



肾上腺髓质素原N端20肽对血管紧张素刺激心肌成纤维细胞生成NO的影响

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是1993年由Kitamura等[1]从肾上腺髓质瘤中发现的一种心血管活性肽,来源于其基因编码的肾上腺髓质素原(proadrenomedullin, proADM)。proADM分子中的成对碱性氨基酸残基为内源性肽酶的加工位点。proADM在体内被酶解后生成4个肽段,分别为肾上腺髓质素原N端20肽(proADM N-terminal 20 peptide, PAMP)、proADM45-92、ADM和肾上腺升压素(adrenotensin, ADT)[2]。上述各肽段在体内各自发挥其独立的生物学效应,ADM具有很强的舒张血管、降低血压、抑制血管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞的增殖等生物学功能;PAMP有较弱的舒张血管、降低血压的效应,目前PAMP对心肌成纤维细胞的影响仍是未知的[2], [3]。NO作为一重要的舒血管因子,已证实心肌成纤维细胞分泌NO,并对心肌重塑起着重要作用[4][5][6]。血管紧张素II(AngII)对血管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞的增殖、胶原生成具有重要作用。本文旨在探讨PAMP对AngII作用于心肌成纤维细胞合成NO的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

出生1~3 d的SD大鼠,本校实验动物中心提供。胰蛋白酶、四氮唑盐(MTT)、DMEM低糖型培养基为GIBCO公司产品;和二甲基亚砷(DMSO)为美国Sigma公司产品;胎牛血清(FCS)购于杭州四季青生物工程材料研究所;2500E型CO₂培养箱(美国NuAire公司);753型紫外可见分光光度计(上海光学仪器制造厂)。

1.2 方法

1.2.1 CFs 培养 在无菌条件下,取出生后1~3 d的SD大鼠的心室,剪碎,用0.25%的胰酶在37 °C下分散细胞,每隔5 min收集1次细胞,收集第2~8次消化所得的细胞悬液至离心管,加入等量的含20 %新生小牛血清的DMEM,离心(1 000 r/min, 10 min)、弃上清,加入含200 ml/L FCS的DMEM吹打成细胞悬液后,接种于培养瓶中。根据CFs较心肌细胞贴壁速度快的原理,在50 ml/L CO₂、37 °C、饱和湿度条件下培养60~90 min,采用差速贴壁法,倾去上清液,剩下的细胞即为CFs,加入含100 ml/L FCS的DMEM继续培养。细胞生长接近融合状态时按1:4传代。实验用第3代。

1.2.2 细胞鉴定 经倒置显微镜、透射电镜、免疫组化纤维粘连蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为CFs,纯度达98%,台盼蓝染色细胞活力大于98%。

1.2.3 实验分组 ①空白对照组;②10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶mol/L AngII组;③10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L PAMP组;④10⁻⁷ mol/L AngII+PAMP(10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L)组。

1.2.4 用硝酸还原法测定NO的含量 NO在体外转化为NO₂和NO₃,利用硝酸还原酶将NO₃还原为NO₂,通过显色深浅测定NO₂浓度推算NO含量。操作按试剂盒说明进行,NO含量以公式(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×100 μmol·L⁻¹计算。

1.3 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用多个样本均数比较的ANOVA方差分析,两两比较采用SNK

2 结果

2.1 AngII对CFs的NO合成功能的影响

培养24 h后, 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ AngII 组细胞培养液中的浓度是: (73.88 ± 2.23) 、 (64.34 ± 3.02) 、 (54.12 ± 2.82) 、 (40.21 ± 1.45) $\mu\text{mol/L}$, 各组之间有显著性差异($P < 0.001$)。但空白组与 10^{-9} $\mu\text{mol/L}$ AngII之间无显著性差异($P > 0.05$)。这表明随着AngII 的浓度增加, NO的合成显著性地减少(表1)。

表 1 AngII 对 CFs 合成 NO 的影响($n=6$)
Tab.1 Effects of AngII on NO production
in neonatal SD rat cardiac fibroblast
 ($n=6, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

Group	NO ($\mu\text{mol/L}$)
Blank	74.57 ± 2.49
10^9 mol/L AngII	$73.88 \pm 2.23^*$
10^8 mol/L AngII	$64.34 \pm 3.02^*$
10^7 mol/L AngII	$54.12 \pm 2.82^{**}$
10^6 mol/L AngII	$40.21 \pm 1.45^{***}$

$F=206.93, P<0.001$; $^*P=0.633$ vs Blank; $^*P=0.000$ vs 10^9 mol/L AngII; $^{**}P=0.000$ vs 10^8 mol/L AngII; $^{***}P=0.000$ vs 10^7 mol/L AngII (SNK method)

2.2 PAMP对CFs的NO合成功能的影响

10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ PAMP组细胞培养液中NO的浓度分别为 74.40 ± 3.42 、 74.91 ± 2.66 、 75.77 ± 3.31 、 74.23 ± 2.43 $\mu\text{mol/L}$, 而空白组为 74.57 ± 2.49 $\mu\text{mol/L}$ 。各组之间无显著性差异($P > 0.05$, 表2)。

表 2 PAMP 对 CFs 合成 NO 的影响($n=6$)
Tab.2 Effects of PAMP on NO production in
neonatal SD rat cardiac fibroblasts ($n=6, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

Group	NO ($\mu\text{mol/L}$)
Blank	74.57 ± 2.49
10^9 mol/L PAMP	74.40 ± 3.42
10^8 mol/L PAMP	74.91 ± 2.66
10^7 mol/L PAMP	75.77 ± 3.31
10^6 mol/L PAMP	74.23 ± 2.43

$F=0.296, P=0.859$

2.3 AngII与PAMP共同作用时对NO合成功能的影响

10^{-7} $\mu\text{mol/L}$ AngII+(10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$) PAMP组培养液中NO合成浓度分别为 (66.15 ± 2.95) 、 (80.58 ± 3.77) 、 (88.67 ± 1.46) 、 (96.22 ± 2.96) $\mu\text{mol/L}$ 各组间有显著性差异($P < 0.001$)。AngII

浓度保持不变的情况下, 随PAMP浓度增加, NO合成明显增多(表3)。

表3 PAMP和AngII对CFs合成NO的影响

Tab.3 Effects of PAMP and AngII on NO production in neonatal SD rat cardiac fibroblasts ($n=6$, Mean \pm SD)

Group	NO(μ mol/L)
Blank	74.57 \pm 2.49
10 ⁷ mol/L AngII	54.12 \pm 2.82
10 ⁷ mol/L AngII+10 ⁹ mol/L PAMP	66.15 \pm 2.95*
10 ⁷ mol/L AngII+10 ⁸ mol/L PAMP	80.58 \pm 3.77**
10 ⁷ mol/L AngII+10 ⁷ mol/L PAMP	88.67 \pm 1.46***
10 ⁷ mol/L AngII+10 ⁶ mol/L PAMP	96.22 \pm 2.96****

$F=61.08$, $P<0.001$; * $P=0.000$ vs 10⁷ mol/L AngII; ** $P=0.000$ vs 10⁷ mol/L AngII+10⁹ mol/L PAMP; *** $P=0.000$ vs 10⁷ mol/L AngII+10⁸ mol/L PAMP; **** $P=0.0008$ vs 10⁷ mol/L AngII+10⁷ mol/L PAMP (SNK method)

3 讨论

在心血管疾病中, 高血压心脏病, 心力衰竭等疾病都会引起心室重塑, 心肌重塑是由一系列复杂的分子和细胞机制导致心肌结构、功能和表型的变化。目前的研究认为: 心室重塑为心肌对心肌损伤及心脏超负荷的一种反应, 反映了生长促进因子(如细胞因子、生长因子、血管紧张素、去甲肾上腺素等)及内源性生长抑制因子(如心钠素、缓激肽及NO等)之间效应的失衡。其确切机制尚不明确[7]。

AngII目前已证实其在高血压心脏病、动脉粥样硬化、血管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞增生中起重要作用[8]。本实验观察到AngII明显随着浓度的增大刺激心肌成纤维细胞合成NO。与以前所观察到的结果一样[9]。

几乎所有组织都有PAMP分布, 在心血管系统中, 血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、心肌成纤维细胞及心肌细胞均可合成分泌PAMP[6]。研究发现, Ang II可以刺激离体大鼠心肌细胞及成纤维细胞分泌PAMP[10], ADM可以影响AngII心肌成纤维细胞NO合成。但PAMP对心肌成纤维细胞的影响未见报道。

本实验同以往实验一样观察到AngII呈剂量依赖性使CFs合成NO减少。但PAMP对CFs的合成NO无影响。而当PAMP与AngII共同作用于CFs下, AngII保持不变时, 随PAMP浓度增加, NO生成增多。

据文献报道[11], Ang II有两种受体, AT1R 与AT2R, 它们对心血管的作用基本相反。使用AT1R 拮抗剂阻断Ang II与AT1R 的结合, 可使Ang II与AT2R 结合增加, 促进缓激肽-前列腺素- NO 途径的开放, 使效应细胞分泌NO 上升。如果使用AT2R 拮抗剂阻断Ang II与AT2R 的结合, 可使Ang II与AT1R 结合增加, 抑制缓激肽-前列腺素- NO 途径的开放, 使效应细胞分泌NO 下降。因此假设Ang II可通过与AT1R结合抑制成年大鼠MFs分泌NO, 同时又可通过其它受体途径促进NO 的分泌, 一般情况下以前者为主; 当AT1R 功能被阻断后, 后者效应会明显呈现。

本实验中用含0.5%胎牛血清DMEM培养CFs 24 h后, 使其处于生长静息期时加入PAMP, 观察到PAMP对CFs合成NO无影响。因此推测, 在CFs处于静息期时, PAMP对其合成NO无影响。但当PAMP与AngII共同作用于静息期的CFs时, AngII可能通过作用于静息期的CFs, 使其表面表达PAMP的特异受体, 此时, PAMP通过其特异性受体, 并间接通过AT1R和AT2R受体机制, 从而表现出促进CFs合成NO增多。

综上所述, CFs静息期时表面PAMP特异受体可能不表达, PAMP对处于静息期的CFs的合成NO也无影响; 但当AngII作用于CFs后, CFs活化表达PAMP特异性受体并抑制NO的合成, 此时, PAMP通过作用于CFs表面PAMP特异性受体, 使合成NO增多。

参考文献:

- [1] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192: 553-60.
- [2] Samson WK. Proadrenomedullin derived peptides[J]. *Front Neuroendocrinol*, 1998, 19: 100-27.
- [3] Tanenao E. A review of the biological properties and clinical implication of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilation peptides[J]. *Peptides*, 2001, 22: 1693-711.
- [4] Wang D, Yu X, Cohen RA, et al. Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II - induced epidermal growth factor receptor phosphorylation and intracellular Ca^{2+} levels[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(16): 12223-30.
- [5] Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease. A unifying hypothesis[J]. *Hypertension*, 2001, 37: 1047-52.
- [6] Yan DH, Cheng XS, Wang XM, et al. Effects of nitric oxide deficiency on hypertension and cardiovascular remodeling[J]. *Chin J Hypertens*, 2000, 8(4): 349-54.
- [7] Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease. A unifying hypothesis[J]. *Hypertension*, 2001, 37: 1047-52.
- [8] 杜昕, 戴闰柱, 冯宗忱. 血管紧张素II对培养的心脏成纤维细胞胶原代谢和分裂增殖的影响[J]. *心脏杂志*, 2003, 15(2): 318-20.
- Du X, Dai GZ, Fen ZC. Effects of angiotensin II on collagen metabolism and proliferation activity of cultured cardiac fibroblasts[J]. *Chin Heart J*, 2003, 15(2): 318-20.
- [9] 沈武忠, 高广道, 刘健, 等. Ang II对成年大鼠心肌成纤维细胞分泌ET-1、NO 功能的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(9): 1050-2.
- Shen WZ, Gao GD, Liu J, et al. Effects of angiotensin II on ET-1, NO secreted from rat cardiac fibroblasts[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2002, 18(9): 1050-2.
- [10] Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al. Secretion of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide from cultured neonatal rat cardiac cells[J]. *Life Sci*, 2001, 69: 239-45.
- [11] Schmermund A, Lerman LO, Ritman EL, et al. Cardiac production of angiotensin II and its pharmacological inhibition: effects on the coronary circulation[J]. *Mayo Clin Proc*, 1999, 74(5): 503-13.