文章编号:1000-5404(2011)07-0735-03

论著

阿托伐他汀抑制心房肌细胞 CTGF 及 Cx43 的表达

张卫泽[1],宋振华[2],陈永清[1],马 凌[1],李丹丹[2],惠玲玲[3] (730050 兰州,兰州军区总医院心血管内科[1];730000 兰州,兰州大学第二临床学院心血管内科[2];710032 西安,第四军医大学西京医院心血管内科[3])

【摘要】 **目的** 探讨阿托伐他汀(atorvastatin)对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的心房肌细胞结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)及缝隙连接蛋白 43(Connexin 43,Cx43)表达的影响。**方法** 18 只雌雄对半 1 周龄左右 Wistar 大鼠,用于体外心房肌细胞的分离培养与鉴定。设置 6 组(n = 18):正常对照组、AngⅡ(终浓度 1 μmol/L)组、AngⅡ + 二甲基亚砜(DMSO)组、AngⅡ + atorvastatin(0.1、1.0、10 μmol/L)组,作用 72 h 后 RT-PCR 分别检测 CTGF、TGF-β1 及 Cx43 的 mRNA 表达。**结果** 与正常对照组相比,AngⅡ组 CTGF、TGF-β1 和 Cx43 mRNA 表达呈显著增加($P<0.05$),阿托伐他汀逆转上述变化,10 μmol/L 组作用最强($P<0.05$),而作为溶剂的 DMSO 无明显作用($P>0.05$)。**结论** 阿托伐他汀可能通过抑制 AngⅡ诱导的心房肌细胞 CTGF mRNA 的高表达来减轻心房纤维化,同时可能通过下调 Cx43 mRNA 的表达来逆转缝隙连接蛋白的重构,最终减低房颤发生率。

【关键词】 阿托伐他汀;血管紧张素Ⅱ;原代心房肌细胞;结缔组织生长因子;转化生长因子-β1;缝隙连接蛋白 43;大鼠

【中图法分类号】 R972.2;R322.11;R394.2 **【文献标志码】** A

Atorvastatin inhibits CTGF and Cx43 expressions in primarily cultured rat atrial myocytes

Zhang Weize[1], Song Zhenhua[2], Chen Yongqing[1], Ma Ling[1], Li Dandan[2], Hui Lingling[3] ([1]Department of Cardiology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu Province, 730050; [2]Department of Cardiology, Second School of Clinical Medicine, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [3]Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of atorvastatin on the expressions of angiotensin Ⅱ-induced atrial myocytes connective tissue growth factor (CTGF) and Connexin 43 (Cx43) in atrial myocytes. **Methods** A total of 18 Wistar rats of both genders, weighing from 35 to 40 g and aging about 1 week were used for culturing primary atrial myocytes and identification. The cells were divided into 6 groups, normal control, AngⅡ(1 μmol/L), AngⅡ + dimethyl sulfoxide (DMSO) and AngⅡ + atorvastatin (0.1, 1.0 and 10 μmol/L). In 72 h after treatment, mRNA expressions of CTGF, transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and Gx43 were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with normal control group, expressions of CTGF, TGF-β1 and Gx43 were increased significantly in AngⅡ group ($P<0.05$), but atorvastatin reversed those changes in a dose-dependent manner ($P<0.05$). However, DMSO had no such effect as a solvent ($P>0.05$). **Conclusion** Atorvastatin maybe attenuate atrial fribosis by inhibiting the increase of mRNA expression of CTGF induced by AngⅡ, reverse the remodeling of connexin by downregulating mRNA expression of Cx43, and thus reduce the incidence rate of atrial fibrillation.

【Key words】 atorvastatin; angiotensin Ⅱ; primary atrial myocytes; connective tissue growth factor; transforming growth factor-β1; connexin 43; rats

Corresponding author: Song Zhenhua, E-mail: songzhenhua001@126.com

阿托伐他汀通过抗炎、抗氧化作用被广泛应用于心血管疾病的治疗[1]。Abuissa 等[2]和 Patti 等[3]通过临床实验发现其在预防和治疗房颤方面独树一帜。近期研究指出 AngⅡ通过 Rac1 系统激活能够上调 Cx43 表达的 CTGF[4],而 Cx43 重构在房颤发生时心房结构重构中扮演重要角色,而早期 Ruperez 等[5]报道阿托伐他汀在一定程度上通过 RhoA/ROCKh 和 MAPK 途径来抑制 AngⅡ诱导的 CTGF 的表达,同时研究证实阿托伐他汀可以阻止 Cx43 重构[6]。所以本实验通过 AngⅡ干预心房肌细胞模拟房颤发生时的体外分子细

【通信作者】 宋振华,E-mail:songzhenhua001@126.com

胞学病理生理变化，从CTGF、Cx43方面探讨阿托伐他汀降低房颤发生率的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

18只雌雄对半，1周龄左右Wistar大鼠，体质量35～40 g（兰州军区总医院实验动物中心提供）。高糖DMEM/F12干粉培养基、胎牛血清、胰蛋白酶和Ⅱ型胶原酶购自Gibco公司，AngⅡ、5-溴脱氧尿嘧啶购自Sigma公司，分析纯二甲基亚砜（北京索莱宝技术有限公司），心肌细胞特异性抗体兔抗大鼠α-横纹肌肌动蛋白和SABC的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司，阿托伐他汀钙片（atorvastatin，立普妥）由大连辉瑞制药有限公司惠赠，CTGF、TGF-β1和Cx43的RT-PCR试剂盒（TaKaRa）购自大连宝生物有限公司。

1.2 大鼠心房肌细胞的原代培养

参照程伟等[7]原代心房肌细胞的培养方法，取18只Wistar大鼠，将大鼠呈仰卧位固定，消毒胸部皮肤，沿胸骨左缘剑突上一肋剪开并去除胸前壁，迅速切除心脏并置于冷PBS液清洗4次，去血，取左、右心房，用无血清培养基洗涤，无菌条件下用眼科剪将心房肌修剪成直径约1 mm×1 mm×1 mm大小的肌粒。在组织块中加入0.08%胰酶，37 ℃水浴10 min，随后吹打，弃上清液后加入混合酶（含0.08%胰酶和0.04% Ⅱ型胶原酶）水浴手摇反复消化，收集上清后加入含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基中终止消化，200目细胞筛过滤，细胞悬液离心1 000 r/min，4 ℃ 10 min，弃上清液，再用DMEM/F12培养液洗细胞1次，离心，弃上清，加入DMEM/F12培养液（含10%胎牛血清），打散细胞团为单细胞悬液。调整细胞数为1.0×10^5/ml，将单细胞悬液接种于培养皿中。将培养皿置于37 ℃ 5% CO_2孵箱中培养1 h后，采用差速贴壁分离技术去除成纤维细胞，吸取培养瓶中的细胞悬液滴加在有盖玻片的6孔培养板中，滴入Brdu使其终浓度为0.1 mmol/L，并继续培养。48 h后换液，加不含Brdu的DMEM/F12培养液（含10%的胎牛血清），并用倒置显微镜观察并摄片。观察项目：细胞形态大小、细胞贴壁时间、单细胞出现搏动时间、搏动频率。

1.3 细胞爬片标本制备及免疫细胞化学染色鉴定心房肌细胞

细胞培养24 h后，用4%多聚甲醛固定30 min，在30% H_2O_2 1份＋纯甲醇50份混合液中室温浸泡30 min，以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗1～2次，滴加5% BSA封闭液，室温20 min。甩去多余液体，不洗，细胞片滴加1∶150稀释的兔抗大鼠α-横纹肌肌动蛋白一抗工作液（4 ℃过夜），PBS洗2 min×3次。滴加试剂SABC的羊抗兔二抗，20～37 ℃ 20 min。PBS洗5 min×4次。DAB室温显色，苏木精轻度复染、脱水、透明、封片。显微镜观察并摄片。

1.4 阿托伐他汀的干预处理分组

心房肌细胞在24孔培养板中培养48 h后，更换无血清培养液，24 h后加入不同浓度（0.1、1.0、10 μmol/L）的阿托伐他汀，60 min后加入AngⅡ（终浓度1 μmol/L），作用72 h后收获细胞。设立6组（$n=18$）：正常对照组、AngⅡ组、AngⅡ＋DMSO组、AngⅡ＋atorvastatin（0.1、1.0、10 μmol/L）组。

1.5 RT-PCR检测CTGF、TGF-β1、Cx43的mRNA表达

以Trizol试剂盒（Invitrogen）提取细胞的总RNA，逆转录反应依照试剂盒说明进行。分别以各自的引物（表1）扩增CTGF、TGF-β1、Cx43和内参照GAPDH。CTGF、TGF-β1、Cx43和内参照GAPDH的PCR扩增条件均为：95 ℃预变性5 min，然后95 ℃ 45 s→55 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min，40次循环后72 ℃再延伸8 min。取RT-PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳（含溴化乙锭0.5 mg/L），紫外凝胶成像系统分析光密度值及mRNA相对表达量。

表1 基因引物序列及扩增片段大小

目的基因	引物序列	片段长度
CTGF	正义链 5′-CCTGACCCAACTATGATGC-3′	200 bp
	反义链 5′-CCCTTACTCCCTGGCTTT-3′	
TGF-β1	正义链 5′-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3′	79 bp
	反义链 5′-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3′	
Cx43	正义链 5′-AGAATCATAGCGTCGGTGTCAGG-3′	82 bp
	反义链 5′-GCTGGTATTTGGATGGCTGAAGA-3′	
GAPDH	正义链 5′-GGCACAGTCAAGGCTGAGAAATG-3′	150 bp
	反义链 5′-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3′	

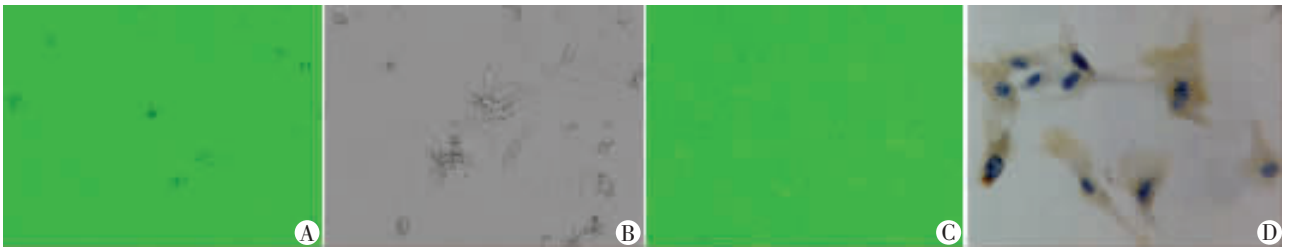
1.6 统计学分析

各实验数据为实验重复3次的平均值，以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理，以单因素方差分析各组之间的差异，组间两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 心房肌细胞的原代培养和免疫组化鉴定

倒置显微镜下观察，心房肌细胞培养24 h，可见圆形细胞贴壁拓展成多边形，偶见自发性搏动，平均108/min。免疫化学染色，α-横纹肌肌动蛋白阳性：培养48 h，可见细胞大多数自发性搏动，频率不一致，90～120/min；培养至72 h，可见单个细胞融合在一起，同时搏动，平均90/min。见图1。



A：培养24 h（倒置显微镜 ×100）；B：培养48 h（倒置显微镜 ×100）；C：培养72 h（倒置显微镜 ×40）；D：培养24 h免疫化学染色（SABC ×200）

图1 心房肌细胞培养形态观察及免疫组化鉴定

2.2 RT-PCR 结果

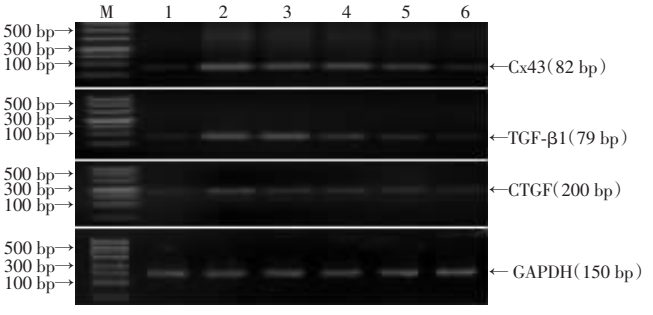
2.2.1 阿托伐他汀对 AngⅡ上调 CTGF 和 TGF-β1 及 Cx43 mRNA 表达的影响 与正常心肌细胞对照组相比，AngⅡ可明显增加心房肌细胞 CTGF、CTGF 和 Cx43 mRNA 的表达（$P<0.05$），阿托伐他汀可逆转上述变化（$P<0.05$），见表2。

2.2.2 各组 CTGF、TGF-β1 及 Cx43 的电泳结果 结果显示 AngⅡ组和 AngⅡ+DMSO 组 CTGF、TGF-β1 和 Cx43 mRNA 的表达增强，而 atorvastatin 干预组中，与正常对照组比较无明显变化，见图2。

表2 各组 CTGF、TGF-β1 和 Cx43 mRNA 的相对表达水平（$n=18$，$\bar{x}\pm s$）

组别	CTGF	TGF-β1	Cx43
正常对照组	0.43±0.03	0.30±0.07	0.97±0.03
AngⅡ组	0.94±0.03[a]	1.37±0.32[a]	1.83±0.02[a]
AngⅡ+DMSO 组	0.93±0.02[a]	1.28±0.15[a]	1.78±0.02[a]
AngⅡ+0.1 μmol/L atorvastatin 组	0.75±0.03[b]	1.18±0.07[b]	1.36±0.04[b]
AngⅡ+1.0 μmol/L atorvastatin 组	0.66±0.02[b]	0.48±0.03[b]	1.24±0.04[b]
AngⅡ+10 μmol/L atorvastatin 组	0.47±0.05[b]	0.33±0.03[b]	1.04±0.05[b]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 AngⅡ组比较



M：标准；1：正常对照组；2：AngⅡ组；3：AngⅡ+DMSO 组；4：AngⅡ+0.1 mol/L atorvastatin 组；5：AngⅡ+1.0 μmol/L atorvastatin 组；6：AngⅡ+10 μmol/L atorvastatin 组

图2 RT-PCR 检测各组 CTGF、TGF-β1 及 Cx43 的 mRNA 表达

3 讨论

阿托伐他汀在预防和治疗房颤方面具有无可比拟的应用前景。房颤与心肌纤维化密切相关，减少心肌纤维化可以有效预防房颤的发生。已有研究证实，结缔组织生长因子作为转化生长因子-β1 的下游介质与心肌纤维化密切相关，同时 CTGF 可以上调缝隙连接蛋白43 mRNA 的表达[4]，所以本实验通过 AngⅡ干预心房肌细胞从 CTGF 和 Cx43 mRNA 表达方面探讨阿托伐他汀降低房颤发生率的作用机制。

CTGF 不仅是一种诱导心脏成纤维细胞增殖的致纤维化因子，国内郭敏等[8]指出纯化的心肌细胞有 CTGF 的基础表达，并且与心房纤维化密切相关的 TGF-β1 可以明显上调其表达[9]，提示心肌细胞主动参与了心肌纤维化过程。Bujak 等[10]研究表明，AngⅡ可激活 TGF-β1 将其转变为生物活性形式，继而激活下游的 CTGF，也可直接激活 Rac-1 和辅酶Ⅱ来激活 CTGF 介导心肌纤维化，He 等[11]证实 AngⅡ可以上调 CTGF mRNA 的表达；同时已有报道 AngⅡ升高可激活 MAPK 系统重要信号分子-细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK），促进缝隙连接蛋白43 的合成[12]。本实验结果显示 AngⅡ组 CTGF、TGF-β1 mRNA 和 Cx43 mRNA 表达明显高于正常对照组，与上述报道一致，而阿托伐他汀治疗组可逆转上述变化，证实阿托伐他汀可能通过抑制 CTGF、TGF-β1 mRNA 和 Cx43 mRNA 的表达来减低心房肌纤维化，从而减低房颤的发生率。

综上所述，阿托伐他汀在一定程度上可能通过下调与心肌纤维化密切相关的 CTGF 及与结构重构密切相关的 C43 的表达，逆转心房纤维化从而阻止心房肌结构重构这一过程进展，在预防和治疗房颤发生方面具有重大意义，但具体作用机制还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Athyros V G, Tziomalos K, Karagiannis A, *et al*. Atorvastatin：safety and tolerability[J]. Expert Opin Drug Saf, 2010, 9(4)：667－674.

[2] Abuissa H, O'Keefe J H, Bybee K A. Statins as antiarrhythmics：a systematic review part Ⅰ：effects on risk of atrial fibrillation[J]. Clin Cardiol, 2009, 32(10)：544－548.

[3] Patti G, Chello M, Candura D, *et al*. Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery：results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study[J]. Circulation, 2006, 114(14)：1455－1461.

[4] Adam O, Lavall D, Theobald K, *et al*. Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(5)：469－480.

[5] Ruperez M, Rodrigues-Diez, Blanco-Colio M, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin Ⅱ-induced vascular fibrosis：role of RhoA/ROCK and MAPK pathways[J]. Hypertension, 2007, 50(2)：377－383.

[6] Chen H J, Yao L, Chen TG, *et al*. Atorvastatin prevents connexin43 remodeling in hypertrophied left ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(21)：1902－1907.

[7] 程伟，肖颖彬，王学锋. 维拉帕米抑制快速起搏诱导心房肌细胞离子通道重构的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：444－446.

[8] 郭敏，郎明健，曾秋棠，等. 心肌细胞结缔组织生长因子的表达及TGF-β1 对其表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2008，24(6)：1060－1064.

[9] Xiao H, Lei H, Qin S, *et al*. TGF-beta1 expression and atrial myocardium fibrosis increase in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease[J]. Clin Cardiol, 2010, 33(3)：149－156.

[10] Bujak M, Frangogiannis N G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2)：184－195.

[11] He Z, Way K J, Arikawa E, *et al*. Differential regulation of angiotensin Ⅱ-induced expression of connective tissue growth factor by protein kinase C isoforms in the myocardium[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16)：15719－15726.

[12] Ruch R J, Trosko J E, Madhukar B V. Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation[J]. J Cell Biochem, 2001, 83(1)：163－169.

（收稿：2010-10-27 修回：2010-12-17）
（编辑 栾 嘉）