

# 吡咯野百合碱对培养的肺及主动脉内皮细胞形态, 数量及一氧化氮产生的影响

承伟<sup>1\*</sup>, 李智<sup>2</sup>, 小山澈野<sup>3</sup>, 大池正宏<sup>3</sup>, 伊东裕之<sup>3</sup>

(1. 锦州医学院药理学系, 辽宁 锦州 121001; 2. 中国医科大学药理学教研室, 辽宁 沈阳 110001;

3. 九州大学医学院药理学教研室, 福冈 812-8582, 日本)

**摘要** 吡咯野百合碱(MCTP)注射是建立肺动脉高压病理模型的常用方法, 但机理不清。实验采用细胞培养方法和 DAF-2 荧光法观察了 MCTP 对培养的牛肺动脉内皮细胞(CPAE)形态、数量及 NO 产生的影响, 以探讨 MCTP 导致肺动脉高压的机理。结果表明: MCTP ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 使培养的 CPAE 表面积增大 [从  $(46 \pm 4) \mu\text{m}^2$  增加到  $(223 \pm 27) \mu\text{m}^2$ ]; 细胞数量减少 [从  $(175 \pm 9) \times 10^6 \text{L}^{-1}$  减少到  $(49 \pm 6) \times 10^6 \text{L}^{-1}$ ]; 在 CPAE 和牛主动脉内皮细胞, MCTP 还可抑制由 ACh 所致的 NO 生成 [分别从  $(16.1 \pm 1.3)\%$  减少到  $(1.5 \pm 1.1)\%$  和从  $(14.2 \pm 1.6)\%$  减少到  $(1.4 \pm 1.6)\%$ ]。提示 MCTP 可通过损伤 CPAE, 减少 NO 的生成而导致肺动脉高压。

**关键词**: 野百合碱; 一氧化氮; 肌, 平滑, 血管; 细胞, 内皮; 细胞, 培养的

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)03-0169-03

野百合碱(monocrotaline, MCT)是从植物美丽猪屎豆(*Crotalaria spectabilis*)叶中分离的吡咯双烷生物碱<sup>[1]</sup>, 吡咯野百合碱(monocrotaline pyrrole, MCTP)是 MCT 的不稳定的代谢产物<sup>[2]</sup>。MCTP iv 是建立肺动脉高压病理模型的常用方法。本文研究 MCTP 对培养的牛肺动脉内皮细胞(calf pulmonary artery endothelial cells, CPAE)形态和数量及对 CPAE 和牛主动脉内皮细胞(bovine aorta endothelial cells, BAEC)一氧化

氮(nitric oxide, NO)产生的影响以探讨其导致肺动脉高压的原因。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

CPAE 和 BAEC 购自 American Type Culture Collection。采用文献[3]方法, 使用改良的 Eagle 培养基(DMEM)和 10% 的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养 CPAE 及 BAEC, MCTP 组在开始培养时加入相应浓度的 MCTP, 培养后 d 7 进行实验。

### 1.2 细胞面积和细胞数量的测定

培养的 CPAE 用 CCD 摄像机记录后, 存于电脑中, 采用电脑图像分析软件(Adobe Photoshop, USA)测量细胞面积, 用细胞计数器计算细胞数。

### 1.3 细胞内生成一氧化氮的测定

培养 6 d 后的 CPAE 及 BAEC 与 NO 敏感性荧光材料——二乙酰二氨基荧光素(DAF-2/DA, Daiichi Pure Chemicals, Co. Ltd, Tokyo, Japan)在室温和 37°C 条件下各温育 20 min。仪器: 数字荧光显微系统(Atto, Rockville, MD, USA)。用 490 nm 和 515 nm 荧光刺激 DAF-2。DAF-2 具有单兴奋发射波长, 无法将 DAF-2 荧光值换算成实际 NO 浓度, 但 DAF-2 荧光值的增加与 NO 浓度呈线性关系<sup>[4]</sup>, 实验采用与基础 DAF-2 荧光强度比较的方法, 可表示细胞内 NO 的生成的改变, 其计算公式同测细胞内钙公式。

### 1.4 试剂和溶液

MCTP, ACh 购自 Sigma。改良 Krebs 溶液的组成 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 132.4, KCl 5.9, MgCl<sub>2</sub> 1.2, 葡萄糖 11.5, HEPES 11.5, 用 NaOH 将 pH 调至 7.4, 无钙 Krebs 溶液用  $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EGTA 替换 CaCl<sub>2</sub>。

### 1.5 统计学处理

数据用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用成组 *t* 检验作显著性检验。

收稿日期 2000-06-16 接受日期 2001-01-11

基金项目 国家留学基金委和国家自然科学基金资助项目(39870891)

作者简介: 承伟(1958-)男, 辽宁省锦州市人, 副教授, 硕士, 主要从事心肺血管药理学研究。

\* 联系作者: Tel (0416) 2553801, Fax (0416) 2553807

## 2 结果

### 2.1 吡咯野百合碱对培养的牛肺动脉内皮细胞面积和数量的影响

实验分为对照组与 MCTP 组 培养 6 d 后测量细胞面积和数量. MCTP ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 使培养的 CPAE 表面积增大, 对照组 ( $46 \pm 4$ )  $\mu\text{m}^2$ , MCTP 组 ( $223 \pm 27$ )  $\mu\text{m}^2$ , 细胞数量减少, 对照组 ( $175 \pm 9$ )  $\times 10^6 \text{L}^{-1}$ , MCTP 组 ( $49 \pm 6$ )  $\times 10^6 \text{L}^{-1}$ , 两者在统计学上均有明显差异 (图 1).

### 2.2 吡咯野百合碱对乙酰胆碱所致一氧化氮生成的影响

实验分为对照组与 MCTP 组, 后者于培养液中加入 MCTP ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 培养 6 d 后开始实验. 上述二组培养 6 d 后的细胞给予一氧化氮合酶 (NOS) 激动剂 ACh ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 后, 对照组及 MCTP 组 CPAE 的 DAF-2 荧光值均增加, 30 min 达高峰, 说明 NO 产生增多. 但 MCTP 组的 DAF-2 荧光值的增加明显小于对照组. 对照组与给予 ACh 前相比增加 ( $16.1 \pm 1.3$ )%, MCTP 组与给予 ACh 前相比增加 ( $1.5 \pm 1.1$ )%. MCTP 对培养的 BAEC 也有同样作用, 对照组与给予 ACh 前相比 DAF-2 荧光值增加 ( $14.2 \pm 1.6$ )%, MCTP 组与给予 ACh 前相比 DAF-2 荧光仅增加 ( $1.4 \pm 1.6$ )%, 两者在统计学上均有明显差异 (表 1).

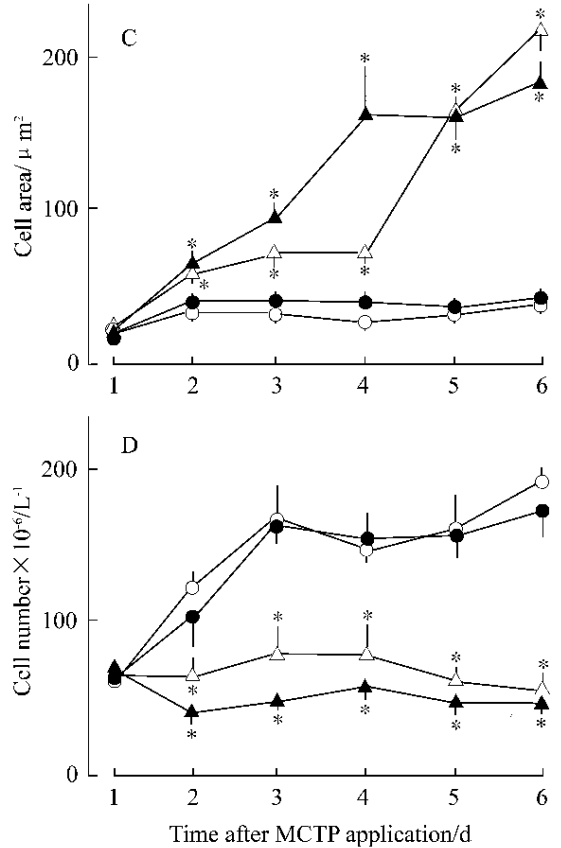
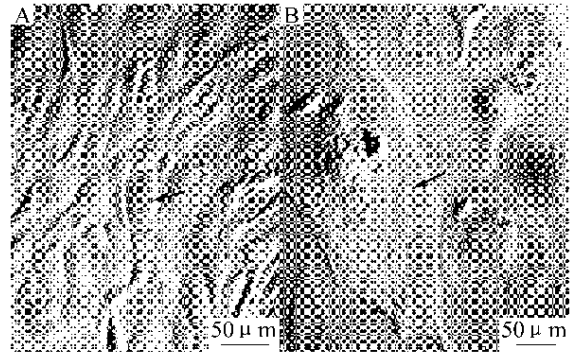
**Tab 1. Effects of MCTP on the production of nitric oxide (NO) induced by acetylcholine (ACh) in CPAE and BAEC**

Group	Value of DAF-2 fluorescence		Changes of the value
	Before ACh	After ACh	
Control (CPAE)	1378 ± 106	1681 ± 119**	282 ± 59
MCTP (CPAE)	1321 ± 99	1339 ± 107	18 ± 6###
Control (BAEC)	1359 ± 112	1545 ± 113*	186 ± 51
MCTP (BAEC)	1325 ± 121	1343 ± 118	16 ± 7###

BAEC: bovine aorta endothelial cells. MCTP ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treated for 6 d then ACh ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was added for 30 min.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with corresponding before ACh; ###  $P < 0.001$ , compared with corresponding control.

## 3 讨论

目前在肺动脉高压的研究中, 多用 MCTP iv 方法建立病理模型. 由于应用低压氧舱方法或利用自



**Fig 1. Effects of monocrotaline pyrrole (MCTP) on cell number and cell surface area of calf pulmonary artery endothelial cells (CPAE).** A and B are the photographs of CPAE cell surface area treated (A) without or (B) with MCTP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Arrow shows the cell surfaces area. C and D, CPAE cells were treated with MCTP for 6 d. (○) control (without MCTP); (●) (△) (▲): MCTP 0.1, 1 and  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$ , compared with corresponding control.

然缺氧环境建立肺动脉高压病理模型费用较高, 难以满足对肺动脉高压的研究需求. 现多采用 MCTP

注射方法建立此种模型。MCTP可与血管内皮细胞DNA形成交叉联结,抑制细胞增殖,导致细胞停留在G<sub>2</sub>期与M期,而使细胞变大变少。MCTP还可使内皮细胞乳酸脱氢酶及前列环素等炎性介质的释放增多,血管渗出、水肿及血栓形成,而导致肺动脉高压。MCTP(10 μmol·L<sup>-1</sup>)可使BAEC表面积平均扩大7倍,使其数量平均减少10倍,并具有剂量依赖性关系。本实验结果与这一研究结果基本一致;实验观察了MCTP对CPAE形态和数量的影响,并取得了与BAEC一致的结果。实验还证明MCTP可抑制CPAE及BAEC由NOS激动剂ACh所致的NO生成,这一结果此前未见文献报道。血管内皮细胞产生的NO是重要的血管舒张因子,对血压的调节具有重要的意义<sup>[6]</sup>。实验结果提示:MCTP可通过抑制CPAE的NO的生成,使肺动脉收缩,加速肺动脉高压的形成。此种作用是直接的,还是由于MCTP抑制细胞增殖损伤血管内皮细胞间接引起的还有待证实。

#### 4 参考文献:

- [1] Adams R, Rodgers EF. The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *retusa*[J]. *J Am Chem Soc*, 1939, **61**: 2815 - 2819.
- [2] Mattocks AR. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids[J]. *Nature*, 1968, **217**(130): 723 - 728.
- [3] Chamley JH, Campbell GR, McConnell JD, Groschel-Stewart U. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and subculture[J]. *Cell Tissue Res*, 1977, **177**(4): 503 - 522.
- [4] Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluorescein[J]. *Anal Chem*, 1998, **70**(13): 2446 - 2453.
- [5] Reindel JF, Roth. The effect of monocrotaline pyrrole on cultured bovine pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells[J]. *Am J Pathol*, 1991, **138**(3): 707 - 719.
- [6] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. *Pharmacol Rev*, 1991, **43**(2): 109 - 142.

## Effects of monocrotaline pyrrole on morphology, number and production of nitric oxide of cultured artery endothelial cells

CHENG Wei<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>2</sup>, KOYAMA Tetsuya<sup>3</sup>, OIKE Masahiro<sup>3</sup>, ITO Yushi<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China; 2. Department of Pharmacology, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan)

**Abstract:** Experimental model of pulmonary hypertension has been created by exposing animals to monocrotaline pyrrole (MCTP), but the cause of pulmonary hypertension induced by MCTP is still controversial. In this study, cell culture and DAF-2 fluorescence technique were used to investigate the effects of MCTP on cell surface area, cell number and production of nitric oxide (NO) in cultured calf pulmonary artery endothelial cells (CPAE) and bovine aorta endothelial cells (BAEC). MCTP induced the cell enlargement from (46 ± 4) to (223 ± 27) μm<sup>2</sup> and decreased the number of cells from (175 ± 9) × 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> to (49 ± 6) × 10<sup>6</sup> L<sup>-1</sup> in CPAE. Acetylcholine induced production of NO, measured by DAF-2,

was decreased significantly from (16.1 ± 1.3)% to (1.5 ± 1.1)% and from (14.2 ± 1.6)% to (1.4 ± 1.6)% in CPAE and BAEC, respectively. The results indicate that MCTP may damage endothelial cells and inhibit NO production, which maybe another pathogenesis of MCTP induced pulmonary hypertension.

**Key words:** monocrotaline; nitric oxide; muscle, smooth, vascular; cells, endothelial; cells, cultured

**Foundation item:** The project supported by National Overseas Scholarship Foundation and National Natural Science Foundation of China (39870891)