

研究论文

核因子 κ B 在精氨酸血管加压素诱导大鼠心肌成纤维细胞一氧化氮合成中的作用范延红¹, 赵连友^{2,*}, 郑强荪², 薛玉生², 杨学东², 田建伟², 徐琳²¹第四军医大学西京医院心脏内科, 西安 710033; ²第四军医大学唐都医院心脏内科, 西安 710038

摘要: 本文探讨了精氨酸血管加压素(AVP)刺激下体外培养的大鼠心肌成纤维细胞(CFs)内一氧化氮(NO)含量、一氧化氮合酶(NOS)活性、诱导型一氧化氮合酶基因表达的变化及其与核因子 κ B(NF- κ B)的关系。用胰酶消化法分离培养 Sprague Dawley 仔鼠的 CFs, 分别采用硝酸还原酶法、分光光度法、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、免疫荧光-共聚焦显微镜和蛋白质印迹检测 AVP 干预下 CFs 的 NO 含量、NOS 活性、iNOS mRNA 表达和 NF- κ B 的活化。结果显示, AVP 浓度依赖性(0.001-0.1 μ mol/L)地增加 CFs 的 NO 含量, 提高 NOS 活性, 增加 iNOS mRNA 表达; AVP 能够活化 NF- κ B, 使其由细胞浆转位于细胞核; NF- κ B 特异性抑制剂吡咯啉烷二甲基硫脲(PDTC)能够抑制 AVP 诱导的 CFs NO 含量增加、NOS 活性提高和 iNOS mRNA 表达增加。上述结果提示, AVP 干预下 CFs iNOS mRNA 表达增加、NOS 活性增高、NO 合成增多可能通过 NF- κ B 激活途径, NF- κ B 激活参与心肌纤维化的发生和发展。

关键词: 精氨酸加压素; 一氧化氮; 心肌成纤维细胞; 核因子 κ B

中图分类号: Q463; R542.2+3

Arginine vasopressin-induced nitric oxide content changes in cultured cardiac fibroblasts and its relation to nuclear factor- κ BFAN Yan-Hong¹, ZHAO Lian-You^{2,*}, ZHENG Qiang-Sun², XUE Yu-Sheng², YANG Xue-Dong², TIAN Jian-Wei², XU Lin²¹Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, and²Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038

Abstract: To investigate the changes in the nitric oxide (NO) contents, nitric oxide synthase (NOS) activity and inducible nitric oxide (iNOS) mRNA expression in arginine vasopressin (AVP)-induced cardiac fibroblasts (CFs) *in vitro* and its relation to nuclear factor- κ B (NF- κ B), CFs were isolated by trypsin digestion method. Nitric acid reductase method, spectrophotometry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), immunofluorescence-interactive laser cytometer techniques and Western blotting were used respectively to detect NO contents, NOS activity, iNOS mRNA expression and the activation of NF- κ B in CFs. AVP increased NO contents, NOS activity and iNOS mRNA expressions in a concentration-dependent manner; NF- κ B was activated and mobilized from cytoplasm to nucleus in AVP-induced CFs; PDTC, one of the inhibitors of NF- κ B, could inhibit aforementioned increments. It is suggested that the increases in NO contents, elevation of NOS activity and increment of iNOS mRNA expression may be mediated through NF- κ B activation pathway in cultured CFs induced by AVP, and that NF- κ B is involved in the occurrence and development of myocardial fibrosis.

Key words: arginine vasopressin; nitric oxide; cardiac fibroblasts; NF- κ B

Received 2002-12-03 Accepted 2003-03-19

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39670317).

* Corresponding author. Tel: +86-29-3377656; E-mail: mouseandcow@sina.com

一氧化氮(NO)是一种重要的血管舒张因子, NO生成增多不仅可舒张血管、降低血压,还可抑制心肌纤维化的发生和发展^[1]。精氨酸血管升压素(AVP)是下丘脑分泌的九肽抗利尿激素,近年来的研究发现,AVP能够剂量依赖性地促进心肌纤维细胞(CFs)增殖和胶原合成^[2],促进心肌纤维化的发生和发展。有研究表明,CFs表面有AVP受体^[3],AVP能够时间依赖性地提高CFs一氧化氮合酶(NOS)活性,促进CFs生成NO^[4],但是AVP与CFs NO合成的量效关系及通过何种细胞内机制和途径影响合成NO,目前尚不清楚。核因子- κ B(NF- κ B)是一种广泛存在于各种细胞、具有多种调节作用的转录因子,能够调节包括诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在内的众多靶基因的基因表达,白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 γ 干扰素(IFN- γ)能够通过激活CFs的NF- κ B上调iNOS基因表达,增加NO合成^[5]。本文拟探讨不同浓度AVP对体外培养大鼠CFs NO合成的影响及AVP诱导下NO合成增加是否通过NF- κ B活化途径,旨在探讨心肌纤维化发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂来源 实验用SD仔鼠(出生1-3 d)由第四军医大学动物中心提供。AVP由美国Peninsular Lab提供。NO含量和NOS活性测定试剂盒购自南京建成生物技术研究所。TRIZOL裂解液、Oligo(dT)、M-MLV反转录酶和Taq-DNA聚合酶分别购自Promega和宝生物公司。小鼠抗大鼠NF- κ B p65单克隆抗体购自Transduction公司,兔抗小鼠FITC抗体购自Sigma公司。SABC试剂盒购自宝生物公司。PCR引物由上海生物工程公司合成。

1.2 CFs的分离、培养和鉴定^[5] 无菌条件下取SD仔鼠心室,无菌盐水漂洗后剪至2-3 mm³小块。1.25 g/L胰蛋白酶37℃消化20-40 min,每5 min收集1次细胞,收集3-4次,筛网过滤,1000 r/min离心3-5 min。将所得细胞沉淀物重新悬浮于含100 ml/L小牛血清的DMEM培养液中,小心吹打分散。置于37℃,50 ml/L CO₂ 孵箱中贴壁60-90 min后更换培养液,用差速贴壁法去除心肌细胞。继续培养细胞至近融合状态时按1:2传代。实验用2-3代细胞。对CFs进行SABC法免疫组织化学染色结果:纤维连接蛋白染色阳性,血管平滑肌肌动蛋白染色阴性,符合CFs染色特征。

1.3 CFs培养液NO含量、NOS活性和iNOS mRNA表达量检测 实验分为对照组、0.001 μ mol/L AVP组、0.01 μ mol/L AVP组、0.1 μ mol/L AVP组、1 μ mol/L AVP组和0.1 μ mol/L AVP + NF- κ B特异性抑

制剂吡咯啉烷二甲基硫脲(PDTC)组。CFs培养至近融合状态时无血清培养液驯化24 h,继之分组培养24 h,收集培养液测定NO含量和NOS活性,收集细胞测定iNOS mRNA表达量。

1.3.1 NO含量测定 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 μ mol/L计算。

1.3.2 NOS活性测定 NO与亲核物质生成有色化合物,测定其吸光度值,通过NOS催化产生的NO量推算NOS活力。操作按试剂盒说明进行,NOS活性以公式(测定管吸光度-空白管吸光度)×141.6 U/ml计算。

1.3.3 iNOS mRNA表达量测定^[6] 按TRIZOL试剂说明书提取CFs总RNA。反转录合成cDNA第一链,反应体系为:10×cDNA合成缓冲液、MgCl₂、oligo(dT)、4×dNTP、RNA酶抑制剂、AMV反转录酶和去离子水,总体积20 μ l,42℃恒温水浴1 h。取反转录产物10 μ l进行PCR反应:反应体系为:10×PCR合成缓冲液、4×dNTP、上游引物、下游引物、cDNA模板、Taq酶和去离子水,总体积50 μ l。循环参数为:94℃变性1 min,50℃复性1 min,72℃延伸1.5 min,共30个循环。其中鼠iNOS(GenBank登录号:X76881)上下游引物序列分别为:tcgagccctggaagaccacatct和gtgtgtcttctccaaggtgttccttat,扩增PCR产物大小为276 bp。鼠磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)(GenBank登录号:M32599)上下游引物序列分别为:tattgggcgctgggtcacca和ccaccttctgatgtcatca,扩增PCR产物大小为746 bp。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像分析系统分析,以iNOS mRNA/GAPDH mRNA电泳带荧光强度比值作为iNOS mRNA表达量的指标。

1.4 CFs中NF- κ B的活化 实验分为对照组、0.1 μ mol/L AVP组、0.1 μ mol/L AVP + PDTC组。细胞培养至近融合状态时用无血清培养液驯化24 h,继之分组再培养1 h,收集细胞。

1.4.1 CFs中NF- κ B细胞内定位检测 用4%多聚甲醛固定细胞。以5%山羊血清室温封闭30 min;倾去血清,滴加1:30抗大鼠NF- κ B p65单克隆抗体4℃过夜;倾去抗体孵育液,PBS洗3次,换加1:10 FITC荧光标记兔抗鼠抗体,4℃过夜,PBS充分洗板。将待测样品置于激光扫描共聚焦显微细胞仪下,选用40×物镜,7%滤光片,确定激发光波长为488 nm,进入Kinetics-Image Scan程序,预扫描后选定最佳细胞

扫描参数,扫描细胞照片并保存。

1.4.2 制备 CFs 核提取物⁷¹ 用冷 Tris 缓冲盐溶液洗涤细胞 2 次,将沉淀悬浮于 400 μ l 溶液 A (mmol/L:HEPES 10, pH 7.9, KCl 10、EDTA 0.1、EGTA 0.1、DTT 1、PMSF 0.5)冰浴 15 min,加入 25 μ l 10% NP-40 溶液,混匀后于 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心,沉淀重悬于 30 μ l 溶液 B [mmol/L:HEPES 20, pH 7.9, NaCl 400、EDTA 1、EGTA 1、DTT 1、PMSF 1 和 25% (v/v)]甘油中,置摇床上剧烈震荡 15 min,4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 10 min 取上清分装冻存。

1.4.3 CFs 细胞核中 NF- κ B 蛋白含量检测 CFs 核提取物与等体积 2 \times 电泳加样缓冲液混合煮沸 5 min,每泳道上样 10 μ l。用 10% 聚丙烯酰胺凝胶标准方法电泳,并将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。对硝酸纤维素膜进行丽春红 S 染色,观察蛋白质转移情况后用去离子水将染液漂洗干净。用封闭液 37 $^{\circ}$ C 孵育硝酸纤维素膜 1 h,1:100 抗 NF- κ B p65 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育膜过夜,PBS 洗膜 5 min \times 2 次。生物素标记二抗工作液 4 $^{\circ}$ C 孵育膜过夜,PBS 洗膜 5 min \times 3 次。辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 4 $^{\circ}$ C 孵育膜过夜,PBS 洗膜 5 min \times 3 次。DAB 显色,显色适度时,再用水漂洗终止显色反应,拍摄滤膜照片。

1.5 统计学处理 所有数据以 means \pm SD 表示,应用 SPSS 统计软件对资料进行分析。多组均数比较采用 F 检验和 q 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P > 0.05$ 表示无显著差别。

2 结果

2.1 AVP 对 CFs NO 合成、NOS 活性的影响以及 PDTC 的抑制作用

对照组 CFs 具有 NOS 活性,能够合成 NO。在不

同浓度 AVP 干预下,CFs NOS 活性增强,NO 含量升高,呈浓度依赖性。其中 0.1 μ mol/L AVP 组和 1 μ mol/L AVP 组的 NOS 活性和 NO 含量均显著高于对照组、0.001 μ mol/L、0.01 μ mol/L 和 1 μ mol/L AVP 组,但无显著性差异。加入 PDTC 后 0.1 μ mol/L AVP 组 CFs NOS 活性和 NO 合成显著降低(见表 1)。

表 1. AVP 和 PDTC 对 CFs 培养上清液中 NO 含量和 NOS 活性的影响

Table 1. Effects of AVP and PDTC on NO contents and NOS activity in CFs supernatant

Group	NO contents (μ mol/L)	NOS activity (U/ml)
Control	29.34 \pm 5.34 [#]	26.65 \pm 4.87 [#]
AVP		
0.001 μ mol/L	31.79 \pm 1.59 [#]	30.33 \pm 8.24 [#]
0.01 μ mol/L	36.87 \pm 1.89 [#]	35.96 \pm 4.1 [#]
0.1 μ mol/L	70.78 \pm 8.93 [*]	71.86 \pm 3.3 [*]
1 μ mol/L	62.86 \pm 6.05 [*]	66.34 \pm 3.8 [*]
0.01 μ mol/L AVP + PDTC	40.63 \pm 7.82 [#]	33.32 \pm 6.49 [#]

* $P < 0.05$ vs control, [#] $P < 0.05$ vs 0.01 μ mol/L AVP group. $n = 5$, means \pm SD.

2.2 AVP 对 CFs iNOS mRNA 表达的影响以及 PDTC 的抑制作用

对照组 CFs 有 iNOS mRNA 表达。在不同浓度 AVP 干预下,CFs iNOS mRNA 表达量呈浓度依赖性增加。其中 0.1 和 1 μ mol/L AVP 组的 iNOS mRNA 表达量显著高于对照组,0.001、0.01 和 1 μ mol/L AVP 组的 iNOS mRNA 表达量虽低于 0.1 μ mol/L AVP 组,但无显著性差异。加入 PDTC 后 0.1 μ mol/L AVP 组 iNOS mRNA 表达量显著降低(图 1 和表 2)。

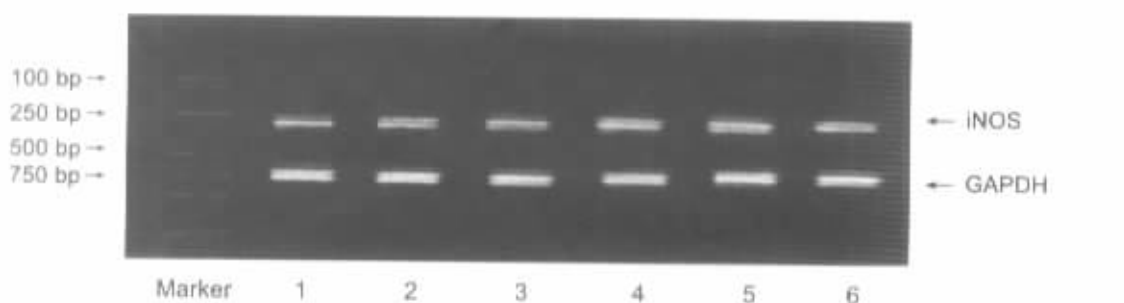


图 1. AVP 和 PDTC 对 CFs iNOS mRNA 表达的影响

Fig. 1. Effects of AVP and PDTC on iNOS mRNA expression in CFs. 1, control group; 2, 0.001 μ mol/L AVP group; 3, 0.01 μ mol/L AVP group; 4, 0.1 μ mol/L AVP group; 5, 1 μ mol/L AVP group; 6, 0.1 μ mol/L AVP + PDTC group.

表 2. AVP 和 PDTC 对 CFs iNOS mRNA 的影响

Table 2. Effects of AVP and PDTC on iNOS mRNA expression in CFs (OD value)

Group	iNOS	GAPDH	iNOS/GAPDH
Control	0.15 ± 0.02 [#]	0.61 ± 0.02	0.25 ± 0.04 [#]
0.001 μmol/L AVP	0.18 ± 0.04 [#]	0.59 ± 0.03	0.30 ± 0.06 [#]
0.01 μmol/L AVP	0.19 ± 0.02 [#]	0.60 ± 0.01	0.31 ± 0.03 [#]
0.1 μmol/L AVP	0.43 ± 0.04 [*]	0.62 ± 0.03	0.70 ± 0.03 [*]
1 μmol/L AVP	0.38 ± 0.02 [*]	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.06 [*]
0.1 μmol/L AVP + PDTC	0.21 ± 0.05 [#]	0.64 ± 0.07	0.33 ± 0.05 [#]

^{*} $P < 0.05$ vs control, [#] $P < 0.05$ vs 0.1 mol/L AVP group. $n = 5$, means ± SD.

2.3 AVP 对 CFs NF-κB 细胞内定位的影响以及 PDTC 的抑制作用

CFs 呈多角形或梭形散在、成簇生长。对照组 CFs 胞浆有中等强度绿色荧光着色,胞核中无荧光着色;0.1 μmol/L AVP 组 CFs 胞浆中绿色荧光着色强

度显著减弱,核中有强绿色荧光着色,并可在核中强绿色荧光着色处见无荧光着色的核仁区;0.1 μmol/L AVP + PDTC 组 CFs 胞浆中有中等强度绿色荧光着色、胞核中无荧光着色,偶尔可见核中有强绿色荧光着色、胞浆着色浅淡的细胞(图 2)。

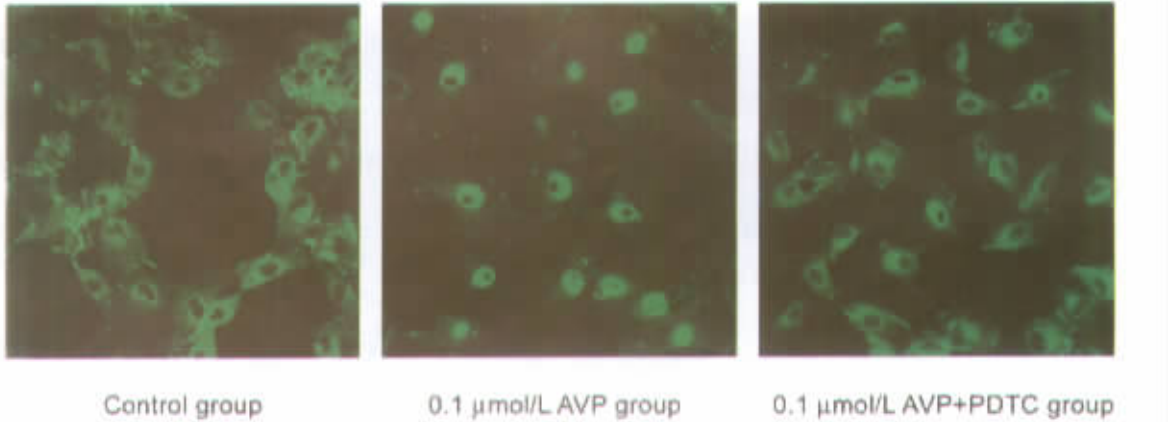


图 2. AVP 和 PDTC 对 CFs 中 NF-κB 细胞内分布的影响

Fig. 2. Effects of AVP and PDTC on the distribution of NF-κB in CFs (×400).

2.4 AVP 对 CFs 核内 NF-κB 蛋白含量的影响以及 PDTC 的抑制作用

在对照组 CFs 核蛋白提取物中未发现 NF-κB 蛋白,0.1 μmol/L AVP 组 CFs 核蛋白提取物中 NF-κB 蛋白表达阳性。与 0.1 μmol/L AVP 组相比,0.1 μmol/L AVP + PDTC 组 CFs 核蛋白提取物中 NF-κB 蛋白表达显著减弱(图 3)。

3 讨论

心肌纤维化是指心肌组织中胶原浓度显著升高或胶原容积分数显著高于正常值,CFs 是其主要效应细胞。心肌间质胶原增多使心肌硬度增加,顺应性下降,导致心脏舒张、收缩和传导功能发生障碍,是心力衰竭、心律失常和心性猝死发生的重要环节^[8]。AVP 和 NO 是重要的血管活性物质,它们在心肌纤维

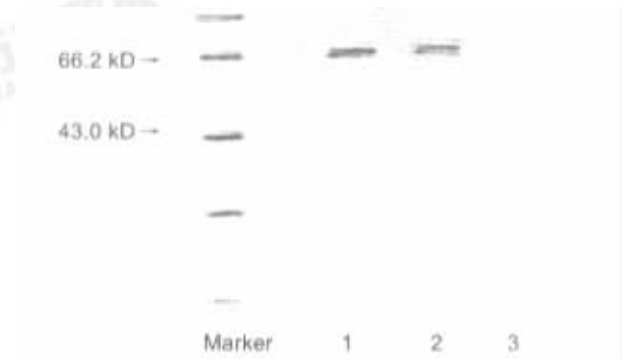


图 3. AVP 和 PDTC 对 CFs 核提取物中 NF-κB 蛋白含量的影响

Fig. 3. Effects of AVP and PDTC on NF-κB protein contents in CFs nuclear extract. 1, AVP group; 2, AVP + PDTC group; 3, control group.

化的发生和发展中起相互拮抗的作用。CFs本身能够合成分泌NO,但在CFs中NO合成与AVP的浓度效应关系及其细胞内机制目前还不清楚。

本研究结果显示,在一定浓度范围内(0.001 - 0.1 μ mol/L)AVP干预下CFs的NO含量、NOS活性和iNOS mRNA表达量都随AVP浓度的增高而增加;但当AVP浓度继续增高(1 μ mol/L)时,这些反而都有所下降。说明AVP能够在一定浓度范围内剂量依赖性地提高CFs合成NO,其最大效应浓度为0.1 μ mol/L。NOS是NO合成的关键酶,根据其存在方式及作用特点分为内皮型、神经元型和诱导型三种类型。免疫组化研究认为,成纤维细胞中仅含有iNOS^[9],其活性受iNOS基因表达控制。这与本研究中iNOS mRNA表达量、NOS活性和NO含量同步增减相符合。本实验中使用的AVP浓度与高血压患者血中的AVP浓度一致^[10],因此AVP干预下CFs内NO合成增多具有重要的病理生理意义,它可能属于生物体内的一种代偿性负反馈调节机制。增加的NO能够在一定范围内拮抗AVP浓度增高(0.001 - 0.1 μ mol/L)所致的促心肌纤维化作用,以求最大限度地维持正常的心肌结构和功能;但这种代偿能力是有限的,当AVP浓度过高(>0.1 μ mol/L)时,CFs合成的NO不能再继续增加,也就无法拮抗更高浓度AVP的促心肌纤维化作用,导致心肌组织发生纤维化。

NF- κ B是由p50和p65亚基组成的异源二聚体,正常情况下它在胞浆中与其抑制蛋白结合而呈非活性状态。当细胞受到各种刺激原作用时,NF- κ B与其抑制蛋白解离而激活,进入细胞核内与特定基因启动子结合,调节靶基因表达。

本研究通过AVP诱导CFs合成NO增加进行实验,结果发现AVP干预下CFs的NF- κ B由细胞浆转位至细胞核,细胞核中可检测出NF- κ B蛋白,说明AVP能够激活CFs的NF- κ B。近年研究发现,iNOS基因5'端转录调控区域中含有NF- κ B结合位点,NF- κ B激活参与iNOS mRNA表达^[11]。因此,AVP干预下CFs NO合成增多可能是通过激活NF- κ B,增加iNOS mRNA表达,提高NOS活性途径实现的。本文结果显示:AVP在活化CFs NF- κ B的同时,能够上调iNOS mRNA表达,提高NOS活性,增加NO合成,并且这三种上调作用均能够被NF- κ B特异性抑制剂PDTIC显著抑制。从而证实,AVP干预下CFs NO合成增加至少部分通过NF- κ B活化、iNOS mRNA表达增加、NOS活性增高途径,提示NF- κ B激活可能与心肌纤维化的发生发展有关。

NO不但直接抑制CFs增殖、降低纤维连接蛋

白、I型胶原和III型胶原基因表达、促进间质胶原降解^[12],而且通过抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活、降低血压等间接途径抑制心肌纤维化^[13]。因此,通过调节NF- κ B的活性或以NF- κ B作为药物作用的靶点增加NO合成,可以延缓心肌纤维化的发生和发展,这将为心肌纤维化的防治研究提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Kim NN, Villegas S, Summerour SR, Villarreal FJ. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 1999 31(2):457-466.
- [2] Yang XD(杨学东), Zhao LY, Li X, Qiao HY. Effects of arginine vasopressin on collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Heart J(心脏杂志)* 2000 12(3):169-171 (Chinese, English abstract).
- [3] Yang XD(杨学东), Zhao LY, Wang SW, Qiao HY, Xu HL. Effects of V1 receptor antagonist on the proliferation of rat cardiac fibroblast induced by arginine vasopressin. *J Hypert(高血压杂志)* 2002 10(5):472-475.
- [4] Fan YH(范延红), Zhao LY, Peng YH, Chen YQ, Zhou XR, Xu L. Changes of NOS-NO system activity in neonatal rat cardiac fibroblasts with and without arginine vasopressin. *Heart J(心脏杂志)* 2002 14(1):19-22 (Chinese, English abstract).
- [5] Farivar RS, Brecher P. Salicylate is a transcriptional inhibitor of the inducible nitric oxide synthase in cultured cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 1996 271(49):31585-31592.
- [6] Scott JA, Weir ML, Wilson SM, Xuan JW, Chambers AF, McCormack DG. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. *Am J Physiol* 1998 275(Heart Circ Physiol 44):H2258-H2265.
- [7] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983 11(5):1475-1489.
- [8] Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2000 15(4):264-272.
- [9] 钟慈生,孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海:上海医科大学出版社,1997:28.
- [10] Zhao LY(赵连友), Cao SP. Changes of plasma AVP concentration and its relation to hypertension patients' condition. *J Cardiol(心脏病杂志)* 1993 21(3):147-149 (Chinese, English abstract).
- [11] Cooke CL, Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 282(2):C395-C402.
- [12] Wang D, Yu X, Cohen RA, Brecher P. Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation and intracellular Ca^{2+} levels. *J Biol Chem* 2000 275(16):12223-12230.
- [13] Yan DH(焉定红), Cheng XS, Wang XM, Zhang RX, Li JX, Shu H, Wu QH. Effects of nitric oxide deficiency on hypertension and cardiovascular remodeling. *J Hypert(高血压杂志)* 2000 8(4):349-354.