

·实验研究·

血管紧张素-(1-7)对血管紧张素 II 诱导培养乳鼠非心肌细胞增殖的影响

曾武涛, 董吁钢, 马虹, 潘敬运, 刘培庆, 曾进胜, 关永源

(中山医科大学附属第一医院心内科, 广东广州 510089)

摘要: 【目的】探讨血管紧张素-(1-7)[Ang-(1-7)]对血管紧张素 II (Ang II) 诱导培养乳鼠非心肌细胞增殖的影响。【方法】在 Ang II 诱导培养的 SD 乳鼠非心肌细胞中, 应用 Ang-(1-7), 通过测定非心肌细胞 DNA、蛋白质合成、细胞数目等指标, 观察非心肌细胞增殖情况。【结果】Ang-(1-7) 呈剂量依赖性抑制 Ang II 诱导培养的乳鼠非心肌细胞的 DNA 及蛋白质合成, 与单纯 Ang II 组相比, Ang-(1-7) 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 分别减少 [^3H] thymidine 掺入 21%、31%、35%、36%, 减少 [^3H] Leucine 掺入 15%、25%、31%、32%。Ang-(1-7) 还能减少 Ang II 诱导培养的乳鼠非心肌细胞数目 (Ang II 组吸光度: 0.86 ± 0.10 ; Ang II + Ang-(1-7) 组: 0.78 ± 0.09 , $P < 0.05$), 其作用能被非选择性血管紧张素 II 拮抗剂 [$\text{Sar}^1 \text{Thr}^8$] Ang II 抑制。【结论】Ang-(1-7) 能抑制 Ang II 诱导的乳鼠非心肌细胞增殖。

关键词: 血管紧张素类; 非心肌细胞; 增殖

中图分类号: Q592.1; R543

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)04-0241-04

The Influence of Angiotensin-(1-7) on Proliferation of Cultured Cardiac Nonmyocytes of Neonatal Rats Induced by Angiotensin II

ZENG Wu-tao, DONG Yu-gang, MA Hong, PAN Jing-yun, LIU Pei-qing,
ZENG Jin-sheng, GUAN Yong-yuan

(Division of Cardiology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To explore the influence of angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] on proliferation of cultured cardiac nonmyocytes of neonatal rats induced by angiotensin II (Ang II). 【Methods】Ang-(1-7) was used in cultured cardiac nonmyocytes of neonatal rats induced by Ang II. The synthesis of DNA, protein and cell numbers of nonmyocytes were employed to observe proliferation of nonmyocytes. 【Results】Ang-(1-7) inhibited synthesis of DNA and protein of neonatal rats nonmyocytes induced by Ang II in a dose-dependent manner. Compared with Ang II group, [^3H] thymidine incorporation was decreased by 21%, 31%, 35%, 36% and [^3H] Leucine incorporation was decreased by 15%, 25%, 31%, 32% by Ang-(1-7) 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L respectively. Ang-(1-7) also reduced the numbers of cultured cardiac nonmyocytes of neonatal rats induced by Ang II [Absorbance of Ang II group: 0.86 ± 0.10 , Ang II + Ang-(1-7) group: 0.78 ± 0.09 , $P < 0.05$]. The effects of Ang-(1-7) could be blocked by [$\text{Sar}^1 \text{Thr}^8$] Ang II. 【Conclusion】Ang-(1-7) can inhibit proliferation of cultured cardiac nonmyocytes of neonatal rats induced by Ang II.

Key words: angiotensins; cardiac nonmyocyte; proliferation

收稿日期: 2001-03-20

基金项目: 2000 年广东省科委基金团体项目

作者简介: 曾武涛(1970-), 男, 湖南嘉禾人, 医学博士, 讲师; 潘敬运、刘培庆, 本校生理学教研室; 曾进胜, 本校附属第一医院神经内科; 关永源, 本校药理学教研室。Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

左室肥厚是许多心血管疾病的一种重要并发症,最终导致心力衰竭和恶性心律失常,是心血管疾病死亡率升高的一个独立危险因素^[1]。左室肥厚的发生涉及到多种因素参与,除压力超负荷的机械刺激外,神经体液因子亦参与了左室肥厚,血管紧张素 II (Ang II) 就是最重要的导致左室肥厚的神经体液因子之一。过去许多研究证明 Ang II 可致心脏心肌细胞肥大和非心肌细胞增殖^[2,3]。最近,我们的研究发现血管紧张素-(1-7) [Ang-(1-7)] 能抑制 Ang II 诱导培养的乳鼠心肌细胞肥大^[4],但其能否抑制 Ang II 诱导培养的乳鼠心脏非心肌细胞增殖尚不清楚。本实验我们采用培养乳鼠心脏的非心肌细胞做为模型,观察 Ang-(1-7) 对 Ang II 诱导的心脏非心肌细胞增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

Ang-(1-7), Ang II, [Sar¹ Thr⁸] Ang II 购自美国 Sigma 公司; DEME 培养基, 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; ³H-Thymidine、³H-Leucine 购自中国原子能研究所; 胎牛血清购于杭州四季青生物材料工程研究所; SD 乳鼠由中山医科大学动物中心提供。

1.2 非心肌细胞的培养

取 1~3 天龄 SD 乳鼠, 在无菌条件下取出心室, 剪成约 1 mm³ 大小碎块, 0.8 g/L 胰蛋白酶消化后, 离心, 收集细胞, 加入含 100 g/L 胎牛血清的 DEME 培养液, 接种于 50 mL 培养瓶中, 置 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中单层贴壁培养, 用 1 h 差速贴壁法分离心肌细胞和非心肌细胞(主要为成纤维细胞), 将非心肌细胞用 100 g/L 牛血清 DEME 液配成 1×10⁶/mL 的密度均匀接种于 35 mm 的培养器及 24 孔培养板上, 待非心肌细胞长满瓶壁后, 用 0.8 g/L 的胰蛋白酶消化传代, 实验采用传代培养的非心肌细胞, 这样更能保证细胞的数量和纯度。实验前代之以指定的无血清培养液(DMEM、胰岛素 10 mg/L、转铁蛋白 10 mg/L、VitC 100 μmol/L、VitB₁₂ 1.5 μmol/L、青霉素 100 mg/L), 每 3 天换一次培养液。

1.3 非心肌细胞的鉴定

主要从两个方面鉴定: 一方面是培养的心肌细胞和非心肌细胞(主要为成纤维细胞)形态不一样, 心肌细胞具有自发性搏动。本实验通过异丙肾上

腺素 1 μmol/L 的刺激, 在倒置显微镜下计数心肌细胞的收缩情况, 非心肌细胞培养组产生收缩的细胞不足 10%。另一方面是心肌细胞不能传代培养, 而成纤维细胞传代培养生长良好, 因此, 我们使用的传代培养的非心肌细胞中几乎不含心肌细胞。

1.4 实验分组

将生长在 24 孔培养板上无血清静止培养了 24 h 的非心肌细胞培养液, 按以下分组加入不同干扰素进行实验。①对照组(无血清组): 非心肌细胞培养液中不加干预因素; ②Ang II 组: 加入 Ang II 10⁻⁷ mol/L; ③Ang-(1-7)组: 加入 Ang-(1-7) 10⁻⁶ mol/L; ④Ang II + Ang-(1-7)组: 在加入 Ang II 10⁻⁷ mol/L 基础上, 分别加入 Ang-(1-7) 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L; ⑤Ang II + Ang(1-7) + [Sar¹ Thr⁸] Ang II: 予 10⁻⁵ mol/L [Sar¹ Thr⁸] Ang II 预处理 30 min 后, 再加入 Ang II 10⁻⁷ mol/L 和 Ang-(1-7) 10⁻⁶ mol/L。

1.5 DNA 及蛋白质合成测定

按上述分组加入不同干预药物时, 同时在 24 板孔加入 37 kBq [³H] thymidine 一起培养 24、48、72 h。移去培养液并用预冷的 100 g/L 三氯乙酸于 4 °C 固定 30 min, 然后用平衡盐溶液洗 2 次, 最后用 10 g/L SDS 0.1 mol/L NaOH 溶液 0.5 mL 裂解细胞, 37 °C 放置过夜, 第 2 天收集细胞裂解液, 在有闪烁液的测量杯中, 摇匀放置待其溶解后于 LS3801 液体闪烁仪(Beckman)测定放射性核数计数率(min⁻¹)。用 [³H] Leucine 代替 [³H] thymidine, 进行蛋白合成的分析。

1.6 细胞数目的测量

用结晶紫染色的方法^[5]测量细胞数目的状况。加 0.5 mL 50 g/L 的 glutaraldehyde 液固定细胞 15 min, 去离子水冲洗 3 遍后, 用新配制的 1 g/L 的结晶紫染色 20 min, 再用去离子水冲洗 3 遍后, 每个培养孔内加入 0.5 mL TritonX-100 以提取被细胞核吸收的结晶紫液。用分光光度计在波长 590 nm 处测量每个培养孔的吸光度(A)值。A 值的大小与细胞数目成正比。

1.7 统计方法

所有结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 组间 *q* 检验作统计学处理, 以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ang-(1-7)对 Ang II 诱导的乳鼠非心肌细胞

DNA 和蛋白合成的影响

用含有各种浓度 Ang-(1-7)与含有 Ang II 的无血清培养液培养非心肌细胞 48 h, 结果: Ang-(1-7)明显抑制 Ang II 诱导的非心肌细胞 [³H] thymidine 掺入, 同时 Ang-(1-7)也导致 [³H] Leucine 的掺入明显减少, 且作用呈浓度依赖性(图 1)。与单纯 Ang II 组相比, Ang-(1-7) 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 分别减少 [³H] thymidine 掺入 21%、31%、35%、36%; 减少 [³H] Leucine 掺入 15%、25%、31%、32%, 说明 Ang-(1-7)同时能够减少 Ang II 促非心肌细胞的 DNA 合成和蛋白质合成。

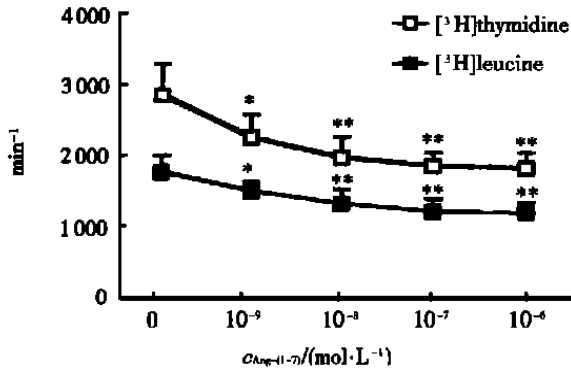


图 1 不同浓度 Ang-(1-7)下 Ang II 诱导的非心肌细胞 [³H] thymidine 和 [³H] leucine 的掺入

Fig. 1 The influence of different concentration Ang-(1-7) on incorporation of [³H] thymidine and [³H] leucine in cardiac nonmyocytes induced by Ang II

* P < 0.05, ** P < 0.01 compared with Ang II only, n = 6

2.2 Ang-(1-7)对 Ang II 诱导的非心肌细胞数目的影响

用 Ang II 10⁻⁷ mol/L、Ang-(1-7)10⁻⁶ mol/L 分别单独或联合培养非心肌细胞 7 d 后, 通过测定每个培养孔的吸光度值 (A), 观察非心肌细胞数目变化情况。Ang II 可诱导非心肌细胞数目明显增加(表 1, P < 0.01), 而当 Ang II 和 Ang-(1-7)联

表 1 Ang-(1-7)对 Ang II 促非心肌细胞数目增加的影响
Table 1 The influence of Ang-(1-7) on numbers of cardiac nonmyocytes induced by Ang II

Groups	A _{590nm}
Control	0.74 ± 0.08
Ang-(1-7)	0.74 ± 0.08 ¹⁾
Ang II	0.86 ± 0.10 ²⁾
Ang II + Ang-(1-7)	0.78 ± 0.09 ³⁾

1) P > 0.05 2) P < 0.01 as compared with control; 3) P < 0.05

as compared with Ang II, n = 10

合作用时, Ang II 的促非心肌细胞数目增加作用明显受到抑制 (P < 0.05)。

2.3 [Sar¹ Thr⁸] Ang II 对 Ang-(1-7)抑制 Ang II 促非心肌细胞 DNA 合成的影响

[Sar¹ Thr⁸] Ang II 预处理非心肌细胞 30 min 后, 加入 Ang II 10⁻⁷ mol/L 和 Ang-(1-7)10⁻⁶ mol/L 培养细胞 48 h, 结果如图 2。[Sar¹ Thr⁸] Ang II 能拮抗 Ang-(1-7)抑制 Ang II 促非心肌细胞 DNA 合成的作用, 但其本身对细胞 DNA 合成影响不大。

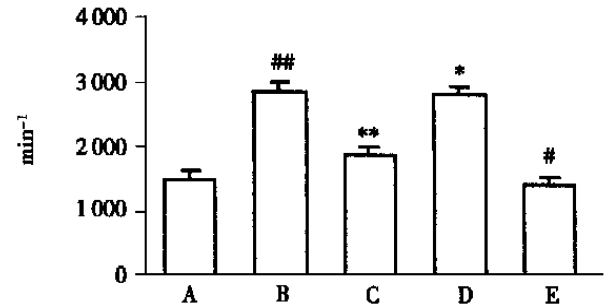


图 2 [Sar¹ Thr⁸] Ang II 对 Ang-(1-7)和 Ang II 条件下非心肌细胞 [³H] thymidine 掺入的影响

Fig. 2 The influence of [Sar¹ Thr⁸] Ang II on Ang-(1-7) inhibiting [³H] thymidine incorporation in cardiac nonmyocytes induced by Ang II

A: Control; B: Ang II; C: Ang II + Ang-(1-7); D: Ang II + Ang-(1-7) + [Sar¹ Thr⁸] Ang II; E: [Sar¹ Thr⁸] Ang II; n = 6 # P > 0.05 # # P < 0.01 as compared with control; * P > 0.05, ** P < 0.01 as compared with Ang II

3 讨论

心脏细胞包括心肌细胞和非心肌细胞两部分, 其中心肌细胞约占心脏总体积的 75%, 非心肌细胞约占 25%, 但非心肌细胞数目则占整个心脏细胞总数的 50% 以上, 为心肌细胞的 2 倍, 主要包括成纤维细胞、少量的平滑肌细胞以及内皮细胞等。心肌肥厚时, 心肌细胞蛋白质含量增加, 体积增大, 数目不增加, 心脏的非心肌细胞(主要成纤维细胞)数目增加, 纤维增生, 并产生大量的纤维素和胶原。

许多研究证实 Ang II 能促进培养的肝脏细胞肥大和非心肌细胞的增殖, 是导致心肌肥厚的重要体液内分泌因子之一^[2,3]。Ang-(1-7)是由血管紧张素 I (Ang I) 和 Ang II 在体内经内肽酶作用下转化而成的 7 肽生物活性物质。最近, 我们的研究提示 Ang-(1-7)能抑制 Ang II 诱导培养的 SD 乳鼠心肌细胞肥大^[4]。本研究则提示 Ang-(1-7)能抑制 Ang

II 诱导培养的 SD 乳鼠心脏的非心肌细胞增殖。这说明 Ang-(1-7) 很可能是抑制心肌肥厚的重要体液内分泌因子之一。这些发现提示我们可从 Ang-(1-7) 方面探索防止心肌肥厚的新思路和方法。

但须指出的是, 由于乳鼠心脏细胞和成年鼠心脏细胞, 离体心脏细胞培养与在体心肌肥厚均有许多差异, Ang-(1-7) 是否能抑制 Ang II 诱导的成年心肌细胞肥大, 非心肌细胞增殖以及在体心肌肥厚尚有待进一步研究。然而, 研究证明应用血管紧张素转化酶抑制剂可以减少 Ang I 转化为 Ang II, 使 Ang I 转化为 Ang-(1-7) 的量增多^[6, 7], 说明 Ang-(1-7) 可能参与了体内血管紧张素转化酶抑制剂的逆转左室肥厚作用。然而, 有关 Ang-(1-7) 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大、非心肌细胞增殖机理目前尚不清楚。有研究发现 Ang-(1-7) 的扩血管作用, 能被一氧化氮(NO)合酶抑制剂阻断^[8]。Ang-(1-7) 诱导的心肌细胞肥大、非心肌细胞增殖是否与一氧化氮有关, 其中间环节和内在联系, 仍有待进一步探索。

Brosnihan 等^[9]在观察 Ang-(1-7) 扩张冠状动脉的受体时, 发现 Ang-(1-7) 的扩血管作用既不被 AT₁ 拮抗剂抑制, 也不为 AT₂ 拮抗剂抑制, 但能被非选择性 Ang II 拮抗剂 [Sar¹ Thr⁸] Ang II 显著抑制。同样, Ang-(1-7) 抑制血管平滑肌细胞增殖以及心肌细胞肥大的作用不被 AT₁ 或 AT₂ 受体拮抗剂阻断, 而 [Sar¹ Ile⁸] Ang II 和 [Sar¹ Thr⁸] Ang II 可有效地阻断这种作用^[4, 10]。本研究 Ang-(1-7) 抑制 Ang II 促乳鼠非心肌细胞增殖作用也能被非选择性 Ang II 拮抗剂 [Sar¹ Thr⁸] Ang II 阻断。这说明 Ang-(1-7) 的受体不是 AT₁ 或 AT₂ 而可能是另一种受体, 但其受体结构目前仍不清楚。

开展对 Ang-(1-7) 的进一步研究, 将有益于人类更全面、清楚地认识和了解血管紧张素系统, 将有助于防治 Ang II 所产生的对人类不利作用。

参考文献:

- [1] Zhu Y C, Zhu Y Z, Spitznagel H, *et al.* Substrate metabolism, hormone interaction, and angiotensin converting enzyme inhibitors in left ventricular hypertrophy [J]. *Diabetes*, 1996, 45(suppl): S59.
- [2] Baker K M, Aceto J F. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells [J]. *Am J Physiol*, 1990, 259(2): H610.
- [3] 王洪新, 陶亮, 饶曼人. 血管紧张素 II 对培养乳鼠非心肌细胞 DNA 及蛋白质合成的影响 [J]. *中国药理学通报*, 1996, 12(5): 417.
- [4] 曾武涛, 马虹, 鲁伟, 等. 血管紧张素-(1-7) 在血管紧张素 II 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.
- [5] Gillies R J, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer culture [J]. *Anal Biochem*, 1986, 159(1): 109.
- [6] Kohara K, Brosnihan K B, Ferrario C M. Angiotensin-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat [J]. *Peptides*, 1993, 14(5): 883.
- [7] Luque M, Martin P, Martell N, *et al.* Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 1996, 14(6): 799.
- [8] Ferrario C M, Chappell M C, Dean R H, *et al.* Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9: 1716.
- [9] Brosnihan K B, Li P, Ferrario C M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide [J]. *Hypertension*, 1996, 27(3pt2): 523.
- [10] Freeman E J, Chisolm G M, Ferrario C M, *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth [J]. *Hypertension*, 1996, 28(1): 104.

(编辑 刘清海)