

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

薛世荣¹, 李志樑¹, 徐春生¹, 严全能¹, 江海龙¹, 吴宏超¹, 唐朝枢²(¹南方医科大学珠江医院心内科, 广东 广州 510282; ²北京大学心血管病研究所, 北京 100037)

摘要:目的 探讨肾上腺髓质素原 N 端 20 肽(PAMP)对血管紧张素 II 刺激心肌成纤维细胞(CFs)生成 NO 的影响及意义。方法 采用胰酶消化、差速贴壁法培养新生 SD 大鼠 CFs,以硝酸还原法测定细胞培养液中 NO 的浓度,分别观察不同浓度 AngII、PAMP、及 AngII+PAMP 对 CFs 生成 NO 的影响。结果 (1) 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 ($P<0.01$)。 (2) 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 ($P>0.05$)。 (3) 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 ($P<0.01$)。结论 随 Ang II 浓度增加可显著抑制 CFs 分泌 NO, 而 PAMP 对 CFS 合成 NO 无明显影响, 但 PAMP 与 AngII 共同培养时, 随 PAMP 浓度增加, NO 的合成呈依从性增多。

关键词:肾上腺髓质素 N 端 20 肽; 血管紧张素 II 心肌成纤维细胞; 一氧化氮

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)07-0936-03

Effects of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide on angiotensin II-induced NO production in rat cardiac fibroblasts

XUE Shi-rong¹, LI Zhi-liang¹, XU Chun-sheng¹, YAN Quan-eng¹, JIANG Hai-long¹, WU Hong-chao¹, TANG Chao-shu²

¹Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Institute of Cardiovascular Diseases, Beijing University, Beijing 100037, China

Abstract: Objective To explore the effects of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) on nitric oxide (NO) production in rat cardiac fibroblasts (CFs) induced by angiotensin II (AngII) stimulation. **Methods** Neonatal SD rat CFs isolated by trypsin digestion were cultured and stimulated with PAMP, AngII or their combination, and NO production in the CFs in response to the treatments was measured by nitric acid reductase method. **Results** NO levels in the cell culture treated with 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , and 1×10^6 $\mu\text{mol/L}$ AngII were 73.88±2.23, 64.34±3.02, 54.12±2.82, and 40.21±1.45 $\mu\text{mol/L}$, respectively, showing significant differences between the groups ($P<0.01$), whereas treatment of the cells with 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , and 1×10^6 $\mu\text{mol/L}$ PAMP did not result in significant variation in NO production (74.40±3.42, 74.91±2.66, 75.77±3.31, and 74.23±2.43 $\mu\text{mol/L}$, respectively) in comparison with that of the blank control group (74.57±2.49 $\mu\text{mol/L}$, $P>0.05$). Combined treatments with 1×10^7 $\mu\text{mol/L}$ AngII and PAMP at 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , and 1×10^6 $\mu\text{mol/L}$ PAMP caused significant increment of NO production (66.15±2.95, 80.58±3.77, 88.67±1.46, and 96.22±2.96 $\mu\text{mol/L}$, respectively, $P<0.01$) in a PAMP dose-dependent manner, suggesting the abolishment of AngII-induced enhancement of NO production in the CFs by PAMP. **Conclusion** PAMP increases NO production in the CFs in the presence of AngII but it does not induce significant changes in NO production when used alone.

Key words: proadrenomedullin N-terminal 20 peptide; angiotensin II; nitric oxide; cardiac fibroblasts

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

收稿日期: 2005-03-14

基金项目: 973 国家重大基础发展研究项目(G20000569); 心血管活性物质功能多样性(G2000056905)

Supported by the 973 National Grand Development and Research Foundation of China (G20000569), Functional Diversity of Cardiac Active Materials (G2000056905)

作者简介: 薛世荣(1974-), 男, 在读硕士, 医师, 电话: 020-33077589, E-mail: xue9999@126.com

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^[4-6]。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、10⁻⁶ mol/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 检验,统计软件用 SPSS10.0。

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 μmol/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) μmol/L,各组之间有显著性差异 (P < 0.001)。但空白组与 10⁻⁹ μmol/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

Group	NO (μmol/L)
Blank	74.57 ± 2.49
10 ⁻⁹ mol/L AngII	73.88 ± 2.23 [#]
10 ⁻⁸ mol/L AngII	64.34 ± 3.02 [*]
10 ⁻⁷ mol/L AngII	54.12 ± 2.82 ^{**}
10 ⁻⁶ mol/L AngII	40.21 ± 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 μmol/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 μmol/L,而空白组为 74.57 ± 2.49 μmol/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, Mean ± SD)

Group	NO (μmol/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 μmol/L AngII+ (10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ μmol/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) μmol/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)。

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

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±SD)

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

F=61.08, P<0.001; *P=0.000 vs 10⁻⁷ mol/ L AngII; **P=0.000 vs 10⁻⁷ mol/ L AngII+10⁻⁹ mol/ L PAMP; ***P=0.000 vs 10⁻⁷ mol/ L AngII+10⁻⁸ mol/ L PAMP; ****P=0.0008 vs 10⁻⁷ mol/ L AngII+10⁻⁷ mol/ L PAMP (SNK method)

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 Ca²⁺ levels[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(16): 12223-30.
- [5] Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease. Aunifying 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.