

[ 文章编号 ] 1007-3949(2013)21-08-0673-07

· 实验研究 ·

# 促红细胞生成素对心脏成纤维细胞表型转化的影响及其信号机制

王伟, 赵金红, 张新金, 李建美

( 云南省第二人民医院心内科, 云南省昆明市 650021 )

[关键词] 促红细胞生成素; 心肌纤维化; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 转化生长因子激活性激酶 1; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[摘要] 目的 观察促红细胞生成素(EPO)对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导培养的乳鼠心脏成纤维细胞(CF)表型转化的影响,以及其可能的信号通路(TGF- $\beta_1$ -TAK<sub>1</sub>-p38MAPK)在其中的作用。方法 体外分离培养乳鼠心脏成纤维细胞,用  $10^{-6}$  mol/L 的 AngⅡ诱导培养心脏成纤维细胞表型转化,加入 20 kU/L 的 EPO 进行预干预,同时加或不加 15  $\mu$ mol/L 的 SB203580 进行处理,以平滑肌肌动蛋白(SMA)表达作为心脏成纤维细胞表型转化的观察指标,应用免疫组织化学观察心脏成纤维细胞内 SMA 表达情况;采用实时荧光定量 PCR 方法检测细胞内信号分子转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK) mRNA 的表达情况;采用蛋白免疫印迹法检测  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、TGF- $\beta_1$ 、转化生长因子激活性激酶 1(TAK<sub>1</sub>)、p38MAPK 以及磷酸化的 TAK<sub>1</sub>(p-TAK<sub>1</sub>)和 p-p38MAPK 的表达情况。结果 20 kU/L 的 EPO 能有效抑制 AngⅡ诱导的 CF 细胞表型转化,减少 CF 细胞内  $\alpha$ -SMA 蛋白的沉积,降低 CF 表型转化相关信号分子 TGF- $\beta_1$ 、p-TAK<sub>1</sub>、TAK<sub>1</sub>、p-p38MAPK 和 p38MAPK 的活化或表达,且加入 SB203580 后该作用增强。结论 EPO 可抑制 AngⅡ诱导的乳鼠心脏成纤维细胞表型转化为肌成纤维细胞,减轻心肌纤维化,并可降低相关信号分子 mRNA 及蛋白的表达,初步考虑 EPO 抑制心肌纤维化,减轻心室重构的作用是通过 TGF- $\beta_1$ -TAK<sub>1</sub>-p38MAPK 进行的。

[ 中图分类号 ] R5

[ 文献标识码 ] A

## Effect of Erythropoietin on Cardiac Fibroblast Phenotype and Its Signal Mechanism

WANG Wei, ZHAO Jin-Hong, ZHANG Xin-Jin, and LI Jian-Mei

( Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Yunnan, Kunming, Yunnan 650021, China )

[ KEY WORDS ] Erythropoietin; Cardiac Fibrosis; Transforming Growth Factor-beta1; TGF- $\beta$ -activated Kinase-1; Mitogen-activated Protein Kinase

[ ABSTRACT ] Aim To observe the effects of erythropoietin (EPO) on neonatal rat cardiac fibrosis phenotypic switched into myofibroblasts induced by angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) and the association with possible signaling pathway (transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta_1$ )-TGF- $\beta$ -activated kinase-1 (TAK<sub>1</sub>)-mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)).

Methods Cardiac fibroblasts were isolated from new-born Sprague-Dawley rats, and the cells were used to establish the model of fibrosis by Ang Ⅱ ( $10^{-6}$  mol/L) in vitro. Then they were treated with EPO (20 kU/L), at the same time, they were treated with or without the p38MAPK inhibitor SB203580 (15  $\mu$ mol/L). Immunohistochemistry was used to detect the intracellular protein expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). The mRNA levels of TGF- $\beta_1$  and p38MAPK was analyzed by quantitative real-time PCR. The protein expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$ , TAK<sub>1</sub>, and p38MAPK and the phosphorylation of TAK<sub>1</sub> and p38MAPK were analyzed by Western blot. Results 20 kU/L of EPO can effectively inhibit Ang Ⅱ-induced cardiac phenotypic switched into myofibroblasts, reduce the intracellular protein expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and also can significantly suppress Ang Ⅱ-induced upregulation of TGF- $\beta_1$ , TAK<sub>1</sub>, and p38MAPK.

[ 收稿日期 ] 2013-02-28

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金(30960138)和云南社会发展科技计划(2009ZC176M)

[ 作者简介 ] 王伟,硕士研究生,研究方向为心血管疾病基础与临床,E-mail 为 yatou\_005@126.com。通讯作者张新金,博士,主治医师,研究方向为心血管疾病基础与临床,E-mail 为 zxjgry2004@sina.com。李建美,硕士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病介入诊治和无创动脉硬化早期检测,E-mail 为 lijianmei090@sina.com。

expression and phosphorylation of TAK<sub>1</sub> and p38MAPK. The effects can be strengthened by SB203580. **Conclusion** EPO can effectively inhibit Ang II-induced cardiac phenotypic switched into myofibroblasts, reduce myocardial fibrosis, and can reduce the related signaling molecules mRNA and protein expression. Preliminary consideration of the EPO can inhibit myocardial fibrosis, reduce the process of ventricular remodeling through TGF-β<sub>1</sub>-TAK<sub>1</sub>-p38MAPK.

心室重塑是一个不断发展的过程,它不仅表现为心肌细胞的坏死、肥厚及凋亡,同时也促使成纤维细胞表型转化为肌成纤维细胞(myofibroblasts, myoFb),细胞外基质出现胶原沉积及纤维化,进而导致心功能的不断恶化。其中,肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活是导致心室重构的主要因素,而血管紧张素Ⅱ(angiotensin II, Ang II)是该系统发挥主要生物学效应的物质,它可诱导心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)向肌成纤维细胞分化,并激活CF合成大量胶原等细胞外基质成分,引起心肌纤维化,同时该过程也与CF细胞分泌的许多信号分子、细胞因子以及生长因子相关<sup>[1]</sup>。如转化生长因子β<sub>1</sub>(transforming growth factor-β<sub>1</sub>, TGF-β<sub>1</sub>),它的表达可发挥组织修复作用,并促进胶原沉积及CF的纤维化,进而参与心肌损伤后的心室重塑过程。同时,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的组织保护作用近期也成为研究热点,它可通过介导各种信号转导通路来发挥抗氧化、抗凋亡、抗炎、促进新生血管生成等心肌的保护作用<sup>[2-4]</sup>。本研究旨在观察使用Ang II诱导体外培养的CF表型转化,观察EPO对Ang II诱导表型转化的CF是否具有抑制作用,并尝试解释TGF-β<sub>1</sub>-TAK<sub>1</sub>-p38MAPK在其中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

SD大鼠(1~3日龄,雌雄不限,许可证号:SCXKC 滇 2011-0004)由昆明医科大学动物中心提供。DMEM/F12(1:1)培养基购自Hyclone,胎牛血清购自Gibco;Ang II、EPO购自Merck;Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶、SB203580购自Sigma;Trizol、反转录及PCR试剂盒、RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司;所有引物均由上海生物工程公司合成,其中GAPDH引物序列为上游5'-gacaacttggcatctgg-3',下游5'-atcgaggatgttctgg-3',片段长度为133 bp;TGF-β<sub>1</sub>引物序列为上游5'-tgagtggctgttttgacg-3',下游5'-gttggactgtccattg-3',片段长度为149 bp;p38MAPK引物序列为上游5'-atgacgaaatgaccggctac-3',下游5'-acaacgttccggtaac-3',片段长度为141 bp;α平滑肌

肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、波形蛋白(vimentin)、α肌动蛋白(α-actin)抗体以及SABC免疫组织化学试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供;兔抗TGF-β<sub>1</sub>多克隆抗体购自Santa Cruz公司,兔抗p38MAPK单克隆抗体、兔抗转化生长因子激活性激酶1(TGF-β-activated kinase, TAK<sub>1</sub>)单克隆抗体由Epitomics提供;辣根酶标记抗兔IgG及抗小鼠IgG由Abmart提供;EZ-ECL购自Biological Industries。

### 1.2 心脏成纤维细胞的分离、培养及鉴定

取出生1~3天龄SD大鼠15只,无菌条件下取乳鼠心脏剪去心房及大血管,磷酸盐缓冲液充分冲洗掉残血,置于冰上剪碎成1 mm<sup>3</sup>小块;用0.125%胰酶+0.5 g/LⅡ型胶原酶复合酶法分次消化心室肌组织,分次收集细胞悬液,1000 r/min离心8 min沉淀细胞;用含15%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬细胞,加入25T培养瓶中,置于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱培养45 min后,差速贴壁去除尚未贴壁的心肌细胞,培养至90%以上融合时,用含0.02%EDTA的0.25%胰酶消化传代,实验用第2~3代细胞。细胞爬片后用免疫组织化学PV两步法鉴定,Fibronectin和Vimentin阳性,α-actin阴性,证实为CF。

### 1.3 实验分组

将无血清培养基同步化培养24 h的CF细胞随机分为5组,分别为:①空白对照组;②Ang II诱导组;③EPO组;④Ang II+EPO组;⑤Ang II+EPO+SB203580组。使用10<sup>-6</sup> mol/L<sup>[5]</sup>的Ang II诱导CF表型转化为myoFb,在诱导前1 h加入20 kU/L的EPO干预,或联合加入EPO及15 μmol/L<sup>[6,7]</sup>的SB203580(p38MAPK抑制剂)预处理,48 h后进行下一步实验,磷酸化蛋白经药物处理40 min后进行磷酸化蛋白的提取,各组均为同一批细胞。

### 1.4 细胞爬片及α平滑肌肌动蛋白在各组细胞内的表达情况

取生长良好的原代CF细胞,在细胞达到80%~90%融合时,0.25%的胰酶消化细胞,制成细胞悬液,以10<sup>4</sup>的密度接种于24孔板内的细胞爬片上(每组设立副片),37℃细胞培养箱中孵育,待细胞贴壁稳定后,随机分组,按上步中详述步骤进行药物处理,48 h后各组孵育相同浓度α-SMA抗体

(1:3000), 湿盒中 37℃ 2 h(或 4℃ 过夜), 免疫组织化学 PV 两步法检测  $\alpha$ -SMA 在各药物处理组中的表达情况。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 检测相关基因 mRNA 的相对表达量

药物处理细胞 48 h 后, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA; 经紫外线分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度后, 按试剂盒说明书取 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录合成 cDNA; 取 2  $\mu$ L cDNA 产物做模板, 分别以各自的引物进行 RT-PCR, 扩增 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK 和内参 GAPDH。RT-PCR 条件为: 95℃ 起始模板变性 30 s; 95℃ 模板变性 10 s, 60℃ 退火/延伸 30 s, 重复 40 个循环; 65~95℃ 每增加 0.5℃ 进行 5 s 读板, 形成溶解曲线。以 GAPDH 为内参基因, 所有样品均设置 3 个平行管, 每个样本加入 cDNA 量为 15~20 ng。基因表达量以 3 个平行管平均循环阈值 (Ct) 表示, 并取 RT-PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 证实 PCR 产物。应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法(比较处理样本和未处理样本目标基因转录的表达差异,  $\Delta\Delta Ct$  值为目标组  $\Delta Ct$  平均值减去对照组  $\Delta Ct$  平均值得到的每个目标基因相对循环数)计算 TGF- $\beta_1$  和 p38MAPK mRNA 的相对表达量, 实验重复三遍。

实时荧光定量 PCR 质控: 将各组 cDNA 混合作为标准品, 10 倍梯度稀释为 S1、S0.1、S0.01、S0.001, 以 RNase-Free & DNase-Free 水为空白对照, 按照之前所述体系进行 qPCR, 绘制标准曲线, 检测反应线性情况。标准曲线  $R^2 > 0.99$  说明反应线性良好, 可以计算相对表达量; PCR 反应效率应该控制在 90%~110% 之间, 超出范围说明存在抑制 PCR 反应物质或者引物与模板比例不当。

## 1.6 细胞总蛋白、磷酸化蛋白提取及蛋白免疫印迹

药物处理细胞 48 h 后(磷酸化蛋白药物处理 40 min), 使用蛋白裂解液(WB 及 IP 细胞裂解液, 使用前 1 mL 裂解液加入 10  $\mu$ L PMSF, 磷酸化蛋白再加入磷酸酶抑制剂)于冰上裂解细胞, 用细胞刮收集细胞, 后用超声裂解细胞 3~5 次, 充分裂解后, 4℃、14000 g、离心 10 min 获得总蛋白或磷酸化蛋白。取 30  $\mu$ g 蛋白量在聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 60 V 电泳至分离胶, 转电压到 100 V 电泳至溴酚蓝到合适部位; 110 V, 90 min 转膜; TBS-T 快速洗膜 5 min  $\times$  3 次; 5% 脱脂 Milk-TBS-T 室温慢摇封闭 2 h; TGF- $\beta_1$  抗体(1:500)、p-TAK<sub>1</sub>(1:2500)、TAK<sub>1</sub> 抗体(1:3000)、p-p38MAPK(1:1000)、p38MAPK 抗体(1:3000)4℃ 孵育一抗过夜; TBS-T 洗膜, 10 min  $\times$  3 次; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温孵育 2 h,

TBS-T 洗膜, 10 min  $\times$  2 次, TBS 洗膜 5 min; ECL 发光试剂盒显色显影 5 min 后, 于暗室进行胶片曝光, 显影, 定影后, Gel Dox<sup>TM</sup> XR + 凝胶成像系统成像, 进行数据分析。

## 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS17.0 统计软件包进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 心脏成纤维细胞的分离、培养及鉴定

CF 生长较心肌细胞迅速, 原代分离心肌细胞和 CF 后 3~5 天, CF 即可达 80%~90% 融合状态。CF 呈长梭形, 胞体较大, 胞浆透明, 胞核 1~2 个, 无自发搏动。经免疫组织化学 PV 两步法鉴定, CF 的纤维连接蛋白和波形蛋白在胞浆内围绕细胞核呈棕褐色颗粒状强阳性反应; 而  $\alpha$ -actin 胞浆内无明显棕褐色颗粒状改变, 呈阴性反应, 由此可鉴定为 CF(图 1)。

### 2.2 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白在细胞内的表达情况

CF 细胞的  $\alpha$ -SMA 免疫化学染色表现出明显的阳性反应, 不同组别的细胞染色强度不完全一致, 但结构定位明显, 呈丝状分布。空白对照组细胞阳性丝状着色程度较轻; AngII 诱导组较其他组细胞着色明显; EPO 组与空白对照组相似, 细胞着色较轻, AngII + EPO 组及 AngII + EPO + SB203580 组之间没有明显差别, 但均较空白对照组着色稍深, 而相对于 AngII 诱导组  $\alpha$ -SMA 蛋白着色较轻(图 2)。

### 2.3 实时荧光定量 PCR 检测 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK mRNA 的表达情况

2.3.1 实时荧光定量 PCR 检测 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK mRNA 的标准曲线、溶解曲线及扩增曲线 用特异性引物对心脏 CF 的 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK 进行扩增, 同时以 GAPDH 作为内参, TGF- $\beta_1$  和 p38MAPK 实时荧光定量 PCR 溶解曲线显示引物特异性较好, 未受非特异扩增和引物二聚体的干扰(图 3)。

实时荧光定量 PCR 结果显示, TGF- $\beta_1$  及 p38MAPK 的反应效率分别为 96.3%、100.9%, 标准曲线  $R^2$  分别为 0.998、0.996, 引物与模板比例得当, 反应线性良好(图 3)。

2.3.2 实时荧光定量 PCR 检测信号分子的 mRNA 表达 实时荧光定量 PCR 检测心肌 CF 中 TGF- $\beta_1$  和 p38MAPK 的 mRNA 表达量, 发现经 AngII 诱导后的 CF 中, TGF- $\beta_1$  mRNA 表达量是空白对照组的 1.41 倍( $P < 0.05$ ), 使用 EPO 进行干预后, 其 mRNA 表达量较 AngII 诱导组降低, 为 AngII 诱导组的 0.71 倍( $P <$

0.05);在同时加入特异性 p38 抑制剂的 SB203580 组,TGF- $\beta_1$  的 mRNA 表达量降低最为明显,仅为 Ang II 诱导组的 0.60 倍( $P < 0.05$ )。信号蛋白 p38MAPK 的表达情况类似于 TGF- $\beta_1$ ,Ang II 诱导组 mRNA 表达

量是空白对照组的 2.13 倍( $P < 0.05$ ),使用 EPO 进行干预后,其 mRNA 表达量较 Ang II 诱导组降低,在加入特异性 p38 抑制剂的 SB203580 组,其 mRNA 表达量降低较为明显(表 1)。

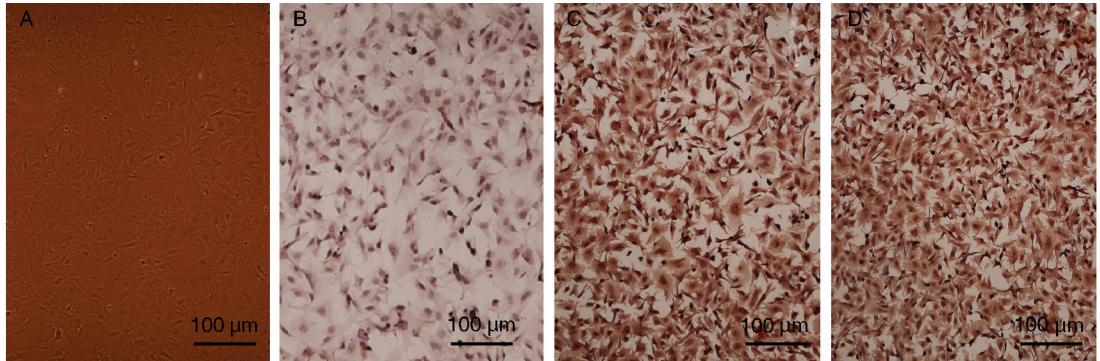


图 1. CF 的分离、培养及鉴定结果 A 为 80% ~ 90% 融合的 CF;B 为阴性对照组,  $\alpha$ -actin 蛋白无明显变化;C 和 D 为胞质内纤维连接蛋白及波形蛋白显示出明显的棕色沉积。

Figure 1. Isolation, culture and identification of CF

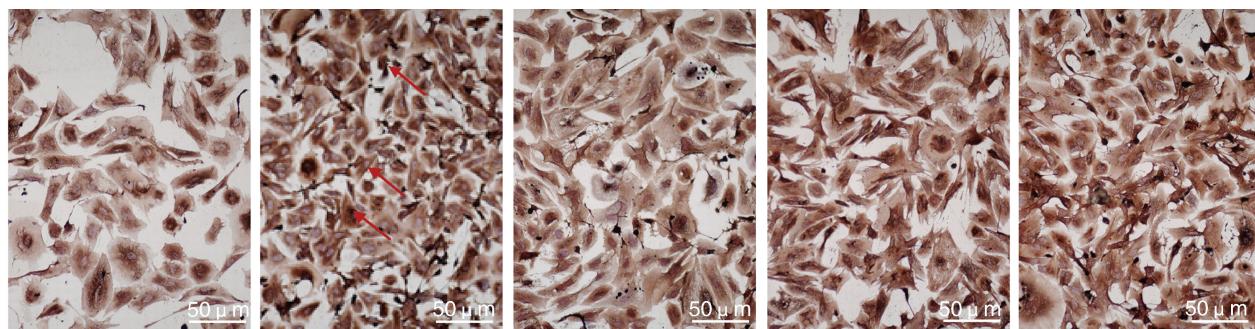


图 2.  $\alpha$ -SMA 在细胞内的表达情况 从左到右依次为空白对照组、Ang II 诱导组、EPO 组、Ang II + EPO 组和 Ang II + EPO + SB203580 组。

Figure 2. The expression of  $\alpha$ -SMA in the drug treated cells

表 1. p38MAPK 及 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达倍数( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1. Quantitative analysis of p38MAPK and TGF- $\beta_1$  mRNA relative expression( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	p38MAPK	TGF- $\beta_1$
空白对照组	1	1
Ang II 诱导组	$2.13 \pm 0.23^a$	$1.41 \pm 0.13^a$
EPO 组	$1.08 \pm 0.15$	$1.07 \pm 0.14$
Ang II + EPO 组	$0.74 \pm 0.08^b$	$0.71 \pm 0.13^b$
Ang II + EPO + SB203580 组	$0.11 \pm 0.13^b$	$0.60 \pm 0.02^b$

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Ang II 诱导组比较。

2.3.3 实时荧光定量 PCR 产物电泳结果 经实时定量 PCR 后,反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示,分别在 149 bp、141 bp 及 133 bp 处出现特异性条带,证实产物为 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK 及 GAP-

DH,无非特异性扩增(图 4)。

#### 2.4 蛋白免疫印迹检测蛋白的表达情况

免疫印迹法检测 CF 经各药物处理后表型转化观察指标  $\alpha$ -SMA 及各信号通路蛋白的表达情况,利用内参蛋白  $\beta$ -actin 的表达对目的蛋白的表达量进行校正,使用 Gel Dox<sup>TM</sup> XR + 凝胶成像系统获取图像,分别在 42 kDa、25 kDa、75 kDa、75 kDa、42 kDa、42 kDa 处显示出特异性条带(图 5),证实为  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 、p-TAK<sub>1</sub>、TAK<sub>1</sub>、p-p38MAPK、p38MAPK,取各条带透光体积(Int)与内参条带的比值进行比较,得出通道蛋白的相对表达量。

$\alpha$ -SMA 的蛋白表达量在 Ang II 诱导后明显升高,使用 EPO 进行干预后明显较 Ang II 诱导组降低( $P < 0.05$ ),同时加入 SB203580 后,各通道的蛋白表达量较 Ang II 诱导组降低更为明显( $P < 0.05$ )。

Ang II 可诱导各通道蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ) ; 而 EPO 对各通道蛋白的基础表达量无明显影响 ( $P > 0.05$ ) , 但 EPO 可抑制 Ang II 诱导的通道蛋白的表

达或活化 ( $P < 0.05$ ) , 同样在同时加入 SB203580 后, 各通道蛋白表达量较 Ang II 诱导组降低更为明显 ( $P < 0.05$ ; 表 2)。

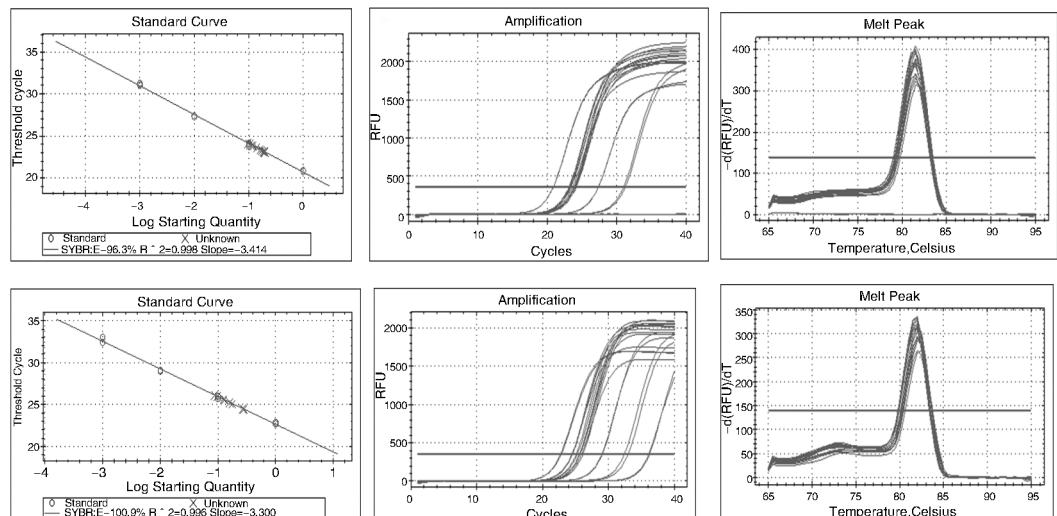


图 3. TGF- $\beta_1$ (上图)、p38MAPK(下图)的标准曲线(左)、扩增曲线(中)及溶解曲线(右)

Figure 3. The standard curve, amplification curve and melting curve of TGF- $\beta_1$ , p38MAPK

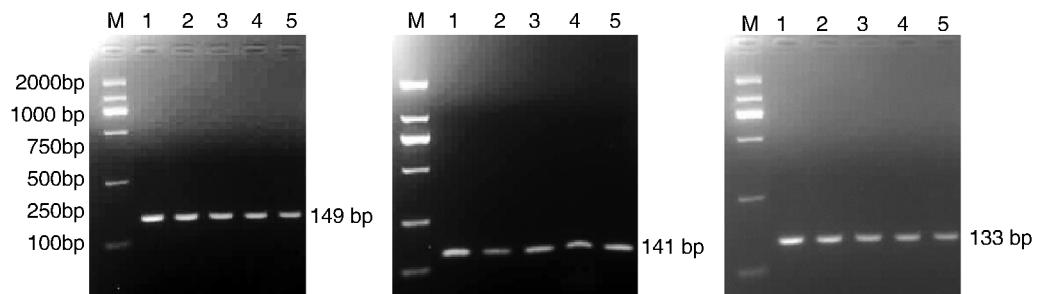


图 4. Real-time PCR 产物电泳结果 从左到右依次为 TGF- $\beta_1$ 、p38MAPK 和 GAPDH。M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2 为 Ang II 诱导组, 3 为 EPO 组, 4 为 Ang II + EPO 组, 5 为 Ang II + EPO + SB203580 组。

Figure 4. Electrophoretic image of product by real-time-PCR

表 2. 药物处理组蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2. Quantitative analysis of protein relative expression in drug treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

蛋白	空白对照组	Ang II 诱导组	EPO 组	Ang II + EPO 组	Ang II + EPO + SB203580 组
$\alpha$ -SMA	$0.45 \pm 0.16$	$1.83 \pm 0.28^a$	$0.51 \pm 0.16$	$1.39 \pm 0.26^{ab}$	$0.84 \pm 0.16^{abc}$
TGF- $\beta_1$	$0.31 \pm 0.07$	$0.94 \pm 0.15^a$	$0.37 \pm 0.09$	$0.59 \pm 0.14^{ab}$	$0.57 \pm 0.13^{ab}$
TAK <sub>1</sub>	$0.71 \pm 0.05$	$1.16 \pm 0.12^a$	$0.73 \pm 0.11$	$1.00 \pm 0.07^{ab}$	$0.93 \pm 0.04^{ab}$
p-TAK <sub>1</sub>	$0.68 \pm 0.11$	$1.56 \pm 0.23^a$	$0.87 \pm 0.24$	$1.17 \pm 0.19^{ab}$	$1.07 \pm 0.19^{ab}$
p38MAPK	$0.48 \pm 0.08$	$0.94 \pm 0.13^a$	$0.53 \pm 0.10$	$0.70 \pm 0.07^{ab}$	$0.68 \pm 0.07^{ab}$
p-p38MAPK	$0.35 \pm 0.05$	$0.81 \pm 0.24^a$	$0.39 \pm 0.05$	$0.60 \pm 0.05^{ab}$	$0.58 \pm 0.07^{ab}$

a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 Ang II 诱导组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 Ang II + EPO 组比较。

### 3 讨 论

心室重构是多种心血管疾病发生、发展的重要

病理机制, 涉及心肌细胞坏死、肥厚及凋亡, CF 表型转化为 myoFb, 细胞外基质胶原沉积及间质纤维化, 进而导致心肌收缩、舒张功能障碍, 促使心功能

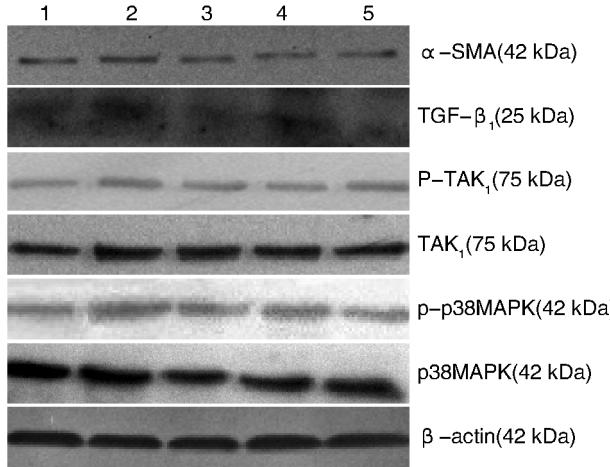


图 5. 免疫印迹法检测蛋白表达情况 1 为空白对照组,2 为 Ang II 诱导组,3 为 EPO 组,4 为 Ang II + EPO 组,5 为 Ang II + EPO + SB203580 组。

Figure 5. Western blot analysis of protein expression

不断恶化。近年来, EPO 的组织保护作用日益受到重视,但其发挥保护作用的信号转导机制尚不完全明确。心室重构的生物学机制及抑制因素成为新的研究热点。TGF-β₁ 作为促纤维化作用明确的生长因子,它的表达可发挥组织修复作用,并促进胶原沉积及心肌纤维化,进而参与心肌损伤后心室重塑的病理生理过程<sup>[8]</sup>。近年来的研究表明<sup>[9]</sup>,由 Ang II 介导的细胞外基质沉积可被 TGF-β 中和抗体或 TGF-βR II 拮抗剂部分阻断,提示 Ang II 能够刺激 TGF-β 分泌,并最终触发细胞外基质的合成而导致纤维化,同时 p38MAPK 信号通路可在大鼠心肌损伤的应激刺激下磷酸化活化,在细胞凋亡、细胞因子产生、转录调节和细胞骨架重排过程中发挥重要的作用<sup>[10]</sup>,由此不难推测心肌纤维化的过程也有可能通过与 TGF-β₁-TAK₁-p38 MAPK 进行。

实验证实<sup>[11,12]</sup> Smad 及 TAK₁ 均可以介导 TGF-β 在多种细胞类型中的信号转导,并在心室重构方面发挥着至关重要的作用。其一, TGF-β 可通过 Smad 蛋白介导的信号途径参与细胞外基质中胶原的沉积<sup>[13]</sup>。有报道称 Smad 蛋白主要存在于血管周围的非梗死区域中,且其大鼠心肌梗死后被反应性激活<sup>[14]</sup>,在心室重构中承担着重要的作用。另外, TAK₁ 是 MKKK 家族成员之一,最早被认为是在 TGF-β 和骨形成蛋白信号传导与发育中起作用<sup>[15]</sup>,目前资料显示<sup>[16]</sup>,TAK₁ 的下游激酶 p38MAPK 磷酸化后可能激活了核因子 κB (nuclear factor-κB, NF-κB),它又导致了某些基因的过表达或负表达,从而使 TGF-β₁-TAK₁-p38MAPK 信号通路的激活在心室

重构过程中也发挥着不可或缺的作用。Ang II 可诱导血管外膜成纤维细胞 p38MAPK 通路激活,此信号转导途径在血管外膜成纤维细胞迁移过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>,它的活化可诱导在表皮成纤维细胞中 TGF-β 介导的胶原纤维及细胞外基质的沉积<sup>[18]</sup>,故该信号通路可能成为另一个抑制心室重构的新的治疗目标。

本实验体外培养乳鼠 CF, 使用 Ang II 诱导 CF 表型转化为 myoFb, 模拟心肌损伤后 CF 胶原沉积、增殖等心室重构的病理生理过程; 同时进行药物干预,从表型转化及信号分子的表达两方面来尝试解释 EPO 抑制心室重构的作用机制。

α-SMA 作为 CF 表型转化的观察指标, Ang II 诱导组 α-SMA 蛋白沉积增多, 使用 EPO 干预后, 与 Ang II 诱导组相比, 胞质内褐色丝状沉积明显减少, 在同时加用 SB203580 处理后, α-SMA 蛋白的表达量较 Ang II 诱导组减少, 客观上支持 EPO 可以抑制 Ang II 诱导的 CF 表型转化、胶原沉积及心肌纤维化过程。另外, 信号分子 TGF-β₁、p38MAPK mRNA 及 TGF-β₁、p-TAK₁、p-p38MAPK、TAK₁ 和 p38MAPK 蛋白在 Ang II 诱导 CF 表型转化时表达明显升高, 而在 EPO 抑制纤维化时则表达下降, 提示 TGF-β₁-TAK₁-p38MAPK 信号通路激活参与心肌纤维化的过程。

我们推测 TGF-β₁ 的升高可能促使 TAK₁ 活化或表达, 进一步使 p38MAPK 磷酸化, 而 p-p38MAPK 又激活了其他某些因子, 导致相关基因表达上调而参与心室重构, 同时 p38MAPK 的磷酸化也受到了下游某些信号分子的负反馈调节, 从而达到一定的稳态, 就本研究目前的实验结果, 初步提示 EPO 抑制心肌纤维化、抗心室重构的心脏保护作用可能部分通过 TGF-β₁-TAK₁-p38MAPK 信号通路进行的, 但这些心脏保护作用仍需在体实验研究来进一步佐证。

#### [参考文献]

- Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. Pharmacol Ther, 2009, 123: 255-278.
- Kanashiro-Takeuchi RM, Takeuchi LM, Hatzistergos K, et al. Effects of combination of proliferative agents and erythropoietin on left ventricular remodeling post-myocardial infarction [J]. Clin Transl Sci, 2011, 4(3): 168-174.
- Kawachi K, Iso Y, Sato T, et al. Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine [J]. Heart Vessels, 2012, 27(1): 79-88.
- Hefer D, Yi T, Selby DE, et al. Erythropoietin induces

- positive inotropic and lusitropic effects in murine and human myocardium [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2012, 52 (1): 256-263.
- [5] 张新金, 马业新, 文渊, 等. 促红细胞生成素抑制血管紧张素Ⅱ诱导的大鼠心脏成纤维细胞中 TGF-β1 和胶原的表达 [J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 36 (7): 636-640.
- [6] Kumar S, Jiang MS, Adams JL, et al. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263 (3): 825-831.
- [7] 王秋月, 佟健华, 杜娟, 等. TGF-β1 通过 p38MAPK 信号通路调控肾小球系膜细胞分泌纤维连接蛋白的研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35 (3): 246-248.
- [8] Wang L, Kwak JH, Kim SI, et al. Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38alpha and p38delta mitogenactivated protein kinase dependent pathway in murine mesangial cells [J]. *Biol Chem*, 2004, 279: 33 213-219.
- [9] Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires TGF-β [J]. *Clin Invest*, 2010, 120 (10): 3 520-529.
- [10] Olli T, Ylermi S, Mika L. p38 kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and antiapoptotic mechanisms [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (11): 1 276-286.
- [11] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling [J]. *Nature*, 2003, 425: 577-584.
- [12] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. *Nature*, 1997, 390: 465-471.
- [13] Rosenkranz S. TGF-β<sub>1</sub> and angiotensin networking in cardiac remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63: 423-432.
- [14] Hao J, Ju H, Zhao S, Junaid A, et al. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-β in the chronic phase of myocardial infarct scar healing [J]. *Mol Cell Cardiol*, 1999, 31: 667-678.
- [15] Ishitani T, Ninomiya-T suji J, Nagai SJ, et al. The TAK-1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signaling between b-catenin and transcription factor TGF [J]. *Nature*, 1999, 399 (6738): 798-802.
- [16] Mat suyama W, Wang L, Farrar WL, et al. Activation of discoidin domain receptor-1 isoform b with collagen upregulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogenactivated protein kinase and NF-κappaB [J]. *Immunol*, 2004, 172 (4): 2 332-340.
- [17] 李莉, 高平进, 沈伟利, 等. 血管紧张素Ⅱ诱导自发性高血压大鼠血管外膜成纤维细胞迁移活性涉及 p38 MAPK [J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33 (6): 557-560.
- [18] Ihn H, Yamane K, Tamaki K. Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts [J]. *Invest Dermatol*, 2005, 125: 247-255.

(此文编辑 许雪梅)