

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0437-04

• 实验研究 •

N-乙酰基-丝氨酰-天门冬酰-赖氨酰-脯氨酸对大鼠心脏成纤维细胞 c-Jun氨基末端激酶通路活化的影响

张晓明^{1,2}, 罗玲¹, 杨林³, 张丽娟¹, 李倩¹, 孙影⁴, 王瑞敏¹, 魏中秋¹, 杨方^{1,4}

(华北煤炭医学院 1 实验中心, 4 病理解剖学教研室, 河北省唐山市 063000, 2 武警河北总队唐山市支队; 3 成都大学医护学院)

[关键词] N-乙酰基-丝氨酰-天门冬酰-赖氨酰-脯氨酸; 血小板源生长因子; c-Jun氨基末端激酶; 心脏纤维化

[摘要] 目的 探讨 N-乙酰基-丝氨酰-天门冬酰-赖氨酰-脯氨酸 (AcSDKP) 对血小板源生长因子诱导的大鼠心脏成纤维细胞增殖及胶原合成以及 c-Jun氨基末端激酶表达的影响。方法 选用新生 Wistar 大鼠心脏成纤维细胞作为实验研究材料, MTT 法检测心脏成纤维细胞代谢活性的改变, 免疫细胞化学法检测 iv 型、Ⅲ型胶原表达的改变, Western Blotting 检测大鼠心脏成纤维细胞中磷酸化 JNK (p-JNK) 和 JNK 蛋白及 iv 型、Ⅲ型胶原蛋白的表达。结果 10 μg/L 血小板源生长因子刺激下, 代表大鼠心脏成纤维细胞代谢活性的 OD 值增加, iv 型、Ⅲ型胶原表达增强, 表明血小板源生长因子刺激了心脏成纤维细胞增殖, 促进了胶原的合成。同时 p-JNK 蛋白表达增高, 而 JNK 蛋白表达无明显改变。10⁻⁹ mol/L AcSDKP 能够抑制血小板源生长因子诱导的大鼠心脏成纤维细胞代谢活性, 同时抑制了 iv 型、Ⅲ型胶原及 p-JNK 蛋白的表达, 而 JNK 蛋白表达无明显改变。结论 AcSDKP 能够通过阻断血小板源生长因子介导的 JNK 通路激活进而抑制大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原蛋白表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of AcSDKP on the Activation of C-Jun N-Terminal Kinase Induced by PDGF in Cultured Rat Cardiac Fibroblasts

ZHANG Xiao-Ming LUO Ling YANG Lin ZHANG Li-Juan LI Qian SUN Ying WANG Rui-Min WEI Zhong-Qiu and YANG Fang

(Experimental and Research Center, North China Coal Medical University, Tangshan, Hebei 063000, China)

[KEY WORDS] N-Acetylserine-L-tyrosine-L-proline; Platelet-Derived Growth Factor; c-Jun NH₂-Terminal Kinase; Cardiac Fibrosis[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of N-acetylserine-L-tyrosine-L-proline (AcSDKP) on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis and the expression of JNK.

Methods Neonatal rat cardiac fibroblasts were used in the experiment; the proliferation of cardiac fibroblasts was observed by MTT assay; the expression of type iv and type Ⅲ collagen protein in cardiac fibroblasts was detected by immunocytochemistry assay. The expression of JNK protein, phosphorylation of JNK protein and type iv and type Ⅲ collagen protein in cardiac fibroblasts was measured by Western Blotting analysis.

Results 10 μg/L PDGF increased cell metabolic activity, expression of type iv and type Ⅲ collagen and phosphorylation of JNK, while the protein levels of JNK were not changed. 10⁻⁹ mol/L AcSDKP could inhibit cardiac fibroblasts proliferation, expression of type iv and type Ⅲ collagen and phosphorylation of JNK mediated by PDGF, while the protein levels of JNK were not significantly changed.

Conclusion AcSDKP could inhibit the proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts induced by PDGF through blocking activation of JNK pathway.

心脏纤维化是心室结构重建的重要病理改变之一,也是许多心脏病发展为心功能衰竭的重要病

理过程,其主要形态学表现为心脏间质成纤维细胞增殖和细胞外基质(包括胶原)的沉积。血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是一种较强的促分裂原,能刺激多种细胞的分裂增殖,并通过刺激靶细胞胶原的合成在纤维化疾病形成过程中起重要作用^[1]。有报道一些细胞因子可通过 c-Jun氨基末端激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK)信号转导途径调节细胞的增殖和细胞外基质的合成^[2]。近年来体内、外实验研究证实 N-乙酰基-丝

[收稿日期] 2010-01-19 [修回日期] 2010-05-25

[基金项目] 中华人民共和国人事部留学人员科技活动项目(国人厅发[2006]164号);河北省科技厅博士基金项目(04547002D-5),唐山市新药基础研究重点实验室项目(04362001B-9)

[作者简介] 张晓明,硕士,主要从事心血管疾病预防研究,Email为 z3x2m@yahoo.com.cn; 通讯作者杨方,博士,教授,博士研究生导师,主要从事器官(心、肺)纤维化机制与防治研究,Email为 fan-gyang02@sohu.com.

氨酰-天门冬酰-赖氨酰-脯氨酸 (N-acetylserylaspartyllysylproline, AcSDKP) 具有拮抗心脏纤维化的作用^[1,3,4]。有文献报道, AcSDKP 可以通过阻抑 Smad 和细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK 1/2) 途径而抑制心脏成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成^[5,6]。然而 AcSDKP 能否通过对 JNK 信号转导途径的调节而发挥抗心脏纤维化的作用, 目前国内外尚未见相关文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 Wistar 大鼠 (华北煤炭医学院实验动物中心提供)。小鼠抗大鼠 iv 型和 Ⅳ型胶原单克隆抗体 (Sigma 产品); JNK 及磷酸化 JNK (phospho-JNK) 抗体 (美国 Santa Cruz 产品); 羊抗小鼠二抗、羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒、BCIP/NBT 显色试剂盒 (武汉博士德生物有限公司产品); SP600125 (Sigma 产品); PDGF-BB (Rat Recombinant R&D 产品); MTT (天津灏阳生物制品有限公司)。

1.2 心脏成纤维细胞的差速贴壁分离培养

取新生 Wistar 大鼠, 按照文献 [6,7] 的方法获得原代及传代培养的心脏成纤维细胞, 并进行心脏成纤维细胞鉴定。实验时将培养的细胞调整同步化后, 使细胞静止于 G₀/G₁ 期。第 2 代细胞用于实验研究。

1.3 实验分组

实验分: 对照组 (0.4% 胎牛血清的 DEME 培养液)、PDGF 刺激组 (0.4% 胎牛血清的 DMEM 培养液中加入终浓度为 10 μg/L 的 PDGF)、SP600125 干预组 (以 10 mmol/L SP600125 预孵育 15 min 后再加入终浓度为 10 μg/L PDGF) 和 AcSDKP 干预组 (0.4% 胎牛血清培养条件下, 10⁻⁹ mol/L AcSDKP 预孵育 30 min 后给予 10 μg/L PDGF)。

1.4 MTT 法检测心脏成纤维细胞代谢活性

细胞同步化后, 根据分组条件, 按文献 [1] 的方法进行, 每组设 5 个重复孔平行添加相应的试剂, 以 OD 值的大小代表心脏成纤维细胞代谢活性。实验重复 2 次以上。

1.5 免疫细胞化学法检测心脏成纤维细胞 iv 型、Ⅳ型胶原的表达

将第二代细胞以 1 × 10⁸ /L 密度接种于放置无菌盖玻片的 24 孔培养板中, 按照实验分组分别加入相应试剂 (每组平行 5 孔加样), 刺激 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 按免疫细胞化学常规染色

方法分别做 iv 型和 Ⅳ型胶原的免疫细胞化学染色。其中, 小鼠抗大鼠 iv 型和 Ⅳ型胶原单克隆抗体稀释度为 1: 150 DAB 显色。将每张阳性染色的细胞爬片进行积分光密度测定。测量时每张细胞爬片随机选取 5 个 200 倍的显微镜视野 (每个视野下约 100 个细胞), 用北航医学图像分析软件测定积分光密度值 (IOD 值)。

1.6 Western Blotting 检测心脏成纤维细胞 JNK 和 p-JNK 表达及 iv 型和 Ⅳ型胶原蛋白的表达

细胞同步化后, 按照实验分组分别加入相应试剂, 而后于 37°C、5% CO₂ 培养箱内孵育培养 (检测 JNK 及 p-JNK 蛋白表达孵育 30 min, 检测 iv 型和 Ⅳ型胶原蛋白表达孵育 48 h), 弃培养液, PBS 洗三次后, 每组分别加入 250 μL 新鲜配制的细胞裂解液, 冰上振荡裂解 30 min, 收集裂解细胞, 于 12 000 r/min、4°C 离心 15 min, 收集上清, -70°C 保存备用。以考马斯亮蓝 R-250 染色测定蛋白浓度后, 以 15 μg/孔上样, 电泳并转膜。5% 牛血清白蛋白 37°C 封闭 1 h, JNK 及 p-JNK 单克隆抗体 (1: 1 000 稀释)、iv 型和 Ⅳ型胶原单克隆抗体 (1: 500 稀释) 4°C 孵育过夜。二抗 (1: 3 000 稀释) 37°C 孵育 1 h。BCIP/NBT (1: 50 稀释) 显色 3 min。以 Image J 软件对蛋白表达条带进行扫描 (OD 值) 及定量分析。

1.7 统计学处理

采用单因素方差分析进行组间均数比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 MTT 法检测心脏成纤维细胞代谢活性

与对照组 (0.086 ± 0.031) 相比, PDGF 刺激组 (0.119 ± 0.037) 细胞代谢活性明显增高, 为对照组的 1.36 倍 ($P < 0.05$); 当加入特异性阻断剂 SP600125 预孵育心脏成纤维细胞 15 min 后再给予 PDGF, 其细胞代谢活性 (0.098 ± 0.043) 明显下降, 仅为 PDGF 刺激组的 82.2% ($P < 0.05$)。同样当给予浓度为 10⁻⁹ mol/L AcSDKP 预孵育心脏成纤维细胞 30 min 后, 再加入 PDGF 孵育心脏成纤维细胞 48 h, 细胞代谢活性 (0.096 ± 0.039) 较 PDGF 刺激组明显降低, 为 PDGF 刺激组的 80.4% ($P < 0.05$)。但 SP600125 干预组和 AcSDKP 干预组细胞代谢活性仍高于对照组, 为对照组的 1.12 和 1.09 倍。

2.2 免疫细胞化学法检测心脏成纤维细胞 iv 型和 Ⅳ型胶原的表达

与对照组相比, PDGF 刺激组心脏成纤维细胞

的 iv 型、 α 型胶原表达增强, OD 值分别为对照组的 4.04 倍和 3.19 倍 ($P < 0.05$); 与 PDGF 刺激组相比较, SP600125 干预组 iv 型和 α 型胶原表达有所下降, 分别为 PDGF 刺激组的 70.33% 和 61.56%; 而 A α SDKP 干预组 iv 型、 α 型胶原表达也下降, 分别为

PDGF 刺激组的 68.57% 和 72.94% ($P < 0.05$)。但 SP600125 干预组和 A α SDKP 干预组的 iv 型、 α 型胶原表达仍高于对照组, iv 型胶原表达分别为对照组的 2.94 倍和 2.76 倍, α 型胶原表达分别为对照组的 1.96 倍和 2.24 倍 ($P < 0.05$; 表 1 和图 1)。

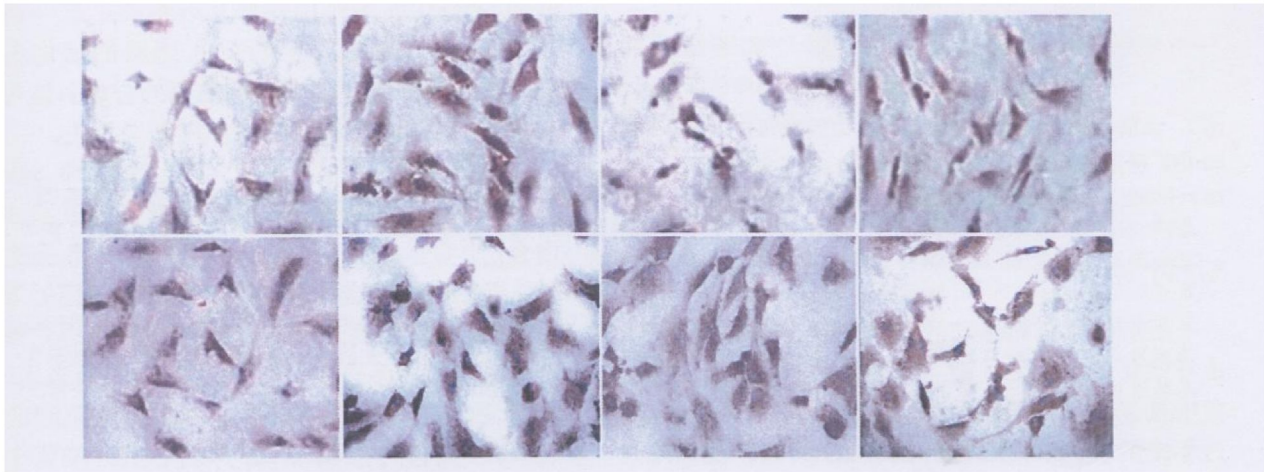


图 1 免疫细胞化学染色法检测大鼠心脏成纤维细胞 iv 型 (上图) 和 α 型 (下图) 胶原的表达 ($\times 200$) 从左到右依次为对照组、PDGF 刺激组、A α SDKP 干预组和 SP600125 干预组。

表 1 免疫细胞化学法检测 A α SDKP 对血小板源生长因子诱导的心脏成纤维细胞 iv 型和 α 型胶原表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	iv 型胶原	α 型胶原
对照组	1.24 \pm 0.40	3.02 \pm 0.30
PDGF 刺激组	5.04 \pm 0.60 ^a	9.65 \pm 0.40 ^a
SP600125 干预组	3.67 \pm 0.60 ^{ab}	5.94 \pm 0.40 ^{ab}
A α SDKP 干预组	3.45 \pm 0.50 ^{ab}	6.79 \pm 0.40 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 PDGF 刺激组比较。

2.3 Western Blotting 检测心脏成纤维细胞 iv 型和 α 型胶原蛋白的表达

与对照组相比, PDGF 刺激组 iv 型和 α 型胶原表达增强, 分别为对照组的 1.58 倍和 1.84 倍 ($P < 0.05$)。与 PDGF 刺激组相比, SP600125 干预组 iv 型和 α 型胶原表达有所下降, 分别为 PDGF 刺激组的 74.1% 和 76.9% ($P < 0.05$); 而 A α SDKP 干预组 iv 型和 α 型胶原的表达也下降, 分别为 PDGF 刺激

组的 75.9% 和 78.1% ($P < 0.05$)。但 SP600125 干预组和 A α SDKP 干预组的 iv 型、 α 型胶原表达仍高于对照组, iv 型胶原表达分别为对照组的 1.20 倍和 1.17 倍, α 型胶原表达分别为对照组的 1.40 倍和 1.45 倍 ($P < 0.05$; 表 2 和图 2)。

2.4 Western Blotting 检测心脏成纤维细胞 JNK 及 p-JNK 蛋白的表达

与对照组相比, PDGF 刺激组 p-JNK 蛋白表达增强, 为对照组的 4.24 倍 ($P < 0.05$)。与 PDGF 刺激组相比, SP600125 干预组 p-JNK 蛋白表达减弱, 仅为 PDGF 刺激组的 60.37% ($P < 0.05$); 而 A α SDKP 干预组 p-JNK 蛋白表达也减弱, 为 PDGF 刺激组的 48.8%。但 SP600125 干预组和 A α SDKP 干预组 p-JNK 蛋白的表达仍高于对照组, 分别为对照组的 2.56 倍和 2.07 倍 ($P < 0.05$)。然而, JNK 蛋白表达在各组间差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 2 和图 2)。

表 2 Western Blotting 检测 A α SDKP 对血小板源生长因子诱导的心脏成纤维细胞 iv 型和 α 型胶原以及 JNK、p-JNK 表达的影响

分 组	iv 型胶原	α 型胶原	p-JNK	JNK
对照组	8.036 \pm 3.768	1.245 \pm 0.687	17.495 \pm 6.812	32.748 \pm 7.888
PDGF 刺激组	12.697 \pm 4.374 ^a	20.691 \pm 1.147 ^a	74.181 \pm 18.15 ^a	35.303 \pm 6.553
SP600125 干预组	9.402 \pm 1.037 ^{ab}	15.743 \pm 0.605 ^{ab}	44.788 \pm 7.730 ^{ab}	35.041 \pm 2.704
A α SDKP 干预组	9.643 \pm 0.519 ^{ab}	16.306 \pm 0.978 ^{ab}	36.216 \pm 5.781 ^{ab}	35.565 \pm 2.867

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 PDGF 刺激组比较。

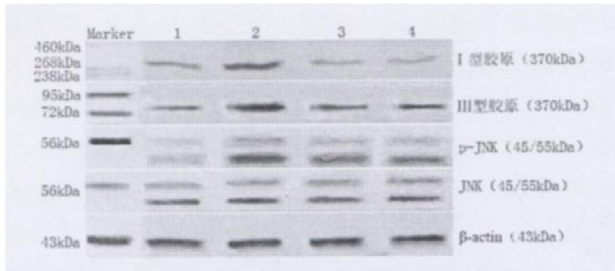


图 2 大鼠心脏成纤维细胞 iv 型和 Ⅲ型胶原蛋白以及 p-JNK 和 JNK 蛋白的表达 1 为对照组, 2 为 PDGF 刺激组, 3 为 A cSDKP 干预组, 4 为 SP600125 干预组。

3 讨论

心脏间质细胞增殖和胶原成分的异常增多是形成纤维化的病理学基础。纤维化过程中心脏结构的重构是许多心脏病发展为心功能衰竭的重要过程。近年来的体内、外实验研究表明, A cSDKP 能够通过抑制间质细胞的增殖和胶原合成, 减轻高血压和心肌梗死后心脏纤维化的程度, 表明 A cSDKP 具有一定的抗心脏纤维化作用^[3, 4, 7, 8]。本实验结果再次显示 A cSDKP 能够抑制心脏成纤维细胞的增殖和 iv 型、Ⅲ型胶原蛋白的表达, 进一步证实了 A cSDKP 对心脏纤维化具有一定的拮抗作用。

JNK 是 MAPK 家族中的重要成员, 现已证实有三组编码 JNK 的基因, 分别为 JNK1、JNK2 和 JNK3。JNK1 和 JNK2 基因在全身广泛表达, 而 JNK3 的表达仅见于脑、心脏和睾丸^[9]。有研究报道, 用 10 nmol/L 的 JNK 特异性阻断剂 SP600125 预处理肺间质成纤维细胞, 可以明显减弱转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 介导的 JNK 蛋白的磷酸化, 同时抑制了间质细胞的增殖和细胞外基质的合成与分泌, 提示 JNK 信号通路参与了 TGF- β 1 诱导的致肺纤维化的病变过程^[10]。一些研究亦证实 JNK 信号转导通路参与了多种脏器纤维化的发生^[9-11]。显然激活 JNK 信号通路对器官纤维化的形成、进展有着重要的影响。本实验结果显示, 在 PDGF 刺激作用下, 心脏成纤维细胞 p-JNK 表达较对照组增强 (JNK 表达无明显改变), 同时心脏成纤维细胞代谢活性和 iv 型、Ⅲ型胶原表达增加, 提示 PDGF 介导的 JNK 通路激活在心脏纤维化发生、发展过程中可能起重要作用。

本实验还发现当使用 JNK 特异性阻断剂 SP600125 预处理心脏成纤维细胞后, 由 PDGF 介导的心脏成纤维细胞 p-JNK 的表达明显减弱, 同时细胞的增殖和 iv 型、Ⅲ型胶原的表达也随之减弱, 表明

SP600125 能够通过阻断 JNK 通路而抑制成纤维细胞的增殖和胶原的合成。本实验我们还发现, 当应用 A cSDKP 预处理心脏成纤维细胞后再给予 PDGF 刺激, 其成纤维细胞的增殖和 iv 型、Ⅲ型胶原以及 p-JNK 蛋白的表达情况和抑制程度与特异性阻断剂 SP600125 的作用效果几近相同。这一结果提示 A cSDKP 能够通过阻断 JNK 通路的活化进而抑制心脏成纤维细胞的增殖和胶原的合成。这可能与 A cSDKP 抑制心脏纤维化的作用密切相关。

有研究报道 A cSDKP 可通过阻抑 Smad 和 ERK1/2 途径而抑制心脏成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成^[5, 6]。本实验发现, A cSDKP 还能通过阻断 JNK 通路的活化进而抑制心脏成纤维细胞的增殖和胶原的合成, 显然, A cSDKP 抑制心脏纤维化的作用可能是通过对多条信号转导通路的调节来实现的。然而, 这些通路间的相互关系 (包括通路间的串话现象) 以及它们在 A cSDKP 抑制心脏纤维化中的相互作用将是进一步探讨的课题。

【参考文献】

- 朱曦龄, 王丽平, 杨方, 等. A cSDKP 对 PDGF 诱导的大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的调节作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23 (1): 66-69
- Yong JK, Eun SJ, Hae YS, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95 (6): 1135-145
- Yang F, Yang XP, Liu YH, et al. A cSDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction [J]. *Hypertension*, 2004, 43 (2): 229-236
- Rhaleb NE, Peng H, Yang XP, et al. Long term effect of N-acetylseryl-aspartyl-L-lysylproline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-Kidney 1-Clip hypertension [J]. *Circulation*, 2001, 103 (25): 3136-141
- Pokharel Sarawati, Rasoul Saman, Rokhs Anton JM, et al. N-Acetylserine-L-lysyl-proline inhibits phosphorylation of smad2 in cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 2002, 40 (2): 155-161
- 张丽娟, 马文东, 杨嫣, 等. 细胞外信号调节激酶 1/2 在抗纤维化短肽 A cSDKP 调节大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原表达中的作用 [J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36 (5): 444-448
- 杨方, 朱曦龄, 王丽平, 等. 抗纤维化短肽 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸对大鼠心脏成纤维细胞胶原合成与降解的调节作用 [J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34 (9): 843-846
- 王立萍, 杨方. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与心肌纤维化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (4): 517-519
- Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19 (2): 142-149
- 许焯, 牟女蜀, 曾玉. JNK 信号通路在 TGF- β 诱导肺间质成纤维细胞基质分泌中的作用 [J]. 江苏大学学报 (医学版), 2007, 17 (6): 84-86
- 张绍洁, 吴黎明. 冠心病患者外周血单个核细胞基质金属蛋白酶 9/组织型金属蛋白酶试剂 1 及磷酸化 c-jun 蛋白表达改变与冠状动脉病变特征的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (3): 209-212 (此文编辑 许雪梅)