

研究论文

腹膜淋巴孔与淋巴转归 NO-cGMP-Ca²⁺ 信号转导途径研究

李燕园, 李继承*

浙江大学细胞生物学研究所淋巴学研究室, 杭州 310031

摘要: 为研究一氧化氮(nitric oxide, NO)调节大鼠腹膜淋巴孔和淋巴吸收的细胞内信号转导机制, 在体外培养的间皮细胞上, 利用 cGMP 检测试剂盒和激光共聚焦扫描显微镜, 研究 NO 对间皮细胞内 cGMP 和游离钙离子浓度([Ca²⁺]_i)的影响; 并利用动物实验研究 NO-cGMP-Ca²⁺ 通路对大鼠腹膜淋巴孔和淋巴吸收的影响。结果发现: (1)与对照组相比, NO 供体 Sper/NO (spermine/nitric oxide complex)可以剂量依赖性地升高间皮细胞内 cGMP 的浓度($P<0.01$)。此作用可被可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)特异性抑制剂 1H-[1,2,4]噁二唑[4,3-a]喹啉-1-one 酮(1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one, ODQ)阻断($P<0.05$, $P<0.01$)。Sper/NO 可使间皮细胞内[Ca²⁺]_i 相对水平降低($P<0.05$), 但此效应可被 ODQ 阻断; L-型电压依赖性钙通道阻滞剂 nifedipine, 可使细胞内的[Ca²⁺]_i 在短时间内迅速明显下降($P<0.05$), 达平衡后再加入 Sper/NO 并不能引起[Ca²⁺]_i 的进一步改变($P>0.05$); (2) NO 可以剂量依赖性地提高大鼠膈组织淋巴孔最大分布面积($P<0.01$) 和对示踪剂的吸收量($P<0.05$), ODQ 可明显抑制 NO 引起的淋巴孔和淋巴吸收的改变($P<0.01$)。该结果首次发现 nifedipine 能显著增加淋巴孔最大分布面积($P<0.01$)及膈组织对台盼蓝的吸收量($P<0.05$), 而且 nifedipine 预处理后 Sper/NO 并不能使淋巴孔的淋巴吸收进一步升高 ($P>0.05$)。结果提示, NO 可以通过降低 cGMP 水平降低大鼠腹膜间皮[Ca²⁺]_i, 且此过程和 L-型电压依赖性钙通道有关; NO 可通过 NO-cGMP-[Ca²⁺]_i 通路, 促进淋巴孔的开放和吸收。

关键词: 淋巴孔; 信号转导; 间皮细胞; 一氧化氮; 大鼠

学科分类号: Q55

Effects of nitric oxide on peritoneal lymphatic stomata and lymph drainage via NO-cGMP-Ca²⁺ pathway

LI Yan-Yuan, LI Ji-Cheng*

Department of Lymphology, Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China

Abstract: To study the cell signal transduction mechanism of nitric oxide (NO) on the peritoneal lymphatic stomata and lymph drainage in the rat, cGMP content were measured by a commercially available radioimmunoassay kit, and the [Ca²⁺]_i were observed by a confocal laser scanning microscope in the cultured peritoneal mesothelial cell. Animal experiment was practiced to study the effect of NO-cGMP-Ca²⁺ pathway on the lymphatic stomata and lymph absorption. The results showed that: (1) Sper/NO increased cGMP of the rat peritoneal mesothelial cell (RPMC) in a dose-dependent manner ($P<0.01$) compared to the control group. This effect was blocked by 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) ($P<0.05$), a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase (sGC). The level of [Ca²⁺]_i in single RPMC decreased by adding Sper/NO ($P<0.05$). Pretreatment with ODQ for 10 min blocked the Sper/NO-induced decrease in [Ca²⁺]_i. L-typed calcium channel blocker nifedipine induced an immediate and marked decrease in [Ca²⁺]_i ($P<0.05$). After [Ca²⁺]_i reached a balance again, adding Sper/NO could not change [Ca²⁺]_i ($P>0.05$). (2) Sper/NO increased the area of the stomata ($P<0.01$) and the quantity of the tracer in a dose-dependent manner ($P<0.05$) compared to the control group. Pretreatment with ODQ significantly inhibited Sper/NO-induced change of lymphatic stomata and lymph drainage ($P<0.01$). Nifedipine increased the opening area of the lymphatic stomata ($P<0.01$) and the concentration of absorbed trypan blue of the diaphragm ($P<0.05$). Sper/NO could not make a further change in the samples pretreated by nifedipine ($P>0.05$). The results indicate that NO can decrease [Ca²⁺]_i in the RPMC

Received 2004-06-03 Accepted 2004-07-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371815)

* Corresponding author. Tel: +86-571-87217451; Fax: +86-571-87217145; E-mail: lijichen@zju.edu.cn

through the NO-cGMP pathway. This procession is related with the L-type voltage-gated Ca^{2+} channel. NO enlarges the opening area of the lymphatic stomata and enhances the lymph drainage of tracer by NO-cGMP- $[Ca^{2+}]_i$ pathway.

Key words: lymphatic stomata; signal transduction; mesothelial cell; nitric oxide; rat

在1863年, von Recklinghausen 首先发现了小鼠腹膜表面间皮细胞之间的连接处存在小孔, 并将其命名为腹膜淋巴孔(the peritoneal lymphatic stomata)^[1]。Tsilibary 和Wissig (1977)^[2]等首先在电子显微镜下证实了小鼠膈腹膜淋巴孔。1991年Li 和Yu^[3]首先发现和报道人腹膜淋巴孔, 并认为腹膜淋巴孔是腹膜下毛细淋巴管在腹膜间皮细胞之间的开口处。淋巴孔具有主动的物质吸收作用, 液体、颗粒样物质和细胞成分均可被淋巴孔吸收。所以, 淋巴孔是腹膜腔内物质转归的最重要通道, 也是肝硬化腹水转归的主要途径^[4-6]。

在构成腹膜淋巴孔的间皮细胞内, 有许多成束状的肌动蛋白微丝^[7], 这些微丝具有收缩功能, 是淋巴孔可调控性的结构基础。NO、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管紧张素 II (angiotensin II) 和一些用于肝硬化腹水治疗的中药能使淋巴孔开放数量增多, 孔径增大^[8,9]。

李继承等的研究表明, 中药治疗腹水, 促腹水转归机制是中药诱导机体产生内源性NO, 舒张淋巴孔, 促进淋巴孔引流腹水。这种作用可被NOS抑制剂(N^G -单甲基-L-精氨酸, L-NMMA)抑制, 使内源性NO的舒张淋巴孔作用逆转^[9,10]。我们也发现, NO可以调控胸膜淋巴孔, 促淋巴转归^[11]。然而, 迄今为止有关NO淋巴孔调控机制仍未阐明。

NO是细胞间信息传递的重要调节因子, 能激活各种靶分子, 包括可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)、细胞色素P450、蛋白激酶和磷酸酶等。其中通过激活其受体蛋白sGC升高cGMP水平是NO许多生理功能的主要信号转导机制, 而cGMP之后的细胞内信号转导途径较为复杂, 在不同的细胞类型有所不同。NO松弛血管平滑肌, 使血管舒张的作用是通过NO-cGMP通路降低细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)而实现^[12]。Geeson^[13]的研究表明, NO供体硝普钠具有松弛胃底平滑肌的作用, 可以被L-型钙通道阻滞剂所抑制; Patel等的研究则显示NO可以激活肝细胞 Ca^{2+} 内流^[14]。NO-cGMP系统亦可提高大鼠胰腺 β 细胞内 Ca^{2+} 浓度^[15]。为深入探讨NO的淋巴孔调控机制, 我们观察了NO供体Sper/NO作用后培养间皮细胞内cGMP

和 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, 并应用动物实验探讨经NO-cGMP- Ca^{2+} 途径的NO调控淋巴孔, 促淋巴吸收作用, 以期揭示NO淋巴孔调控机制, 为药物的淋巴孔调控和中医治疗腹水等研究, 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 腹膜间皮细胞的分离, 培养和鉴定

清洁级Sprague-Dawley (SD)大鼠5只, 浙江大学医学院实验动物中心提供, 体重150~180 g。无菌取大鼠大网膜组织, 将其剪成1.5 cm × 1.5 cm左右的小块, 以0.125%胰酶-0.01% EDTA (Sigma公司)消化液在37℃下消化20 min。终止消化, 离心弃上清, DMEM培养液洗涤2次, 离心弃上清, 加入含10%胎牛血清(杭州四季青生物制品公司)的DMEM/F12完全培养液(Gibco)将细胞打散为均匀悬浮液, 以 1×10^5 /ml密度接种于25 cm²鼠尾胶包被的培养瓶中, 置于37℃, 5% CO₂培养箱中培养24 h后首次换液, 以后每2~3 d换液1次。待细胞80%融合, 消化传代, 2~5代的细胞用于实验。第2代培养的细胞用抗大鼠波形蛋白抗体, 抗大鼠角蛋白抗体, 抗VIII因子和抗白细胞CD45相关抗原的单克隆抗体(Dako公司产品), 以DAB法鉴定细胞。

1.2 NO对大鼠腹膜间皮细胞cGMP含量的影响

6孔板培养细胞, 培养至第3 d细胞融合后, 换无血清DMEM-F12培养液, 24 h后加药处理。(1)对照组加培养液; (2) Sper/NO (Sigma公司): 1 μ mol/L; (3) Sper/NO: 10 μ mol/L; (4) Sper/NO: 50 μ mol/L; (5) 1 μ mol/L ODQ (Sigma公司)作用10 min后, 加入50 μ mol/L Sper/NO; (6) 10 μ mol/L ODQ作用10 min后, 加入50 μ mol/L Sper/NO, Sper/NO作用时间均为30 min。药物作用后, 吸弃培养液, 立即加入1 ml 50 mmol/L醋酸缓冲液(pH值为4.75), 以橡皮刮器刮取、收集细胞, 混悬, 反复冻融3~4次, 3 000 r/min离心15 min取上清100 μ l, 按¹²⁵I cGMP放免试剂盒(上海中医药大学放免室)说明进行操作, 用 γ 计数器测量各组沉淀的放射性强度。

1.3 NO对大鼠腹膜间皮细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

利用激光共聚焦扫描显微镜(laser confocal scan-

ning microscope, LCSM) (Leica TCS-NT, Germany) 测定细胞内 Ca²⁺ 浓度的变化。将单层培养的大鼠腹膜间皮细胞, 以 1×10^5 /ml 的细胞密度接种于铺有盖玻片的六孔培养板中, 待细胞 90% 融合后, 用 Hanks 液漂洗 2 次, 5 μ mol/L Fluo-3/AM (标记 Ca²⁺), 37 $^{\circ}$ C 避光负载 40 min, 用 Hanks 液洗涤 3 次, 充分洗掉没有进入细胞内的荧光探针。将负载好的玻片静置 20 min 后, 转移至一不锈钢槽中, 并将其安置于有恒温装置(37 $^{\circ}$ C)的 LCSM 载物台上, 利用 LCSM 检测细胞内游离 Ca²⁺ 浓度。37 $^{\circ}$ C 下扫描, 每 20 s 对所选视野扫描 1 次, 观察 60 s, 得到加药前细胞内荧光强度, 之后向不锈钢槽中分组加药: (1) Sper/NO: 50 μ mol/L; (2) 10 μ mol/L ODQ 作用 10 min 后, 加入 50 μ mol/L Sper/NO, 继续检测 10 min; (3) 10 μ mol/L nifedipine (Sigma 公司)作用 5 min 后, 加入 50 μ mol/L Sper/NO 继续检测 10 min。得到每隔 20 s 荧光强度分布图后, 每视野选 7~8 个细胞, 用加药前后的细胞荧光强度与背景的荧光强度相比较, 获得相对的变化趋势来判断细胞荧光强度的变化, 以背景的荧光强度为对照, 由 Leica TCS NT 型激光共聚焦扫描显微镜系统软件分析结果, 数据以相对荧光强度的变化值表示。

1.4 NO 通路对大鼠淋巴孔和淋巴吸收的影响 清洁级 SD 大鼠 42 只, 体重 180~190 g, 雌雄不拘, 由浙江大学医学院实验动物中心提供。随机将大鼠分为 7 组, 每组 6 只。

1.4.1 台盼蓝吸收实验 处死大鼠后, 迅速取其右侧膈肌, 放入盛有培养液的六孔板中, 进行如下操作: 将培养液换为浓度为 200 μ mol/L 的 Sper/NO 溶液, 作用 30 min, 加入终浓度为 1% 台盼蓝溶液, 5 min 后, 立即用 PBS 平衡盐溶液充分漂洗组织, 切取 3 mm \times 5 mm 的组织块, 固定于 4 $^{\circ}$ C 2.5% 的戊二醛溶液中用于扫描电镜的研究。其余组织用滤

纸吸干表面后, Mettler 天平称重, 加 PBS 平衡盐溶液 0.5 μ l/mg, 充分研磨后制成组织匀浆, 4 000 r/min 离心 20 min, 取中层澄清液体 100 μ l, 用酶标仪在 550 nm 处测定吸光度值。同样的操作在 200 μ mol/L 的 Sper/NO 换为如下溶液后重复: (1) 不加任何药物, 培养液作用 30 min。 (2) 10 μ mol/L 的 Sper/NO 溶液作用 30 min。 (3) 50 μ mol/L ODQ 处理组织 10 min。 (4) 50 μ mol/L ODQ 处理组织 10 min 后, 加入 200 μ mol/L Sper/NO 继续作用 30 min。 (5) 单独 50 μ mol/L nifedipine 处理组织 5 min。 (6) 50 μ mol/L nifedipine 预处理 5 min 后, 加入 200 μ mol/L Sper/NO。记录各组样本的吸光度, 并用膈肌的组织匀浆中层澄清液, 配制台盼蓝标准液。用酶标仪在 550 nm 处^[35]测定吸光度值, 绘制标准曲线。

1.4.2 扫描电镜制样、观察与统计 将各组膈肌组织用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 2% 单宁酸导电处理, 梯度乙醇脱水, 醋酸异戊酯置换。日立 Eiko HCP-2 型临界点干燥仪干燥, 日立 Eiko IB-5 型离子溅射仪镀金, Stereoscan 260 扫描电镜观察, 加速电压 20 kV。每组获得 6 只样本观察腹膜面淋巴孔的超微结构, 同时每个样本随机选取淋巴孔密集区 3 个视野($\times 1 000$), 应用 Elescope 软件计算每 1 000 μ m² 的视野中淋巴孔的最大分布面积。

1.5 统计分析 所有数据以 mean \pm SD 表示, 两组间差异分析用 *t* 检验, 多组间均数差异用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 大鼠腹膜间皮细胞形态和鉴定

大鼠腹膜间皮细胞体外培养 24 h 后, 开始贴壁生长, 最初呈梭形或不规则形, 3~4 d 可达融合, 形成铺路石样外观。免疫组化结果, 显示细胞角蛋白和波形蛋白抗原阳性(图 1 A、B), 第 VIII 因子

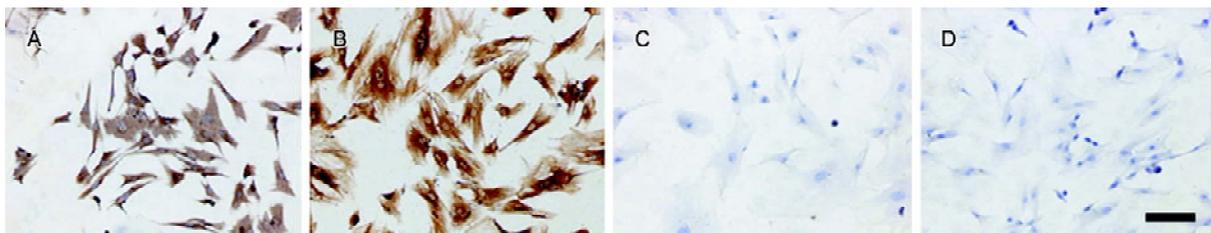


图 1. 培养细胞抗角蛋白(A)和波形蛋白抗体阳性(B), 抗VIII因子抗体(C)和抗白细胞 CD45 抗体阴性(D)

Fig. 1. Cultured cells reacted positively with antibodies to cytokeratins (A) and vimentin (B), but negatively with factor VIII (C) and CD 45 (D). Scale bar, 10 μ m.

相关抗原和白细胞 CD45 抗原阴性(图 1 C、D), 据此可排除成纤维细胞、内皮细胞和白细胞, 细胞纯度 95% 以上。

2.2 NO 对间皮细胞内 cGMP 的影响

我们用 Sper/NO 作为 NO 供体, 测定 NO 对间皮细胞内 cGMP 浓度的影响。Sper/NO (10、50 $\mu\text{mol/L}$) 作用 30 min 后, 胞内 cGMP 的浓度较对照组呈剂量依赖性增加($P < 0.01$)。此作用可被 ODQ (sGC 特异性抑制剂) 阻断: 在 1 $\mu\text{mol/L}$ 抑制率为 30.63% ($P < 0.05$), 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可以完全抑制 Sper/NO 引起的间皮细胞 cGMP 的升高($P < 0.01$) (图 2)。结果表明, NO 可以通过激活 sGC 而升高间皮细胞内 cGMP 水平。

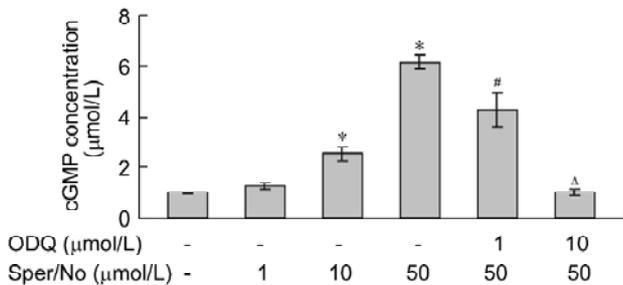


图 2. NO 供体对间皮细胞内 cGMP 的影响

Fig. 2. Effect of NO donor on the cGMP of peritoneal mesothelial cells in rat. * $P < 0.01$ compared with control group, # $P < 0.05$ compared with Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) group, ^Δ $P < 0.01$ compared with Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) group.

2.3 NO 对间皮细胞内游离 Ca^{2+} 的影响

由图 3 (A~C) 可以看出, 与背景荧光钙强度相比较, Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) 可使间皮细胞相对荧光强度降低: 加入 Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) 前为(41.42 \pm 15.2), 加入 Sper/NO 140 s 后, 其相对水平降至(16.34 \pm 5.33) ($P < 0.05$), 而 240 s 后降至(4.95 \pm 1.45) ($P < 0.05$), 达平衡。然而, 如提前加入 ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用待测间皮细胞 10 min, 则可以明显地阻断 Sper/NO 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平下降: 间皮细胞相对荧光强度在加入 ODQ 前(5.91 \pm 2.33) 及作用 240 s 后(5.33 \pm 2.09), 无明显变化 ($P > 0.05$), 再加入 Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) 作用 120 s 后, 相对荧光强度(4.06 \pm 1.85) 亦无明显变化 ($P > 0.05$), 图 4 A~C)。结果表明, ODQ 虽不引起间皮细胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化, 但可以抑制 Sper/NO, 导致间皮细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 降低。将 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine 作用于大鼠腹膜间皮细胞后,

间皮细胞相对荧光强度立即明显降低: 20 s 内由(10.14 \pm 3.58) 降至(3.66 \pm 0.88) 后, 达平衡 ($P < 0.05$)。nifedipine 作用细胞 5 min 后, 再加入 Sper/NO (50 $\mu\text{mol/L}$) 作用 120 s 后, 间皮细胞的相对荧光强度为(2.45 \pm 0.55), 较 nifedipine 作用达平衡后的荧光强度, 没有出现明显变化 ($P > 0.05$, 图 5 A~C)。实验结果表明, Sper/NO 可通过升高间皮细胞内 cGMP 水平而降低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 此过程与 L- 型钙通道有关。

2.4 NO-cGMP- Ca^{2+} 途径对大鼠淋巴孔吸收作用的影响

2.4.1 标准品的浓度和吸光度值

表 1. 台盼蓝标准品的浓度及对应吸光度

Table 1. Concentration and light absorbance of standard sample of trypan blue at 550 nm

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	1 000	500	250	125	62.5	31.25
Absorbance	2.774	1.399	0.762	0.431	0.294	0.214

经相关性分析, 表 1 中数据得等级相关系数 $r = 0.990$, 标准曲线为: $y = 2.488 + 1.318x$, 其中 y 为组织液中台盼蓝的浓度的对数, x 为吸光度的对数。

2.4.2 用酶标仪在 550 nm 处测定各组吸光度值, 并利用标准曲线将其换算为组织匀浆中台盼蓝的浓度 结果见表 2。结果显示, Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) 组, nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组和 nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$) + Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) 组之间的台盼蓝的浓度的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但该三组连同 Sper/NO (10 $\mu\text{mol/L}$) 组的台盼蓝浓度均高于对照组 ($P < 0.05$)。ODQ 对大鼠膈吸收示踪剂的作用没有影响 ($P > 0.05$), 但 ODQ 预处理后可以显著抑制 Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) 引起的台盼蓝浓度升高 ($P < 0.01$)。

2.5 NO-cGMP- Ca^{2+} 途径对大鼠淋巴孔超微结构的影响

应用扫描电镜观察对照组和各实验组的淋巴孔的大小和分布密度, 作者发现各组间存在明显差异 (图 6A~G)。经 Elescope 软件处理显示 (表 2), Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) 组, nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组和 nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$) + Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) 组的淋巴孔最大分布面积 (每 1 000 μm^2) 较对照组有明显增大, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但这三个实验组两两之间的差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。Sper/NO

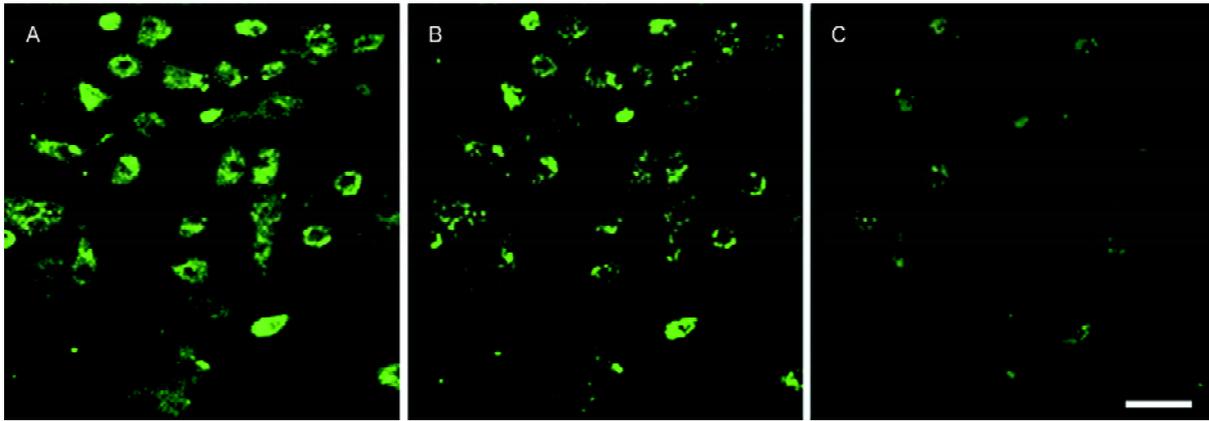


图 3. 激光扫描共聚焦显微镜(LCSM)下观察 Sper/NO 对间皮细胞内 Ca²⁺ 的影响

Fig. 3. LCSM observation of the effect of Sper/NO on the cultured peritoneal mesothelial cells. A: Cells of treated with medium only. B: Cells of 140 s after treatment of Sper/NO 50 μmol/L. C: Cells of 240 s after treatment of Sper/NO 50 μmol/L. Scale bar, 10 μm.

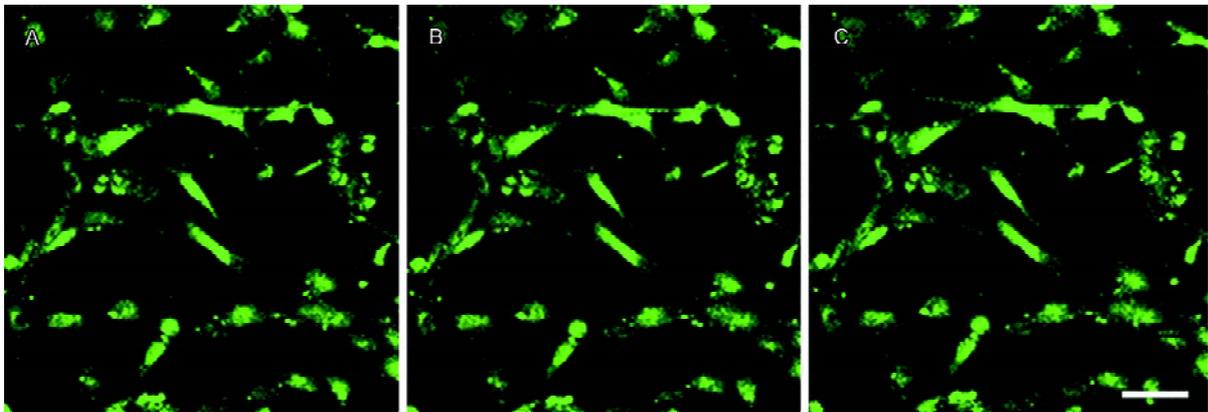


图 4. LCSM 下观察 ODQ 和 Sper/NO 对间皮细胞内 Ca²⁺ 的影响

Fig. 4. LCSM observation of the effect of ODQ and Sper/NO on the cultured peritoneal mesothelial cells. A: Cells of treated with medium only. B: Cells of 300 s after treatment of ODQ (10 μmol/L). C: Cells of 300 s after treatment of Sper/NO 50 μmol/L. Scale bar, 10 μm.

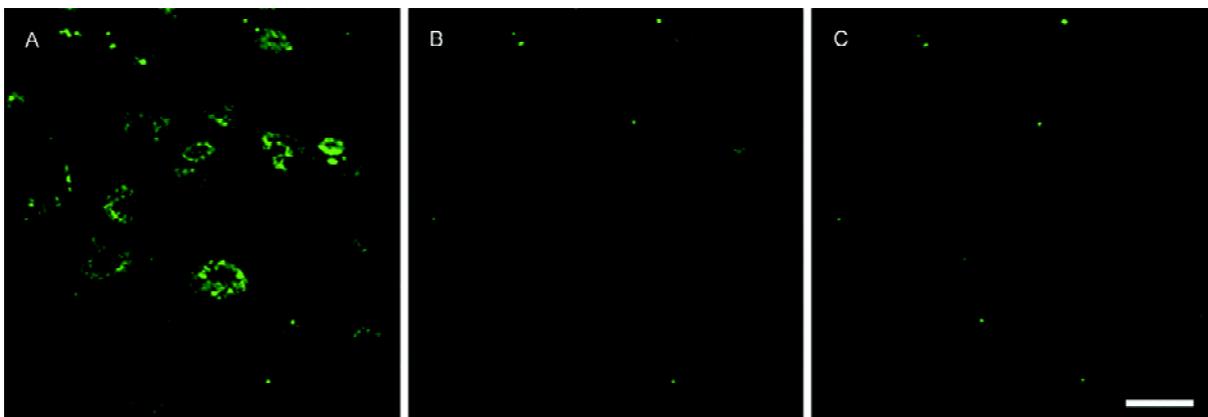


图 5. LCSM 下观察 nifedipine 和 Sper/NO 对间皮细胞内 Ca²⁺ 的影响

Fig. 5. LCSM observation of the effect of nifedipine and Sper/NO on the cultured peritoneal mesothelial cells. A: Cells of treated with medium only. B: Cells of 20 s after treatment of nifedipine (10 μmol/L). C: Cells of 120 s after treatment of Sper/NO 50 μmol/L. Scale bar, 10 μm.

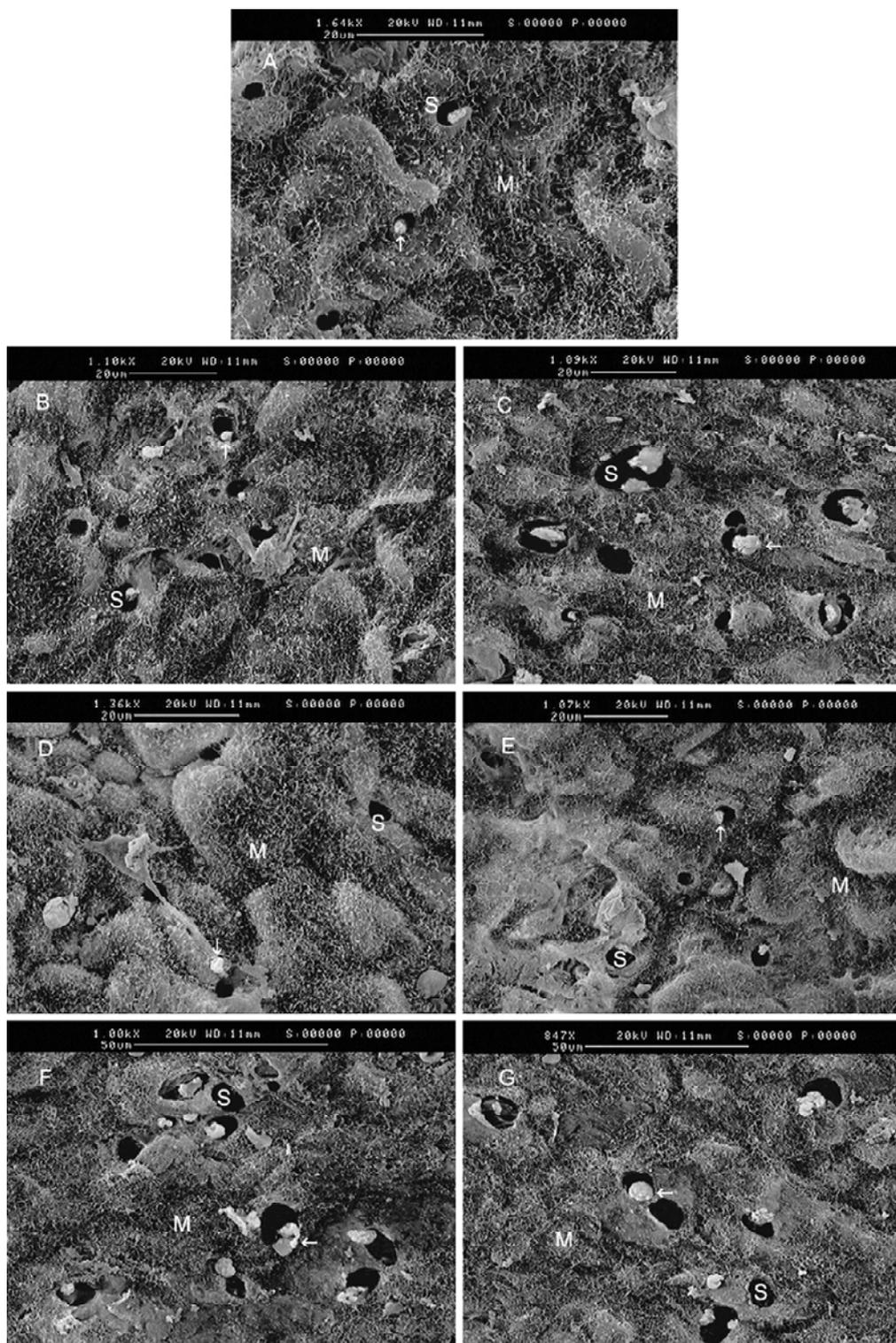


图 6. 各实验组大鼠膈腹膜淋巴孔扫描电镜图

Fig. 6. Scanning electron microscopic observation of the rat diaphragmatic peritoneal lymphatic stomata. A: Lymphatic stomata of the control group. B: Lymphatic stomata of the Sper/NO 10 $\mu\text{mol/L}$ group. C: Lymphatic stomata of the Sper/NO 200 $\mu\text{mol/L}$ group. The opening area of the lymphatic stomata are significantly increased. D: Lymphatic stomata of the group pretreated with ODQ 50 $\mu\text{mol/L}$. E: Lymphatic stomata of the group pretreated with ODQ 50 $\mu\text{mol/L}$ and then Sper/NO 200 $\mu\text{mol/L}$. F: Lymphatic stomata of the nifedipine 50 $\mu\text{mol/L}$ group. G: Lymphatic stomata of the group pretreated with nifedipine 50 $\mu\text{mol/L}$ and then Sper/NO 200 $\mu\text{mol/L}$. M, mesothelial cell; S, lymphatic stomata; \uparrow , particles of Trypan blue. A~E, scale bar, 20 μm . F, G, scale bar, 50 μm .

表 2. 各实验组膈组织匀浆液中台盼蓝的浓度($\mu\text{g/ml}$)与淋巴孔开放面积的比较($\mu\text{m}^2/1\ 000\ \mu\text{m}^2$)Table 2. Comparison of trypan blue concentration in diaphragm homogenate ($\mu\text{g/ml}$) and the opening area of lymphatic stomata between groups ($\mu\text{m}^2/1\ 000\ \mu\text{m}^2$)

Group	Concentration	Opening area
Control	201.30 \pm 13.93	23.21 \pm 7.31
Sper/NO (10 $\mu\text{mol/L}$)	289.99 \pm 39.54*	32.75 \pm 10.74*
Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$)	444.80 \pm 74.90 ^Δ	70.79 \pm 32.99 ^{**Δ}
ODQ (50 $\mu\text{mol/L}$)	194.11 \pm 15.38 ^{ΔΔ}	26.05 \pm 9.94 ^{ΔΔ}
ODQ (50 $\mu\text{mol/L}$)+ Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$)	211.76 \pm 14.10 ^{#ΔΔ}	22.00 \pm 8.17 ^{#ΔΔ}
Nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$)	457.48 \pm 76.82 ^{*Δ}	78.26 \pm 25.77 ^{**Δ}
Nifedipine (50 $\mu\text{mol/L}$)+ Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$)	451.93 \pm 79.90 ^{*Δ}	71.01 \pm 34.18 ^{**Δ}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^{ΔΔ} $P > 0.05$ compared with control group; # $P < 0.01$ compared with Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$) group; ^Δ $P > 0.05$ compared with each other.

(10 $\mu\text{mol/L}$)组的淋巴孔最大开放面积较对照组亦有增大($P < 0.05$)。ODQ (50 $\mu\text{mol/L}$)组及 ODQ (50 $\mu\text{mol/L}$)+Sper/NO (200 $\mu\text{mol/L}$)组淋巴孔的最大开放面积较对照组小, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果显示, Sper/NO 和 nifedipine 均能显著增加腹膜淋巴孔最大开放的面积, Sper/NO 对淋巴孔的作用可被 ODQ 所抑制; nifedipine 预处理后 Sper/NO 并不能进一步改变淋巴孔的最大开放面积, 提示 NO 对淋巴孔的作用与细胞内 cGMP 和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度有关。

3 讨论

许多研究表明, NO 对淋巴孔调控起至关重要的作用。李继承等通过大量实验筛选了一些在肝硬化腹水时有显著消腹水作用的中药, 发现它们可促腹膜淋巴孔开放, 导致腹膜淋巴孔对腹水的吸收作用加强^[10]。而 Ding^[9]的研究则进一步表明, 中药对淋巴孔调控与 NO 有关。Doboszynska^[16]的研究还证实(淋巴孔)间皮细胞内存在有 eNOS, 能使 NO 合成和释放, 可能参与淋巴孔的生理调控。我们的研究也发现 NO 可以促进胸膜淋巴孔开放和胸膜腔淋巴吸收^[11]。但 NO 调控淋巴孔的机制尚未见报道。本实验首次就 NO 调控淋巴孔的 NO-cGMP-Ca²⁺ 细胞内信号转导途径进行了探讨。

淋巴孔由间皮细胞的胞体和突起围成, 为研究 NO 调控淋巴孔, 促淋巴吸收的机制, 我们利用培养的腹膜间皮细胞, 探讨了 NO 在胞体内的信号转导。NO 的许多生理功能是通过激活 sGC, 升高细胞内 cGMP 水平而实现, 如松弛血管平滑肌、抑制血细胞粘附和参与神经生理功能等等。本实验中我

们应用 Sper/NO 作为 NO 供体, 研究 NO 对间皮细胞 cGMP 水平的影响。Sper/NO 是一种新型的 NO 供体, 具有高度的水溶性, 可以自发释放可预测的 NO, 且释放量与药物剂量有较好的线性关系, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 在 pH 值 7.4 的条件下半衰期为 39 min^[17], 是针对本实验较为理想的 NO 供体。我们的实验证实, 与对照组相比, NO 可以剂量依赖性地升高间皮细胞的 cGMP 水平。ODQ (sGC 选择性抑制剂)可以剂量依赖性地阻断 Sper/NO 引起的间皮细胞 cGMP 升高(图 2)结果提示 NO 可通过激活间皮细胞内的 sGC, 而提高细胞内的 cGMP 水平。

Ca²⁺ 是细胞内重要的第二信使, 参与诸多生理过程。关于 NO 对细胞内 Ca²⁺ 的影响, 由于观察对象不同以及所使用的方法不同, 所得的结果也不尽相同。NO 抑制血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流被认为是 cGMP 依赖性的, 这一作用是通过抑制电压依赖性钙通道电流实现, 但不影响细胞内钙库释放^[12]。在兔窦房结上, 在异丙肾上腺素存在时, NO 供体可以模拟卡巴胆碱(CCh)抑制钙电流激活钾电流的作用, 且该作用可被 cGMP 抑制剂所阻断。在没有异丙肾上腺素存在时, NO 供体对 Ca²⁺ 无作用^[18]。Patel 等的研究显示, 在有内皮细胞存在时, 缓激肽可以明显增强肝细胞内钙震荡, 此作用可被 NO 供体模拟, 且被 NO 抑制剂取消^[14]。Matsuura 等也报道了 NO 供体硝普钠可以通过 NO-cGMP 途径提高大鼠胰腺 β 细胞内 Ca²⁺ 浓度^[15]。

目前, 就 NO 对间皮细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的影响还未见报道。本实验中我们应用 Fluo-3AM 作为细胞内游离 Ca²⁺ 指示剂, 结果显示 50 $\mu\text{mol/L}$ NO 能够

非常显著地降低培养间皮细胞内 $[Ca^{2+}]_i$, 并且该作用可以被 ODQ 所阻断。 $[Ca^{2+}]_i$ 降低是通过两条途径实现: 钙通道阻滞使细胞外 Ca^{2+} 内流受阻和胞内钙库的 Ca^{2+} 摄取被抑制。当我们用 L-型电压依赖性钙通道阻滞剂 nifedipine 处理间皮细胞时, 可使 $[Ca^{2+}]_i$ 在短时间内迅速明显下降($P < 0.05$), 达平衡后再加入的 NO 并不能引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的进一步改变($P > 0.05$)。本研究首次表明, NO 可通过提高 cGMP 水平导致间皮 $[Ca^{2+}]_i$ 的下降, 且与 L-型电压依赖性钙通道有关。这为研究 NO-cGMP- Ca^{2+} 通路对淋巴孔和淋巴吸收的影响提供了细胞信号转导的实验依据。

我们通过动物实验, 用台盼蓝做指示剂观察了 NO 和 $[Ca^{2+}]_i$ 对淋巴孔形态的改变和台盼蓝的吸收量的影响。实验表明, NO 可以剂量依赖性地提高台盼蓝的吸收量, 并相应增大腹膜淋巴孔最大分布面积。该研究结果与我们对胸膜淋巴孔的研究结果一致^[11], 而且 Ding^[9]也观察到 NOS 抑制剂可逆转 NO 供体引起的小鼠腹膜淋巴孔的开大。ODQ 本身虽对腹膜淋巴孔的形态和其吸收能力没有影响, 但 ODQ 预处理组织, 则可明显抑制 NO 引起的淋巴孔开大和台盼蓝吸收量增加。这一结果表明, NO 通过 cGMP 调节淋巴吸收。我们的结果还首次发现 L-型电压依赖性 Ca^{2+} 通道阻滞剂 nifedipine, 不但能显著增加腹膜淋巴孔最大分布面积, 促进台盼蓝的淋巴吸收, 而且 nifedipine 预处理后, Sper/NO 并不能进一步改变对淋巴孔和淋巴吸收的影响, 结合细胞实验证实的 NO 降低间皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的结果, 充分提示 NO 对淋巴孔的作用与 $[Ca^{2+}]_i$ 降低有关。我们推测 NO 使间皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 水平降低后, 可能进一步通过影响细胞骨架, 使间皮细胞形态改变, 细胞间连接开放, 而导致淋巴孔分布面积增大, 但具体机制还需要进一步实验证实。

参考文献

- 1 von Recklinghausen F, Zur Fettresorption. *Virchows Arch Pathol Anat* 1863; 26: 172-208.
- 2 Tsilibary EC, Wissig SL. Absorption from the peritoneal cavity: SEM study of the mesothelium covering the peritoneal surface of the muscular portion of the diaphragm. *Am J Anat* 1977; 149: 127-133.
- 3 Li JC, Yu SM. Study on the ultrastructure of the peritoneal stomata in humans. *Acta Anat* 1991; 41: 26-30.
- 4 Tsilibary EC, Wissig SL. Light and electron microscope observation of the lymphatic drainage unit of the peritoneal cavity of rodents. *Am J Anat* 1987; 180: 180-195.
- 5 Li H, Li JC. Development of the peritoneal lymphatic stomata and lymphatic vessels of the diaphragm in mice. *Ann Anat* 2003; 185: 411-418.
- 6 Li JC (李继承), Shi YH, Chen XB, Yu SM. Study on the peritoneal stomata and absorptive mechanism of ascites. *Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报)* 1992; 14: 328-333, (Chinese, English abstract).
- 7 Tsilibary EC, Wissig SL. Lymphatic absorption from the stomata. *Microvasc Res* 1983; 25: 22-27.
- 8 Li JC (李继承), Shen Y, Toba Bruno, Giovanni Z. Angiotensin-induced vascular endothelial growth factor regulates pericardial lymphatic stomata and mesothelial sinusoid in European edible frog. *Acta Zool Sin (动物学报)* 2002; 48: 353-357 (Chinese, English abstract).
- 9 Ding SP, Li J C. Regulating effect of Chinese herbal medicine on the peritoneal lymphatic stomata in enhancing ascites absorption of experimental hepatofibrotic mice. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 333-337.
- 10 Li JC, Lu ZL, Wu NP, Zhou JL, Shi YH. A scanning electron microscopy and computer image processing morphometric study of the pharmacological regulation of patency of the peritoneal stomata. *Ann Anat* 1996; 178: 443-447.
- 11 Li YY (李燕园), Li JC. Effects of nitric oxide on pleural lymphatic stomata and its lymphatic drainage in the rat. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2002; 54: 333-336 (Chinese, English abstract).
- 12 Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 237-272.
- 13 Geeson J, Larsson K, Hourani SM, Toms NJ. Sodium nitroprusside-induced rat fundus relaxation is ryanodine-sensitive and involves L-type Ca^{2+} channel and small conductance Ca^{2+} -sensitive K^+ channel components. *Auton Autacoid Pharmacol* 2002; 22: 297-300.
- 14 Patel S, Robb-Gaspers LD, Stellato KA, Shon M, Thomas AP. Coordination of calcium signalling by endothelial-derived nitric oxide in the intact liver. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 467-471.
- 15 Matsuura N, Ishikawa T, Abe S, Yuyama H, Sugino F, Ishii K, Nakayama K. Nitric oxide-cyclic GMP system potentiates glucose-induced rise in cytosolic Ca^{2+} concentration in rat pancreatic beta-cells. *Life Sci* 1999; 65: 1515-1522.
- 16 Doboszynska T, Andronowska A, Modzelewska B. Immunohistochemical localisation of ET-1 and eNOS in lymphatic stomata of the porcine broad ligament of the uterus. *Folia*

- Histochem Cytobiol 2001; 39: 15-22. 1995; 25: 674-678.
- 17 Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro*. J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25: 674-678.
- 18 Hax X, Shimoni Y, Giles WR. A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. J Gen Physiol 1995; 18: 207-213.

* * * * *

中国生理学会应用生理学专业委员会 暨《中国应用生理学杂志》20周年 纪念大会和学术讨论会

第一轮通知

中国生理学会应用生理学专业委员会成立和《中国应用生理学杂志》创刊(1985)正逢20周年。专业委员会和杂志编委会拟定于2005年9月召开庆祝大会和学术讨论会,地点暂定四川省成都市。现征集本次大会交流论文。

一、会议征文要求:

- 1. 征文内容:** 凡未在国内公开发行人刊物发表过的与应用生理学相关的研究论文及实验技术方法等。
- 2. 征文范围:** 环境生理(高温、低温、高氧、低氧、高压、潜水、航空、航天、噪音、振动、微波、激光、电磁波等物理因素,有害气体等化学因素及生物因素等)、劳动、运动及训练生理、妇幼生理、老年生理、禽畜等动物生理、免疫生理、临床生理及心血管、呼吸、神经内分泌等与应用生理有关的基础生理等。
- 3. 征文要求:** 征文包括题目、作者姓名、工作单位、邮政编码、联系人及联系方式和摘要。要求题目含义明确,且不得超过26个字。内容着重说明新结果与新观点。摘要限800字以下,文中不要插图、表格和参考文献,用小四号宋体字、A4纸打印,一式两份,并附软盘、单位推荐函及审稿费60元。本次会议所征集的论文均在“中国应用生理学杂志2005年增刊号”正式发表,并可开具论文刊用证书。凡不符合征文要求者恕不受理。征文不退稿,请作者自留底稿。
- 4. 截止日期:** 征文截止日期为2005年5月31日,以邮戳为准,过期不候。

二、投稿地址:

100850 北京市海淀区太平路27号军事医学科学院基础医学研究所
《中国应用生理学杂志》20周年学术会议筹备组 葛学铭 收
(信封上请注明“会议征文”字样,及作者姓名、详细通讯地址和邮政编码。)
欢迎作者网上投稿, Email: gexueming@126.com
联系电话: 010-68214026; 010-86667712

《中国应用生理学杂志》20周年学术会议筹备组
军事医学科学院基础医学研究所

2005年1月