

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0321-04

·实验研究·

卡维地洛对高血压大鼠心肌成纤维细胞 一氧化氮合酶—一氧化氮系统的影响

张海涛¹, 赵连友², 刘朝中¹, 罗慧兰¹, 王荫静¹, 于心亚¹, 田建伟²

(1. 中国人民解放军空军总医院内科, 北京市 100036;

2. 第四军医大学唐都医院内科, 陕西省西安市 710038)

[关键词] 内科学; 心肌成纤维细胞; 卡维地洛; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 自发性高血压大鼠

[摘要] 观察基础和卡维地洛干预条件下, 自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠心肌成纤维细胞一氧化氮合酶—一氧化氮系统活性的变化。胰酶消化法分离、培养大鼠心肌成纤维细胞, 采用硝酸还原酶法和分光光度法观察基础和卡维地洛干预条件下, 培养基中一氧化氮合酶活性及一氧化氮含量的变化。结果发现, 在基础状态下 72 h, 高血压大鼠组心肌成纤维细胞一氧化氮含量($66.6 \pm 3.5 \mu\text{mol/L}$)及一氧化氮合酶活性($16.7 \pm 0.7 \text{ kU/L}$)较 Wistar 大鼠组($80.8 \pm 6.2 \mu\text{mol/L}$ 和 $29.1 \pm 2.1 \text{ kU/L}$)显著降低, 并有统计学意义($P < 0.01$); 一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性随卡维地洛浓度的增高而增加, 均呈剂量依赖性; 另外, 在不同浓度卡维地洛作用下, 高血压大鼠组心肌成纤维细胞的一氧化氮含量随一氧化氮合酶活性的增强而增高, 二者呈显著正相关($r = 0.911$, $P < 0.01$)。结果提示, 高血压大鼠心肌成纤维细胞的一氧化氮合酶—一氧化氮系统功能异常, 表现为—一氧化氮合酶活性降低, 一氧化氮含量减少。卡维地洛使心肌成纤维细胞内一氧化氮合酶—一氧化氮系统活性显著增高, 并呈浓度依赖性, 其中对高血压大鼠的影响远远高于正常血压组, 这可能是卡维地洛抑制血压增高的重要机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Carvedilol on Nitric Oxide Synthase-Nitric Oxide System of Cardiac Fibroblasts in Spontaneously Hypertensive Rats

ZHANG Hai-Tao¹, ZHAO Lian-You², LIU Chao-Zhong¹, LUO Hui-Lan¹, WANG Yin-Jing², YU Xin-Ya¹, and TIAN Jian-Wei²

(1. Department of Cardiology, General Hospital of Air Force, PLA, Beijing 100036; 2. Department of Cardiology, Tangdu Hospital of 4th Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[KEY WORDS] Cardiac Fibroblasts; Carvedilol; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Spontaneously Hypertensive Rats

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the changes of nitric oxide synthase-nitric oxide system activity in rat cardiac fibroblasts (CF) derived from spontaneously hypertensive rat (SHR) and Wistar rat with and without carvedilol. **Methods** CF were isolated by trypsin digestion method. Nitric acid reductase method and spectrophotometry were used to detect the NO contents and NOS activity respectively with or without carvedilol. **Results** Under basal condition (72 h), NO content ($66.6 \pm 3.5 \mu\text{mol/L}$) and NOS activity ($16.7 \pm 0.7 \text{ kU/L}$) of CF derived from SHR were significantly lower than those of Wistar rats ($80.8 \pm 6.2 \mu\text{mol/L}$, $29.1 \pm 2.1 \text{ kU/L}$) ($P < 0.01$). Carvedilol could significantly increase NOS activity and NO content of CF derived from two groups, which showed dose-dependent effects. Moreover, NO contents increased with the enhancement of NOS activity, and there was significant positive relevance between them ($r = 0.911$, $P < 0.01$). **Conclusion** The NOS-NO system of CF in SHR was abnormal, which showed that NOS activity and NO content of CF in SHR were lower. Carvedilol could significantly increase NOS activity and NO content of CF derived from two groups, but the effect on CF of SHR was much more powerful than that of Wistar rats. The effect may be an important mechanism to control blood pressure.

卡维地洛作为一种第三代 β 受体阻断剂, 可同时阻滞 β_1 、 β_2 和 α_1 受体, 它的抗平滑肌细胞增殖和迁移、抑制心肌细胞凋亡及血管损伤后新生内膜形

成等特性使其逐渐用于治疗 and 预防左心室肥厚^[1]、心绞痛、心功能衰竭、动脉硬化以及冠状动脉介入治疗和搭桥术后冠状动脉再狭窄等新的领域, 近年来已成为临床及基础研究中一个令人瞩目的热点。心肌纤维化是高血压发病过程中左室重建的重要病理改变, 心肌成纤维细胞异常增殖参与了这一病理过程^[2]。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为细胞信号转导的信使在心血管系统中发挥着重要作用^[3]。为了探

[收稿日期] 2003-10-20 [修回日期] 2004-05-16

[作者简介] 张海涛, 硕士, 主治医师, 主要研究高血压发病机制与防治, E-mail 为 haitao-z5999@sina.com。赵连友, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为高血压发病机制与防治。刘朝中, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病诊断和治疗。

讨卡维地洛预防和逆转左心室肥厚的具体机制,本文以自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)和 Wistar 大鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)为实验对象,分别观察卡维地洛对 CF 一氧化氮合酶——一氧化氮(NOS-NO)系统活性的影响,从细胞和分子水平为药物防治高血压左心室肥厚提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物、药品和试剂

自发性高血压大鼠(血压 176~190 mm Hg)由中国医学科学院动物所提供, Wistar 大鼠(血压 120~132 mm Hg)由军事医学科学院动物中心提供,均为 12 周龄,雄性,体重 220~250 g。含酚红 DMEM 干粉培养基为美国 Gibco 公司产品;无酚红 DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品;胰蛋白酶为美国 Serva 公司产品;胎牛血清为北京元亨圣马生物技术研究所生产;卡维地洛由北京巨能制药有限公司提供;NO 试剂盒和 NOS 试剂盒为南京建成生物技术公司提供。

1.2 心肌成纤维细胞培养与鉴定

无菌条件下迅速取出 12 周龄大鼠心脏,除去心房和右心室及周围的结缔组织,剪碎,0.25%胰酶 37℃消化成单细胞悬液,每 8 min 收集一次细胞。离心 2 次(1 kr/min, 5 min/次),将所得全部细胞置于含 15%小牛血清 DMEM 培养基的 100 mL 培养瓶中,在 5% CO₂、37℃孵箱中培养 90 min,采用差速贴壁法分离 CF。待 CF 生长接近融合时以 1:2 传代。在倒置显微镜下观察,细胞呈梭形、多角形,细胞质透明,细胞核明显变大,呈椭圆形,常含有 2~3 个核。对 CF 进行 SABC 法免疫组织化学染色;纤维连接蛋白染色阳性,血管平滑肌肌动蛋白染色阴性,符合 CF 染色特征。实验用 2~4 代细胞。

1.4 实验分组及处理

用 15% FCS-DMEM 培养基调成约 2.5×10^7 个/L 的细胞数,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μ L,培养 24 h 贴壁后,换用无血清无酚红的 DNEM(0.4% FCS-DNEM)培养基,继续培养 24 h,使 CF 处于 G₀/G₁ 期。实验分为空白对照组和 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 卡维地洛干预 72 h 组,分别测定 CF、NO 含量及 NOS 活性。

1.5 心肌成纤维细胞培养基一氧化氮含量测定

用硝酸还原酶法,检测细胞培养基中的 NO₂ 含量,通过显色深浅读取吸光度,测定其浓度的高低。样品 NO 含量以公式(测定管吸光度—空白管吸光

度)/(标准管吸光度—空白管吸光度) × 100 μ mol/L 计算。

1.6 心肌成纤维细胞一氧化氮合酶活性测定

通过 NOS 催化产生的 NO 量推算 NOS 活力。NO 与亲核物质生成有色化合物,测定其吸光度值可计算出 NOS 活力。NOS 活性以每分钟生成的 NO 量表示,用公式(测定管吸光度—空白管吸光度)/(比色光径 × 反应时间) × 650.3 kU/L 计算。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达,使用 SPSS 10.0 统计软件处理。进行 *t* 检验、单因素方差分析和直线相关分析。*P* < 0.05 为有统计学差异,*P* < 0.01 为有极显著差异。

2 结果

2.1 不同浓度卡维地洛对心肌成纤维细胞合成一氧化氮的影响

在基础状态下培养 72 h, SHR CF NO 含量较 Wistar 大鼠显著降低(*P* < 0.01)。随着干预浓度增加,两种大鼠 CF NO 含量均呈递增趋势,较各自对照组明显升高。10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L 卡维地洛培养组与各自对照组比较,SHR 培养上清液累积 NO 含量分别增加 2.7%、12.0%、28.1% 和 37.5%; Wistar 大鼠分别为 1.0%、5.3%、12.5% 和 15.6%,其中在 10⁻⁷~10⁻⁵ mol/L 卡维地洛作用下两组间比较差异具有统计学意义(均 *P* < 0.05)(表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度卡维地洛对心肌成纤维细胞一氧化氮含量的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

Table 1. Effects of different concentration carvedilol on NO content of CF

| 浓度分组 | 自发性高血压大鼠 (μ mol/L) | Wistar 大鼠 (μ mol/L) |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 对照 | 66.6 ± 3.5 | 80.8 ± 6.2 |
| 卡维地洛 | | |
| 10 ⁻⁸ mol/L | 68.4 ± 2.9 | 81.6 ± 2.0 |
| 10 ⁻⁷ mol/L | 74.6 ± 2.4 ^a | 85.1 ± 4.3 |
| 10 ⁻⁶ mol/L | 85.3 ± 1.6 ^b | 90.9 ± 3.2 ^a |
| 10 ⁻⁵ mol/L | 91.6 ± 4.1 ^b | 93.4 ± 4.7 ^b |

a: *P* < 0.05, b: *P* < 0.01, 与对照比较

2.2 不同浓度卡维地洛对心肌成纤维细胞一氧化氮合酶活性的影响

在基础状态下作用 72 h, SHR CF 的 NOS 活性较 Wistar 大鼠显著降低(*P* < 0.01)。随着卡维地洛浓

度增加, NOS 活性均呈递增趋势, 较各自对照组明显升高。 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 卡维地洛培养组与各自对照组比较, SHR 培养上清液累积 NOS 活性增加率分别为 16.2%、25.1%、34.1% 和 41.3%; Wistar 大鼠分别为 6.9%、16.2%、21.0% 和 25.4%, 在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 卡维地洛作用下两种大鼠间比较差异显著, 具有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2, Table 2)。

表 2. 不同浓度卡维地洛对心肌成纤维细胞一氧化氮合酶活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2. Effects of different concentration carvedilol on NOS activity of CF

| 浓度分组 | 自发性高血压大鼠 | Wistar 鼠 |
|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照者 | 16.7 ± 0.7 | 29.1 ± 2.1 |
| 卡维地洛 (mol/L) | | |
| 10^{-8} | 19.4 ± 1.1 ^a | 31.1 ± 1.4 |
| 10^{-7} | 20.9 ± 1.4 ^b | 33.8 ± 1.1 ^a |
| 10^{-6} | 22.4 ± 1.1 ^b | 35.2 ± 1.8 ^a |
| 10^{-5} | 23.6 ± 1.0 ^b | 36.5 ± 2.0 ^a |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照者比较。

2.3 不同浓度卡维地洛作用下心肌成纤维细胞一氧化氮含量与一氧化氮合酶活性的关系

不同浓度卡维地洛作用下 CF 的 NO 含量与 NOS 活性的关系见图 1 (Figure 1)。由图 1 可知, 在不同浓度卡维地洛作用下, SHR CF 的 NO 含量随 NOS 活性的增强而增高, 二者呈显著正相关($r = 0.911$, $P < 0.01$)。

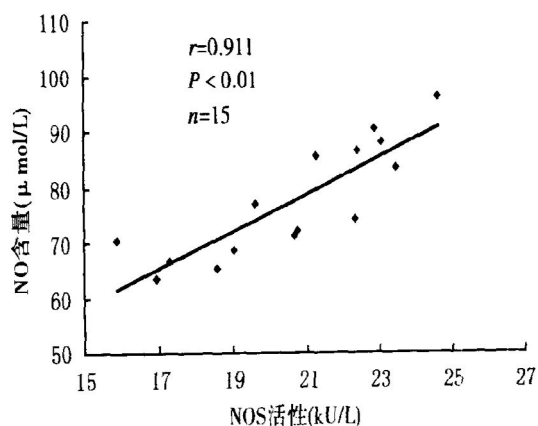


图 1. 不同浓度卡维地洛作用下自发性高血压大鼠组心肌成纤维细胞的一氧化氮含量与一氧化氮合酶活性的关系
Figure 1. The relation of NO content and NOS activity with treatment of different concentration carvedilol

3 讨论

自 1987 年 Moncada 发现血管内皮细胞产生的内皮衍化舒张因子即为 NO 后, NO 便成为生命科学研究领域中最热门的课题之一, 并呈现方兴未艾之势。在心血管系统 NO 除介导内皮依赖性血管舒张外, 还具有抑制血小板聚集, 对抗平滑肌细胞增殖、迁移、胶原合成、抑制心肌细胞凋亡、调节心肌收缩以及抗动脉粥样硬化等作用^[4-6]。NO 对正常血压的维持起重要作用, 与心室肥厚的发生与发展有着密切的关系^[7]。研究证实, 心肌间质的纤维化主要是因为 CF 的活化、增殖及其所分泌的胶原增生与沉积所致^[8]。CF 的增生和其生物活性调控着心肌组织胶原合成和降解的动态平衡, 而最终影响心肌肥厚的发生与否^[9]。近年研究发现, CF 具有 NOS-NO 系统, 生成的 NO 可影响心脏功能^[10], 同时可抑制 CF 增殖, 降低细胞外胶原沉积^[11]。NO 生成减少可加速由血管紧张素持续输注引起的 MF, 并使其程度加重^[12]。卡维地洛系一新型具有多种药理作用的抗高血压药, 阻滞 β_1 、 β_2 受体和 α 受体的同时, 具有血管扩张特性和抗自由基及抗氧化等作用^[13], 并能抑制 CF 的增殖及胶原合成^[14]。但是, 卡维地洛干预下 CF 的 NOS-NO 系统的变化及其与 MF 的关系, 目前尚不清楚。

本研究采用硝酸还原酶特异性将 NO^3 还原为 NO^2 , 通过显色深浅测定其浓度的高低, 为一种灵敏、简便、快速、稳定、易推广的方法, 可以达到在几乎同一时间点检测多份样本的目的。通常的细胞培养基中均含有酚红作为细胞培养过程中反应细胞代谢产物(主要是一些酸性物质)聚集量的指示剂。若采用普通 DMEM 培养基进行 NO^2 离子浓度的检测试验, 其中所含的酚红会不可避免地影响检测标本的吸光度进而影响试验结果。因而本研究在进行 NO^2 检测的试验时均采用无酚红的 DMEM 培养基, 避免了酚红对试验结果的干扰。

有研究发现, 在 AVP 作用下, 体外培养的高血压病患者血管平滑肌细胞 NOS mRNA 表达量增高、活性增强, NO 含量增高^[15]。对健康人的实验也曾证明静脉给予 L-精氨酸可使体内的 NO 释放增加, 并伴有明显的降压效应。可见, NO 参与心肌肥厚的发生与发展已成为大家较为接受的观点。本研究以自发性高血压大鼠及其对照组正常血压的 Wistar 大鼠为研究对象, 结果发现, 在不加任何刺激因素的情况下, 自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠培养的 CF 均具有 NOS 活性, 能够分泌一定量的 NO, 且随培养

时间延长, NOS 活性增强, NO 含量增加。进一步分析提示: NO 含量随 NOS 活性增强而增高, 二者呈显著正相关, 表明 NO 含量的增多是由于 NOS 活性增强所致。NOS 活性是 NOS 催化 L-精氨酸和分子氧生成 NO 的能力, NOS 活性的高低与 NOS 蛋白含量密切相关。由此不难看出, 自发性高血压大鼠的 NO 含量减少可能是 NOS 活性下降所致。NOS-NO 系统活性不足与高血压发病倾向密切相关。

本研究同时动态观察了 CF 的 NOS-NO 系统活性与卡维地洛的量效关系。结果表明, 不同浓度的卡维地洛作用下, CF 的 NOS 活性和 NO 含量都随药物浓度的增高而增加, 呈剂量依赖性。卡维地洛使自发性高血压大鼠的 NOS-NO 系统活性增强远远高于正常血压组, 这可能是卡维地洛抑制血压增高的重要机制之一。高血压状态下, CF 增殖和胶原合成旺盛, NOS 活性降低, NO 生成减少, 使血管紧张素 II 增高引起的 MF 过程加速, 程度加重, 促进心血管重构。卡维地洛能够上调 NOS 活性, 促进 NO 合成, 并呈剂量和时间依赖性, 而 NO 能够抑制 CF 增殖和胶原合成, NO 生成增加可以减缓 MF 过程, 抑制并逆转左心室肥厚^[16]。因此, NO 含量的增加可拮抗高血压致 MF 作用, 延缓 MF 的发展。

综上所述, 不难看出 NO 在心肌肥厚的发生和发展中起着重要作用。自发性高血压大鼠 NO 合成和分泌不足, 使舒血管物质减少, 缩血管物质相对占优势, 长期作用可促进 CF 增殖及胶原合成, 发生 MF, 血压进一步升高。卡维地洛通过促进 CF 的 NOS-NO 系统活性, 抑制 CF 增殖及胶原合成, 进而达到降低血压, 阻止和逆转左心室肥厚的目的, 但其

确切机制还有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 惠波, 郝玉明, 刘凡, 王秉臣. 卡维地洛的分子血管保护作用. 中国新药杂志, 2000, 9 (4): 229-231
- [2] 曹政, 王家宁, 杨桂元, 李建军. 醛固酮促进血管紧张素 II 诱导大鼠心脏成纤维细胞合成胶原. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (2): 135-138
- [3] Tian B, Liu J, Bitterman PB, Bache RJ. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. *Am J Physiol*, 2002, 283 (5): H1 958-967
- [4] 尹卫东, 张善春. 内源性血管活性物质. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (4): 361-364
- [5] Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kouzmenbas S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997, 272 (52): 32 804-809
- [6] Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Fujita M, Araki M, Yanazume T, Adachi S, et al. Basic fibroblast growth factor protects cardiac myocytes from iNOS-mediated apoptosis. *J Cell Physiol*, 2002, 190 (1): 54-62
- [7] Okruhlicova L, Tribulova N, Bernatova I, Pechanova O. Induction of angiogenesis in NO-deficient rat heart. *Physiol Res*, 2000, 49 (1): 71-76
- [8] Krzesinski JM, Rorive G, Van Ganswenberge H. Hypertension and ventricular hypertrophy. *Acta Cardiol*, 1996, 51 (2): 143-154
- [9] Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*, 2000, 15 (4): 264-272
- [10] Farivar RS, Chobanian AV, Brecher P. Salicylate or aspirin inhibits the induction of the inducible nitric oxide synthase in rat cardiac fibroblasts. *Circ Res*, 1996, 78 (5): 759-768
- [11] Kim NN, Villegas S, Summerour SR, Villarreal FJ. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31 (2): 457-466
- [12] Tian B, Liu J, Bitterman P, Bache RJ. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am J Physiol*, 2003, 285 (3): H1 105-112
- [13] Kurz T, Richardt D, G? rge B, Hartmann F, T? lg R, Katus H, et al. Differential effects of carvedilol on norepinephrine release in normoxic and ischemic heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36 (1): 96-100
- [14] 张海涛, 赵连友, 王荫静, 田建伟, 王士雯. 卡维地洛、比索洛尔、哌唑嗪对 SHR 心肌成纤维细胞增殖作用的对比研究. 高血压杂志, 2003, 11 (1): 69-72
- [15] 赵连友, 李宏伟, 李雪, 杨学东, 乔怀宇, 彭育红, 等. 高血压病患者血管平滑肌细胞一氧化氮合酶活性的变化和精氨酸加压素对一氧化氮合成的影响. 中华医学杂志, 2000, 80 (6): 425-428
- [16] Abdelaziz N, Colombo F, Mercier I, Calderone A. Nitric oxide attenuates the expression of transforming growth factor-beta(3) mRNA in rat cardiac fibroblasts via destabilization. *Hypertension*, 2001, 38 (2): 261-266

(此文编辑 胡必利)