



内皮素 对心血管的作用

曾庆华 著

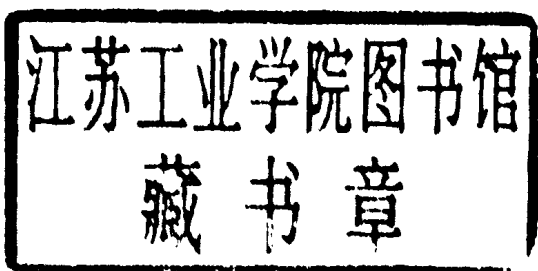
NEIPI SUDUI
XINXUEGUANDE
ZUOYONG

东北师范大学出版社

东北师范大学文库

内皮素对心血管的作用

曾庆华 著



东北师范大学出版社

1998·长春

(吉)新登字 12 号

东北师范大学文库

内皮素对心血管的作用

NEIPISU DUI XINXUEGUAN DE ZUOYONG

曾庆华 著

责任编辑：郑东宁	封面设计：魏国强	责任校对：石 柳
东北师范大学出版社出版	吉林省新华书店发行	
(长春市人民大街 138 号)	东北师范大学出版社激光照排中心制版	
(邮政编码：130024)	吉林省吉新月历公司印刷分公司印刷	
开本：850×1168 1/32	1998 年 10 月第 1 版	
印张：9.5	1998 年 10 月第 1 次印刷	
字数：250 千	印数：001—500 册	
ISBN 7 - 5602 - 2232 - 3/Q · 30	定价：15.00 元	

前 言

内皮素 (endothelin, ET) 是 1988 年日本学者柳泽 (Yanagisawa) 等从猪主动脉内皮细胞中分离出的一种由 21 个氨基酸组成的多肽。它具有强大的缩血管和促血管平滑肌细胞增殖作用。大量的研究表明, 某些心血管疾病, 如高血压、心绞痛、心肌梗塞、心脏猝死等, 血浆内皮素含量明显增高, 表明内皮素与这些疾病的发病过程有密切的关系。近年来, 内皮素的研究十分活跃, 令人瞩目, 是继心钠素之后, 心血管活性多肽和内分泌研究的又一个新的里程碑。这个新领域为推动和促进生理学的深入发展而作出贡献的机会是巨大的。

我由衷地感谢我的博士导师钟国赣教授为我确定了内皮素对心脏机能影响的研究, 并给予了悉心的指导。本书是在我的博士学位论文《内皮素对心脏机能的影响及 Rb1 对抗 ET 作用的研究》基础上, 进一步参考国内外有关文献, 引用了最新的研究成果撰写而成。

本书共分三篇九章。第一篇为基础部分, 介绍内皮素的一般性质, 包括内皮素的结构、种类、特性、合成、分布、释放、调节及受体。第二篇为全书的重点, 介绍内皮素对心血管的作用, 包括内皮素对血管平滑肌、心肌作用, 对心肌细胞内钙浓度影响, 对心肌细胞膜离子通道的影响、研究方法、原理, 以及内皮素与某

些心血管疾病发病的关系。由于内皮素过量分泌和释放是许多心血管急、危、重病发病的一个重要诱因，拮抗内皮素的作用具有重要的临床意义。因此，本书第三篇主要介绍内皮素对抗剂及其应用，包括人参皂甙单体 Rb1 对抗内皮素-1 的作用。这为研制开发我国自己的对抗内皮素药物开辟了广阔的前景，为人参防治和治疗与内皮素有关的心血管疾病提供了实验室依据。

该书结构严谨，内容丰富，论据充分，文图并茂，即可作为生理学专业研究生教学用书，也可供有关医学基础、临床研究的参考书。

我的博士导师、白求恩医科大学钟国赣教授对本书进行了整体设计和目录编排。“东北师范大学图书出版基金”为本书的出版提供了经费资助，在此深表谢意。

在本书的撰写过程中，吴志学，于欣同志为本书清绘部分图稿，刘波同志协助整理全部图稿。在此一并致谢。

由于作者学识功底不足，力不从心，加之时间仓促，故本书错漏之处在所难免，殷盼有关专家和广大读者批评指正。

曾庆华

1998 年 1 月

目 录

前 言	1
第一篇 内皮素的一般性质	1
第一章 内皮素的结构和特性	3
第一节 内皮素的结构	3
第二节 内皮素生物合成与分子克隆	9
第二章 内皮素在心血管的分布、释放调节及受体	13
第一节 内皮素在心血管的分布	13
第二节 内皮素的释放调节	15
第三节 内皮素受体	21
第二篇 内皮素对心血管的作用	29
第三章 内皮素对血管平滑肌的作用	30
第一节 内皮素对血管的收缩作用	30
第二节 内皮素对微循环的影响	37
第三节 内皮素的促血管平滑肌细胞增生作用	43
第四章 内皮素对心肌的影响	46
第一节 内皮素对在体心脏收缩性能的影响	46

第二节	内皮素对离体心脏收缩机能的影响	60
第三节	内皮素对心肌的正性肌力作用	72
第四节	内皮素促心肌细胞增殖作用	78
第五章	内皮素对心肌细胞内钙浓度影响	81
第一节	概 述	81
第二节	钙荧光探针测量细胞内钙的原理、应用	86
第三节	内皮素对含钙基质及无钙基质细胞内钙 浓度影响	96
第六章	内皮素对心肌、平滑肌细胞膜离子通道的 影响	102
第一节	概 述	102
第二节	细胞膜离子通道电流记录的原理、应用 及采用的 Pclamp 软件	104
第三节	内皮素对血管平滑肌离子通道的作用	144
第四节	心肌细胞的钙通道	148
第五节	内皮素对心肌细胞钙离子通道电流的 作用	169
第六节	内皮素对心肌细胞钾离子通道电流的 作用	202
第七章	内皮素与某些心血管疾病发病的关系	216
第一节	内皮素与高血压	216
第二节	内皮素与脂质代谢	222
第三节	内皮素与心肌梗塞	224
第四节	内皮素与心律失常	226
第五节	内皮素与心肌肥厚	227
第六节	内皮素与心肌缺血、充血性心力衰竭	229
第七节	内皮素与其他心血管疾病	231
第八节	内皮素与休克	233

第三篇 内皮素对抗剂及其应用	237
第八章 内皮素对抗剂.....	238
第一节 特异性内皮素-1 受体拮抗剂	238
第二节 特异性内皮素抗体.....	243
第三节 内皮素合成抑制剂及生物效应抑制剂.....	246
第九章 Rb1 对抗 ET-1 的作用	255
第一节 概 述.....	256
第二节 Rb1 对抗 ET-1 导致的正性肌力作用	259
第三节 Rb1 对抗 ET-1 提高心肌细胞内钙浓度 作用.....	266
第四节 Rb1 对抗 ET-1 提高心肌细胞钙电流	271
第五节 Rb1 对抗 ET-1 提高心肌细胞延迟外向 钾电流.....	284

第一篇

内皮素的一般性质

布里安(Brien)1984 年发现牛的主动脉与肺动脉内皮细胞可分泌一种活性多肽物质,可引起血管收缩。^[1]海基·鲁巴尼(Hickey Rubanyi)等于 1985 年发现,在培养的牛主动脉内皮细胞上清液中存在一种血管收缩物质,它对蛋白酶敏感,而许多已知的受体拮抗剂(如 α 、 β 受体拮抗剂)、5 羟色胺能、组胺能及胆碱能受体拮抗剂和酶抑制剂,皆不能阻止该物质的缩血管作用。^[2]1986 年,基鲁斯皮(Gilluespie)等发现该物质具有很强的缩冠状血管作用,并将这种物质命名为内皮衍生性血管收缩因子(endothelial derived constrictor factor, EDCF)。^[3]1988 年,柳泽(Yanagisawa)等从培养的猪主动脉内皮细胞上清液成功地分离和纯化了这种内皮衍生的收缩因子,并分析了它的氨基酸序列及克隆出相应的 cDNA;该收缩因子,由 21 个氨基酸组成,并正式命名为 ET (endothelin, ET)。^[4]ET 的发现引起了科学家的极大兴趣,近十年来,很多学者对 ET 的分布、受体、作用及其机理,进行了广泛而又深入的研究,取得了大量的实验结果。内皮素的发现与 1980 年发现的内皮衍生松弛因子,形成了新的血管紧张度调控系统,使人们对血管紧张

度调控的认识有了新的突破性进展。内皮素不仅是一种缩血管物质，它还具有生长因子、激素调节肽、神经肽等广泛作用，因而它参与循环、神经、呼吸、泌尿等系统的生理调节，并在某些心血管疾病的发病过程中具有重要意义。

本篇仅就内皮素的一般性质，及内皮素在心血管的分布、释放调节、受体作简要叙述。

第一章 内皮素的结构和特性

内皮素 (endothelin, ET) 是由 21 个氨基酸组成的生物活性多肽。目前发现生物体内有 ET-1、ET-2、ET-3 和 VIC 四种异形肽形式, 其生物合成过程基本相同。内皮素主要分布在血管内皮细胞。近年研究证明内皮素还广泛分布在心脏、肺、肾、神经等机体几乎所有的组织。生理状态下, 内皮素的合成, 释放量很低, 内皮素释放受许多因素调节。内环境理化因素, 内源性和外源性生物活性物质都可以影响内皮素的表达和释放, 而大部分因素主要通过影响 ppETmRNA 的转录和释放而得以实现的。内皮素只有在与靶细胞膜上的内皮素受体结合以后, 启动一系列细胞内信息传递过程, 方可实现其生物学效应。

第一节 内皮素的结构

内皮素是内皮素前体原水解而形成的具有生物活性的 21 个氨基酸组成的活性多肽。它基本结构如图 1-1 所示, 分子量 2 600 左右。分子内有两对由半胱氨酸残基构成的二硫键 (Cys¹-Cys¹⁵ 及

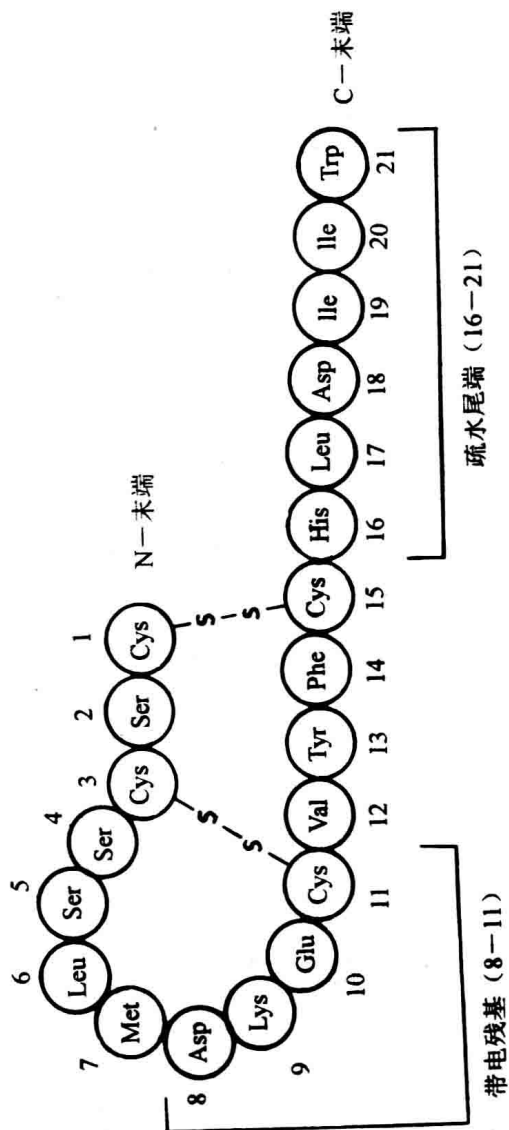


图 1-1 内皮素的分子结构

Cys³-Cys¹¹),分子中的8~10位氨基酸均为带电氨基酸(Asp-Lys-Glu),分子的16~21位均为疏水性氨基酸。二对二硫键对维持内皮素的高级结构至关重要,它是维持内皮素活性最为重要的因素之一。如果打开两对二硫键,内皮素的生物活性降低至千分之一。分子中由疏水氨基酸组成的6肽尾部,对内皮素的生物活性也十分重要。若除去末端5个氨基酸,则其活性全部丧失。内皮素的氨基酸序列决定了内皮素特殊的立体构象,这对内皮素与受体的识别是非常重要的。芒罗(Munro)(1990年,1991年)和克里斯克(Krystek)(1991年)曾相继应用核磁共振测定了内皮素在水溶液中的立体构象(conformation),它的立体构象如图1-2。他们测定的结果表明:内皮素分子的5~8位氨基酸残基形成明显弯曲,而在分子的9~16位氨基酸残基则形成螺旋结构。Asp⁸-Lys⁹之间可以自旋转,因而弯曲的Ser⁵-Leu⁶-Met⁷-Asp⁸与螺旋状结构形成绞链(hinge)。Leu¹⁷则连接C末端与1~15位氨基酸残基形成的双环结构。与ET受体结合有关的残基与二硫键在螺旋的一侧形成可供受体结合的活性中心。

自1988年,Yanagisawa等从培养的猪主动脉内皮细胞上清液成功地分离和纯化了这种内皮衍生的收缩因子即内皮素之后,Inoue(1989年)以人工合成的编码ET 1~20位氨基酸残基的寡核苷酸片段为探针,筛选人的cDNA文库时发现基因组ET相关基因除了ET基因外,另外两组基因均可表达出与ET相似的活性多肽。至此,Inoue首次提出“内皮素家族(endothelin family)”这一概念。按其发现顺序将几种内皮素分别命名为ET-1、ET-2和ET-3。^[5]ET三种异形肽的结构和功能有很多相似之处,它们的结构如图1-3所示,分子量如表1-1所示。它们都是由21个氨基酸残基组成,分子内皆有两对二硫键;其末端皆为色氨酸及一个疏水性尾部,在功能上,三种异形肽都有强大而持久的缩血管效应。然而三者之间亦存在着一定差异,如它们的基

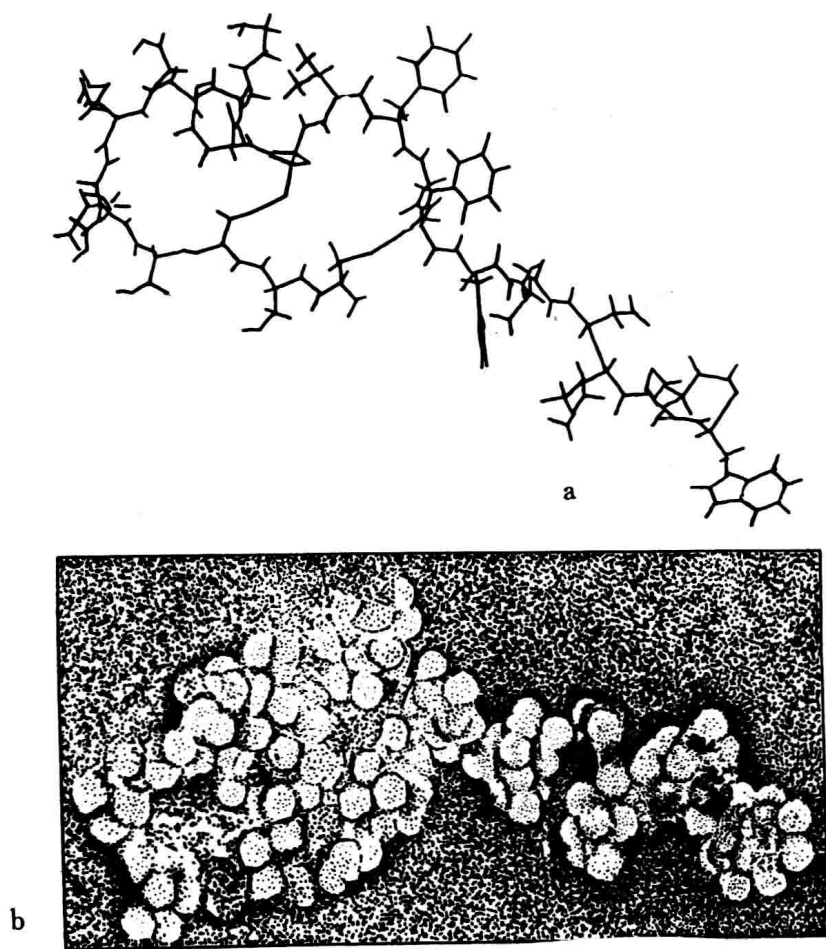


图 1-2 根据核磁共振测定结果绘制的
内皮素分子立体构象模式图

(a) 传统的棒状形 (b) 空间填充模型

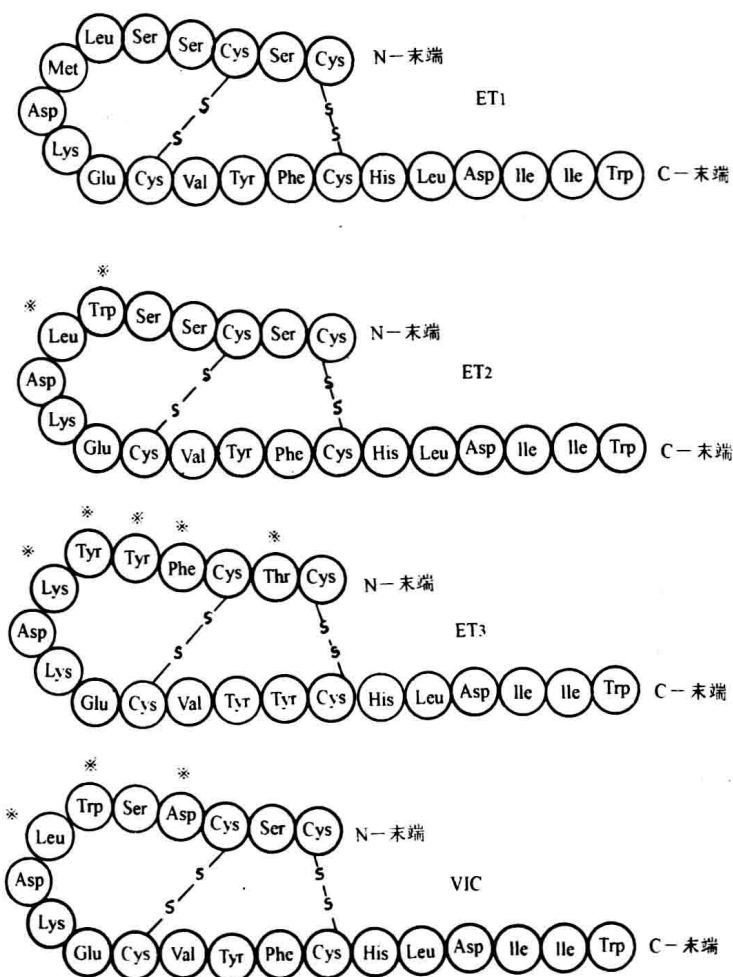


图 1 - 3 VIC 及 ET-1、2、3 的结构

因定位,组织表达的特异性,与受体的结合等不尽相同。ET-1 主要在内皮细胞中表达,ET-2 的表达以肾脏居多,ET-3 则主要在神经系统表达。在功能方面,三种 ET 的缩血管强度不同,其强度依次为 $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$ 。ET-3 主要分布于中枢神经系统,可引起神经递质样作用,而其缩血管强度仅为 ET-1 的 1/20。除上述三种外,塞达 (Saida) (1989 年) 在小鼠体内发现另外一种活性多肽,对肠道平滑肌有收缩作用,因而被命名为血管活性肠收缩肽 (Vasoactive intestinal constrictor, VIC)。VIC 的结构如图 1-3 所示,也是由 21 个氨基酸残基组成,只有 3 个氨基酸残基,即 Asp⁴、Trp⁶ 和 Leu⁷ 不同于 ET-1。因 VIC 在结构和功能上与内皮素很相似,而且以内皮素的 cDNA 探测出为其编码的基因顺序,因而目前认为 VIC 是内皮素的一种。

表 1-1 内皮素四种异形肽的分子量

	内皮素	分子量
内皮素-1	(牛内皮素, ET-1)	2491.8
内皮素-2	(人内皮素, ET-2)	2547.5
内皮素-3	(鼠内皮素, ET-3)	2643.6
VIC 老鼠 β 内皮素		2574.5

第二节 内皮素生物合成与分子克隆

一、内皮素生物合成

ET-1、ET-2、ET-3 及 VIC 的合成过程基本相同。内皮素的生物合成主要包括以下几个基本步骤:

① 内皮素基因激活后,首先在核内转录生成核不均 RNA (HnRNA), HnRNA 为 mRNA 之前体,经剪切合成为相应 ET 前体原 mRNA (ppETmRNA)。

② ppETmRNA 进入胞浆,在粗面内质网翻译合成 ppET。

③ ppET 能特异识别硷性氨基酸,在内肽酶作用下,水解并释放出 ET 前体 (proendothelin, pET 或 BigET)。

④ BigET 经 ET 转换酶 (endthelin converting enzyme, ECE) 作用,水解 Trp²¹-Val²²之间的肽键,释放出由 21 个氨基酸残基组成的 ET。内皮素转换酶不仅分布于血管内皮细胞,还分布于血管平滑肌、脑组织、肾髓质和胎盘等。

正确情况下,内皮素在体内容易降解,血浆内皮素的浓度很低,约为 1.5~3.0 pg/mL。内皮素在血浆中的生物半衰期仅 1~2 min,主要在肺脏,其次是肾脏和血管组织中进行降解。安哥德 (Anggard)、佩诺 (Pernow) 等应用 ¹²⁵I-ET-1 证明,内皮素在体内降解有两个时相。第一个时相 (又称快速清除时相) 约 2 min,在此时相内,60% 以上的 ET-1 被清除;第二个时相 (称慢速清除相) 约 45 min,可清除其余 40% 的 ET-1。关于清除的机制尚未完全阐明。有人推测其主要降解途径是与受体结合后,发生了所谓“内趋化” (internalization)。这类受体主要存在于肺、肾、肝脏、