化细胞, 并用 PBS 冲洗三次, 以液体闪烁计数器测定每孔的放射值(每分钟计数值, count per minute, cpm)。

2 结果

2.1 内皮素 1 对大鼠肺动脉环的收缩作用

在实验条件下, 内皮素 1 能使 SD 大鼠肺血管环产生的收缩反应加强, 且呈浓度依赖性(表 1, Table 1, $r = 0.935$, $P < 0.05$)。在 1~12 nmol/L 浓度范围内, 内皮素 1 所致血管张力迅速上升, 由 40 ± 6 mg 上升至 347 ± 12 mg, 当浓度高于 12 nmol/L 后, 血管收缩张力上升速度减慢。

2.2 内皮素 1 对家兔肺动脉平滑肌细胞 DNA 和蛋白质合成的影响

在离体肺动脉平滑肌细胞培养基中分别加入不同浓度的内皮素 1, 然后测定培养基中 ³H-TdR 和 ³H-Leu 的放射性活度。发现内皮素 1 能增加家兔

肺动脉平滑肌细胞的 DNA 与蛋白质的合成, 在浓度为 1 × 10⁻¹¹ ~ 1 × 10⁻⁸ mol/L 时, ³H-TdR 和 ³H-Leu 的掺入率呈现剂量依赖性增加(表 2, Table 2; 前者 $r = 0.756$, 后者 $r = 0.84$, $P < 0.05$); 其 EC₅₀ 值分别为 10.87 nmol/L 和 8.54 nmol/L。

表 1. 内皮素 1 对大鼠肺动脉环收缩强度的影响

Table 1. Effects of endothelin 1 on contractile intensity of pulmonary arterial ring in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Concentrations of endothelin (mol/L)	Contractile intensity (mg)
1 × 10 ⁻⁹	40 ± 6
2 × 10 ⁻⁹	80 ± 34
6 × 10 ⁻⁹	237 ± 26
12 × 10 ⁻⁹	347 ± 12
18 × 10 ⁻⁹	359 ± 77

表 2. 内皮素 1 对家兔肺动脉平滑肌细胞 DNA 及蛋白质合成的影响

Table 2. Effects of endothelin 1 on the protein synthesis and DNA of the pulmonary arterial smooth muscle cells in the rabbit ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Concentrations of endothelin (mol/L)	Incorporating rate of ³ H-TdR ($\times 10^5$ cpm)	Incorporating rate of ³ H-Leu ($\times 10^5$ cpm)
1 × 10 ⁻¹¹	11.94 ± 1.24	46.50 ± 5.20
1 × 10 ⁻¹⁰	45.62 ± 2.56	57.24 ± 5.81
1 × 10 ⁻⁹	84.02 ± 3.79	63.41 ± 7.11
1 × 10 ⁻⁸	98.36 ± 6.25	87.61 ± 6.96
1 × 10 ⁻⁷	98.40 ± 7.10	105.41 ± 8.55
1 × 10 ⁻⁶	88.45 ± 6.50	95.44 ± 6.38

3 讨论

急性低氧时, 肺血管内皮细胞释放大血管活性介质(如白三烯、细胞因子、血小板活化因子等), 引起肺血管收缩, 持续缺氧则使肺内多种生长因子及癌基因的表达增加, 促使肺血管壁细胞增殖, 管壁增厚, 管腔狭窄, 并最终出现肺动脉高压^[5]。

内皮素是由血管内皮细胞分泌的由 21 个氨基酸残基组成的强大缩血管活性多肽, 自 1988 年发现以来, 有关内皮素在高血压发病机制中作用的研究开展得很广泛^[6]。随后的实验不但发现肺心病患者血浆内皮素 1 水平明显升高, 我们的研究也证实缺氧可刺激肺组织和肺动脉内皮素 1 的表达增

加^[2,3],由于内皮素 1 的强大血管活性与致分裂活性,它在肺血管收缩反应及肺血管壁增厚中的作用引起人们的广泛重视。本实验进一步观察了内皮素 1 对离体大鼠肺动脉收缩功能及体外培养家兔动脉平滑肌细胞 DNA 与蛋白质合成的影响,实验结果证实,内皮素 1 不仅能收缩肺动脉,还能促进肺动脉平滑肌细胞的分裂增殖。说明内皮素 1 在缺氧性肺动脉高压的发病过程中扮演着十分重要的角色。

参考文献

- [1] Lemman A, Fredrie L, Hildebrand Jr, et al. Endothelin: Anew cardiovascular regulation peptide[J]. *Mayo Clin Proc*, 1990, **65**: 1441
- [2] 冉丕鑫,徐军,陈顺存,等. 慢性缺氧对大鼠肺动脉和右室内内素与一氧化氮合成酶 mRNA 表达的影响[J]. *中华医学杂志*, 1995, **75**(8): 479
- [3] 冉丕鑫,徐军,陈顺存,等. 慢性缺氧影响肺脏内皮素和一氧化氮成酶 mRNA 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 1997, **13**(1): 35
- [4] Kourembanas S. Hypoxia induces endothelin gene express and secr 内皮素 ion in cultured human endothelium[J]. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1054
- [5] 冉丕鑫. 生长因子、癌基因与缺氧性肺动脉高压[II]. *基础医学与临床*, 1996, **16**: 1
- [6] Kohno K, Yasunari K, Murakawa KI. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension [J]. *Am J Med*, 1990, **88**: 614
- (此文 2000- 03- 21 收到, 2000- 06- 18 修回)
- (此文编辑 胡必利)