

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0014-03

尾加压素 U^{II} 的促丝裂作用

张勇刚, 陈亚红¹, 马春艳², 齐永芬, 庞永正, 杨军, 张肇康, 唐朝枢

(北京大学第一医院心血管病研究所, 北京 100034;

1. 北京大学第三医院呼吸内科; 2. 北京大学第一医院肾脏疾病研究所)

[主题词] 尾加压素; 肌, 平滑; 细胞增殖; 丝裂原

[摘要] 为研究体内新发现的缩血管活性肽尾加压素 U^{II} 对细胞的促丝裂作用, 在培养的大鼠动脉血管平滑肌细胞和气管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞以及肾系膜细胞上, 采用 ^3H -胸腺嘧啶掺入法, 观察了尾加压素 U^{II} 对细胞DNA合成的影响。结果显示尾加压素 U^{II} 明显促进细胞 ^3H -胸腺嘧啶掺入增加, 并在一定浓度范围内呈剂量依赖性。但同一剂量的尾加压素 U^{II} 在不同细胞产生的作用强弱不同, 10^{-10} mol/L的尾加压素 U^{II} 仅对心肌成纤维细胞和气管平滑肌细胞有刺激作用, 且成纤维细胞>气管平滑肌细胞, 10^{-9} ~ 10^{-8} mol/L尾加压素 U^{II} 对诸细胞的效应则为心肌成纤维细胞>气管平滑肌细胞>肾系膜细胞>血管平滑肌细胞, 而高浓度尾加压素 U^{II} (10^{-7} mol/L)对心肌成纤维细胞增殖的刺激作用明显减弱。这些结果提示尾加压素 U^{II} 是一种新发现的内源性丝裂原, 其促丝裂效应在疾病发生中的作用值得进一步研究。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Mitogenic Effect of Urotensin U^{II} on Cells

ZHANG Yong-Gang, CHEN Ya-Hong, MA Chun-Yan, QI Yong-Fen, PANG Yong-Zheng, YANG Jun, ZHANG Zhao-Kang, and TANG Chao-Shu

(Department of Cardiovascular Research, the First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China)

MeSH Urotensins; Muscle, Smooth; Cell Proliferation; Mitogens

ABSTRACTS **Aim** To investigate the mitogenic effect of urotensin II on cells. **Methods** In cultured rat aorta smooth muscle cells (VSMC), tracheal smooth muscle cells (TSMC), cardiac fibroblasts (CF) and glomerular mesangial cells (GMC), U^{II} was used to stimulate these cells and levels of ^3H -TdR incorporation were used to evaluate the speed of DNA synthesis. **Results** U^{II} increased levels in concentration-dependent manner of ^3H -TdR incorporation of these cells significantly. But in different cells, U^{II} of same concentration did not induce same effect. 10^{-10} mol/L U^{II} could increase levels of ^3H -TdR incorporation of CF and TSMC only, with the incorporation of CF higher than TSMC, while 10^{-9} ~ 10^{-8} mol/L U^{II} induced effect in the following order: CF>TSMC>GMC>VSMC. However, 10^{-6} ~ 10^{-7} mol/L U^{II} showed weaker stimulating effects on CF than lower concentration of U^{II} (10^{-10} ~ 10^{-8} mol/L). **Conclusion** These study provides evidence that urotensin II is an endogenous mitogen for some cells and the contribution of mitogenic effect of U^{II} to diseases deserves investigating greatly.

尾加压素 U^{II} (urotensin U^{II}) 是一种生长抑素样环型结构神经肽, 最早自鱼的尾部下垂体中提取出来。1998年首次从人体克隆出来^[1], 进一步研究证实, U^{II} 主要分布于心血管和神经系统^[1-3], 在肾和肺也有少量的分布; 其特异性受体GPR14主要分布于心血管、神经和膀胱平滑肌^[2, 4], U^{II} 具有强

烈的缩血管效应, 比内皮素强十余倍, 提示 U^{II} 在心血管系统的稳态调节中可能有重要的作用。本研究在培养的大鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblast, CF)、气管平滑肌细胞(tracheal smooth muscle cell, TSMC)、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和肾系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)上, 采用 ^3H -胸腺嘧啶掺入法, 观察了尾加压素 U^{II} 对细胞DNA合成的影响, 旨在研究尾加压素 U^{II} 的促丝裂原效应。

1 材料与方法

[基金项目] 国家自然科学基金(39730220)资助课题

[作者简介] 张勇刚, 男, 1963年生, 心血管病理生理学博士, 主要从事心血管发病机制方面的研究。唐朝枢, 男, 1945年生, 教授, 博士生导师, 长期从事心血管病理生理科研及教学工作, 发表论文数百篇, 本文通讯作者。

1.1 材料

SD 大鼠和乳鼠购自我校实验动物中心, Rat U \oplus 由美国 Phoenix Pharm Inc 合成, 纯度 > 99.5%, RPMI 1640 培养基为 Sigma 产品, ^3H -TdR 购自中国原子能研究所(放射比活性为 3.7×10^{10} Bq/L)。

1.2 血管平滑肌细胞的培养^[5]

取 250 g 左右 SD 大鼠, 断头处死后, 于无菌状态下速取胸主动脉血管约 2 cm, 分离中膜, 剪碎, 置于培养瓶内, 采用含 15% 血清的 RPMI1640 培养液于 37℃、95% 空气-5% CO₂ 条件下培养。经形态学及 α -actin 免疫组织化学染色证实为平滑肌细胞, 实验用第 4~6 代细胞。

1.3 心肌成纤维细胞的培养^[6]

参照 Simpson 等的方法取 1 日龄 SD 乳鼠心室肌, 剪碎, 用 0.125% 胰酶部分消化, 收集细胞, 在含 10% 血清的 RPMI1640 培养液中于 37℃、95% 空气-5% CO₂ 条件下培养, 通过差速贴壁, 筛选 30~60 min 内贴壁成纤维细胞传代培养, α -actin 鉴别细胞阴性, 实验用第 4~6 代细胞。

1.4 气道平滑肌细胞的培养^[7]

采用贴块法。取 250 g 左右 SD 大鼠, 断头处死后, 无菌摘取气管, 剥去气管外组织, 从膜部剪开气管, 剪取膜部平滑肌条, 并剪成 1 mm² 左右小块, 加入含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于培养瓶中, 培养条件同上。经形态学及 α -actin 免疫组织化学染色证实为平滑肌细胞。实验用第 2~6 代细胞。

1.5 肾系膜细胞的培养^[8]

肾皮质取自 6~8 只成年 SD 大鼠, 经研磨后分别过 200、140 和 80 μm 筛网, 收集 80 μm 筛网上的肾小球, 经离心收集, 悬浮于 20% RPMI1640 培养液中, 培养条件同上。采用光镜或电镜及免疫组织化学的方法进行鉴定, 缺乏角蛋白及 (II) 因子相关抗原, 并有 α -平滑肌激动蛋白表达。采用第 5~10 代细胞进行实验。

1.6 ^3H -胸腺嘧啶掺入实验^[9]

将培养的细胞用 0.125% 的胰酶消化, 制成细胞悬液, 接种于 24 孔板, 每孔计数为 5×10^4 , 贴壁培养 24 h 后, 换为乏血清培养液培养(1%~2% 血清) 24 h, 加入不同浓度的 U \oplus (0、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L) 培养 12 h, 然后加入 ^3H -TdR (37 KBq/孔) 继续培养 8~12 h, 用 Millipore 抽滤, 收集于玻璃纤维膜上, 烘干后加入闪烁剂 (PPO/POPOP/二甲苯/无水乙醇), 用 LKB 液闪仪检测 ^3H 放射性强度。结果以 cpm 表示, ^3H -TdR 的掺入量

代表了细胞 DNA 的合成量。

1.7 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析组间 q 检验作统计学处理。

2 结果

如表 1 (Table 1) 和图 1 (Figure 1) 所示, 在一定的范围内, U \oplus 呈浓度依赖性地促进这些细胞的 ^3H -TdR 掺入。对于 CF, 低浓度 U \oplus (10^{-10} ~ 10^{-8} mol/L) 的刺激作用尤为明显, 10^{-10} 、 10^{-9} 和 10^{-8} mol/L U \oplus 组的掺入量分别为对照组的 9.5、11.3 和 14.4 倍($P < 0.01$), 但高浓度 U \oplus (10^{-7} 和 10^{-6} mol/L) 组刺激效应反而减弱, 分别为对照组的 2.1 和 2.4 倍($P < 0.05$)。对于 TSMC, 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L U \oplus 组的掺入量分别为对照组的 1.8、2.5、3.1、4.2 和 7.7 倍($P < 0.01$)。对于 GSMC, 10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L U \oplus 组的掺入量分别为对照组的 1.9、2.2 和 2.5 倍($P < 0.01$), 而 10^{-10} mol/L U \oplus 与对照组无明显差异($P > 0.05$)。对于 VSMC, 与 GSMC 类似, 10^{-10} mol/L U \oplus 组与对照组无明显差异($P > 0.05$), 10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L U \oplus 组掺入量分别为对照组的 1.22($P < 0.05$)、1.6 和 1.7 倍($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度尾加压素(mol/L)对细胞 ^3H -TdR 掺入(cpm)的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 The effects of U \oplus (mol/L) on ^3H -TdR incorporation (cpm) of several cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Dose	CF	TSMC	GSMC	VSMC
0	818 \pm 134	3 004 \pm 366	6 148 \pm 1 758	3 402 \pm 293
10^{-10}	7 764 \pm 1 076 ^b	5 314 \pm 1084 ^b	6 586 \pm 1 459	3 124 \pm 222
10^{-9}	9 235 \pm 1 227 ^b	7 362 \pm 586 ^b	11 488 \pm 134 ^b	4 161 \pm 710 ^a
10^{-8}	11 810 \pm 914 ^b	9 151 \pm 596 ^b	13 652 \pm 1 641 ^b	5 334 \pm 955 ^b
10^{-7}	1 686 \pm 138 ^a	12 574 \pm 1452 ^b	15 569 \pm 2 048 ^b	5 613 \pm 846 ^b
10^{-6}	1 962 \pm 270 ^a	23 213 \pm 3 128 ^b		

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, compared with 0 mol/L U \oplus group.

3 讨论

鱼类的 U \oplus 由 12 个氨基酸残基组成, 而大鼠和人类 U \oplus 分别含有 14 和 11 个氨基酸残基^[1,2,10], 位于 U \oplus 末端第 6~11 位的环状 6 肽结构^[1]在生物进化中十分保守, 其序列为半胱氨酸-苯丙氨酸-色氨酸-赖氨酸-酪氨酸-半胱氨酸, 是 U \oplus 的生物活性中心。U \oplus 能引起一系列生物学效应, 如调节肾上腺皮质激素的分泌, 调节渗透压平衡, 尤其在

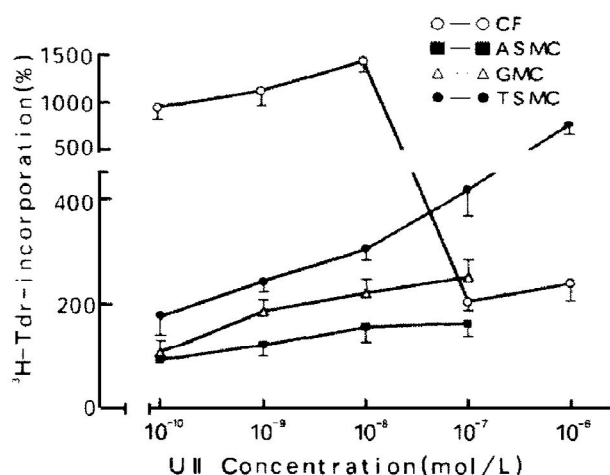


图1 尾加压素Ⅱ对不同细胞作用的浓度效应曲线。以对照组(不含UⅡ)为100%

Figure 1 Concentration-effect curves of UⅡ (Control: 100%, n=6)

心血管系统具有十分重要的作用。早期报道鱼的UⅡ能引起硬骨鱼血压增高,最近发现UⅡ能使大鼠胸主动脉强烈收缩,其缩血管效应是内皮素的十余倍^[2],UⅡ能引起灵长类动脉血管强烈收缩,而对静脉的作用较弱。UⅡ是目前已知的机体最强的内源性缩血管物质^[2]。

最近,Ames等^[2]采用免疫扩散法发现,灵长类冠状动脉粥样硬化斑块内脂质沉积的平滑肌细胞和巨噬细胞聚集的区域富含UⅡ提示UⅡ在动脉硬化和冠心病发病中具有重要的意义。我们曾在大鼠主动脉缩窄后压力超负荷性心肌肥大模型和大鼠主动脉内膜球囊拉伤后再狭窄模型上发现,心肌浆膜及主动脉UⅡ受体结合位点上调,并且UⅡ引起血管收缩反应增强,推测UⅡ参与了心肌肥大和血管损伤性疾病的发病过程^[11]。本工作首次观察到UⅡ具有丝裂原样作用,UⅡ能促进大鼠多种细胞如CF、TSMC、GMC和VSMC ³H-TdR掺入增加,表明UⅡ能促进这些细胞的增殖。其特点表现为在一定的浓度范围内,促增殖作用具有浓度依赖性。但在不同的细胞,相同浓度的UⅡ产生的效应不同。10⁻¹⁰ mol/L的UⅡ仅对CF和TSMC有促增殖作用,强弱顺序为CF>TSMC,10⁻⁹~10⁻⁸ mol/L UⅡ效应强弱顺序为CF>TSMC>GMC>VSMC,而10⁻⁷ mol/L UⅡ效应为TSMC>GMC>CF>VSMC。

尾加压素Ⅱ在疾病发病中的机制目前尚不清楚。细胞增殖是许多疾病的共同病理过程,其中平滑肌细胞增殖在高血压、动脉粥样硬化以及血管内

皮损伤性疾病的发生中起着十分重要的作用,而气道平滑肌细胞增殖则参与了气道重塑,心肌成纤维细胞在心肌肥大和心肌重塑中占重要地位,肾系膜细胞增殖参与了肾小球硬化的过程,因此我们推测UⅡ的丝裂原作用在这些疾病的发生中可能具有重要意义,值得高度重视。

对于UⅡ促丝裂原效应的机制目前尚不明了。据报道,UⅡ与GPR14结合后引起细胞内[Ca²⁺]_i升高,发挥血管收缩等一系列效应^[2]。UⅡ是否通过[Ca²⁺]_i和其它信号转导途径来促进细胞的分裂和增殖,其详细机制有待研究。

参考文献

- [1] Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, et al. Cloning of cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 15 803- 808
- [2] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin- II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14 [J]. *Nature*, 1999, **401**: 282- 286
- [3] Mori M, Sugo T, Abe M, et al. Urotensin II is the endogenous ligand of a G- protein coupled orphan receptor SENR (GPR14) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **265**(1): 123- 129
- [4] Liu Q, Pong SS, Zeng Z, et al. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G- protein coupled receptor GPR14 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266**(1): 174- 178
- [5] Hirata Y, Takagi Y, Takata S, et al. Calcitonin gene- related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **151**(3): 1 113- 121
- [6] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat culture and its regulation by serum and catecholamines [J]. *Circ Res*, 1982, **51**: 787- 801
- [7] Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodeling and phenotype plasticity in asthma [J]. *Eur Respir J*, 1996, **9**: 808- 820
- [8] Meger LH, Tsai P, Caramelo C, et al. ANF inhibits vasopressin- induced Ca²⁺ mobilization and contraction in glomerular mesangial cells [J]. *Am J Physiol*, 1988, **255**: F771
- [9] Porter JG, Catalano R, Mc Enroe G, et al. C- type natriuretic peptide inhibits growth factor- dependent DNA synthesis in smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1992, **263**(5pt1): C1 001- 006
- [10] Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, et al. Cloning, sequence, analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors [J]. *FEBS Letters*, 1999, **457**: 28- 32
- [11] 张勇刚, 杨军, 夏春芳, 等. 尾加压素Ⅱ在心血管系统中的作用 [J]. *北京医科大学学报*, 2000, **32**(2): 133

(此文2000- 05- 08收到,2000- 11- 05修回)

(此文编辑 朱雯霞)