

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-02-0108-04

## 氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化因子-1 表达的影响

李爱民, 何作云, 周小波, 覃 军, 耿建萌

(第三军医大学新桥医院心内科, 重庆市 400037)

[主题词] 肌, 平滑, 血管; 血管紧张素  $\text{E}_1$  单核细胞趋化蛋白-1; 受体, 血管紧张素  $\text{E}_1$  受体拮抗剂; 氯沙坦

[摘 要] 为了探讨血管紧张素  $\text{E}_1$ 受体拮抗剂氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响, 以培养兔主动脉平滑肌细胞为研究对象, 分别给予不同浓度血管紧张素  $\text{E}_1$ 和/或血管紧张素  $\text{E}_1$ 受体拮抗剂氯沙坦, 采用免疫组织化学、原位杂交与酶联免疫吸附技术检测不同处理组平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 蛋白及其 mRNA 表达和平滑肌细胞培养介质中单核细胞趋化蛋白-1 含量的变化。结果发现,  $10^{-6} \sim 10^{-10}$  mol/L 血管紧张素  $\text{E}_1$ 呈剂量依赖性增加平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 蛋白及其 mRNA 表达水平, 增高培养介质中单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量( $P$  均  $< 0.001$ )。  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  mol/L 氯沙坦预处理使血管紧张素  $\text{E}_1$ 刺激的平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 蛋白及其 mRNA 表达水平及培养介质中单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量明显减低( $P$  均  $< 0.001$ )。以上结果提示, 氯沙坦可拮抗血管紧张素  $\text{E}_1$ 所致的平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 的表达与分泌, 这可能有助于减轻或防治某些病理状态下血管平滑肌细胞的增殖与迁移。

[中图分类号] R962

[文献标识码] A

## Effects of Angiotensin $\text{E}_1$ on Protein and mRNA Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Cultured Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells

LI Ai-Min, HE Zuo-Yun, ZHOU Xiao-Bo, QIN Jun, and GENG Jian-Meng

(Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**MeSH** Muscle, Smooth, Vascular; Angiotensin  $\text{E}_1$  Monocyte Chemoattractant Protein 1; Receptor, Angiotensin  $\text{E}_1$  Receptor/antagonist; Losartan

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the role of angiotensin  $\text{E}_1$ receptor antagonist losartan on the protein and mRNA expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in cultured rabbit aortic smooth muscle cells (SMC). **Methods** The levels of protein and mRNA expression of MCP-1 in cultured SMC and the contents of MCP-1 in the cultured media of SMC were detected by cytochemistry, situ hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results**  $10^{-6} \sim 10^{-10}$  mol/L angiotensin  $\text{E}_1$  (AT  $\text{E}_1$ ) increased the levels of protein and mRNA expression of MCP-1 in the cultured rabbit aortic SMC in a dose-dependent manner and the contents of MCP-1 in the cultured media of SMC ( $P < 0.001$ ). Losartan markedly reduced the protein and mRNA expression of MCP-1 in the cultured rabbit aortic SMC and the contents of MCP-1 in the cultured media of SMC induced by AT  $\text{E}_1$ . **Conclusions** Losartan may antagonist AT  $\text{E}_1$  induced protein and mRNA expression and secretion of MCP-1 in the cultured rabbit aortic SMC, which might play an important role in preventing the early atherosclerosis and the restenosis after angioplasty.

血管平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)增生与迁移是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和血管成形术后再狭窄发生中的关键事件, 单核细胞趋化

蛋白-1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)是一种强力趋化因子。研究发现 As 病灶 SMC 内 MCP-1 蛋白及 mRNA 呈阳性表达<sup>[1]</sup>, 提示 MCP-1 可能在 As 的发生与发展过程中发挥重要作用。近年来发现肾素血管紧张素系统与 As 的发生密切相关, 血管紧张素  $\text{E}_1$ (angiotensin  $\text{E}_1$ )可诱导 SMC 增殖与迁移<sup>[2]</sup>, 但其是否促进 SMC 合成与分泌 MCP-1 尚待探讨。本试验利用体外培养幼兔 SMC 为研究对象, 通过免疫细胞化学、分子杂交技术及酶联免疫吸附分析(ELISA), 观察血管紧张素  $\text{E}_1$ 对 SMC 内 MCP-1 蛋

[作者简介] 李爱民, 男, 1963 年出生, 湖南人, 博士, 第三军医大学新桥医院心内科副教授、副主任医师, 主要从事冠心病与心力衰竭的基础与临床研究。何作云, 男, 1939 年出生, 辽宁人, 硕士, 第三军医大学新桥医院心内科教授、主任医师、博士生导师, 主要从事冠心病与高血压的基础与临床研究。周小波, 男, 1970 年出生, 江西人, 硕士, 第三军医大学新桥医院心内科讲师、主治医师, 主要从事冠心病与心肌肥大的基础与临床研究。

白及 mRNA 表达的影响及血管紧张素  $\text{①}$ 受体拮抗剂氯沙坦的干预效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物选择

选择体重为 0.6~1.0 kg 的健康日本雄性幼兔。

### 1.2 细胞培养方法

无菌操作下取出胸主动脉,贴块法培养 SMC。待细胞达 80%~90% 融合时消化传代于 35 mm 培养皿(内置盖玻片),使细胞密度为  $1 \times 10^8$  个/L。24 h 后换成含 1% 胎牛血清(FCS, Sigma 公司)的无酚红 F-12 HAM 培养基(Sigma 公司),按分组分别加入  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  mol/L 血管紧张素  $\text{①}$ (Sigma 公司)和/或  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  mol/L 氯沙坦(由美国默沙东公司惠赠)。继续 37℃ 培养 48 h 后分别收集培养基和细胞用于细胞化学·原位杂交与酶联免疫吸附分析。实验用第 3~5 代细胞。

### 1.3 分组

实验分四组进行。对照组:仅加含 1% FCS 的培养基;④血管紧张素  $\text{①}$ 组:1% FCS 培养基+  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  mol/L 血管紧张素  $\text{①}$ ;④干预组:预先加入终浓度为  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  mol/L 氯沙坦,30 min 后加入  $10^{-7}$  mol/L 血管紧张素  $\text{①}$ 。氯沙坦组:1% FCS 培养基加  $10^{-5}$  mol/L 氯沙坦。每组取 8 个样本,取平均数作为每一观察亚组的计量值。

### 1.4 平滑肌细胞培养介质中单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量检测

采用 ELISA 法,按试剂盒操作说明进行。主要步骤如下:加入生物素化抗体至预包被有鼠抗人 MCP-1 单克隆抗体的酶标板孔中,加 MCP-1 标准品(0、51、128、320、800 和 2 000 ng/L)或 1:2 稀释的待测培养基,25℃ 孵育 2 h。倾去板孔内液体,洗板 3 次。加链霉卵白素-辣根过氧化物酶工作液,25℃ 孵育 30 min。加 TMB 底物液,置暗处室温显色 30 min,加终止液终止显示色反应。在 DG-3022A 型酶联免疫检测仪上,450 nm 波长下检测各孔吸光度(OD 值)。以浓度值为横坐标,所测各标准 OD 值为纵坐标,绘制 MCP-1 标准曲线。利用各样本孔测得的 OD 均值,从标准曲线上查得相应的浓度值,以 ng/L 表示。每组均作 8 个样本,每个样品及标准曲线各浓度均作复孔,取其均值作为每组浓度值。ELISA 试剂盒购自美国 Endogen 公司。

### 1.5 单核细胞趋化蛋白-1 免疫组织化学分析

采用 SP 法,试剂盒购自北京中山公司。SMC 以

丙酮固定 10 min,0.75%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶 37℃,30 min。正常羊血清封闭后加 1:500 鼠抗人 MCP-1 单克隆抗体,37℃,60 min。加 1:100 羊抗鼠 IgG,37℃,30 min。加 1:100 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素,37℃,30 min。DAB 染色,脱水、透明、中性树胶封片。镜下观察,并采用重庆大学生产的 Tiger 920 型细胞图像分析仪进行 MCP-1 蛋白的半定量分析。

### 1.6 培养细胞原位杂交分析

杂交所用探针为 35 个碱基的寡核苷酸链(由中国科学院上海生物化学研究所合成),其序列为:5'-CGG ATG TTG GGT TTG CTT GTC CAG GTG GTC CAA GG-3',与兔 MCP-1 cDNA 序列的 257~291 互补。用地高辛 3'-末端法标记探针。4% 多聚甲醛/PBS(pH 7.0,无 RNA 酶)固定,4℃×60 min。蛋白酶 K(5  $\mu\text{g/L}$ )消化,37℃×10 min;0.1 mol/L 三乙醇胺(含 0.25% 乙酸酐),25℃×10 min;2×SSC 漂洗,10 min×2 次;滴加 0.5 mg/L 浓度的 MCP-1 寡核苷酸探针 20  $\mu\text{L}$ ,加盖原位杂交专用盖玻片,置湿盒内 37℃×24 h 以上。4×SSC 漂洗 15 min,2×SSC 漂洗 30 min,1×SSC 漂洗 10 min,0.5×SSC 漂洗 10 min,0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min×2 次。加 1:2000 抗地高辛-碱性磷酸酶抗体 50  $\mu\text{L}$ (0.3% Triton X-100/PBS, pH 7.2),湿盒内 37℃放置 4~5 h。TSM1 及 TSM2 漂洗,各 10 min×2 次。TSM2 稀释的 1:100 NBT/BCIP(pH 9.5)显色,室温,3~4 h;0.05 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 10 min×2 次,蒸馏水充分冲洗,脱水透明中性树胶封片,显微镜下观察及 MCP-1 mRNA 阳性信号的半定量图象分析(方法同 1.4)。阴性对照用预杂交液替代探针工作液。

### 1.7 统计学处理

计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。用单因素方差分析比较组间差异显著性。 $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 平滑肌细胞培养介质内单核细胞趋化蛋白-1 含量

培养介质内单核细胞趋化蛋白-1 的含量见表 1(Table 1)。可见  $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  mol/L 血管紧张素  $\text{①}$  刺激组培养介质中 MCP-1 蛋白含量明显增加(与对照组比较  $P$  均 $< 0.001$ )。 $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  mol/L 氯沙坦预处理组 MCP-1 含量明显下降(与  $10^{-7}$  mol/L 血管紧张素  $\text{①}$ 刺激组比较,  $P$  均 $< 0.001$ )。

表 1. 氯沙坦对平滑肌细胞培养介质中单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量的影响

Table 1. Effects of losartan on the contents of MCP-1 in cultured SMC media ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Groups	MCP-1
Control	0.26 $\pm$ 0.23
AT $\mu$ mol/L)	
10 <sup>-6</sup>	0.65 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
10 <sup>-7</sup>	0.56 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
10 <sup>-8</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
10 <sup>-10</sup>	0.32 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>
Losartan(mol/L)	
10 <sup>-5</sup>	0.26 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
10 <sup>-6</sup>	0.26 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
10 <sup>-7</sup>	0.42 $\pm$ 0.06

a:  $P < 0.001$ , compared with control group; b:  $P < 0.001$ , compared with 10<sup>-7</sup> AT  $\mu$ mol/L group.

## 2.2 平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 的表达

基础状态下 SMC 内 MCP-1 蛋白呈弱阳性表达, 而 SMC 经 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-10</sup> mol/L AT  $\mu$ mol/L 刺激后 MCP-1 蛋白表达明显增加; 10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-7</sup> mol/L 氯沙坦预处理后 (10<sup>-7</sup> mol/L  $\mu$ mol/L) SMC 内 MCP-1 蛋白表达明显减弱 (表 2 和图 1, Table 2 and Figure 1)。

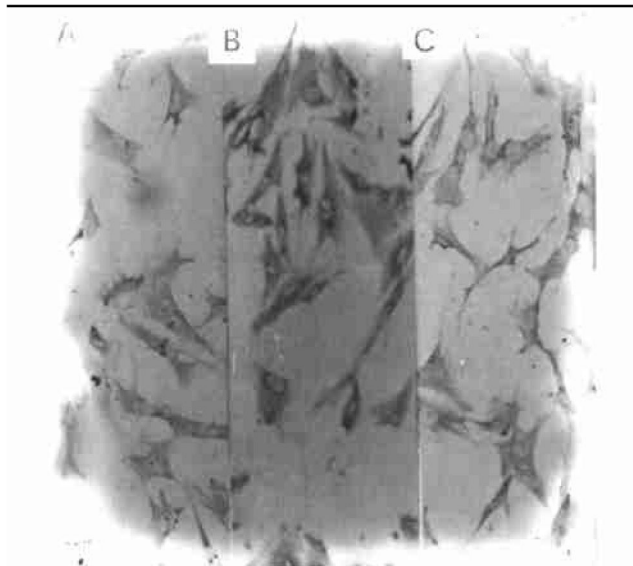


图 1. 平滑肌细胞内的单核细胞趋化蛋白-1 蛋白染色信号 ( $\times 300$ ). A, 对照组; B, 血管紧张素  $\mu$ mol/L 组; C, 氯沙坦组。

Figure 1. Staining of MCP-1 protein within SMC. A is Control group, B is angiotensin  $\mu$ mol/L group, and C is losartan group.

## 2.3 平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 表达结果

对照组 SMC 内仅有弱的 MCP-1 mRNA 信号表

达, 而 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-10</sup> mol/L 血管紧张素  $\mu$ mol/L 刺激后 MCP-1 mRNA 信号表达平均积分光密度值均明显增强 (与对照组比较  $P$  均  $< 0.01$ ), 10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-7</sup> mol/L 氯沙坦预处理组的平均积分光密度值显著下降 (与 10<sup>-7</sup> mol/L 血管紧张素  $\mu$ mol/L 组比较,  $P$  均  $< 0.01$ ) (表 2 和图 2, Table 2, and Figure 2)。

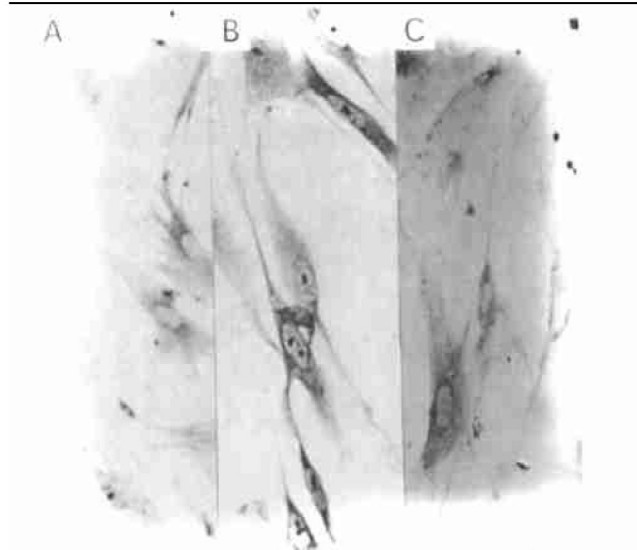


图 2. 平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 阳性染色信号 ( $\times 300$ ). A, 对照组; B, 血管紧张素  $\mu$ mol/L 组; C, 氯沙坦组。

Figure 2. Staining of MCP-1 mRNA within SMC. A is Control group, B is angiotensin  $\mu$ mol/L group, and C is losartan group.

表 2. 氯沙坦对培养的平滑肌细胞内单核细胞趋化蛋白-1 蛋白及其 mRNA 表达的影响

Table 2. Effects of losartan on expression of MCP-1 protein and mRNA in cultured SMC ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ , OD/ $\mu$ m<sup>2</sup>)

Groups	MCP-1 protein	MCP-1 mRNA
Control	0.016 $\pm$ 0.006	0.025 $\pm$ 0.004
AT $\mu$ mol/L)		
10 <sup>-6</sup>	0.127 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.220 $\pm$ 0.034 <sup>a</sup>
10 <sup>-7</sup>	0.107 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	0.157 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>
10 <sup>-8</sup>	0.070 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.082 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>
10 <sup>-10</sup>	0.028 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.038 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
Losartan(mol/L)		
10 <sup>-5</sup>	0.017 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.026 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
10 <sup>-6</sup>	0.028 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.033 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>
10 <sup>-7</sup>	0.076 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.061 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.001$ , compared with control group; b:  $P < 0.001$ , compared with 10<sup>-7</sup> AT  $\mu$ mol/L group.

## 3 讨论

近期研究表明肾素血管紧张素系统参与了 As 的发生发展过程<sup>[3]</sup>。血管紧张素  $\mu$ mol/L 作为一种强烈的

有丝分裂原在促进细胞增生与迁移中发挥重要作用。研究发现 As 病灶的 SMC 内 MCP-1 及 MCP-1 受体 mRNA 表达呈阳性,提示 MCP-1 可能参与了 As 的发生与发展,SMC 不仅可作为 MCP-1 的效应细胞,而且还可自行合成与分泌 MCP-1 而影响其它细胞的功能。这可能有助于 As 发生过程中血管 SMC 的增殖与迁移。体外实验表明血管紧张素Ⅱ可促进 SMC 迁移,但血管紧张素Ⅱ是否影响 MCP-1 的表达尚未见报道。本实验显示不同浓度血管紧张素Ⅱ可明显增加培养 SMC 内 MCP-1 蛋白及其 mRNA 表达水平,还使培养 VSMC 介质中 MCP-1 蛋白水平明显升高,氯沙坦预处理可消除血管紧张素Ⅱ的促 MCP-1 表达效应。提示血管紧张素Ⅱ不仅加速 SMC 内 MCP-1 合成,同时还加速其分泌,这可能有助于病理状态下 SMC 的迁移。

血管平滑肌细胞(SMC)内 MCP-1 表达增加的机制尚不十分清楚,有研究显示核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和活化蛋白-1(AP-1)可能介导了血管紧张素Ⅱ所诱导的 MCP-1 表达增加<sup>[4,5]</sup>,而 NF- $\kappa$ B 及 AP-1 活化的机制可能是多因素性的,包括蛋白激酶 C 在内的蛋白激酶活性增强、STATs 家族蛋白、磷脂酶 C 活性增强及反应氧产物聚集均可激活 NF- $\kappa$ B。最近研究发现丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶可能也与 NF- $\kappa$ B 的激活有关<sup>[6]</sup>,且 NF- $\kappa$ B 与 AP-1 的协同作用是 MCP-1 表达的关键。此外 AT<sub>2</sub>还可直接激活丝裂素活化蛋白激酶<sup>[7]</sup>,从而诱导细胞增生与分化。

血管紧张素Ⅱ通过与血管紧张素Ⅱ受体结合而发挥作用。血管紧张素Ⅱ受体按照配体的选择性、转导与结构差异一般分为两种亚型,即血管紧张素 1 型与血管紧张素 2 型受体。其中血管紧张素 1 型受体通过与 G 蛋白偶联而介导诸如血管收缩、细胞生长、离子代谢、酶活性增高及刺激醛固酮产生血管 SMC 表面血管紧张素 1 受体位点占血管紧张素Ⅱ结合的 80% 以上。血管紧张素 2 型受体主要分布于胚胎及新生胎儿体内,其转导过程及功能尚不十分清楚<sup>[8]</sup>。血管紧张素Ⅱ与血管紧张素 1 受体结合,通过 G 蛋白途径激活磷脂酶 C,加速磷脂酰肌醇水

解,然后激活蛋白酶 C,促使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放,并通过蛋白磷酸化而产生一系列细胞内效应来调节细胞生长、增生。氯沙坦为一种非肽类血管紧张素 1 受体拮抗剂,它竞争性地与 SMC 表面血管紧张素 1 受体结合,从而拮抗血管紧张素Ⅱ的生物学效应。本实验发现用氯沙坦预处理培养血管 SMC 后,血管紧张素Ⅱ所诱导的 MCP-1 mRNA 表达及其蛋白合成与分泌均明显减少,提示氯沙坦可阻断血管紧张素Ⅱ的促 MCP-1 表达效应,这可能对于防治 As 及血管成形术后再狭窄等病理过程有着十分重要的意义,应进一步进行在体实验以确定氯沙坦的体内效应。

#### 参考文献

- [1] Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 in human atherosclerotic plaques [J]. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1 121- 127
- [2] Kohno M, Yokokawa K, Kano H, et al. Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensinⅡ-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 1997, **29**: 1 309- 313
- [3] Hernandez-Presa M, Butos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- $\kappa$ B activation, monocyte chemoattractant protein 1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 1 532- 541
- [4] Martin T, Cardarelli PM, Parry CG, et al. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF- $\kappa$ B and AP-1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, **27**: 1 091- 097
- [5] Ruiz OM, Lorenzo O, Ruperez M, et al. AngiotensinⅡ-activated nuclear transcription factor- $\kappa$ B through AT1 and AT2 in smooth muscle cells: molecular mechanisms [J]. *Circ Res*, 2000, **86**: 1 266- 272
- [6] Suzuki YJ, Mizuno M, Packer L, et al. Signal transduction for nuclear factor- $\kappa$ B activation: proposed location of antioxidant-inhibitory step [J]. *J Immunol*, 1994, **153**: 5 008
- [7] Duff JL, Berk BC, Corson MA. AngiotensinⅡ stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured aortic smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **188**: 257 - 264
- [8] Lorell BH. Roles of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and disease [J]. *Am J Cardiol*, 1999, **83**: 48H- 52H

(此文 2000- 11- 07 收到, 2001- 04- 22 修回)

(此文编辑 胡必利)