

自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞异常增殖和自身肾素-血管紧张素系统的关系

王向宇 吴可贵 晋学庆 王华军 许昌声
(福建医科大学附属第一医院高血压研究所, 福州 350005)

The Relationship between the Abnormal Proliferation and Renin-Angiotensin System of Aortic Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats

WANG Xiang-Yu, WU Ke-Gui, JIN Xue-Qing, WANG Hua-Jun and XU Chang-Sheng
(Hypertensive Division, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the relationship between the enhanced proliferation and renin-angiotensin system (RAS) of aortic smooth muscle cells (SMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods Proliferative activity of SMC was assessed by ³H-TdR incorporation and doubling time (DT). Angiotensin I (Ang I) content and angiotensin converting enzyme (ACE) activity were measured by radioimmunoassay and colorimetry respectively.

Results SHR SMC had stronger proliferative ability compared with Wistar-kyoto normotensive rats (WKY) while SHR SMC RAS was activated. Enhanced proliferation of SHR SMC was obviously inhibited with the long-term administration of captopril (Cap) and saralasin (Sar). The inhibition rate on ³H-TdR incorporation of SHR SMC by 10⁻⁴ mol/L Cap was 31% ± 4% (P < 0.01) while the DT was prolonged for about 13 h (P < 0.01). Ang I content and ACE activity were decreased for 25% ± 9%, 27% ± 13% respectively. The inhibition rates on ³H-TdR incorporation of SHR SMC by 10⁻⁵ mol/L Sar was 20% ± 3%

(P < 0.05) while the DT was prolonged for about 7 h (P < 0.05). The Ang I content that two types of rats synthesized and secreted increased while ACE activity of SHR SMC decreased by 10⁻⁵ mol/L Sar. SHR, WKY SMC RAS were not influenced by short-term administration of Cap.

Conclusion Long-term administration of Cap and Sar suppressed SHR SMC growth through inhibition of Ang I generation or blockade of Ang I binding to its receptor.

KEY WORDS Spontaneously hypertensive rat; Smooth muscle cells; Renin-angiotensin system

摘要 为探讨自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞异常增殖和肾素-血管紧张素系统的关系,用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量和倍增时间来反映主动脉平滑肌细胞的增殖能力。放射免疫法测定血管紧张素 I 浓度,紫外分光光度法测定血管紧张素转化酶活性。结果发现自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞分裂增殖能力比血压正常鼠强,自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞肾素-血管紧张素系统处于高功能状态。卡托普利和 Sar 长期干预可显著抑制自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞异常增殖,10⁻⁴ mol/L 卡托普利使自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量被抑制 31% ± 4%,倍增时间延长 13 h,血管紧张素 I 和血管紧张素转化酶水平分别下降 25% ± 9% 和 27% ± 13%。10⁻⁵ mol/L Sar 对自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入的抑制率为 20% ± 3% (P < 0.05),倍增时间延长约 7 h (P < 0.05),并使两种大鼠主动脉平滑肌细胞合成和分泌血管紧张素 I 增加 (P < 0.05),自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞血管紧张素转化酶活性降低 (P < 0.05)。卡托普利短期干预不影响两种大鼠主动脉平滑肌细胞肾素-血管紧张素系统。以上结果提示,卡托普利和 Sar 长期干预可减少自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞血

管紧张素 I 生成或阻断血管紧张素 I 与特异性受体结合,从而抑制其异常增殖。

关键词 自发性高血压大鼠; 平滑肌细胞; 肾素—血管紧张素系统

肾素—血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在高血压中起着重要作用。心血管局部 RAS 调节着局部血流和血管紧张度,促进心脏和血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的生长和代谢^[1]。体内 SMC 的增殖可能受压力因素、神经递质、遗传因素、各种生长因子和血管活性物质的多因素调控^[2],为排除在体时压力环境、神经递质等干扰,有利于对 SMC 本身 RAS 和 SMC 增殖的关系进行单因素分析,本实验对 20 周龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)和血压正常鼠(wistar-kyoto normotensive rat, WKY)的 SMC 进行离体培养,以进一步探讨高血压大鼠 SMC 本身 RAS 功能状态与增殖的关系,以及卡托普利(captopril, Cap)和 saralasin (Sar)逆转高血压 SMC 增殖的机制。

1 材料和方法

1.1 血管平滑肌细胞培养和鉴定

取 20 周龄雄性 SHR 和 WKY 各 8 只(本院动物室提供),尾动脉收缩压分别为 29.1 ± 2.1 kPa 和 16.5 ± 1.7 kPa。无菌操作下取出胸主动脉,在含 15% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS; 杭州四季青公司)的 RPMI 培养液中和 37℃、5%CO₂ 条件下,用贴块法进行 SMC 原代培养,用 3~6 代细胞进行实验。培养的 SMC 为梭形或纺锤形,呈“峰和谷”样结构。电镜下可见细胞膜下呈细胞长轴平行排列的肌丝。 α -actin 单抗体免疫细胞化学鉴定,阳性细胞达 95% 以上。

1.2 观察长期干预的影响

观察原代培养的细胞,当组织块边缘有细胞生长时,加入 Cap 或 Sar 共孵育 4 周。实验分组为:①对照组(15%FCS-RPMI);②不同浓度的 Cap 组(10^{-8} 、 10^{-6} 和 10^{-4} mol/L);③不同浓度的 Sar 组(10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L)。整个实验过程中以上各组均保持恒定的药物浓度。

1.2.1 鼠标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验 细胞贴壁后,换无血清培养基培养 48 h,使 SMC 处于 G1/G0 期。将 SMC 调成 1×10^6 个/L,加入 $1 \mu\text{Ci}$ ³H-TdR(比活

性为 1 mCi/L,上海原子核能研究所),共育 24 h 后进行放射性强度测定。³H-TdR 掺入量单位为 Bq/10⁵ 细胞。

1.2.2 倍增时间测定 将 SMC 调成 2×10^7 个/L,加入 24 孔板,每孔 1 mL,每 2~3 天换液一次,分别于第 3、4、5 和 6 天中止反应,进行细胞计数,计算倍增时间(doubling time, DT)。

$$DT(h) = \frac{(t_1 - t_2) \log 2}{\log N_1 - \log N_2}$$

上式中 t_1 、 t_2 分别为第 6、4 天, $t_1 - t_2 = 48$ h, N_1 、 N_2 分别代表第 6、4 天的细胞数。

1.2.3 Ang I 和 ACE 测定 将 SMC 悬液按(3~5) $\times 10^7$ 个/L 接种于 24 孔,每孔 1 mL,培养液和 1~2 mL 空白培养液作对照,孵育 3~5 天,测定前行细胞计数。

1.2.3.1 培养液中 Ang I 测定 同时将每孔培养液吸出,置入预冷的含酶抑制剂(6.8 mmol/L 8-羟基喹啉, 3.4 mmol/L 二巯基丙醇, 6.8 mmol/L EDTA Na₂)的试管中,离心(4℃, 3 000 r/min \times 5 min),取上清液, -80℃ 保存。

1.2.3.2 SMC 中的 Ang I 测定 将各孔培养液吸尽后,用 pH 7.4 的 PBS 洗 2 次后,加入含上述酶抑制剂的 0.1 mol/L Tris-HCl 1.0 mL,冻融一次,刮下细胞,匀浆,离心(4℃, 16 000 r/min \times 20 min),取上清液, -80℃ 保存。Ang I 浓度用 pg/10⁶ 细胞作单位(Ang I 测定试剂盒由北京免疫试剂研究所提供)。

1.2.3.3 SMC 中的 ACE 测定 吸弃各孔培养液,刮下细胞,用 PBS 洗 2 次,加入 1.0 mL pH 8.3 PBS,移入 Eppendorf 管, -80℃ 冻存 1~2 个月,以降解外源加入的 Cap。测定前解冻、匀浆、离心(4℃, 16 000 r/min \times 20 min),取上清液。ACE 测定采用紫外分光光度法(7520 型紫外分光光度仪,上海),以 FAPGG 为底物,测定在 340 nm 的吸光度差值。ACE 活性以 U/10⁶ 细胞为单位(ACE 测定试剂盒由 Sigma 公司提供)。

1.3 观察短期干预的影响

主动脉平滑肌细胞实验前均用 15%FCS-RPMI 培养,未加入任何药物。用 Cap 和 SMC 共育 24 h。

1.4 统计方法

每次实验均重复 3 次,实验结果表达为 $\bar{x} \pm s$ 。各组数据之间显著性检验用 ANOVA 方差分析。

2 结果

2.1 基础状态下的比较

自发性高血压大鼠(SHR)SMC 的³H-TdR 掺入量明显高于 WKY ($P < 0.01$)。在 15%

FCS-RPMI 作用下,SHR 和 WKY 的 SMC 在 3~6 天几乎呈指数增长,SHR SMC 倍增时间明显短于 WKY ($P<0.01$).说明 SHR SMC 分裂增殖能力比 WKY 强。SHR SMC 合成 Ang I 和 ACE,分泌 Ang I 的能力均比 WKY 强。(表 1 和表 2, Table 1 and Table 2)。

2.2 长期卡托普利干预的影响

自发性高血压大鼠 (SHR) 和 WKY 的 SMC 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量随 Cap 浓度增加而减少,呈剂量依赖性。当 Cap 浓度为 10^{-8}mol/L 时,对 SHR 的 SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入量已有显著的抑制,当 Cap 浓度为 10^{-4}mol/L 时,SHR SMC 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量被抑制 $31\%\pm 4\%$ 。而只有高浓度 Cap (10^{-4}mol/L) 时,才能减少 WKY SMC 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量,抑制率为 $17\%\pm 9\%$ ($P<0.05$)。Cap 使 SHR 的 SMC 增殖速度减慢,DT 延长,呈剂量依赖性, 10^{-4}mol/L Cap 使 SHR 的 SMC DT 延长约 13 h ($P<0.01$)。同样也只有高浓度 Cap (10^{-4}mol/L) 使 WKY 的 SMC DT 延长约 6 h。可见 Cap 抑制 SHR SMC 增殖的效应比 WKY 强。

基础状态下 SHR 的 SMC 处于激活状态,因而 10^{-4}mol/L 的 Cap 使 SHR 的 SMC 中的 Ang I 和 ACE 水平分别下降 $25\%\pm 9\%$ 和

$27\%\pm 13\%$,培养液中的 Ang I 下降 $34\%\pm 12\%$, 10^{-8}mol/L 的 Cap 不影响 SHR 的 SMC 中的 Ang I 和 ACE 及培养液中 Ang I 水平, 10^{-4}mol/L 的 Cap 仅使 WKY SMC 中的 Ang I 含量下降,SMC 中的 ACE 和培养液中的 Ang I 无变化。 10^{-6} 和 10^{-8}mol/L 的 Cap 不影响 WKY SMC 中的 Ang I 和 ACE 水平(表 1 和表 2, Table 1 and Table 2)。

2.3 长期 Sar 干预的影响

10^{-6}mol/L 和 10^{-5}mol/L Sar 抑制 SHR 的 SMC H-TdR 掺入量,抑制率分别为 $12\%\pm 5\%$ 和 $20\%\pm 3\%$ ($P<0.05$),并使 DT 延长约 2 h 和 7 h ($P<0.05$), 10^{-7}mol/L 的 Sar 不影响 SHR SMC 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入,只有 10^{-5}mol/L 的 Sar 抑制 WKY SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入,抑制率为 $13.8\%\pm 2.9\%$ ($P<0.05$),DT 延长约 3 h ($P<0.05$)。Sar 抑制 SHR SMC 增殖的效应比抑制 WKY 强。 10^{-6}mol/L 和 10^{-5}mol/L 的 Sar 使 SHR SMC 合成、分泌 Ang I 增加 ($P<0.05$), 10^{-7}mol/L Sar 则无影响, 10^{-5}mol/L Sar 使 SHR SMC ACE 活性降低 ($P<0.05$), 10^{-5}mol/L Sar 使 WKY 合成、分泌 Ang I 增加,Sar 均不影响 WKY SMC ACE 活性(表 1 和表 2, Table 1 and Table 2)。

Table 1. Effects of long-term treatment of Cap and Sar on $^3\text{H-TdR}$ incorporation and doubling time of SMC from WKY and SHR ($n=8, \bar{x}\pm s$).

Groups	$^3\text{H-TdR}$ incorporation (Bq/ 10^5)		Doubling time(h)	
	WKY	SHR	WKY	SHR
Control	393±49	703±63 ^e	47.5±2.5	30.0±1.4 ^e
Captopril (mol/L)	10^{-8}	369±53	47.8±1.9	34.8±2.5 ^f
	10^{-6}	365±34	49.2±2.2	40.8±2.2 ^f
	10^{-4}	325±41 ^b	484±43 ^f	53.1±2.3 ^c
Saralasin (mol/L)	10^{-7}	393±47	48.7±1.9	29.9±1.4
	10^{-6}	370±33	47.8±2.7	32.0±1.8 ^e
	10^{-5}	339±44 ^b	562±61 ^f	50.6±3.0 ^b

b; $P<0.05$, c; $P<0.01$, compared with WKY control group; e; $P<0.05$, f; $P<0.01$, compared with SHR control group.

2.4 短期卡托普利干预的影响

只有 10^{-4}mol/L Cap 才能够抑制 SHR

SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入,抑制率为 $10.2\%\pm 2.1\%$ ($P<0.05$),Cap 对 WKY SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入无

影响, Cap 不改变 SHR 和 WKY SMC Ang II 和 SMC RAS (表 3, Table 3)。ACE 含量, 说明短期 Cap 干预不影响两种大鼠

Table 2. Effects of long-term treatment of Cap and Sar on Ang content and ACE activity of SMC from WKY and SHR ($n=8, \bar{x} \pm s$).

Groups	Ang in SMC (pg/10 ⁶)		Ang in medium (pg/10 ⁶)		ACE activity (U/10 ⁶)	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Control	102±17	208±36 ^c	44±16	102±18 ^c	46±14	66±14 ^c
Captopril	10 ⁻⁸	99±14	203±36	41±12	99±14	48±15
(mol/L)	10 ⁻⁶	97±20	179±31 ^c	42±18	81±20 ^c	46±15
	10 ⁻⁴	84±13 ^b	144±32 ^c	37±11	56±14 ^f	43±17
Saralasin	10 ⁻⁷	110±14	210±39	40±12	107±19	47±18
(mol/L)	10 ⁻⁶	105±14	243±33 ^c	46±11	128±19 ^c	43±11
	10 ⁻⁵	121±19 ^b	251±33 ^c	60±14 ^b	130±19 ^c	40±16

b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with WKY control group; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, compared with SHR control group.

Table 3. Effects of short-term treatment of Cap on ³H-TdR incorporation, Ang content and ACE activity of SMC from WKY and SHR ($n=8, \bar{x} \pm s$).

Groups	³ H-TdR (Bq/10 ⁵)		Ang in SMC (pg/10 ⁶)		Ang in medium (pg/10 ⁶)		ACE activity (U/10 ⁶)	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Control	393±49	703±63	102±17	210±36	44±16	102±18	46±14	66±14
Captopril								
(mol/L)								
	10 ⁻⁸	400±63	697±69	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	377±67	677±73	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	347±57 ^a	631±57 ^c	120±29 ^a	190±38 ^d	40±14 ^a	105±21 ^d	44±14 ^a

a: $P > 0.05$, compared with WKY control group; d: $P > 0.05$, e: $P < 0.05$, compared with SHR control group.

3 讨论

自发性高血压大鼠整个动脉血管包括弹力型动脉和肌性动脉均存在血管中膜肥厚, 血管中膜面积/管腔比例增加, 有人认为这是继发于血压的升高。但越来越多的研究表明: 高血压血管肥厚不是单一血压因素的结果, 非压力因素如神经、体液和遗传因素占有很重要的地位^[2]。我们的实验结果发现, 脱离了高血压影响的体外培养的 SHR SMC ³H-TdR 掺入比 WKY 高, 倍增时间比 WKY 短, 增殖能力比 WKY 强。可见, SHR SMC 存在内在的遗传缺陷是其异常增

殖的一种基本因素。

血管紧张素转化酶(ACE)是 RAS 的重要组成部分之一, ACE 最显著的作用是激活升血压缩血管 Ang II 和灭活降血压舒血管物质缓激肽。ACE 主在存在于血管内皮, 所以以往对其功能和调节的研究多取材于整体动物、离体血管或培养的内皮细胞。有研究表明大鼠肠系膜动脉血管内皮剥脱后, ACE 活性仅下降约 20%, 且内皮损伤后血管中膜 ACE 基因表达增强^[3], 更表明了 SMC ACE 的重要性, 因而对 SMC 中 ACE 的研究应引起足够的重视。Ang II 受体拮

抗剂竞争性阻断 Ang I 和 SMC 膜上 Ang I 受体的结合,降低血压,明显减轻心脏和血管肥厚,但其血浆 Ang I、肾素和 ACE 水平反而升高,局部 Ang I 和 ACE 水平如何变化尚有争议^[4,5]。

自发性高血压大鼠循环 RAS 处于正常或低于正常的状态,但 SMC RAS 却处于激活状态,表现为组织 ACE 酶活性和 Ang I 含量显著增高。实验表明:血管局部 Ang I 和 ACE 水平比血压、循环 Ang I 和 ACE 水平与血管肥厚更具相关性^[6]。因此,研究 SMC RAS 的旁分泌、自分泌和胞内分泌如何调节细胞功能, Cap、Sar 如何影响 SMC RAS 以抑制其增殖是非常有意义的。我们通过体外培养 SMC,并在培养基中加入一定浓度的 Cap 或 Sar 长期干预,观察 SMC RAS 和增殖速度的改变。结果表明:SHR 和 WKY SMC 可以合成和分泌 Ang I 和 ACE,且 SHR SMC 中和培养液中 Ang I 均显著高于 WKY,SHR SMC ACE 活性显著高于 WKY,进一步证实 SMC 本身存在 RAS,高血压时血管 RAS 异常活跃,可能与 SHR SMC 异常增殖有关。Cap 和 Sar 对 SHR SMC 异常增殖的抑制作用强于 WKY,与 SHR SMC RAS 处于高功能状态有关。 10^{-8} mol/L Cap 在不影响 SHR SMC RAS 的情况下,也能延缓其 SMC 增殖速度,可能与其激活激肽系统有关^[7]。 10^{-5} mol/L Cap 和 Sar 分别通过抑制 WKY SMC 合成 Ang I、阻断 Ang I 和其受体结合而延缓其增殖,说明 Ang I 可能是调节正常血压大鼠心血管构筑的重要因子,参与心血管正常的生长发育。Sar 使 SHR 和 WKY Ang I 水平升高可能是反馈调节或通过 Ang I 受体介导的 Ang I 降解被抑制的结果^[8]。有人认为:局部 Ang I 升高可能削弱 Sar 的作用^[4]。短期卡托普利干预,并不产生长期干预的效果,只有 10^{-4} mol/L Cap 显著抑制 SHR SMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入,对两种大鼠 SMC RAS 都不产生影响。更证明了“比起抑制循环 RAS 活性而言,抑制组织局部 RAS 活性

往往需要用较大剂量、较长时间的 ACEI 治疗”的观点^[9,10]。

参考文献

- 1 Unger T, Gohlke P. Tissue renin-angiotensin systems in the heart and vasculature: possible involvement in the cardiovascular actions of converting enzyme inhibitors. *Am J Cardiol*, 1990, 65: 3I~10I.
- 2 Owen GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth cells. *Am J Physiol*, 1989, 257: H1 755~765.
- 3 Pipili-Synetos E, Sideri E, Catravas JD, et al. Endothelium removal does not abolish angiotensin converting enzyme activity from the mesenteric bed of the rat. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40: 1 149~151.
- 4 Campbell DJ, Kladis A, Valentijn AJ. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 26: 233~240.
- 5 Mizuno K, Tani M, Hashimoto S, et al. Effects of losartan, a nonpeptides angiotensin I receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin content in spontaneously hypertensive rats. *Lif Sci*, 1992, 51: 367~374.
- 6 Chen DG, Jin XQ, Wang HJ, et al. Mechanisms responsible for sustained hypotension after captopril treatment. *J Hypertens*, 1995, 13: 1 113~121.
- 7 Linz W, Scholkens BA. A specific β_2 -bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antiproliferative effect of ramipril. *Br J Pharmacol*, 1992, 105: 771~772.
- 8 Crozat A, Penhoat A, Saez JM. Processing of angiotensin I (A-I) and (Sar¹, Ala³) A-I by cultured bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*, 1986, 118: 2 312~318.
- 9 Johnston CI, Fabris B, Yamada H, et al. Comparative studies of tissue inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens*, 1989, 7 (Suppl 5): 511~516.
- 10 Nakata K, Nishimura K, Takada T, et al. Effects of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, SA446, on tissue ACE activity in normotensive, spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1987, 9: 305~310.

(1997-06-05 收到, 1997-08-19 修回)