

血管紧张素 II 对大鼠 HSC 合成 PAI-I 的影响及 NO 的干预作用

张 晶, 李定国, 尤汉宁, 刘清华, 宗春华, 陆汉明

张晶, 李定国, 尤汉宁, 刘清华, 宗春华, 陆汉明, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
 项目负责人: 张晶, 200092, 上海市, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科.
 电话: 021-65790000-5316 传真: 021-55571294
 收稿日期: 2002-12-28 接受日期: 2003-03-21

摘要

目的: 明确血管紧张素 II (AngII) 对大鼠肝星形细胞(HSC)细胞外基质降解的影响以及一氧化氮(NO)对其的干预作用。

方法: 采用原位酶灌注法分离培养 HSC, 发色底物法测定纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-I) 活性, 硝酸还原酶法测定 NO 浓度; 采用半定量 RT-PCR 法检测 PAI-I mRNA 的表达。

结果: AngII 能剂量依赖性地促进 HSC 合成和释放 PAI-I, NO、依那普利和氯沙坦均能减弱这种作用。

结论: AngII 能通过 I 型受体抑制细胞外基质降解, NO 可以拮抗这种作用。促进细胞外基质代谢是依那普利和氯沙坦抑制肝纤维化的机制之一。

张晶, 李定国, 尤汉宁, 刘清华, 宗春华, 陆汉明. 血管紧张素 II 对大鼠 HSC 合成 PAI-I 的影响及 NO 的干预作用. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1807-1808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1807.asp>

0 引言

近年来研究证实, 肝纤维化的关键细胞 - 肝星形细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 能表达血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的 I 型受体 (AngII receptor type I, AT1R), 并且外源性 AngII 能促进其分裂增生和合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)^[1]. 为进一步明确 AngII 与 ECM 代谢的关系, 本实验对 Ang II 与纤溶酶原激活物抑制物-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-I, 为肝纤维化过程中抑制 ECM 代谢的主要物质之一) 之间的关系进行了初步研究, 并观察了依那普利 (enalapril, Ena, 为血管紧张素转换酶抑制剂) 和氯沙坦 (losartan, Los, 为 AT1R 拮抗剂) 及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 对 AngII 功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 从成年 SD 大鼠肝脏中采用原位酶灌注法分离 HSC, 以 $2 \times 10^5/cm^2$ 接种于培养瓶中, 于 5% CO₂ 37 °C 恒温孵育箱中培养。

1.2 方法 将传代的 HSC 以 $2 \times 10^5/ml$ 接种于 24 孔培养板, 待细胞接近长满时, 换用无血清培养基。24 h 后分别加入不同浓度的药物进行干预 (详见结果部分), 孵育 24 h 后采集上清液冻存备用。每个条件设 3 复孔,

取平均值。采用发色底物法测定 PAI-I 活性, 采用硝酸还原酶法测定 NO 含量。采用 RT-PCR 法检测 PAI-I mRNA 表达。

统计学处理 采用 SAS 软件包进行统计学分析, 多组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 AngII 对 HSC 上清液中 PAI-I 活性影响及药物干预的作用 AngII 以剂量依赖的方式促进 PAI-I 合成和分泌, 这种作用可被 Ena 减弱, 也可被 $10^{-6}mol/L$ Los 完全阻断, 说明 AngII 通过 AT1R 影响 PAI-I 合成 (图 1)。

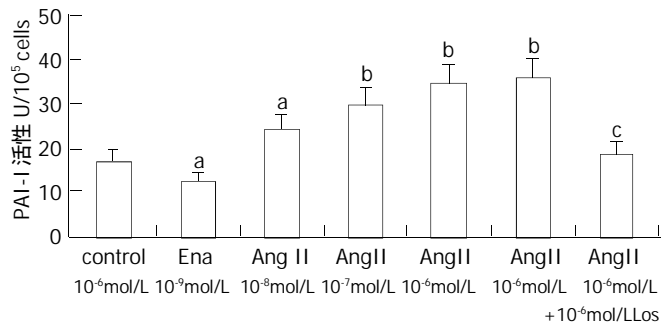


图 1 AngII 对 HSC 上清液中 PAI-I 活性影响及药物的干预作用。*P < 0.05, ^aP < 0.01, vs 对照组; ^cP < 0.01 vs 应用 Los 前。

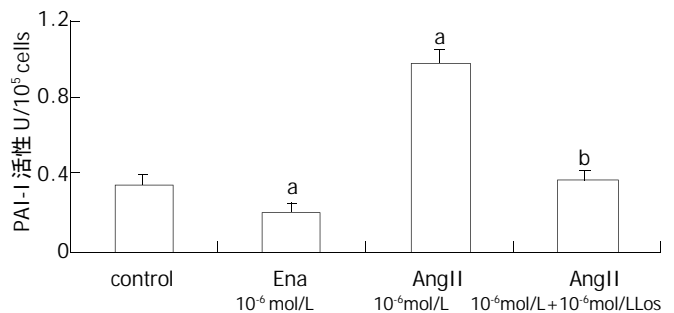


图 2 AngII 对 HSC 表达 PAI-I mRNA 的影响及药物干预作用。*P < 0.05, ^aP < 0.01, vs 对照组; ^bP < 0.01 vs 应用 Los 前。

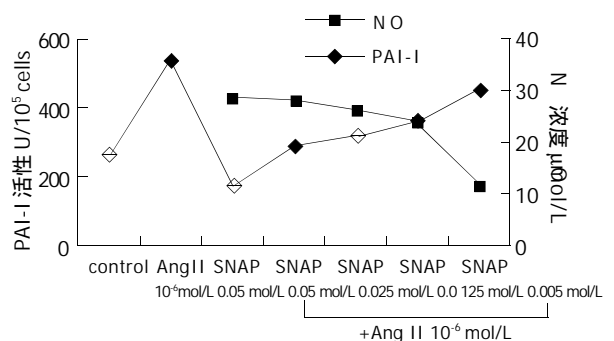


图 3 不同浓度 NO 对 AngII 促进 PAI-I 合成的影响。*P < 0.01, vs 对照组; ^bP < 0.01, vs 应用 Los 前。

2.2 AngII对HSC表达PAI-I mRNA的影响及药物干预作用 在正常HSC中可检测到PAI-I mRNA表达。 10^{-6} mol/L AngII可显著增加PAI-I mRNA表达($P < 0.01$)，Ena和Los可减弱或阻断这种作用(图2)。

2.3 不同浓度NO对AngII促进PAI-I合成的影响 对照孔上清液中未检测到NO。SNAP能剂量依赖性地诱导上清液中NO生成。NO能剂量依赖性地减弱AngII促进PAI-I合成的作用(图3)。

3 讨论

由组织和细胞合成的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS),称为局部RAAS^[2],参与多种组织纤维化过程,应用RAAS抑制剂能延缓纤维化发生^[3]。已经证实,肝纤维化的关键细胞HSC能表达AT1R,外源性AngII能促进HSC分裂增生和合成ECM^[1]。肝纤维化时肝内AngII升高^[4]。多种RAAS抑制剂如依那普利、氯沙坦等具有预防或逆转肝纤维化的作用^[5],说明肝纤维化与局部RAAS密切相关。

PAI-I在HSC表达很强^[6],具有抑制ECM降解,促进肝纤维化发生的作用。本实验结果显示,HSC可合成PAI-I并释放至上清液中,AngII能剂量依赖性地上调PAI-I活性, 10^{-6} mol/L AngII使PAI-I活性上调2.06倍、PAI-I mRNA上调2.8倍。由于PAI-I具有抑制ECM降解的作用,肝纤维化时AngII升高势必增强这种作用,从而使ECM沉积多于降解,加速纤维化发生。Ena能够抑制血管紧张素转换酶活性,抑制HSC合成AngII;Los阻断AngII与AT1R结合,从而促进ECM降解,起到抑制肝纤维化的作用。

NO是强烈的抗肝纤维化因子^[7],并且总是与AngII作用相反。因此,我们观察了在HSC中,NO对AngII作用的影响。由于诱生型NO合成酶在HSC表达极低,

因此我们采用NO供体-SNAP诱导NO合成。从图3可以看出, 10^{-6} mol/L AngII能显著增加PAI-I活性($P < 0.01$),NO使这种促进作用被明显抑制,SNAP浓度越高,NO越多,则抑制作用越强。这说明,在肝纤维化进展中,AngII与NO仍然是作用相反的一对,促进NO合成有助于延缓AngII引起的肝纤维化,而抑制NO则促进肝纤维化发展。这与在自发性高血压大鼠心肌的研究结果相同^[8]。

总之,本实验结果表明,AngII能通过I型受体,以剂量依赖的方式促进HSC合成和分泌PAI-I,抑制ECM降解,促进肝纤维化进展,NO能剂量依赖地抑制AngII对PAI-I合成和分泌的促进作用。促进ECM降解是Ena和Los抗肝纤维化的机制之一。

4 参考文献:

- Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118: 1149-1156
- Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res* 2000; 86:1187-1189
- Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res* 2000;47:1-3
- 张晶,宗春华,李定国,周仁建,杜学亮,周馨,徐芹芳,陆汉明. 肝内肾素-血管紧张素-醛固酮系统与大鼠肝纤维化的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:397-400
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type I receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750
- Knittel T, Fellmer P, Ramadori G. Gene expression and regulation of plasminogen activator inhibitor type I in hepatic stellate cells of rat liver. *Gastroenterology* 1996;111:745-754
- Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocyte and the effect on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995;95:1199-1206
- Hou J, Kato H, Cohen RA, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II-induced cardiac fibrosis in the rat is increased by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1995; 96:2469-2477