

血管紧张素 II 对肝星状细胞 TIMP-1 表达的作用

王 磊, 刘海林

王磊, 刘海林, 上海第二医科大学附属第九人民医院消化科 上海市 200011
项目负责人: 刘海林, 200011, 上海市制造局路 639 号, 上海第二医科大学
附属第九人民医院消化科. liu_hailin@yahoo.com.cn
电话: 021-63138341-5134 传真: 021-63136856
收稿日期: 2004-02-06 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 研究血管紧张素 II (Ang II) 对肝星状细胞组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)表达的作用.

方法: 体外培养大鼠肝星状细胞株HSC-T6, 分别加入不同浓度的 Ang II (10^{-6} - 10^{-9} mol/L) 和 Ang II 10^{-6} mol/L+ Losartan 10^{-6} mol/L, 作用 48 h 后收集细胞, RT-PCR 检测各组TIMP-1 mRNA表达水平.

结果: 10^{-6} mol/L Ang II 和 10^{-7} mol/L Ang II 作用的 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 的表达分别为 0.79 ± 0.04 和 0.83 ± 0.06 , 显著高于空白对照组 0.62 ± 0.08 ($P < 0.05$), 10^{-6} Ang II + 10^{-6} Losartan 组 TIMP-1 mRNA 的表达为 0.64 ± 0.06 , 显著抑制 10^{-6} mol/L Ang II 的作用 ($P < 0.05$).

结论: Ang II 可通过 AT1 受体促进 HSC-T6 细胞 TIMP-1 的表达.

王磊, 刘海林. 血管紧张素 II 对肝星状细胞 TIMP-1 表达的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1455-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1455.asp>

0 引言

最近的研究发现, 血管紧张素 II (Ang II) 是一种重要的促肝纤维化因子, Ang II 可通过 1 型受体(AT1 受体)介导促进肝星状细胞(HSC)增生、 Ca^{2+} 内流和胶原合成^[1]. 但在肝纤维化形成过程中 Ang II 对细胞外基质(ECM)的代谢是否发挥作用尚不十分清楚. 组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)通过抑制 ECM 降解在肝纤维化过程中发挥重要作用. 本研究观察了不同浓度 Ang II 和 AT1 受体拮抗剂对肝星状细胞株 HSC-T6 的 TIMP-1 表达的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6), 为美国加利福尼亚旧金山总医院肝病中心实验室 Friedman 教授建立, 上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠; Ang II 购自 Calbiochem 公司; AT1 受体拮抗剂 Losartan 为默沙东公司产品; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; Trizol 试剂盒, 购自 Sigma 公司; Takara RT-PCR 试

剂盒为 Takara 公司产品; TIMP-1、 β -actin 引物由上海生工公司合成.

1.2 方法 HSC-T6 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液制备为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液, 接种于培养皿中, 置含 50 mL/L CO_2 、37 °C 培养箱中培养 24 h, 细胞贴壁后换含 4 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养 24 h 后, 换含终浓度为 10^{-6} - 10^{-9} mol/L Ang II 及 Ang II 10^{-6} mol/L+Losartan 10^{-6} mol/L 的培养液, 并设空白对照组, 每组 3 盘细胞. 作用 48 h 后, 每盘细胞加 1 mL Trizol, 将细胞收集至经 DEPC 水处理的 Eppendorf 管中, -80 °C 保存. 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 溶于 20 μ L 0.1 g/L DEPC 水中, 取溶解的 RNA 1 μ L, 用 DEPC 水稀释 100 倍, 用紫外分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度. 逆转录反应体系: RNA 标本 2 μ g, 逆转录酶 1 μ L, dNTP 混合物(10 mmol/L) 2 μ L, $10 \times$ PCR 缓冲液 2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 4 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, oligo dt-Adaptor 引物 1 μ L, 其余为无 RNA 酶水, 反应总体积共 20 μ L. cDNA 合成反应条件: 30 °C, 10 min; 42 °C, 60 min; 99 °C, 5 min; 5 °C, 5 min. PCR 反应体系: 逆转录 cDNA 产物 2 μ L, TIMP-1 或 β -actin 上下游引物(表 1)各 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, dNTP 混合物(10 mmol/L) 0.5 μ L、 $10 \times$ PCR 缓冲液 2 μ L、 $MgCl_2$ (25 mmol/L) 1.2 μ L、其余为无 RNA 酶水, 反应总体积共 20 μ L. PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 之后 94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min; 共 35 个循环; 最后 72 °C 10 min, 终止反应. PCR 扩增产物加 2 μ L DNA 上样液混匀, 经 15 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 g/L 溴化乙锭)电泳后, 经 GIS-2800 凝胶图像处理系统拍照, 分析各产物条带平均灰度值, 以 β -actin 产物条带灰度值为内参照计算 mRNA 相对表达量. 统计学处理 SAS 统计软件包进行配对 t 检验.

表 1 引物序列

引物	序列	扩增长度(bp)	位点
TIMP-1 顺义	5' -GACCTGGTCATAAGGGCTAAA-3'	219	118-138
反义	5' -GCCCGTGATGAGAACTCTTCACT-3'	313-336	
β -actin 顺义	5' -GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'	540	25-45
反义	5' -CTCTTTGATGTACGCACGATTTC-3'	541-564	

2 结果

10^{-6} mol/L Ang II 组和 10^{-7} mol/L Ang II 组作用的 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 的表达分别为 0.79 ± 0.04 和 0.83 ± 0.06 , 显著高于空白对照组 0.62 ± 0.08 ($P < 0.05$),

10^{-6} Ang II + 10^{-6} Losartan 组 TIMP-1 mRNA 的表达为 0.64 ± 0.06 , 显著抑制 10^{-6} mol/L Ang II 的作用 ($P < 0.05$) (表 2、图 1)。

表 2 不同浓度 Ang II 和 Losartan 对 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 表达的作用 (mean \pm SD, $n=3$)

分组(mol/L)	TIMP-1 mRNA	
10^{-6} Ang II	0.79 ± 0.04^a	$P=3.29$
10^{-7} Ang II	0.83 ± 0.06^a	$P=3.64$
10^{-8} Ang II	0.59 ± 0.05	$P=0.55$
10^{-9} Ang II	0.61 ± 0.06	$P=0.17$
空白对照组	0.62 ± 0.08	
10^{-6} Ang II + 10^{-6} Losartan	0.64 ± 0.06^b	$P=3.60$

^a $P < 0.05$ vs 空白对照组, ^b $P < 0.05$ vs 10^{-6} Ang II 组。

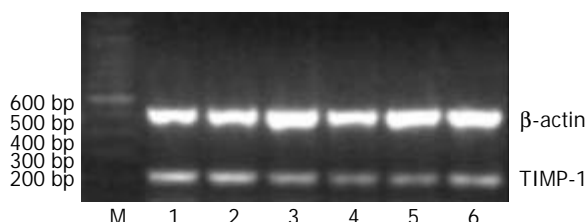


图 1 1: Ang II 10^{-6} mol/L; 2: Ang II 10^{-7} mol/L; 3: Ang II 10^{-8} mol/L; 4: Ang II 10^{-9} mol/L; 5: 空白对照; 6: Ang II 10^{-6} mol/L + Losartan 10^{-6} mol/L; M: 标准 DNA 标记。Ang II 对 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 表达的 PCR 电泳。

3 讨论

近来研究报道, 肝脏中也存在组织肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)^[2], 作为 RAAS 的重要活性成分, Ang II 在肝纤维化形成中的作用正逐渐引起广泛关注。动物实验表明大鼠分离培养的活化 HSC 和肝星状细胞株 HSC-T6 均可表达 AT1 受体, AT1 受体拮抗剂和 ACEI 对实验性大鼠肝纤维化具有一定的治疗作用^[3-4]。人活化的 HSC 同样存在 AT1 受体表达, Ang II 可以通过与其受体结合, 促进 HSC 增生、胶原合成和 Ca^{2+} 内流^[1]。TIMP-1 是 TIMP 家族的重要成员, 在肝纤维化过程中主要来源于活化的 HSC, 其通过抑制间质金属蛋白酶(MMP)的活性减少细胞外基质的降解, 在肝纤维化的

形成和发展中发挥十分重要的作用^[5]。而目前关于 Ang II 是否可以影响 HSC 的 TIMP-1 表达尚鲜有报道。

HSC-T6 是通过转导 SV40 基因建立的 SD 大鼠 HSC 细胞株, 具有稳定的活化 HSC 的生物学特性^[6]。我们在体外观察了不同浓度(10^{-6} - 10^{-9} mol/L)的 Ang II 对 HSC-T6 细胞的作用。结果提示高浓度的 Ang II 可以促进 HSC-T6 细胞的 TIMP-1 mRNA 的表达, 而且该作用可以被 AT1 受体拮抗剂抑制, 提示 Ang II 可以通过 AT1 受体的介导直接上调 TIMP-1 mRNA 表达, 从而通过抑制 ECM 降解促进肝纤维化的形成。同期国外亦有研究证明, 不同浓度 Ang II 作用于培养的大鼠 HSC 后, TIMP-1 的表达呈浓度和时间依赖性增加。而且此作用可被蛋白激酶 C 抑制剂所阻断, 提示 Ang II 刺激 TIMP-1 生成的机制可能与蛋白激酶 C 介导的 RNA 从头合成途径有关^[7]。

因此, Ang II 可通过上调 HSC 的 TIMP-1 参与抑制细胞外基质的降解, 促进肝纤维化的形成, Ang II 对其他肝纤维化相关 MMP/TIMP 的调节作用如何尚需要深入研究。

4 参考文献

- 1 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis 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
- 2 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
- 3 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujino H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):745-750
- 4 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华. 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1168-1171
- 5 刘海林, 李宣海, 杨少平, 王丹芝. 金属蛋白酶组织抑制因子-1 与肝纤维化. *中华消化杂志* 2000;20:127-128
- 6 Vogel S, Piantadosi R, Frank J, Lalazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blanter WS. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 2000;41:882-893
- 7 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujino H, Imazu H, Fukui H. Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res* 2003;27:51-56