[文章编号] 1007-3949(2007)15-05-0361-04 ·实验研究·

血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响

齐 峰, 王先梅, 杨丽霞, 郭传明, 石燕昆, 赵 颖, 王 红
(中国人民解放军成都军区昆明总医院心血管内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 内科学; 血管紧张素(1-7); 血管紧张素㊆; 心脏成纤维细胞; 胶原; 逆转录—聚合酶链反应; 细胞增殖

[摘 要] **目的** 探讨血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响。**方法** 分离培养 SD 仔鼠心脏成纤维细胞, 四氮唑盐比色法检测细胞增殖, 流式细胞分析技术测定细胞周期, 逆转录—聚合酶链式反应测定心脏成纤维细胞 iv、㊃型胶原 mRNA 的表达。**结果** 1.0 μmol/L 血管紧张素㊆作用 24 h, 心脏成纤维细胞的四氮唑蓝比色分析法吸光度值(0.24±0.01)较无血清对照组(0.14±0.01)明显增加($P<0.01$); 0.001~1.0 μmol/L 血管紧张素(1-7)和 1.0 μmol/L 血管紧张素㊆共同干预后吸光度值逐渐降低, 分别为 0.20±0.01、0.19±0.01、0.13±0.01、0.16±0.03, 均显著低于血管紧张素㊆组($P<0.01$)。④血管紧张素㊆组心脏成纤维细胞的 S 期百分率(14.0%±0.9%)和增殖指数(23.4±1.8)较对照组(5.4%±0.7% 和 10.8±2.4)明显增高($P<0.01$); 0.1 μmol/L 血管紧张素(1-7)干预后 S 期百分率(8.5%±0.7%)和增殖指数(16.2±2.0)较血管紧张素㊆组降低($P<0.01$)。㊃血管紧张素㊆刺激后心脏成纤维细胞的 iv、㊃型胶原 mRNA 表达水平分别为较对照组明显增高($P<0.01$); 给予 0.001~1.0 μmol/L 血管紧张素(1-7)和 1.0 μmol/L 血管紧张素㊆共同干预后, 胶原表达水平浓度依赖性的下降, 均显著低于血管紧张素㊆组($P<0.05$)。**结论** 血管紧张素(1-7)具有抑制血管紧张素㊆浓度增加引起的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的作用。

[中图分类号] R541.3 [文献标识码] A

Effects of Angiotensin(1-7) on Cell Proliferation and Collagen Synthesis of Cardiac Fibroblasts Induced by Angiotensin ㊆

QI Feng, WANG Xian-Mei, YANG Li-Xia, GUO Chuan-Ming, SHI Yan-Kun, ZHAO Ying, and WANG Hong
(*Department of Cardiology, Kunming General Hospital, Kunming 650032, China*)

[**KEY WORDS**] Ang(1-7); Angiotensin ㊆; Cardiac Fibroblasts; Collagen; RT-PCR; Cell Proliferation

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the effect of Angiotensin(1-7) (Ang(1-7) on cell proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts(CF) induced by Angiotensin ㊆(Ang ㊆). **Methods** CF were isolated and cultured from Neonatal SD rats. Cell number and cell cycle were evaluated by MTT assay and flowcytometry technique. Type and ㊃collagen mRNA expressions in CF were analyzed by RT-PCR. **Results** 1 μmol/L Ang ㊆significantly increased absorption value of CF(0.24±0.01) compared with control group (0.14±0.01, $P<0.01$), 0.001~1.0 μmol/L Ang(1-7) attenuated the absorption value of Ang ㊆group in a concentration dependent manner (0.22±0.01, 0.21±0.01, 0.18±0.01 and 0.16±0.01, $P<0.01$). ④Compared to the control (5.4%±0.7%, 10.8±2.4), cells in S stage (14.0%±0.9%) and proliferatiion index (23.4±1.8), they were markedly increased in 1 μmol/L Ang ㊆group ($P<0.01$). In the presence of 0.1 μmol/L Ang(1-7), cells in S stage (8.5%±0.7%) and the proliferatiion index (16.2±2.0) were significantly lower than that of Ang ㊆group ($P<0.01$). ㊃mRNA expressions of type ivand ㊃collagen in Ang ㊆group were significantly higher than those of the control ($P<0.01$), and in the presence of 0.1 μmol/L Ang(1-7), mRNA expressions were reduced in a concentration dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** The results indicate that Ang(1-7) could inhibi the proliferation of CF and the synthesis of type ivand ㊃collagen.

血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]是肾素—血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)家族中被新认识的一个重要成员, 它在很多方面表现出与血管紧张素㊆相反的作用, 在高血压及其相关疾病的发生发展中有重要作用[1]。Ang(1-7)可以抑制血管平滑肌细胞增殖, 逆转心肌细胞肥大[2]。但是, Ang(1-7)是否能够抑制心脏成纤维细胞(cardiacfibroblasts,

[收稿日期] 2006-05-22 [修回日期] 2007-03-10
[作者简介] 齐峰, 学士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的发病机制, 联系电话为 0871-4774571 或 13987661111, E-mail 为 wangh43@126.com。王先梅, 博士, 副主任医师, 研究方向为高血压的发病机制, 联系电话为 0871-4774571。杨丽霞, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病的发病分子机制, 联系电话为 0871-4774573。

CF)增殖和细胞外胶原的合成,目前尚不清楚。高血压左心室肥厚存在心肌局部的 RAS 的激活,心肌局部血管紧张素㊆(Angiotensin ㊆, Ang ㊆)浓度升高。Ang ㊆是调节心肌肥大成纤维细胞增殖的重要体液因素之一。因此,本研究探讨了 Ang(1-7)对 Ang ㊆诱导 CF 增殖和胶原合成增加的作用,旨在探讨 Ang(1-7)对心脏重构的影响,为高血压左心室肥厚的防治提供新的思路和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

出生 1~3 天的 SD 大鼠由第四军医大学实验动物中心提供;Ang(1-7)、Ang ㊆均购自美国 Sigma 公司(用三蒸水配成 10 μmol/L 贮存液,使用时用 DMEM 稀释);iv型和㊃型胶原引物由上海博雅生物技术有限公司提供;RT-PCR 试剂盒由 Takara 公司提供。

1.2 心脏成纤维细胞的培养和鉴定

采用差速贴壁法分离培养 CF,经倒置显微镜、透射电镜、免疫组化纤维粘连蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为所需的 CF,纯度达 0.98,锥虫蓝染色细胞活力大于 0.97。生长近融合时按 1∶3 传代,实验采用 2~4 代细胞。

1.3 四氮唑蓝比色分析法检测活细胞数目[3]

将 CF 以 2 000 个/孔接种在 96 孔板中。药物干预后,每孔加入 MTT 20 μL,37 ℃继续孵育 4 h,终止培养,吸弃上清液,每孔加入 150 mL DMSO,振荡混匀 10 min 后在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定吸光度值,用只加培养基不加细胞的空白孔调零。

1.4 细胞周期测定[4]

心肌成纤维细胞以 10^9 个/L,接种于 25 mL 玻璃培养瓶中。药物干预后收集培养的细胞悬浮于 5 mL 4 ℃预冷的 PBS 中,缓慢加入 −20 ℃预冷的 950 mL/L 乙醇 15 mL,使其终浓度为 700 mL/L,冰浴 30 min,离心,重悬于 PBS,调整细胞密度为 10^9~10^{10} 个/L,取适量细胞悬液加入 RNA 酶 37 ℃冰浴 30 min,除去 RNA,加入碘化丙啶染液,终浓度为 20 mg/L,暗处冰浴 30 min。上机前用 300 目尼龙网过滤。根据碘化丙啶所标记的 DNA 含量确定细胞所处的周期。

1.5 iv型和㊃型胶原 mRNA 表达测定

按 Trizol 试剂说明书提取 CF 总 RNA,参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录反应,PCR 反应共 35 个循环,PCR 产物经 15 mL/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统(型号 Bio-1D,法国 VL 公司)进行图象分析,测得其与 GAPDH 密度比值作为 mRNA 相对表达量。从 Gene Bank 中检出鼠 iv型胶原上下游引物序列为 5'-TGC CGT GAC CTC AAG ATG TG-3' 和 5'-CAC AAG CGT GCT GTA GGT GA-3'。鼠㊃型胶原上下游引物序列为 5'-AGA TCA TGT CTT CAC TCA AGTC-3' 和 5'-TTT ACA TTG CCA TTG GCC TAG-3'。

1.6 实验分组

实验分 4 组: 对照组:无血清 DMEM 培养基;④Ang(1-7)单独作用组:0.1 μmol/L Ang(1-7)加入无血清 DMEM 培养基中;⒁Ang ㊆组:1.0 μmol/L Ang ㊆加入无血清 DMEM 培养基中; 不同浓度 Ang(1-7)干预组:0.001、0.01、0.1 和 1.0 μmol/L Ang(1-7)分别与 1.0 μmol/L Ang ㊆共同培养。每组均为 5 个样本,药物干预时间均为 24 h。

1.7 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析,再用两两比较的 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞数目的影响

血管紧张素㊆组 CF 吸光度 A_{490} 值(0.24±0.01)明显高于空白对照组(0.14±0.01),差异有显著性($P<0.01$);在 1.0 μmol/L Ang ㊆作用的基础上,给予 0.001、0.01、0.1 和 1.0 μmol/L Ang(1-7)干预 24 h 后,各组 CF 的吸光度值分别为 0.20±0.01、0.19±0.01、0.13±0.01、0.16±0.03,均低于 Ang ㊆组($P<0.01$),但均高于空白对照组($P<0.01$);0.1 μmol/L Ang(1-7)单独作用组吸光度值(0.11±0.01)亦较对照组降低($P<0.01$)。

2.2 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞周期的影响

血管紧张素(Ang)㊆组 CF 的 S 期百分率和增殖指数较对照组明显增高($P<0.01$);0.1 μmol/L Ang(1-7)干预组 S 期百分率和增殖指数均较 Ang ㊆组降低($P<0.01$),但仍高于空白对照组($P<0.01$);Ang(1-7)单独作用组 S 期百分率和增殖指数亦较空白对照组降低($P<0.01$;表 1)。

2.3 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞 iv、㊃型胶原基因表达的影响

2.3.1 0.1 μmol/L 血管紧张素(1-7)对心脏成纤维细胞的 iv、㊃型胶原基因表达的影响 Ang ㊆组 CF 的 iv、㊃型胶原 mRNA 表达水平与对照组比较均

明显增高($P<0.01$),0.1 μmol/L Ang(1-7)干预组 iv型、㈣型胶原 mRNA 表达水平较 Ang ㊆组明显降低($P<0.01$),但仍高于空白对照组($P<0.01$);Ang(1-7)单独作用组 iv型、㈣型胶原 mRNA 表达水平分别较空白对照组降低($P<0.01$)。(图 1,表 2)。

表 1. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分 组	细胞周期			
	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
对 照	89.2%±2.40%	5.4%±0.67%	5.4%±1.75%	10.8%±2.40%
Ang ㊆	76.6%±3.39%	14.0%±0.94%[a]	9.4%±0.91%	23.4%±1.75%[a]
Ang(1-7)	93.2%±0.70%	3.9%±0.31%[a]	2.9%±0.54%	6.8%±0.70%[a]
Ang ㊆+ Ang(1-7)	83.8%±2.04%	8.5%±0.70%[ab]	7.7%±2.09%	16.2%±2.04%[ab]

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$ 与 Ang ㊆组比较。

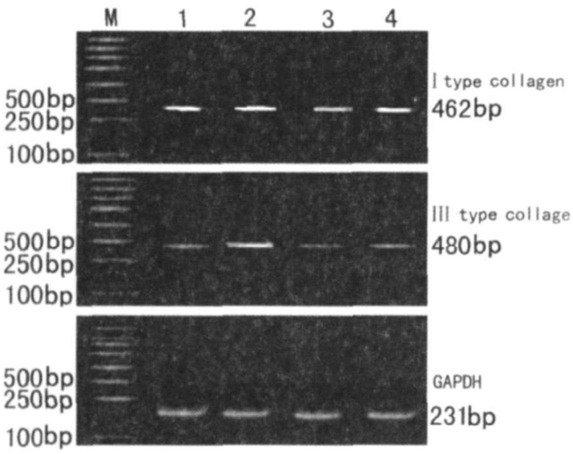

图 1. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞胶原 mRNA 表达的影响 M 为 Marker; 1 为对照; 2 为血管紧张素㊆; 3 为血管紧张素(1-7);4 为血管紧张素㊆+ 血管紧张素(1-7)。

表 2. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞 iv、㈣型胶原基因表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分 组	iv型胶原基因表达	㈣型胶原基因表达
对照组	0.9±0.07	0.74±0.04
Ang ㊆	1.3±0.07 a	1.0±0.05[a]
Ang(1-7)	0.8±0.05 ab	0.7±0.02[ab]
Ang ㊆+ 1 μmol/L Ang(1-7)	1.1±0.02[b]	0.8±0.03[b]
Ang ㊆+ 0.1 μmol/L Ang(1-7)	1.0±0.04[b]	0.7±0.05[b]
Ang ㊆+ 0.01 μmol/L Ang(1-7)	0.9±0.02[b]	0.7±0.03[b]
Ang ㊆+ 0.001 μmol/L Ang(1-7)	0.8±0.03[b]	0.6±0.04[b]

a 为 $P<0.01$ 与对照组比较; b 为 P < 0.01 与 Ang ㊆组比较。

2.3.2 不同浓度血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞的 iv、㈣型胶原基因表达的影响 0.001、0.01、0.1 μmol/L 和 1.0 μmol/L Ang(1-7)干预组 CF 的 iv型胶原 mRNA 表达水平和㈣型胶原 mRNA 表达水平均较 Ang ㊆组降低($P<0.05$;图 2,表 2)。

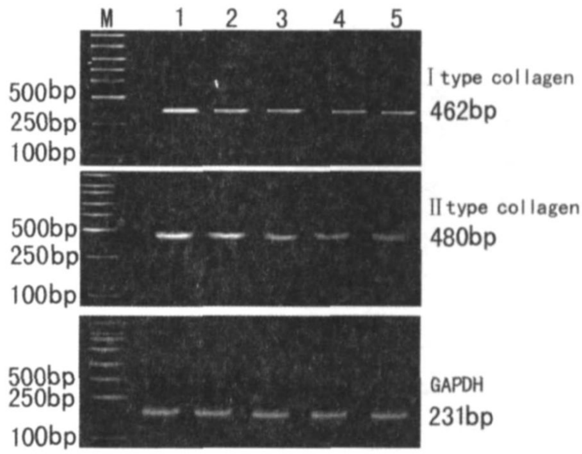

图 2. 不同浓度血管紧张素(1-7)对血管紧张素㊆诱导心脏成纤维细胞胶原 mRNA 表达的影响 M 为 Marker; 1 为对照; 2 为血管紧张素㊆+ 0.001 μmol/L 血管紧张素(1-7); 3 为血管紧张素㊆+ 0.01 μmol/L 血管紧张素(1-7); 4 为血管紧张素㊆+ 0.1 μmol/L 血管紧张素(1-7); 5 为血管紧张素㊆+ 1 μmol/L 血管紧张素(1-7)。

3 讨 论

高血压左心室肥厚是心血管事件发生的独立危险因素,具有较高的患病率、致残率和致死率。大量研究表明,高血压左心室肥厚主要包括两方面的病理改变:一是心肌细胞肥大、肌丝排列紊乱;二是 CF 增殖和胶原的过度增殖、沉积、排列紊乱,两者共同构成了心脏重构的细胞病理学基础[5]。现已明确,循环和组织局部 RAS 的激活是导致和加重高血压左心室肥厚的关键因素。对 RAS 的认识和研究一直以来围绕血管紧张素㊆及其受体。近年来在大鼠、狗及人的不同组织中都发现存在内源性的 Ang

(1-7),是 RAS 的另一代谢产物,其在很多方面表现出与 Ang ㊆相反的作用。现已证实,Ang(1-7) 的生理作用主要有利尿、利钠,调节水钠平衡[6];扩张血管、降低血压[7];抑制血管平滑肌细胞增殖;抑制心肌细胞肥大,Ang(1-7) 是否能够抑制 CF 增殖和细胞外胶原的合成,目前尚不十分清楚。

高血压左心室肥厚存在心肌局部的 RAS 的激活,心肌局部 Ang ㊆浓度升高。Ang ㊆与 AT1 受体的跨膜区域结合,激活信号转导蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶及 Src 等细胞内不同的信号传导通路,引起相关基因的表达。Ang ㊆是调节心肌肥大和成纤维细胞增殖的重要体液因素之一。Ang ㊆主要通过细胞内第二信使促进心肌细胞肥大和通过诱导原癌基因及胚胎型基因表达促心肌肥大。Ang ㊆还可刺激心肌间质细胞增殖和引起胶原合成增加。已经证实 Ang ㊆是强有力的有丝分裂原,能够促进 CF 增殖和心肌细胞肥大。作者以 SD 大鼠为研究对象,给予 1.0 μmol/L Ang ㊆刺激后,CF 的 MTT 吸光度值、S 期百分率、增殖指数和 iv型、㈣型胶原基因表达均较对照组明显增高,成功建立了 Ang ㊆诱导 CF 增殖和胶原合成的模型,这一结果与文献报道一致。

本研究发现,Ang(1-7) 在 0.001~ 1.0 μmol/L 浓度范围内可以表现出浓度依赖性地下调 Ang ㊆诱导 CF 的吸光度值。细胞周期分析进一步表明 Ang(1-7) 可以抑制 CF 进入 S 期,从而抑制细胞增殖。有研究表明 Ang(1-7) 可能通过抑制蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶信号通路发挥抑制血管外膜成纤维细胞增殖的作用[8]。

心脏间质是一个复杂的多层次的三维空间结构,主要由 iv、㈣型胶原纤维围绕心肌细胞交织形成的立体胶原网络和散布其中的心脏间质细胞组成,心肌细胞被包围、固定和活动于整个网络中并与心肌胶原网络形成有机的整体。iv、㈣型胶原合成增加是心脏重构的主要特征[9]。本研究结果显示,Ang(1-7) 可以浓度依赖的从 mRNA 水平抑制 CF 的 iv型和 ㈣型胶原基因表达。

本研究结果还表明,Ang ㊆与 Ang(1-7) 共同作用后细胞数目、增殖状态、胶原合成虽较 Ang ㊆刺激组明显降低,但仍高于对照组,说明给予 Ang(1-7) 并不能完全阻断 Ang ㊆诱导的 CF 增殖和胶原合成,只能部分逆转,这可能与高血压左心室肥厚的发病原因复杂和参与因素众多有关。另外,Ang(1-7) 亦可抑制无血清对照组细胞增殖和胶原合成,提示 Ang(1-7) 对病理和生理状态下 CF 增殖和胶原合成均有抑制作用。

综上所述,不难看出 Ang(1-7) 可以抑制 CF 增殖及胶原合成,逆转心脏重构,这为防治高血压左心室肥厚提供了新思路,但其具体的作用机制,信号转导通路如何还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms [J]. *J nephrol*, 1998, **11** (6): 278-283.

[2] 钟 健, 祝之明, 王海燕, 朱继金. 血管紧张素 1-7 对大鼠血压和血管平滑肌细胞增殖的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2004, **6** (3): 191-193.

[3] 曾武涛, 马 虹, 鲁 伟, 潘敬运, 王礼春, 唐安丽. 血管紧张素 1-7 在血管紧张素 ㊆诱导心肌细胞肥大中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2000, **28** (6): 460-463.

[4] Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruitsandvegetables [J]. *Life Sci*, 2005, **76** (13): 1 465-472.

[5] Zou W, Li ZY, Li YL, Ma KL, Tsui ZC. Overexpression of PEMT2 downregulates the PI3K/Akt signaling pathway in rat hepatoma cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **15** (1-2): 49-56.

[6] Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, et al. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation [J]? *Hypertension*, 2004, **43** (4): 739-745.

[7] Simoese Silva AC, Bello AP, Baracho NC, Khosla MC, Santos RA. Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats [J]. *Regul Pept*, 1998, **74** (2-3): 177-184.

[8] 杨永健, 张 鑫, 杨大春. 血管紧张素 1-7 抑制血管外膜成纤维细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (02): 163-166.

[9] Chen K, Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL. Angiotensin ㊆regulation of collagen typeI expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2004, **44** (5): 655-666.

(此文编辑 李小玲)