

• 论著 •

Rho 激酶在缺氧性肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

张齐 李志超 罗颖 彭利静 张博 刘毅 闫志强 李志斌

【摘要】 目的 研究低氧条件下 Rho 激酶是否参与低氧引起的血管平滑肌细胞增生。**方法** 组织块法培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)。应用甲基噻唑基四唑(MTT)比色法观察细胞增生情况;流式细胞仪观察细胞周期的变化;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 Rho 激酶的表达。**结果** 缺氧组 MTT 比色吸光度(A)值显著高于常氧组,缺氧 24 h+Rho 激酶抑制剂 Y27632 组 A 值显著低于缺氧 24 h 组;缺氧组细胞周期 G2/M 期细胞比例显著高于常氧 24 h 组,缺氧 24 h+Y27632 组细胞比例显著低于缺氧 24 h 组。Western blot 结果表明各缺氧组 Rho 激酶表达均明显高于常氧组,其中以缺氧 24 h 组表达增高最明显;Rho 激酶在缺氧 24 h+Y27632 组明显低于缺氧 24 h 组。**结论** 缺氧可诱导 PASMCs 增殖,缺氧诱导的增生 PASMCs 中 Rho 激酶活性水平增加,提示缺氧致 PASMCs 增殖过程中 Rho 激酶可能发挥重要作用。

【关键词】 缺氧; 肺动脉; 平滑肌细胞; 细胞增殖; Rho 激酶

Effect of Rho kinase on hypoxia stimulated proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells

ZHANG Qi, LI Zhi-chao, LUO Ying, PENG Li-jing, ZHANG Bo, LIU Yi, YAN Zhi-qiang, LI Zhi-bin.
Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi, China

Corresponding author: LI Zhi-chao (Email: lizhic@fmmu.edu.cn)

【Abstract】 Objective To study whether Rho kinase is involved in the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) induced by hypoxia. **Methods** Rat's PASMCs were isolated and cultured. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to determine the growth of cells. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. Western blot was used to assess the expression of Rho kinase. **Results** The results of MTT showed that the number of PASMCs was increased after exposure to low oxygen tension for 12 hours compared with PASMCs in normoxia. After exposure of PASMCs to hypoxia for 24 hours, the cellular proliferation peaked, and was higher than that of PASMCs exposed to normal oxygen tension, hypoxia and Y27632 (Rho kinase inhibitor) groups, then it declined when exposed for 48 hours. Analysis of cell cycle indicated that the ability of cell proliferation increased significantly in PASMCs exposed to hypoxia compared with normoxia. Rho kinase level was higher in PASMCs exposed to hypoxia compared with normoxia. **Conclusion** Hypoxia stimulates proliferation of PASMCs and promotes PASMCs into the phase of mitosis. The expression of Rho kinase is increased in PASMCs that are exposed to hypoxia, and it shows that Rho kinase is activated by hypoxia in PASMCs. Rho kinase maybe involve in the proliferation of PASMCs induced by hypoxia.

【Key words】 hypoxia; pulmonary artery; smooth muscle cell; proliferation; Rho kinase

肺动脉高压是肺循环障碍和肺功能异常性疾病的最终结局,是肺源性心脏病(肺心病)发病机制的中心环节。急、慢性低氧均可导致缺氧性肺动脉高压(HPH),其中肺血管收缩反应增强和肺血管结构改建(remodeling)是其主要的血管变化特征。肺血管结构改建主要表现为肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)肥大、增殖,PASMCs 在缺氧环境下的增生可能是导致肺动脉高压形成的重要环节之一。研究发现,Rho 激酶参与凝血酶诱导的平滑肌细胞 DNA 合成及迁移。Rho 激酶在血管紧张素Ⅱ、5-羟色胺和

UrotensinⅡ等诱导的血管平滑肌细胞增生中也发挥重要作用^[1-5],但 Rho 激酶是否参与低氧引起的 PASMCs 增生尚未见报道。本研究中观察了 Rho 激酶是否参与低氧引起的 PASMCs 增生,探讨 HPH 血管重构的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:8~10 周龄健康成年 SD 大鼠,体重 180~200 g(由第四军医大学实验动物中心提供)。RPMI 1640 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶(Gibco 公司),肌动蛋白(actin,北京中山生物技术有限公司),甲基噻唑基四唑(MTT, Sigma 公司),二甲基亚砷(DMSO,西安化学试剂厂生产),Rho 激酶多克隆抗体(Anaspec 公司);普通细胞培养箱(日本 Sanyo 公司),缺氧细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),流式

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370624)

作者单位:710033 陕西西安,第四军医大学病理生理学教研室

通讯作者:李志超(E-mail: lizhic@fmmu.edu.cn)

作者简介:张齐(1980-),女(汉族),河北徐水人,硕士研究生
(Email: zhangqi_1105@163.com)。

细胞仪(美国 BD 公司),倒置显微镜(Olympus 公司)。各溶液按说明书要求配制。

1.2 大鼠 PSMCs 培养、纯化及鉴定:将 SD 大鼠称重,腹腔内注射乌拉坦 1 g/kg,断颈法处死,无菌条件下取出肺动脉,去除血管内膜和外膜,将中膜组织以组织块法行原代培养,即将肺动脉平滑肌层切割成 1 mm³ 的小块,然后加入含体积分数为 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中培养,原代培养 60~72 h 后观察细胞生长情况,3~4 d 换液 1 次;原代培养 6~7 d,细胞生长融合铺满瓶壁约 80% 后,用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,接种于新培养瓶扩大培养,首次传代时,采用差别消化法将 PSMCs 与上皮细胞分离。传代培养后细胞形态稳定,倒置显微镜下观察,呈现平滑肌细胞特征性的“峰”、“谷”状生长,小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SM-actin)单克隆抗体免疫细胞化学鉴定,阳性细胞达 95% 以上,实验用第 3~8 代细胞。用苔盼蓝拒染法鉴定细胞活性,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 MTT 比色测定 PSMCs 增殖:细胞悬液消化好后移入 96 孔板,接种密度为每孔 5×10^3 /L,培养 24 h 后,换成含体积分数为 2% 的血清 RPMI 1640 培养液,每孔 100 μ l,培养 24 h;依实验要求分组、加液处理。常氧组置于 37℃、20% O₂、5% CO₂ 的普通培养箱中;缺氧组置于 37℃ 的 2% O₂、5% CO₂、93% N₂ 缺氧培养箱中,继续培养,每孔加 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μ l,37℃ 继续孵育 4 h;小心吸弃孔内上清液,每孔加入 75 μ l DMSO 终止反应,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,以 A 值反映细胞增殖情况。

1.4 PSMCs 周期改变:流式细胞技术检测细胞周期,参考 MTT 检测时间和剂量效应结果,分常氧 24 h 组、缺氧 24 h 组和缺氧 24 h+不同浓度 Rho 激酶抑制剂(Y27632,0.01、0.1 和 1 μ mol/L)组。取第 3 代生长良好的 PSMCs,用胰蛋白酶消化后接种于 6 孔板,按实验分组要求培养 24 h 后分别消化、离心,收集细胞于 3 个离心管,制成 1×10^5 /L 细胞悬液,950 ml/L 乙醇固定,按说明书要求制备样本、检测。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 Rho 激酶的表达:弃去细胞培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次,加入细胞裂解液[含体积分数 1% 曲通(Triton)X-100,1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),2 mg/L 亮氨酸酶素,2 mg/L 抑肽酶,2 mg/L 胃酶抑素,

PBS]裂解,检测样品蛋白含量。样品于 100℃ 水浴 5 min。取等量蛋白上样进行质量分数为 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳毕,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用丽春红 S 染色、封闭液封闭,加一抗(1:100)孵育过夜,洗涤,再加二抗(1:2 000)孵育 2 h,加入化学发光试剂,于暗室自显影,按试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理:数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行 *t* 检验、方差分析和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养:原代培养约 3 d 后,细胞开始从组织块爬出,起初细胞单个散在或多个聚积,呈梭形或不规则三角形,边界清晰,折光性好,核居中、呈卵圆形;细胞爬出 3 d 后,生长繁殖加快,间隙变小,呈典型漩涡状或放射状排列。传代培养的细胞生长规律与原代培养相似,传代 3 d 细胞生长繁殖活跃,4~6 d 后生长进入平台期,可以进行下次传代培养细胞,经 α -SM-actin 染色,可见密集的阳性反应颗粒,呈黄褐色。

2.2 缺氧对 PSMCs 增殖的影响(表 1):各缺氧组 PSMCs 的 MTT 比色分析 A 值均高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 缺氧对 PSMCs 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of hypoxia on proliferation of PSMCs($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	12 h(A 值)	24 h(A 值)	48 h(A 值)
常氧组	0.246 $\pm$ 0.02	0.283 $\pm$ 0.03	0.291 $\pm$ 0.02
缺氧组	0.271 $\pm$ 0.02*	0.326 $\pm$ 0.02**	0.321 $\pm$ 0.03*

注:与常氧组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 抑制剂 Y27632 对 PSMCs 增殖的影响(表 2):缺氧 24 h 加不同浓度 Y27632 组的 A 值均低于缺氧 24 h 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 Y27632 对缺氧 24 h PSMCs 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of Y27632 on proliferation of PSMCs exposed to hypoxia for 24 hours($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PSMCs(A 值)
常氧 24 h 组	0.304 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
缺氧 24 h 组	0.343 $\pm$ 0.02
缺氧 24 h+Y27632(0.01 μ mol/L)组	0.319 $\pm$ 0.02 Δ
缺氧 24 h+Y27632(0.1 μ mol/L)组	0.316 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$
缺氧 24 h+Y27632(1 μ mol/L)组	0.310 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$

注:与缺氧 24 h 组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 缺氧对 PSMCs 细胞周期影响(表 3):缺氧 12、24 和 48 h 均可使 G₂/M 期细胞比例显著增加,G₀/G₁ 期细胞比例显著降低,缺氧 24 h+Y27632

组 G2/M 期细胞比例显著低于缺氧 24 h 组。

表 3 缺氧对 PSMCs 周期的影响 (n=8)

Table 3 Effects of hypoxia on cell cycle of PSMCs (n=8)

组别	S 期	G2/M 期	G0/G1 期
常氧 24 h 组	16.35%	15.23%	68.42%
缺氧 12 h 组	17.12%*	30.62%**	52.26%**
缺氧 24 h 组	15.53%*	40.38%**	44.09%**
缺氧 48 h 组	14.73%**	41.51%**	44.76%**
缺氧 24 h + Y27632 组	17.21%△	19.94%△△	62.85%△△

注:与常氧 24 h 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与缺氧 24 h 组比较: △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

2.5 缺氧对 PSMCs 中 Rho 激酶表达的影响 (图 1): 缺氧组较常氧 24 h 组 PSMCs 中 Rho 激酶表达量增加; 缺氧 24 h 组较常氧 24 h 组 PSMCs 中 Rho 激酶表达量增加最明显; 缺氧 24 h + Y27632 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组 Rho 激酶表达量明显减少。

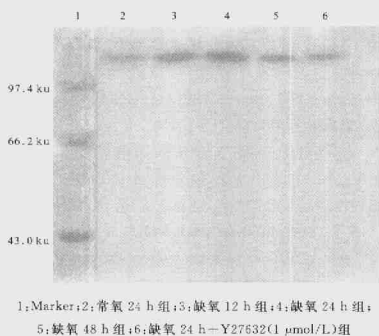


图 1 PSMCs 中 Rho 激酶的表达

Figure 1 Expression of Rho kinase in PSMCs

3 讨论

HPH 多见于慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、高原性肺心病、新生儿缺氧等临床疾病, HPH 的主要血管变化特征是肺血管收缩反应增强和肺血管结构重塑, 其中肺血管重构的主要特征为血管平滑肌细胞表型由收缩型向合成型转变, 并大量增殖引起血管壁中层肥厚, 同时伴有远端非肌性血管肌化^[6]。缺氧引起 PSMCs 过度增殖的机制尚不完全明确。Rho/Rho 激酶途径在调节血管平滑肌细胞收缩及其他细胞功能 (如细胞增殖和迁移) 中发挥非常重要的作用。Rho 激酶的功能之一是使肌球蛋白轻链 (MLC) 磷酸化, 引起平滑肌收缩。研究表明, 在缺氧条件下, PSMCs 的 MLC 磷酸化增加; Rho 激酶参与了缺氧引起的肺血管收缩, 在 HPH 肺血管持久性收缩中发挥重要作用^[7]。

Rho 激酶参与自发性高血压大鼠 (SHR) 血管功能和结构的改变, Rho 激酶的增量调节在高血压性血管疾病的发病机制中发挥关键作用^[8]。Rho 激酶在调节血管平滑肌细胞增殖和迁移方面也发挥很重要的作用, Rho/Rho 激酶介导凝血酶引起血管平滑肌的 DNA 合成和迁移^[9], Rho/Rho 激酶通过诱导细胞外信号调节激酶 (ERK1/ERK2) 从胞质到细胞核移位参与 5-羟色胺介导的血管平滑肌有丝分裂^[10]。Rho 激酶参与了血管紧张素 I 引起的血管平滑肌细胞增生和迁移^[12,13]。

缺氧引起 Rho/Rho 激酶信号的激活在胎儿肺形态发育中起重要作用, 但在新生儿继续激活此途径会损伤出生后的肺发育, 在成人会促进肺动脉高压的形成^[14]。本实验中采用 MTT 比色法 (能反映贴壁生长的活细胞数) 观察缺氧对 PSMCs 增殖的影响, 结果显示, 缺氧能促进 PSMCs 增殖, 以缺氧 24 h 时增殖程度最高。细胞周期是靠细胞周期蛋白质之间和谐配合而推动不同时期细胞周而复始不断循环的结果, 细胞周期时相按照细胞形态、细胞内 DNA 标记情况、DNA 含量及蛋白质表达模式等特征可分为 G1、S、G2、和 M4 个时期。流式细胞技术结果表明, 缺氧组 G2/M 期细胞比例较常氧组显著增加, 而 G0/G1 期细胞比例显著降低, 说明缺氧可促使细胞进入有丝分裂期, 加快细胞周期循环。为进一步探讨其机制, 我们测定了 Rho 激酶表达情况。Western blot 结果表明, 缺氧引起增殖的细胞中, 随增殖程度增加 Rho 激酶表达也加强。Y27632 是 Rho 激酶的特异性抑制剂, 它与 ATP 竞争性抑制 Rho 激酶。实验结果表明, 不同浓度的 Y27632 均能抑制 PSMCs 增生, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Y27632 抑制程度最大; 同时, 细胞周期检测缺氧 24 h + Y27632 组的 G2/M 期细胞比例较缺氧 24 h 组显著降低; 给予 Y27632 后, 增殖受到抑制的 PSMCs 中 Rho 激酶表达也明显减少。说明 Rho 激酶参与了缺氧引起的 PSMCs 的增殖, 提示 Rho 激酶在 HPH 的发生、发展过程中可能发挥了作用, 但 Rho 激酶发挥作用的详细机制有待进一步研究。

参考文献:

- Seasholtz T M, Majumdar M, Kaplan D D, et al. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration [J]. Circ Res, 1999, 84: 1188 - 1193.
- Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, et al. Involvement of Rho-kinase in angiotensin I-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells [J]. Hypertension, 2000, 35: 313 - 318.
- Kanda T, Hayashi K, Wakino S, et al. Role of Rho-kinase and p27

- in angiotensin I-induced vascular injury [J]. Hypertension, 2005, 45: 724-729.
- 4 Liu Y, Suzuki Y J, Day R M, et al. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin [J]. Circ Res, 2004, 95: 579-586.
 - 5 Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, et al. Human urotensin I-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase [J]. Circ Res, 2001, 88: 1102-1104.
 - 6 姚伟, 钱桂生, 杨晓静, 等. 小牛血清和血小板源性生长因子对肺动脉平滑肌细胞 Na^+/H^+ 交换器活性和细胞增殖的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 728-731.
 - 7 Wang Z, Jin N, Ganguli S, et al. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25: 628-635.
 - 8 Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension [J]. FASEB J, 2001, 15: 1062-1064.
 - 9 McMurtry I F, Bauer N R, Fagan K A, et al. Hypoxia and Rho/Rho-kinase signaling: lung development versus hypoxic pulmonary hypertension [J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 543: 127-137.
- (收稿日期: 2005-12-12 修回日期: 2006-05-29)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

硝普钠雾化吸入治疗肺源性心脏病右心衰竭临床观察

王立志 郭春明 冯亚新 赵香芝

【关键词】 硝普钠; 雾化吸入; 肺源性心脏病; 右心衰竭

慢性肺源性心脏病(肺心病)病理中心环节是肺动脉高压, 因此, 在抗炎治疗的同时, 积极降低肺动脉压, 有望迅速缓解临床症状^[1]。基于此, 2003 年 12 月—2005 年 1 月, 采取硝普钠(SNP)雾化吸入辅助治疗肺心病右心衰竭, 取得较好的临床疗效, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 65 例患者, 其中男 42 例, 女 23 例; 年龄 60~78 岁, 平均 (67.2±6.6) 岁; 符合 1984 年全国第 4 次肺心病专业会议修订的标准。按纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级法: Ⅲ级 24 例, Ⅳ级 41 例。合并高血压 6 例, 冠心病 8 例。以住院顺序号按奇、偶数随机分为观察组 34 例, 对照组 31 例。两组性别、年龄、合并症、心功能分级差异无统计学意义, 有可比性。

1.2 方法: 两组常规治疗相同。对照组用 α -糜蛋白酶 5 mg、地塞米松 5 mg 加入 50 ml 生理盐水中雾化吸入 60 min, 每日 2 次; 观察组在对照组雾化吸入器内再加入 SNP 50 mg。吸入前及吸入时每 15 min 测量右侧肱动脉血压 1 次。分别于治疗后 5、10 和 15 d 对比两组临床

基金项目: 山东省聊城市科技攻关计划项目(2003W11)

作者单位: 252000 山东省聊城市人民医院

作者简介: 王立志(1957-), 男(汉族), 山东聊城人, 副主任医师(E-mail: lizhiw5168@sina.com 或 lizhi51688@sohu.com)。

表 1 雾化吸入 SNP 对肺心病的疗效

组别	例数 (例)	5 d 疗效			10 d 疗效			15 d 疗效		
		显效例数	有效例数	总有效率	显效例数	有效例数	总有效率	显效例数	有效例数	总有效率
观察组	34	11*	12	67%*	18	12	88%	25	8	97%
对照组	31	3	8	35%	13	10	74%	18	11	94%

注: 与对照组比较: * $P < 0.01$

疗效; 治疗前后查血、尿常规, 肝功能, 肾功能, 电解质, 心电图, X 线胸片, 超声心动图等。

1.3 疗效判定: 心功能改善 2 级, 水肿、发绀、气喘消失, 肺部啰音几乎消失, 咯痰明显好转为显效; 心功能改善 1 级, 咳嗽、咯痰、水肿、发绀和肺部啰音明显好转为有效; 达不到上述标准为无效。

1.4 统计学处理: 数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, t 检验; 率的比较用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效: 观察组总体疗效好于对照组, 以 5 d 时最明显 ($P < 0.01$)。

2.2 血压变化和不良反应: 两组血压均未发生明显变化; 也未见明显不良反应发生。

3 讨论

SNP 是一种速效和短时作用的血管扩张剂, 是标准的一氧化氮(NO)供体^[2], 后者是调节心血管和血流最关键的信号分子, 具有很强的舒血管功能^[3]; 调节心血管系统、神经系统和免疫功能, 具有抗血小板聚集、抑制血管平滑肌增生、调节血管张力、稳定循环容积等作

用^[4]。我们用 SNP 雾化吸入辅助治疗肺心病右心衰竭, 表明雾化吸入 SNP 有助于早期迅速缓解症状, 而对支气管炎的感染过程无影响。雾化吸入过程中, 肱动脉血压无明显变化, 说明 SNP 雾化吸入只在肺动脉局部发挥扩血管作用, 而对体循环压无影响。

参考文献:

- 1 杨茂农, 胥方元, 王毅, 等. 肺心合剂对肺动脉高压大鼠肺血管重建的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 231-234.
- 2 李中言, 赵连友. 一氧化氮与心血管疾病 [J]. 中华心血管病杂志, 1998, 24: 73-75.
- 3 孙立东, 汤友林, 席炜滨, 等. 院前一氧化氮吸入加静脉溶栓对急性心肌梗死再通率的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 169-171.
- 4 Zwissler B, Kemming G, Habler O, et al. Inhaled prostacyclin (PGI₂) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(6 Pt 1): 1671-1677.

(收稿日期: 2005-11-10)

(本文编辑: 李银平)