

低氧时肾上腺髓质素对人胚肺成纤维细胞胶原合成和转化生长因子 β_1 表达的影响

郝淑玲 于忠和* 齐保申¹ 罗继征 周晓梅¹

(北京军区总医院呼吸内科, 北京 100700; ¹中国医学科学院基础医学研究所生理室, 北京 100005)

摘要 观察低氧(2%O₂)条件下肾上腺髓质素(ADM)对人胚肺成纤维细胞胶原合成和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)表达的影响。体外培养人胚肺成纤维细胞, 分常氧和低氧24、48、72 h组, 用^{[3]H}-脯氨酸掺入法反映细胞总胶原合成和分泌, ELISA法检测细胞上清液中TGF- β_1 活化蛋白质含量。低氧24、48、72 h, 细胞总胶原合成和分泌分别是常氧组的125.88%和124.74%、183.44%和165.73%、152.55%和172.93%($P < 0.01$)。低氧24、72 h, ADM(10⁻⁷ mol/L)组细胞胶原合成分泌减少了19.24%和20.76%($P < 0.01$)、9.57%($P < 0.05$)和10.98%($P < 0.01$); 低氧48 h, ADM(10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L)组胶原合成分泌分别降低了5.57%($P < 0.05$)和9.19%($P > 0.05$)、11.09%($P < 0.01$)和14.49%($P < 0.05$)、35.41%($P < 0.01$)和18.57%($P < 0.05$)。低氧48 h, 细胞培养液中TGF- β_1 上升了24.17%($P < 0.05$), 加入ADM(10⁻⁷ mol/L), TGF- β_1 比对照组下降了17.53%($P < 0.05$); 低氧72 h, ADM(10⁻⁷ mol/L)组TGF- β_1 下降了19.49%($P < 0.05$)。低氧时ADM通过阻碍成纤维细胞胶原合成而影响低氧性肺血管改建及损伤组织修复过程, ADM与TGF- β_1 可能通过相互拮抗, 共同调节成纤维细胞胶原的生成。

关键词 低氧; 成纤维细胞; 胶原; 肾上腺髓质素; 转化生长因子 β_1

低氧是体内重要的病理生理过程。以往的研究表明, 低氧性肺动脉高压时, 肺动脉壁胶原沉积增多, 参与了肺血管结构重建。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)是调节胶原代谢的重要细胞因子, 能够促进人肺成纤维细胞胶原合成^[1]。

新近发现的肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是最初从肾上腺嗜铬细胞瘤中分离出的一种由52个氨基酸组成的血管舒张肽, 低氧时可以降低肺动脉压力^[2]。近年来研究发现, ADM具有抑制心脏成纤维细胞生长和胶原合成的作用^[3]。

本实验通过观察低氧条件下, ADM对人胚肺成纤维细胞胶原合成的影响, 以期探讨ADM在低氧性肺血管结构改建过程中可能发挥的作用, 为研究防治低氧性肺动脉高压的途径提供新的思路和理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

ADM购自美国Sigma公司, 单克隆抗人平滑肌 α 肌动蛋白抗体购自北京中山生物公司, ^{[3]H}-脯氨酸购自中国原子能研究院, TGF- β_1 ELISA试剂盒购自美国R&D公司。

1.2 细胞培养

无菌条件下取出12周人工流产人胎儿肺组织, 组织贴块法, 在含10%胎牛血清的DMEM培养基中原代培养成纤维细胞^[4]。3~4天后, 组织块周围可见有细胞放射状长出。免疫组化染色, 成纤维细胞 α 肌动蛋白抗体染色阴性。细胞生长融合后, 用0.25%胰蛋白酶消化传代。实验用第4~6代细胞。

1.3 低氧条件的确定

37℃恒温密闭低氧小室(中国医学科学院基础医学研究所生理室提供)内通入2%O₂+5%CO₂+93%N₂混合气体, 通气量2 L/min, 10 min后调整气体流

收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-06-01

国家自然科学基金资助项目(No.30070336)

*通讯作者。Tel: 010-66721167, Fax: 010-66721167, E-mail:

Zhonghe88@263.net

量至 0.5 L/min 维持, 测氧仪(CR-2)检测小室内氧浓度维持在 2%~3%。低氧组细胞置于低氧小室内培养。

1.4 细胞总胶原合成和分泌^[5]

以细胞内^[3H]-脯氨酸掺入量及细胞培养上清液中^[3H]-脯氨酸的放射活性来判断细胞总胶原合成和分泌。细胞以 1×10^5 个/L 浓度接种于 24 孔板温育 12 h, 换无血清 DMEM, 12 h 细胞转入 G₀ 期后换含 0.4% 胎牛血清的 DMEM。实验分常氧组(N)和低氧 24、48、72 h 组(H₂₄、H₄₈、H₇₂), 每组按不加 ADM、 10^{-7} mol/L ADM、 10^{-8} mol/L ADM、 10^{-9} mol/L ADM 浓度分别培养, 同时加入^[3H]-脯氨酸 37 kBq/孔。分别收集细胞和细胞培养上清液, 液闪计数。

1.5 TGF- β_1 定量

收集常氧、不同低氧时间点对照和 10^{-7} mol/L ADM 组细胞培养上清液。4 °C, 1500 r/min 离心 10 min, 取上清液, -70 °C 保存。按照 ELISA 试

剂盒说明步骤, 检测细胞培养上清液中 TGF- β_1 含量。每一样本采用双复孔, 取均值。

1.6 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用 *t* 检验, 组间两两比较采用 SPSS10.0 统计软件单因素方差分析, $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 低氧对人胚肺成纤维细胞形态和结构的影响

培养 72 h, 常氧下成纤维细胞呈纺锤形或多角形, 电镜下观察胞浆内线粒体丰富, 可见合成的胶原纤维。低氧组细胞数量明显增多, 内质网稍扩张, 细胞形态和结构未见其他明显改变(图 1, 图 2)。

2.2 低氧时成纤维细胞胶原合成的变化及 ADM 对其影响

无血清条件下, 低氧 24、48、72 h, 细胞总胶原合成和分泌分别是常氧对照组的 125.88% 和 124.74%、183.44% 和 165.73%、152.55% 和 172.93% ($P < 0.01$)。表明低氧可以促进成纤维细胞胶原合成和分泌(表 1)。

常氧组加入 ADM 后, 细胞胶原合成和分泌变化不明显。低氧环境下, ADM 对细胞胶原的生成产生

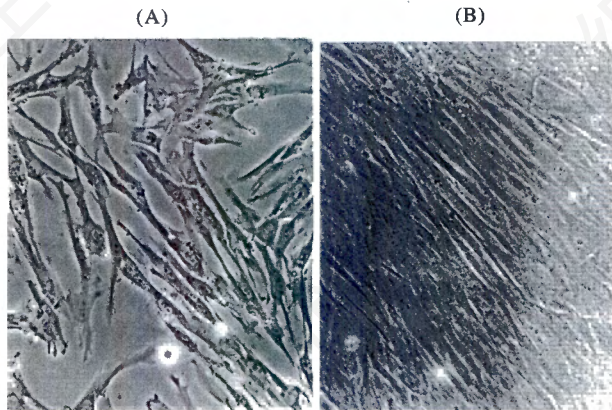


图 1 培养 72 h, 常氧下成纤维细胞呈纺锤形或多角形(A), 低氧组细胞数量明显增多(B), 100 ×

表 1 低氧对胶原合成和分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	标本数	^[3H] -脯氨酸掺入率(cpm/min)	
		细胞	培养液
N ₂₄	6	3555 ± 104	1354 ± 112
H ₂₄	6	4475 ± 348*	1689 ± 74*
N ₄₈	6	4317 ± 129	2349 ± 60
H ₄₈	6	7919 ± 233*	3893 ± 300*
N ₇₂	6	6234 ± 331	3291 ± 282
H ₇₂	6	9510 ± 101*	5691 ± 64*

与 N 组比较, * $P < 0.01$ 。

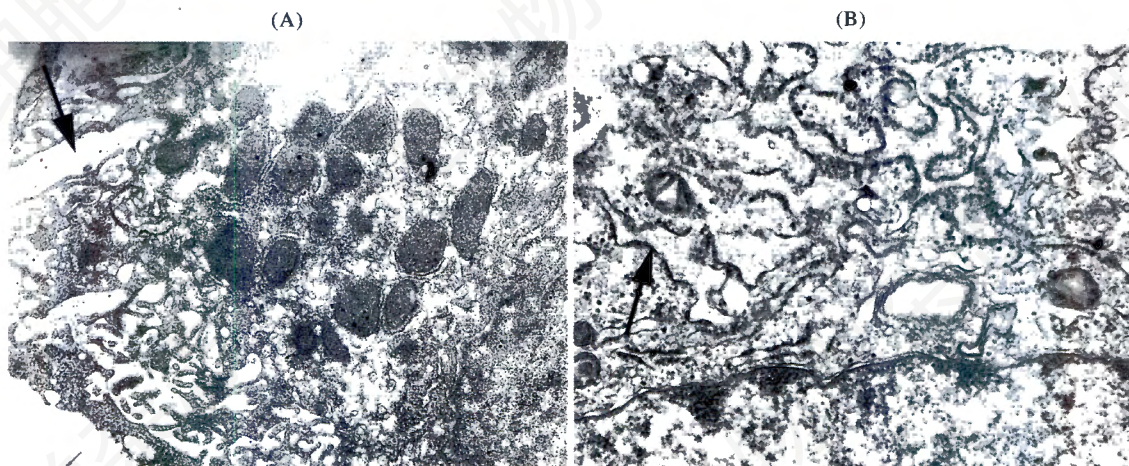


图 2 培养 72 h, 常氧下成纤维细胞胞浆内线粒体丰富, 可见合成的胶原纤维(A), 低氧组细胞内质网稍扩张(B, 箭头所示), 8000 ×

表2 ADM对常氧和低氧时胶原合成和分泌的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	标本数	$[^3\text{H}]$ -脯氨酸掺入率(cpm/min)	
		细胞	培养液
N_{48}	6	6396 \pm 76	3291 \pm 282
$N_{48}+10^{-9}$ mol/L ADM	6	6787 \pm 284	3212 \pm 232
$N_{48}+10^{-8}$ mol/L ADM	6	6715 \pm 195	3223 \pm 271
$N_{48}+10^{-7}$ mol/L ADM	6	6150 \pm 279	2960 \pm 245
H_{24}	6	5701 \pm 432	2216 \pm 171
$H_{24}+10^{-9}$ mol/L ADM	6	5480 \pm 314	2391 \pm 70
$H_{24}+10^{-8}$ mol/L ADM	6	5344 \pm 425	2059 \pm 145
$H_{24}+10^{-7}$ mol/L ADM	6	4604 \pm 284**	1756 \pm 166**
H_{48}	6	7919 \pm 233	3893 \pm 300
$H_{48}+10^{-9}$ mol/L ADM	6	7478 \pm 334*	3535 \pm 136
$H_{48}+10^{-8}$ mol/L ADM	6	7041 \pm 142**	3329 \pm 154*
$H_{48}+10^{-7}$ mol/L ADM	6	5115 \pm 124**	3170 \pm 179*
H_{72}	6	9510 \pm 101	5691 \pm 64
$H_{72}+10^{-9}$ mol/L ADM	6	9541 \pm 306	5757 \pm 266
$H_{72}+10^{-8}$ mol/L ADM	6	9366 \pm 207	5670 \pm 37
$H_{72}+10^{-7}$ mol/L ADM	6	8600 \pm 327*	5066 \pm 196**

分别与H组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

了抑制作用。低氧24、72 h,各自与对照组相比,ADM(10^{-7} mol/L)使细胞胶原合成分泌分别减少了19.24%和20.76%($P < 0.01$),9.57%($P < 0.05$)和10.98%($P < 0.01$)。低氧48 h, 10^{-9} mol/L ADM、 10^{-8} mol/L ADM、 10^{-7} mol/L ADM组胶原合成和分泌分别降低了5.57%($P < 0.05$)和9.19%($P > 0.05$)、11.09%($P < 0.01$)和14.49%($P < 0.05$)、35.41%($P < 0.01$)和18.57%($P < 0.05$),呈现浓度效应趋势(表2)。

2.3 低氧时TGF- β_1 含量的变化及ADM对其的影响

低氧能够刺激成纤维细胞TGF- β_1 合成。与常氧对照组相比,低氧48 h,细胞培养液中TGF- β_1 增加了24.17%($P < 0.05$)。常氧和低氧24 h,ADM对细胞TGF- β_1 生成影响不明显。低氧48、72 h,ADM(10^{-7} mol/L)组TGF- β_1 含量较对照组分别下降了17.53%和19.49%,均有统计学显著性差异($P < 0.05$)(表3)。

3 讨论

成纤维细胞是构成结缔组织的主要细胞,它不仅通过增殖及合成胶原纤维、弹性纤维及其他基质成分,而且通过分泌血管紧张素、碱性成纤维细胞生长因子、TGF- β_1 等多种细胞因子影响组织结构的形成。文献报道,在组织损伤及修复早期,成纤维细胞处于低氧的微环境中^[6,7]。因此,研究低氧时ADM对成纤维细胞胶原合成的影响,对于阐明低氧性肺血管结构改建及组织损伤修复的发生干预

表3 ADM对常氧和低氧时细胞培养上清液中TGF- β_1 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	TGF- β_1 (pg/ml)
N_{48}	5	575.99 \pm 54.40
H_{48}	5	714.68 \pm 23.79*
N_{48}	5	575.99 \pm 54.40
$N_{48}+10^{-7}$ mol/L ADM	5	588.52 \pm 46.73
H_{24}	5	110.16 \pm 19.73
$H_{24}+10^{-7}$ mol/L ADM	5	103.56 \pm 25.69
H_{48}	5	714.68 \pm 23.79
$H_{48}+10^{-7}$ mol/L ADM	5	589.41 \pm 21.94**
H_{72}	5	793.76 \pm 53.63
$H_{72}+10^{-7}$ mol/L ADM	5	639.08 \pm 74.64**

与 N_{48} 组比较,* $P < 0.05$;分别与 H_{48} 和 H_{72} 组比较,** $P < 0.05$ 。

机制均有重要意义。

本实验在光、电镜下观察,发现低氧(2% O_2)对成纤维细胞形态和结构影响不明显,证明成纤维细胞在低氧(2% O_2)条件下仍能保持良好的细胞学活性。研究发现,低氧是一种重要的促增殖和促胶原合成因素,同时能够刺激许多细胞因子的产生。Falanga等^[8,9]研究表明,低氧(2% O_2)24~72 h呈时间依赖性地促进人皮肤成纤维细胞 α_1 前胶原基因的复制与转录及TGF- β_1 的生成。本实验结果与Falanga等的报道类似。

ADM是新近发现的一种具有扩血管作用的活性肽^[10]。研究表明,ADM可以通过自分泌/旁分泌的形式调节细胞功能,它能够抑制基础条件下和血管紧张素II刺激的大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成^[11]。低氧是重要的促ADM生成的原因,可诱导大鼠肺组织ADM表达增多,刺激成纤维细胞ADM的合成及其受体的表达^[12,13]。我们在实验中观察到,2% O_2 低氧条件下,ADM可以抑制成纤维细胞胶原合成,提示ADM可能通过阻碍细胞胶原合成而影响低氧性肺血管改建及损伤组织修复的过程,在低氧性肺动脉高压中起减轻和/或延缓的作用。关于ADM的作用机制,文献有不同报道。Horio等^[14]认为ADM抑制大鼠心脏成纤维细胞的作用是通过cAMP途径介导的。Isumi等^[15]报道ADM通过cAMP-PKA途径调节3T3细胞分泌炎性介质。

TGF- β_1 是具有促纤维化作用的细胞因子,能刺激成纤维细胞合成胶原,阻止已合成的细胞外基质的降解。文献显示,TGF- β_1 抗体可阻断低氧引起的成纤维细胞COLIA₁胶原合成和TGF- β_1 基因复制,而剔除TGF- β_1 基因的大鼠则不出现此阻断作用,认为TGF- β_1 是促进胶原合成的关键因子^[16]。

最近的研究表明, ADM 和 TGF- β_1 在胚胎发育过程中出现的时间及表达的部位相似, 提示 ADM 和 TGF- β_1 之间可能存在着联系^[17]。目前国内外关于这方面的文献报道较少。本实验结果显示, 低氧 48、72 h, ADM 使细胞胶原合成减少, 同时 TGF- β_1 表达也降低。因此, 我们推测低氧时, ADM 与 TGF- β_1 可能通过相互拮抗, 共同调节成纤维细胞胶原的生成。

参考文献 (References)

- [1] Raghon G *et al.* *Am Rev Respir Dis*, 1989, **140**: 95
- [2] Yang BC *et al.* *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, **28**: 458
- [3] Takahashi K. *Tohoku J Exp Med*, 2001, **193**: 79
- [4] Brenner RE *et al.* *Pediatr Pulmonol*, 2001, **32**: 1
- [5] 李玉瑞. *细胞外间质的生物化学及研究方法*, 北京: 人民卫生出版社, 1998, 222
- [6] Hunt TK *et al.* *Surg Gynecol Obstet*, 1972, **135**: 561
- [7] Knighton DR *et al.* *Invest Radiol*, 1991, **26**: 604
- [8] Falanga V *et al.* *J Invest Dermatol*, 1991, **97**: 634
- [9] Falanga V *et al.* *J Cell Physiol*, 1993, **157**: 408
- [10] Kitamura K *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192**: 553
- [11] Tsuruda T *et al.* *Cardiovasc Res*, 1999, **43**: 958
- [12] Hofbauer KH *et al.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, **278**: R513
- [13] Choksi T *et al.* *Br J Pharmacol*, 2002, **136**: 784
- [14] Horio T *et al.* *Eur J Pharmacol*, 1999, **382**: 1
- [15] Isumi Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **244**: 325
- [16] Falanga V *et al.* *J Cell Physiol*, 2002, **191**: 42
- [17] Montuenga LM *et al.* *Endocrinology*, 1998, **139**: 3946

The Effects of Adrenomedullin on Collagen Synthesis and Transforming Growth Factor β_1 Production of Human Embryonic Lung Fibroblasts in Hypoxia

Shu-Ling Hao, Zhong-He Yu*, Bao-Shen Qi¹, Ji-Zheng Luo, Xiao-Mei Zhou¹

(Department of Respiratory Disease, General Hospital of Beijing Division, People's Liberation Army, Beijing 100700, China; ¹Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract To determine the effects of adrenomedullin (ADM), a vasorelaxant peptide on the collagen synthesis and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) production of human embryonic lung fibroblasts in hypoxia. Human embryonic lung fibroblasts were cultured by outgrowth *in vitro*. Cells were exposed to hypoxia (2%O₂) or normoxia after added ADM 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L. Total collagen synthesis and secretion were detected by [³H]-proline incorporation. TGF- β_1 production in culture supernatant were measured by ELISA. Compared to normoxia, hypoxia increased fibroblasts collagen synthesis and secretion and TGF- β_1 production. When exposed to hypoxia for 24 h and 72 h, collagen synthesis and secretion in ADM(10⁻⁷ mol/L) group were decreased by 19.24% and 20.76%(*P*<0.01), 9.57%(*P*<0.05) and 10.98%(*P*<0.01). Hypoxia for 48 h, collagen synthesis were inhibited by ADM(10⁻⁹,10⁻⁸ and 10⁻⁷ mol/L) of 5.57%(*P*<0.05) and 9.19%(*P*>0.05),11.09%(*P*<0.01) and 14.49%(*P*<0.05), 35.41% (*P*<0.01) and 18.57%(*P*<0.05) respectively, in a dose-dependent manner. Hypoxia for 48 h and 72 h, TGF- β_1 production were suppressed by 17.53% and 19.49% in ADM(10⁻⁷ mol/L) group (*P*<0.05). In hypoxia, ADM influence the process of pulmonary vascular remodeling and wound healing by inhibiting collagen synthesis of fibroblasts. ADM may be a antagonistic substance of TGF- β_1 .

Key words hypoxia; fibroblast; collagen; adrenomedullin; TGF- β_1

Received: January 2, 2004 Accepted: June 1, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070336)

*Corresponding author. Tel: 86-10-66721167, Fax: 86-10-66721167, E-mail: Zhonghe88@263.net