论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2378-05

Rho/Rho 激酶信号通路在低氧致肺纤维化中的作用及法舒地尔的干预效应

高 艳[1],谢 敏[1],石俊青[2] (610041 成都,四川大学华西医院呼吸内科[1];610041 成都,成都市第一人民医院呼吸内科[2])

【摘要】 **目的** 观察人胚肺成纤维细胞低氧培养 24 h 对致纤维化相关因子表达的影响及不同浓度法舒地尔(6、12、25 μmol/L)的干预作用。**方法** 以人胚肺成纤维细胞(MRC-5)为研究对象,体外构建以 HIF-1α 蛋白的高表达为特征的低氧微环境,低氧(37 ℃、5% CO_2、2% O_2、93% N_2) 培养 0、6、12、24 h,Western blot 法检测各低氧时间点 RhoA、ROCK1、CTGF蛋白的表达及以低氧 24 h 为对照组,观察低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)蛋白表达的影响;RT-PCR、MTT 法分别检测低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对人胚肺成纤维细胞(MRC-5)CTGF mRNA 表达和细胞活力的影响,均以低氧 24 h 为对照组。以常氧(21% O_2,74% N_2,5% CO_2)24 h 及低氧 24 h 为对照,ELISA 法测定低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对细胞上清Ⅰ型胶原(Col Ⅰ)表达的影响。**结果** ①随着低氧作用时间延长,RhoA、ROCK1、CTGF 蛋白表达上调并逐渐增强。②低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔(6、12、25 μmol/L)对 CTGF 蛋白及 mRNA 水平均有抑制作用($P<0.05$,$P<0.01$)。③与低氧 24 h 对照组比较,低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔(6、12、25 μmol/L)均对细胞上清 ColⅠ的合成及细胞增殖活性均有抑制作用($P<0.01$)。**结论** 低氧可能是通过激活 Rho/Rho 激酶信号通路促发 CTGF 的高表达进而引发肺成纤维细胞细胞外基质表达增加等一系列促纤维化反应,而法舒地尔通过抑制 Rho/Rho 激酶信号通路来干预低氧致纤维化因子的转录和表达。

【关键词】 法舒地尔;低氧;人胚肺成纤维细胞;ROCK1 结缔组织生长因子

【中图法分类号】 R364.4;R563.02;R978.2 **【文献标志码】** A

Fasudil attenuates hypoxia-induced pulmonary fibrosis *via* suppressing Rho/Rock signal pathway

Gao Yan[1], Xie Min[1], Shi Junqing[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, West China Hospital, Sichuan University; [2]Department of Respiratory Diseases, First People's Hospital of Chengdu, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hypoxic condition on the expressions of RhoA, ROCK1and connective tissue growth factor (CTGF) in human fetal fibroblasts, and the beneficial effects of fasudil in the hypoxia-induced pulmonary fibrosis. **Methods** Human fetal fibroblasts (MRC-5 cells) were cultured under hypoxic condition (37 ℃, 5 % CO_2, 2% O_2, 93% N_2) for 0, 6, 12, and 24 h respectively. The cells cultured in a condition of 21% O_2, 74% N_2 and 5% CO_2 were used as control. The effect of fasudil was investigated in normal group, hypoxia group and intervention groups (6, 12 or 25 μmol/L fasudil) under the corresponding oxygen condition for 24 h. The protein levels of HIF-1α, RhoA, ROCK1, and CTGF were assayed by Western blotting. RT-PCR was performed to detect CTGF mRNA levels. Cell viability was measured by thiazolyl blue (MTT) assay. The concentration of collagen type Ⅰ (Col Ⅰ) in fibroblast cells' supernatant were determined by ELISA. **Results** The protein levels of RhoA, ROCK1 and CTGF were up-regulated by hypoxia in a time-dependent manner. Different concentrations of fasudil all inhibited the expressions of protein and mRNA of CTGF after 24 h of hypoxia ($P<0.01$, 0.05). Compared with the hypoxia for 24 h, fasudil all inhibited cell proliferation activity and the secretion of Col Ⅰ in fibroblast cells's supernatant for hypoxia 24 h ($P<0.01$). **Conclusion** Hypoxia exerts a potential brotic stimulus probabily through activating Rho/Rock signal pathway, thus up-regulates the expression of CTGF, and finally triggers a series of brotic responses. These changes could be markedly inhibited by fasudil. Fasudil attenuates hypoxia-induced pulmonary fibrosis, which may be due to suppressing the Rho/Rock signal pathway.

【基金项目】 四川省科技厅攻关项目(0040205301469)

【通信作者】 谢 敏,E-mail:xiemin@SCSICS.com

[Key words] fasudil; hypoxia; human fetal fibroblasts; ROCK1; connective tissue growth factor

Supported by the Tackling Program of Department of Science and Technology of Sichuan Province (0040205301469). Corresponding author: Xie Min, E-mail: xiemin@SCSICS.com

Rho 激酶即 Rho 相关激酶 ROCK，是 Rho 下游靶效应分子，小 G 蛋白 Rho 如"分子开关"一样激活下游靶分子 Rho 激酶，触发下游激酶级联反应，参与调节细胞的多种生物学行为，包括细胞有丝分裂黏附，细胞骨架调整，肌肉细胞收缩，细胞迁移、增殖、凋亡及基因表达等[1]。近年来其细胞生物调节及转导功能得到了广泛的研究[2]，特别是 Rho 激酶特异性抑制剂的发现，成为探索 Rho/Rho 激酶信号通路在各种疾病发生机制中作用的有力工具。研究显示，其特异性抑制剂对心脏纤维化[3]、肾硬化[4]、肝纤维化[5]等多种器官纤维化有干预效应，且其对低氧性肺动脉高压[6]、博来霉素诱导的肺纤维化[7]也有一定的干预作用。而肺纤维化在临床上常见有局部组织氧供不足即存在低氧的微环境，而低氧在细胞增殖、细胞外基质合成等方面起着重要的调节作用，是一种潜在的促纤维化因素。由此我们提出设想：Rho/Rho 激酶信号通路也参与了低氧所致的肺纤维化，且其抑制剂可能成为一种潜在的治疗低氧致肺纤维化的药物。本实验通过构建以低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1, HIF-1α)高表达为特征的低氧环境模型，以人胚肺成纤维细胞(MRC-5)为研究对象，观察低氧对 Rho/Rho 激酶信号通路、结缔组织生长因子(CTGF)表达及Ⅰ型胶原(ColⅠ)合成的影响，并使用 ROCK 的特异性抑制剂法舒地尔对其干预，进一步探讨低氧致肺纤维化的作用机制及 Rho/Rho 激酶信号通路在低氧致肺纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

MRC-5 由四川大学华西医院移植免疫实验室提供，10% 胎牛血清、DMEM(高糖)(Gibco 公司)，川威盐酸法舒地尔注射液(天津红日药业股份有限公司)，兔抗人 CTGF 抗体、兔抗人 RhoA 抗体、兔抗人 β-actin 抗体(北京博奥森公司)，兔抗人 ROCK1 抗体、兔抗人 HIF-1α 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司)，发光显迹液(美国 Milipore 公司)，MTT 及二甲基亚砜(DMSO)(Amresco 公司)，人Ⅰ型胶原(ColⅠ)ELISA 试剂盒(上海森雄公司)，TaKaRa RNA PCR 试剂盒(宝生物有限公司)，引物设计合成(Invitrogen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清及青、链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 高糖培养基培养 MRC-5 细胞，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱中，每 2~3 天传代。分组实验前，培养细胞至 80% 融合时，以无血清培养基培养 12 h 使细胞饥饿以达到同步化后，换用含 1% 胎牛血清的新鲜培养基然后细胞分组进行各项检测。

1.2.2 低氧环境构建 分别在常氧 12、24 h 及低氧 12、24 h 下用 Western blot 法检测 MRC-5 细胞 HIF-1α 蛋白的表达，以验证低氧环境是否成功造就。实验分为常氧对照组(21% O_2，74% N_2，5% CO_2)、低氧(2% O_2，93% N_2，5% CO_2)6、12、24 h 组，即低氧条件下分别孵育 0、6、12、24 h，刺激细胞结束时，弃去培养皿的培养基，以灭菌 PBS 1 ml/次洗皿 3 次，加入 150 μl 含有蛋白抑制剂的细胞裂解液，置冰上裂解 30 min，刮下细胞，置冰浴中超声破碎细胞，4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min，吸取上清液测蛋白质浓度。加上样缓冲液并于沸水中煮 6 min 后以 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，完毕后半干法电转移至 PVDF 膜，5% 的 TBST 脱脂奶粉封闭 2 h，加一抗(1∶500)4 ℃过夜，TBST 洗膜 3 次(5 min/次)，加入二抗(1∶10 000)室温作用 2 h，TBST 洗膜 3 次(5 min/次)，加 ECL 荧光剂，压片显影。Scan-Drv6 软件扫描胶片，运用 Quantity One 图像分析系统对 Western blot 结果进行图像分析。对各电泳条带的光密度值进行扫描，以HIF-1α/β-actin 的值代表目的蛋白表达的相对含量。

1.2.3 低氧作用不同时间对 MRC-5 细胞 RhoA、ROCK1、CTGF 蛋白表达的影响 采用 Western blot 法检测 MRC-5 细胞 RhoA、ROCK1、CTGF 蛋白的表达，实验分组及方法同 1.2.2。

1.2.4 不同浓度法舒地尔对低氧 24 h 下 MRC-5 细胞 CTGF 蛋白表达的影响 实验分为常氧 24 h 对照组、低氧 24 h 对照组(未予药物处理)、低氧 24 h + 法舒地尔 6 μmol/L、低氧 24 h + 法舒地尔 12 μmol/L、低氧 24 h + 法舒地尔 25 μmol/L。采用 Western blot 检测 MRC-5 细胞 CTGF 蛋白的表达，实验方法同 1.2.2。

1.2.5 不同浓度法舒地尔对低氧 24 h 下 MRC-5 细胞 CTGF mRNA 表达的影响 实验分组同 1.2.4，采用 RT-PCR 检测各组细胞 CTGF mRNA 的表达，以 Trizol 法提取各组细胞总 RNA，按逆转录试剂盒操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA，再依照 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。反应总体系 25 μl，PCR 反应条件 94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 30 s，59 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，进行 30 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并用凝胶成像系统进行凝胶摄像和图像分析。CTGF 上游引物 5′-AGATTCCCACCCAATTCAAA-3′，下游引物：5′-TTCACTTGCCA-CAAGCTGTC-3′，产物长度 430 bp；β-actin 上游引物 5′-CAACT-GGGACGATATGAGAAG-3′，下游引物：5′-AGGAAGGAAGGCT-GGAAGAG-3′，产物长度 570 bp。以 CTGF 与 β-actin 电泳条带积分光密度(integrated optical density, IOD)值的比值表示CTGF mRNA 的相对表达量。

1.2.6 MTT 观察低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对细胞增殖活力的影响 实验分组同 1.2.4。用 0.25% 胰蛋白酶消化接近汇合的 MRC-5 细胞(8~12 代)，用含 10% FCS 的 DMEM 培养液制成单细胞悬液(1×10^4/ml)接种于 96 孔板中，每孔 200 μl，置 37 ℃，5% 的 CO_2 培养箱培养 24 h。24 h 后换为含法舒地尔的 DMEM 培养基于低氧下培养 24 h，法舒地尔终浓度为 0(对照组)、6、12、25 μmol/L 组，并设空白调零组，每组设 5 个

复孔。培养结束后加 MTT(5 mg/ml)20 μl,继续孵育 4 h。取出,弃上清,加 DMSO 150 μl/孔,平板摇床上摇动混匀 10 min,酶标仪 490 nm 处测光密度值[D(490)]。

1.2.7 ELISA 测定培养细胞上清 Col Ⅰ的表达 实验分组同 1.2.4。低氧孵育 24 h 后收集各组细胞上清,3 000 r/min 离心,按照 ELISA 试剂盒说明分别测定。

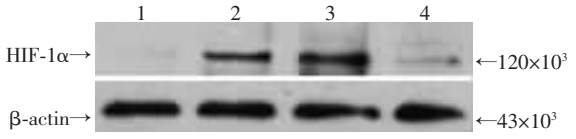
1.3 统计学分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,多组间数据比较行方差分析,两两比较用 LSD 法,相关性行直线相关分析。

2 结果

2.1 低氧环境的构建

构建以 HIF-1α 高表达为特征的低氧环境模型,结果显示,常氧 12、24 h 对照组 MRC-5 细胞有少量 HIF-1α 的基础表达[HIF-1α/β-actin 分别(0.016 ± 0.013)、(0.193 ± 0.027)],而在低氧 12、24 h 后出现相应的高表达[HIF-1α/β-actin 分别为(0.432 ± 0.028)、(0.905 ± 0.037)],且具有时间依赖性(P < 0.01)。见图 1。

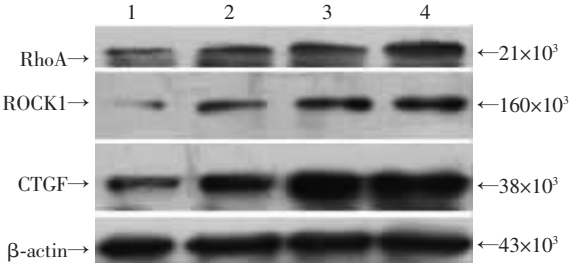


1:常氧 12 h 组 2:低氧 12 h 3:低氧 24 h 组 4:常氧 24 h 组

图 1 Western blot 检测 HIF-1α 蛋白的表达

2.2 低氧 0、6、12、24 h 下对 MRC-5 细胞 RhoA、ROCK1、CTGF 的蛋白表达的影响

常氧对照组 MRC-5 细胞有基础量 RhoA、ROCK1、CTGF 表达,但在低氧条件下,三者的表达水平均即增强,以低氧 24 h 表达最显著(P < 0.05)。故选择低氧 24 h 为后续研究的时间点。见图 2,表 1。



1:常氧 0 h 组;2:低氧 6 h 组 3:低氧 12 h 组 4:低氧 24 h 组

图 2 Western blot 检测不同时间点低氧对 RhoA、ROCK1、CTGF 表达的影响

表 1 不同时间点低氧对 RhoA、ROCK1、CTGF 蛋白表达的影响(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA/β-actin	ROCK1/β-actin	CTGF/β-actin
常氧 0 h 组	0.203 ± 0.062	0.035 ± 0.027	0.418 ± 0.009
低氧 6 h 组	0.307 ± 0.119[a]	0.245 ± 0.021[a]	0.748 ± 0.02[a]
低氧 12 h 组	0.368 ± 0.088[a]	0.368 ± 0.023[a]	1.164 ± 0.045[a]
低氧 24 h 组	0.519 ± 0.216[ab]	0.431 ± 0.022[ab]	1.415 ± 0.09[ac]

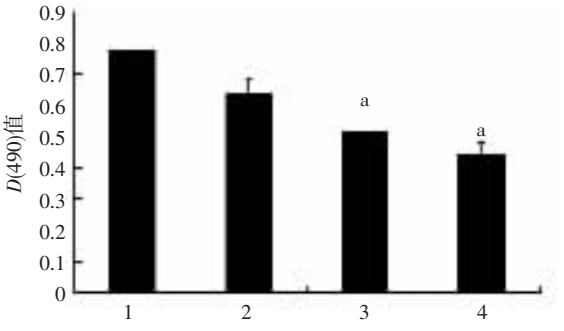
a:P < 0.01,与常氧 0 h 组比较 b:P < 0.01, c:P < 0.05,与低氧 12 h 组比较

2.3 低氧 6、12、24 h 下 MRC-5 细胞的 RhoA、ROCK1 蛋白表达水平与 CTGF 蛋白表达相关性分析

低氧 6、12、24 h 下 MRC-5 细胞的 RhoA、ROCK1 蛋白表达水平与 CTGF 蛋白表达水平呈显著正相关,即随着低氧时间延长,在 RhoA、ROCK1 蛋白表达水平上升的同时,CTGF 蛋白表达水平也上升(r 值分别为 0.964、0.98,P < 0.01)。

2.4 MTT 观察低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对细胞增殖活力的影响

我们的前期研究已显示低氧对 MRC-5 细胞增殖有促进作用,故我们加入不同浓度法舒地尔(0、6、12、25 μmol/L)于低氧下处理 24 h,结果显示不同浓度法舒地尔在低氧下对细胞增殖均有抑制作用,且抑制率分别为 12.8%、29.0%、38.7%。见图 3。



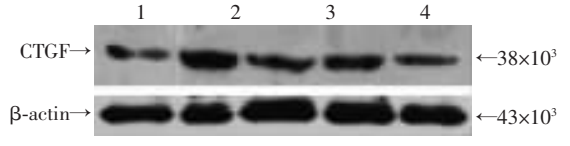
a:P < 0.01,与低氧 24 h 组比较

1:低氧 24 h 组 2:低氧 24 h + 法舒地尔 6 μmol/L 组 3:低氧 24 h + 法舒地尔 12 μmol/L 组 4:低氧 24 h + 法舒地尔 25 μmol/L 组

图 3 低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对细胞增殖活力的影响

2.5 不同浓度法舒地尔对低氧刺激 MRC-5 表达 CTGF 的影响

2.5.1 低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对 CTGF 蛋白表达的影响 常氧 24 h 对照组 CTGF 有基础性表达[CTGF/β-actin (0.359 ± 0.040)]。但在低氧 24 h 下,MRC-5 的CTGF 蛋白表达增高[CTGF/β-actin (1.012 ± 0.053),P < 0.01],且不同浓度法舒地尔处理的 MRC-5 细胞,其蛋白表达较单纯低氧 24 h 组均明显降低[6、12、25 μmol/L CTGF/β-actin 分别为 (0.521 ± 0.11)、(0.448 ± 0.098)、(0.365 ± 0.105),P < 0.01]。且高剂量法舒地尔组 25 μmol/L 的抑制作用大于低剂量法舒地尔组 6 μmol/L(P < 0.05)。见图 4。

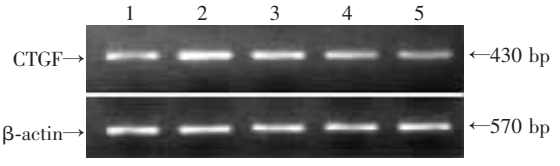


1:常氧 24 h 组 2:低氧 24 h 组 3:低氧 24 h + 法舒地尔 6 μmol/L 组 4:低氧 24 h + 法舒地尔 12 μmol/L 组 5:低氧 24 h + 法舒地尔 25 μmol/L 组

图 4 Western blot 检测不同浓度法舒地尔对 CTGF 蛋白表达的影响

2.5.2 低氧 24 h 下不同浓度法舒地尔对 CTGF mRNA 表达的影响 常氧 24 h 对照组 CTGF mRNA 有基础性表达[CTGF/β-actin(1.350 ± 0.054)]。但在低氧 24 h 下,MRC-5 的 CTGF

mRNA 表达增高[CTGF/β-actin (1.797 ± 0.038), $P < 0.01$],且不同浓度法舒地尔均对 MRC-5 细胞的 CTGF mRNA 表达有抑制作用[6、12、25 μmol/L CTGF/β-actin 分别为(1.381 ± 0.169)、(1.373 ± 0.216)、(0.946 ± 0.090), $P < 0.05$]。见图 5。

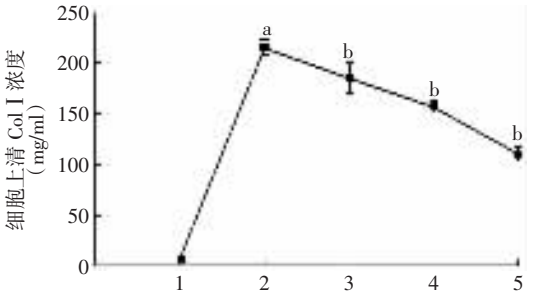


1:常氧 24 h 组 2:低氧 24 h 组 3:低氧 24 h + 法舒地尔 6 μmol/L 组 4:低氧 24 h + 法舒地尔 12 μmol/L 组 5:低氧 24 h + 法舒地尔 25 μmol/L 组

图 5　RT-PCR 检测 CTGF mRNA 的表达水平

2.6　不同浓度法舒地尔对各组细胞上清 Col Ⅰ表达的影响

常氧 24 h 对照组 Col Ⅰ的浓度非常微弱,而在低氧 24 h 后,其浓度出现明显增高($P < 0.01$),且在低氧 24 h 下,不同浓度法舒地尔对 MRC-5 细胞 Col Ⅰ的分泌均有抑制作用($P < 0.01$)。见图 6。



a:$P < 0.01$,与常氧 24 h 组比较;b:$P < 0.01$,与低氧 24 h 组比较 1:常氧 24 h 组;2:低氧 24 h 组;3:低氧 24 h + 法舒地尔 6 μmol/L 组;4:低氧 24 h + 法舒地尔 12 μmol/L 组;5:低氧 24 h + 法舒地尔 25 μmol/L 组

图 6　不同浓度法舒地尔对细胞上清 Col Ⅰ浓度的影响

3　讨论

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是一组由多种病因引起的主要累及肺间质、肺泡和(或)细支气管的肺部弥漫性疾病,在病理上以肺成纤维细胞的增殖和大量细胞外基质的沉积和重构、局部组织氧供不足即缺氧为其主要特点。而低氧作为一种潜在的促纤维化因素,可能是通过促发致纤维化因子的高表达及细胞外基质的过度沉积、相应细胞的增殖和凋亡,血管生成等病理改变,致肺组织损伤及异常修复,肺血管结构重塑,最终导致广泛肺纤维化。本实验中以人 MRC-5 细胞为研究对象,造就以 HIF-1α 高表达为特征的低氧微环境来探讨低氧致肺纤维化的可能机制。

Rho 为小分子鸟苷酸结合蛋白(又称小 G 蛋白),通过激活下游靶分子 Rho 激酶,触发下游激酶级联反应参与调节细胞的多种生物学行为,包括细胞有丝分裂黏附,细胞骨架调整,肌肉细胞收缩,细胞迁移、增殖、凋亡及基因表达等。近年来研究表明 Rho/Rho 激酶信号通路参与了肿瘤性、神经性、纤维化及心血管等多种疾病的发生、发展,成为研究的热点。CTGF 是一种富含半胱氨酸的由 349 个氨基酸组成的多肽,属于 CCN 家族,由于其较特异的促组织纤维化效应而得到广泛的研究,Allen 等[8,9]提出,缺氧可作为一个独立的因素刺激成纤维细胞高表达 CTGF。CTGF 在低氧条件下的高表达机制尚不清楚,我们认为可能有 2 种主要途径:①通过 TGF-β/Smads 途径,低氧条件下可使 TGF-β 的表达增强[10],其通过 Smads 途径与 CTGF 启动子序列上的相应位点结合而促发 CTGF 的表达。②通过 HIF-1 诱导 CTGF 表达,低氧使 HIF-1 不被降解而活性增加,它能直接与 CTGF 基因启动子区 HREs 结合增加其转录活性,增加 CTGF mRNA 的表达[9],而贯穿以上两种途径的一个重要物质便是 RHO 蛋白。在低氧条件下,RHO 异常活化从而使 HIF-1 持续表达而发挥作用[11];此外在 TGF-β 活化 RHO 的同时[12],RHO 也介导了 TGF-β 促发的 CTGF 表达 CTGF 的高表达[13]可进一步调节细胞分泌 Col Ⅰ的量来参与细胞外基质沉积。本实验中,我们发现常氧 0 h 组 MRC-5 细胞有基础水平的 RhoA、ROCK1、CTGF 蛋白的表达,但低氧作用 6 h 后三者蛋白的表达均上调,且随低氧时间延长,表达增强,以低氧 24 h 最高。为验证低氧下三者蛋白表达趋势的关系,我们用直线相关性分析显示:低氧下,RhoA、ROCK1 与 CTGF 蛋白表达呈显著正相关(r 值分别为 0.964、0.98, $P < 0.01$),这与我们前期实验结果是相符的。本实验证明低氧促进 MRC-5 细胞高表达 CTGF 可能部分是通过激活 Rho/Rho 激酶信号通路来实现的。对于低氧如何活化 Rho/Rho 激酶信号通路,有研究显示:慢性低氧增加了肺内活性氧 ROS 的生成,通过 ROS 依赖性的活化 Rho/Rho 激酶信号通路而增强了 ET-1 介导的 Ca^{2+} 敏感性最终导致肺动脉高压[14],而低氧致纤维化过程中是否也通过同样的方式活化 Rho/Rho 激酶信号通路还有待于进一步研究。

法舒地尔为 Rho 激酶的特异性抑制剂之一,为一种新型异喹啉磺胺衍生物,其主要通过与 ATP 竞争 Rho 激酶催化区的 ATP 结合位点而阻断 Rho 激酶的活性,本实验结果显示:低氧 24 h 下,6、12、25 μmol/L 浓度法舒地尔处理 MRC-5 细胞能有效抑制低氧 24 h 引起的 MRC-5 CTGF 蛋白及 CTGF mRNA 水平表达上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),且高浓度法舒地尔较低浓度法舒地尔对 MRC-5 细胞 CTGF 蛋白及 CTGF mRNA 水

平表达的抑制作用更强($P<0.05$),由上可得出,法舒地尔通过 Rho/Rho 激酶信号通路在蛋白及基因水平抑制低氧引起的 MRC-5 CTGF 表达,从而进一步证明 Rho/Rho 激酶信号通路在低氧致纤维化因子高表达中的作用。

肺成纤维细胞的增殖及大量细胞外基质特别是Ⅰ型胶原的沉积是导致肺纤维化的重要病理过程,我们的前期实验结果已显示[15]:低氧显著促进了 MRC-5 增殖及Ⅰ型胶原的表达,那么 Rho 激酶的特异性抑制剂法舒地尔是否也对上述两个重要的病理过程有干预作用呢?本实验结果显示:与单纯低氧 24 h 对照组比较,不同浓度(6、12、25 μmol/L)法舒地尔均对低氧下 MRC-5 的增殖有抑制作用,抑制率分别为 12.8%、29.0%、38.7%,推测法舒地尔可能是通过抑制低氧引发的 Rho/Rho 激酶信号通路及下游 CTGF 表达进而抑制其诱发细胞增殖的作用。除此之外,研究显示CTGF 的过度表达可以上调 ColⅠα2 启动子转录起始位点上游 379 bp 处 CTGF 的应答元件从而刺激胶原的合成[16]。本实验结果显示:不同浓度(6、12、25 μmol/L)法舒地尔均能显著抑制低氧 24 h 引发 MRC-5 ColⅠ高分泌($P<0.05$),提示法舒地尔可能通过抑制低氧激活的 Rho/Rho 激酶信号通路来抑制低氧引发的 CTGF 及其下游 ColⅠ的表达

上述结果表明,低氧激活 Rho/Rho 激酶信号通路、ROCK 作用于其下游底物因子 CTGF 致其高表达,而 CTGF 的高表达促发了人胚肺成纤维细胞增殖及 ColⅠ合成,从而最终致肺纤维化。Rho 激酶的特异性抑制剂法舒地尔则通过与 ATP 竞争 Rho 激酶催化区的 ATP 结合位点而阻断 Rho 激酶的活性,间接抑制了低氧所致的 CTGF 高表达、人胚肺成纤维细胞增殖及 ColⅠ的合成,对低氧致肺纤维化有一定的干预作用。本实验通过体外构建低氧微环境,发现法舒地尔是通过 Rho/Rho 激酶信号通路来抑制低氧致 CTGF 及 ColⅠ表达,初步探索了低氧致肺纤维化的作用机制及 Rho/Rho 激酶信号通路在低氧致肺纤维化中的参与作用,为低氧致肺纤维化提供了潜在干预靶点,同时提示法舒地尔可能具有开发价值,但更为详细的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1):153-208.

[2] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. J Mol Med, 2002, 80(10):629-638.

[3] Kagiyama S, Matsumura K, Goto K, *et al*. Role of Rho kinase and oxidative stress in cardiac fibrosis induced by aldosterone and salt in angiotensin type 1a receptor knockout mice[J]. Regul Pept, 2010, 160(1/3):133-139.

[4] Koshikawa S, Nishikimi T, Inaba C, *et al*. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, reverses L-NAME exacerbated severe nephrosclerosis in spontaneously hypertensive rats[J]. J Hypertens, 2008, 26(9):1837-1848.

[5] 王玉珍, 姜慧卿, 扈彩霞, 等. 法舒地尔通过 Rho/ROCK 信号通路抑制肝星状细胞黏附、迁移和增殖[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(11):821-823.

[6] 孙兴珍, 田向阳. 法舒地尔对大鼠低氧性肺动脉高压及其肺血管结构重建的影响[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(5):421-424.

[7] Shimizu Y, Dobashi K, Iizuka K, *et al*. Contribution of small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(1):210-217.

[8] Allen J T, Knight R A, Bloor C A, et al. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 21(6):693-700.

[9] Higgins D F, Biju M P, Akai Y, *et al*. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(6):F1223-F1232.

[10] Papakonstantinou E, Aletras A J, Roth M, *et al*. Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts[J]. Cytokine, 2003, 24(1/2):25-35.

[11] Takata K, Morishige K, Takahashi T, *et al*. Fasudil-induced hypoxia-inducible factor-1alpha degradation disrupts a hypoxia-driven vascular endothelial growth factor autocrine mechanism in endothelial cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6):1551-1561.

[12] Itoh Y, Kimoto K, Imaizumi M, *et al*. Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2007, 84(3):464-472.

[13] Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, *et al*. Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48):37429-37435.

[14] Jernigan N L, Walker B R, Resta T C. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca^{2+} sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(3):L515-L529.

[15] 何正平, 谢敏. 姜黄素对低氧下肺成纤维细胞增殖及Ⅰ型胶原表达的抑制作用研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2010, 41(4):621-625.

[16] Holmes A, Abraham D J, Sa S, *et al*. CTGF and SMADs, Maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling[J]. J Biol Chem, 2001, 276(14):10594-10601.

(收稿:2010-06-01 修回:2010-08-12)

(编辑 吴培红)