

· 论 著 ·

比那地尔与肺动脉平滑肌细胞的增殖和凋亡

姚小鹏¹, 李强^{1*}, 钱卫珠², 黄怡¹, 白冲¹, 董宇超¹, 刘忠令¹

(1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433; 2. 科研部国际合作肿瘤研究所)

[摘要] **目的:** 研究钾通道开放剂比那地尔(Pin)对大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC)增殖和凋亡的作用。**方法:** 通过非核素标记细胞增殖检测、³H-TdR 掺入、形态学、流式细胞术等方法研究 Pin 对大鼠 PASMC 增殖和凋亡的作用。**结果:** 25~500 μmol/L 的 Pin 呈剂量依赖性地减少大鼠 PASMC 的细胞数和 DNA 合成, 500 μmol/L 的 Pin 显著减少 S 期和 G₂/M 期的细胞比例, 增加 G₀/G₁ 期细胞的比例。50~500 μmol/L 的 Pin 呈剂量依赖性地增加大鼠 PASMC 的凋亡率。**结论:** 钾通道开放剂抑制大鼠 PASMC 增殖并促进其凋亡。钾通道开放剂可能成为今后预防和控制低氧性肺动脉高压血管重建的有效药物。

[关键词] 比那地尔; 钾通道开放剂; 肺动脉; 平滑肌; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R 544.102 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0093-03

Effect of pinacidil on proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells

YAO Xiao-Peng¹, LI Qiang^{1*}, QIAN Wei-Zhu², HUANG Yi¹, BAI Chong¹, DONG Yu-Chao¹, LIU Zhong-Ling¹ (1. Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. International Joint Cancer Institute, Division of Scientific Research)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of potassium channel opener pinacidil (Pin) on cell proliferation and apoptosis of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC). **Methods:** The effects of Pin on proliferation and apoptosis of rat PASMC were observed with non-isotope proliferation kit, ³H-TdR incorporation, morphology, and flow cytometer. **Results:** Pin (25-500 μmol/L) dose-dependently decreased the cell number and the DNA synthesis of rat PASMC. Pin at 500 μmol/L decreased the S and G₂/M periods ratio, increased the G₀/G₁ period ratio remarkably. Pin (50-500 μmol/L) dose-dependently increased the apoptotic ratio of rat PASMC. **Conclusion:** Potassium channel opener decreases the proliferation and increases the apoptosis of rat PASMC. Potassium channel openers may become effective medicines in preventing and managing the vascular remodeling of hypoxic pulmonary hypertension in future.

[KEY WORDS] pinacidil; potassium channel opener; pulmonary artery; smooth muscle; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 93-95]

研究^[1]表明低氧抑制肺动脉平滑肌细胞(PASMC)钾通道活性使其膜电位降低, 开放电压依赖钙通道, Ca²⁺内流增加使兴奋-收缩耦联增强, 导致PASMC收缩。低氧性肺动脉高压(HPH)除血管收缩外, 另一重要改变为血管结构重建, 而PASMC增殖和凋亡的变化是这一过程的重要组成部分。本研究旨在明确钾通道开放剂比那地尔(Pin)对大鼠PASMC增殖和凋亡的作用, 从而为今后钾通道开放剂用于防治HPH血管重建提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 250 g 雄性 SD 大鼠 2 只(第二军医大学实验动物中心), 取肺动脉后酶消化法培养 PASMC^[2]。7~10 d 后以免疫组化法鉴定, PASMC 纯度为 98%。培养皿中的细胞长满后以 1:3 的比例每 3 d 传代 1 次。

1.2 细胞增殖的检测 第 5~10 代 PASMC 以

10%FCS RPMI 1640 培养液按 5×10³/孔接种于 96 孔板。48 h 后更换成 1%FCS 继续培养 48 h 使细胞停止生长。换成 10%FCS PRMI 1640 培养液, 并加入 1、10、25、50、100、200、500 μmol/L 的 Pin (Sigma)。24 h 后按非核素标记细胞增殖检测试剂盒 (Cell Titer™, Promega) 的方法, 用酶标仪 (ELx800, Bio-tek Instrument Inc.) 测定 D₄₉₀/D₆₃₀ 以检测细胞数; 18 h 后加入 ³H-TdR (上海原子能研究所) 37 kBq/孔, 6 h 后收集细胞于玻璃纤维纸上, 待干燥后置于闪烁杯中, 加入闪烁液, 用 β-液闪仪 (TRI-CARB 406CD) 测定 ³H-TdR 掺入值以检测 DNA 合成。第 5~10 代 PASMC 按 1×10⁵/孔接种于 6 cm 平皿, 72 h 后更换成 1%FCS 继续培养 48 h 使细胞停止生长。更换成 10%FCS RPMI 1640 培养

[作者简介] 姚小鹏(1966-), 男(汉族), 博士, 主治医师。

E-mail: yaoxp5@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: Liques@sh163.net

液并加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin。24 h 收集细胞,加入 70% 冰甲醇过夜,次日碘化丙啶(PI, Roche)染色后流式细胞仪(FACScan BD)测定细胞周期。以上实验对照组均不加入 Pin。

1.3 细胞凋亡的检测 第 5~10 代 PASMCM 接种于 96 孔板,72 h 后更换成 1% FCS RPMI 1640 培养液,24 h 后加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin,24 h 后置于倒置相差显微镜下照相。第 5~10 代 PASMCM 以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板,72 h 后更换成 1% FCS RPMI 1640 培养液,24 h 后分别加入 10、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin,8 h 后以 Annexin V 凋亡检测试剂盒(Roche)标明的方法检测细胞凋亡。以上实验对照组均不加入 Pin。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Pin 与细胞增殖 浓度为 25~500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin 剂量依赖性地减少 10% FCS 诱导 PASMCM 的 D_{490}/D_{630} 和 $^3\text{H-TdR}$ 掺入值,与对照组比较相差非常显著($P < 0.01$, 图 1)。500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin 与对照组比较非常显著地增加 G_0/G_1 期细胞比例及减少 S 期和 G_2/M 期细胞比例($P < 0.01$, 图 2)。

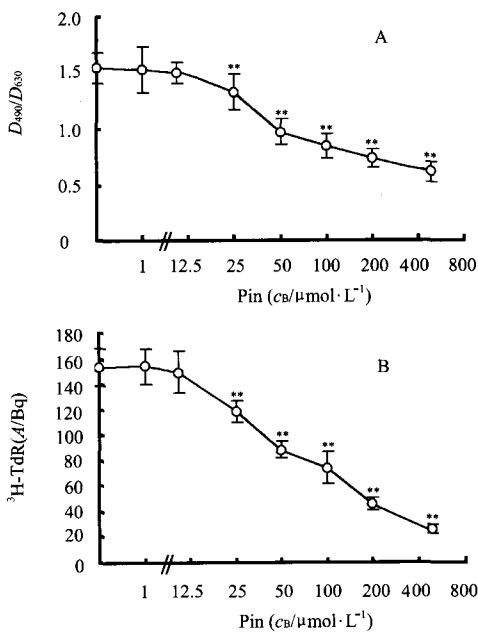


图 1 Pin 对 PASMCM 细胞数(A)和 DNA 合成(B)的影响

Fig 1 Effect of Pin on cell number(A) and DNA synthesis of PASMCM(B)

** $P < 0.01$ vs control group; $n = 8$

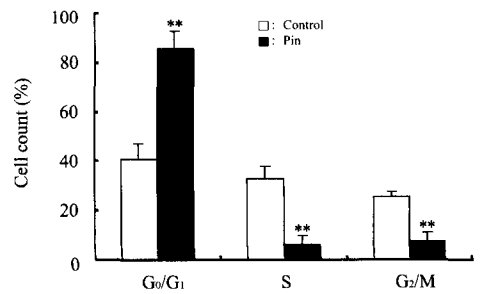


图 2 Pin 对 PASMCM 细胞周期的影响

Fig 2 Effect of Pin on cell cycle of PASMCM

** $P < 0.01$ vs control group; $n = 4$

2.2 Pin 与细胞凋亡 倒置相差显微镜下见 Pin 组细胞体积缩小,似有伪足伸出,个别细胞胞体变圆,对照组细胞呈梭形,胞体较宽,胞核不明显(图 3)。定量检测结果经计算机分析后根据荧光染色不同将细胞分为 3 群,Annexin V⁻PI⁻为活细胞,在左下象限;Annexin V⁺PI⁺为坏死细胞,在右上象限;Annexin V⁺PI⁻为凋亡细胞,在右下象限。50~500 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pin 剂量依赖性地增加 PASMCM 的凋亡率,与对照组相比差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 4)。

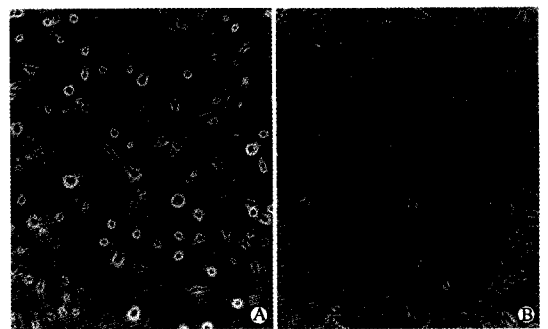


图 3 细胞凋亡定性检测结果

Fig 3 Qualitative detecting result of apoptosis($\times 100$)

A: 500 $\mu\text{mol/L}$ Pin group; B: Control group

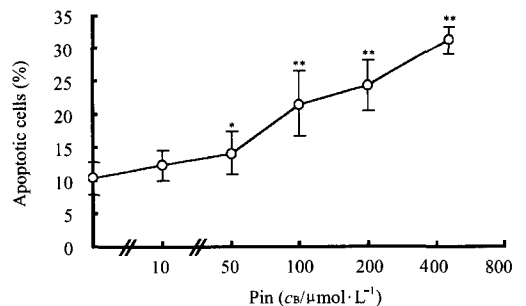


图 4 Pin 对 PASMCM 凋亡的影响

Fig 4 Effect of Pin on apoptosis of PASMCM

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $n = 4$

3 讨论

作为一种血管活性物质,钾通道开放剂对体循环血管平滑肌细胞(SMC)增殖也有作用,Shi等^[3]报道Pin等4种钾通道开放剂抑制新福林诱导的兔胸主动脉SMC增殖。但肺循环血管,尤其是肺小动脉的特性与体循环动脉不同,主要表现在对低氧的反应上,前者低氧时收缩,后者低氧时舒张。导致这一现象的原因是由于2种动脉SMC钾通道特性的差异,PASMC钾通道可以直接感受低氧使肺动脉收缩。这种性质上的差异是否会导致钾通道开放剂对2种动脉SMC增殖作用的不同?本实验结果显示,25~500 μmol/L的Pin呈剂量依赖性地减少10%FCS诱导的PASMC增殖,提示尽管通道特性不同,但与体循环动脉SMC一样,钾通道开放剂也可以抑制PASMC增殖。本实验还发现500 μmol/L的Pin明显减少S期和G₂/M期的细胞比例,增加G₀/G₁期细胞的比例。说明钾通道开放剂抑制PASMC增殖的机制除减少DNA合成外,还包括对细胞周期的调控,即通过阻止细胞进入S期和G₂/M期减少PASMC增殖。

钾通道活性改变与神经系统和血液系统一些细胞的凋亡有关。Yu等^[4,5]发现钾通道阻断剂可以显著降低无血清培养神经元细胞的凋亡率($P < 0.01$),而开放剂可诱导凋亡。其后他们又证明神经酰胺诱导神经元细胞凋亡时增加电压依赖钾通道活性。Nagy等^[6]报道钾通道活性改变与胸腺细胞的凋亡有关。Beauvais等^[7]的研究结果提示钾通道活性增加促进嗜酸细胞凋亡,并且可能是凋亡细胞体积缩小的原因。Krick等^[8]最近报道钾通道活性增高促进常氧体外培养PASMC凋亡。本研究发现,给予钾通道开放剂Pin后,PASMC表现出细胞体积缩小、胞膜皱缩等凋亡特征,50~500 μmol/L的Pin呈剂量依赖性地促进PASMC的凋亡。表明在体外培养条件下,在几乎相同浓度范围内,钾通道开放剂同时具有抑制PASMC增殖和促进其凋亡的作用。

HPH早期主要表现为肺小动脉收缩,随着时间的延长,肺血管结构重建所起的作用越来越大。HPH血管重建表现为内皮细胞损伤,PASMC肥大增殖,肌型血管中层增厚,非肌型血管向肌型转化,成纤维细胞增殖和细胞外基质增多等。其中PASMC增殖是HPH形成的重要环节。本研究发现钾通道开放剂具有抑制PASMC增殖和增加其凋亡的双重作用,这2种作用的结果都是PASMC数量

的减少,提示在体外培养条件下钾通道开放剂是PASMC增殖的强有力抑制剂。最近钟小宁等^[9]报道HPH模型组大鼠腹腔给予Pin后,肺小动脉管壁厚度与血管外径比值、管壁面积与血管总面积比值、管腔面积与血管总面积比值等血管结构重建指标较单纯低氧组明显改善。这些结果虽未直接涉及PASMC增殖改变所起的作用,但结合本研究结果可以肯定,钾通道开放剂的抑增殖作用对在体HPH血管结构重建有一定的治疗和预防作用。今后,在防治HPH过程中,除加强病因治疗外,早期给予钾通道开放剂可能有一定的预防和治疗作用。

[参考文献]

- [1] Smirnor SV,Robertson TP,Ward JPT,et al. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary artery muscle cells[J]. *Am J Physiol*,1994,266(35):H365-H370.
- [2] 姚小鹏,王皓,倪灿荣,等. 大鼠阻力性肺动脉平滑肌细胞培养[J]. *解剖学杂志*,2002,25(3):294-296.
- [3] Shi DH,Guo ZG. Inhibitory effect of potassium channel openers on proliferation of cultured rabbit aortic smooth muscle cells[J]. *Acta Pharm Sin*,1996,17(6):513-515.
- [4] Yu SP,Yeh CH,Sensi SL,et al. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current[J]. *Science*,1997,278(5335):114-117.
- [5] Yu SP,Yeh CH,Gottron F,et al. Role of the outward delayed rectifier K⁺ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons[J]. *J Neurochem*,1999,73(3):933-941.
- [6] Nagy P,Panyi G,Jenei A,et al. Ion-channel activities regulate transmembrane signaling in thymocyte apoptosis and T-cell activation[J]. *Immunol Lett*,1995,44(2-3):91-95.
- [7] Beauvais F,Michel L,Dubertret L. Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis: role of K⁺ channels[J]. *J Leukoc Biol*,1995,57(6):851-855.
- [8] Krick S,Platoshyn O,McDaniel SS,et al. Augmented K⁺ currents and mitochondrial membrane depolarization in pulmonary artery myocyte apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2001,281(4):L887-L894.
- [9] 钟小宁,梁国容,何志义,等. 比那地尔防治大鼠低氧性肺动脉高压肺血管重建的实验研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*,2000,23(12):727-729.
Zhong XN,Liang GR,He ZY,et al. Laboratory study on protective and therapeutic effects of pinacidil on pulmonary vascular remodeling in rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi (Chin J Tuberc Respir Dis)*,2000,23(12):727-729.

[收稿日期] 2003-05-16

[修回日期] 2003-11-29

[本文编辑] 曹静