

## 血管紧张素 II 诱导大鼠胰星状细胞增殖和胶原合成

鲁 临, 李兆申\*, 许国铭, 邹多武, 屠振兴, 龚燕芳

(第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 研究血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 对大鼠胰星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 增殖和活化的影响。**方法:** 取第 4~7 代培养的大鼠 PSCs, 采用无血清 DMEM 培养液培养 48 h 使细胞同步静止化后, 换含 1、10 和 100 nmol/L Ang II 的无血清培养液继续培养 24 h 或 48 h; 另外, 在加入 100 nmol/L Ang II 无血清培养液前加入 100 nmol/L AT1 受体拮抗剂 ZD7155 或 AT2 受体拮抗剂 PD123319。分别采用 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶核苷掺入、[<sup>3</sup>H]-脯氨酸掺入、Western 印迹和 Northern 印迹法动态检测细胞 DNA 合成速率、胶原合成速率、 $\alpha$ -平滑肌动蛋白和 I 型前胶原 mRNA 表达。**结果:** 与正常对照组比较, 1 nmol/L Ang II 刺激 24 h 后细胞 DNA 合成率无显著增加 ( $P > 0.05$ ), 而 10 和 100 nmol/L 处理组细胞 DNA 合成率显著增加 ( $P$  值均  $< 0.05$ ); 刺激 48 h 后, 1、10 和 100 nmol/L Ang II 处理组细胞胶原合成率和 I 型前胶原 mRNA 表达水平均明显增加 ( $P$  值均  $< 0.05$ ), 但  $\alpha$ -平滑肌动蛋白表达无明显变化 ( $P$  值均  $> 0.05$ )。与 Ang II (100 nmol/L) 处理组比较, Ang II (100 nmol/L) + ZD7155 (100 nmol/L) 处理组细胞 DNA 合成率、胶原合成率和 I 型前胶原 mRNA 表达水平均显著下降 ( $P$  值均  $< 0.01$ ), 而 Ang II (100 nmol/L) + PD123319 (100 nmol/L) 处理组均无明显变化 ( $P$  值均  $> 0.05$ )。**结论:** Ang II 通过 AT1 受体介导, 可剂量依赖性诱导大鼠 PSCs 增殖和胶原合成, 从而参与胰腺纤维化的发生。

**[关键词]** 胰星状细胞; 细胞增殖; 胶原; 血管紧张素 II

**[中图分类号]** R 576 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0272-04

### Ang II induces proliferation and collagen synthesis in rat pancreatic stellate cells

LU Lin, LI Zhao-shen\*, XU Guo-ming, ZOU Duo-wu, TU Zhen-xing, GONG Yan-fang (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of Ang II on cellular proliferation and activation of cultured rat pancreatic stellate cells (PSCs). **Methods:** Growth arrest was induced in the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> passage rat PSCs by culturing with serum-free DMEM for 48 h, then the PSCs were incubated for 24 h or 48 h with serum-free culture medium containing different concentrations of Ang II (0, 1, 10, and 100 nmol/L) in the presence or absence of ZD7155 and PD123319, the specific antagonists of Ang II type 1 and 2 receptors (AT1 and AT2). The DNA synthesis rate was investigated by using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, collagen synthesis rate by [<sup>3</sup>H]proline incorporation,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression by Western blot analysis, and procollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA expression by Northern blot analysis. **Results:** Treatment of cells with Ang II for 24 h resulted in a dose-dependent increase in DNA synthesis, with statistically significant increase at 10 and 100 nmol/L (both  $P < 0.05$  vs normal control). Treatment for 48 h with Ang II at concentrations of 1, 10, and 100 nmol/L dose-dependently induced collagen synthesis and procollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA expression (both  $P < 0.05$  vs normal control). The above effects of Ang II (100 nmol/L) were inhibited by ZD7155 ( $P < 0.01$  vs Ang II alone) but not by PD123319 ( $P > 0.05$  vs Ang II alone). No significant increase in the expression of  $\alpha$ -SMA protein was observed in response to stimulation with increasing concentrations of Ang II. **Conclusion:** The present study indicates that Ang II, mediated by AT1 receptor, can dose-dependently induce the proliferation and collagen production in rat PSCs, thus participating in the pancreatic fibrogenesis.

**[KEY WORDS]** pancreatic stellate cells; cell proliferation; collagen; angiotensin II

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 272-275]

大量研究证实胰腺组织存在一局部特异的肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS)。近来有动物实验<sup>[1]</sup>表明血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 在胰腺纤维化的发生中起到了重要作用, 但其作用机制尚不清楚。由于胰星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 是参与胰腺纤维化的主要效应细胞<sup>[3]</sup>, 故本研究将观察 Ang II 对体外培养的大鼠 PSCs 增殖和胶原合成的影响, 以

初步揭示 Ang II 参与胰纤维化的细胞学作用机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂 DMEM、胎牛血清及其他细胞培养试剂

**[作者简介]** 鲁 临, 博士生, 副主任医师。现在山东省临沂市人民医院消化内科, 临沂 276003。

\* Corresponding author. E-mail: zhsl@81890.net

为 Gibco BRL 公司产品;人 Ang II 为 Calbiochem 公司产品;ZD7155 为 Tocris Cookson 公司产品;PD123319 为 Sigma 公司产品;PVDF 膜为 Millipore 公司产品;尼龙膜 (Hybond-N<sup>+</sup>)、<sup>[3H]</sup>thymidine、<sup>[3H]</sup>proline、<sup>[α-<sup>32</sup>P]</sup>dCTP、DNA 随机引物标记试剂盒和 ECL 试剂盒为 Amersham Pharmacia 公司产品;小鼠抗大鼠 α-平滑肌动蛋白(α-SMA)和 β-actin 抗体及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体为 Santa Cruz 公司产品。

**1.2 大鼠 PSCs 培养及处理** 大鼠 PSCs 的分离根据我们以前报道的方法进行<sup>[4]</sup>。分离的 PSCs 培养于含 20% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。第 4~7 传代细胞用于本实验。70%~80% 融合的细胞用无血清 DMEM 培养 48 h 后,换含不同浓度 Ang II 的新鲜无血清培养基进行 Ang II 干预实验。Ang II 终浓度为 1、10、100 nmol/L。另外,在加入高浓度 Ang II (100 nmol/L)刺激前,先加入 100 nmol/L 的 AT1 受体拮抗剂 ZD7155 或 AT2 受体拮抗剂 PD123319(ZD7155 和 PD123319 均用去离子水溶解)预孵育 2 h,以观察它们是否可阻断 Ang II 对 PSCs 的作用。正常对照组仅加入新鲜无血清培养基。每组设 4 个复孔。

**1.3 细胞增殖检测** 采用<sup>[3H]</sup>-TdR 掺入实验检测细胞 DNA 合成速率。培养于 24 孔板中的 PSCs 在 Ang II 刺激 20 h 后,加入<sup>[3H]</sup>-TdR(1 μl/孔)继续孵育 4 h。收集细胞,用液闪仪测定 cpm 值。

**1.4 胶原合成检测** 参照有关文献<sup>[5]</sup>,采用<sup>[3H]</sup>-脯氨酸掺入实验检测细胞胶原合成能力。检测的 cpm 值用细胞 DNA 含量纠正,以排除细胞增殖对结果的影响。

**1.5 Western 印迹检测 α-SMA** 经 100 nmol/L Ang II 刺激 24 h、48 h、72 h 后的细胞用 SDS 溶液裂解后,离心取上清。蛋白浓度采用 BCA 法测定。取 50 μg 蛋白,经 SDS-PAGE(12%分离胶,4%积层胶)分离后,采用半干电转方法将蛋白转移到 PVDF 膜上。用含 5%BSA 的 TBST 封闭后,加入 1:500

稀释的抗 α-SMA 和抗 β-actin 抗体于室温下孵育 2 h,随后加入 1:3 000 稀释的二抗于室温孵育 1 h,最后加入 ECL 试剂显影。采用 Fluor-S-Multi Imager 和 4.1 版本 Quantity1 软件(Bio-Rad)分析各条带灰度面积值。β-actin 蛋白表达为内参照。

**1.6 Northern 印迹法检测 I 型前胶原基因表达** 细胞总 RNA 采用 TRIzol 试剂分离,根据 260 nm 波长下的光密度值进行定量。大鼠 I 型前胶原基因和 β-actin cDNA 采用 RT-PCR 制备,并经测序证实。探针标记采用随机引物法,按试剂盒说明书操作。大鼠 I 型前胶原基因引物序列为:上游 5'-CCT GCT GGA CCC CGA GGA AAC-3',下游 5'-TCA CAC CAG TAT CAC CAG GT-3';β-actin 引物序列为:上游 5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3'和 5'-TGG ACT GTC TGA TGG AGT A-3'。取 10 μg 总 RNA,经 1.2%琼脂糖 2%变性甲醛凝胶电泳后,EB 染色观察 RNA 完整性及上样量。采用毛细转移法将 RNA 转移到尼龙膜上。杂交后膜于-70℃放射自显影 1~7 d。采用图像分析系统计算各条带灰度面积值。β-actin mRNA 表达为内参照。

**1.7 统计学处理** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析比较各组间差异,所有统计分析均经 SPSS11.0 软件处理完成。

**2 结果**

**2.1 Ang II 对大鼠 PSCs 增殖的影响** 1、10 和 100 nmol/L Ang II 刺激 24 h 后,各组细胞 DNA 合成速率分别为正常对照组的 112%( $P > 0.05$ )、145%( $P < 0.05$ )和 170%( $P < 0.05$ )。Ang II (100 nmol/L) + ZD7155(100 nmol/L)处理组细胞 DNA 合成率较 Ang II (100 nmol/L)组显著下降( $P < 0.01$ ),而 Ang II (100 nmol/L) + PD123319 (100 nmol/L)处理组细胞与 Ang II (100 nmol/L)组无显著性差异( $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 Ang II 对大鼠 PSCs 增殖、胶原合成、前胶原 α1(I) mRNA 表达的影响

Tab 1 Effects of Ang II on cell proliferation, collagen synthesis, and procollagen α1(I) mRNA expression in rat PSCs (n=4,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	DNA synthesis rate(cpm)	Collagen synthesis rate(cpm)	Procollagen α1(I) mRNA
Control	368.6±62.8	2048.4±259.3	0.45±0.10
1 nmol/L Ang II	413.5±59.0	2520.9±233.6	0.61±0.19
10 nmol/L Ang II	534.4±60.3*	2868.7±268.8*	0.78±0.22*
100 nmol/L Ang II	626.1±63.5*	3381.5±263.3**	0.27±0.36**
100 nmol/L Ang II +100 nmol/L ZD7155	324.4±55.7△△	1833.7±284.0△△	0.41±0.20△△
100 nmol/L Ang II +100 nmol/L PD123319	355.3±69.6	1942.6±309.2	1.20±0.25

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control; △△  $P < 0.01$  vs 100 nmol/L Ang II

2.2 Ang II 对大鼠  $\alpha$ -SMA 表达的影响 见图 1。100 nmol/L Ang II 刺激 24 h、48 h 和 72 h 后细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白水平分别为  $0.41 \pm 0.17$ 、 $0.37 \pm 0.15$ 、 $0.32 \pm 0.20$ ，与正常对照组的  $0.36 \pm 0.10$  相比均无明显差异。

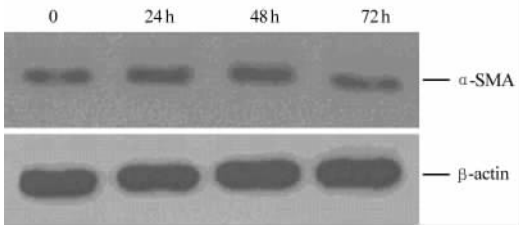


图 1 Western 印迹检测大鼠 PSCs  $\alpha$ -SMA 表达  
Fig 1 Western blot analysis of  $\alpha$ -SMA expression in rat PSCs

2.3 Ang II 对大鼠 PSCs 胶原合成的影响 Ang II 刺激 48 h 后各组细胞的胶原合成率分别为正常对照组细胞的 123% (1 nmol/L Ang II,  $P < 0.05$ )、140% (10 nmol/L Ang II,  $P < 0.05$ ) 和 165% (100 nmol/L Ang II,  $P < 0.01$ )；Ang II (100 nmol/L) + ZD7155 (100 nmol/L) 处理组细胞胶原合成率较 Ang II (100 nmol/L) 组显著下降 ( $P < 0.01$ )，而 Ang II (100 nmol/L) + PD123319 (100 nmol/L) 处理组细胞与 Ang II (100 nmol/L) 组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

2.4 Ang II 对大鼠 PSCs 前胶原  $\alpha 1(I)$  mRNA 表达的影响 1、10 和 100 nmol/L Ang II 处理 48 h 后，各组细胞前胶原  $\alpha 1(I)$  mRNA 表达水平较正常对照组均显著增加 ( $P$  值均  $< 0.05$ )。Ang II (100 nmol/L) + ZD7155 (100 nmol/L) 处理组细胞前胶原  $\alpha 1(I)$  mRNA 表达水平较 Ang II (100 nmol/L) 处理组显著下降 ( $P < 0.01$ )，而 Ang II (100 nmol/L) + PD123319 (100 nmol/L) 处理组细胞与 Ang II (100 nmol/L) 组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2 和表 1)。

### 3 讨论

胰腺纤维化是慢性胰腺炎的重要病理学特征，主要是由于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)，特别是 I 型胶原的过度沉积造成的。近年研究证实胰腺存在局部的 RAS，提示其可能在胰腺生理和病理生理中发挥作用。有研究表明血管紧张素 AT1 受体拮抗剂 candesartan (坎地沙坦) 可明显减轻大鼠胰腺纤维化程度，证明 Ang II 在胰腺纤维化的发生中起到了重要作用。然而，Ang II 参与胰

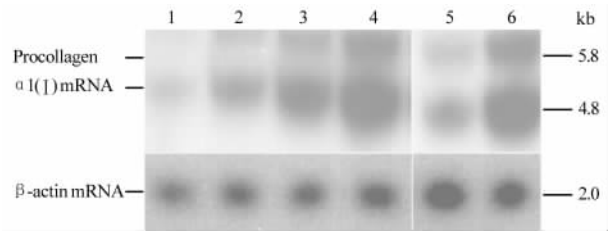


图 2 Northern 印迹检测大鼠 PSCs 前胶原  $\alpha 1(I)$  mRNA 表达

Fig 2 Northern blot analysis of procollagen  $\alpha 1(I)$  mRNA expression in rat PSCs

1: Control; 2: 1 nmol/L Ang II; 3: 10 nmol/L Ang II; 4: 100 nmol/L Ang II; 5: 100 nmol/L Ang II + 100 nmol/L ZD7155; 6: 100 nmol/L Ang II + 100 nmol/L PD123319

腺纤维化的作用机制尚不清楚。PSCs 形态和功能类似肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs)，活化的 PSCs 可合成各种 ECM 蛋白成分包括 I、III 型胶原和 FN 等，是介导胰腺纤维化发生的主要效应细胞<sup>[3]</sup>。故本研究观察了 Ang II 对体外培养的大鼠 PSCs 增殖和活化的影响，以阐明 Ang II 参与影响纤维化的细胞学机制。

正常情况下，PSCs 处于静止状态，细胞增殖缓慢，仅合成少量 ECM 成分。在胰腺损伤时，PSCs 发生活化，细胞由静止表型转化为具有高度自我增殖能力的肌成纤维样细胞，并开始表达  $\alpha$ -SMA。活化的 PSCs 可合成大量 I、III 型胶原、层粘连蛋白和纤维连接素等 ECM 蛋白，成为胰腺纤维化时 ECM 的主要来源<sup>[6, 7]</sup>。本研究结果表明 Ang II 可剂量依赖性地提高大鼠 PSCs 的 DNA 合成速率和胶原合成率，提示 Ang II 能促进大鼠 PSCs 的增殖和胶原合成。由于 I 型前胶原是 ECM 中含量最多的成分，故我们以 I 型前胶原为指标，检测 Ang II 处理 48 h 诱导 I 型前胶原基因转录的情况，结果 I 型前胶原 mRNA 表达水平均明显增加并呈剂量依赖性。初步表明 Ang II 通过直接诱导胶原基因表达而增加胶原合成。Ang II 促进 PSCs 增殖和胶原的作用可被 AT1 受体特异性拮抗剂 ZD7155 所阻断，而 AT2 受体拮抗剂 PD980589 无明显作用。一般认为 Ang II 的生物学作用主要是由其 AT1 和 AT2 受体介导的。在大鼠 PSCs，我们的研究表明活化的大鼠 PSCs 仅表达 AT1 受体，而不表达 AT2 受体 mRNA 和蛋白<sup>[8]</sup>。本研究发现 AT1 受体特异性拮抗剂 ZD7155 可阻断 Ang II 诱导的 PSCs 增殖、胶原合成和 I 型胶原基因表达，进一步证实 Ang II 对大鼠

PSCs 的作用是由 AT1 受体所介导的。

细胞表达  $\alpha$ -SMA 是 PSCs 由静止表型活化(转化)为肌成纤维样细胞表型的重要标志物,但本研究中,Ang II 处理 24、48、72h 后对  $\alpha$ -SMA 表达与对照组相比,并无明显的诱导作用,这提示 Ang II 不参与大鼠 PSCs 的活化或转化过程。最近有 2 篇文章<sup>[9,10]</sup>报道了 Ang II 对大鼠 PSCs 的作用。与本研究结果一致,他们的研究表明 Ang II 不影响大鼠 PSCs 活化或转化。但其研究同时表明 Ang II 仅具有促增殖作用,对 PSCs 的胶原合成功能没有影响。他们采用 ELISA 方法检测了 Ang II 刺激后细胞上清液中 I 型胶原含量的变化,结果发现 I 型胶原含量无明显变化。然而,由于 ELISA 方法仅能检测到降解形式的 I 型胶原,不能准确反映细胞 I 型胶原蛋白合成能力,故其结果不具备说服力。多数学者认为直接检测细胞内而不是上清中 I 型蛋白含量,并结合 [<sup>3</sup>H]-脯氨酸掺入实验、Northern 印迹等技术,才能准确反应胶原合成能力。

本研究结果表明,尽管 Ang II 不影响大鼠 PSCs 活化,但可刺激其增殖和纤维化活化,这可能是 Ang II 参与胰腺纤维化发生的作用机制。

#### [参考文献]

[1] Kuno A, Yamada T, Masuda K, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124: 1010-1019.

- [2] Yamada T, Kuno A, Masuda K, et al. Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307: 17-23.
- [3] Haber PS, Keogh GW, Apte MV, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155: 1087-1095.
- [4] 贾一韬,李兆申. 大鼠胰星状细胞的分离与培养[J]. *胰腺病学*, 2003, 3: 158-161.
- [5] Shek FW, Benyon RC, Walker FM, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160: 1787-1798.
- [6] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation and culture[J]. *Gut*, 1998, 43:128-133.
- [7] Bachem MG, Schneider E, Gross H, et al. Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315: 905-911.
- [8] 鲁 临,李兆申,许国铭,等. 血管紧张素 II 受体在大鼠胰星状细胞上的表达及调节[J]. *中华消化杂志*, 2005, 25: 307-308.
- [9] Hama K, Ohnishi H, Yasuda H, et al. Angiotensin II stimulates DNA synthesis of rat pancreatic stellate cells by activating ERK through EGF receptor transactivation[J]. *Gastroenterology*, 1998, 115: 421-432.
- [10] Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, et al. Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells[J]. *Pancreas*, 2004, 28: 120-137.

[收稿日期] 2005-07-05

[修回日期] 2005-10-20

[本文编辑] 曹 静

### Stereoselective pharmacokinetics of tetrahydropalmatine after oral administration of (–)-enantiomer and the racemate

Hong Z, Fan G, Chai Y, Yin X, Wu Y (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolites Research, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] Tetrahydropalmatine (THP) is a biologically active ingredient isolated from a traditional Chinese herb *Rhizoma corydalis* (yanhusuo). THP is a racemic mixture which contains 50% of the (+) and 50% of (–) enantiomer. The (–) enantiomer accounts for most of the analgesic effects. Plasma concentrations of THP enantiomers were analyzed by chiral high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Chiralcel OJ column with quantification by UV at 230 nm. The method was used to determine the pharmacokinetics of THP enantiomers in rats and dogs after oral administration of rac-THP or (–)-THP. The pharmacokinetic profiles of the two enantiomers after dosing with rac-THP were significantly different both in rats and dogs. The mean  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  values in rats were  $1.93 \pm 0.36$  microg/ml and  $6.65 \pm 2.34$  microg $\times$ h/ml for the (–) enantiomer, and  $1.11 \pm 0.25$  microg/ml and  $2.03 \pm 0.45$  microg $\times$ h/ml for the (+) enantiomer. The mean  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  in dogs were  $1.60 \pm 0.81$  microg/ml and  $9.88 \pm 2.58$  microg $\times$ h/ml for the (–) enantiomer, while  $0.36 \pm 0.21$  microg/ml and  $1.22 \pm 0.40$  microg $\times$ h/ml for the (+) enantiomer. rac-THP at 40 mg/kg and (–)-THP at 20 mg/kg had very similar plasma concentration-time profiles, and  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ , and  $t_{1/2}$  of the (–) enantiomer in both rats and dogs, indicating that the two treatments were equivalent with respect to the pharmacokinetic properties of the (–) enantiomer.

[Chirality, 2005, 17: 293-296]