

文章编号:1000-5404(2013)18-1957-04

论著

血管紧张素 II 诱导被动致敏人气道平滑肌细胞合成 I 型胶原

沈彬¹,程远雄¹,李宁²,牛毅¹,谢浩俊¹,霍雅婷¹ (510515 广州,南方医科大学南方医院呼吸内科¹;515031 汕头,广东省汕头市中心医院呼吸内科²)

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 II (Ang II) 及其 I 型受体 (Angiotensin Type 1 Receptor, AT1R) 拮抗剂洛沙坦 (Losartan) 对被动致敏人气道平滑肌细胞 (human airway smooth muscle cells, HASMCs) 合成 I 型胶原的影响。方法 体外培养 HASMCs, 按处理因素将细胞分为 4 组: ①被动致敏组 (10% 哮喘血清); ②被动致敏 + Ang II 组 (10% 哮喘血清 + 10^{-7} mol/L Ang II); ③被动致敏 + Losartan 组 (10% 哮喘血清 + 10^{-6} mol/L Losartan); ④被动致敏 + Ang II + Losartan 组 (10% 哮喘血清 + 10^{-7} mol/L Ang II + 10^{-6} mol/L Losartan)。免疫荧光染色法鉴定 HASMCs, 荧光定量 PCR 检测 I 型胶原 mRNA 表达, ELISA 检测 I 型胶原蛋白分泌。结果 10^{-7} mol/L Ang II 作用于被动致敏的 HASMCs 24 h 后, I 型胶原 mRNA 及蛋白的表达较被动致敏组明显增加 ($P < 0.01$)。在 Losartan 存在的情况下, Ang II 对被动致敏 HASMCs I 型胶原 mRNA 及蛋白表达的促进作用明显受到抑制 ($P < 0.01$)。结论 Ang II 能促进被动致敏的 HASMCs 分泌 I 型胶原, 可能是通过与 AT1R 结合而实现的。

[关键词] 人气道平滑肌细胞; 被动致敏; 血管紧张素 II; I 型胶原

[中图分类号] R322.34; R562.25; R977.6 **[文献标志码]** A

Angiotensin II induces collagen I synthesis in human passively sensitized airway smooth-muscle cells *in vitro*

Shen Bin¹, Cheng Yuanxiong¹, Li Ning², Niu Yi¹, Xie Haojun¹, Huo Yating¹ (¹Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; ²Department of Respiratory Diseases, Shantou Central Hospital, Shantou, Guangdong Province, 515031, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effects of angiotensin (Ang) II and losartan, an antagonist of angiotensin type 1 receptor (AT1R), on the production of collagen type I in human passively sensitized airway smooth muscle cells. **Methods** After human airway smooth muscle cells were isolated from normal bronchial tissue samples, and primarily cultured and identified by immunofluorescence staining of α -actin. The obtained cells were divided into the following 4 groups: ① passively sensitized group: 10% serum from asthmatic patients; ② passively sensitized + Ang II group: 10% serum from asthmatic patients + Ang II (final concentration of 10^{-7} mol/L); ③ passively sensitized + losartan group: 10% serum from asthmatic patients + losartan (final concentration of 10^{-6} mol/L); ④ passively sensitized + Ang II + losartan group: 10% serum from asthmatic patients + Ang II (final concentration of 10^{-7} mol/L) + losartan (final concentration of 10^{-6} mol/L). The effect of Ang II and losartan on the collagen type I mRNA expression in the passively sensitized HASMCs was detected by real-time RT-PCR, and its protein content was analyzed by ELISA. **Results** Compared to control group, the mRNA expression and protein release of collagen type I in Ang II-induced group (10^{-7} mol/L for 24 h) was significantly higher ($P < 0.01$). Losartan treatment produced a significantly inhibitory effect on the expression of mRNA and protein synthesis ($P < 0.01$). **Conclusion** Ang II induces the synthesis of collagen type I by human passively sensitized airway smooth muscle cells, which might be through binding with AT1R.

[通信作者] 程远雄, E-mail: drchengyx@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1251.012.html>(2013-06-25)

[Key words] human airway smooth muscle cells; passively sensitization; angiotensin II; collagen type I

Corresponding author: Cheng Yuanxiang, E-mail: drchengyx@163.com

新近研究^[1]表明,人气道平滑肌细胞(human airway smooth muscle cells, HASMCs)除具收缩和舒张功能外,在哮喘血清等刺激下,尚可向增殖/合成型转换,分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等多种活性介质,参与气道炎症、气道重塑和气道高反应性。I型胶原(collagen type I, COL I)是正常及疾病状态下含量最多的ECM成分,且有体外实验^[2]数据表明, COL I可促进HASMCs增殖。血管紧张素II(Ang II)是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)中的重要效应物质,被普遍认为可激活I型胶原基因转录^[3],研究^[4-5]证实哮喘急性发作时存在循环及肺脏局部RAS系统的激活。我们前期研究发现, Ang II可通过与其I型受体(Angiotensin Type 1 Receptor, AT1R)结合刺激体外培养HASMCs收缩^[6]、增殖^[7], Ang II是否通过与AT1R结合影响被动致敏HASMCs分泌I型胶原,加重气道重塑尚有待证实。本研究以哮喘血清被动致敏HASMCs模拟人哮喘气道平滑肌细胞,观察Ang II及AT1R拮抗剂洛沙坦(Losartan)干预下, I型胶原 $\alpha 1$ (COL I- $\alpha 1$) mRNA及COL I蛋白表达的变化,探讨Ang II在哮喘气道重塑中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

兔抗人 α -actin抗体(武汉博士德公司), Ang II、Losartan(Sigma公司), DMEM、FBS(Gibco公司), DAPI(广州威佳科技有限公司), TRIzol(Invitrogen公司), 人COL I ELISA试剂盒(武汉华美生物技术有限公司), SYBR[®] Premix ExTaq[®]、Prime-Script[®] RT reagent Kit试剂盒(TaKaRa公司), 引物均由Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HASMCs的培养与鉴定 参照文献^[8], 无菌状态下取肺肿瘤肺叶切除患者肿瘤旁远端正常支气管组织, 以组织块贴壁法培养原代HASMCs。待细胞生长融合至85%以上时, 0.25%含EDTA胰酶消化传代。对细胞进行形态学观察, 纯化爬片后行细胞内 α -actin蛋白免疫荧光染色, 95%以上的细胞呈阳性染色, 鉴定为HASMCs。取3~5代用于实验。

1.2.2 哮喘血清制备 实验血清17份, 来自2011-2012年我院就诊的初诊急性发作期哮喘患者, 男性10例, 女性7例, 年龄20~45岁。诊断符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的支气管哮喘的诊断标准^[9], 有过敏史, 近1周来未使用

过糖皮质激素, 排除有其他呼吸系统疾病。静脉采血4~5 mL, 测定血清总IgE $>10^6$ U/L, 分离血清, 灭活, 滤菌备用。

1.2.3 实验分组 将细胞以 $1 \times 10^4/cm^2$ 密度种板培养, 待2~3 d细胞长至85%左右时, 更换孔内液体为无血清培养基, 同步24 h后弃去孔内液体, 按以下分组加入相应试剂: ①被动致敏组: 含10%哮喘血清的DMEM; ②被动致敏+Ang II组: 含10%哮喘血清的DMEM+Ang II(终浓度为 10^{-7} mol/L); ③被动致敏+Losartan组: 含10%哮喘血清的DMEM+Losartan(终浓度为 10^{-6} mol/L); ④被动致敏+Ang II+Losartan组: 含10%哮喘血清的DMEM+Ang II(终浓度为 10^{-7} mol/L)+Losartan(终浓度为 10^{-6} mol/L)。

1.2.4 荧光定量PCR检测COL I- $\alpha 1$ mRNA表达 将HASMCs以 $1 \times 10^4/m^2$ 种于6孔板中, 按实验分组进行药物干预。Trizol一步法提取细胞总RNA, 逆转录酶催化合成cDNA。逆转录反应条件: 37℃变性15 min, 85℃退火5 s。取2 μ L cDNA作为反应模板, 采用SYBR染料法于ABI7500定量PCR仪上行PCR扩增。COL I- $\alpha 1$: 正义链5'-AAGGTGTTGTGCGATGACG-3', 反义链5'-GTTTCTTGCTCGGTGGGTG-3'。GAPDH: 正义链5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAA-3', 反义链5'-TGCTGAAGACGCCAGTGA-3'。反应结束后, 观察扩增曲线及溶解曲线, 以GAPDH为内参照, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算COL I- $\alpha 1$ mRNA的相对含量。

1.2.5 ELISA检测细胞培养上清中COL I蛋白水平 将HASMCs以 $1 \times 10^4/cm^2$ 种于96孔板中, 按实验分组分别加入不同的干预药物, Losartan在Ang II之前30 min加入。收集培养液, 离心后按ELISA试剂盒标准方案检测COL I的浓度。主要步骤如下: 加入标准品和待测样品后37℃孵育120 min, 洗板。再加入孵育液37℃孵育60 min, 洗板。加入显色20~30 min后, 加入终止液。酶标仪450 nm测定光密度值 $[D(450)]$ 。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用SPSS 13.0统计分析软件, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 HASMCs原代培养及鉴定

组织块贴壁培养约7 d即有少量细胞开始从组织块周边迁出, 细胞多呈梭形或多边形。14 d左右细胞密集融合后传代至第6代仍生长良好, 细胞生长致密处平行排列成束, 相互穿插, 呈现起伏状生长, 表现为典型的“峰/谷”状。针对平滑肌特异的人 α -actin单克隆抗体细胞免疫荧光染色, 在 $\times 200$ 高倍镜下可见 α -actin在气道平滑肌细胞细胞质内均匀分布, 呈绿色荧光(图1)。

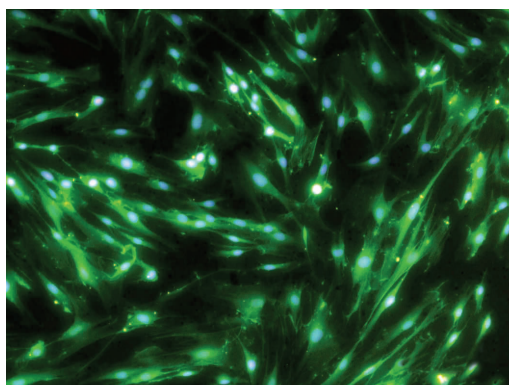


图1 免疫荧光染色鉴定培养的原代 HASMCs (×200)

2.2 Ang II 对被动致敏 HASMCs COL I- α 1 mRNA 表达和 COL I 蛋白合成的影响

荧光定量 PCR 结果显示,被动致敏 + Ang II (10^{-7} mol/L) 组的 COL I- α 1 mRNA 表达显著高于被动致敏组 ($P < 0.01$)。在 Losartan 存在的情况下,Ang II 对被动致敏 HASMCs COL I- α 1 mRNA 表达的促进作用明显降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

ELISA 结果显示,被动致敏 + Ang II (10^{-7} mol/L) 组细胞培养上清中的 COL I 蛋白含量显著高于被动致敏组 ($P < 0.01$)。Losartan 预处理后,Ang II 对被动致敏 HASMCs 分泌 COL I 蛋白的促进作用明显降低 ($P < 0.01$)。这一结果与 mRNA 表达结果变化相一致。见表 1。

表 1 Ang II 对被动致敏 HASMCs COL I- α 1 mRNA 表达和 COL I 蛋白分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	COL I- α 1 mRNA 表达	COL I 蛋白(ng/mL)
被动致敏组	1.00 \pm 0.00	53.99 \pm 4.10
被动致敏 + Ang II 组	1.63 \pm 0.96 ^a	86.94 \pm 6.25 ^a
被动致敏 + Losartan 组	1.02 \pm 0.61	53.89 \pm 2.14
被动致敏 + Ang II + Losartan 组	0.87 \pm 0.00 ^b	55.55 \pm 3.29 ^b

a: $P < 0.01$,与被动致敏组比较; b: $P < 0.01$,与被动致敏 + Ang II 组比较

3 讨论

气道平滑肌在哮喘病理生理过程中起着重要的作用,不仅参与急性气道收缩,也与气道高反应性、气道重塑和气道炎症密切相关,可被视为哮喘防治的一个重要靶标^[10]。ECM 沉积变异是哮喘气道重塑的重要组成部分,除大、小气道的黏膜下层及外膜区外,致死性哮喘病例中尚可见平滑肌层中 ECM 组分沉积^[11]。越来越多的证据^[8,12]表明 ASM 细胞可表达和释放各种 ECM 蛋白,调节 ECM 动态平衡。ECM 蛋白包绕 HASMCs,促进更多的平滑肌细胞增殖、迁移,生成更多的 ECM 蛋白和活性介质^[13]。目前影响其分泌因素的研究尚少,糖皮质激素在防止 ECM 蛋白沉积或改变

其生物学效应方面无效^[14-15]。

因哮喘患者 HASMCs 难得,国外研究多数以哮喘血清被动致敏 HASMCs。国外体外研究^[8]证实,与健康人血清处理组相比,哮喘血清被动致敏后 HASMCs 分泌的 ECM 蛋白成分及含量均明显不同。以哮喘血清被动致敏 HASMCs 进行研究有助于了解哮喘进程中 HASMCs 的可能作用。

有关 Ang II 促胶原合成机制的研究,已成为心、肾、肝纤维化研究的热点之一。国内外大量研究^[16-19]发现 Ang II 在一定范围内呈浓度依赖性促进包括肾小球系膜细胞、肝星状细胞、心肌细胞、血管平滑肌细胞在内的多种细胞分泌 COL,最佳浓度多为 10^{-6} mol/L 或 10^{-7} mol/L,同等或 10 倍于 Ang II 浓度的 AT1R 拮抗剂即可明显阻断这一作用。Ford 等^[19]采用 [³H]-脯氨酸掺入释放法,检测到在 10^{-7} mol/L Ang II 刺激下血管平滑肌细胞胶原合成明显增多,而在 AT1R 拮抗剂洛沙坦(10 倍于 Ang II 浓度)干预后胶原合成则明显减少。McKay 等^[20]检测到 Ang II 在最佳浓度 100 nmol/L 时可诱导 HASMCs 肥大。刘翠丽等^[21]通过哮喘大鼠体内实验证实,哮喘大鼠肺组织局部增多的 Ang II 促进气道平滑肌增殖肥大和气道壁胶原沉积,AT1R 拮抗剂可以减轻气道重塑的发生,并对肺功能有一定程度的改善。由此推测,Ang II 在哮喘气道重塑中可能起着促进 ECM 蛋白沉积的重要作用,特异性 AT1R 拮抗剂洛沙坦可阻断这一生物学效应。

本研究从被动致敏 HASMCs 入手,发现 Ang II (10^{-7} mol/L) 处理组有关 COL I 的检测结果均与单纯被动致敏组明显不同。COL I- α 1 mRNA 表达水平及蛋白含量显著高于单纯被动致敏组,表明 Ang II (10^{-7} mol/L) 有促进被动致敏 HASMCs 分泌 COL I 的作用。为了验证 Ang II 的促分泌作用是否通过 AT1R 介导,我们加入 AT1 受体拮抗剂洛沙坦(10^{-6} mol/L) 干预。结果表明,与被动致敏 + Ang II 组相比,被动致敏 + Ang II + Losartan 组 COL I- α 1 mRNA 表达水平及 COL I 蛋白含量均明显下降,与单纯被动致敏组相比差异无统计学意义,表明 Ang II 促进被动致敏 HASMCs 分泌 I 型胶原的作用主要是由 AT1R 介导的,AT1R 拮抗剂洛沙坦可阻断这一作用。据此推测,Ang II 可能是通过与 HASMCs 膜上的 AT1R 结合后,激活相应下游信号传导途径,从而刺激 COL I 合成增加。

本研究结果提示 Ang II 能诱导被动致敏 HASMCs 分泌 COL I,可能在哮喘气道重塑平滑基层增厚中起着一定的作用。

本研究的不足之处:①未对不同浓度 Ang II 对被动致敏 HASMCs 分泌 COL I 的影响进行检测,虽然文献及本课题组前期实验均证实 10^{-7} mol/L 的 Ang II 作用于 HASMCs 效果最佳,但仍需行不同浓度实验进一步证实。②仅对 Ang II 诱导被动致敏 HASMCs 分泌 COL I 这一生物学现象进行观察,未对 Ang II 与 AT1R 结合后可能激活的下游信号转导通路进行检测。③未检测 Ang II 对被动致敏 HASMCs 分泌纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、透明质酸等的影响,虽然 COL I 是最主要的 ECM 成分,但纤维粘连蛋白等在哮喘气道重塑中也存在着沉积变化,且对 HASMCs 的功能起着多种影响。因此,我们在下一步研究中,拟对已证实参与 HASMCs 分泌 COL I 等 ECM 过程的细胞外信号调节激酶信号转导通路进行检测,进一步明确产生这一生物学现象的机制。并制备哮喘小/大鼠模型,观察 Ang II 和洛沙坦干预后动物气道壁 COL I、纤维粘连蛋白等的沉积情况。

参考文献:

- [1] Panettieri R A Jr. Airway smooth muscle: immunomodulatory cells that modulate airway remodeling? [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, 137(2/3): 277-293.
- [2] Hirst S J, Twort C H, Lee T H. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23(3): 335-344.
- [3] Weber K T, Swamynathan S K, Guntaka R V, et al. Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(3/4): 395-403.
- [4] Marshall R P. The pulmonary renin-angiotensin system [J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(9): 715-722.
- [5] Millar E A, Angus R M, Hulks G, et al. Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function[J]. *Thorax*, 1994, 49(5): 492-495.
- [6] Li N, Cai R, Niu Y, et al. Inhibition of angiotensin II-induced contraction of human airway smooth muscle cells by angiotensin-(1-7) via downregulation of the RhoA/ROCK2 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 811-818.
- [7] 牛毅,程远雄,李宁,等. ERK 信号通路在血管紧张素 II 诱导的人气道平滑肌细胞增殖中的作用[J]. *广东医学*, 2013, 34(3): 352-355.
- [8] Johnson P R, Black J L, Carlin S, et al. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(6): 2145-2151.
- [9] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(3): 177-185.
- [10] Doeing D C, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma[J]. *J Appl Physiol*, 2013, 114(7): 834-843.
- [11] Bai T R, Cooper J, Koelmeyer T, et al. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(2 Pt 1): 663-669.
- [12] Panettieri R A, Tan E M, Ciocca V, et al. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction *in vitro*: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(3): 453-461.
- [13] Johnson P R. Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001, 28(3): 233-236.
- [14] Bonacci J V, Harris T, Wilson J W, et al. Collagen-induced resistance to glucocorticoid anti-mitogenic actions: a potential explanation of smooth muscle hyperplasia in the asthmatic remodelled airway[J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 138(7): 1203-1206.
- [15] Freyer A M, Billington C K, Penn R B, et al. Extracellular matrix modulates beta2-adrenergic receptor signaling in human airway smooth muscle cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(4): 440-445.
- [16] Kagami S, Border W A, Miller D E, et al. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6): 2431-2437.
- [17] Zhang Y, Yang X, Wu P, et al. Expression of angiotensin II type 1 receptor in rat hepatic stellate cells and its effects on cell growth and collagen production [J]. *Horm Res*, 2003, 60(3): 105-110.
- [18] Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, et al. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(3): 463-475.
- [19] Ford C M, Li S, Pickering J G. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(8): 1843-1851.
- [20] McKay S, de-Jongste J C, Saxena P R, et al. Angiotensin II induces hypertrophy of human airway smooth muscle cells: expression of transcription factors and transforming growth factor-beta1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18(6): 823-833.
- [21] 刘翠丽,林江涛,张晓岩,等. 血管紧张素 II 对哮喘大鼠气道重塑影响的研究[J]. *中华哮喘杂志: 电子版*, 2007, 1(1): 29-34.

(收稿:2013-03-10;修回:2013-05-31)

(编辑 邓强庭)