

文章编号:1000-582X(2002)05-0080-03

两种内皮细胞分泌血管紧张素 II 的差异*

胥成浩,王贵学,蔡绍哲,苏 兰,王远亮

(重庆大学 生物工程学院及国家教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆 400044)

摘 要:为进一步了解血管内皮细胞(VEC)在代谢特征上的异质性,加深对 VEC 生物学特性的认识,文中应用平行平板流动腔装置,将人胚肾小球血管内皮细胞(HGVEC)和牛肺动脉内皮细胞(BPAEC)两种不同的 EC 在同样的剪切流环境中剪切作用 24 h,利用放射免疫法检测循环液中血管紧张素 II(Ang II)分泌量。结果表明, HGVEC 的 Ang II 平均分泌率(7.54 ± 0.27) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 显著高于 BPAEC(6.08 ± 0.11) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 且 HGVEC 的 Ang II 平均分泌率随剪切时间的增加而减少,在各时点间的变异相对较大;而 BPAEC 的 Ang II 平均分泌率在各时点的分泌率较为稳定,变幅较小。表明这两种内皮细胞在 Ang II 分泌特性上存在异质性。

关键词:血管内皮细胞;血管紧张素 II;异质性

中图分类号:Q66

文献标识码:A

关于血管内皮细胞(VEC)在剪切流作用下的形态结构和功能的研究是近年来的热点课题。对 VEC 异质性的研究大大丰富了对其生物学特性和细胞流变特性的本质认识。已有研究表明,血管内皮细胞在结构、功能、抗原成分、代谢特征和对生长因子的反应上存在异质性^[1-3]。EC 可以合成和分泌许多类型的胶原,但不同来源的 EC 分泌不同类型的胶原;培养的牛肾上腺微血管 EC 分泌 I、II 型胶原,牛主动脉、肺动脉和肠系膜静脉 EC 分泌 III 型胶原,而人脐静脉 EC 分泌 IV 型胶原;动脉 EC 和静脉 EC 合成前列腺素的能力及血管紧张素转换酶(ACE)的活性各不相同,肺、卵巢、脐动脉 EC 含量均比其静脉 EC 的含量高。但是,通过血管紧张素 II(Ang II)分泌量的差异来反映人胚肾小球血管内皮细胞(HGVEC)和牛肺动脉内皮细胞(BPAEC)的异质性还少有报道。为进一步了解 VEC 在代谢特征上的异质性,加深对 VEC 生物学特性的认识,文中应用平行平板流动腔装置和放射免疫检测法,分析了剪切流场中 HGVEC 和 BPAEC 两种 VEC 分泌 Ang II 的差异。

1 材料与方法

1.1 血管内皮细胞的培养

1.1.1 人胚肾小球血管内皮细胞的分离培养

将引产后 6 h 以内的新鲜人胎肾(约 28 个周龄)

用无菌 Hank's 液(按常规方法配制)保存取回。用无菌 Hank's 液将肾表面血迹冲洗干净,小心剥离肾被膜,剪取肾皮质置于 0.04 mm 孔径不锈钢液网中研磨,同时用 Hank's 液将其冲滤至 0.016 mm 孔径的滤网上。冲洗并收集 0.016 mm 孔径网上的组织团,将悬液用 1 000 r/min 离心。用 0.05% IV 型胶原酶(美国 Sigma 公司)消化组织团 15 min, 800 r/min 离心 3 min, 收集上清,再经 1 000 r/min 离心 10 min, 其沉淀即为人胚肾小球血管内皮细胞。经 0.5% 台盼兰计活细胞百分率,调整细胞数以 1.5×10^8 个细胞/L 的密度接种于 50 mL 培养瓶中,加入 M199 培养液(美国 Gibco 公司,含 20% 小牛血清、胰岛素 6 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、青霉素 0.2 g/L、链霉素 0.1 g/L)在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。每 2 天换液 1 次。

HGVEC 的鉴定采用常规免疫组化的方法,检测细胞的 VII 因子相关抗原。进行 HGVEC 的传代培养时,选择生长旺盛期的 HGVEC,用 Hank's 液冲洗 2 次,加入消化液(0.02% EDTA - Na_2 , pH 7.2, 0.25% 胰蛋白酶),消化 2~3 min,待细胞开始变圆,加入含 20% 小牛血清的 M199 培养液,轻轻吹打瓶底细胞使其脱落,离心洗细胞两次。经 0.5% 台盼兰计算活细胞百分率,以 1:2 的比例接种于 24 孔板上,每两天换液 1 次。

1.1.2 牛肺动脉内皮细胞的培养

选雄性健康小牛,在无菌条件下取出肺动脉,用

* 收稿日期:2002-02-20

基金项目:教育部重点实验室基金资助项目(教技司[1999]153)

作者简介:胥成浩(1963-),男,四川南充人,四川大学硕士,现为乐山师范学院生物系讲师,从事生物学教学和科研工作。

D-Hank's 液冲洗数次后纵行剖开血管壁,用刀片小心刮下 EC,放入加有培养液的培养皿中,培养液为加含 20% 新生小牛血清的 RPMI1640。6~7 d 后,在相差显微镜下观察可见 EC 均匀排列。细胞鉴定根据相差显微镜下均匀的鹅卵石排列形态特征及采用因子 VIII 相关抗原阳性的免疫组化法。传代培养时,培养皿内细胞融合后去掉培养液,经 D-Hank's 冲洗后再用胰蛋白酶消化 5 min,加入 D-Hank's 液吹打成细胞悬液,取悬液于离心管内经 800 r/min 离心 5 min 后倒掉液体,加入培养液再吹打成悬液,分别种入 2 个培养瓶内。每次传代都同上处理。传 2~3 代后即可用于实验。

取无菌的长宽规格为 14 cm × 4 cm 的细胞培养载片 2 张,将 HGVEC 接种于 1 张载片上,另 1 张载片接种 BPAEC,每张载片的细胞面积均为 25 cm²。将载片放入盛有 M199 培养液的培养皿中,再将培养皿置于 CO₂ 培养箱中培养 3 d 左右,细胞生长融合形成单层,融合度 95% 以上。重复试验 2 次。

1.2 流动装置与流动参数

采用自行研制的平行平板流动腔装置^[4]。将长满单层的 2 张细胞载片分别安放在 2 个独立的平行平板流动腔中,流动装置下槽加入 18 mL M199 培养液(含 10% 小牛血清和双抗)。启动循环泵,使通过每个流动腔的流量均为 4.5 mL/min,使 EC 所受到的剪切应力均为 0.3 N/m²。

1.3 单层内皮细胞分泌物含量的测定

循环开始后每隔 2 或 6 h 从循环液中抽取 1 mL 样品,同时补充 1 mL 新鲜培养液于循环液中。样品冻存于 -20 °C 低温冰箱中供检测用。样品中的 Ang II 分泌量测定采用放射免疫分析法。每一标准品和样品均为双管,按北京邦定生物技术公司试剂盒说明书操作。单位:ng/L。各处理测定的样品时点均为 0、2、4、6、12、18、24 h。

1.4 数据处理

将 Ang II 实测分泌量(ng/L)转换为单位面积的分泌量(pg/cm²),再换算出样品的累积分泌量(CP)。运用非线性回归方程参数估计的麦夸特法,对累积分泌量随剪切时间 T 变化的测定值拟合为多项式回归方程,根据对这些方程式进行一阶微分所得的分泌速率方程计算出测定时点范围内等间距时点(间距为 2 h)的分泌速率。各处理间平均分泌速率的比较采用两样本成对数据假设测验法。

2 实验结果

2 种不同细胞 Ang II 分泌速率的差异列于表 1 中,Ang II 累积分泌量与剪切时间关系的经验方程式列于表 2 中;Ang II 平均分泌速率 \dot{y} 的分布图式列于图 1 中。

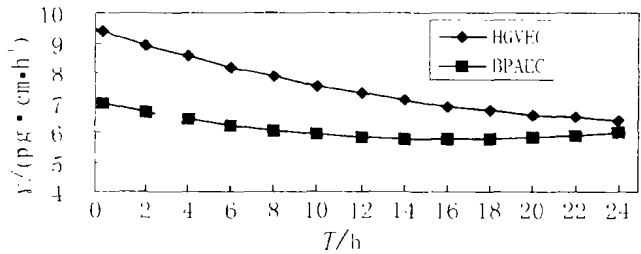


图 1 Ang II 平均分泌速率散布图

表 1 Ang II 分泌速率的差异

细胞类型	平均数 ± 标准误差/(pg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	显著水平
HGVEC	7.536 2 ± 0.271 0 (n = 26)	P < 0.01
BPAEC	6.086 9 ± 0.106 0 (n = 26)	

表 2 Ang II 累积分泌量与剪切时间关系的经验方程

实验	细胞类型	非线性回归方程	相关系数	拟合度/%
I	HGVEC	CP = 20.139 63 + 5.241 38T - 0.049 2T ² + 0.001 1T ³	0.999 8	99.96
	BPAEC	CP = 8.735 945 + 4.666 40T + 0.052 5T ² - 0.001 3T ³	0.999 7	99.94
II	HGVEC	CP = 4.326 859 + 13.487 4T - 0.170 3T ² + 0.001 6T ³	0.999 0	99.80
	BPAEC	CP = 8.395 907 + 9.226 02T - 0.198 0T ² + 0.004 3T ³	0.999 8	99.95
平均	HGVEC	CP = 12.233 21 + 9.364 42T - 0.109 8T ² + 0.001 3T ³	0.999 7	99.95
	BPAEC	CP = 8.566 112 + 6.946 15T - 0.072 7T ² + 0.001 5T ³	0.999 9	99.99

3 讨论

近年来,我们为了验证冯元桢等关于血管段内皮细胞的膜张应力逆流方向累加的理论分析^[5,6],相继采用了人胚肾小球血管内皮细胞、牛肺动脉内皮细胞和人脐静脉血管为试验材料,研究了不同长度的离

体培养的单层内皮细胞和不同长度的离体血管段内皮细胞对蛋白质代谢的影响^[7-9],但是不同种类的 EC 是否对蛋白质的代谢有不同的影响呢?除了血管内皮细胞在结构、功能、抗原成分、代谢特征和对生长因子的反应上存在异质性外^[1,3],Dichek 等发现同种 EC 的传代次数不同时,其基因表达能力也有差异,传 1 代的

thrombospondin vW 因子和蛋白 S 的 mRNA 水平高于传 21 代,而传 21 代的 tPA, PAI-1、尿激酶和凝血调节素的 mRNA 水平高于传 1 代。Gumkowski 等^[2]的研究表明,鼠的肺、肝、脑、肾等不同器官的微血管内皮细胞的血管紧张素转换酶有异质性。Mason 等^[10]比较了人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和皮肤微血管内皮细胞 (DMEC) 对蛋白激酶 II 的响应,发现在蛋白激酶 II 激活后,这两种内皮细胞在胞间黏附分子、血管细胞黏附分子和 E-选择素上有异质性。

本实验中, HGVEC 和 BPAEC 两种不同的 EC 在同样的剪切流环境中剪切作用 24 h, HGVEC 处理的 Ang II 平均分泌率 (7.5362 ± 0.2710) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 高于 BPAEC 处理 (6.0869 ± 0.1060) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 二者间的差异超过极显著水平 ($t = 6.5396$, $P = 0.0028$)。两个处理的平均分泌率曲线 (图 1) 均表明, HGVEC 的 Ang II 平均分泌率随剪切时间的增加而减少, 二者为线性相关关系, HGVEC 处理的变幅为 $9.36 \sim 6.42$ $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 变异相对较大。BPAEC 处理在各时点的分泌率较为稳定, 变幅较小, 自始至终为 $6.95 \sim 6.01$ $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$; 其分泌率曲线为略带凹形的二次抛物线。总之, 本试验结果表明, HGVEC 和 BPAEC 两种不同的 EC 在 Ang II 分泌特性方面表现出异质性。

至于血管内皮细胞异质性产生的原因, Boegehold^[11]认为是多方面的, 包括内皮细胞群体的内在差异和内皮细胞微环境的差异。

致谢: 本研究得到第三军医大学罗向东教授、罗勤女士等的大力帮助, 谨致谢忱!

参考文献:

- [1] THPRORON E, SHATOS M A, SHREEVE S M, et al. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells[J]. Stroke, 1997, 28(2): 375-381.
- [2] GUMKOWSKI F, KAMINSKA G, KAMINSKI M, et al. Heterogeneity of mouse vascular endothelium[J]. Blood Vessels, 1987, 24(1-2): 11-23.
- [3] THORIN E, SHREEVE S M. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states[J]. Pharmacol Ther, 1998, 78(3): 155-166.
- [4] 王贵学, 欧阳克清, 蔡绍哲, 等. 剪切应力对毛细血管内皮细胞代谢的影响[J]. 生物物理学报, 1999, 15: 178-183.
- [5] FUNG Y C, LIU S Q. Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels[J]. J Biomech Eng, 1993, 115: 1-12.
- [6] LIU S Q, YEN M, FUNG Y C. On measuring the third dimension of cultured endothelial cells in shear flow[J]. J Biomech Eng, 1994, 91(19): 8782-8786.
- [7] 王贵学, 蔡绍哲. 内皮细胞蛋白质代谢与细胞膜张应力累积效应的相关性研究[J]. 中国学术期刊文摘, 1998, 4(10): 1245-1247.
- [8] 王贵学, 蔡绍哲. 剪切流场中内皮细胞膜张应力累积效应的实验研究[J]. 生物物理学报, 1999, 15(3): 589-598.
- [9] 王贵学, 蔡绍哲. 牛肺动脉单层内皮细胞长度与其血管紧张素 II 代谢的相关性[J]. 生物物理学报, 2000, 16(2): 358-366.
- [10] MASON J C, YARWOOD H, SUGARS K, et al. Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation[J]. Am J Physiol, 1997, 273(4): 1233-1240.
- [11] BOEGEHOLD M A. Heterogeneity of endothelial function within the circulation[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1998, 7(1): 71-78.

Difference of Two Types of Vascular Endothelial Cells in Secretion of Angiotensin II

XU Cheng-hao, WANG Gui-xue, CAI Shao-xi, SU Lan, WANG Yuan-liang

(College of Bioengineering, Key Laboratory for Biomechanics & Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: To understand further the heterogeneity of vascular endothelial cells in metabolism, and enhance knowledge to biological character of vascular endothelial cells, the authors make human glomerulus vascular endothelial cells (HGVECs) and bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAECs) were exposed to steady laminar shear stress for 24 hours by using parallel plate flow chamber apparatus. The secretion production of angiotensin II (Ang II) in circulating medium is detected by radiomunoassay. The results show that Ang II secretion rate averaged for HGVECs (7.54 ± 0.27) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ is significantly higher than that for BPAECs (6.08 ± 0.11) $\text{pg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, and the average Ang II secretion rate for HGVECs decreased with duration of shear stress and its range of variation in different time points is relatively larger; while the average Ang II secretion rate for BPAECs presented has no obvious change with duration of shear stress and its range of variation in different time points was relatively smaller, showing heterogeneity in Ang II secretion character between HGVECs and BPAECs.

Key words: vascular endothelial cells; angiotensin II; heterogeneity

(责任编辑 李胜春)