

[文章编号] 1007-3949(2008)16-12-0961-04

• 实验研究 •

血管紧张素Ⅱ对大鼠血管外膜成纤维细胞骨桥蛋白表达的影响

刘海潮¹, 何 军², 马业新³

(1. 中国人民解放军广州军区武汉总医院, 湖北省武汉市 430030 2. 宁夏医学院附属医院心内科, 宁夏银川市 750004 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科学, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 内科学; 血管紧张素Ⅱ; 外膜成纤维细胞; 骨桥蛋白; 氯沙坦; 血管重塑

[摘要] 目的 研究血管紧张素Ⅱ对培养的大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞骨桥蛋白表达的影响。方法 大鼠外膜成纤维细胞被随机分为对照组、血管紧张素Ⅱ不同浓度(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L)和时间(6 h、12 h和24 h)干预组及血管紧张素Ⅱ加 AT1受体拮抗剂氯沙坦和/或 AT2受体拮抗剂 PD123319干预组, 用 RT-PCR 及 Western blotting 技术结合光密度扫描分析, 观察血管紧张素Ⅱ对培养的大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞骨桥蛋白表达的影响。结果 血管紧张素Ⅱ 10^{-6} mol/L 明显刺激外膜成纤维细胞骨桥蛋白的表达, 6 h、12 h 和 24 h 骨桥蛋白较对照组分别升高 65.43%、97.03% 和 105.11% ($P < 0.05$); 而 24 h 阴性对照无明显变化。不同浓度的血管紧张素Ⅱ均可诱导骨桥蛋白表达, 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 血管紧张素Ⅱ孵育后分别升高了 70.46%、97.37%、123.10% 和 147.59% ($P < 0.01$)。在血管紧张素Ⅱ刺激前 1 h 分别加入氯沙坦(10^{-5} mol/L)、PD123319(10 mmol/L)、氯沙坦(10^{-5} mol/L) + PD123319(10 mmol/L), 共同孵育 12 h 后, 其抑制率分别为 58.9%、0.92% 和 59.7%。Western blotting 分析, 12 h 不同剂量血管紧张素Ⅱ干预组(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L)骨桥蛋白量较对照组分别提高了 50.68%、63.03% 和 69.86% ($P < 0.05$), 氯沙坦明显抑制血管紧张素Ⅱ刺激的骨桥蛋白表达, 抑制率达到 61.7% ($P < 0.05$), 而 PD123319 作用后抑制作用不明显, 抑制率仅为 0.89% ($P > 0.05$)。结论 血管紧张素Ⅱ能在基因和蛋白水平上刺激大鼠外膜成纤维细胞骨桥蛋白的表达, 此作用可能是通过 AT1 受体介导。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Angiotensin Ⅱ on the Expression of Osteopontin in Rat Vascular Adventitial Fibroblasts

LU HaiChao, HE Jun, and MA Ye-Xin

(Department of Cardiology, Wuhan General Army Hospital, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Ⅱ; Vascular Adventitial Fibroblasts; Osteopontin; Losartan; Vascular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To explore the function of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in promoting osteopontin gene expression and protein synthesis of rat vascular adventitial fibroblasts. **Methods** Cultured cells were incubated with 1 different concentration of Ang Ⅱ for different hours and Ang Ⅱ plus AT1 receptor blocker losartan or/and AT2 receptor blocker PD123319. Then RT-PCR and Western blotting analysis were used to observe the effect of Ang Ⅱ on osteopontin gene expression of rat vascular adventitial fibroblasts. **Results** Ang Ⅱ (10^{-6} mol/L) obviously enhanced the expression of OPN mRNA in adventitial fibroblasts in time-dependent manner; the ratio of mRNA of osteopontin and β -actin in cells incubated with Ang Ⅱ for 6, 12 and 24 h increased by 65.43%, 97.03% and 105.11% respectively, as compared with that of the control ($P < 0.05$), whereas there was no significant change in negative control at 24 h. Ang Ⅱ could induce gene expression of osteopontin in dose-dependent manner; cells incubated with 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L Ang Ⅱ for 12 h, there was up-regulation of OPN mRNA expression by 70.46%, 97.37%, 123.10% and 147.59% respectively ($P < 0.01$). Pre-treatment with losartan (10^{-5} mol/L) and/or PD123319 (10 mmol/L) for 1 h in adventitial fibroblasts before Ang Ⅱ (10^{-6} mol/L) used, the expression of OPN mRNA was inhibited by 58.9%, 0.92% and 59.7% respectively. Western blotting analysis also showed that protein synthesis of osteopontin in cells incubated with 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L Ang Ⅱ for 12 h increased by 50.68%, 63.03%, 69.86% respectively, as compared with that of the control ($P < 0.05$). Pre-treatment with losartan (10^{-5} mol/L) but not PD123319 (10 mmol/L) before Ang Ⅱ (10^{-6} mol/L) used could inhibit the expression of OPN protein. **Conclusions** Ang Ⅱ may up-regulate osteopontin gene expression and protein synthesis of rat vascular adventitial fibroblasts via angiotensin type 1 receptor.

[收稿日期] 2008-06-16

[修回日期] 2008-11-15

[作者简介] 刘海潮, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病的防治, Email 为 LHC197628@163.com。何军, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病的防治。马业新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病与心力衰竭的防治。

血管紧张素 ① (angiotensin ① , Ang ①)诱导骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)在血管平滑肌细胞过度表达,促进平滑肌细胞的增殖与迁移在血管重塑中起重要作用。随着人们对血管外膜改变在血管重塑形成机制中起重要作用的认识,人们发现,在血管损伤模型中(重度或中度球囊损伤)外膜成纤维细胞的表型改变,向管腔方向迁移并增殖形成新生内膜。同时 Li等^[1]在体外实验中证实,由成纤维细胞生长因子受体 1介导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC)表达的骨桥蛋白可促进外膜成纤维细胞迁移和新内膜形成。通过反义阻断 OPN 表达,使迁移的外膜成纤维细胞数目显著减少,说明 OPN 作为一种趋化因子在外膜细胞的迁移中也起着重要的作用。但是血管局部的 Ang ① 是否能诱导外膜成纤维细胞自身表达骨桥蛋白,目前尚不清楚。本实验以培养的大鼠胸主动脉外膜成纤维细胞为实验对象研究其对骨桥蛋白表达的影响,以进一步探讨 Ang ① 和骨桥蛋白在血管外膜重塑中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、DMEM 培养基 (Gibco公司),抗骨桥蛋白多克隆 IgG 抗体 (SantaCruz公司), Ang ① (美国 Sigma公司),兔抗山羊 HRP (华美公司),引物 (上海博亚生物技术有限公司),dNTP、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶 (Promega公司),ECL 显色液 (博彩公司)。氯沙坦 (losartan)为美国 Merck 公司产品。

1.2 大鼠血管外膜成纤维细胞培养

Wistar大鼠(同济医科大学实验动物中心),取 6~8 周龄雄性 WKY 大鼠,断头处死,常规体表消毒,开胸游离取出胸主动脉,纵向剪开血管,分离中层和外膜。将分离后的外膜剪碎,贴片于培养皿底部,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 液培养成纤维细胞,待细胞长至亚融合状态,用 0.25% 胰酶消化、传代,实验使用第 2~3 代细胞。

1.3 细胞分组及 RNA 的提取

当传代细胞生长至 80% 汇合时,加入不同浓度 Ang ① (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L)继续培养 12 h 其中 Ang ① (10^{-6} mol/L)干预的细胞按时间再分为 6、12 和 24 h 干预组,另 3 组在 Ang ① (10^{-6} mol/L)刺激前 1 h 分别加入氯沙坦 (10^{-5} mol/L)、PD123319 (10^{-6} mmol/L)、氯沙坦 (10^{-5} mol/L) + PD123319 (10^{-6} mmol/L),共同孵育 12 h 干预后按异

硫氰酸胍酚氯仿一步法提取细胞总 RNA,以培养液内不加 Ang ① 的细胞作对照。

1.4 RT-PCR 分析

AMV 逆转录酶催化下合成 cDNA,以适量 cDNA 为模板在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。用于骨桥蛋白基因序列扩增的引物序列为:上游: 5'-AAGGAGTATAAGCAGAGGGC-3',下游: 5'-CTCTAGGGTCTAGGACTAGCTTGT-3',扩增片段长度为 200 bp β -肌动蛋白 (β -actin)引物序列为:上游: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3';下游: 5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3',扩增片段为 541 bp 骨桥蛋白的 PCR 反应条件: 94℃ 5 min $\rightarrow$ 94℃变性 1 min $\rightarrow$ 59℃退火 45s $\rightarrow$ 72℃延伸 1 min 30 个循环后再 72℃延伸 10 min β -actin 的 PCR 反应条件: 94℃ 5 min $\rightarrow$ 94℃变性 1 min $\rightarrow$ 57℃退火 45s $\rightarrow$ 72℃延伸 1 min 30 个循环后再 72℃延伸 10 min 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 进行电泳。结束后,于紫外灯下观察扩增结果,并进行图片光密度扫描。以骨桥蛋白与 β -actin 的电泳条带的光密度比值来作为骨桥蛋白 mRNA 的相对表达量。

1.5 蛋白提取及 Western blotting 检测

提取细胞总蛋白,配 10% 分离胶与 4% 浓缩胶,各加 20 μ g 变性蛋白样品与 5 $\times$ 上样缓冲液 1:6 混合,置于 5 $\times$ Tris 甘氨酸缓冲液 (pH 8.3) 中,冰浴中以 80 V 电压电泳 120 min 再以 0.08 A 电流持续转膜 120 min 然后用含脱脂奶粉封闭液封闭,37℃振摇 2 h 后 4℃过夜,第 2 天洗膜 2 次后加入 1:200 抗骨桥蛋白抗体稀释液,37℃振摇 2 h 洗膜 2 次,加入 1:1000 的兔抗山羊 HRP 抗体稀释液 37℃振摇 1 h 滴 1:1ECL 显色液于膜上,反应 5 min 压片 15 min 将胶片置于显影液和定影液各 2 min 后观察。

1.6 密度扫描分析

采用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统软件对 PR-PCR 及 Western blotting 图片扫描进行半定量分析。

1.7 统计学处理

全部实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度血管紧张素 ① 对血管外膜成纤维细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

对照组细胞表达少量的骨桥蛋白基因 (与 β -ac-

tin基因水平光密度比值为 0.401 ± 0.063), 在 Ang II 诱导下, 骨桥蛋白表达水平明显高于基础表达, 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L Ang II 干预组光密度比值 (分别为 0.680 ± 0.029 、 0.793 ± 0.074 、 0.922 ± 0.049 和 1.006 ± 0.030) 分别较对照组提高了 70.46%、97.37%、123.10% 和 147.59%, 差异有显著性 ($P < 0.01$, 图 1)。

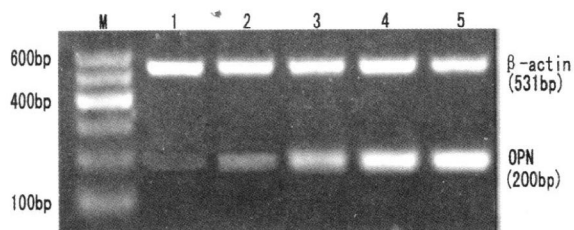


图 1 不同浓度血管紧张素 II 对血管外膜成纤维细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1~5 分别为 0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 血管紧张素 II 。

2.2 血管紧张素 II 干预不同时间对血管外膜成纤维细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

在 Ang II (10^{-6} mol/L) 刺激下, 随着时间的延长, 骨桥蛋白基因表达水平逐渐增高, 在 12 h 达到高峰, 随后稳定高水平表达, 6、12 和 24 h 骨桥蛋白基因 (与 β -actin 基因水平光密度比值分别为 0.761 ± 0.086 、 0.973 ± 0.032 和 1.007 ± 0.013) 与对照组相比分别提高了 65.43%、97.03% 和 105.11%, 差异均有显著性 ($P < 0.05$, 图 2)。

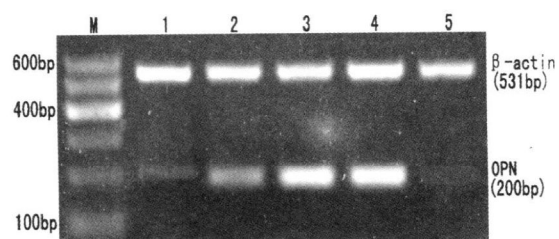


图 2 血管紧张素 II 干预不同时间对大鼠外膜成纤维细胞内骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1~4 分别为 Ang II 刺激后 0、6、12 和 24 h 5 为无血管紧张素 II 刺激 24 h 阴性对照。

2.3 氯沙坦和 PD123319 对 Ang II 诱导外膜成纤维细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

实验中分别在 Ang II (10^{-6} mol/L) 刺激前 1 h 加入氯沙坦 (10^{-5} mol/L) 和/或 PD123319 (10 mmol/L), 共同孵育 12 h。氯沙坦明显抑制 Ang II 刺激的骨桥蛋白基因表达, 抑制率达到 58.9% ($P < 0.05$), 而 PD123319 作用后抑制率为 0.92% ($P > 0.05$), 氯沙坦 + PD123319 组抑制率为 59.7%, 与

单独氯沙坦组比较差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 3)。

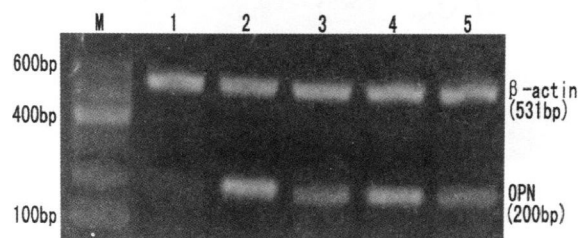


图 3 氯沙坦和 PD123319 对血管紧张素 II 诱导大鼠外膜成纤维细胞内骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1 和 2 分别为 0 及 10^{-6} mol/L 血管紧张素 II 刺激 12 h (分别为阴性和阳性对照); 3~5 分别为血管紧张素 II (10^{-6} mol/L) 刺激前 1 h 加入氯沙坦、PD123319 及氯沙坦 + PD123319。

2.4 血管紧张素对血管外膜成纤维细胞骨桥蛋白表达量的影响

对照组细胞表达少量的骨桥蛋白 (条带光密度扫描为 73.67 ± 10.11), 不同浓度 (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) Ang II 干预 12 h 后蛋白表达量有所增加 (条带光密度扫描分别为 110.52 ± 11.03 、 119.05 ± 5.25 和 124.26 ± 9.75) 较对照组分别提高 50.68%、63.03% 和 69.86%。对照组与各干预组间差异均有显著性 ($P < 0.05$, 图 4)。

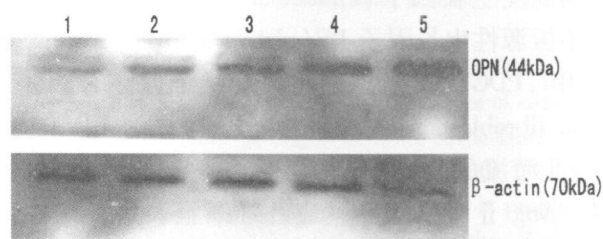


图 4 不同浓度血管紧张素 II 诱导大鼠外膜成纤维细胞 12 h 后对骨桥蛋白表达的 Western 印迹结果 β -actin 为内参照; 1~5 分别为 0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 血管紧张素 II 。

2.5 氯沙坦和 PD123319 对血管紧张素 II 诱导外膜成纤维细胞骨桥蛋白表达量的影响

在 Ang II (10^{-6} mol/L) 刺激前 1 h 加入氯沙坦 (10^{-5} mol/L) 和/或 PD123319 (10 mmol/L), 共同孵育 12 h。氯沙坦明显抑制 Ang II 刺激的骨桥蛋白表达, 抑制率达到 61.7% ($P < 0.05$), 而 PD123319 作用后抑制率为 10.25% ($P > 0.05$), 氯沙坦 + PD123319 组抑制率为 69.63%, 与单独氯沙坦组比较差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 5)。

3 讨论

近年的研究结果指出外膜在血管功能中并非只

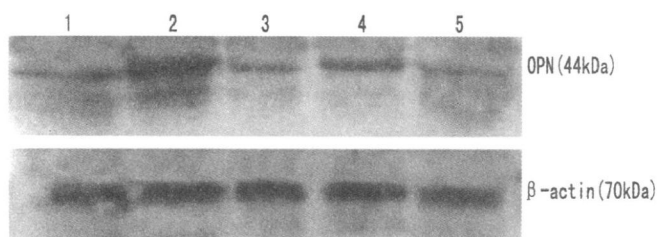


图 5 氯沙坦和 PD123319 对血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 诱导大鼠外膜成纤维细胞内骨桥蛋白表达的 Western 印迹结果 β -actin 为内参照; 1、2 分别为 0 及 10^{-6} mol/L 血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 刺激 12 h (分别为阴性和阳性对照); 3~5 分别为血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ (10^{-6} mol/L) 刺激前 1 h 加入氯沙坦、PD123319 及氯沙坦 + PD123319。

起支持及营养作用。血管外膜改变在血管重塑形成机制中的作用越来越受到人们的重视。血管外膜的主要细胞成分为血管外膜成纤维细胞 (adventitial fibroblasts, AF)。在血管重塑过程中, 成纤维细胞转变为肌成纤维细胞, 表达 α 肌动蛋白, 并增殖、从外膜迁移至内膜, 同时细胞外间质种类和数量发生变化, 而局部体液因素起重要的调节作用, 其中血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 尤为重要。血管损伤后外膜局部的肾素血管紧张素系统被激活。已有文献报道血管外膜也存在 $\text{Ang} \text{II}$ 的受体, 以往研究报道 $\text{Ang} \text{II}$ 通过 AT1 受体促进 AF 的增殖与有丝分裂, 而且可增强其它促分裂剂表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF), 血小板源性生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的作用^[2]。经 $\text{Ang} \text{II}$ 灌流的 SD 大鼠其胸主动脉外膜胶原沉积增多。 $\text{Ang} \text{II}$ 可引起外膜成纤维细胞表型转化表达 KI-67 和 α -SMA^[3]。

骨桥蛋白是一种相对分子量约为 44 kDa 的分泌型糖基化磷蛋白, 约含 300 个氨基酸残基, 其氨基酸序列分析表明其含特异的 RGD (Arg Gly Asp) 基元——细胞粘附功能基元, 该基元是骨桥蛋白分子发挥粘附功能的结构基础。在心血管系统, OPN 来源于内皮细胞、VSMC、MΦ 和肌成纤维细胞 (myofibroblast, MF)。有资料显示, 在一系列参与动脉粥样硬化和血管成形术后狭窄的细胞因子中, PDGF、bFGF、EGF、TGF- β 、IL-1 和 $\text{Ang} \text{II}$ 均能够刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞过度表达骨桥蛋白。原位杂交免疫组织化学和 Western blotting 检测结果显示, 不仅粥样硬化和再狭窄病变部位的血管内皮细胞和平滑肌细胞内骨桥蛋白 mRNA 呈高表达状态, 而且细胞外基

质中的骨桥蛋白含量也明显升高。并且 OPN 与斑块稳定性有关^[4]。在其他的血管疾病, 如动脉钙化、高血压病和动脉瘤等都证实 OPN 参与了血管的修复与重塑^[5]。

既往对骨桥蛋白的研究主要集中在平滑肌细胞上, 近来发现 OPN 也参与外膜成纤维细胞向肌成纤维细胞转化和迁移, 用差异显示技术发现在 AF 向 MF 转化过程中, OPN 基因上调, 提示 OPN 可能也是一种细胞分化的标志基因^[6]。近来认为, 当内膜损伤后释放多种生长因子, 如 TGF- β 1 可使 AF 转化为 MF, 而 MF 在细胞内表达 OPN 并迁移至内膜后分泌 OPN, 此时 OPN 可使大量的 MF 和 VSMC 迁移至内膜, 参与新生内膜的形成。

本研究结果表明, $\text{Ang} \text{II}$ 可刺激血管外膜成纤维细胞 OPN mRNA 的表达, 且随着浓度增大作用时间的延长, 其作用亦增强, 而 Western blotting 条带光密度扫描亦显示其蛋白表达与基因水平的研究结果相一致, 由此推测 $\text{Ang} \text{II}$ 刺激血管外膜成纤维细胞 OPN 合成的机制与其在转录水平刺激 OPN mRNA 的表达有关。作者进一步研究发现, AT1 受体拮抗剂氯沙坦 10 μ mol/L 能明显减弱 $\text{Ang} \text{II}$ 刺激的 OPN 表达, 而 AT2 受体拮抗剂 PD123319 的这种作用不明显, 说明 $\text{Ang} \text{II}$ 主要通过 AT1 受体来介导此作用。 $\text{Ang} \text{II}$ 是否通过上调外膜成纤维细胞内骨桥蛋白的表达来参与成纤维细胞的增殖与迁移有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Li G, Oparil S, Kelpke SS, et al. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro [J]. *Circulation*, 2002, 106 (7): 854-859.
- [2] Kim DK, Huh JE, Lee SH, et al. Angiotensin $\text{Ang} \text{II}$ stimulates proliferation of adventitial fibroblasts cultured from rat aortic explants [J]. *J Korean Med Sci* 1999, 14 (5): 487-496.
- [3] Tsunoda T, Kato J, Hatakeyama K, et al. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in angiotensin $\text{Ang} \text{II}$ -induced hypertensive rats [J]. *Cardiovasc Res* 2005, 65 (4): 921-929.
- [4] Golledge J, McCann M, Mangan S, et al. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis [J]. *Stroke* 2004, 35 (7): 1636-1641.
- [5] Van Vickle-Chavez SJ, Tung W, Sabes TS, et al. Temporal changes in mouse aortic wall gene expression during the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysms [J]. *J Vasc Surg* 2006, 43 (5): 1010-1020.
- [6] Sun AJ, Gao PJ, Liu JJ, et al. Identification of genes related to cell phenotypic transition by differential display analysis [J]. *Acta Physiol Sin*, 2001, 53 (6): 435-439.

(此文编辑 李玲玲)