

肾上腺髓质对缺氧所引起的肺动脉血管平滑肌细胞增殖的影响

牟 睐 李 桢(杭州 310006 浙江省医药有限公司)

摘要 目的:研究肾步腺髓质(AM)对缺氧所引起的肺动脉血管平滑肌细胞(PASMC)增殖的影响及其机制。方法:体外培养大鼠 PASMC,观察不同缺氧培养时间细胞上清液 AM 浓度的变化;以 H-TdR 渗入法,观察缺氧条件下无血清和含血清培养的 PASMC 的增殖情况,以及不同浓度的 AM 对细胞增殖的影响。结果:缺氧培养 24h 起细胞上清液 AM 浓度明显升高;缺氧使含血清培养的 PASMC 增殖增加; 10^{-7} mol/L 以上浓度的 AM 抑制含血清培养的 PASMC 的增殖。结论:结果提示 PASMC 可能需丰外源性生长因子作用的基础上直接感受缺氧发生增生反应;AM 能抑制缺氧所引起的 PASMC 的增殖,因此可能对缺氧性血管构型学建具有一定意义。

关键词 肾上腺髓质;肌;平滑;细胞;肺动脉;缺氧症

Effect of adrenomedullin on proliferation of pnlnmonary artery smooth muscle cells reslting from hypoxla

Mou Lai(Mou L)(The Medicine Corp. LTD of Zhejiang Province, Hangzhou 310006)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To study effect of adrenomedullin(AM) on proliferation of pulmonary artery vessel smooth muscle(PASMC) resulting from hypoxia and its mechanisms. **METHOD:** Rat PASMC were culture in hypoxic condition with special instrument and AM concentration in supernatant fluid were measured by radioimmunoassay. **RESULTS:** After incubation for 48h with various concentration of AM in hypoxic condition, trichloroacetic acid - insoluble tritiated thymidine (^3H -TdR) measure in a liquid scintillation counter. Whe ther fetal calf serum(FCS) affects PASMC proliferation in hypoxic condition was also observed. Results AM concentration increased significantly after incubation for 24h in hypoxic condition. Hypoxia stimulated PASMC proliferation only in those cultured in presence of FCS. AM inhibited hypoxia - stimulated increase of PASMC cultured in presence of FCS in thymidine incorporation from 10^{-7} mol/L on. **CONCLUSION:**The results suggest that hypoxia may stimulate PASMC in presence of exogenous factors with which PASMC are activated, and AM could inhibit PASMC proliferation resulting from hypoxia so it may play a role in hypoxic pulmonary vascular remodeling.

KEY WORDS adrenomedullin, muscle, smooth, vacular, cells, pulmonary artery, anoxia

肾上腺髓质素(Adrenomedullin, AM)是 1993 年被 发现的一种具有扩血管作用的多肽,近来其在缺氧性

肺动脉高压 (Hypoxic pulmonary artery hypertension, HPHT) 发病机制中的作用及其临床应用价值逐渐受到人们的重视。本文通过观察 AM 对不同方法体外培养的肺动脉血管平滑肌细胞 (Pulmonary artery vessel smooth muscle cell, PASM) 增殖的影响, 探讨 AM 在 HPHT 发病中的作用及其治疗作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠 PASM 培养

摘取 5 只 2 周龄雄性 SD 大鼠的肺动脉, 在冰浴 D-Hanks 液中剪成 1~2mm³ 的碎片, 以消化液 (0.25% 胶原酶:0.0125% 弹性蛋白酶, 1:1) 消化, 离心, 反复此过程 3 次, 将最后一轮的离心沉淀物加入 0.125% 胰蛋白酶 1ml 中, 置 37℃, CO₂ 孵箱中孵育 5min, 以 10% 小牛血清终止消化。然后以纱网过滤。滤液离心后, 以含 10% 小牛血清的培养液 (DMEM:1640, 1:1) 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。原代约培养 10d 左右, 每 2~3d 换液一次, 传代用 0.125% 胰蛋白酶。取第 3 代细胞进行实验。

1.2 细胞缺氧培养方法

采用美国 Precision Scientific 公司所生产的 Napco 可调氧浓度 CO₂ 孵箱, 该孵箱有两个进气阀分别与 CO₂ 和 N₂ 气瓶相接。通过调节 N₂ 的进气量, 可改变孵箱内氧浓度。将细胞置于此孵箱内以 37℃, 3% O₂, 5% CO₂ 条件进行缺氧培养。

1.3 AM 浓度测定

将第 3 代 PASM 接种于 6 孔板上, 待细胞生长融合后, 换含 20% 小牛血清的培养液 (DMEM:1640, 1:1), 分为缺氧 1, 4, 8, 12, 24 和 48h 组, 每组一六孔板细胞, 并各配一六孔板细胞为对照组。各实验组以上述方法缺氧培养相应时间, 各对照组采用 Heraus 孵箱, 以 37℃, 5% CO₂, 21% O₂ 条件进行培养。培养到预定时间后, 吸取培养液, 离心吸取上清, 在上清液中加入 1ml 1M 醋酸, 以 100℃ 水浴 10min, -70℃ 冷藏。按 AM 放免试剂盒 (Peninsula Lab) 说明书方法测定上清液 AM 浓度。

1.4 AM 对细胞增殖的影响

另取第 3 代细胞, 待生长融合后, 以无血清培养和含血清培养两种方法进行实验。无血清培养采用加有 2μ Ci/ml 的 ³H-TdR 的 SFM 无血清培养基, 其中对照组常氧培养 48h; 缺氧培养细胞分为 5 组, 为空白组 (不加 AM), 其余 4 组分别加有 10⁻⁶mol/L, 10⁻⁷mol/L, 10⁻⁸mol/L, 10⁻¹⁰mol/L 的 AM 纯品 (Peninsula Lab)。每组均为一六孔板细胞, 以前述方法缺氧培养 48h。含血清培养采用加有 2μ Ci/ml 的 ³H-TdR 的含 20% 小牛血

清的培养液 (DMEM:1640, 1:1), 分常氧和缺氧两种方法进行培养, 每种方法培养的细胞都各分为 5 组, 分别为空白组 (不加 AM) 和各加 10⁻⁶mol/L, 10⁻⁷mol/L, 10⁻⁸mol/L, 10⁻¹⁰mol/L AM 纯品组, 以前述方法培养 48h。培养结束后, 弃培养液, 以 PBS 冲洗 3 次, 加入 25% 胰蛋白酶消化至所有细胞脱落漂浮后, 记数细胞。然后将含细胞液滴于玻璃纤维素膜上, 用负压吸滤机吸去液体, 经 100% 乙醇脱水, 5% 三氯乙醇固定。干后用液闪记数仪记数, 以样本 ³H-TdR 的每分钟衰变数 (cmp) 反映细胞增殖情况。

1.5 统计方法

使用德国 Jerry 编制的 NCSS 软件包进行统计分析, 多组均数采用 ANOVA 检验, 两组均数比较采用 Newman-Keul & duncan 检验。

2 结果

2.1 大鼠 PASM 培养情况

PASM 接种后, 24h 就有细胞贴壁。贴壁细胞开始为圆型, 不透明, 边缘清晰。3d 后, 透明度增高, 周边不清, 10d 左右基本融合。

2.2 缺氧对 AM 分泌的影响

缺氧培养 PASM 上清液 AM 浓度变化见图 1, 可见培养 24h 起 AM 浓度较对照组有明显增高。

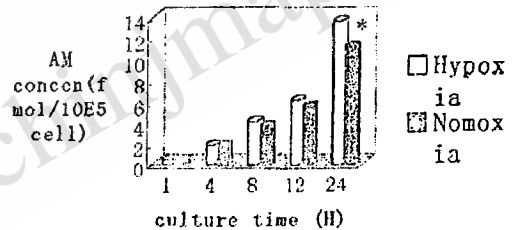


图 1 常氧和缺氧条件下培养的 PASM 分泌 ADM

* $P < 0.05$

2.3 PASM 的增殖反应

缺氧对含血清和无血清两种培养方法下 PASM 增殖的影响见图 2, 可见含血清培养组细胞增殖明显增加, 而无血清组无明显改变。AM 对缺氧培养 PASM 增殖的影响见图 3, 可见 10⁻⁷mol/L 以上浓度的 AM 可明显抑制缺氧含血清培养条件下的 PASM 增殖, 而 AM 对无血清培养的细胞增殖无明显影响见图 4。

3 讨论

在细胞培养中, 加入小牛血清的目的是利用其中的细胞生长因子促进培养细胞的生长, 本文结果显示, 缺氧对无血清培养 PASM 的增生无明显影响, 但却能明显促进含血清培养的 PASM 的增殖。血管平滑肌细胞能否直接感受缺氧是一个有争议的问题, 冯小

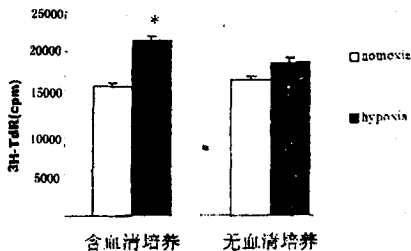


图2 两种培养方法的细胞增殖情况

* $P < 0.05$

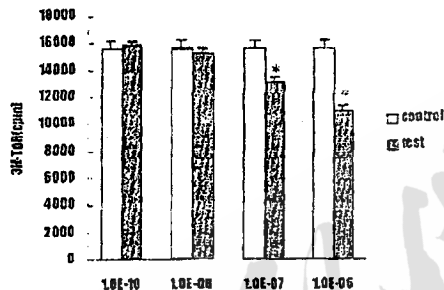


图3 两种培养方法的细胞增殖情况

* $P < 0.05$

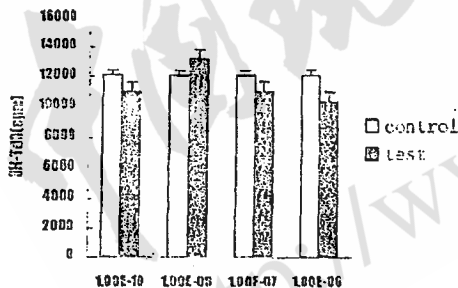


图4 不同浓度 ADM 对无血清培养的 SMSC 增殖的影响

* $P < 0.05$

东^[1]等认为缺氧能直接促进 PASM C 的增生,而另一些报道^[2,3]则认为 PASM C 不能直接感受缺氧,缺氧须通过作用于内皮细胞使其分泌生长因子来促进 PASM C 的增生。本文结果则提示,PASM C 可能须在某种外来的生长因子维持其增生状态的基础上,才能感受缺氧。因此,我们推测,在 HPHT 形成过程中,一方面,缺氧可

能作用于血管内皮细胞促其分泌某些生长因子,以旁分泌方式使 PASM C 处于活跃增殖状态。另一方面,受外源生长因子作用的 PASM C 可直接感受缺氧而进一步增殖,从而促成了肺血管的重构。

本文结果显示,AM 对无血清培养的细胞的增生无明显影响,但能明显抑制含血清培养的 PASM C 的增生。因此,AM 可能主要对在外源性生长因子作用下生长活跃的 PASM C 起抑制作用。由于 AM 对单纯血清所引起的 PASM C 增生也有抑制作用^[4],为些本文通过设计相应对照组,观察 AM 对含血清培养的 PASM C 在缺氧和常氧条件下增殖的影响,发现相同浓度的 AM 使缺氧组的增殖明显低于常氧组,因此说明 AM 能抑制由缺氧直接引起的这部分 PASM C 增生。另外,通过比较发现,PASM C 自身所产生的 AM 浓度明显低于能抑制 PASM C 增生的最低 AM 浓度,因此推测可能在体条件下只有来自 PASM C 外的 AM 的才有影响其增生可能。

肺血管结构重组是缺氧性肺动脉高压形成的重要机制,而 PASM C 的增殖是肺血管重构的重要原因。AM 能抑制缺氧所引起的 PASM C 的增殖,提示其可能在 HPHT 发病机制中起有某种程度的作用,并具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- 1 冯晓东,蔡英年,李世强.内皮素-1 对缺氧肺动脉平滑肌细胞的增殖作用.中国应用生理学杂志,1995,11(3):197.
- 2 肖芳,车东媛,张婉蓉.缺氧内皮细胞条件培养液对肺动脉平滑肌细胞生长的影响.中华病理学杂志,1993,22(3):166.
- 3 Sugo S, Minamino N, Kangawa K, *et al*. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201(3):1160.
- 4 Kano H, Kohno M, Yasunari K. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. J Hypertens, 1996, Feb, 14(2):209.