

[文章编号] 1007-3949(2003)11-02-0135-04

• 实验研究 •

醛固酮促进血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导大鼠心脏成纤维细胞合成胶原

曹 政¹, 王家宁¹, 杨桂元¹, 李建军²

(1. 郧阳医学院内科学教研室, 湖北省十堰市 442000; 2. 武汉大学人民医院心血管内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 内科学; 心肌纤维化; 逆转录—聚合酶链反应; 醛固酮; 心脏成纤维细胞; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体; 血管紧张素

[摘要] 为探讨醛固酮对大鼠心脏成纤维细胞血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体表达的影响及醛固酮对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 促进心脏成纤维细胞胶原代谢效应的影响, 采用 ^3H -脯氨酸掺入法对体外分离培养的心脏成纤维细胞分别检测醛固酮、血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 以及二者共同作用后对心脏成纤维细胞胶原合成量的影响; 分别利用放射配体结合实验和半定量逆转录—聚合酶链反应测定经醛固酮处理后细胞血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体及其 mRNA 的表达水平, 并比较其与对照组间的差异。结果发现血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (10^{-7} mol/L) 可使心脏成纤维细胞胶原合成量显著增加 ($P < 0.01$), 醛固酮对心脏成纤维细胞的胶原合成无影响, 但醛固酮可明显地增强血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 促进心脏成纤维细胞胶原合成的效应; 经醛固酮 (10^{-7} mol/L) 处理的心脏成纤维细胞血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体的表达与对照组比较明显升高 (2 倍), 细胞血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体 mRNA 的水平也较对照组显著增加 (1.5 倍)。结果说明醛固酮虽然不能通过直接作用影响心脏成纤维细胞的胶原代谢, 但它可以通过上调心脏成纤维细胞血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体的表达来增强血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 致心脏成纤维细胞胶原合成增多的效应。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Aldosterone Potentiate Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ Induced Collagen Synthesis in Rat Cardiac Fibroblasts

CAO Zheng¹, WANG Jia Ning¹, YANG Gui Yuan¹, and LI Jian Jun²

(1. Department of Medicine, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei Province 442000; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Cardiac Fibrosis; Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; Aldosterone; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; Cardiac Fibroblasts; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ Type 1 Receptor; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of aldosterone on expression of angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ type 1 (AT₁) receptor in rat cardiac fibroblasts (CFs) and test the effect of aldosterone on Ang $\text{Ang} \text{ II}$ induced collagen synthesis. **Methods** Cardiac fibroblasts culture were established from neonatal rats. Collagen synthesis was measured by ^3H -proline incorporation after incubation with Ang $\text{Ang} \text{ II}$, aldosterone and Ang $\text{Ang} \text{ II}$ plus aldosterone. The density of AT₁ receptor was determined by ^{125}I -Ang $\text{Ang} \text{ II}$ saturation binding, and AT₁ receptor mRNA levels were analyzed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results Ang $\text{Ang} \text{ II}$ increased collagen synthesis in cultured CFs; while aldosterone did not affect production of collagen. However, aldosterone could significantly potentiate the incremental effect of Ang $\text{Ang} \text{ II}$ on collagen synthesis in CFs. The density of AT₁ receptor increased 2-fold and was accompanied by a 1.5-fold increase in the corresponding mRNA after treatment of aldosterone (10^{-7} mol/L). **Conclusion** Aldosterone does not exert a direct effect on collagen synthesis in cultured rat CFs, but could influence the collagen output of CFs through the upregulated AT₁ receptor.

目前研究表明肾素—血管紧张素—醛固酮系统在心肌纤维化的形成和发展中起到了至关重要的作用^[1], 现已证实: 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin, Ang $\text{Ang} \text{ II}$) 具有较强的致心肌纤维化作用, 它可以通过血管紧

张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 型受体 (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ type 1 receptor, AT₁R) 的介导直接作用于心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs), 引起胶原合成的增加^[2]; 醛固酮具有很强的致心肌纤维化效应^[3]。而醛固酮与 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 之间也存在着相互作用: 一方面 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 可以刺激醛固酮合成; 另一方面醛固酮又可以增加组织对 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 的结合, 使 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 的生物学效应增强^[4]。同时体内实验也发现在经醛固酮—盐处理后致心肌纤维化形成的大鼠模型中, 其心肌组织 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 受体的水平明显得以上调^[5]。但醛固酮是否能通过上调培养的 CFs 表面的 AT₁ 受体来增强 Ang $\text{Ang} \text{ II}$ 致细胞胶原合成增多的生物

[收稿日期] 2002-10-22 [修回日期] 2003-03-05

[基金项目] 湖北省教育厅资助课题 (2002X00003)

[作者简介] 曹政, 男, 1976 年出生, 湖北省郧县人, 现在武汉大学医学院攻读心血管内科硕士学位, 研究方向为心血管疾病中心室重构的防治, 联系电话: 13972458886, E-mail: caozheng908@163.com。王家宁, 男, 1967 年出生, 湖北省房县人, 副主任医师, 医学博士, 研究方向为心血管疾病分子生物学, 为本文通讯作者, 联系电话: 13986887493。杨桂元, 男, 1940 年出生, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 享受国务院政府特殊津贴专家, 联系电话: 0719-8891188。

学作用,目前尚无相关实验,本实验对此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

醛固酮、Ang Ⅱ和螺内酯均购于美国 Sigma 公司, DMEM 培养基(GIBCO 公司)和逆转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购于 Promega 公司, Trizol 为 GIBCO 公司产品, AT1 受体和 β -actin 的 cDNA 引物为北京赛百盛公司合成, ^{125}I -Ang Ⅱ(比活度为 1 750 uCi/mol) 和 ^3H -脯氨酸购于北京同位素研究所, 闪烁液为含 18.1 mmol/L PPO 和 277.1 $\mu\text{mol/L}$ POPOP 的二甲苯溶液。

1.2 心脏成纤维细胞的培养及鉴定

取出生 1~3 天的 Wistar 大鼠 6~8 只, 在无菌条件下取其心室部分, 剪碎后用胰蛋白酶消化, 每 5 min 收集 1 次细胞, 离心后将所得全部细胞转移至盛有培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM 液)的培养瓶中, 在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 90 min 后采用差速贴壁法分离 CFs, 所得贴壁细胞绝大部分为 CFs, 继续培养待细胞生长接近汇合时, 以 1:3 传代, 选用第 3~5 代细胞用于实验。倒置显微镜下观察, 细胞呈梭形、多角形, 显得较薄, 胞质透明, 胞核较大, 呈椭圆形, 常含有 2~3 个核, 经免疫组织化学 SAB 法染色, 纤维连接蛋白呈阳性, 符合成纤维细胞的染色特征(图 1, Figure 1)。



图 1. 心脏成纤维细胞鉴定图($\times 400$) 箭头处表示抗纤维连接蛋白抗体染色阳性。

Figure 1. The identification of cardiac fibroblasts

1.3 ^3H -脯氨酸掺入实验

取对数生长期的 CFs, 调整细胞密度至 10^8 个/L, 按每孔 1 mL 接种于 24 孔培养板, 静置培养, 待细

胞生长接近汇合状态时, 弃上清, 加入无血清 DMEM 继续培养 24 h 后, 按以下方案给药干预: 空白对照组; ④Ang Ⅱ处理组(10^{-7} mol/L); ④醛固酮处理组(10^{-7} mol/L); Ang Ⅱ(10^{-7} mol/L) + 醛固酮(10^{-7} mol/L) 处理组; 螺内酯干预组预先使用螺内酯(10^{-6} mol/L) 干预后再加 Ang Ⅱ和醛固酮处理。加入上述试剂处理 48 h, 加入 ^3H -脯氨酸(92.5 Bq/L) 和维生素 C(50 $\mu\text{g/L}$), 孵育 4 h 后用胰蛋白酶消化细胞呈细胞悬液, 收集细胞至玻璃纤维滤纸上, 烘干滤纸, 将其置于闪烁计数管中, 每管加入闪烁液 0.5 mL, 用液体闪烁计数仪测定每管放射性。

1.4 逆转录-聚合酶链反应

细胞总 RNA 的提取按照 TRIZOL 试剂盒的要求进行, 紫外分光光度计测定 RNA 吸光度 A_{260}/A_{280} 比值, 根据逆转录试剂盒要求的标准进行逆转录反应, 随后取逆转录反应产物进行扩增, AT1 受体和 β -actin 的引物序列参照文献, 分别为: AT1 受体反义链 5'-GCACAATCGCCATAATTATCG-3', 正义链 5'-CACC-TATGTAAGATCGCTTG-3', 扩增片段长度为 444 bp; β -actin 反义链 5'-TGCTGGGTATGGGTCAGCAGGAC TG-3', 正义链 5'-CATGGCTGGGGTGTGAAGGTCT CA-3', 扩增片段长度为 266 bp。在 95 $^\circ\text{C}$ 变性 4 min 后进入循环, 扩增条件为 94 $^\circ\text{C}$ 1 min \rightarrow 56 $^\circ\text{C}$ 1 min \rightarrow 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 共进行 32 次循环, 最后在 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物在溴乙锭染色的 2% 琼脂糖凝胶上电泳后, 在紫外灯下拍摄照片, 并在凝胶成像分析系统上对扩增产物进行分析, 结果用 AT1 受体扩增产物吸光度积分/ β -actin 扩增产物吸光度积分的比值表示。

1.5 血管紧张素 Ⅱ受体结合实验

待细胞在 24 孔培养板中生长接近汇合状态时, 换用无血清 DMEM 继续培养 24 h, 再使用不同试剂处理 24 h 后, 分别加入 ^{125}I -Ang Ⅱ(0.1~2 nmol/L) 和结合缓冲液(终浓度为 50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.2% BSA), 其中在非特异性结合管中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Ang Ⅱ标准品, 反应总体积为 200 μL 。室温下孵育 1 h 后吸出反应液以终止反应, 同时加入预冷的 PBS 液冲洗 2~3 次, 随后用 NaOH 裂解细胞, 利用 γ -探测仪测定各管裂解液的放射性。

1.6 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差表示, 使用 SPSS 10.0 统计软件处理数据, Scatchard 作图使用 Prism 软件。组间差异比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性。

2 结果

2.1 心脏成纤维细胞对³H-脯氨酸掺入量的影响

血管紧张素Ⅱ处理组细胞对³H-脯氨酸的掺入量较对照组明显增加($P < 0.01$), 醛固酮组 CFs³H-脯氨酸掺入量与空白对照组无统计学差异, 但醛固酮与 AngⅡ共同处理组细胞对³H-脯氨酸的掺入量显著增高, 与 AngⅡ组比较有明显的增加($P < 0.05$, 表 1, Table 1)。

表 1. 醛固酮(10^{-7} mol/L) 对血管紧张素Ⅱ(10^{-7} mol/L) 诱导的心脏成纤维细胞胶原合成的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of aldosterone (10^{-7} mol/L) on AngⅡ(10^{-7} mol/L)-induced collagen synthesis in cardiac fibroblasts

分 组	例数	³ H-脯氨酸 (每分钟计数)
对照组	4	252 ± 35
醛固酮	6	294 ± 47
血管紧张素Ⅱ	6	493 ± 42 ^a
醛固酮+ 血管紧张素Ⅱ	6	689 ± 61 ^{ab}
醛固酮+ 血管紧张素Ⅱ+ 螺内酯(10^{-6} mol/L)	6	518 ± 36 ^a

$P < 0.05$, a: 与对照组比较, b: 与血管紧张素Ⅱ组比较。

2.2 心脏成纤维细胞的血管紧张素Ⅱ1 型受体 mRNA 水平

细胞经醛固酮处理后 AT1 受体 mRNA 的丰度(0.755 ± 0.023) 较对照组(0.486 ± 0.014) 明显增加($P < 0.01$), 但在螺内酯干预组可抑制醛固酮所致的这种改变(AT1 受体 mRNA 丰度为 0.513 ± 0.015) (图 2, Figure 2)。

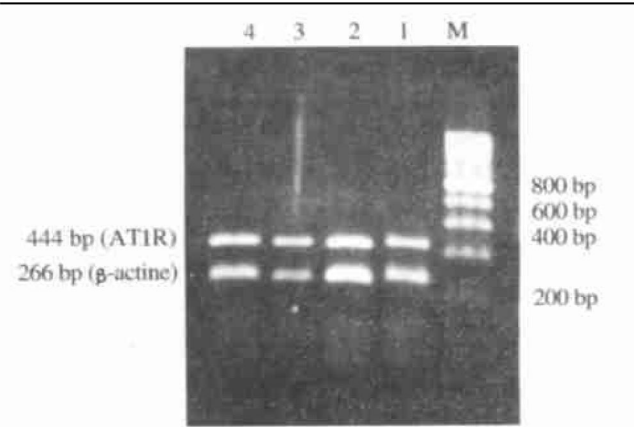


图 2. 血管紧张素Ⅱ1 型受体 mRNA 的表达 M: 参照标记; 1: 对照组; 2: 醛固酮组; 3: 螺内酯 10^{-6} mol/L 组; 4: 螺内酯 10^{-7} mol/L 组。

Figure 2. mRNA expression of AT1 receptor

2.3 细胞血管紧张素Ⅱ1 型受体的水平

将实验数据经 Scatchard 分析并作图后发现, 醛固酮处理组细胞¹²⁵I-AngⅡ最大结合能力(B_{max} : 786 ± 23.1 pmol/g) 较未处理组(B_{max} : 379 ± 32.7 pmol/g) 增高近 2 倍, 而受体亲和力(K_d 值) 无明显变化(图 3, Figure 3)。

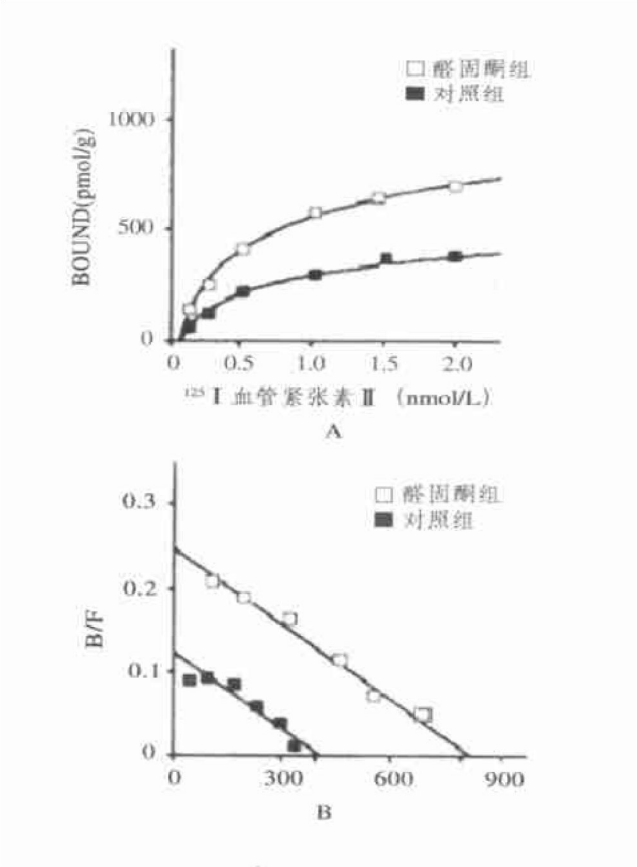


图 3. 放射配体结合实验 A: 醛固酮诱导心脏成纤维细胞血管紧张素Ⅱ结合饱和曲线; B: 醛固酮诱导心脏成纤维细胞血管紧张素Ⅱ结合 Scatchard 曲线。 Scatchard 作图使用 Prism3.03 软件。

Figure 3. Radioligand Binding Assay

3 讨论

心室重塑重要的病理学基础是心肌纤维化的形成, 是指心肌组织细胞外间质胶原沉积增多所致的一种病理性改变。在许多心血管疾病(如: 高血压、冠心病和心衰等) 发生时, 由于心肌负荷过重、缺血缺氧和炎症等原因常常会引起心肌纤维化的形成^[6], 它的形成一方面会使心肌僵硬增加而引起心室舒张功能障碍; 另一方面心肌纤维化可以导致心肌组织电活动的不均一性增强从而易引起室性心律失常的发生, 因此心肌纤维化被认为是能够影响心血管疾病患者预后的一个决定因素。

近年研究表明醛固酮是导致心肌纤维化形成和发展的一个重要因素^[7]。最近完成的试验发现: 在

严重心衰患者,使用醛固酮的受体拮抗剂——螺内酯治疗可以明显降低患者的死亡率(30%)^[8],而这种显著效果正是得益于螺内酯有效地抑制了心肌纤维化的形成和发展^[9]。但是目前对于醛固酮引起心肌纤维化的具体机制尚不清楚。

由于心脏组织中的胶原成分主要由 CFs 合成和分泌,所以 CFs 的胶原代谢异常是心肌纤维化形成的主要病理学基础,研究醛固酮对 CFs 胶原代谢的影响有助于揭示其导致心肌纤维化的可能机制。过去有学者认为醛固酮致心肌纤维化的效应可能是通过直接作用于心脏成纤维细胞使其胶原的合成量增加来实现,但近年来的多项研究发现:直接将醛固酮作用于 CFs 并未引起胶原合成量的增加^[10]。由此提示醛固酮致心肌纤维化的机制可能是通过间接途径来实现的。

本实验将醛固酮直接作用于培养的 CFs,结果并没有引起细胞胶原合成量的增加,也证实醛固酮不能直接影响到 CFs 的胶原代谢,由此提示醛固酮引起心肌纤维化形成可能是通过间接途径实现;而 Ang Ⅱ的作用可以使细胞胶原合成量增加,说明 Ang Ⅱ具有一种直接的促进 CFs 胶原合成增多的效应;在醛固酮诱导心肌纤维化的几项动物实验中研究人员发现持续使用醛固酮 3~4 周后,心肌组织中才出现胶原沉积增多的改变^[11],在使用 Ang Ⅱ处理 2~4 天后即可观察到上述变化,而通常醛固酮在数小时之后即可发挥其基因组效应,因此这种致纤维化效应的“滞后现象”也提示醛固酮诱导心肌纤维化的形成并非是通过直接刺激胶原合成所致。

目前已经证实:CFs 表面存在着 Ang Ⅱ的受体^[12],在大鼠 CFs 表面 AT1 受体是最主要的亚型,而且 Ang Ⅱ的绝大部分生物学效应(包括刺激胶原合成)也是由 AT1 受体介导完成的^[13],因此本课题着重研究了 AT1 受体的变化。研究发现:许多因素(如 Ang Ⅱ、细胞因子、胰岛素、低密度脂蛋白和雌激素等)可以影响 AT1 受体的表达,而其表达水平在很大程度上决定着 Ang Ⅱ生物学效应的强弱。本实验发现醛固酮可以增强 Ang Ⅱ致胶原合成增多的效应,由此提示,在 CFs 的胶原代谢方面醛固酮与 Ang Ⅱ存在着某种协同作用。为了解释这一现象,我们研究了醛固酮对细胞 AT1 受体表达的影响,结果发现使用醛固酮处理细胞后可以明显上调 CFs 的 AT1 受体及其 mRNA 的水平,说明醛固酮很有可能是通过上调 AT1 受体来增强 Ang Ⅱ促进 CFs 胶原合成增多的效应。

最近对 AT1 受体基因序列的研究发现:在 AT1 受体基因的转录起始区上游存在着多个糖皮质激素反应元件(GRE)^[14],研究发现醛固酮与其盐皮质激素受体的结合物能够与糖皮质激素反应元件发生结合进而加快 AT1 受体基因的转录速度^[15],从而使 AT1 受体的表达增多。Rombouts 等^[10]研究证实大鼠 CFs 中有醛固酮盐皮质激素受体的存在,因此当醛固酮作用于 CFs 时,很可能通过上述途径上调 AT1 受体的表达,使 Ang Ⅱ促进 CFs 胶原合成的效应得以增强。实验中螺内酯正是通过阻断了醛固酮与醛固酮盐皮质激素受体的结合,使醛固酮难以发挥其原有基因组效应,从而抑制了醛固酮对 AT1 受体的上调作用,这可能是螺内酯能够抑制心肌纤维化形成和发展的机制之一。

[参考文献]

- Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *J Cardiovasc Res*, 2000, **47** (1): 1
- 申景平,李瑞峰,雷立权,高广道. 心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞对血管紧张素 Ⅱ的反应性. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 115-117
- Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32** (3): 865-879
- Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H, et al. Vascular aldosterone. *J Biol Chem*, 1994, **269** (36): 24 316-320
- Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Abdelkarim S, Bernard S, Claude D, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone. *Hypertension*, 1999, **33** (3): 981-986
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, 1999, **79** (2): 216-262
- Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Troune P, Wassef M, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*, 1995, **26** (4): 971-987
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med*, 1999, **341** (3): 709-717
- Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension*, 2001, **38** (15): 1 227-232
- Rombouts K, Niki T, Wielant A, Hellemans K, Schuppen D, Komoss N, et al. Influence of aldosterone on collagen synthesis and proliferation of rat cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol*, 2001, **134** (2): 224-232
- Ramires-Gil JF, Delcayre C, Robert V, Wassef M, Mougenot N, Troune P, et al. In vivo left ventricular function and collagen expression in aldosterone/salt hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **32** (5): 927-934
- Staufenberger S, Jacobs M, Brandstatter K, Hafner M, Regitz-Zagrosek V, Ertl G, et al. Angiotensin Ⅱ type 1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myocardial infarction. *J Cell Physiol*, 2001, **187** (3): 326-335
- 彭永平,江时森,陈锐华,李俭春. 血管紧张素 Ⅱ 型受体与醛固酮受体拮抗剂对逆转高血压大鼠心肌重塑的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 408-410
- Guo DF, Uno S, Ishihata A, Nakamura N, Inagami T. Identification of a cis-acting glucocorticoid responsive element in the rat angiotensin Ⅱ type 1A promoter. *Circ Res*, 1995, **77** (2): 249-257
- Pearce D, Yamamoto KR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science*, 1993, **259** (13): 1 161-165

(此文编辑 朱雯霞)