



纤维化及正常肝组织中血管紧张素 II 1型受体mRNA的表达

血管紧张素 II 1型受体(AT1R)是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的重要组成部分,除了对心血管系统的调节作用,在心、肾间质纤维化及肝纤维化中的作用也越来越受到重视。目前已有动物实验研究表明,大鼠的肝星形细胞存在AT1R,并经测序得到证实,而且用AT1R拮抗剂治疗肝大鼠纤维化,取得了明显的疗效[1]。但AT1R在人类肝组织中的分布及作用尚未见报道。本研究通过对人纤维化肝组织和正常肝组织中AT1R表达的检测,探讨肝纤维化形成过程中AT1R的表达变化以及它在肝纤维化发生发展中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

纤维化肝组织18例,取自2001年1月~2002年2月广州军区总医院肝胆外科手术切除的新鲜标本。其中10例为原发性肝癌周围组织,8例为乙型肝炎后肝硬化组织;男10例,女8例;中位年龄46.2岁。正常肝组织12例,均取自尸体供肝(即肝移植术前穿刺所取标本,热缺血时间约3 min),其中男8例,女4例,中位年龄38.7岁。所有标本均经病理观察证实。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒及逆转录试剂盒购自Invitrogen公司,随机六聚体引物、Taq酶为上海博彩生物工程公司产品,PCR扩增用引物由上海博亚生物工程公司合成。

1.3 AT1R mRNA的检测

采用异硫氰酸胍一步法提取肝组织总RNA,标本均经紫外分光光度计测定其纯度及含量,标本总RNA $A_{260/280}$ 值均在1.8~2.0之间。取总RNA 5 μg ,随机引物按逆转录试剂盒操作说明逆转录成cDNA,并进行PCR扩增。AT1R上游:5'-CGGAGTCAACGG-ATTTGGTGGTAT-3';下游:5'-AGGCTTCTCCATGG-TGGTAGAGAC-3',扩增片段为300 bp。“看家基因”磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因作为内参照,上游:5'-CATGGTCTACATGTTCCAGT-3',下游:5'-GGCT AAGCAGTTGGTTGGTG-3',扩增片段为349 bp。取反转录产物cDNA 5 μl ,上下游引物各1 μl ,5 \times 缓冲液5 μl ,10 mmol/L dNTP 2 μl ,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl (终浓度为2.0 mmol/L),加水至终体积25 μl 。混匀,离心,以矿物油覆盖。置PCR仪94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR结束时产物积累处于指数增长期,产物片段大小与预期的相一致,每一样本均设置假逆转录产物和蒸馏水为模板的阴性对照。1.5%琼脂糖电泳,紫外线下观察结果并照像。进行计算机灰度扫描,采用GeneBand图像分析软件测定每一样本目的片段和内参片段的面积灰度值(IA),以每例组织与GAPDH电泳带IA之比值,作为该例标本目的基因表达的相对数值。

1.4 统计学处理

采用方差分析,用SPSS10.0统计分析软件进行统计学处理。

18例纤维化肝组织及12例正常肝组织的cDNA均能扩增出AT1R目的片段，而在同样条件下，该cDNA 可以扩增出内参片段，所有阴性对照均未扩增出特异性片段，2组肝组织中AT1R的PCR产物的电泳结果见图1。同样条件下，纤维化肝组织中AT1R mRNA的表达量较正常肝组织明显增多，2组目的片段和内参片段IA的比值正常肝组织为 0.71 ± 0.21 ，纤维化肝组织为 1.27 ± 0.45 ，具有显著性差异($F=13.29$ ， $P<0.01$)。

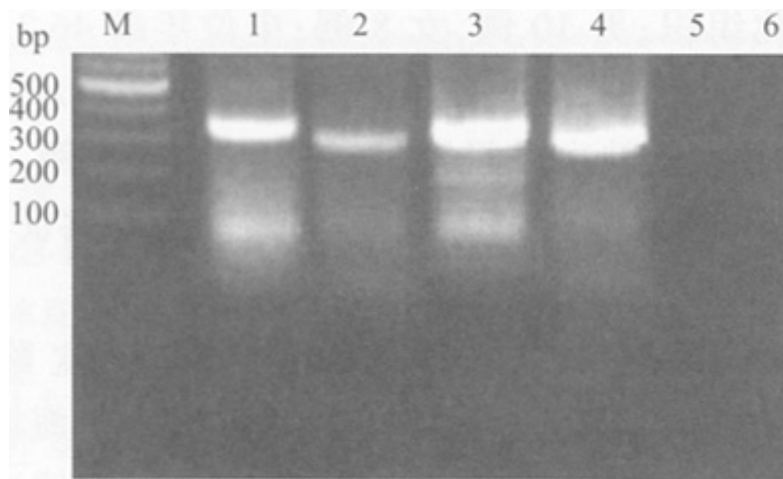


图1 AT1R mRNA在正常肝组织和纤维化肝组织中的表达

Fig.1 Expressions of AT1R mRNA in normal and fibrotic liver tissues

M: DNA Mark; Lanes 1, 2: Normal liver(Lane 1 is the internal standard product, and Lane 2 is AT1R product.); Lanes 3, 4: Fibrotic liver(Lanes 3 is the internal standard product, and Lane 4 is AT1R product.); Lanes 5, 6: Negative control

3 讨论

我们使用半定量RT-PCR方法检测AT1R在纤维化肝组织及正常肝组织中的表达。首先在GeneBank中找到AT1R目的基因序列，用Gene Blast选出同源性最小的特异性片段，通过引物设计软件分析设定上下游引物，确定AT1R扩增目的片段为300 bp；用同样方法设定相对应的能稳定表达的“看家基因”GAPDH作为内参照，扩增片段为349 bp。以前的研究发现总RNA在400~800 ng之间，循环次数在40次以下，RNA的扩增量随模板量和循环次数成线性增长[2]。我们在同一体系中同时逆转录扩增AT1R特异性目的片段及一稳定表达的内参基因GAPDH，并以两者比值作为mRNA相对表达量，能真实反映基因mRNA的实际表达量。不加逆转录酶的假逆转录产物和不加模板的PCR体系均不能扩增出目的片段，说明PCR产物来源于逆转录产物cDNA而非基因组DNA。

肝纤维化是各种原因造成肝脏的一种病理改变，特点是胶原、蛋白多糖及糖蛋白等多种ECM成分过量沉积，同时伴有肝再生不良。在肝纤维化形成过程中肝星形细胞(HSC)的激活和增生起主要作用，其中HSC表型的激活是肝纤维化形成过程的关键。近来研究表明，RAAS参与了肝星形细胞的激活过程[3]。

RAAS在人类及动物模型的高血压形成中起着十分关键的作用。以往认为，RAAS属循环内分泌系统，随着分子生物学技术的发展，已发现许多肾外组织器官也存在RAAS的肾素及其他成份。提示RAAS不仅是一个循环内分泌系统，而且可能是一个全身分布的旁分泌、自分泌或腔内分泌系统。最近，对内源性RAAS的研究证实，血管紧张素对心脏及动脉血管的细胞增殖有直接作用，而这种作用是通过不同器官组织的不同血管紧张素受体实现的。血管紧张素II受体是血管紧张素作用的主要受体，它分为AT1和AT2两种亚型，主要发挥生物学效应的是AT1。目前认为，血管紧张素与受体AT1结合后，通过三磷酸鸟苷结合蛋白调控磷脂酰肌醇酶，该酶继而将磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸酯水解成第二信使二脂酰甘油(DG)和肌醇-1，4，5-三磷酸酯(IP3)，从而

形成一套以肌醇磷脂代谢为基础的第二信使系统，与细胞的增殖调控有密切关系[4]。近年来，内源性RAAS在心肌、血管和肾间质纤维化的作用研究已多有报道。Mifune等[5]证明了血管紧张素II能刺激血管平滑肌细胞外ECM的合成与沉积，导致管壁纤维化，从而设想在其他组织中也有类似作用。Lim等[6]用AT-1受体拮抗剂Losartan治疗肥厚性心肌病大鼠，取得明显疗效，I型胶原及转化生长因子- β (TGF- β)mRNA表达均减少了50%以上。目前，关于RAAS在肝纤维化中的作用也受到关注，Yoshiji等[7]新近发现AT-1受体拮抗剂Candesartan可减轻大鼠肝纤维化，降低肝纤维化血清标志物和TGF- β mRNA等表达水平。Yang等[8]证明了肝纤维化形成时醛固酮合成酶基因-CYP11B2mRNA在HSC中表达增强，醛固酮拮抗剂安体舒通对早期肝纤维化具有抑制作用。同时发现了HSC上具有AT-1受体，并经测序得到证实。从而提示了Ang II及其受体AT1R在HSC的激活和转化过程中可能具有重要的作用。

本研究结果显示，纤维化肝组织较正常肝组织AT1R mRNA的表达明显增加，两者之间存在显著差异。但Ang II及其受体AT1R在HSC的激活、转化和肝纤维化发生发展中如何发挥其重要的作用，其作用的主要机制是什么，还有待进一步研究。由于AT1R拮抗剂早已成为商品药物，并广泛应用于心血管系统的临床治疗，具有安全可靠、毒副作用小等特点。因此，加强对Ang II与AT1R对肝纤维化作用的研究，有可能为肝纤维化的防治提供一种新的治疗途径。

参考文献：

[1] 魏红山, 李定国, 陆汉明, 等. 血管紧张素II受体阻断剂抗肝纤维化的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(5): 302-4.

Wei HS, Li DG, Lu HM, et al. Effects of angiotensin II receptor blockade on hepatic fibrosis in rats [J]. Chin J Hepatol, 2000, 8(5): 302-4.

[2] 冯洪强, 冷圣希, 张忠明, 等. 肝硬化门静脉高压症大鼠肝组织内内皮素-1基因mRNA的表达[J]. 中华普通外科杂志, 1998, 13(2): 114-6.

Feng HQ, Leng SX, Zhang ZM, et al. Expression of endothelin-1 gene at the level of mRNA in hepatic tissues of cirrhotic rats with portal hypertension[J]. Chin J Gen Surg, 1998, 13(2): 114-6.

[3] 李旭, 杨希山, 吴平生, 等. 肝星形细胞表达醛固酮合成酶基因及安体舒通抗肝纤维化的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(2): 75-7.

Li X, Yang XS, Wu PS, et al. CYP11B2 expression in rat liver and the efficacy of antisterone on liver fibrosis[J]. Chin J Hepatol, 2001, 9(2): 75-7.

[4] 胡爱华, 周宪梁, 惠汝太, 等. 血管紧张素受体的研究进展[J]. 国外医学·分子生物学分册, 1999, 21(1): 28-30.

Hu AH, Zhou XL, Hui RT, et al. The research progress of angiotensin receptor [J]. Foreign Medical Science·Mol Biol Section, 1999, 21(1): 28-30.

[5] Mifune M, Sasamura H, Shimizu H, et al. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 2000, 36(50): 845-50.

[6] Lim D, Lutucuta S, Bachireddy P, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2001, 103(6): 789-91.

[7] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Angiotensin II type 1 receptor integrations is a major regulator for liver fibrosis development in rats[J]. Hepatology, 2001, 34(4): 745-50.

[8] Yang XS, Li X, Wu PS, et al. CYP11B2 expression in rat liver and the effect of spironolactone on hepatic fibrogenesis[J]. Horm Res, 2000, 33(6): 288-93.

参考文献:

- [1] 魏红山, 李定国, 陆汉明, 等. 血管紧张素 II 受体阻断剂抗肝纤维化的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(5): 302-4.
- Wei HS, Li DG, Lu HM, et al. Effects of angiotensin II receptor blockade on hepatic fibrosis in rats [J]. Chin J Hepatol, 2000, 8(5): 302-4.
- [2] 冯洪强, 冷圣希, 张忠明, 等. 肝硬化门静脉高压症大鼠肝组织内内皮素-1基因mRNA的表达[J]. 中华普通外科杂志, 1998, 13(2): 114-6.
- Feng HQ, Leng SX, Zhang ZM, et al. Expression of endothelin-1 gene at the level of mRNA in hepatic tissues of cirrhotic rats with portal hypertension[J]. Chin J Gen Surg, 1998, 13(2): 114-6.
- [3] 李旭, 杨希山, 吴平生, 等. 肝星形细胞表达醛固酮合成酶基因及安体舒通抗肝纤维化的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(2): 75-7.
- Li X, Yang XS, Wu PS, et al. CYP11B2 expression in rat liver and the efficacy of antisterone on liver fibrosis[J]. Chin J Hepatol, 2001, 9(2): 75-7.
- [4] 胡爱华, 周宪梁, 惠汝太, 等. 血管紧张素受体的研究进展[J]. 国外医学·分子生物学分册, 1999, 21(1): 28-30.
- Hu AH, Zhou XL, Hui RT, et al. The research progress of angiotensin receptor [J]. Foreign Medical Science·Mol Biol Section, 1999, 21(1): 28-30.
- [5] Mifune M, Sasamura H, Shimizu H, et al. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 2000, 36(50): 845-50.
- [6] Lim D, Lutucuta S, Bachireddy P, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2001, 103(6): 789-91.
- [7] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Angiotensin II type 1 receptor integrations is a major regulator for liver fibrosis development in rats[J]. Hepatology, 2001, 34(4): 745-50.
- [8] Yang XS, Li X, Wu PS, et al. CYP11B2 expression in rat liver and the effect of spironolactone on hepatic fibrogenesis[J]. Horm Res, 2000, 33(6): 288-93.