

1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙胺基)丙烷盐酸盐 对心脏成纤维细胞胶原 I,III 型 mRNA 表达的影响

郑恒*, 谢辉¹, 方淑贤, 钱家庆²

(同济医院药学部; ¹ 同济医科大学分子生物教研室, ² 药理教研室, 武汉 430030)

摘要 目的:研究去甲肾上腺素(NE)引起心肌肥厚与胶原 I,III 型 mRNA 表达水平之间的关系,及兼具 α_1 受体阻断作用及钙离子拮抗作用的 1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙胺基)丙烷盐酸盐(DDPH)的影响。方法:培养的新生鼠心肌成纤维细胞,加 NE 孵育,胶原 I,III 型 mRNA 表达水平用 RT-PCR 方法测定。结果:心肌成纤维细胞,加 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NE 孵育 24 h,导致胶原 I,III 型表达水平分别增加 10, 3.1 倍,但 DDPH 可使其表达水平显著降低。结论:DDPH 可抑制心肌成纤维细胞胶原 I,III 型 mRNA 的表达。

关键词 I 型胶原; III 型胶原; 成纤维细胞; 去甲肾上腺素; 1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙胺基)丙烷盐酸盐

左室心肌肥厚包括心肌细胞和非心肌细胞肥大和增生,其中心肌成纤维细胞合成胶原增多,胶原堆积心肌纤维化是心室重构的一个重要因素^[1,2]。心室重构过程中,细胞外基质组成成分的基因表达水平发生改变。I,III 型胶原是心肌细胞外基质的基本组成成分,对保持心功能的完整性起着重要作用^[3]。

关于儿茶酚胺类诱导心肌细胞肥大,致 DNA、蛋白质合成增加的报道^[4,5]较多,而研究其刺激心脏成纤维细胞增殖的实验工作则较少。1-(2,6-二甲基苯氧基)-2-(3,4-二甲氧基苯乙胺基)丙烷盐酸盐(DDPH)是中国药科大学设计合成的新化合物,为 α_1 受体阻断剂,并兼具钙离子拮抗作用。现已作为降压药进入临床试验。本实验用体外培养的成纤维细胞,观察 DDPH 对胶原 I,III 亚型 mRNA 表达水平的影响,为进一步研究 DDPH 逆转心肌肥厚提供新的实验依据。

材料与方 法

动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠,出生 2 ~ 4 d,由同济医科大学实验动物中心提供。

药品及仪器 DDPH 由中国药科大学自行合成

和提供,纯度 99.9% 以上,去甲肾上腺素(NE)购自 Fluka 公司。小牛血清、胰蛋白酶和 DMEM/F12 培养基为 Gibco 产品;RNA 酶抑制剂(ribonuclease inhibitor, RNasin)、AMV 逆转录酶、Taq 酶和 dNTP 均为 Promega 公司产品;胶原 I,III 亚型及 β -actin 3 对引物为西安美联公司合成。低温离心机为 Universal 公司产品,PCR 仪为 Perkin Elmer 公司产品,紫外凝胶成像系统为 UVP 公司产品。

体外乳鼠心肌成纤维细胞的原代培养 无菌条件下,取出生 1 ~ 3 d SD 大鼠心室,置于 D-Hanks 液中剪碎,用 0.08% 胰蛋白酶在磁力搅拌下分散细胞,温度控制在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$,每 10 min 收集一次细胞,反复 5 次,将离心后所得分离细胞置于含有 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基中,在二氧化碳培养箱中孵育,用时差法将成纤维细胞与心肌细胞分离。

药物刺激 将培养 3 d 的成纤维细胞换无血清培养基,加不同药物。实验分组:(1) 对照组:换无血清培养基继续培养;(2) 换无血清培养基添加 NE $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;(3) 换无血清培养基添加 NE $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + DDPH $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;继续培养 24 h。

培养细胞总 RNA 制备 (1) 收获细胞用 3 ~ 5 mL 细胞裂解液(D 液)溶解,移于 10 mL 离心管,再加入等量(3 ~ 5 mL)苯酚溶液,1/10 量乙酸钠,1/5 量氯仿-异戊醇(49:1)混合液,振摇 10 s,置冰浴 15 min。4 $^\circ\text{C}$ 离心,10 000 $\times g$,20 min。(2) 吸上层水相至新的离心管中,加等体积异戊醇,混匀,-20 $^\circ\text{C}$ 沉

收稿日期:1999-06-15

* Tel: (027) 83662498, Fax: (027) 82906781,

E-mail: hmwang@tjh.tjmu.edu.cn

淀 1 h 以上。4℃离心, 10 000 × g, 20 min。(3) 弃上清液, 沉淀物溶解于 0.5 mL D 液中, 移至 1.5 mL Eppendorf 管中, 加等体积异戊醇, 混匀, -20℃, 再次沉淀 1 h 以上。4℃离心, 10 000 × g, 20 min。(4) 弃上清液, 沉淀物用 200 μL TES 溶液溶解, 加 20 μL 乙酸钠(2 mol·L⁻¹), 双倍体积(440 μL) 无水乙醇, 摇匀, 置 -80℃ 冰箱, 20 ~ 30 min。4℃离心, 10 000 × g, 20 min。(5) 弃上清液, 沉淀(RNA) 经真空干燥, 溶于 20 ~ 50 μL DEPC 水中, 置 -80℃ 冰

箱, 待用。(6) RNA 浓度定量, 用分光光度法测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度(A), 在 260 nm 的读数用于计算样品中的核酸浓度, A 值为 1 相当于 40 μg·mL⁻¹ 的 RNA。

RT-PCR 引物 按文献^[6]设计 collagen(Co) I 及 Co III 引物, Co I 引物区域定位于外显子 1 和 2, Co III 引物区域定位于外显子 3 和 4。引物序列见表 1。

Tab 1 Oligonucleotide sequences of 5' and 3' primers used for RT-PCR

mRNA	5' Primer	3' Primer	Product(bp)
Collagen I	5' GGCGGCCAGGGCTCCGACCC3'	5' AATTCCTGGTCTGGGGCACC3'	347
Collagen III	5' TGGTGTGGAGCCGCTGCCA3'	5' CTCAGCACTAGAATCTGTCC3'	376

bp = base pairs.

RT-PCR 定量 以 β-actin 为内对照, 用相同 mRNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 对扩增产物进行半定量。β-actin 引物序列^[7](上游引物: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', 下游引物:

5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3')。

RT-PCR 反应 (1) cDNA 第 1 链的合成: 反应体积为 20 μL, 成分如下: 样品总 RNA 或 mRNA 4 μg, 5 × 逆转录酶缓冲液 4 μL, AMV 逆转录酶 20 U, RNasin 20 U, dNTPs 2 μL, 下游引物 50 pmol, 去离子水补至 20 μL。42℃ 反应 30 ~ 60 min, 95℃ 灭活逆转录酶 10 min。(2) PCR: 上述逆转录产物 20 μL, 10 × PCR 反应液 5 μL, 上游引物 50 pmol, Taq 酶 2.5 U, 去离子水补至 50 μL, 在适当温度下扩增 30 个循环。应用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物, 用 UVP 公司透射扫描仪对琼脂糖凝胶电泳 RT-PCR 产物进行峰体积定量测定。

统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验进行统计学分析。

结 果

1 DDPH 对成纤维细胞 Collagen III mRNA 表达水平的影响

由表 2 可见, NE 1 μmol·L⁻¹ 孵育成纤维细胞 24 h, Co III mRNA RT-PCR 产物 Co III/β-actin 比值为对照组成纤维细胞 RT-PCR 产物 Co III/β-actin 比值的 3.1 倍; DDPH 组 Co III mRNA 表达水平降

低为 NE 1 组的 54.5%; 提示 NE 1 μmol·L⁻¹ 刺激成纤维细胞 Co III mRNA 表达水平显著增加, 此作用可被 DDPH 部分拮抗。

Tab 2 Effects of 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-(3,4-dimethoxyphenylethylamino) propane hydrochloride (DDPH) on the expression level of Collagen(Co) III mRNA in cultured rat cardiac fibroblasts

Group	Volume/ μmol		Co III/β-actin (10 ⁻¹)
	Co III(10 ³)	β-Actin(10 ⁴)	
Control	14.9 ± 1.8 [#]	11 ± 3	1.4 ± 0.2 [#]
NE 1	47 ± 4 ^{**}	10.6 ± 2.9	4.4 ± 0.3 ^{**}
NE 1 + DDPH 3	24.8 ± 1.6 [#]	10.2 ± 1.1	2.4 ± 0.2 [#]

$\bar{x} \pm s$, *n* = 5. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 compared with control; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 compared with NE.

结果如图 1 所示, 第 1 栏为 PBR 322/MSPI 分子量参照, 第 2 栏为对照组, 第 3 栏为刺激剂 NE 组, 第 4 栏为 NE + DDPH 3 μmol·L⁻¹ 组。结果提示 DDPH 在浓度为 3 μmol·L⁻¹ 下能明显抑制 NE 诱导的乳鼠成纤维细胞 Co III mRNA 的表达。

2 DDPH 对成纤维细胞 Co I mRNA 表达水平的影响

NE 1 μmol·L⁻¹ 孵育成纤维细胞 24 h, Co I mRNA RT-PCR 产物 Co I/β-actin 比值为对照组成纤维细胞 RT-PCR 产物 Co I/β-actin 比值的 10 倍; DDPH 组 Co I mRNA 表达水平降低为 NE 1 组的 23.3%; 提示 NE 1 μmol·L⁻¹ 刺激成纤维细胞 Co I mRNA 表达水平显著增加, 此作用可被 DDPH 部分

拮抗。见表 3。

结果如图 2 所示,第 1 栏为 PBR 322/ MSP1 分子量参照,第 2 栏为对照组,第 3 栏为刺激剂 NE

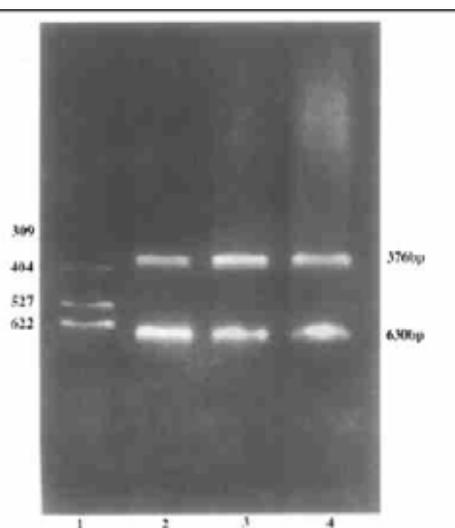


Fig 1 Effect of DDPH on expression of Co III mRNA in cultured rat cardiac fibroblasts treated for 24 h with norepinephrine (NE) or NE + DDPH. Co III and β -actin RT-PCR were carried out under the same conditions. cDNA template from RT reaction was PCR amplified for 30 cycles. Amplification of Co III and β -actin cDNA yielded 376-bp and 630-bp fragments, respectively. Lane 1: PBR322/ MSP1 molecular weight marker; Lane 2: control group; Lane 3: NE $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; Lane 4: NE $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + DDPH $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

Tab 3 Effects of DDPH on the expression level of Co I mRNA in cultured rat cardiac fibroblasts

Group	Volume/ μmol		Co I/ β actin (10^{-2})
	Co I	β Actin(10^2)	
Control	$145 \pm 10^{##}$	101 ± 2.0	$1.4 \pm 0.2^{##}$
NE 1	$1470 \pm 73^{**}$	102 ± 2.0	$14.4 \pm 2.0^{**}$
NE 1 + DDPH 3	$342 \pm 14^{##}$	108 ± 6.8	$3.2 \pm 0.4^{##}$

$\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control; ## $P < 0.01$ compared with NE.

讨 论

NE 通过激动肾上腺素受体,致心肌细胞肥大和成纤维细胞增殖,胚胎型基因表达水平升高^[8]。关于肾上腺素受体调控心肌细胞肥大和成纤维细胞增殖的信号转导途径尚未完全清楚。最近 Autelitano 等^[9]实验证实, α_1 -肾上腺素受体不仅可激动鸟苷酸调节蛋白(G_q protein)联结受体,还可通

组,第 4 栏为 NE + DDPH $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。提示 DDPH 在浓度为 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下能明显抑制 NE 诱导的乳鼠成纤维细胞 Co I mRNA 的表达。

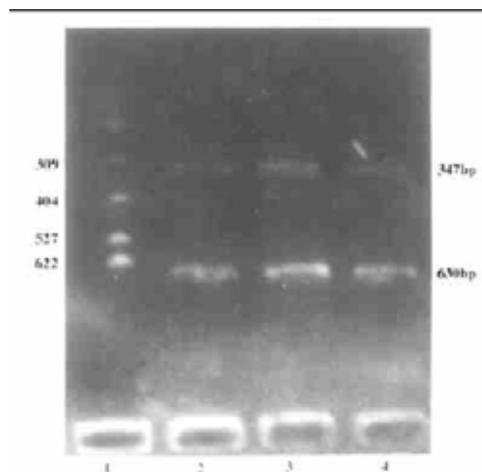


Fig 2 Effect of DDPH on expression of Co I mRNA in cultured rat cardiac fibroblasts treated for 24 h with NE or NE + DDPH. Co I and β -actin RT-PCR were carried out under the same conditions. cDNA template from RT reaction was PCR amplified for 30 cycles. Amplification of Co I and β -actin cDNA yielded 347-bp and 630-bp fragments, respectively. Lane 1: PBR322/ MSP1 molecular weight marker; Lane 2: control group; Lane 3: NE $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; Lane 4: NE $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + DDPH $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

过激动 Ras-依赖激活的丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAK) 和细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 以及 MAK 激酶 (mitogen-activated protein kinase)-依赖激活 c-Jun NH-末端激酶 (c-jun aminoterminal kinase, JNK)。提示 MAP 激酶超级家族的多个成员参与心肌细胞肥大的信号转导。

Brijesh 等^[10]报道,大鼠 iv NE, 胶原、TGF β_1 表达水平显著增加,此作用可被 α 肾上腺素受体阻断剂酚妥拉明适度阻滞,而 β 肾上腺素受体阻断剂普萘洛尔抑制胶原、TGF β_1 表达水平的作用更强。提示激活 α, β 肾上腺素受体的信号转导途径可调控胶原、TGF β_1 表达水平。

本实验证实 DDPH 可显著抑制 NE 引起的体外培养的心肌成纤维细胞 Co I, III mRNA 表达水平的增加。因 DDPH 兼具 α_1 受体阻断作用及钙通道阻滞作用,既可直接阻滞 L-型钙通道的钙电流,也

可通过阻滞作为信号转导系统中间环节第二信使钙的升高来阻断引起心肌成纤维细胞增殖的信号转导途径。DDPH对引起心肌成纤维细胞增殖的MAP激酶系统的作用有待进一步确认。

参 考 文 献

- Dixon IM, Ju H, Reid NL, *et al.* Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and effect of losartan. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**: 1837
- Ju H, Zhao S, Jassal DS, *et al.* Effect of AT₁ receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 1997, **35**: 223
- Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, *et al.* Changes in gene expression in the intact human heart. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 2315
- Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, *et al.* Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 812
- Reinecke H, Vetter R, Drexler H. Effects of α -adrenergic stimulation on the sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺-exchanger in adult rat ventricular cardiocytes. *Cardiovasc Res*, 1997, **36**: 216
- Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, *et al.* Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res*, 1998, **37**: 123
- Jen ZY, Gregory PB, Michael FA, *et al.* Serum from patients with chronic renal insufficiency alters growth characteristics and ANP mRNA expression of adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**: 2429
- Lanza GM, Scott MJ, Davison G, *et al.* Angiotensin II receptor blockade in Syrian hamster (TO-2) cardiomyopathy does not affect microscopic cardiac material properties: implications for mechanisms of tissue remodeling. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997, **11**: 521
- Autelitano DJ, Woodcock EA. Selective activation of α_{1A} -adrenergic receptors in neonatal cardiac myocytes is sufficient to cause hypertrophy and differential regulation of α_1 -adrenergic receptor subtype mRNA. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30**: 1515
- Brijesh B, Mahboubeh E. Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment. *Am J Pathol*, 1991, **139**: 1131

EFFECT OF 1-(2,6-DIMETHYLPHENOXY)-2-(3,4-DIMETHOXYPHENYL-ETHYLAMINO) PROPANE HYDROCHLORIDE ON EXPRESSION OF COLLAGEN TYPE I AND TYPE III mRNA IN CULTURED CARDIAC FIBROBLASTS

Zheng Heng, Xie Hui¹, Fang Shuxian and Qian Jiaqing²

(Department of Pharmaceutics, Tongji Hospital; ¹Department of Molecular Biology; ²Department of Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

ABSTRACT **AIM:** The collagen subtypes I (Co I) and III (Co III) are essential components of the cardiac extracellular matrix (ECM) in maintaining the functional integrity of the heart. The aim of the present study was to investigate whether norepinephrine stimulation known to induce cardiac hypertrophy might be involved in the regulation of the Co I and Co III mRNA expression, and effects of 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-(3,4-dimethoxyphenylethylamino) propane hydrochloride (DDPH) on expression of Co I and Co III mRNA. **METHODS:** Neonatal rat cardiac fibroblasts were prepared from Sprague-Dawley rats (1 ~ 3 d after birth). Norepinephrine was used as hyperplastic agent, Co I, Co III and mRNA expression were measured by RT-PCR. **RESULTS:** Stimulation of neonatal rat cardiac fibroblasts with 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ norepinephrine for 24 h resulted in a significant increase of the Co I mRNA (10 fold) and Co III mRNA (3.1 fold). The changes on the expression level were blocked by the DDPH. **CONCLUSION:** The data demonstrate that the Co I and Co III mRNA levels were up-regulated by the activation of the adrenergic signal transduction pathway and DDPH was shown to decrease the expression levels of Co I and Co III mRNA.

KEY WORDS collagen I; collagen III; cardiac fibroblasts; norepinephrine; 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-(3,4-dimethoxyphenylethylamino) propane hydrochloride