

心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞对血管紧张素Ⅱ的反应性

申景平, 李瑞峰, 雷立权¹, 高广道¹

(山东大学医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012;

1. 西安交通大学医学院病理生理学教研室, 陕西省西安市 710061)

[主题词] 心肌梗死; 血管紧张素Ⅱ; 成纤维细胞; 卡托普利; 洛沙坦; 疾病模型, 动物

[摘要] 为了研究梗死心肌成纤维细胞对血管紧张素Ⅱ的反应性,应用酶法分离、培养经卡托普利和洛沙坦干预后的成年大鼠梗死心肌成纤维细胞,检测在不同处理因素下,血管紧张素Ⅱ对培养的成纤维细胞的³H-胸腺嘧啶脱氧核苷、¹⁴C-尿嘧啶核苷和³H-脯氨酸掺入率的影响。结果发现,在相同浓度血管紧张素Ⅱ(10^{-7} mol/L)的作用下,对照组的成纤维细胞对上述三种底物的掺入率均显著高于假手术组($P < 0.05$);而卡托普利和洛沙坦两干预组分别与假手术组相比,均无显著性差异($P > 0.05$)。血管紧张素Ⅱ的上述作用均不能被血管紧张素Ⅱ型受体阻滞剂洛沙坦完全阻断,但能被血管紧张素Ⅱ特异性拮抗剂(1.8 血管紧张素Ⅱ和血管紧张素抗肽)完全阻断。结果提示,血管紧张素Ⅱ可直接作用于非梗死区心肌的成纤维细胞,促进成纤维细胞的 DNA、RNA 和蛋白质合成;介导血管紧张素Ⅱ对成纤维细胞作用除血管紧张素Ⅱ型受体外,还有其他因素参与。长期应用卡托普利可显著降低心肌梗死后心肌成纤维细胞对血管紧张素Ⅱ的反应性,而洛沙坦只能部分降低成纤维细胞的反应性。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The Responseness of the Fibroblasts from the Myocardium-Infarcted Rats to Angiotensin Ⅱ

SHEN Jing-Ping, LI Rui-Feng, LEI Li-Quan, and GAO Guang-Dao

(Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

[MeSH] Myocardial Infarction; Angiotensin Ⅱ; Fibroblasts; Captopril; Losartan; Disease Models, Animal

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the responsiveness of the fibroblasts from the myocardium infarcted rats to angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ).

Methods With the tissue isolation, cell culture and the uptake rates of ³H-thymidine (³H-TdR), ¹⁴C-uridine (¹⁴C-UR) and ³H-proline (³H-Pro) representing syntheses of DNA, RNA and collagen protein of isolated fibroblasts (Fbs) from the heart of myocardial infarction (MI) rats and sham-operated (SO) which were treated with losartan or captopril for 6 weeks, respectively.

Results The uptake rates of ³H-TdR, ¹⁴C-UR and ³H-Pro of Fbs from MI group treated with losartan or captopril are not significantly different from those of the SO one, respectively. These effects of Ang Ⅱ on Fbs are abolished completely by 1.8 Ang Ⅱ and angiotensin antipeptide, but not completely by angiotensin receptor-1 antagonist, losartan.

Conclusion The findings suggest that the responsiveness of Fbs to Ang Ⅱ from MI rats treated with either losartan or captopril is significantly lower than that from that from the MI rats. Ang Ⅱ acts on the Fbs from normal or hypertrophied myocardium via not only AT1 receptor, but also other mechanisms involving in the effects of Ang Ⅱ to Fbs.

心脏内的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在心肌梗死(myocardial infarction, MI)后的心室肌重构中起着重要作用^[1,2]。近年来发现,血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂洛沙坦(losartan)也具有与血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)相当的疗效^[3]。心肌梗死后长期应用洛沙坦干预,是否也能阻抑心肌成纤维细胞增殖,对血管紧张素的反应性是否也有影响,尚未见报道。为此,本研究通过分离心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞,对上述问题进行探讨。

[收稿日期] 2001-08-14 [修回日期] 2002-02-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39270315)资助。

[作者简介] 申景平,男,山东省成武县人,1966年7月出生,现为中国医学科学院基础医学研究所在读博士研究生。李瑞峰,男,山东省无棣县人,1955年4月出生,山东大学医学院病理生理学副教授,硕士研究生导师。为本文并列第一作者。雷立权,西安交通大学医学院病理生理学教授。高广道,西安交通大学医学院病理生理学教授,本文通讯作者。

1 材料和方法

1.1 实验分组

选用体重220~260 g健康雌性SD大鼠(西安交通大学医学院实验动物中心提供),术前随机分为梗死组和假手术(sham-operated, SO)组。梗死组再分为对照组(MI)、卡托普利干预组(MI+Cap)和洛沙坦干预组(MI+Los)三个亚组,每组8~12只不等(由于手术组动物死亡率高,所以动物数量也多)。

1.2 大鼠心肌梗死模型的复制

参照文献[4],动物用乙醚麻醉,在无菌条件下于左侧第四肋间切口,迅速挤出心脏,于冠状动脉起点下2 mm~3 mm处实线并结扎左冠状动脉主干,缝合胸壁;假手术组在相应部位穿线,但不结扎,缝合胸壁。

1.3 给药方法

对照组饲以普通水。干预组于术后3天始,分别通过饮水给卡托普利 60 mg/(kg·day) 和洛沙坦 10 mg/(kg·day),连续给药6周。

1.4 成纤维细胞的分离及培养方法^[5]

每组各取6只大鼠,断头处死,无菌条件下,取出心脏,去掉心房大血管、心包及梗死区。将心肌组织剪成1 mm大小,用含0.1%的胰蛋白酶和0.1%的I型胶原酶的无钙Hanks液,37℃水浴消化。弃去第一次消化所得细胞悬液,收集其余各次所得细胞悬液。用贴壁法将死亡心肌细胞、成纤维细胞和其他的细胞除去。将细胞移至含10%的小牛血清(SBS)和双抗(青霉素和链霉素)的Eagle培养基将贴壁细胞按 10^7 细胞/L的浓度接种于3瓶5 mL培养瓶中,每瓶1 mL,置于二氧化碳培养箱(37℃,5% CO₂,95%空气)培养。48 h后弃去培养液,更换新的不含小牛血清的培养基,再培养24 h,加入各种处理因素。本室研究发现,血管紧张素 ① 浓度在 10^{10} mol/L~ 10^7 mol/L时,掺入率随浓度的增大而升高,但在 10^7 mol/L~ 10^5 mol/L时,则随浓度的增加而降低,故除对照组外,血管紧张素 ① 的浓度均为 10^7 mol/L。1.8血管紧张素 ① 和血管紧张素抗肽(Angiotensin antipeptide, Ang-AP)为血管紧张素 ① 的拮抗剂,具有拮抗血管紧张素 ① 的功能。本研究中洛沙坦、1.8血管紧张素 ① 、Ang-AP的浓度均为 10^6 mol/L,与血管紧张素 ① 同时加入培养基中。24 h后终止培养,进行测量。

1.5 DNA、RNA和蛋白质合成率的测定

用 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(^3H -thymidine, ^3H -TdR)、 ^{14}C -尿嘧啶核苷(^{14}C -uridine, ^{14}C -UR)和 ^3H -脯氨酸(^3H -proline, ^3H -Pro)掺入率来表示心肌成纤维细胞的DNA、RNA和蛋白质的合成率,具体测定方法同文献[5]。在培养24 h后,收获成纤维细胞,用过氯酸-过氧化氢法,制成无色透明液体,用均相法进

行液体闪烁计数测量,并通过内标准源法进行淬灭校正。由于成纤维细胞胶原的代谢率较慢,故 ^3H -脯氨酸的掺入率较低,为了降低测量误差,每份样本测量时间均在10 min以上,最后计算出各样本 ^3H 和 ^{14}C 的实际衰变率(dpm/ 10^4 cells)。

1.6 统计学处理

实验数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均数差异的显著性以组间检验和方差分析进行测试,显著性水准为 $P < 0.05$ 。

2 实验结果

在基础状态下(磷酸盐缓冲液, PBS), SO组分别与两干预组(MI+ Cap和MI+ Los)相比,成纤维细胞的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(表1, Table 1)、 ^{14}C -尿嘧啶核苷(表2, Table 2)和 ^3H -脯氨酸(表3, Table 3)掺入率均无显著差异。

在相同浓度的血管紧张素 ① (10^7 mol/L)作用下,两干预组(MI+ Cap和MI+ Los)成纤维细胞的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(表1, Table 1)、 ^{14}C -尿嘧啶核苷(表2, Table 2)和 ^3H -脯氨酸(表3, Table 3)的掺入率则显著低于MI组($P < 0.05$),而两干预组之间无显著差异。

血管紧张素 ① 对 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(表1, Table 1)、 ^{14}C -尿嘧啶核苷(表2, Table 2)和 ^3H -脯氨酸(表3, Table 3)的掺入率可分别被血管紧张素 ① 拮抗剂(1.8Ang ① 及Ang-AP完全阻断,但不能被洛沙坦完全阻断。表现为血管紧张素 ① + Los组与血管紧张素 ① 组相比,成纤维细胞的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷(表1, Table 1)、 ^{14}C -尿嘧啶核苷(表2, Table 2)和 ^3H -脯氨酸(表3, Table 3)的掺入率三组虽降低,但仍高于各自的基础状态值(PBS)($P < 0.05$)。

表1. 血管紧张素 ① 对成纤维细胞的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷掺入率的影响(kdpm/ 10^4 cells)

Table 1. The effect of Ang ① on the uptake rate of ^3H TdR in fibroblasts of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	PBS	Ang ①	Ang ① (16)	Ang ①	Ang ① 20.
SO	11.8 \pm 1.0	18.3 \pm 1.8 ^d	15.8 \pm 1.0 ^d	12.3 \pm 1.1	11.8 \pm 1.0
MI	12.4 \pm 0.8	21.5 \pm 1.6 ^d	18.2 \pm 1.1 ^d	12.9 \pm 1.0	12.8 \pm 0.9
MI+ Los	11.9 \pm 1.1	18.0 \pm 1.0 ^{ad}	14.8 \pm 0.9 ^d	12.8 \pm 0.7	12.2 \pm 0.7
MI+ Cap	12.7 \pm 1.0	17.4 \pm 1.0 ^{ad}	14.6 \pm 1.0 ^d	11.8 \pm 0.5	12.0 \pm 0.8

Ang ① (16) = Ang ① + Los, Ang ① = Ang ① + 1.8Ang ① , and Ang ① 20. = Ang ① + Ang-AP. a: $P < 0.05$,

compared with MI group; d: $P < 0.05$, compared with PBS treated.

表 2. 血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 对成纤维细胞的 ^{14}C -尿嘧啶核苷掺入率的影响 (dpm/ 10^4 cells)Table 2. The effect of Ang \textcircled{II} on the uptake rate of ^{14}C -UR in fibroblasts of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

Groups	PBS	Ang \textcircled{II}	Ang \textcircled{II} (10)	Ang \textcircled{II}	Ang \textcircled{II} 20.
SO	5614 \pm 311	8958 \pm 766 ^d	6422 \pm 343 ^d	5632 \pm 354	5293 \pm 274
MI	5495 \pm 258	10758 \pm 856 ^d	7168 \pm 326 ^d	6052 \pm 367	5828 \pm 336
MI+ Los	5662 \pm 350	9232 \pm 662 ^{ad}	6884 \pm 289 ^d	5499 \pm 280	5514 \pm 368
MI+ Cap	5707 \pm 270	8941 \pm 749 ^{ad}	6730 \pm 301 ^d	5552 \pm 339	5584 \pm 336

Ang \textcircled{II} (10) = Ang \textcircled{II} + Los, Ang \textcircled{II} = Ang \textcircled{II} + 1.8 Ang \textcircled{II} , and Ang \textcircled{II} 20. = Ang \textcircled{II} + Ang-AP. a: $P < 0.05$, compared with MI group; d: $P < 0.05$, compared with PBS treated.

表 3. 血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 对成纤维细胞的 ^3H -脯氨酸掺入率的影响 (dpm/ 10^4 cells)Table 3. The effect of Ang \textcircled{II} on the uptake rate of ^3H -Pro in fibroblasts of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

Groups	PBS	Ang \textcircled{II}	Ang \textcircled{II} (10)	Ang \textcircled{II}	Ang \textcircled{II} 20.
SO	55 \pm 7	104 \pm 11 ^d	74 \pm 7 ^d	52 \pm 4	62 \pm 8
MI	65 \pm 8	149 \pm 134 ^d	92 \pm 8 ^d	70 \pm 6	61 \pm 6
MI+ Los	64 \pm 5	96 \pm 10 ^{ad}	85 \pm 6 ^d	56 \pm 5	68 \pm 6
MI+ Cap	59 \pm 7	87 \pm 11 ^{ad}	77 \pm 9 ^d	59 \pm 6	60 \pm 9

Ang \textcircled{II} (10) = Ang \textcircled{II} + Los, Ang \textcircled{II} = Ang \textcircled{II} + 1.8 Ang \textcircled{II} , and Ang \textcircled{II} 20. = Ang \textcircled{II} + Ang-AP. a: $P < 0.05$, compared with MI group; d: $P < 0.05$, compared with PBS treated.

3 讨论

本研究表明,在相同浓度血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ (10^{-7} mol/L) 的作用下,卡托普利和洛沙坦长期 (42 天) 干预组 (MI+ Cap、MI+ Los) 大鼠非梗死区中成纤维细胞的 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷、 ^{14}C -尿嘧啶核苷、 ^3H -脯氨酸掺入率显著地低于心肌梗死组 ($P < 0.05$),而两干预组 (MI+ Cap 和 MI+ Los) 间无显著性差异。提示长期应用卡托普利和洛沙坦可同等程度地降低心肌梗死后心肌成纤维细胞对血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 的反应性,降低成纤维细胞核酸和胶原蛋白的合成。Nio 等^[6] 报道,心肌梗死后心脏内的肾素-血管紧张素系统被激活,通过一系列的生物学反应使心肌成纤维细胞上的血管紧张素 1 型受体上调,参与心肌肥大和心肌纤维化。有意思的是,洛沙坦并不能完全阻断血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 对成纤维细胞的作用,提示血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 促进成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成可能还与血管紧张素 1 型受体外的机制有关,如血管紧张素 2 型受体的活性和数量是否也发生改变,有待进一步探讨。Schieffer 等^[7] 报道,心肌梗死后 1 周始,连用血管紧张素转化酶抑制剂或洛沙坦 6 周,可减缓非梗死区的纤维化,二者作用相当。尽管二者的作用机制不同,但血管紧张素 1 型受体阻滞剂与

血管紧张素转化酶抑制剂均可以降低心肌血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 的含量。本实验从离体水平上进一步证明,两者均可降低心肌梗死后心肌成纤维细胞对血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 的反应性,为心肌梗死后心力衰竭的防治提供重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] Dzau V. Cardiac renin-angiotensin system: molecular and functional aspects. *Am J Med*, 1988, **84**(Suppl 3A): 22
- [2] 李刚,陈运贞,姚珍薇,等. 缺失型血管紧张素转化酶基因与陈旧性心肌梗死患者胰岛素抵抗的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 48-50
- [3] Greenwald L, Becker RC. Expanding the paradigm of the renin-angiotensin system and angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am Heart J*. 1994, **128**: 996
- [4] Shen JP, Lei LQ, Gao GD, et al. The study on the mechanism and the effects of angiotensin $\text{Ang } \textcircled{II}$ on synthesis of nucleic acid, protein and collagen in myocytes and fibroblasts isolated from myocardium infarcted rats. *J Xi'an Med Univ*, 1997, **9**: 127
- [5] 申景平,雷立权,高广道,等. 血管紧张素 $\text{Ang } \textcircled{II}$ 对心肌梗死大鼠成纤维细胞核酸、胶原合成影响的研究. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (1): 5-7
- [6] Nio Y, Matsubara H, Murasawa L, et al. Regulation of gene transcription of angiotensin $\text{Ang } \textcircled{II}$ receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 46
- [7] Schieffer B, Winger A, Meybrunn M, et al. Comparative effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin $\text{Ang } \textcircled{II}$ type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 1994, **89**: 2273

(此文编辑 胡必利)