论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0154-03

盐酸尼卡地平对血管紧张素Ⅱ诱导成年大鼠心脏成纤维细胞增殖和 PYK_2 表达的影响

郝 嘉[1],吕 伟[2],肖颖彬[1] (第三军医大学:[1]新桥医院心血管外科,重庆 400037,[2]西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究盐酸尼卡地平对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的成年大鼠心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts,CFs)增殖和粘附斑激酶新成员 PYK_2 合成的影响,探讨盐酸尼卡地平抑制心肌纤维化的机制。**方法** 建立 AngⅡ诱导成年大鼠纤维化模型,采用 MTT 法检测盐酸尼卡地平对 CFs 增殖的影响,免疫组化法检测 CFs 纤维连接蛋白量的变化,RT-PCR 法和 Western blot 法分别检测 PYK_2 mRNA 和蛋白的改变。**结果** 盐酸尼卡地平呈浓度依赖性方式抑制 AngⅡ诱导 CFs 的增殖和纤维连接蛋白的合成,并可降低 PYK_2 mRNA 和蛋白的表达。**结论** 盐酸尼卡地平的抗心肌纤维化作用的作用机制之一可能是通过抑制 PYK_2 的表达实现的。

关键词:盐酸尼卡地平;心脏成纤维细胞;血管紧张素Ⅱ;粘附斑激酶

中图法分类号:R322.11;R329.2;R972.4 **文献标识码**:A

Influence of perdipine on the proliferation and PYK_2 expression in cultured adult rat cardiac fibroblast stimulated by angiotensin Ⅱ

HAO Jia[1], LU Wei[2], XIAO Ying-bin[1] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the influence of perdipine on the proliferation and proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK_2) expression in cultured adult rat cardiac fibroblast stimulated by angiotensin Ⅱ, and to explore the mechanism of perdipine on cardiac fibrosis. **Methods** Adult rat cardiac fibroblasts (CFs) were treated with angiotensin Ⅱ (AngⅡ) to establish fibrosis model. The effects of perdipine on proliferation of CFs were analysed by MTT colorimetric assay, and fibronectin was tested by immunohistochemistry method. PYK_2 mRNA and protein level were examined by RT-PCR and Western blot analysis respectively. **Results** Perdipine inhibited CFs proliferation and fibronectin synthesis stimulated by angiotensin Ⅱ in a dose dependent, and the levels of PYK_2 mRNA and protein were decreased significantly. **Conclusion** Perdipine can inhibit cardiac fibrosis stimulated by angiotensin Ⅱ by suppressing CFs proliferation and fibronectin synthesis. PYK_2 is involved in the effect of perdipine.

Key words: perdipine; cardiac fibroblast; angiotensin Ⅱ; focal adhesion kinase

心肌纤维化常伴随发生于风湿性心脏病、高血压、心肌梗死及心力衰竭等疾病,在增龄和冠状动脉粥样硬化过程中[1]也会发生心肌纤维化。这种改变可引起心肌结构紊乱、僵硬度增加、心脏顺应性降低、组织异质性增高,是引起心律失常、猝死和慢性心功能不全的重要原因。心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts,CFs)在刺激因素作用下的过度增殖和胶原合成增加,是心肌纤维化的细胞生物学基础。富含脯氨酸的酪氨酸激酶2(proline-rich tyrosine kinase 2, PYK_2),是粘着斑激酶家族的新成员。PYK_2 涉及到多条信号传导通路,包括离子通道的调节、细胞生长增殖分化和细胞凋亡等,但其功能机制至今尚不清楚[2]。盐酸尼卡地平属二氢吡啶类钙离子拮抗剂,为有效的血管扩张剂,已广泛应用于心血管疾病,临床疗效好且毒副反应少。本研究盐酸尼卡地平对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导成年大鼠 CFs 增殖和粘附斑激酶新成员 PYK_2 合成的影响,探讨其抑制心肌纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

成年 Wistar 大鼠 20 只,体质量(200±20)g,雌雄不拘,第三军医大学实验动物中心提供。主要试剂:AngⅡ、MTT 均为 Sigma 产品,PYK_2 引物为上海生工合成,总 RNA 提取试剂盒、

作者简介:郝 嘉(1973-),男,四川省荣县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心肌纤维化方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)66938392

通讯作者:肖颖彬,电话:(023)68755607,E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

收稿日期:2005-07-27;修回日期:2005-08-29

RT-PCR 试剂盒为赛百盛产品,DEPC 购自 Roche 公司,PYK_2 抗体购自 Santa-Cruz 公司,S-P 免疫组化染色试剂盒、纤维连接蛋白抗体、波形蛋白抗体、肌动蛋白单克隆抗体购自北京中山公司,PCR Marker、*Taq* 酶为华美产品。盐酸尼卡地平 2 mg/2 ml(日本山之内制药株式会社产品,添加物:D-山梨糖醇)。

1.2　CFs 的培养和鉴定

手术分离雄性成年 Wistar 大鼠心脏后采用组织块消化法消化收集细胞,采用差速贴壁 2 h,获得心脏成纤维细胞。以第 2~4 代细胞进行实验。免疫组化染色行细胞鉴定:以肌动蛋白、波形蛋白为一抗,以心肌细胞作对照。

1.3　四唑盐比色实验(MTT 法)测定盐酸尼卡地平对 AngⅡ诱导 CFS 增殖的影响

检测中培养基选用无酚红 DMEM-F12(含 HEPES)。实验分组:①对照组:含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养基;②AngⅡ组:含 AngⅡ 1.0×10^{-7} mol/L;③AngⅡ + 盐酸尼卡地平 10 μmol/L 组;④AngⅡ + 盐酸尼卡地平 20 μmol/L 组;⑤AngⅡ + 盐酸尼卡地平 40 μmol/L 组。96 孔板中培养 24 h 后,每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 g/L),继续培养 4 h,终止培养,小心吸弃上清,加入 DMSO 150 μl/每孔,振荡 10min 使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定光吸收值,用只加培养液不加细胞的空白孔调零。

以相同密度接种的未经药物处理的相应细胞作正常对照.实验设 3 复孔,取其平均值。

1.4　免疫组化法检测盐酸尼卡地平对 AngⅡ诱导 CFS 纤维连接蛋白表达的影响

加入干预因素后 24 h 取出细胞爬片,用 S-P 免疫组化法测定,对照组用 PBS 代替一抗。用图像分析仪行半定量分析,每一玻片任选 5 个视野检测阳性细胞积分光密度(IOD)值。

1.5　RT-PCR 法检测 PYK_2 mRNA 表达

实验分组:根据前面的实验结果,选择 20 μmol/L 的盐酸尼卡地平浓度,使用 6 孔培养板培养,分组为:①对照组:含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基;②AngⅡ组:含 AngⅡ 1.0×10^{-7} mol/L 的 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养基;③盐酸尼卡地平 20 μmol/L + AngⅡ 1×10^{-7} mol/L 的 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养基。分别抽提细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照。GAPDH 产物长度 452 bp。PYK_2 上游引物序列为:5′-CCC TCA TGA CCC GCT GCT GG-3′,下游引物的序列为:5′-GGT GGC CCC CAC CCT CCG TC-3′,扩增片断长度 1 000 bp。以平均灰度值代表相应基因的表达量,并除以 GAPDH 的平均灰度值,所得数值作为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。

1.6　Westernblot 法检测 PYK_2 蛋白表达

每孔细胞中加入 80 μl 蛋白上样缓冲液,放置 5 min 后,吸入小离心管,沸水浴中放置 10 min 后,4 ℃冰箱中冷却。取 30 μl 上样,12% SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜后,放入脱脂奶粉中封闭 4 ℃过夜。PYK_2 多克隆抗体 1∶500 与膜杂交 37 ℃ 60 min,TBS 洗涤,二抗 1∶5 000,杂交 60 min,TBS 洗涤后加入显色剂 5% DAB 显色。β-actin 为内参照蛋白(图 3)。

1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2　结果

2.1　成年大鼠 CFs 的体外培养及鉴定

倒置显微镜下见细胞为梭形或三角形,生长密集时可形成"编织状"外观,免疫细胞化学染色见 95% 以上的细胞中抗波形蛋白染色阳性,抗肌动蛋白染色阴性。

2.2　盐酸尼卡地平对 CFs 增殖和纤维连接蛋白的影响

不同浓度的盐酸尼卡地平作用于 CFs 24 h 后,平均每孔吸光度见表 1,盐酸尼卡地平浓度为 10~40 μmol/L 对AngⅡ诱导的大鼠 CFs 增殖均有明显的抑制作用,呈剂量依赖性关系。同时,纤维连接蛋白表达量也随着加入盐酸尼卡地平浓度的升高而明显下降($P<0.01$)(图 1、表 1)。

表 1　盐酸尼卡地平对 AngⅡ诱导大鼠 CFs 增殖、纤维连接蛋白合成的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	CFs 增殖光吸收值	纤维连接蛋白积分光密度值
对照组	0.192 ±0.026	8.76 ±0.56
AngⅡ组	0.473 ±0.061[a]	29.22 ±11.87[a]
AngⅡ + 佩尔地平针 10 μmol/L 组	0.232 ±0.025[b]	22.03 ±6.236[b]
AngⅡ + 佩尔地平针 20 μmol/L 组	0.197 ±0.019[b]	19.77 ±4.53[b]
AngⅡ + 佩尔地平针 40 μmol/L 组	0.099 ±0.014[b]	13.45 ±2.70[b]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 AngⅡ组比较

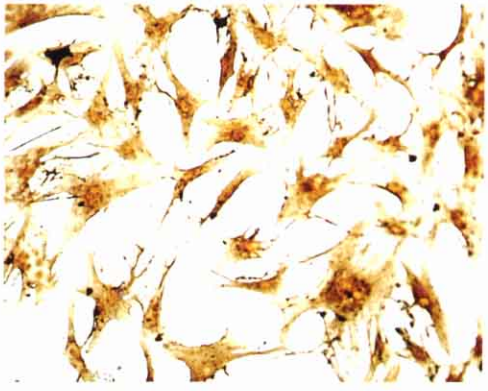


图 1　免疫组化法显示 CFs 纤维连接蛋白表达　(S-P×200)

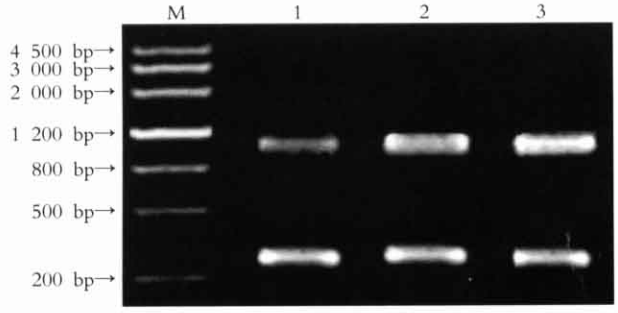
2.3　逆转录 PCR 和 Western blot 检测结果

结果见图 2、3。使用凝胶分析系统可测知扩增条带代表的片段大小与预先设计相符,半定量分析结果见表 2。由表 2 可见盐酸尼卡地平(20 μmol/L)可明显抑制由 AngⅡ诱导的大鼠 CFS 的 PYK_2 mRNA 和蛋白的表达。

表 2　盐酸尼卡地平对 AngⅡ诱导大鼠 CFs 中 PYK_2 mRNA 和蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

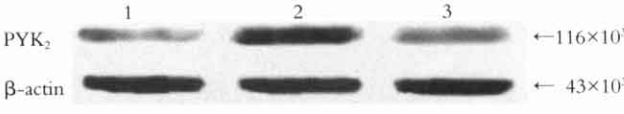
组别	PYK_2 mRNA/GAPDH 比值	PYK_2蛋白相对光密度值
对照组	0.96 ±0.04	0.463 ±0.092
AngⅡ组	1.92 ±0.08[a]	0.774 ±0.110[a]
AngⅡ + 佩尔地平针 20 μmol/L 组	1.42 ±0.10[b]	0.627 ±0.062[b]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 AngⅡ组比较



M：PCR 标准；1：对照组；2：AngⅡ组；3：AngⅡ＋盐酸尼卡地平针 20 μmol/L 组

图2 RT-PCR 法显示 CFs 中 PYK_2 mRNA 表达的变化



1：对照组；2：AngⅡ组；3：AngⅡ＋盐酸尼卡地平 20 μmol/L 组

图3 Western blot 法显示 CFs 中 PYK_2 蛋白表达的变化

3 讨论

CFs 是一种能在细胞外基质内自由移动的多潜能细胞，可合成纤维连接蛋白等细胞外基质成分及胶原蛋白，CFs 增殖和/或合成分泌的“过度”增加是心肌纤维化发生的细胞生物学基础。心肌纤维化通过降低心室顺应性、损伤心肌细胞间的电偶联、增加氧弥散距离、降低心脏收缩能力等机制影响心脏泵功能。由于心肌纤维化是一个复杂的病理过程，多种因素参与它的调节，不同心脏疾病甚至同种疾病不同类型的心肌纤维化的形成机制也有所差异，因此，针对关键调控因素来研制新药和治疗措施以预防和治疗心肌纤维化具有重要意义[3]。

PYK_2作为粘附斑激酶家族的新成员，也称为 Ca^{2+} 依赖性酪氨酸激酶，PYK_2 的活化与 Ca^{2+} 浓度有关。PYK_2是组织中广泛分布的一种激酶，可在细胞核内和细胞质间穿梭，调节核内转录过程。PYK_2是调控大量下游信号通路的“核心”或“开关”，包括离子通道的调节、细胞生长增殖分化迁移、细胞凋亡[4]、炎症调控[5]等。研究已证实，PYK_2是整合素通路和 G 蛋白偶联受体通路的交汇点[6]，PYK_2 与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路[7]、Jak 信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI_3K)[8]信号通路等密切相关，但它的功能至今仍未被完全阐明。

PYK_2与心血管疾病密切相关，研究表明扩张性心肌病中心肌细胞中 PYK_2和下游分子桩蛋白的激活都增加；自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞 PYK_2 的磷酸化明显高于正常血压 Wistar 大鼠，而 AngⅡ介导的前者 PYK_2磷酸化也高于后者，Ca^{2+} 或 PKC 拮抗剂可阻断此作用，PYK_2下调可减少血管平滑肌细胞增殖。有研究表明 AngⅡ可快速引起培养大鼠血管平滑肌细胞 PYK_2酪氨酸磷酸化，其作用可被细胞内 Ca^{2+} 拮抗剂完全抑制，而胞外 Ca^{2+} 拮抗剂可部分抑制大鼠肝细胞 AngⅡ激活 PYK_2 的信号，提示胞外 Ca^{2+} 至少有部分参与 PYK_2活化过程。由于 PYK_2在 CFs 中高表达，结合 PYK_2的功能相关研究，我们推测 PYK_2参与了心肌纤维化的发生发展过程。

目前有关钙通道阻滞剂对心肌纤维化影响的研究较少。已有的研究表明：细胞内钙离子作为第二信使，有促进 CFs 增殖的作用；另外，钙离子还参与某些生长因子的信号传导，而这些生长因子又促进 CFs 的增殖。在本实验中，AngⅡ显著地促进了心肌成纤维细胞的增殖及细胞外基质重要成分纤维连接蛋白的合成，具有促纤维化作用，而盐酸尼卡地平可以浓度依赖性方式抑制 AngⅡ诱导 CFs 的增殖和纤维连接蛋白的合成，且可有效地降低 PYK_2 mRNA 和蛋白的表达，提示盐酸尼卡地平抗纤维化的机制之一可能是通过抑制 PYK_2的表达来实现的。深入探讨介导 CFs 增殖的 PYK_2 信号通路，可能为阐明心肌间质纤维化的发生机制、寻求有效的防治措施提供新的思路和理论依据。

参考文献：

[1] ORLANDI A, FRANCESCONI A, MARCELLINI M, *et al*. Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit[J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(3): 544-552.

[2] SCHLAEPFER D D, MITRA S K, ILIC D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1692(2-3): 77-102.

[3] SEE F, KOMPA A, MARTIN J, *et al*. Fibrosis as a therapeutic target post-myocardial infarction[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(4): 477-487.

[4] BOUTAHAR N, GUIGNANDON A, VICO L, *et al*. Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation [J]. J Biol Chem, 2004, 279(29): 30588-30599.

[5] DI CIOCCIO V, STRIPPOLI R, BIZZARRI C, *et al*. Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis[J]. Immunology, 2004, 111(4): 407-415.

[6] LITVAK V, TIAN D, SHAUL Y D, *et al*. Targeting of PYK2 to focal adhesions as a cellular mechanism for convergence between integrins and G protein-coupled receptor signaling cascades[J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32736-32746.

[7] MCMULLEN M, KELLER R, SUSSMAN M, *et al*. Vascular endothelial growth factor-mediated activation of p38 is dependent upon Src and RAFTK/Pyk2[J]. Oncogene, 2004, 23(6): 1275-1282.

[8] KAWANABE Y, HASHIMOTO N, MASAKI T. Involvements of voltage-independent Ca^{2+} channels and phosphoinositide 3-kinase in endothelin-1-induced PYK2 tyrosine phosphorylation[J]. Mol Pharmacol, 2003, 63(4): 808-813.

（编辑 汪勤俭）