

ACE、AT1受体及TGF-β1在肌营养不良中的表达

孙桂莲, 江雅静, 姜伟, 杨志亮

(中国医科大学附属第一医院儿科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的:探讨肾素-血管紧张素系统(RAS)和转化生长因子β1(TGF-β1)在肌营养不良(MD)中的表达及与肌肉纤维化的关系。方法:应用Western印迹分析和三免疫荧光标记检测杜氏肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良(BMD)和先天性肌营养不良(CMD)患者肌肉活检标本中血管紧张素转移酶(ACE)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)1型(AT1)受体和TGF-β1的表达及共同定位。结果:Western印迹分析结果显示在MD的萎缩肌肉中ACE、AT1受体和TGF-β1的免疫反应明显增强;三免疫荧光标记显示DMD和CMD肌肉的肌内膜和肌束膜中大多数激活的成纤维细胞表达ACE和TGF-β1,ACE和TGF-β1在萎缩肌肉内也共同定位。结论:病变局部ACE、AT1受体和TGF-β1表达增加,表明肌肉组织中RAS在MD时被激活,可能与TGF-β1共同参与MD的发病,并在肌肉纤维化中起重要作用。

[关键词] 血管紧张素转移酶;血管紧张素Ⅱ;肌营养不良;血管紧张素受体;转化生长因子β1

[中图分类号] R72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)06-0709-03

Expression of tissue ACE, AT1 receptor and TGF-β1 in muscular dystrophy

SUN Gui-lian, JIANG Ya-jing, JIANG Wei, YANG Zhi-liang

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the contributive role of the muscle rennin-angiotensin system (RAS) and transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) in the muscular dystrophy (MD) and relationship with muscle fibrosis. **Methods:** The expression and cellular localization of angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II (Ang II) type 1 (AT1) receptor and TGF-β1 protein were determined in biopsied frozen muscle from patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD), Becker muscular dystrophy (BMD), congenital muscular dystrophy (CMD) by triple immunofluorescence and Western Blot analysis. **Results:** The immunoreactivity was distinctly increased in MD for ACE, AT1 receptor and TGF-β1. Triple immunolabeling revealed that most activated fibroblasts in endomysium and perimysium of DMD and CMD muscles were positive for ACE and TGF-β1, and ACE was colocalized primarily with TGF-β1. **Conclusion:** Increased local ACE and AT1 receptor expression shows that muscular tissue RAS is activated in muscular dystrophy, which could play a role in the pathogenesis of MD together with TGF-β1, ACE and TGF-β1 may be important for muscle fibrosis.

[Key words] angiotensin-converting enzyme; angiotensin II; muscular dystrophy; angiotensin receptor; transforming growth factor-beta1

肌肉中肌纤维变性-再生, 伴随异常的结缔组织增生为肌营养不良(muscular dystrophy, MD)的一个特征。已知抗肌萎缩蛋白基因(*dystrophin*)和肌纤维膜下蛋白缺乏为肌纤维变性的原因, 但间质纤维化的发病机制仍不十分清楚。血管紧张素转移酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)中的能使无活性的前体血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I)生成有活性的血管紧张素 II (Ang II)的关键酶。Ang II的作用至少由2个受体亚型介导, 分别为1型受体(AT1)和2型受体(AT2)。Ang II的大多数作用都是由AT1受体介导的。近来的研究表明组织ACE的激活或RAS的过度活动参与了心脏纤

维化、肝纤维化、肾间质纤维化和肺纤维化等的病理生理过程。转化生长因子β1(transforming growth factor-beta1, TGF-β1)在纤维性疾病, 如肝硬化、肾小球肾炎、肺纤维化、瘢痕瘤和慢性胰腺炎中介导细胞外基质的合成和积累。TGF-β1可能也参与MD的发病, 但作为生长因子的血管紧张素肽在MD中的作用及与TGF-β1的相互作用关系尚未见报道, 本文应用免疫荧光标记法及Western印迹分析研究MD患者肌肉活检标本中ACE、AT1受体和TGF-β1的表达及与肌肉纤维化的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

25例患者的肌肉活检标本(日本东北大学医学部附属病院儿科, 1986年至2000年收治), 其中杜氏肌营养不良(DMD)9例; 先天性肌营养不良(CMD)7例(男4例, 女3例), 其中福山型CMD

[基金项目] 教育部留学归国人员科研启动基金资助项目(2005383);
 笹川医学奖学金同学会科研启动基金资助项目(095)

[作者简介] 孙桂莲(1963-), 女, 教授, 博士。

(FCMD)4 例、merosin 阳性 CMD 3 例;Becker 型肌营养不良(BMD)3 例;6 例患者疑似 MD,但肌肉组织化学等检查正常,做为正常对照标本。诊断全部基于临床、试验室检查、肌肉组织化学检查,dystrophin 和 merosin 免疫组织化学检查及 *dystrophin* 基因复杂性 PCR 检查,诊断标准见第 7 版儿科学^[1]。

1.2 方法

1.2.1 三免疫荧光法:测定 ACE 和 TGF-β1 蛋白的免疫组织化学定位及与肌肉纤维化的关系,使用三免疫荧光染色共同定位羊抗人 ACE 多克隆抗体(Chemicon International Inc.,1:100)和兔抗人 TGF-β1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz,1:100)与用于识别成纤维细胞的胶原合成标记,多聚-4-强化酶(P-4-H)(丹麦 Dako,1:100)。测定方法见文献[2]。

1.2.2 Western 印迹分析:依照常规方法提取蛋白,采用 SDS-PAGE 方法分离蛋白,电泳,转膜(PVDF 膜)。封闭后加入特异性的 ACE、AT1 和 TGF-β1 多克隆抗体,再用 HRP 驴抗羊或抗兔 IgG 作为第二抗体。免疫反应结果用 ECL 化学发光法显色。

2 结果

2.1 Western 印迹分析检测正常和 MD 时 ACE、AT1 受体和 TGF-β1 抗体的表达

借助于 Western 印迹分析法分析 ACE、AT1 受体和 TGF-β1 抗体蛋白的表达,结果显示在多数 MD 的萎缩肌肉中,ACE、AT1 受体和 TGF-β1 的免疫反应明显增强。图 1~3 显示正常和各种 MD 患者肌肉中典型的 ACE、AT1 和 TGF-β1 抗体蛋白的表达结果。Western 印迹分析显示了一个 140 kDa 的 ACE 带,50 kD 的 AT1 带和 12.5 kDa 的 TGF-β1 带。正常肌肉中 ACE 为弱表达,相比之下 BMD、CMD 和 DMD 表达增强,但 FCMD 无增强(图 1);正常肌肉中 AT1 为弱表达,相比之下 FCMD、CMD、BMD 和 DMD 表达增强,以 CMD 为最强(图 2);正常肌肉中

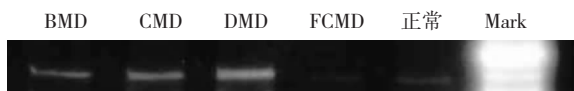


图 1 为 ACE 的 Western 印迹分析结果
Fig.1 Western blot analysis of ACE

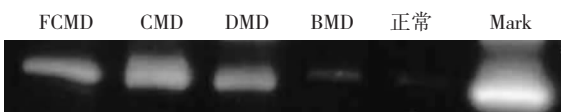


图 2 AT1 的 Western 印迹分析结果
Fig.2 Western blot analysis of AT1

TGF-β1 为弱表达,相比之下 FCMD、CMD、BMD 和 DMD 表达均增强(图 3)。

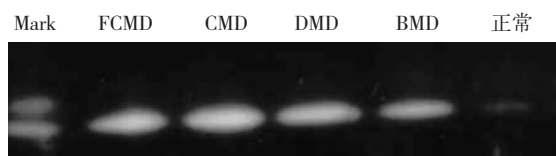


图 3 TGF-β1 的 Western 印迹分析结果
Fig.3 Western blot analysis of TGF-β1

2.2 ACE、TGF-β1 抗体与 P-4-H 抗体的三免疫荧光标记结果

荧光标记结果见图 4~7,三免疫荧光标记结果显示 DMD 肌肉中 ACE 和 TGF-β1 均在血管、再生纤维、炎症细胞和炎症细胞浸润的部位、肌内膜及肌束膜的结缔组织中强烈表达;萎缩肌肉标本中 P-4-H 免疫阳性的成纤维细胞上 ACE 和 TGF-β1 抗体也阳性,三者共同定位于血管、炎症细胞和再生纤维中。

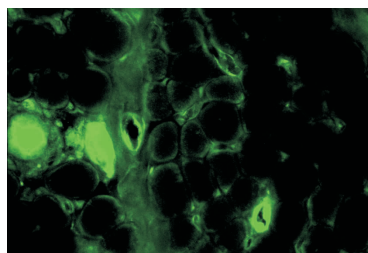


图 4 DMD 肌肉中 ACE 免疫荧光标记呈绿色 ×400

Fig.4 ACE immunolabeling of muscle from patients with DMD ×400

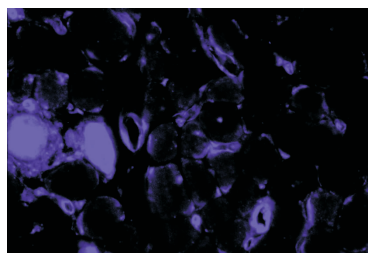


图 5 DMD 肌肉中 TGF-β1 免疫荧光标记呈紫色 ×400

Fig.5 TGF-β1 immunolabeling of muscle from patients with DMD ×400

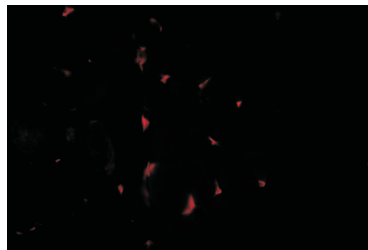


图 6 DMD 肌肉中 P-4-H 免疫荧光标记呈红色 ×400

Fig.6 P-4-H immunolabeling of muscle from patients with DMD ×400

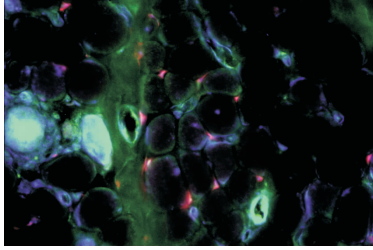


图7 DMD肌肉中三免疫荧光标记结果呈淡蓝色 $\times 400$

Fig.7 Triple immunolabeling of muscle from patients with DMD $\times 400$

3 讨论

以往认为RAS的作用主要是在血液动力学方面,最近学者们把注意力集中在RAS的局部增生作用上。关于Ang II促进纤维组织形成机制的研究已有许多报道,体外研究显示Ang II刺激了成纤维细胞胶原合成和修复组织中纤维形成的介导剂TGF- β 1的表达^[3],已知TGF- β 1参与了许多纤维性疾病的发病,包括DMD^[4]。很多细胞分泌潜在形式的TGF- β 1,被激活后具有生物活性,成为成熟的TGF- β 1^[3],体内潜在形式TGF- β 1被激活的机制不清,Ang II可能参与了上调TGF- β 1基因表达及体内潜伏形式TGF- β 1转化为活性形式的过程^[5]。有研究表明RAS水平增加可调节生长因子和细胞因子的表达,如TGF- β 1、肿瘤坏死因子 α 、血管细胞黏附分子1、核因子 κ B、血小板源生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素样生长因子,这些因子大多数都能促进细胞生长和纤维化。

本研究采用Western印迹分析及三免疫荧光标记法研究了ACE、AT1受体和TGF- β 1在MD患儿肌肉组织中的免疫表达和共同定位,结果观察到ACE、AT1受体和TGF- β 1在MD中的表达明显增加,表明RAS的激活及TGF- β 1可能与MD的发病有关。肌肉组织中局部Ang II的产生被激活,对于局部血流调节及肌肉组织修复起到旁分泌和自分泌的作用^[6]。有报道TGF- β 1在肌肉再生中为关键的调节剂,损伤肌肉中TGF- β 1的量和位置的变化可明显影响肌纤维的再生和过量纤维生产之间的平衡^[4]。TGF- β 1在DMD病人肌肉中的表达明显高于正常,而且TGF- β 1的表达与肌纤维化的程度和病人的年龄有关^[7,8]。本研究显示TGF- β 1抗体的分布基本与ACE免疫反应的细胞定位一致,萎缩肌肉中TGF- β 1和ACE共同定位和过度表达的作用不详,但最可能导致Ang II产生增多,通过AT1受体反过来作用于这些细胞,上调TGF- β 表达,使体内潜伏

型TGF- β 转化为活性型,因此促进纤维组织形成和/或细胞增生的改变^[5]。

有研究发现Ang II通过增加TGF- β 1表达而导致心脏纤维化,此过程又被AT1受体拮抗剂所阻止^[9]。已知纤维形成的调节过程是复杂的,需要许多细胞因子和生长因子,Ang II系统似乎在纤维形成中起主要驱动作用,对RAS的这些新的理解有重要的临床意义,解释了RAS被ACE抑制剂,新的受体拮抗剂,或两者共同抑制时明显减慢纤维化过程的机制^[10]。总之,ACE、AT1受体和TGF- β 1的功能有待阐明,我们的研究表明肌肉组织RAS在MD中被激活,可能有助于TGF- β 1的激活,从而参与了MD的发生和发展。

参考文献:

- [1] 胡亚美,江载芳.实用儿科学[M].7版,北京:人民卫生出版社,2002:2360.
- [2] 孙桂莲,赵亚娟,姜红堃,等.CTGF和TGF- β 1在进行性肌营养不良中的表达及与肌肉纤维化的关系[J].中国医科大学学报,2006,35(2):187-188.
- [3] BORDER WA,NOBLE NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. N Engl J Med,1994,331(19):1286-1292.
- [4] MURAKAMI N,MCLENNAN IS,NONAKA I,et al. Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders[J]. Muscle Nerve,1999,22(7):889-898.
- [5] TOMITA H,EGASHIRA K,OHARA Y,et al. Early Induction of Transforming Growth Factor- β ; via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats[J]. Hypertension,1998,32(2):273-279.
- [6] WHITEBREAD S,MELE M,KAMBER B,et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes[J]. Biochem Biophys Res Commun,1989,163(1):284-291.
- [7] BERNASCONI P,TORCHIANA E,CONFALOHIERI P,et al. Expression of transforming growth factor beta1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine[J]. J Clin Invest,1995,96(2):1137-1144.
- [8] PASSERINI L,BERNASCONI P,BAGGI F,et al. Mantegazza R. Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy[J]. Neuromuscul Disord,2002,12(9):828-835.
- [9] TOMITA H,EGASHIRA K,OHARA Y, et al. Early induction of transforming growth factor- β via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats[J]. Hypertension,1998,32(2):273-279.
- [10] BORDER WA,NOBLE N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases [J]. Semin Nephrol,2001,21(6):563-572.

[收稿日期] 2007-05-14

(编辑 裴孝琦)