

# 低切应力作用下体外培养动脉的内皮素表达

刘波<sup>1</sup>, 周瑾<sup>2</sup>, 刘艳春<sup>3</sup>, 滕海英<sup>4</sup>, 姜宗来<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院力学生物学与医学工程实验室, 上海 200030; 2. 第二军医大学生物化学教研室, 上海 200433;  
3. 第二军医大学解剖学教研室, 上海 200433; 4. 第二军医大学数理教研室, 上海 200433)

**摘要:** 研究了切应力对完整血管的生物学作用以及应力引起血管重建过程中内皮素 (ET) 的变化。采用血管体外应力培养系统, 将一段完整的猪颈总动脉在体外进行培养, 设切应力分别为 2 Pa ( $S_{20}$  组) 和 0.5 Pa ( $S_5$  组), 设置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 h 共 9 个时相观察点, 非平衡法放射免疫检测灌流液中的 ET 含量。通过 Logistic 曲线方程拟合, 分析切应力作用下完整动脉 ET 表达变化规律。结果显示:  $S_{20}$  组 ET 总体变化不明显;  $S_5$  组分泌速率在前 12.37 h 内明显上升, 而后又逐渐下降趋于稳定, 且始终高于  $S_{20}$  组。说明低切应力作用下 ET 的表达及分泌增高。结果提示, 在低切应力引起的血管重建中, ET 可能起着重要作用。

**关键词:** 切应力; 颈总动脉; 血管内皮细胞; 内皮素

**中图分类号:** R318.01; R329.27

## 1 引言

血管重建 (remodeling) 是机体生长、发育、衰老和疾病等过程中, 血管为适应体内外环境的变化而发生的形态结构和功能的改变。探讨“应力-生物学效应 (血管活性物质变化)-血管重建”这一过程的奥秘, 是当今血管力学生物学 (mechanobiology) 研究的热点。

内皮素 (endothelin, ET) 主要由内皮细胞 (endothelial cell, EC) 合成分泌, 是强烈长效的血管收缩剂, 同时也是促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 分裂和增殖的多肽。Yanigisawa 等<sup>[1]</sup>1989 年首次报道, 流体作用可使 ET-1 mRNA 和肽水平发生变化; 有研究通过 DNA 转染实验证明 ET-1 基因具有切应力反应元件 (shear stress response element, SSRE) 类似结构, 位于 5' 上游区的 -2.5 至 -2.9 kb 之间, 能感受切应力变化并做出反应。关于切应力对 EC 内皮素代谢的影响, 虽然已有不少报道, 但这些研究主要集中在培养的 EC, 且报道的 ET 变化趋势各不相同, 没有形成较为统一的意见, 这些差异可能与研究所选用的实验模型、应力大小、作用时间长短有关, 亦有可能与培养的 EC 缺少完整血管壁细胞之间固有的结构层次及功能的相互关系有关<sup>[2,3]</sup>。单纯切应力作用条件下完整血管组织的 ET 表达及分泌状态仍不清楚。

本文所用血管应力培养系统可以较精确地人为

控制应力条件。将一段完整的血管在体外施加不同大小的切应力进行培养, 使其既保存 EC-VSMC 及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 间的结构层次关系, 血管壁细胞更接近于在体状态, 同时消除了神经体液因素对血管活动的影响<sup>[4]</sup>。以此探讨低切应力作用下完整动脉的内皮素表达及分泌变化, 并采用数学拟合较为精确地描述其变化规律, 为血管疾病的发病机理及血管组织工程学等研究提供一些力学生物学基础资料。

## 2 材料与方法

采用我们建立的血管应力培养系统进行体外动脉培养。该系统包括 3 个部分: 1) 血管培养腔; 2) 应力及其调控装置; 3) 温度及 pH 值控制装置 (图 1)。

动脉培养方法如下<sup>[4-6]</sup>: 取分支较少的成年雄性金华猪的颈总动脉, 长度为 3~7 cm, 标记流入端, 记录在体长度。在 0~4°C D-Hanks 液中快速去除血管周围组织, D-Hanks 液清洗 3 遍, 固定于血管培养腔内, 拉伸至在体长度, 腔内加 200 ml 培养液 (DMEM+10% 新生牛血清), 管道内加

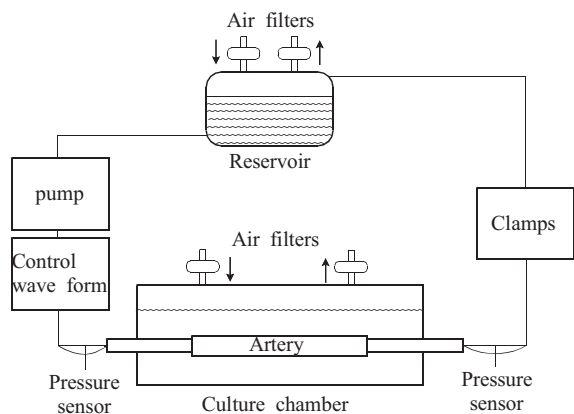
收稿日期: 2004-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10132020; 30100060)

通讯作者: 姜宗来, 电话: (021)54749053,

E-mail: zjiang@sjtu.edu.cn

50 ml 灌流液 [DMEM+10%新生牛血清 +10%葡聚糖 (分子量 6 万), 粘度 4 cP]。系统压力通过后阻力装置调节, 切应力通过流量来调节至所需大小 (实验前定标)。隔天换半量培养液与灌流液, 液体 pH 值的恒定以二元混合气 (5% CO<sub>2</sub>+95%空气) 维持。



**Fig.1** The sketch of artery organ-culture system under shear stress *in vitro*, the reservoir and artery chamber were put in 37°C incubator

调节血管培养系统的压力为稳定的  $1.33 \times 10^4$  Pa, 通过调节系统内液体流量设定切应力分别为 2 Pa (S<sub>20</sub> 组, 中等大小切应力, 对应的流量为 200 ml/min, n=5) 与 0.5 Pa (S<sub>5</sub> 组, 低切应力, 对应的流量为 50 ml/min, n=5), 按培养时间, 设置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 h 共 9 个观察点。每次取贮液池内的灌流液 100 μl 进行测试, 取样后均再注入 100 μl 灌流液, 以维持循环内液体总量不变。所取灌流液加入抑肽酶与 EDTA 二钠, 编号后置于 -70°C 冰箱保存。样品收集齐后进行非平衡法 (内皮素放免检测试剂盒, 解放军总医院东亚免疫技术研究所) 放射免疫检测标本中的 ET 含量。

将放射管按表 1 中的顺序编号: 总放射管 (T) 1, 空白管 (NSB) 2, 零标准管 (S<sub>0</sub>) 3, 标准管 (S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub>) 4~8, 非特异结合管 (U<sub>0</sub>) 9, 样本管 (U) 10~91。按试剂盒使用说明书的步骤加完试剂后, 震荡均匀, 3 500 r/min 离心 25 min, 弃上清液, 用沉淀作放免测定。具体加样程序如下:

**Table 1** Process of radio-immunity method of ET

	T	NSB	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub> ~S <sub>5</sub>	U <sub>0</sub>	U
Test Tube (μl)	1	2	3	4~8	9	10~91
Buffer (μl)	—	200	100	—	100	—
Standard (μl)	—	—	—	100	—	—
Sample (μl)	—	—	—	—	100	100
Antibody (μl)	—	—	100	100	—	100
Mix up and then keep in 4°C for 24 h statically						
<sup>125</sup> I -ET (μl)	100	100	100	100	100	100
Mix up and then keep in 4°C for 12 h statically						
PR reagent (μl)	—	500	500	500	500	500
Mix up and keep in room temperature for 20 min statically, then centrifugate for 25 min at 3 500 r/min.						
Test the CPM of the deposition						

将自动 γ 计数器预先编制程序, 直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

取样后于  $1.33 \times 10^4$  Pa 的压力下将血管在 10% 中性福尔马林中固定, 常规石蜡横切切片 (6 μm), HE 染色, 每条血管取 5 张切片, 光镜下用计算机图像分析处理系统 (CA6300 图像分析系统软件, 中国科学院自动化技术研究所) 在血管横切面上测量血管的内直径<sup>[5]</sup>。以未经培养的新鲜血管作为对照, 观察在较短时间内体外培养动脉管径的变化, 以检验血管培养过程中切应力是否有变

化。

所得数据进行统计处理, 组与组之间用 *t*- 检验。

参照类似文献[7]的方法并加以变换, 忽略每次取样对累积浓度的影响, 将所测浓度换算为单位面积血管的 ET 分泌量 (pg/cm<sup>2</sup>)。血管内表面积 = 血管在体长度 × πD, 式中 D 为血管内直径, 对单位面积血管 ET 累积分泌量随切应力作用时间变化的测定值拟合为 Logistic 曲线方程, 并对这些方程进行一阶微分, 即得分泌速率 (production rate,

$\text{pg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) 方程。

### 3 结 果

#### 3.1 动脉培养过程切应力水平的检验

图像分析系统测量结果显示, 与新鲜血管对照相比, 经 18 h 施加应力培养后,  $S_5$  组血管内径数值略有减小, 但无统计学差异 ( $P>0.05$ );  $S_{20}$  组也无明显差异 ( $P>0.05$ )。

根据切应力计算公式计算平均切应力:

$$\tau=4\mu Q/\pi R^3$$

其中  $\mu$  为液体粘度、 $Q$  为平均流量,  $R$  为血管半径。

可以看出,  $S_{20}$  与  $S_5$  组动脉在 18 h 体外培养过程中, 其切应力基本保持不变, 分别维持在中等切应力与低切应力水平 (表 2)。

**Table 2** Inner diameter and shear stress of cultured artery after 18 h ( $n=5$ )

	Control group	$S_{20}$ group	$S_5$ group
Inner diameter (mm)	$4.06\pm 0.24$	$4.11\pm 0.33$	$3.93\pm 0.28$
Shear stress (Pa)	$2.03\pm 0.32$	$1.96\pm 0.31$	$0.56\pm 0.08$

#### 3.2 切应力作用下动脉的 ET 分泌速率

本文以切应力作用下动脉的 ET 分泌速率表示 ET 表达及分泌的水平。放射免疫检测结果显示, 各组样品的初始浓度均在检测限 (20  $\text{pg/mL}$ ) 以上。图 2 为 ET 累积分泌量曲线, 表示 ET 累积分泌量与切应力作用时间的关系。图 3 为 ET 分泌速率曲线, 直观地反映出 ET 分泌率与切应力作用时间变化的关系。

下面是拟合的 Logistic 曲线方程:

$$S_5: Y=3371.71/(1+e^{1.5559-0.12577T}) \quad R^2 \text{ 值: } 0.9984$$

$$S_{20}: Y=1901.90/(1+e^{1.0059-0.11407T}) \quad R^2 \text{ 值: } 0.9980$$

ET 分泌速率方程为:

$$S_5: Y=423.89e^{1.5559-0.12577T}/(1+e^{1.5559-0.12577T})^2$$

$$S_{20}: Y=216.76e^{1.0059-0.11407T}/(1+e^{1.0059-0.11407T})^2$$

ET 分泌速率曲线的极值点出现在:

$$S_5: T=12.37 \text{ (h)} \quad S_{20}: T=8.83 \text{ (h)}$$

ET 最大分泌速率为:

$$S_5: V_{\max}=105.97 \text{ (pg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$$

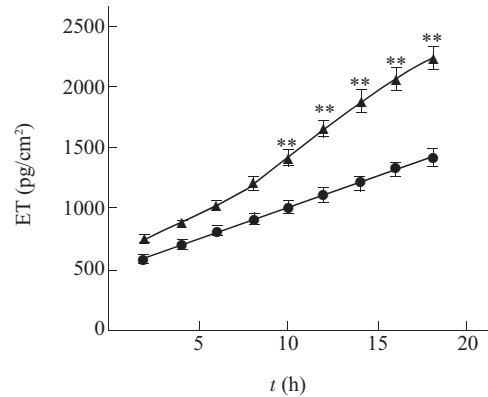
$$S_{20}: V_{\max}=54.19 \text{ (pg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$$

结果显示, 在 0.5 Pa 的低切应力作用下, ET 分泌速率呈上升趋势, 至 12.37 h 左右达到峰值, 而后又逐渐下降, 然后趋于稳定; 而 2 Pa 的中等

切应力作用, ET 分泌速率略有上升趋势, 8.83 h 后略有下降, 但总体变化不明显。如果以线性方程拟合  $S_{20}$  组的数据, 其方程为:

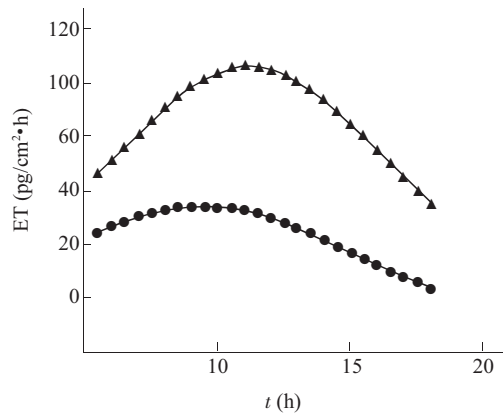
$$Y=51.534T+494.04$$

$R^2$  值为 0.9989, 高于以 Logistic 曲线方程进行拟合的  $R^2$  值, 故也可认为 2 Pa 的中等切应力作用下, ET 分泌以 51.534 ( $\text{pg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) 的稳定速率进行。



**Fig.2** Accumulative quantity of excretive ET under shear stress, show that it was higher in  $S_5$  group than in  $S_{20}$  group all the time. (\*\* $P<0.01$   $S_5$  vs  $S_{20}$ ,  $n=5$ ).

—▲—:  $S_5$ ; —●—:  $S_{20}$



**Fig.3** Production rate of ET under shear stress. It didn't change obviously in  $S_{20}$  group, while in  $S_5$  group it rised evidently at the first 12 h, then descend to a stable level which was higher than  $S_{20}$  group all the time. —▲—:  $S_5$ ; —●—:  $S_{20}$

### 4 讨 论

ET 主要由 EC 合成并释放, 现有研究表明, VSMC 也能表达 ET<sup>[8]</sup>. ET 与心血管疾病、肾病、神经系统、消化系统疾病甚至妇产科疾病的发生发

展均有密切关系。血液动力学因素是影响血管 EC 合成与分泌 ET 的重要因素之一, 切应力对 ET 代谢影响的研究已有不少报道, 但是这方面的研究主要集中于培养细胞模型。经过原代培养的 EC 长时间处于无外加力学因素作用状态, 在形态与功能上与在体情况有很大的不同, 再施切应力, 即使是正常生理水平大小的切应力, 对培养的 EC 也是一种强烈刺激, 不能反映其生理状态下的变化。在体状态下完整血管的 EC 受到持续的正常生理水平的切应力作用, 其 ET 的表达及分泌与细胞模型有何区别, 目前尚未见报道。

生理状态下, 大动脉所承受的切应力为  $1 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ N}$ , 周围动脉为  $2 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-4} \text{ N}$ <sup>[9,10]</sup>, 故本文采用猪颈总动脉进行完整血管体外应力培养, 以  $2 \text{ Pa}$  ( $2 \times 10^{-4} \text{ N}$ ) 作为中等大小切应力, 在控制压力为稳定的  $1.33 \times 10^{-4} \text{ Pa}$  条件下, 改变切应力的大小, 避免了压力改变带来的影响, 可以较为准确地讨论单纯切应力作用条件下引起的血管重建<sup>[4-6]</sup>。本文结果显示,  $0.5 \text{ Pa}$  低切应力作用下, ET 分泌速率在短时间内上升, 后虽又明显下降, 但始终高于正常切应力组。结果表明,  $0.5 \text{ Pa}$  的低切应力对动脉表达及分泌 ET 具有明显的促进作用。而在  $2 \text{ Pa}$  的中等强度切应力作用下, 动脉表达及分泌 ET 以较为均匀的速率进行, 此结果可能反映了在体正常生理条件下 ET 的分泌规律。

在  $0.5 \text{ Pa}$  低切应力作用下, 完整血管的 ET 分泌速率呈这种先上升后下降的趋势, 与运用同样大小的切应力作用于单独培养的 EC 的分泌速率曲线相似<sup>[6]</sup>, 完整血管 ET 的最大速率点出现在  $12.3 \text{ h}$  左右, 比细胞培养模型延迟约  $1.6 \text{ h}$ 。这种延迟的原因可能在于: 1) 动物种属不同。本文采用的是猪的颈总动脉, 可能与其他动物有不同的变化趋势; 2) 所用模型的不同。细胞培养模型中, 细胞的生理状态与在体状况有很大的区别。本文采用的是完整血管培养模型, VSMC 以及 ECM 等的存在可能在一定的程度及环节上抑制了 ET 的释放, 也反映了完整血管比分离的细胞具有更强的抵御环境改变的能力; 3) 应力条件的不同。不同部位的血管, 形态结构有所区别, 其生理条件下的应力状况也各不相同。对同一动物个体而言, 对不同部位、不同类型血管施以同样大小的应力, 其反应也不尽相同。正常大小的切应力对 ET 的表达及分泌的影响似乎并不明显, 血管以较为均匀的速率分泌 ET。这种区别的原因也可能在于完整血管与离体细胞的

差异, 说明 ET 的表达及分泌可能与血管结构的完整性、细胞或者 ECM 间的相互联系等影响有关。

ET 是目前发现的最强的内皮源性缩血管活性肽, 能够强烈地收缩动脉, 刺激心钠素的释放, 抑制肾上腺素释放, 提高全身血压, 并具有类似生长因子的作用, 可激活 c-fos、c-myc 等原癌基因的表达, 促进血管平滑肌细胞增殖, 在高血压等血管病变过程中起着重要作用。本文结果表明, 低切应力对动脉 ET 的表达及分泌具有明显的促进作用, 提示在低切应力诱导的血管重建中 ET 可能起重要作用。

### 参考文献:

- [1] Yanagisawa N, Inoue A, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989,13,supply 5:s13-s17
- [2] Wang GX, Cai SX, Wang PQ, Ouyang KQ, Wang YL, Xu SR. Shear-induced changes in endothelin-1 secretion of microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 2002,63(2): 209-217
- [3] Masatsugu K, Itoh H, Chun TH, Saito T, Yamashita J, Doi K. Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stress. *Regul Peptides*, 2003,111(1-3):13-19
- [4] 刘波, 姜宗来, 张炎, 刘艳春, 覃开荣, 杨向群. 血管体外应力培养系统: 一种新的血管生物力学实验模型. *医用生物力学*, 2001,6(4):225-230
- [5] 刘波, 姜宗来, 严志强, 刘艳春, 张炎, 张峰, 李玉泉. 低切应力对体外培养动脉形态学重建的影响. *解剖学报*, 2004,72(3):297-301
- [6] 刘艳春, 刘波, 张炎, 姜宗来. 低切应力对体外培养血管中膜平滑肌细胞原癌基因 c-Fos 和 c-Myc 表达的影响. *生物物理学报*, 2004,20(6):434-437
- [7] 王贵学, 罗向东, 蔡绍哲, 欧阳克清, 王远亮, 吴云鹏. 内皮细胞代谢与剪切作用时间的相关性. *生物物理学报*, 1999, 15(2):407-413
- [8] Sugo S, Minamino N, Shoji H, Isumi Y, Nakao K, Kangawa K, Matsuo H. Regulation of endothelin-1 production in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001,37(1):25-40
- [9] Davies PF, Ganz P, Diehl PS. Methods in laboratory investigation: reversible microcarrier mediated junctional communication between endothelial and smooth muscle cell monolayers: an *in vitro* model of vascular cell interactions. *Lab Invest*, 1985,53(6):710-718
- [10] Nerem RM, Alexander RW, Chappell DC, Medford RM, Varner SE, Taylor WR. The study of the influence of flow on vascular endothelial biology. *Am J Med Sci*, 1998,316(3): 169-175

## EXPRESSION OF ENDOTHELIN IN ORGAN-CULTURED ARTERY UNDER LOW SHEAR STRESS

LIU Bo<sup>1</sup>, ZHOU Jin<sup>2</sup>, LIU Yan-chun<sup>3</sup>, Teng Hai-yin<sup>4</sup>, Jiang Zong-lai<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Medicine,  
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200433, China;

2. Department of Biochemistry, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

3. Department of Anatomy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

4. Department of Mathematics and Physics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** The biological effect of shear stress on intact artery and the change of Endothelin (ET) during the stress-induced vascular remodeling was studied. The common carotid arteries of pigs were cultured with a artery organ-culture system under different shear stress, 0.5 and 2 Pa respectively,  $1.33 \times 10^{-4}$  Pa of pressure and stable flow *in vitro*. Cultured for 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 h, the content of ET in the perfusate was examined with radio-immunity method, and the data were described by Logistic equation. The secretion velocity of ET didn't change obviously in S<sub>20</sub> group, while in S<sub>5</sub> group it rised evidently at the first 12 h and then descend to a stable level which was higher than S<sub>20</sub> group all the time. The secretion and expression of ET rised under low shear stress. It may play an important role in vascular remodeling induced by low shear stress.

**Key Words:** Shear stress; Common carotid artery; Endothelial cell; Endothelin