

血管紧张素Ⅱ对培养心肌细胞蛋白质和DNA合成的影响

周晓霞 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所 北京 100037)

心肌肥厚是高血压病最常见的并发症之一,但其发病机制迄今尚不清楚。近年来,随着心脏局部肾素血管紧张素系统(RAS)的确立和血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)在基础与临床的广泛应用,已有越来越多的证据表明:心脏局部的RAS在高血压左心肥厚的发生、发展中可能具有重要的病理意义。如对压力负荷所致的心肌肥厚,用ACEI虽未使血压下降但可完全防止心肌肥厚的发生^[1];在遗传性高血压动物模型上,用交感神经阻滞剂或血管扩张剂虽可使血压下降却未能预防或逆转心肌肥厚,但用ACEI后,不仅有效地防止了心肌肥厚的发生,也可使肥厚的心肌发生逆转^[2];用次加压剂量的血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)灌注大鼠可引起心肌肥厚,该作用可被血管紧张素受体亚型1(AT₁)拮抗剂所阻断^[3]。以上研究表明:在介导心肌肥厚作用中,AngⅡ可能是一重要因素。但到目前为止,利用体外培养的心肌细胞直接观察AngⅡ对其促生长作用的报道不多,特别是关于AngⅡ对占心脏细胞总数50%左右的非心肌细胞的影响报道甚少。为此,本文利用体外细胞培养技术,观察了AngⅡ对心肌和非心肌细胞蛋白质和DNA合成的影响。

材料与方法

一、动物与主要试剂

1—4天的Wistar乳鼠(北京医科大学动物部提供),DMEM干粉培养基(GIBCO公司),胰蛋白酶(DIFCO公司),肌动蛋白单克隆抗体(DAKO公司),³H-胸腺嘧啶(³H-TdR)和³H-亮氨酸(³H-Leu)(中国原子能研究所),5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU上海生物化学研究所),胎牛血清、血管紧张素Ⅱ、Foli-酚试剂牛血清白蛋白均购于SIGMA公司,其余试剂为国产和分析纯。

二、心肌和非心肌细胞的培养与鉴定

参照文献^[4],用胰蛋白酶消化法将1—4天的Wistar乳鼠心肌消化成单细胞悬液,经差速贴壁分离后,将未贴壁的心肌细胞用含10%胎牛血清及青、链霉素的DMEM培养液稀释成 5×10^4 cells/ml,并于培养前24—36小时加入0.1 mmol/L Brdu以抑制非心肌细胞的增殖,然后将细胞悬液均匀地接种于25 ml培养瓶或24孔板,置于37℃、CO₂温箱中培养。细胞长至次融合状态时,弃原培养液,用无血清的DMEM液洗两次后,改用低血清(含0.4%胎牛血清)的DMEM液培养48小时以抑制细胞于G₀/G₁期。之后加入AngⅡ并于相应时间观察各指标。经以上方法分离制备的心肌细胞,结合镜下细胞搏动的观察及肌动蛋白单克隆抗体的免疫组化染色,其纯度可达到90%以上。

上述差速贴壁分离后已贴壁的非心肌细胞,加入含10%胎牛血清的DMEM液培养至融合状态时进行传代。第二代细胞被用于实验。此时用肌动蛋白单克隆抗体作免疫组化鉴定,少于10%的细胞为阳性反应。该种处理分离制备的非心肌细胞主要是成纤维细胞^[5]。

三、³H-TdR、³H-Leu掺入率的测定

以 5×10^4 cells/ml密度接种于24孔板的细胞长至次融合状态时,用含低血清的DMEM液培养48小时,之后加入含不同浓度AngⅡ的DMEM培养液1 ml,继续培养24小时后,每孔再加入³H-TdR或³H-Leu 1微居里。在37℃、CO₂培养箱中孵育5—6小时,移去培养液并用预冷的10%三氯乙酸于4℃固定30分钟。然后用平衡盐溶液洗两次,最后用1%SDS—0.1 mol/L NaOH溶液0.5 ml裂解细胞,37℃放置过夜。第二天收集细胞裂解液于含8 ml闪烁液的测量杯中,摇匀放置待其完全溶解后于液闪计数仪上进行测量。

四、细胞总蛋白含量的测量

衷心感谢阜外医院病理科宋来凤教授、杨方医师在细胞大小测量及鉴定方面所给与的热情支持与帮助。

接种于 25 ml 小培养瓶中的细胞长至次融合状态时, 用含低血清的 DMEM 液培养 48 小时以抑制细胞于 G_0/G_1 期。随机分为对照组和不同浓度 Ang II 组, 加药持续作用五天后, 收集细胞于小离心管中, 用平衡盐溶液洗两次后, 加入 10% 预冷的三氯乙酸 4°C 放置 30 分钟, 移去三氯乙酸后, 加入 1 mol/L NaOH 0.5 ml 以溶解蛋白, 室温放置 2 小时后, 用 Lowry 法测细胞总蛋白含量^[6]。

五、细胞大小的测定与细胞计数

细胞培养及加药处理等均同于材料与与方法四。细胞大小的测定是于第六天收集细胞, 取细胞悬液滴加于载玻片上, 在相差显微镜下用测微器测细胞直径。10×10 放大倍数下, 测微器与标准尺之比为 95:98, 故所测细胞直径 = 实测值 × 校正值(0.97)。细胞计数按白细胞计数方法进行。

六、统计学处理

按 student 氏 t 检验。

结 果

一、Ang II 对心肌细胞数目的影响

经低血清抑制处于 G_0/G_1 期的细胞用 Ang II (10^{-8} mol/L) 刺激, 并分别于[图 1]所示的时间进行细胞计数, 与未用 Ang II 刺激的相应对照组相比, Ang II 刺激组细胞数目无明显改变。

二、Ang II 对心肌细胞蛋白含量及大小的影响

培养液中加入不同浓度 Ang II (10^{-12} — 10^{-6} mol/L), 持续作用五天后, 引起剂量依赖性的细胞直径增大、细胞总蛋白含量增加, 二者均于 10^{-8} mol/L 浓度时达最大, 分别较对照

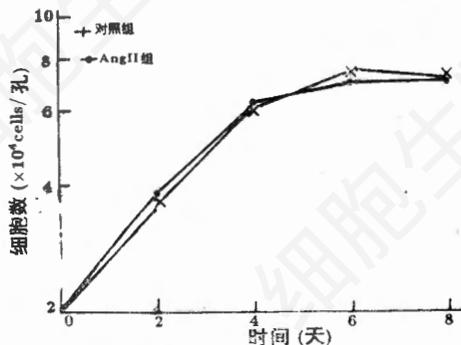


图 1 Ang II 对心肌细胞数目的影响 (n = 4)

组增加 $37 \pm 9\%$ ($P < 0.01$ $n = 50$) 和 $27 \pm 3.3\%$ ($P < 0.01$ $n = 4$) [图 2]。

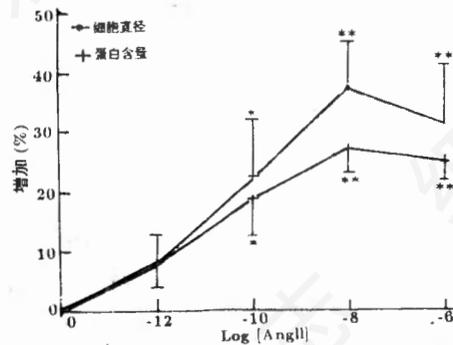


图 2 Ang II 对心肌细胞大小及蛋白含量的影响 (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $n = 5$)

三、Ang II 对心肌细胞 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率的影响

培养液中加入不同浓度 Ang II (10^{-12} — 10^{-6} mol/L) 作用 24 小时, 可刺激 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率增加, 且呈剂量依赖关系, 以 10^{-8} mol/L 浓度时最大, 较对照组增加 $38 \pm 7\%$ ($P < 0.01$ $n = 5$), 但 Ang II 对心肌细胞的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率无明显影响[图 3]。

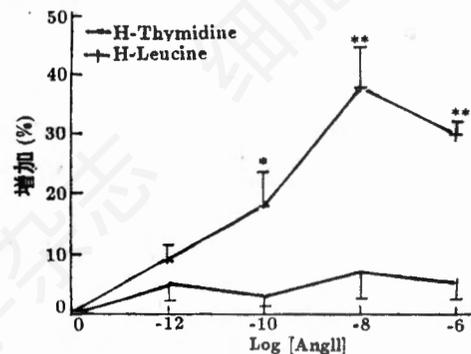


图 3 Ang II 对心肌细胞 $^3\text{H-TdR}$ 及 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率的影响 (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $n = 5$)

四、Ang II 对非心肌细胞 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率及细胞数目的影响

培养液中加入 Ang II 不仅可使非心肌细胞蛋白质合成增加, 也可使其 DNA 合成及细胞数目增高。Ang II (10^{-8} mol/L) 作用 24 小时可

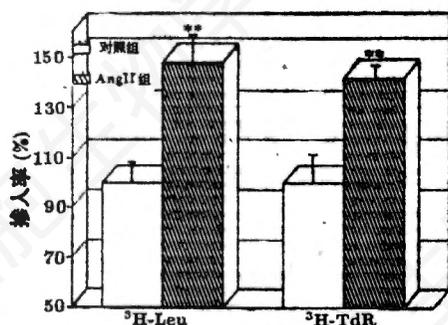


图4 Ang II 对非心肌细胞 $^3\text{H-TdR}$ 及 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率的影响 (** $P < 0.01$ $n = 5$)

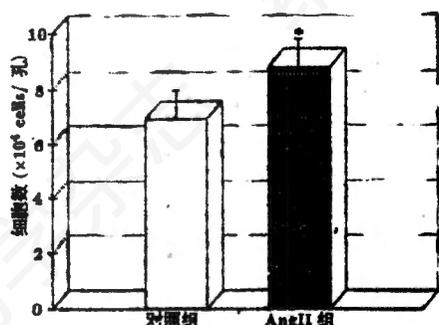


图5 Ang II 对非心肌细胞数目的影响 (* $P < 0.05$ $n = 4$)

使非心肌细胞的 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率较对照组增加 $48 \pm 9\%$ ($P < 0.01$ $n = 5$), $^3\text{H-TdR}$ 掺入率较对照组增加 $42 \pm 4.2\%$ ($P < 0.01$ $n = 4$) [图4]。Ang II (10^{-8} mol/L) 作用 48 小时可使细胞数目较对照组增加 $27 \pm 6\%$ ($P < 0.05$ $n = 4$) [图5]。

讨 论

心脏局部 RAS 在高血压左心肥厚发生中的重要作用已被越来越多的实验所证实。据报道, 各种负荷所致的肥厚心肌组织中其 RAS 各成份表达均增强^[1,7]。应用不影响血压或后负荷剂量的转换酶抑制剂可以预防心肌肥厚的发生^[1,2]。这些研究提示: 压力负荷时很可能激活了心肌的 RAS, 进而在心脏局部形成超生理浓度的 Ang II, 后者可直接诱导心肌肥厚的发生而不依赖于血液动力学因素。1990 年,

Aceto 等首次报道 Ang II 对体外培养的鸡胚心肌细胞具有促肥大作用^[8]。本文不仅观察了 Ang II 对 Wistar 种乳鼠心肌细胞的影响, 同时也观察了 Ang II 对心肌组织中非心肌细胞的作用。结果表明: Ang II 对心肌细胞是一促肥大因子, 其可使心肌细胞体积增大、总蛋白含量增加及蛋白质合成速率升高。而对心肌细胞的 DNA 合成及细胞数目则无影响。此结果与 Baker 和 Sadoshima 等的研究相一致^[9,10]。心肌组织除 50% 左右的心肌细胞外, 尚有 50% 左右的非心肌细胞, 其中主要是成纤维细胞。在高血压性心肌肥厚中, 这部分间质细胞肥大增生对心脏形态、功能将有十分重要的影响, 但有关 Ang II 对这部分细胞的直接作用报道甚少。本文所见, Ang II 在促进非心肌细胞蛋白质合成的同时也使其 DNA 合成及细胞数目增加, 表明 Ang II 对这部分细胞具有促增殖作用, 但其作用远较胎牛血清为弱, 本文结果仅为血清诱导的 15%。Ang II 对心肌与非心肌细胞的这种直接促肥大、促增殖作用, 提示在高血压心肌肥厚的发生、发展中, 心肌 RAS 被激活而致的局部高浓度 Ang II, 不仅可影响心肌细胞使之肥大, 也可通过使非心肌细胞增殖、胶原合成增加而共同参与心肌肥厚的病理过程。Weber 和 Brilla 曾报道, Ang II 可使心脏间质纤维化和胶原沉积^[11]。因此, 转换酶抑制剂在高血压心肌肥厚治疗中的效用可能不仅在于其有效地防止了 Ang II 所致的心肌细胞肥大, 同时也可阻断 Ang II 引起的心肌组织中间质的增生及由此而致的胶原合成增多、胶原沉积等。

有关 Ang II 对心肌组织中这两类细胞促生长作用不同的机理目前尚不清楚。在相同培养条件下, Ang II 对心肌和非心肌细胞促生长作用的不同可能与细胞类型有关。但这种作用的差异性并不能单靠心肌细胞是终末分化细胞来解释, 因新生鼠的心肌细胞在出生后 5—6 周内仍具有有丝分裂能力^[12]。最近研究指出: Ang II 对心肌细胞的促肥大作用及对非心肌细

胞的促增生作用均是通过 AT₁ 受体介导的, 因而有作者认为 Ang II 对心肌及非心肌细胞作用的差异性可能是由于两类细胞中 Ang II-受体复合物连结的 G 蛋白或第二信使传递系统不同所致^[13]。此外, 是否与 Ang II 对这两类细胞的细胞周期调节基因及内源性的生长因子作用不同有关还尚待进一步研究。

总之, 目前的研究表明: Ang II 在体外具有促进心肌细胞肥大及非心肌细胞增生的作用。其中, Ang II 对非心肌细胞的作用尤其值得重视。全面揭示 RAS 在心肌肥厚中的作用及其机制, 对高血压心肌肥厚的预防和治疗将具有十分重要的意义。

摘 要

本文利用体外细胞培养技术, 观察了血管紧张素 II (Ang II) 对 Wistar 乳鼠的心肌细胞和心肌组织中非心肌细胞的促生长作用。结果表明: 随 Ang II 浓度的升高, 心肌细胞直径、总蛋白含量及 ³H-Leu 掺入率均呈剂量依赖性增加, 而各组间 ³H-TdR 掺入率及心肌细胞数目则无明显变化。相反, Ang II 在引起心肌组织中非心肌细胞(主要是成纤维细胞)的 ³H-Leu 掺入率增加的同时, 也引起其 ³H-TdR 掺入率及细胞数目的增加。以上结果提示: Ang

II 对心肌细胞具有促肥大作用, 而对心肌组织中的非心肌细胞却有促增殖作用。

关键词: 血管紧张素 II 肥厚 增生
细胞培养

参 考 文 献

- [1] Baker, K. M. et al. 1990, *Am. J. Physiol.*, 259: H 324—H 332.
- [2] Linz, W. et al. 1989, *Clin. Exp. Hypertens.*, 11: 1325—1350.
- [3] Dostal, D. E. and baker, K. M. 1992, *Am. J. Hypertens.*, 5: 276—280.
- [4] Harary, I. 1960, *Science.*, 131: 1674—1675.
- [5] Sadoshima, J., et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 267: 10551—10560.
- [6] Lowry, O. H., et al. 1951, *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- [7] Suzuki, J., et al. 1993, *Circ. Res.*, 73: 439—447.
- [8] Aceto, J. F., and Baker, K. M., 1990, *Am. J. Physiol.*, 258: H 806—H 813.
- [9] Baker, K. M. and Aceto, L. F., 1990, *Am. J. Physiol.*, 259: H 610—H 618.
- [10] Sadoshima, J. and Izumo, S. 1993, *Circ. Res.*, 73: 413—423.
- [11] Weber, K. T. and Brilla, C. G. 1991, *Circulation.*, 83: 1849—1865.
- [12] Zak, R. 1974, *Circ. Res.*, 34: 1117—1126.
- [13] Sadoshima, J. and Izumo, S. 1993, *Circ. Res.*, 73: 424—438.

EFFECT OF ANGIOTENSIN II ON PROTEIN AND DNA SYNTHESIS OF CULTURED MYOCARDIAL CELLS

Zhou Xiao-xia Chen Lan-ying

(Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037)

ABSTRACT

Recently, there are accumulating evidences for the existence of an local tissue renin-angiotensin system (RAS) in the heart which maybe is associated with the hypertrophic response. In this study, cell culture technique in vitro was used to investigate the hypertrophic and proliferative effect of angiotensin II on the cultured neonatal rat myocytes and nonmyocytes. The results showed that in myocytes culture, angiotensin II induced increases in cell diameter, protein content and ³H-Leucine incorporation in concentration-dependent manner without changing the rate of DNA synthesis and cell numbers. In contract, angiotensin II caused incrases of DNA synthesis and cell numbers in nonmyocytes cultures. These results indicate that angiotensin II can induce the hypertrophy for cardiac myocytes and the proliferation for cardiac nonmyocytes (mostly fibroblasts).

Key words: Angiotensin II Hypertrophy Proliferation Cell culture