

香烟烟雾对大鼠脑血管内皮细胞超微结构及内皮素 1 表达的影响

冯 昱, 徐爱华, 柳忠兰

(中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 香烟烟雾; 血管内皮; 超微结构; 内皮素 1; 大鼠

[摘要] 目的 研究吸烟对大鼠脑血管内皮细胞超微结构及其内皮素 1 的影响。方法 用免疫组织化学方法分别检测正常对照组、长期大量吸烟组、长期少量吸烟组、短期大量吸烟组及戒烟组大鼠脑血管内皮素 1 的表达; 运用 Western blotting 法对以上各组脑内皮素 1 特异性受体进行定量分析。同时电镜观察其脑血管内皮细胞超微结构的变化。结果 吸烟大鼠各组内皮素 1 及脑内皮素 1 特异性受体表达均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 长期大量吸烟组明显高于其他各吸烟组, 戒烟组明显低于短期大量吸烟组。吸烟可致脑血管内皮细胞超微结构变化, 并可见凋亡细胞, 长期大量吸烟组较其他各吸烟组改变明显。结论 吸烟可引起脑血管内皮细胞损伤, 使内皮素 1 表达上调。戒烟可使上述改变明显恢复。内皮细胞损伤、内皮素 1 表达上调在吸烟对脑损伤中起重要作用, 是吸烟引起脑血栓的重要途径之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Effect of Cigarette Smoking on Vascular Endothelium and Expression Endothelin-1 in Rat Brains

FENG Yu, XU Ai-Hua, and LIU Zhong-Lan

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Smoking Fume; Vascular Endothelium; Ultrastructural; Endothelin-1; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cigarette smoking on vascular endothelium and endothelin-1 (ET-1) expression in rat brains. **Methods** The expression of endothelin-1 and endothelin receptor A (ETRA) were examined in site by means of immunohistochemistry and in quantitative by Western blotting method in rat brains following smoking. Electronic microscopy was used to observe the ultrastructural changes of endothelial cells. **Results** It was found that there were prominent ET-1 and ETRA expressions on the endothelium after smoking; ET-1 and ETRA expressions in long term large amount group were significantly increased compared with the other terms and in abstained group was significantly decreased compared with short term group. Meanwhile the damage of ultrastructure of vascular endothelium was most prominent. The apoptosis of neuron could be found most frequently. **Conclusions** Smoking fume can cause vascular endothelium damage and expression of ET-1 increment. Abstain from smoking can make above change obviously restore. The damage of vascular endothelium and increment expression of ET-1 play an important role in the course of damage and is one way to cerebral thrombosis.

大量研究表明, 吸烟可引起人体血浆中内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 含量增多^[1,2], 但吸烟对脑血管内皮细胞中内皮素 1 表达的影响, 及其对脑血管内皮细胞超微结构的影响尚未见报道。本实验应用免疫组织化学方法定位检测吸烟大鼠脑血管内皮细胞内皮素 1 的表达, 通过 Western blotting 法检测内皮素 1 特异性受体 A (endothelin receptor A, ETRA), 而间接对内皮素 1 表达进行定量研究, 并结合电镜超微结构的变化探讨吸烟对脑血管内皮的影响。

[收稿日期] 2008-03-20

[修回日期] 2008-06-05

[作者简介] 冯昱, 博士, 主治医师, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 fengyu-1976@163.com。徐爱华, 博士研究生, 主要从事脑血管疾病研究, E-mail 为 aiwa@sohu.com。通讯作者柳忠兰, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病, E-mail 为 xuxiaobai-2000@163.com。

1 材料与方法

1.1 吸烟动物模型复制

健康雌性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 190 ± 10 g (由中国医科大学动物部提供)。每组 12 只, 共分 5 组: 正常对照组, 不做任何处理; 长期大量吸烟组: 每天吸烟两次, 每次 10 支, 连续吸烟 75 d; 长期少量吸烟组: 每天吸烟两次, 每次 4 支, 连续 75 d; 短期大量吸烟组: 大量吸烟 35 d 即处死; 戒烟组: 大量吸烟 35 d, 戒烟 30 d。实验用烟为市售 XX 牌香烟, 尼古丁含量 1 mg/支, 焦油含量 18 mg/支。采用 $80 \text{ cm} \times 60 \text{ cm} \times 58 \text{ cm}$ 自制烟仓, 被动吸烟速度约为每 10 min 1 支, 每天两次吸烟之间间隔 4 h。

1.2 取材及内皮细胞内皮素 1 免疫组织化学染色

于实验结束次日各组随机取出 5 只,腹腔内注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)。麻醉成功后,仰卧固定后左心室灌注取脑皮质, OCT 包埋,用 Cryout 1800 冷冻切片机自视交叉后 4 mm 处开始向后行冠状切片,片厚 10 μ m,取 6 张,进行内皮素 1 免疫组织化学染色,部分切片用于阴性对照。小鼠抗大鼠内皮素 1 单克隆抗体和 ABC 试剂盒均购于武汉博士德生物制品有限公司。按照试剂盒说明书操作, DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水、透明和封片。除用 PBS 代替一抗外,余与阴性对照染色步骤相同。内皮素 1 阳性细胞计数方法:计数不重叠 8 个高倍视野染成深棕色的阳性血管内皮细胞总数,手工计数,以排除偶尔表达内皮素 1 的浸润细胞。

1.3 内皮素 1 特异性受体 A 蛋白 Western 印迹分析

提取脑组织蛋白成分。考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。把样品制成相同浓度,变性后上样。样品上样后在 80 V 电压电泳,待样品在浓缩胶与分离胶交界处改成 100 V 电泳 2 h 左右;45 V 电压转印 3 h 左右。用 TBS 配制成的 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜。4 $^{\circ}$ C 山羊抗人 BUBR1 蛋白一抗孵育 PVDF 膜过夜(稀释浓度为 1:1 000);兔抗山羊二抗孵育 PVDF 膜 2 h (稀释浓度为 1:5 000)。ECL 孵育在 PVDF 膜上 0.5~1 min,在暗室中放置暗盒内曝光 0.5~5 min,显影 1~5 min,定影 10 min。拍照分析。

1.4 超微形态学研究

实验结束次日,随机取出 3 只大鼠,经左心室灌注后迅速开颅取脑,于皮层分别取两块大小约 1.0 mm \times 1.0 mm \times 0.5 mm 脑组织块。3% 戊二醛固定过夜后,四氧化锇重固定,环氧树脂包埋。观察定位后行超薄切片,片厚 50~70 nm;铀、铅双重染色;日立 hr7000 透射电镜观察。

1.5 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果采用方差分析比较样本均数,应用 q 检验做组间两两比较分析。

2 结果

2.1 内皮素 1 的免疫组织化学染色

内皮素 1 阳性细胞呈棕染,主要在血管内皮细胞表达。正常对照组额顶叶皮质区平均每 8 个高倍视野仅出现 0.6 个免疫阳性内皮细胞(图 1A);吸烟各组表达均升高,分别与正常对照组相比差异有显著性($P < 0.01$);长期大量吸烟组表达明显增多(图 1B),分别与长期小量吸烟组、短期大量吸烟组和戒

烟组相比差异有显著性($P < 0.01$);戒烟组较长期大量吸烟组、长期小量吸烟组和短期大量吸烟组表达减少($P < 0.01$);长期小量吸烟组与短期大量吸烟组间差异无显著性($P > 0.05$,表 1)。

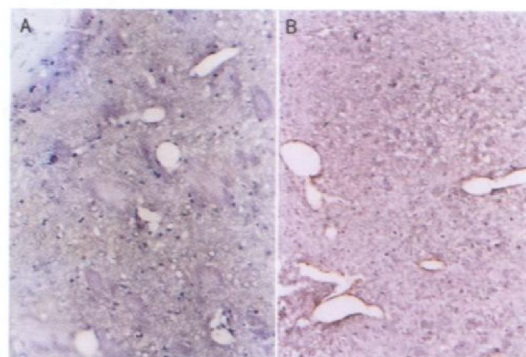


图 1. 内皮素 1 免疫组织化学染色结果($\times 40$) A 为正常对照组, B 为长期大量吸烟组。

2.2 内皮素 1 特异性受体 A 蛋白 Western 印迹分析

通过抗体检测发现,各组 ETR-A 蛋白条带在相对分子质量为 46 kDa 处, ETR-A 蛋白光密度值明显增强(图 2)。经图像分析系统对条带上 ETR-A 蛋白定量分析发现,长期大量吸烟组比其他各组 ETR-A 蛋白含量增多,戒烟组比短期大量吸烟组下降,差异有显著性($P < 0.01$),而长期小量吸烟组与短期大量吸烟组间差异无显著性($P > 0.05$,表 1)。

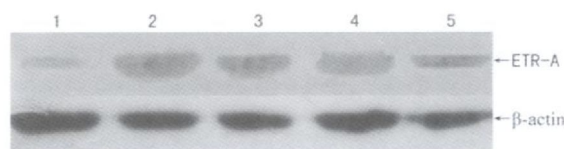


图 2. 各组大鼠脑内皮素 1 Western 印迹分析 1 为正常对照组, 2 为长期大量吸烟组, 3 为长期小量吸烟组, 4 为短期大量吸烟组, 5 为戒烟组。

表 1. 各组内皮素 1 阳性内皮细胞数和 ETR-A 蛋白指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	阳性细胞数 (个/高倍视野)	ETR-A 蛋白指数
正常对照组	5	0.60 \pm 0.48	2.28 \pm 1.41
长期大量吸烟组	5	11.75 \pm 0.96 ^a	30.64 \pm 8.40 ^a
长期小量吸烟组	5	8.50 \pm 1.29 ^{abc}	18.87 \pm 1.20 ^{abc}
短期大量吸烟组	5	7.25 \pm 1.26 ^{abc}	18.77 \pm 2.00 ^{abc}
戒烟组	5	4.5 \pm 1.29 ^{ab}	14.33 \pm 4.18 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与长期大量吸烟组比; c 为 $P < 0.01$, 与戒烟组比。

2.3 内皮细胞超微结构观察

正常对照组血管内皮细胞形态及内皮细胞间紧密连接正常,血管周围神经细胞形态正常。长期大量吸烟组内皮细胞管腔面粗糙,细胞间连接欠紧密(图 3A, $\times 12\ 000$),细胞连接处、高尔基体及线粒体空泡变性,血管基膜与基质间隙增宽(图 3B, $\times 30\ 000$),血管旁可见神经纤维脱髓鞘样改变(图 3C, $\times 8\ 000$)和凋亡的神经细胞(图 3D, $\times 8\ 000$)。长期小

量吸烟组和短期大量吸烟组血管内皮细胞连接尚可,细胞管腔粗糙,内皮细胞内也可见空泡变性的细胞器,血管周围可见神经细胞核异型,切迹凹陷增多,异染色质增多,有脱髓鞘样改变,上述改变程度较长期大量吸烟组轻。戒烟组超微结构接近正常,内皮细胞表面光滑,形态结构接近正常,细胞间连接紧密,可见神经纤维轻度脱髓鞘样改变。

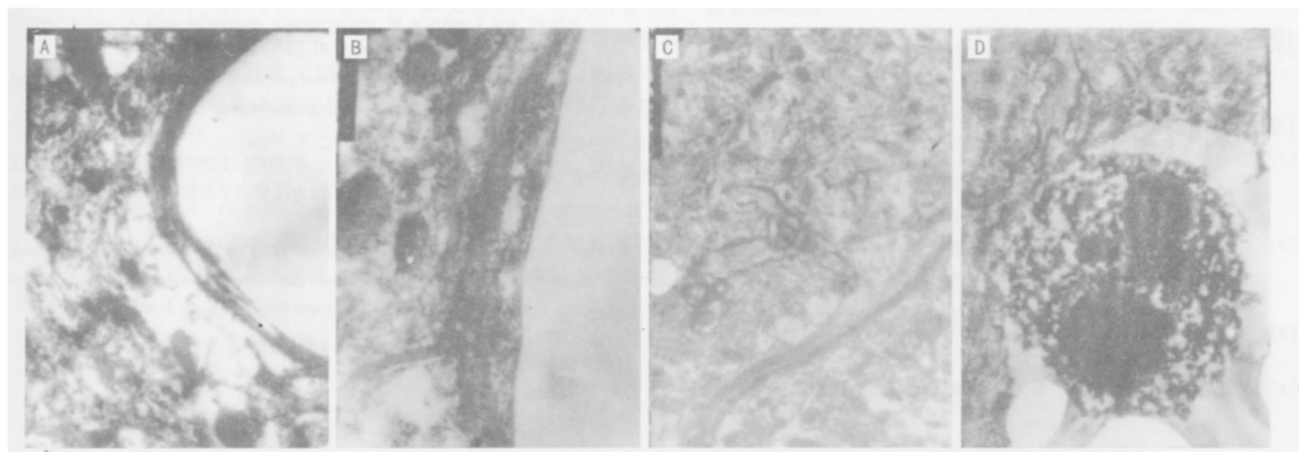


图 3. 长期大量吸烟组内皮细胞超微结构观察

3 讨论

流行病学研究表明,吸烟与缺血性脑血管病(ischemic cerebral vessel disease, ICVD)存在着显著的相关性,近几年来国内外学者对吸烟与脑梗死进行了广泛的研究。为了探讨吸烟对 ICVD 的影响机制,本实验通过电镜技术观察内皮细胞超微结构变化,并通过对内皮素 1 及 ETR-A 蛋白表达的定位和定量研究,确切地反应出在体内皮细胞功能失调程度,以进一步探讨吸烟对脑血管的影响。

文献[3,4]报道内皮细胞的损伤是脑缺血性损害的早期病变和基本动因之一。美国和挪威的一项研究表明,即使是处在微量香烟烟雾环境下,亦可引起动脉内膜破坏。Vatter 等^[5]在对内皮细胞超微结构的研究中观察到,尼古丁损害内皮细胞的细胞器,除尼古丁外烟雾中尚含有亚硝酸胺、苯并芘、一氧化氮、一氧化碳及铬等有害物质及大量的氧自由基,这些有害物质均可直接损伤血管内皮细胞^[6]。本实验采用透射电镜观察吸烟大鼠内皮细胞超微结构发现,吸烟大鼠脑血管内皮细胞管腔面粗糙,细胞连接不紧密,细胞器空泡变性,基底膜间隙扩大,可见凋亡细胞。上述改变在长期大量吸烟组中最明显,短期大量吸烟组及长期小量吸烟组改变较长期大量吸烟组轻,戒烟组改变较其他吸烟组均轻。以上结果

表明,吸烟可致脑血管内皮细胞形态学改变。

内皮素 1 是由血管内皮细胞分泌的含有 21 个氨基酸残基的多肽,是体内最强的血管收缩物质。当血管内皮细胞受到理化损伤时其分泌增加,反之内皮素 1 的升高又可使内皮细胞受到破坏^[7]。周际^[8]发现吸烟可使人血浆内皮素 1 水平大幅度增加。内皮素 1 的增加可使脑血流量降至病理性低水平^[6],造成血管内皮细胞缺血及内皮细胞的损伤。同时内皮细胞损伤也可降低其对内皮素 1 的降解能力并可致拮抗机制的破坏,血管对内皮素 1 收缩作用的敏感性增强,损伤进一步加重,形成恶性循环。由此可见,内皮素 1 的升高程度反应血管内皮细胞的损伤程度。ETR-A 在脑组织中主要分布于血管内皮细胞,是内皮素 1 的特异性受体,其增高或降低可直接反应出内皮素 1 的上升或下调。本实验通过免疫组织化学染色观察到,吸烟大鼠内皮素 1 仅表达于大脑皮层的血管内皮细胞,且各吸烟组表达均明显高于正常对照组,同时用 Western 印迹法通过对 ETR-A 定量检测进一步证实了吸烟可致脑血管内皮细胞内皮素 1 表达上调,是吸烟导致脑血管损伤和形成脑血栓的途径之一。

大量研究发现动脉粥样硬化的发展速率与一个人过去吸烟时间及吸烟量成正比^[9-11]。Rochester 大

医学院的心脏病学家 Pearson 认为,戒烟后仍能引起具有某种连续性的动脉粥样硬化。而 Sneve 等^[12]认为吸烟对内皮细胞的消极作用在戒烟后的短期内开始迅速消除。本实验戒烟组内皮素 1 较短期大量吸烟组明显减少,超微结构接近正常,证明及时戒烟可逆转及减少血管损伤。

综上所述,香烟烟雾可引起血管内皮细胞损伤,戒烟对这种损伤有明显改善;内皮素 1 作为损伤因子可反应出内皮细胞损伤的程度,并在吸烟引起的损伤中起重要作用。

[参考文献]

- [1] Granström BW, Xu CB, Nilsson E, et al. Smoking particles enhance endothelin A and endothelin B receptor-mediated contractions by enhancing translation in rat bronchi [J]. *BMC Pulm Med*, 2006, **15** (6): 6.
- [2] Clausen HV, Larsen LG, Jørgensen A, et al. The human placenta from heavy smokers: evaluation of vasoactive peptides by immunohistochemistry [J]. *AP-MIS*, 2007, **115** (1): 22-29.
- [3] Iglarz M, Clozel M. Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2007, **50** (6): 621-628.
- [4] 柳忠兰, 孙大勇, 冯昱, 等. 吸烟鼠脑血管内皮细胞间粘附分子 1 的表达在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 392-394.
- [5] Vatter H, Konczalla J, Weidauer S, et al. Effect of delayed cerebral vasospasm on cerebrovascular endothelin A receptor expression and function [J]. *J Neurosurg*, 2007, **107** (1): 121-127.
- [6] Zimmerman M, McGeachie J. The effect of nicotine on aortic endothelium: a quantitative ultrastructural study [J]. *Atherosclerosis*, 1987, **63**: 33-36.
- [7] Wang JJ, Liu SM, Chen R, et al. A novel effect of lobeline on vascular smooth muscle cell: inhibition of proliferation induced by endothelin-1 [J]. *Pharmazie*, 2007, **62** (8): 620-624.
- [8] 周际. 吸烟对健康人和脑梗死患者血浆 ET 的影响[J]. *中国临床康复杂志*, 2003, **7** (22): 3 006-025.
- [9] Liu ZL, Feng Y, Liu SJ, et al. Effect of cigarette smoking on expression of P-selectin and E-selectin on cerebrovascular endothelial cells in rat's cerebral thrombosis [J]. *Chin J Mod Med*, 2005, **15** (1): 34-37.
- [10] Changes of brain endothelin levels and peripheral endothelin receptors by chronic cigarette smoke in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, **94** (3): 287-296.
- [11] 耿建红, 柳忠兰, 拱忠影, 等. 吸烟对短暂性脑缺血发作患者血清可溶性细胞间粘附分子 1 水平和脑血流动力学的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 55-57.
- [12] Sneve M, Jorde R. Cross-sectional study on the relationship between body mass index and smoking, and longitudinal changes in body mass index in relation to change in smoking status: the tromso study [J]. *Scand J Public Health*, 2008, **36** (4): 397-407.

(此文编辑 许雪梅)