

## 血管紧张素 1-7 抑制血管外膜成纤维细胞增殖

杨永健, 张 鑫, 杨大春

(成都军区成都总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 内科学; 血管紧张素 1-7; 细胞增殖; 信号转导; 血管外膜; 成纤维细胞

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 1-7 对血管外膜成纤维细胞增殖的影响。方法 在培养大鼠血管外膜成纤维细胞中, 用血管紧张素 Ⅱ和血管紧张素 1-7 刺激, 检测蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶及钙调神经磷酸酶活性, 以氘标胸腺嘧啶和氘标亮氨酸掺入量反映血管外膜成纤维细胞增殖的指标。结果 血管紧张素 1-7 既能明显抑制基础状态下血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 又能抑制血管紧张素 Ⅱ刺激下的血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。血管紧张素 1-7 能明显抑制血管外膜成纤维细胞氘标胸腺嘧啶和氘标亮氨酸掺入 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 而血管紧张素 Ⅱ则促进血管外膜成纤维细胞氘标胸腺嘧啶和氘标亮氨酸掺入 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。血管紧张素 1-7 还能抑制血管紧张素 Ⅱ刺激下的血管外膜成纤维细胞氘标胸腺嘧啶和氘标亮氨酸掺入 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论 血管紧张素 1-7 可能通过影响蛋白激酶 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。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Impact of Angiotensin (1-7) on the Proliferation in Cultured Rat Adventitial Fibroblasts

YANG Yong-Jian, ZHANG Xin, and YANG Da-Chun

(Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Army, Chengdu 610083, China)

[KEY WORDS] Angiotensin (1-7); Proliferation; Signal transduction; Fibroblasts adventitial

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Angiotensin (1-7) [Ang (1-7)] on the activities of protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and calcineurin (CaN) in cultured rat adventitial fibroblasts to affect proliferation. **Methods** PKC, MAPK and CaN activities were measured in cultured rat adventitial fibroblasts, the proliferation was examined by  $^3\text{H}$ -Thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) and  $^3\text{H}$ -Leucine ( $^3\text{H}$ -Leu) incorporation. **Results** By contrast, Ang Ⅱ promoted PKC, MAPK and CaN activities in cultured rat adventitial fibroblasts ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Ang (1-7) not only inhibited PKC, MAPK and CaN activities, but also decreased Ang Ⅱ-mediated PKC, MAPK and CaN activities, compared with their respective controls ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Ang Ⅱ increased  $^3\text{H}$ -TdR and  $^3\text{H}$ -Leu incorporation in cultured rat adventitial fibroblasts, Ang (1-7) not only inhibited  $^3\text{H}$ -TdR and  $^3\text{H}$ -Leu incorporation, but also decreased  $^3\text{H}$ -TdR and  $^3\text{H}$ -Leu incorporation mediated by Ang Ⅱ in cultured rat adventitial fibroblasts, compared with their respective controls ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion** It is concluded that Ang (1-7) inhibited cultured rat adventitial fibroblasts proliferation by depressing PKC-MAPK and CaN signaling pathway.

血管外膜在血管重塑中的作用受到越来越多的重视, 近期有人提出在血管重塑过程中新生内膜并非来源于血管中层的平滑肌, 而是由血管外膜和中层的成纤维细胞增殖迁移而成<sup>[1,2]</sup>。钙调神经磷酸酶是一种受  $\text{Ca}^{2+}$  及钙调素 (calcineurin M, CaM) 调节的多功能信号酶, 通过使活化 T 细胞核因子转位入核, 调节核内一系列基因的表达, 在细胞肥大增殖过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。细胞外各种刺激信号通过不同

的信息传递通路, 共同交汇于蛋白激酶 C, 激活的蛋白激酶 C 通过依赖或非依赖 ras 机制激活丝裂素活化蛋白激酶, 由此形成蛋白激酶 C—丝裂素活化蛋白激酶级联反应<sup>[4]</sup>。新近研究表明<sup>[5,6]</sup>, 肾素—血管紧张素系统的新成员血管紧张素 1-7 [angiotensin (1-7), Ang (1-7)] 是血管紧张素 Ⅱ (angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) 的内源性拮抗因子, 可以抑制 Ang Ⅱ介导的血管外膜成纤维细胞增殖, 但有关 Ang (1-7) 作用的信号转导机制尚不十分清楚。本研究应用 Ang Ⅱ和 Ang (1-7) 刺激血管外膜成纤维细胞, 并检测蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶活性及氘标亮氨酸和氘标胸腺嘧啶掺入量, 观察 Ang (1-7) 对血管外膜成纤维细胞生长的影响, 并对其相关信号转导机制进行探讨。

[收稿日期] 2004-09-30

[修回日期] 2005-03-06

[作者简介] 杨永健, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管重构有关的信号转导机制, 联系电话 028-83572475, E-mail 为 yangyongjian38@yahoo.com。张鑫, 副主任医师, 副主任, 从事心血管重构的基础与临床研, 联系电话 028-86570417。杨大春, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床, 联系电话 028-86570635。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

钙调神经磷酸酶底物 PNPP 购自杜邦公司; Ang ①-Ang-(1-7)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、M199、髓磷脂碱性蛋白(MBP)、磷脂酰丝氨酸、组蛋白 ①SS、蛋白酶抑制剂(PMSF 等)均购自 sigma 公司; 氚标亮氨酸购自中科院上海核技术开发公司; 氚标胸腺嘧啶( $^3\text{H-TdR}$ )购自北京原子能科学研究院。

### 1.2 血管外膜成纤维细胞培养

取 4 只 6 周龄雄性 Wistar 大鼠, 断头处死, 开胸游离主动脉降段(沿主动脉出口平面至膈肌入口处), 置于 Hank's 液中洗涤血迹, 纵向剪开血管, 轻轻刮去内膜, 并分离中层和外膜。将分离后的外膜剪成  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  大小的组织块, 置于培养皿中加入 10% 胎牛血清的 M199 培养液进行组织贴块培养。细胞长至亚融合状态时, 用 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 消化、传代。取第 3~8 代细胞作实验。

### 1.3 实验分组

按刺激因素将培养的血管外膜成纤维细胞分为四组, 分别为 Ang ①-Ang ①+ Ang-(1-7)、Ang-(1-7)及对照组。Ang ①刺激浓度为  $10^{-7}\text{ mol/L}$ , Ang-(1-7)终浓度为  $10^{-5}\text{ mol/L}$ 。

### 1.4 钙调神经磷酸酶活性测定

参照符民桂等<sup>[7,8]</sup>的方法。将消化的血管外膜成纤维细胞悬液接种于 24 孔培养板, 每孔 2 mL, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱, 24 h 后换上无血清培养基再培养 12 h, 分组药物刺激 15 min 后制备细胞提取液。冷 PBS 洗涤收集细胞 2 次, 加入预冷的匀浆液, 匀浆液含 50 mmol/L Tris, pH7.5, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 50 mg/L PMSF, 50 mg/L STI, 5 mg/L leupeptin, 5 mg/L aprotinin。反复冻融 3 次破碎细胞,  $4^\circ\text{C}$  离心, 取上清, 应用考马斯亮蓝法蛋白定量后进行钙调神经磷酸酶活性测定。

底物 iv 液含 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 0.5 mmol/L DDT, 0.2 g/L BSA, 10 mmol/L PNPP, 0.5 mmol/L  $\text{MnCl}_2$ , 0.2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.3  $\mu\text{mol/L}$  CaM。底物 ①液含 3 mmol/L EGTA, 不含  $\text{CaCl}_2$  和 CaM。测定时取待测提取液 20  $\mu\text{L}$  与底物 380  $\mu\text{L}$   $30^\circ\text{C}$  保温 10 min, 立即加入含 0.5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  及 0.4 mmol/L EGTA 的终止反应, 在分光光度计上 410 nm 读取吸光度, 以空白底物液调零, 每样本底物 iv 液测出的值作为磷酸酶的总活力; 底物 ①液测出的值是非钙调神经磷酸酶的其它磷酸酶活力, 两者之差即钙调神经磷酸酶活力, 结果以比活力(A410nm/mg pro)表

示, 重复 6 次。

### 1.5 丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性测定

将消化的血管外膜成纤维细胞悬液接种于 24 孔培养板, 每孔 2 mL, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱, 24 h 后换上无血清培养基培养 12 h, 分组药物刺激 15 min 后制备细胞提取液后, 按李田昌、符民桂等的方法<sup>[7,9]</sup>, 用  $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  磷酸化底物 MBP 测血管外膜成纤维细胞丝裂素活化蛋白激酶活性, 酶的活性用 cpm/well 表示, 重复 6 次; 以  $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  磷酸化蛋白激酶 C 底物肽, 测血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C 活性, 酶的活性用 cpm/well 表示, 重复 6 次。

### 1.6 氚标亮氨酸掺入量的测定

消化的血管外膜成纤维细胞悬液配制成  $5 \times 10^8/\text{L}$  细胞, 接种到 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱, 24 h 后换上无血清培养基培养 12 h, 分组药物刺激, 氚标亮氨酸终浓度为  $1.85 \times 10^{11}\text{ Bq/L}$ , 24 h 后收集各孔细胞液闪记数, 用放射性同位素氚标亮氨酸掺入量反应血管外膜成纤维细胞蛋白质合成速率。

### 1.7 氚标胸腺嘧啶掺入量的测定

氚标胸腺嘧啶终浓度为  $3.7 \times 10^{10}\text{ Bq/L}$ , 其余同氚标亮氨酸掺入量的测定。

### 1.8 统计学处理

所有均数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间进行  $t$  检验和方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 血管平滑肌细胞的鉴定及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度

倒置显微镜下可见培养的血管外膜成纤维细胞呈岛状生长,  $\alpha\text{-actin}$  单克隆抗体免疫组织化学显示 99% 细胞染色为阴性, 说明该纯度完全能满足实验需要。

### 2.2 血管外膜成纤维细胞钙调神经磷酸酶、丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性

从表 1(Table 1) 可以看出, Ang ①刺激组血管外膜成纤维细胞钙调神经磷酸酶活性明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), Ang-(1-7) 可明显抑制 Ang ①介导的血管外膜成纤维细胞钙调神经磷酸酶活性增高, 与 Ang ①刺激组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。Ang ①刺激组丝裂素活化蛋白激酶活性与对照组相比差异显著性 ( $P < 0.05$ ); Ang-(1-7) 能明显抑制血管外膜成纤维细胞丝裂素活化蛋白激酶活性, 与 Ang ①刺激组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); Ang ①刺激组血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C 活性明显高于对照组 ( $P <$

0.05), Ang-(1-7) 能明显抑制 Ang Ⅱ介导的血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C 活性增加( $P < 0.05$ )。

表 1. 血管紧张素 1-7 对血管紧张素 Ⅱ刺激的大鼠血管外膜成纤维细胞钙调神经磷酸酶、丝裂素活化蛋白激酶、蛋白激酶 C 活性的影响

Table 1. The effect of Ang-(1-7) on Ang Ⅱinduced increase of calcineurin, MAP-kinase, Protein Kinase C activities in rat vascular smooth muscle cells ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

分 组	钙调神经磷酸酶丝裂素活化蛋白激酶 (A410nm/Well)	丝裂素活化蛋白激酶 (cpm/well)	蛋白激酶 C (cpm/well)
对照组	0.043 ± 0.001	5362 ± 276	4512 ± 324
Ang-(1-7)	0.029 ± 0.001 <sup>a</sup>	4539 ± 268 <sup>a</sup>	3999 ± 211 <sup>a</sup>
Ang Ⅱ	0.069 ± 0.003 <sup>a</sup>	7137 ± 411 <sup>a</sup>	6133 ± 801 <sup>a</sup>
Ang Ⅱ+ Ang-(1-7)	0.046 ± 0.002 <sup>b</sup>	6298 ± 326 <sup>b</sup>	5093 ± 678 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$  与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 Ang Ⅱ组比较。

2.3 血管外膜成纤维细胞氚标亮氨酸掺入

血管紧张素 Ⅱ(Ang Ⅱ)明显提高血管外膜成纤维细胞氚标亮氨酸掺入量(表 2, Table 2), 两组相比差异非常显著( $P < 0.01$ )。而 Ang-(1-7)可明显抑制血管外膜成纤维细胞氚标亮氨酸掺入量的增加(表 2, Table 2), 与 Ang Ⅱ刺激组相比差异非常显著( $P < 0.01$ )。

2.4 血管外膜成纤维细胞氚标胸腺嘧啶掺入

血管紧张素 Ⅱ(Ang Ⅱ)明显提高血管外膜成纤维细胞氚标胸腺嘧啶掺入量(表 2, Table 2), 与对照组相比差异显著( $P < 0.01$ ), Ang-(1-7)可明显抑制血管外膜成纤维细胞氚标胸腺嘧啶掺入量的增加(表 2, Table 2), 与 Ang Ⅱ刺激组相比差异非常显著( $P < 0.01$ )。

表 2. 血管紧张素 1-7 对血管紧张素 Ⅱ刺激的大鼠血管外膜成纤维细胞氚标亮氨酸、氚标胸腺嘧啶掺入的影响

Table 2. The effect of Ang-(1-7) on Ang Ⅱinduced increase of <sup>3</sup>H-leucine and <sup>3</sup>H-TdR incorporation in cultured rat adventitial fibroblasts ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

分 组	氚标胸腺嘧啶掺入 (cpm/well)	氚标亮氨酸掺入 (cpm/well)
对照组	906 ± 102	34 661 ± 2 000
Ang-(1-7)	801 ± 99 <sup>a</sup>	29 998 ± 1 500 <sup>a</sup>
Ang Ⅱ	1 897 ± 97 <sup>a</sup>	51 778 ± 1 277 <sup>b</sup>
Ang Ⅱ+ Ang-(1-7)	1 377 ± 79 <sup>ab</sup>	42 356 ± 1 138 <sup>db</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$  与对照组比较; c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$  与血管紧张素 Ⅱ组比较。

3 讨论

血管紧张素 1-7[Ang-(1-7)]是由七个氨基酸组成的肾素-血管紧张素系统新成员, 作为 Ang Ⅱ的内源性拮抗因子, 对血管外膜成纤维细胞生长发挥重要的调节作用。Tallant 等<sup>[5]</sup>报道 Ang-(1-7)浓度依赖性抑制血清、Ang Ⅱ和血小板源生长因子刺激的血管外膜成纤维细胞氚标胸腺嘧啶掺入; Ang Ⅱ通过 Ang Ⅱ型受体发挥效应, 但 Ang-(1-7)与其机制不同, Ang-(1-7)的作用不能被 Ang 受体拮抗剂阻断, 提示 Ang-(1-7)通过非 Ang Ⅱ型受体、非 Ang Ⅱ型受体发挥抑制血管外膜成纤维细胞生长的作用。本研究发现 Ang Ⅱ浓度依赖性地增加血管外膜成纤维细胞氚标胸腺嘧啶和氚标亮氨酸掺入, 而 Ang-(1-7)浓度依赖性地抑制基础和 Ang Ⅱ刺激的氚标胸腺嘧啶和氚标亮氨酸掺入。

已知丝裂素活化蛋白激酶信号通路在细胞的增殖中起重要作用。细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增高, 激活  $Ca^{2+}$  敏感酶钙调神经磷酸酶, 激活的钙调神经磷酸酶使核因子 ATc 去磷酸化并进入胞核, 去磷酸化的核因子 ATc 再与心肌细胞核内的转录因子如锌指转录因子 GATA4(一种心肌细胞内的特殊转录因子)等相互作用, 活化多种肥厚增殖的相关基因<sup>[3]</sup>。细胞外各种刺激信号通过不同的信息传递通路, 共同交汇于蛋白激酶 C, 激活的蛋白激酶 C 通过依赖或非依赖 ras 机制激活丝裂素活化蛋白激酶, 由此形成蛋白激酶 C-丝裂素活化蛋白激酶级联反应, 已明确的四条丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路为 ERK1/2、JNK、P38 丝裂素活化蛋白激酶和 ERK5 通路, 其中 ERK1/2 通路是迄今研究较多的一条丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路, 生长因子可激活 ERK1/2, 活化的 ERK1/2 移位入核磷酸化一系列转录因子, 引起细胞增殖、分化<sup>[4]</sup>。Tallant 等<sup>[5,6]</sup>报道, 血管外膜成纤维细胞表达蛋白激酶 C- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\zeta$ 等亚型, 蛋白激酶 C- $\zeta$ 在 Ang Ⅱ对血管外膜成纤维细胞 ERK1/2 的激活中有重要作用。本研究表明, Ang Ⅱ导致血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶活性明显增高; 而 Ang-(1-7)可以显著抑制基础和 Ang Ⅱ介导的血管外膜成纤维细胞蛋白激酶 C、丝裂素活化蛋白激酶和钙调神经磷酸酶活性, 提示 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, 这三条信号通路的关系尚不完全清楚, 尚有待进一步的研究结果明确。

本研究提示,增加内源性 Ang-(1-7) 生成和补充外源性 Ang-(1-7) 可能对血管增殖性疾病有治疗价值,这也为高血压和冠心病的治疗提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Zhu DL, Herembert T, Marche P. Increased proliferation of adventitial fibroblast from spontaneous hypertensive rat aorta. *Hypertension*, 1991, (6): 1161-168
- [2] Zhu DL, Herembert T, Caruelle D, Caruelle JP, Marche P. Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor -induced activation of arterial cells in spontaneous hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol*, 1994, 23 (1): 395
- [3] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 2004, 93 (1): 111-118
- [4] Liao DF, Monia B, Dean N, Berk BC. Protein kinase C- $\zeta$  mediates angiotensin  $\text{I}^{\text{I}}$  activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997, 272 (10): 6146-150
- [5] Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanism of inhibition of vascular growth by angiotensin(1-7). *Hypertension*, 2003, 42 (4): 574-579
- [6] Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin(1-7) downregulates the angiotensin  $\text{I}^{\text{I}}$  type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2001, 37 (4): 1141-146
- [7] 符民桂, 王晓红, 姜志胜, 庞永政, 刘乃奎, 唐朝枢. 钙调神经磷酸酶依赖的信号通路参与血管紧张素  $\text{I}^{\text{I}}$  刺激的心肌细胞肥大. *生理学报*, 1999, 51 (5): 597-601
- [8] 符民桂, 唐朝枢. 钙调神经磷酸酶活性测定. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8 (1): 82-83
- [9] 李田昌, 庞永政, 唐朝枢. 丝裂素活化蛋白激酶活性的测定. *基础医学与临床*, 1996, 16 (3): 155-158

(此文编辑 胡必利)

#### •会议信息•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0166-01

## 第十二届国际生物流变学大会暨第五届国际临床血液流变学大会

一、时间:2005年5月30日~6月3日;地点:重庆金源大酒店。

二、主办单位:

国际生物流变学会、国际临床血液流变学会、中国生物物理学会生物力学及生物流变学专业委员会。

协办单位:重庆大学、重庆市科委、重庆市科协、中国国际自然科学基金、中国生物医学工程学会、中国理论与应用力学学会及其它生物医学工程产业。

合作单位:重庆雨新会展有限公司。

三、大会主题:

生物流变学\临床血液流变学:与时俱进,关注人类健康。包括:

1. 生物流体流变学和力学;
2. 生物固体流变学和力学;
3. 流变方法学;
4. 血管流变学和生物学;
5. 临床血液流变学;
6. 微循环;
7. 血液流变学药物和传统医学;
8. 细胞流变学和细胞工程;

9. 分子流变学和力学;

10. 力学响应及应力与生长的关系;

11. 组织工程流变学;

12. 组织损伤和修复流变学;

13. 干细胞生物流变学;

14. 生物流变学在其他领域的新的开拓。

四、组织领导:

大会顾问委员会主席: Y-C. Fung(USA)

大会组织委员会主席: S. Chien(USA)、廖福龙(China)

秘书长: 蔡绍哲(China)

大会学术委员会主席: 吴云鹏(China)、K-L. P. Sung(USA)

五、联系方式:

组委会地址: 重庆市南坪西路3号商业大楼9-5号

电话: 023-62986633, 62986464

传真: 023-62986644, 62986713

联系人: 邓毅; 电话: 023-66751995, 13708347989

E-mail: chujuncq@yeah.net