

瑞舒伐他汀对 TGF- β 1 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖及其胶原合成与分泌的作用和机制

黄 达, 潘 征, 蓝景生, 何金龙, 韦宝敏

(右江民族医学院附属医院心血管内科, 广西百色市 533000)

[关键词] 心脏成纤维细胞; 瑞舒伐他汀; 细胞增殖; 胶原蛋白; 心脏纤维化

[摘 要] 目的 探讨瑞舒伐他汀对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖及其胶原合成与分泌的作用和可能机制。方法 分离、培养新生 SD 大鼠的心脏成纤维细胞, 采用 CCK-8 比色法测定细胞数目。用 RT-PCR 检测 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白 mRNA 的表达, 用 ELISA 测定 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白含量, 用 Western blot 检测心脏成纤维细胞 Akt 的蛋白表达。结果 CCK-8 比色法显示, 瑞舒伐他汀能抑制 TGF- β 1 引起的心脏成纤维细胞增殖; RT-PCR 结果显示, 瑞舒伐他汀能抑制 TGF- β 1 诱导的 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白 mRNA 的表达; ELISA 结果显示, 瑞舒伐他汀能抑制 TGF- β 1 诱导的 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白分泌; Western blot 结果显示, 瑞舒伐他汀能抑制 TGF- β 1 诱导的 Akt 蛋白表达。结论 瑞舒伐他汀可能通过抑制 TGF- β 1 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖、I 型和 III 型胶原蛋白的合成与分泌来抑制 TGF- β 1 诱导的心脏纤维化, 其分子机制可能与抑制 Akt 信号通路有关。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Effects and Mechanism of Rosuvastatin on TGF- β 1-induced Proliferation and Collagen Synthesis and Secretion in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts

HUANG Da, PAN Zheng, LAN Jing-Sheng, HE Jin-Long, and WEI Bao-Min

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[KEY WORDS] Cardiac Fibroblasts; Rosuvastatin; Proliferation; Collagen; Cardiac Fibrosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects and mechanism of rosuvastatin on TGF- β 1-induced proliferation and collagen synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts. **Methods** Cardiac fibroblasts of neonatal SD rats were isolated and cultured, effect of rosuvastatin on fibroblast proliferation was detected by CCK-8, collagen synthesis was measured with real time-PCR, collagen secretion was checked by ELISA, Akt protein expression was tested by Western blot. **Results** Rosuvastatin dose-dependently inhibited TGF- β 1-induced cardiac fibroblast proliferation, collagen synthesis and collagen secretion, and rosuvastatin could also inhibit Akt activity. **Conclusions** Rosuvastatin may inhibit TGF- β 1-induced cardiac fibrosis through inhibiting cardiac fibroblast proliferation, collagen synthesis and collagen secretion. Its molecular basis may be associated with inhibiting Akt signaling pathway.

转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一种多功能的细胞因子, 可调节细胞的增殖、分化, 刺激多种细胞因子、炎症介质等活性物质的合成与分泌, 参与胞外基质构成及降解。已有报道证实 TGF- β 1 与醛固酮诱导的心肌纤维化密切相关^[1]。也有研究发现直接以 TGF- β 1 刺激体外培养

的心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblast, CF), 可诱导细胞增殖和胶原合成, I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白增多与排列紊乱, 导致心肌纤维化的发生, 为此抑制 TGF- β 1 生物学效应的治疗无疑成为心肌纤维化防治的重要策略。他汀类药物除具有调脂、抗炎症、抗氧化作用外, 还具有明显改善心脏重塑等功

[收稿日期] 2013-01-12

[基金项目] 广西科技规划项目基金 (桂科计字 200809) 资助

[作者简介] 黄达, 主治医师, 主要从事冠状动脉粥样硬化的发病机制研究, E-mail 为 guangxifeiniu@163.com。通讯作者潘征, 副主任医师, 主要从事冠状动脉粥样硬化的发病机制研究, E-mail 为 13977685871@139.com。蓝景生, 博士, 主任医师, 主要从事冠状动脉粥样硬化的发病机制研究。

能^[2]。本研究拟观察瑞舒伐他汀对 TGF- β 1 诱导的新生大鼠 CF 的增殖及其胶原合成与分泌的影响,探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物

出生 1~3 天的清洁级 SD 大鼠,由广州军区总医院动物实验中心提供。

1.2 实验试剂和药物

高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, RIPA 裂解液购自碧云天生物技术有限公司, Trizol、普通逆转录及 RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。瑞舒伐他汀、TGF- β 1 购自美国 Sigma 公司。p-Akt、Akt 抗体购自 Cell Signaling 公司, eIF5 (H-300, sc-25527) 抗体购自 Santa Cruz 公司, 山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 新生大鼠 CF 的分离及培养

出生 1~3 天的清洁级 SD 大鼠浸没于 75% 酒精,用组织镊夹住胸骨下缘,组织剪沿胸骨下缘剪开,暴露出心脏,用眼科剪剪下心室,剪去多余血管组织。PBS 洗涤 2 次,转移到血清瓶中,用小直剪快速把心脏剪碎。加入 400 kU/L II 胶原酶 5 mL 消化液, 37℃ 水浴, 150 r/min 振摇。连续消化 5~6 次, 每次 4 min, 收集后立刻与 5 mL DMEM 混匀。将收集的全部细胞用筛网过滤后, 1200 r/min 离心 5 min, 将收集的细胞置于 ϕ 10 cm 平皿, 5% CO₂、37℃ 静置 2 h, 采用差速贴壁方法进行分离 CF。实验采用培养的第 3 代细胞。

1.4 实验分组

实验分 5 组: 对照组为无血清 DMEM 培养液; TGF- β 1 刺激组, 将 TGF- β 1 加入到无血清 DMEM 培养液, 最终浓度为 5 μ g/L; 瑞舒伐他汀干预 1 组, 在 TGF- β 1 刺激组中加入瑞舒伐他汀干预, 最终浓度为 1 μ mol/L; 瑞舒伐他汀干预 2 组, 在 TGF- β 1 刺激组中加入瑞舒伐他汀干预, 最终浓度为 20 μ mol/L; 瑞舒伐他汀干预 3 组, 在 TGF- β 1 刺激组中加入瑞舒伐他汀干预, 最终浓度为 100 μ mol/L。

1.5 CCK-8 比色法检测细胞数目

实验用第 3 代细胞, 消化的 CF 悬液按 3000 个/孔培养于 96 孔板, 每孔 10% FBS 培养基 200 μ L, 5% CO₂、37℃ 孵箱中培养 24 h 后, 用无血清 DMEM 培养基培养 24 h, 按照以上分组进行刺激, 每组 6 个复孔, 培养 24 h 后加入每孔 10 μ L CCK-8, 继续孵育

4 h 后于酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度 A₄₅₀ 值, 计算细胞增殖率, 计算公式为: 细胞增殖率 = (实验组 A₄₅₀ 值 - 空白对照组 A₄₅₀ 值) / 空白对照组 A₄₅₀ 值 \times 100%。实验重复 3 次^[3]。

1.6 RT-PCR 检测 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达

按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 用分光光度计测定 RNA 的浓度, 存于 -80℃ 保存备用。按 Promega 公司逆转录试剂盒说明书操作, 将 1 μ g RNA 样品逆转录合成 cDNA, 将 cDNA 保存于 -20℃。按照已报道的 cDNA 序列设计相应的特异性引物扩增。I 型胶原蛋白基因上游引物序列为 5'-TGC CGT ATG GAS CTC AAG ATG-3', 下游引物序列为 5'-CAC AAG CGT GCT GTA GGT GAT-3'。III 型胶原蛋白基因的上游引物序列为 5'-AGA TCA TGT CTT CAC TCA AGT-3', 下游引物序列为 5'-TTT ACA TTG CCA TTG GCC TAG-3'。扩增内参 GAPDH 基因上游引物序列为 5'-ATC AAG AAG GTG GTG AAG CA-3', 下游引物序列为 5'-AAG GTG GAA GAA TGG GAG TTG -3'。反应体系: Premix Ex Taq (2 \times) 12.5 μ L、引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L、SYBR Green I 稀释液 2.5 μ L、ddH₂O 7.0 μ L 及模板 2 μ L, 总体积为 25 μ L。通过检测系统观察各扩增曲线、溶解曲线、标准曲线的线性回归系数 R 值, 用统计软件自动进行每 2 μ L 各样本中 mRNA 拷贝数的计算, 以 GAPDH 基因的拷贝数进行标化处理。

1.7 ELISA 检测 I 型和 III 型胶原蛋白含量

按试剂盒说明书进行操作, 每孔加入 40 μ L 检测稀释液后, 再加入 10 μ L 标准品、对照或蛋白样品, 37℃ 孵育 3 h。弃去孔内液体, 每孔用洗液洗 5 次, 弃净洗液, 每孔加入 100 μ L 底物液 (避光), 室温孵育 30 min。每孔加入 100 μ L 终止液, 使用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。

1.8 Western blot 检测 Akt 蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取 60 μ g 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将电泳后的蛋白转移至 NC 膜, 封闭液封闭 2 h, 分别用 p-Akt 和 Akt 兔单克隆抗体 (1:2000) 和 eIF5 兔多克隆抗体 (1:3000) 孵育, 4℃ 过夜, 再用 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000) 室温孵育 100 min, TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 暗室 X 线底片曝光, 显影和定影后根据条带灰度值进行分析。

1.9 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验,多组间数据处理采用方差分析, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 CF 增殖率的变化

与对照组相比,TGF- β 1 刺激组 CF 增殖率显著增加;与 TGF- β 1 刺激组相比,瑞舒伐他汀干预 1 组 CF 增殖率出现下降趋势,但无显著性差异;瑞舒伐他汀干预 2 组 CF 增殖率显著低于 TGF- β 1 刺激组;瑞舒伐他汀干预 3 组 CF 增殖率进一步减少(图 1)。

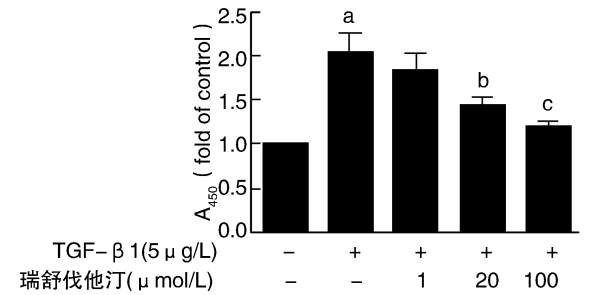


图 1. 各组 CF 增殖率比较 ($n = 3$) a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 TGF- β 1 刺激组比较。

Figure 1. Comparison of CF proliferation rate in each group

2.2 I 型和 III 型胶原蛋白的 mRNA 表达

与对照组相比,TGF- β 1 刺激组 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达水平显著升高;与 TGF- β 1 刺激组相比,瑞舒伐他汀干预 1 组 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达出现下降趋势,但无显著性差异;瑞舒伐他汀干预 2 组 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达与 TGF- β 1 刺激组相比显著降低;瑞舒伐他汀干预 3 组 I 型和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达与 TGF- β 1 刺激组相比进一步降低,但仍高于对照组(图 2)。

2.3 I 型和 III 型胶原蛋白含量比较

与对照组相比,TGF- β 1 刺激组 I 型和 III 型胶原蛋白含量显著升高;与 TGF- β 1 刺激组相比,瑞舒伐他汀干预 1 组 I 型和 III 型胶原蛋白含量出现减少趋势,但无显著性差异;瑞舒伐他汀干预 2 组 I 型和 III 型胶原蛋白含量与 TGF- β 1 刺激组相比显著降低;瑞舒伐他汀干预 3 组 I 型和 III 型胶原蛋白含量与 TGF- β 1 刺激组相比进一步降低,但仍高于对照组(图 3)。

2.4 Akt 的蛋白表达

与对照组相比,TGF- β 1 刺激组 Akt 蛋白表达显

著升高;与 TGF- β 1 刺激组相比,瑞舒伐他汀干预 1 组 Akt 蛋白表达显著降低,瑞舒伐他汀干预 2 组 Akt 蛋白表达明显降低,瑞舒伐他汀干预 3 组 Akt 蛋白表达进一步降低,但仍高于对照组(图 4)。

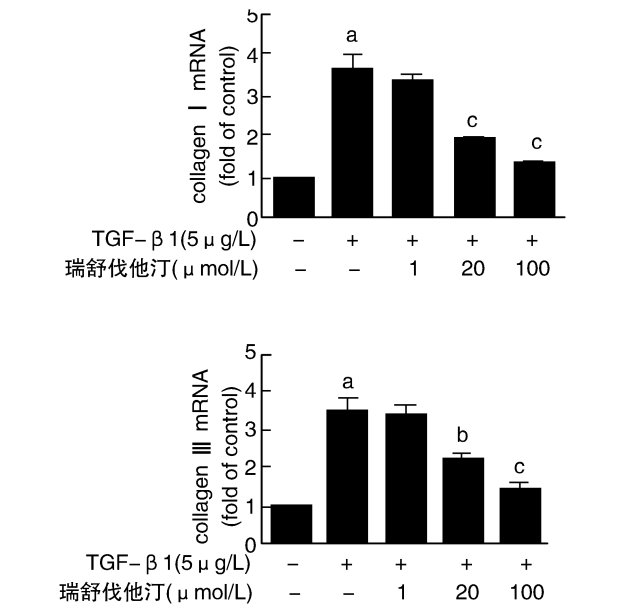


图 2. I 型和 III 型胶原蛋白的 mRNA 表达 ($n = 3$) a 为 $P < 0.001$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,c 为 $P < 0.001$,与 TGF- β 1 刺激组比较。

Figure 2. mRNA expression of collagen I and III in each group

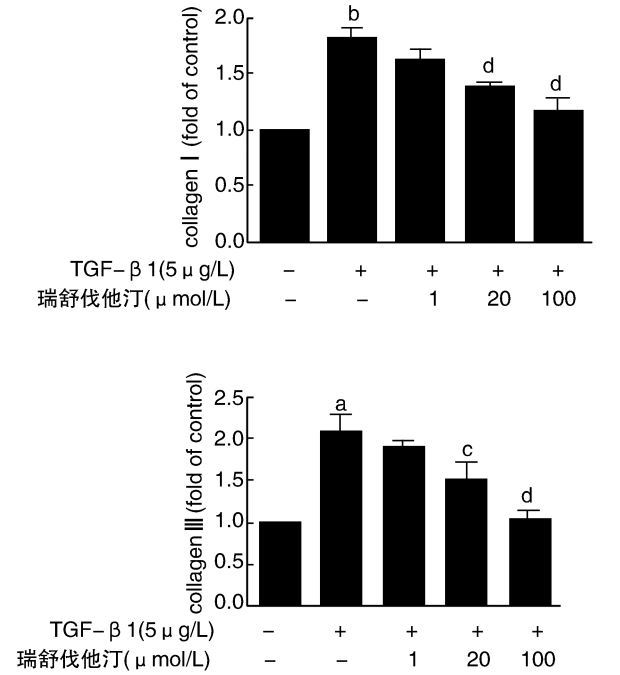


图 3. I 型和 III 型胶原蛋白含量比较 ($n = 3$) a 为 $P < 0.01$,b 为 $P < 0.001$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与 TGF- β 1 刺激组比较。

Figure 3. Comparison of collagen I and III levels in each group

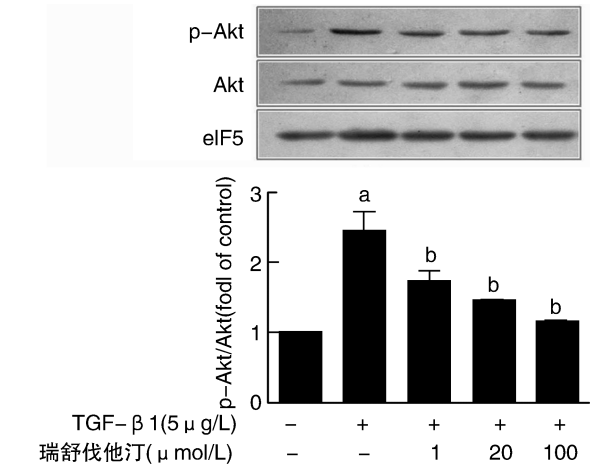


图 4. Akt 的蛋白表达 (n = 3) a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 TGF-β1 刺激组比较。

Figure 4. Protein expression of Akt in each group

3 讨 论

TGF-β1 是一类活性最强、分布最广泛、功能最多、具有激素样活性的多肽生长因子,在心肌纤维化的发生、发展中占有重要地位。研究发现,慢性充血性心力衰竭患者 TGF-β1 基因和蛋白表达水平均显著增加,并与心肌纤维化具有明显相关性^[4]。武宇洲等^[1]研究发现醛固酮能诱导 CF 的 TGF-β1 mRNA 过度表达以及 TGF-β1 过度的合成和分泌,加速心肌纤维化。国外学者研究显示醛固酮拮抗剂螺内酯可抑制 CF 增殖,下调 TGF-β1 基因和蛋白表达,改善心肌梗死后心室重建大鼠的左心室收缩和舒张功能。本研究发现单纯 TGF-β1 刺激 24 h 后,CF 增殖率显著增加,Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白 mRNA、蛋白表达水平显著升高,进一步证实 TGF-β1 在心肌纤维化中起重要作用。

Akt,即蛋白激酶 B,是酪氨酸受体介导的细胞信号转导途径中对细胞增殖及生存起决定作用的关键酶之一,是 PI3K 介导的心脏生长反应的关键下游效应器^[5]。心脏内有活性的(PI3Kα)可以明显升高磷酸化 Akt,从而引起心脏显著肥厚。许多生长因子如胰岛素、胰岛素样生长因子等与相应受体结合后,受体自身的酪氨酸磷酸化,PI3K 被活化,Akt 磷酸化,介

导细胞信号转导。研究发现大黄素能负调控 PI3K/Akt 通路中的多种分子,使 Akt 去磷酸化而下调 Akt 激酶活性,从而抑制细胞增殖^[6]。近年来的研究发现,PI3K/Akt 信号通路参与了单核/巨噬细胞系的浸润、增殖、细胞因子的表达和活化等肾小管-间质纤维化过程^[7]。为此推测 PI3K/Akt 通路激活后作用于多种底物,参与物质代谢和细胞的生存及增殖,参与促进或抑制多种疾病的发生发展。

本研究发现,瑞舒伐他汀减少 TGF-β1 诱导的新生大鼠 CF 数目,能够抑制Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 及其蛋白表达,使Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白分泌减少;Western blot 结果也发现,瑞舒伐他汀干预可使 Akt 表达量减少,提示瑞舒伐他汀可以抑制 TGF-β1 诱导的新生大鼠 CF 增殖及胶原合成分泌,预防和逆转心脏纤维化,其分子机制可能与抑制 Akt 信号通路有关。

[参考文献]

[1] 武宇洲, 崔 炜, 李淑琴. 醛固酮对心脏成纤维细胞转化生长因子 TGF-β1 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19 (18): 2 776-779.

[2] 黎东华, 李 浪. 他汀类药物对动脉粥样硬化抗炎作用机制的新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (5): 417-420.

[3] Li J, Zou Y, Ge J, et al. The effects of G-CSF on proliferation of mouse myocardial microvascular endothelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12 (2): 1 306-325.

[4] Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2007, 18 (4): 279-290.

[5] 张 妍, 曾定尹. 蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3β 信号途径在左心室肥厚大鼠心肌组织中的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (6): 495-498.

[6] 郑合勇, 胡建达, 郑志宏. 大黄素可能通过抑制 Akt 信号通路诱导 HL-60 细胞凋亡[J]. 药学学报, 2007, 42 (11): 1 142-146.

[7] 彭红霞, 陈 明, 张 超. 单侧输尿管结扎对大鼠肾间质 PI3K/AKT 表达的影响[J]. 基础医学与临床, 26 (12): 1 345-349.

(此文编辑 文玉珊)