DOI:10.16016/j.1000-5404.201510146

血管紧张素1-7对血管紧张素Ⅱ诱导的SD大鼠心室成纤维细胞的影响

张 赫,范晋奇,殷跃辉 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科)

[摘要] **目的** 在血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)存在情况下,探讨血管紧张素1-7(angiotensin1-7,Ang1-7)对SD大鼠心室成纤维细胞的影响。**方法** 采用新生1~3 d的SD乳鼠,用胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶消化心室,采用差速贴壁法获取成纤维细胞,将细胞完全随机化分组为对照组(不予处理)、AngⅡ组、Ang1-7组、AngⅡ+Ang1-7组(先用Ang1-7预处理30 min,再加入AngⅡ处理)。采用免疫荧光鉴定细胞,CCK-8检测细胞增殖,Western blot检测细胞Rac1、Rad、$gp91^{phox}$(Nox2)、P65、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)蛋白的表达,实时荧光定量PCR测定Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白(ColⅠ、ColⅢ)和纤维连接蛋白(fibronectin)mRNA的表达。**结果** AngⅡ能够促进SD大鼠心室成纤维细胞增殖,Ang1-7能减弱AngⅡ的促增殖作用($P<0.05$);与对照组比较,AngⅡ组Rac1、Nox2、P65、CTGF表达增加,Rad表达下降,ColⅠ、ColⅢ、fibronectin转录增加($P<0.05$);与AngⅡ组比较,AngⅡ+Ang1-7组Rac1、Nox2、P65、CTGF表达减少,Rad表达升高,ColⅠ、ColⅢ、fibronectin转录下降($P<0.05$);Ang1-7组上述各项指标与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** AngⅡ存在时,Ang1-7对心室成纤维细胞具有保护作用。Ang1-7通过调节Rac1、Rad及下游蛋白的表达,能够抑制成纤维细胞合成细胞外基质。

[关键词] 血管紧张素1-7;血管紧张素Ⅱ;成纤维细胞;大鼠
[中图法分类号] R322.11;R329.26;R341.6 [文献标志码] A

Effects of angiotensin1-7 on rat ventricular fibroblasts induced by angiotensin Ⅱ

Zhang He, Fan Jinqi, Yin Yuehui (Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of angiotensin1-7 (Ang1-7) on rat ventricular fibroblasts induced by angiotensinⅡ (AngⅡ). **Methods** The ventricles from 1~3-day-old Sprague-Dawley rats were digested with trypsin and collagenase type 2. The isolated ventricular fibroblasts were randomly divided into 4 groups: control group, AngⅡ group, Ang1-7 group, and AngⅡ+Ang1-7 group. The control group, AngⅡ group and Ang1-7 group were treated with serum free DMEN, AngⅡ and Ang1-7, respectively. The AngⅡ+Ang1-7 group was pre-incubated with Ang1-7 for 30 min and then treated with AngⅡ. Fibroblasts were identified by immunofluorescence assay. CCK-8 assay was used to measure the proliferation of fibroblasts. Western blot assay was used to detect the expression of Rac1, Rad, $gp91^{phox}$ (Nox2), P65 and connective tissue growth factor (CTGF). Real-time PCR was performed to quantify the mRNA expression of collagen Ⅰ (ColⅠ), collagen Ⅲ (ColⅢ) and fibronectin. **Results** AngⅡ could promote proliferation of fibroblasts which could be inhibited by Ang1-7 ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of Rac1, Nox2, P65 and CTGF were increased and that of Rad was decreased in the AngⅡ group ($P<0.05$), while the mRNA levels of ColⅠ, ColⅢ and fibronectin were increased in the AngⅡ group ($P<0.05$). Compared with the AngⅡ group, the expression levels of Rac1, Nox2, P65 and CTGF were decreased and that of Rad was increased in the AngⅡ+Ang1-7 group ($P<0.05$), while the mRNA levels of ColⅠ, ColⅢ and fibronectin were decreased in the AngⅡ+Ang1-7 group

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570302)
[通信作者] 殷跃辉,E-mail:yinyh63@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1431.007.html(2016-02-01)

($P<0.05$). **Conclusion** With the existance of Ang Ⅱ, Ang1-7 plays a protective role in the ventricular fibroblasts. It inhibits the production of extracellular matrix through regulating Racl, Rad and downstream proteins.

[**Key words**] angiotensin1-7; angiotensin Ⅱ; fibroblasts; rats

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81570302). Corresponding author: Yin Yuehui, E-mail: yinyh63@163.com

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是人体重要的调节系统。RAS 的异常与众多心血管疾病的发生、发展有着密切的关系[1]。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)是 RAS 最重要的组成部分,它的受体为血管紧张素受体(angiotensin Ⅱ receptor),其中最主要的受体是 AT1 和 AT2。Ang Ⅱ主要与 AT1 结合,具有促进细胞增殖、增强氧化应激、收缩血管等作用[2]。Ang1-7 在 1988 年被首次发现。研究证明 Ang1-7 在诸多方面与 Ang Ⅱ作用相反[3]。在体内,Ang Ⅰ和 Ang Ⅱ经酶切作用转化为 Ang1-7。Ang1-7 的内源性属性以及对心血管系统全面的保护作用使其有成为临床药物的潜力[4]。但是,Ang1-7 的作用机制目前仍不清楚。本研究旨在探索 Ang Ⅱ存在条件下,Ang1-7 对心室成纤维细胞的作用,探讨其可能机制,为 Ang1-7 的进一步研究及临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物

清洁级新生 1~3 d SD 乳鼠购自重庆医科大学实验动物中心,体质量 12~20 g,雌雄不限。主要试剂:DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),CCK-8(日本同仁公司),Ⅱ型胶原酶(美国 Invitrogen 公司),Ang Ⅱ、Ang1-7、胰蛋白酶、Rad 抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司),波形蛋白抗体、Rac1 抗体、CTGF 抗体(美国 Santa Cruz 公司),P65 抗体、Nox2 抗体(美国 Proteintech 公司),Tubulin 抗体、FITC 标记的山羊抗兔抗体、辣根过氧化物酶 HRP 标记的抗体(碧云天公司),RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

1.2 原代心室成纤维细胞的培养与鉴定

取 SD 大鼠 15 只,在无菌条件下开胸取出心脏,分离出心室,用 0.01 mol/L PBS 清洗心室(冰上)。将心室剪成 1 mm^3 大小的组织块,加入 0.08% Ⅱ型胶原酶和 0.125% 胰蛋白酶,37 ℃水浴消化 10 min,吸出上清液。在上清液中加入等体积含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 中和并离心,所得细胞用 10% FBS DMEM 重悬。向剩余组织加入胶原酶和胰蛋白酶消化,共消化 5 次。最终将所得细胞混匀,接种于培养瓶,于 37 ℃、5% CO_2 培养 90 min,更换培养液。实验采用第 2~3 代细胞。采用波形蛋白免疫荧光法鉴定成纤维细胞,并设置对照组,对照组不加波形蛋白一抗。

1.3 CCK-8 法检测 Ang Ⅱ、Ang1-7 对成纤维细胞增殖的影响

取成纤维细胞以 9 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,全部细胞无血清处理 12 h。完全随机化分组为对照组、Ang Ⅱ组、Ang1-7 组和 Ang Ⅱ + Ang1-7 组。对照组不予处理。Ang Ⅱ组与 Ang1-7 组分别加入Ang Ⅱ、Ang1-7,AngⅡ + Ang1-7 组先加 Ang1-7 处理 30 min,再加入 Ang Ⅱ处理。药物终浓度为 10^{-6} mol/L,共处理 12 h。然后加入配好的 CCK-8,于 37 ℃、5% CO_2 孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的[D(450)]值,按公式计算细胞活性。细胞活性 = [实验组平均 D(450)值 - 阴性对照组 D(450)值]/[对照组平均 D(450)值 - 阴性对照组 D(450)值]。

1.4 Western blot 检测 Rac1、Rad、Nox2、CTGF、P65 的表达

各组细胞先用无血清 DMEM 处理 12 h,再加入各组对应药物处理 24 h。收集各组细胞,弃去培养基,用预冷 0.01 mol/L PBS 洗涤。加入细胞裂解液在冰上裂解并提取各组细胞蛋白。取等质量上述蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,采用湿转法转移至 PVDF 膜上,室温封闭 90 min,加一抗 4 ℃过夜,PBST 漂洗 3 次,加含有辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗于 37 ℃孵育 60 min。采用 ECL 化学发光法显色,采用 Qunatity One 软件分析结果,用 Tubulin 蛋白进行校正。

1.5 荧光定量 PCR 检测Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白和纤维连接蛋白 mRNA 的表达

用 RNA 提取试剂(RNAiso plus)提取各组细胞总 RNA,并逆转录为 cDNA。引物序列:Ⅰ型胶原蛋白,上游 5′-ATCTCCTGGTGCTGATGGAC-3′,下游 5′-GCCTCTTTCTCCTCTCTGACC-3′,109 bp;Ⅲ型胶原蛋白,上游 5′-AAGGGCAGGGAACAACTGAT-3′,下游 5′-AGCAGGGTGAGAAGAAACCA-3′,136 bp;纤维连接蛋白,上游 5′-ACAACCAGAGGAGGCACAAG-3′,下游 5′-CCGTGTAAGGGTCAAAGCAT-3′,108 bp;GAPDH,上游 5′- CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′,下游 5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′,138 bp。反应体系 25 μL。PCR 反应条件:95 ℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,共 40 个循环。

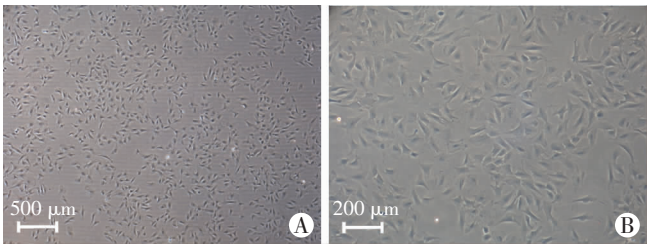
1.6　统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据间比较采用单因素方差分析。两两比较采用 LSD 检验。

2　结果

2.1　SD 大鼠心室成纤维细胞的分离培养

细胞悬液培养 90 min 后,成纤维细胞贴壁,呈圆形,黑点状。培养 24 h 后,细胞向外伸出突起,呈不规则三角形或长梭形,细胞质透光性高,中央有卵原核(图 1A)。3 ~ 4 d 后,细胞密集排列,成铺路石样(图 1B)。



A:24 h;B:72 h

图 1　倒置显微镜下观察 SD 大鼠心室成纤维细胞

2.2　SD 大鼠心室成纤维细胞波形蛋白的鉴定

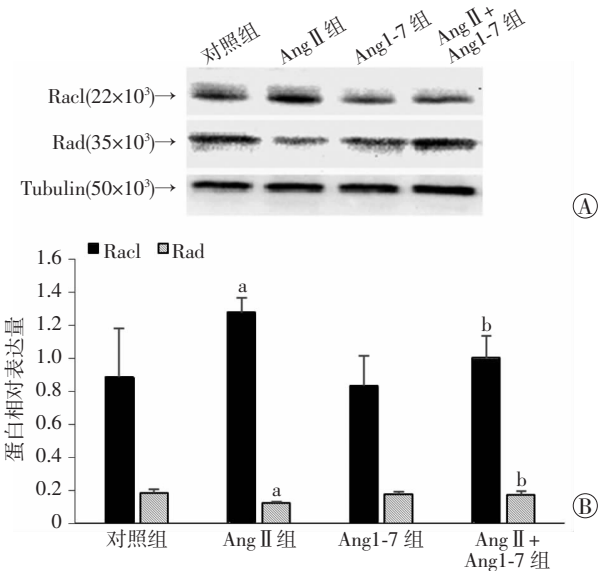
心肌细胞增殖能力差,在培养过程中大多从瓶壁脱落。差速贴壁法培养所剩细胞为成纤维细胞、少量平滑肌细胞和内皮细胞。波形蛋白免疫荧光鉴定显示,细胞均能发绿光。对照组仅有极为微弱的荧光,为抗体非特异性结合所致。DAPI 染核呈深蓝色(图 2)。阳性率 >97%。

2.3　AngⅡ、Ang1-7 对成纤维细胞增殖的影响

药物作用 12 h 后,与对照组(0.488 9 ± 0.016 4)比较,AngⅡ组(0.593 4 ± 0.037 4)细胞数量明显增加($P<0.05$),Ang1-7 组(0.491 1 ± 0.020 9)变化不明显($P>0.05$)。与 AngⅡ组比较,AngⅡ + Ang1-7 组细胞数量减少(0.495 5 ± 0.018 4,$P<0.05$)。

2.4　AngⅡ、Ang1-7 对成纤维细胞 Rac1、Rad 蛋白表达的影响

AngⅡ、Ang1-7 作用 24 h 后,与对照组比较,AngⅡ组 Rac1 蛋白表达升高,Rad 蛋白表达下降($P<0.05$),Ang1-7 组两种蛋白表达量改变不明显($P>0.05$)。与 AngⅡ组比较,AngⅡ + Ang1-7 组 Rac1 表达下降,Rad 蛋白表达升高($P<0.05$,图 3)。

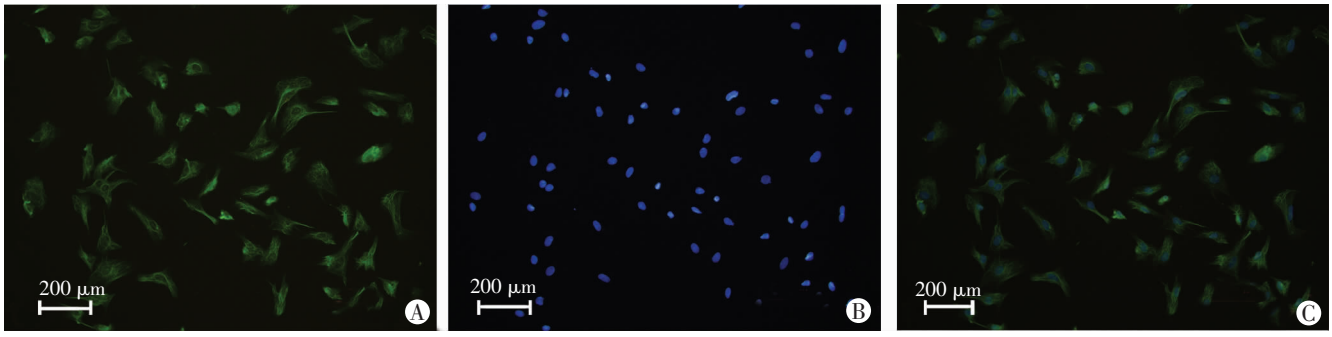


A:Western blot 检测;B:半定量分析　Rac1:$n=6$;Rad:$n=5$;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 AngⅡ组比较

图 3　Western blot 检测各组成纤维细胞 Rac1、Rad 蛋白的表达

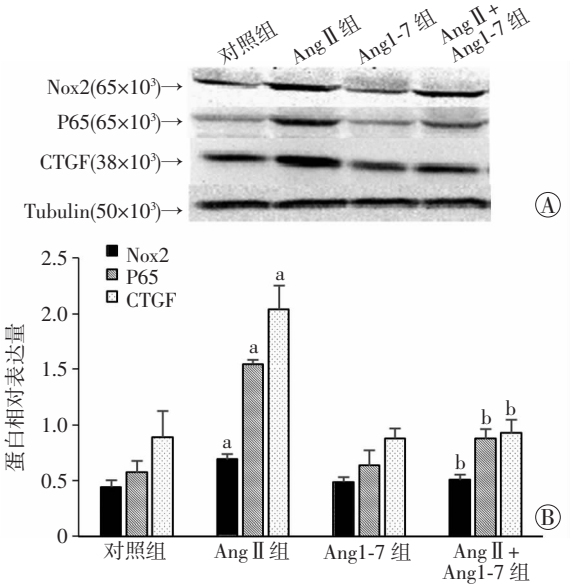
2.5　AngⅡ、Ang1-7 对成纤维细胞 Nox2、P65、CTGF 蛋白表达的影响

AngⅡ、Ang1-7 作用 24 h 后,与对照组比较,AngⅡ组 Nox2、P65、CTGF 蛋白表达均明显升高($P<0.05$),Ang1-7 组 Nox2、P65、CTGF 蛋白表达与对照组相似($P>0.05$)。与 AngⅡ组比较,AngⅡ + Ang1-7 组 3 种蛋白表达均下降($P<0.05$,图 4)。



A:波形蛋白;B:DAPI;C:波形蛋白 + DAPI

图 2　免疫荧光观察 SD 大鼠心室成纤维细胞波形蛋白及 DAPI 定位



A:Western blot 检测;B:半定量分析　Nox2:$n=5$;P65、CTGF:$n=6$;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 AngⅡ组比较

图4　Western blot 检测各组成纤维细胞 Nox2、P65、CTGF 蛋白的表达

2.6　AngⅡ、Ang1-7 对成纤维细胞Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白及纤维连接蛋白 mRNA 表达的影响

与对照组比较,AngⅡ组Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白和纤维连接蛋白的 mRNA 表达分别增加了 1.07、0.73、1.33 倍($P<0.05$,$n=3$)。Ang1-7 组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 AngⅡ组比较,AngⅡ+Ang1-7 组Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白和纤维连接蛋白的 mRNA 表达分别下降了 25.6%、34.1%、31.8%($P<0.05$,$n=3$)。

3　讨论

高血压、冠心病、心肌梗死等常见心血管疾病往往造成心肌原发性损伤,加重心脏负荷。此时,机体激活 RAS,心脏进入代偿状态。活化的 RAS 能增强心脏收缩力,收缩外周血管,调节血液再分配。RAS 在心脏代偿过程中发挥了重要作用。但是,RAS 持续激活也带来一系列副反应:心肌细胞肥大,细胞外基质堆积,心肌间质纤维化,心室肥厚,心腔扩大。这些改变统称为心室重塑。心室重塑作为心脏的代偿性表现,随着基础疾病不断进展,最终导致心力衰竭。因此,调节 RAS 的状态成为治疗各种心血管疾病的常用策略。在 RAS 系统中,血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2,ACE2)水解 AngⅠ生成 Ang1-9,Ang1-9 进一步被血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)水解为 Ang1-7。ACE2 也能直接水解 AngⅡ,生成 Ang1-7[5]。大量研究表明 Ang1-7 作为 RAS 的组成部分,能对抗 AngⅡ的作用,对 RAS 起负性调节作用[6]。Qi 等[7]的研究证明:使用慢病毒在心室过表达 Ang1-7,能有效减轻心肌梗死后的心室重塑,改善各项心功指标。McCollum 等[8]的研究发现 Ang1-7 能够抑制由 AngⅡ诱导的细胞增殖,下调胶原蛋白表达。表明 Ang1-7 参与了细胞外基质合成的调节。目前,越来越多的研究关注于 Ang1-7 的功能,试图将其用于临床心血管疾病治疗,本研究的结果补充了 Ang1-7 的作用机制。

Rac1 蛋白是 Rho GTP 酶家族的一员。Rac1 与动脉粥样硬化、高血压、心脏重构等均有关系[9]。研究显示:房颤患者的心房组织 Rac1 活性普遍升高。Adam 等[10]进一步使用转基因老鼠实验,发现高表达 Rac1 的老鼠更容易出现房颤。现已阐明:Rac1 能与 $gp91^{phox}$(Nox2)、$gp65^{phox}$结合,共同构成还原性辅酶Ⅱ氧化酶复合体(NADPH oxidase),进而增强结缔组织生长因子(CTGF)的表达[11]。另一方面,Rac1 组成 NADPH 氧化酶后,还能激活下游的 NF-kB 因子[12-13]。CTGF 与 NF-kB 是心室重塑的关键因子。本研究中,AngⅡ组成纤维细胞 Rac1、Nox2、P65 和 CTGF 蛋白表达明显升高。而当 Ang1-7 存在时,这 4 种蛋白表达显著下降。提示:Ang1-7 能对抗 AngⅡ对成纤维细胞的刺激作用,Ang1-7 通过下调 Rac1 蛋白表达,进而减少 NADPH 氧化酶形成,抑制 P65 和 CTGF 生成,减少细胞外基质的合成。

Rad 是相对分子质量为 35×10^3 的 GTP 酶,属于 RGK GTP 酶家族。RGK 家族还包括 Rem1、Rem2、Gem/Kir。Rad 普遍存在于细胞膜、细胞质、细胞核,并且可以在胞质与胞核间穿梭[14]。Rad 在心脏组织表达较高,提示其与心脏功能之间关系紧密[15]。最新研究证实:心衰患者和心脏肥大患者心脏组织中 Rad 的量显著减少,敲除 Rad 基因的老鼠更易出现心脏肥大[16]。本研究中,AngⅡ抑制心室成纤维细胞表达 Rad 蛋白。Ang1-7 能减弱 AngⅡ对成纤维细胞的抑制作用,回调 Rad 的表达。回升的 Rad 能够在细胞核结合活化的 P65,阻止其结合 DNA,抑制下游基因的表达[17]。同时,Rad 抑制了 CTGF 的转录[18]。Ang1-7 通过上述作用抑制成纤维细胞表达胶原蛋白和纤维连接蛋白。

综上所述,本研究证明 Ang1-7 能减弱 AngⅡ对心室成纤维细胞的作用。Ang1-7 可通过两种途径产生

作用:①Ang1-7 下调 Rac1 的表达,进而抑制 NADPH 氧化酶形成,抑制 P65、CTGF 表达;②Ang1-7 上调 Rad 的表达,增多的 Rad 能够抑制 P65 与 DNA 结合,同时抑制 CTGF 转录。Ang1-7 通过影响上述两条信号通路,使成纤维细胞合成细胞外基质减少。这一机制可能是 Ang1-7 在体内产生保护作用的机制之一。但是,当单独作用于成纤维细胞时,Ang1-7 对上述各蛋白的调节并不明显。目前普遍认为 Ang1-7 主要通过结合 Mas 受体产生作用。本研究中 Ang1-7 产生的作用是否由 Mas 受体介导仍需研究证实。

参考文献:

[1] Mansur S J, Hage F G, Oparil S. Have the renin-angiotensin-aldosterone system perturbations in cardiovascular disease been exhausted? [J]. Curr Cardiol Rep, 2010, 12(6): 450-463. DOI: 10.1007/s11886-010-0140-7

[2] Underwood P C, Adler G K. The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans[J]. Curr Hypertens Rep, 2013, 15(1): 59-70. DOI: 10.1007/s11906-012-0323-2

[3] Iwai M, Horiuchi M. Role of the ACE2/angiotensin1-7/Mas axis in the cardiovascular system[J]. Hypertens Res, 2010, 33(11): 1108-1109. DOI: 10.1038/hr.2010.164

[4] Westermeier F, Bustamante M, Pavez M, *et al*. Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9)[J]. Pharmacol Res, 2015, 101: 41-55. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.06.018

[5] Lee V C, Lloyd E N, Dearden H C, *et al*. A systematic review to investigate whether Angiotensin-(1-7) is a promising therapeutic target in human heart failure[J]. Int J Pept, 2013, 2013: 260346. DOI: 10.1155/2013/260346

[6] McKinney C A, Fattah C, Loughrey C M, *et al*. Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(12): 815-827. DOI: 10.1042/CS20130436

[7] Qi Y, Shenoy V, Wong F, *et al*. Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1-7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology[J]. Exp Physiol, 2011, 96(9): 863-874. DOI: 10.1113/expphysiol.2011.056994

[8] McCollum L T, Gallagher P E, Tallant E A. Angiotensin-(1-7) abrogates mitogen-stimulated proliferation of cardiac fibroblasts[J]. Peptides, 2012, 34(2): 380-388. DOI: 10.1016/j.peptides.2012.01.020

[9] Elnakish M T, Hassanain H H, Janssen P M, *et al*. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase [J]. J Pathol, 2013, 231(3): 290-300. DOI: 10.1002/path.4255

[10] Adam O, Frost G, Custodis F, *et al*. Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(4): 359-367.

[11] Adam O, Lavall D, Theobald K, *et al*. Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(5): 469-480. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.08.064

[12] Hong D, Bai Y P, Shi R Z, *et al*. Inhibitory effect of reinioside C on vascular smooth muscle cells proliferation induced by angiotensin Ⅱ *via* inhibiting NADPH oxidase-ROS-ENK1/2-NF-kappaB-AP-1 pathway[J]. Pharmazie, 2014, 69(9): 698-703.

[13] Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, *et al*. The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B[J]. J Biol Chem, 2003, 278(23): 20770-20777.

[14] Buraei Z, Lumen E, Kaur S, *et al*. RGK regulation of voltage-gated calcium channels[J]. Sci China Life Sci, 2015, 58(1): 28-38. DOI: 10.1007/s11427-014-4788-x

[15] Reynet C, Kahn C R. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type Ⅱ diabetic humans[J]. Science, 1993, 262(5138): 1441-1444.

[16] Chang L, Zhang J, Tseng Y H, *et al*. Rad GTPase deficiency leads to cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2007, 116(25): 2976-2983.

[17] Hsiao B Y, Chang T K, Wu I T, *et al*. Rad GTPase inhibits the NFkappaB pathway through interacting with RelA/p65 to impede its DNA binding and target gene transactivation[J]. Cell Signal, 2014, 26(7): 1437-1444. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.03.003

[18] Zhang J, Chang L, Chen C, *et al*. Rad GTPase inhibits cardiac fibrosis through connective tissue growth factor[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(1): 90-98. DOI: 10.1093/cvr/cvr068

(收稿:2015-12-12;修回:2016-01-15)

(编辑 栾 嘉)