

循环微粒通过损害肺动脉内皮功能影响肺动脉高压

王旭兰^{1,2}

(1.咸阳职业技术学院,陕西 咸阳 712000; 2.西安交通大学医学部公共卫生系,陕西 西安 710061)

摘要:目的 研究循环微粒(Microparticles, MPs)在肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)大鼠体内含量的改变及其与肺动脉高压的关系。方法 48只雄性Wistar大鼠,其中30随机分为3组,对照组(C组, n=10)、MCT3组(M3组, n=10)、MCT5组(M5组, n=10)。C组作为对照,其余组用野百合碱一次性腹腔注射诱导PH模型,剩余的18只用于后续血管环检测。M3组和M5组分别在注射野百合碱后3周(中期)和5周(晚期)时右心导管法测定右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)来间接反映肺动脉压力,然后用腹主动脉采血法抽取大鼠血液并提取和检测MPs。用提取的三组MPs刺激大鼠肺动脉(每组6只)后检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、弹性蛋白(elastin)蛋白的变化。结果 大鼠血浆MPs含量随PH病情进展而逐渐升高(M5>M3>C);MPs处理肺动脉后可下调eNOS表达,但是上调elastin表达,而且这一作用与PH病情相关,即M5作用强于M3。结论 MPs随PH进展逐渐升高,升高的MPs可以损害内皮功能,这一发现进一步完善了PH的发病机理,为将来防治PH提供理论依据。

关键词:循环微粒;肺动脉高压;内皮功能

中图分类号: R543 **文献标识码:** A **文章编号:** 94047-(2014)04-033-03

近年研究发现,不同病因所致的肺动脉高压(pulmonary hypertension,PH)与肺血管内皮细胞功能受损有密切关系,包括局部血管内皮活性增殖因子和血管活性收缩因子增加、血管活性舒张因子的减少,最终导致肺血管壁的重构,加重血管栓塞的程度^[1]。循环微粒(Circulating microparticles, MPs)是机体受到刺激时:如内皮细胞发生凋亡或受到激活后产生的亚微米级颗粒^[2-5]。MPs的来源包括血小板、白细胞和内皮细胞等,具有促进炎症反应和激活凝血系统的作^[6]。由此可见,MPs可能参与了PH的发生和发展,本研究旨在探讨MPs对PH影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性Wistar大鼠48只,体重(200±10)g,均购买自陕西中医学院实验动物中心。

1.2 试剂耗材

PBS、胎牛血清、RPMI 1640培养基购自Gibco,青霉素/链霉素双抗Sigma,蛋白Marker、

BCA试剂盒购自Thermo Scientific。

1.3 药品

戊巴比妥钠、野百合碱(monocrotaline, MCT)购自Sigma-Aldrich, eNOS、elastin、ECL发光液购自Santa Cruz。

1.4 仪器

BI-420E+生物机能试验系统购自成都泰盟科技有限公司,EDTA抗凝管、注射器购自BD,细胞培养板(6孔板)购自Corning coster,BCA试剂盒购自Thermo Scientific,PVDF膜购自罗氏公司、电泳仪、转膜仪购自BIO-RAD,X射线摄影暗匣及中速感光屏AX-II型购自广东粤华公司,X射线胶片购自柯达、超声破碎仪购自Cole-Parmer,高速离心机购自Beckman coulter,扫描仪购自惠普。

1.4 模型制备及动物分组

PH模型按文献报道方法制备[3]:将MCT用乙醇和生理盐水(2:8)混合液配成20g/L溶液。将30只大鼠随机分为3组:对照组(C组, n=10),MCT3组(M3组, n=10),MCT5组(M5组, n=10)。首先M组大鼠腹腔注射MCT溶液50mg/kg诱导PH,C组大鼠腹腔注射等量乙醇和生理盐水的混合液。M3组和M5组分别

在注射MCT后3周和5周时终止实验进行检测。

1.5 指标检测

1.5.1 右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)的测定^[7]: 3周和5周时, 大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉后, 用BL-420E生物机能试验系统测RVSP来间接反应肺动脉压力。测完RVSP后, 各组大鼠分别开胸用腹主动脉采血法抽取大鼠血液至EDTA抗凝的采血管内用于并提取和检测MPs。

1.5.2 MPs检测 采用两步离心法提取MPs^[8]: 首先将血液离心(4℃ 11000g 2min)获得无血小板血浆, 然后取2ml无血小板血浆入1.5mlEP管再次离心(4℃ 13000g 45min)后小心吸去上清, 向EP管内加100ul RPMI1640培养基混匀沉淀于管底的MPs。用BCA试剂盒测定MPs蛋白浓度后备用。

1.5.3 Western 检测 分离提取正常Wistar大鼠肺动脉并置于预冷的PBS内, 小心分离和剔除肺动脉周围的脂肪组织, 将肺动脉沿纵轴剖开, 将其内血栓清洗干净后移入6孔板内, 向孔内加2ml的RPMI1640培养基(含10%血清、1%双抗), 将孔板放入细胞培养箱孵育半小时, 然后向孔内加入等量的MPs(1mg/ml)刺激1小时。刺激结束后提取肺动脉蛋白, 用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定各组蛋白浓度, 然后进行western检测, 检测蛋白有: 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、弹性蛋白(elastin)蛋白。将最终的X光胶片扫描保存后用ImageJ软件对条带进行统计分析。

1.6 统计学方法

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm S$)表示, 使用方差分析及q检验。应用SPSS13.0及GraphPad Prism5进行统计学和绘图处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠 RVSP 检测

BL-420E生物机能试验系统的测量结果见表1。

表1. 各组大鼠右心室收缩压($\bar{x} \pm S$)

组别	压力值 (mmHg)	P 值
C 组 (n=10)	10.64 ± 1.97	
M3 组 (n=10)	26.86 ± 2.82	*
M5 组 (n=7)	34.24 ± 2.63	*/#

注: 与C组比较, * $p < 0.05$; 与M3组比较, # $p < 0.05$

表1可见注射MCT后大鼠

肺动脉压力明显升高, 肺动脉压力在晚期(M5)较中期(M3)更为严重, 提示PH建模成功。而且随着PH进展, 大鼠生存率下降(M5中 $n=7$)。

2.2 MPs 检测

各组大鼠血中MPs含量检测结果见表2。

表2中可见大鼠血中MPs含

表2. 各组大鼠MPs($\bar{x} \pm S$)

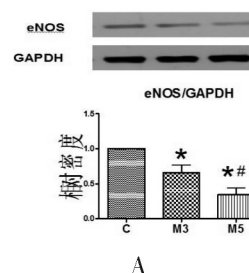
组别	MPs (mg/ml)	P 值
C 组 (n=10)	1.4 ± 0.3	
M3 组 (n=10)	2.1 ± 0.5	*
M5 组 (n=7)	2.8 ± 0.4	*/#

注: 与C组比较, * $p < 0.05$; 与M3组比较, # $p < 0.05$

量随PH病情进展逐渐升高, 这些升高的MPs可能会进一步加重PH病情而形成一个恶性循环。

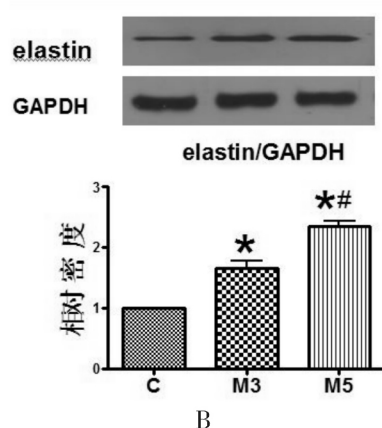
2.3 Western 检测

由图A和B中可见, 随着大鼠PH病情进展, 来自其体内的MPs抑制eNOS表达的能力逐渐增强, 而其上调elastin表达的能力也增强。



3 讨论

我们发现PH大鼠体内MPs含量随病情进展逐渐升高, 大鼠的生存率也减低, 而且这些不同疾病阶段的MPs抑制了离体肺动脉血管



eNOS的表达, 但是却上调了elastin的表达。这些由PH机体产生的MPs可能会进一步加重PH的病情, 形成恶性循环。

MPs是血小板、内皮细胞等在受到C反应蛋白、肿瘤坏死因子、高切应力等刺激下胞膜以出芽方式释放的亚微米级颗粒, 近年来的研究提出

MPs是反映内皮损伤及功能障碍的新指标^[2-5]。王妍等^[6]高血压病患者循环内皮微颗粒水平升高且踝脉搏波传导速度加快,较高水平的循环内皮微颗粒加速了大动脉弹性功能减退。Ci HB等^[9]报道二尖瓣狭窄患者体内MPs含量升高,而且这些患者体内的MPs可以损害人心脏微血管内皮细胞eNOS表达,并减少细胞NO的释放。我们此次研究发现:随着PH病情进展,大鼠体内MPs含量逐渐升高,且大鼠的生存率逐渐降低。而这些来自PH大鼠体内的MPs可以减少离体大鼠肺动脉血管eNOS的表达提示MPs可能参与PH的发生和发展,这可能也是PH的发病机理之一。

PH以肺小动脉血管壁增生重塑、肺小动脉腔内血栓形成、肺血管腔进行性闭塞以及肺血管阻力进行性增高为主要特征的临床综合症^[10]。血管弹性蛋白酶可使平滑肌细胞向内皮下迁移,并可促使金属蛋白酶、细胞外基质、糖蛋白和粘蛋白-C的合成异常^[11]。在一些研究中发现^[12-13]:血管弹性蛋白酶的抑制剂,不仅可以预防肺动脉高压的形成,还可以通过诱导平滑肌细胞的凋亡使肺动脉重构发生逆转。我们研究发现MPs可以促进elastin的表达,而且晚期PH大鼠体内的MPs促进elastin表达的能力较强。提示MPs参与了肺动脉血管壁的重塑。

总之,本研究显示随着PH进展,大鼠体内MPs含量逐渐升高,这些升高的MPs抑制了肺动脉组织中eNOS表达,但是却促进了elastin的表达,进而加重了PH的病情,形成了PH→MPs↑→PH↑的恶性循环。这以发现进一步解释了PH发病机理,为PH的防治提出了新的方法和概念。

参考文献

- [1]田悦,美娜丽,刘雪芹,等. 二氧化硫对低氧性肺动脉高压大鼠肺小动脉内皮细胞炎症反应的影响[J].实用儿科临床杂志, 2008,23(13): 985-990.
- [2]Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, et al. Complement Proteins C5b-9 induce vasculature of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex[J]. J Biol Chem, 1990,265(7):3809-3814.
- [3]Wang JM, Huang Y J, Wang Y, et al. Increased circulating Cd31+ / CD42 - microparticles are associated with impaired systemic artery elasticity in healthy subjects. Am J Hypertens, 2007,20(9):957-964.
- [4]王妍,陶军,杨震,等. 肿瘤坏死因子促进内皮微颗粒释放的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(12): 1137- 1140.
- [5]王妍,陶军,涂昌,等. 高血压病对内皮微颗粒水平的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(4): 222- 224.
- [6]Hugel B, Carmen M, Martinez MC, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin[J]. Physiology. 2005; 20(1): 22-27.
- [7]Schermuly RT, Kreiselmeier KP, Ghofrani HA, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004;169(1):39-45.
- [8]王妍,苏晨,陶军,王洁梅,黄奕俊,陈龙,吴芳,杨震,涂昌. 高血压病患者循环内皮微颗粒水平与动脉弹性功能关系的研究[J].中国循环杂志, 2008,23(3):167-170.
- [9]Ci HB, Ou ZJ, Chang FJ, et al. Endothelial microparticles increase in mitral valve disease and impair mitral valve Endothelial function[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2013;304(7):E695-702.
- [10]Grimminger F, Schermuly RT. PDGF receptor and its antagonists: role in treatment of PAH[J]. Adv Exp Med Biol. 2010;661(10):435-46.
- [11]Jones P, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of Tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the $\alpha v \beta 3$ integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth[J]. Cell Biol.1997;139(1):279-293.
- [12]Cowan KN, Heilbut A, Humpal T, et al. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor[J]. Nat Med, 2000;6(6): 698-702.
- [13]Ye C, Rabinovitch M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension[J].Am J Physiol,1991, 261(4pt2): H1255-H1267.

[责任编辑、校对: 王军利]

(下转第43页)