

贝前列素对心肌成纤维细胞胶原交联的影响及机制研究

孟国梁¹, 杨圣菊², 姚文娟¹, 秦巨峰³, 张 伟^{1*}

(¹南通大学药学院药理学系, 江苏 南通 226001; ²南通大学附属医院皮肤性病科, ³影像科, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:**观察贝前列素对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 刺激下心肌成纤维细胞胶原交联的影响并初步探讨其机制。**方法:**体外培养新生大鼠心肌成纤维细胞, 给予贝前列素预处理后, Ang II (100 nmol/L) 再刺激 24 h, 测定细胞培养基中胶原含量和交联程度, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法测定赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX) mRNA 和蛋白表达。**结果:**贝前列素可剂量依赖性地抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌, 其中 10 μ mol/L 作用最强。贝前列素(10 μ mol/L) 预处理 4 h 后再给予 Ang II 刺激, 心肌成纤维细胞胶原分泌明显减少, 交联胶原水平下降, 交联与非交联胶原比例变低; LOX mRNA 和蛋白表达亦明显下降。**结论:**贝前列素抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原交联, 机制可能与下调 LOX 表达有关。

[关键词] 贝前列素; 心肌成纤维细胞; 交联胶原; 赖氨酰氧化酶

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-169-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150206

Effects and mechanisms of beraprost on cross linked collagen in cardiac fibroblasts

Meng Guoliang¹, Yang Shengjü², Yao Wenjuan¹, Qin Jufeng³, Zhang Wei^{1*}

(¹Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001; ²Department of Dermatology and Venereology, ³Department of Radiology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects and mechanisms of beraprost on cross linked collagen in angiotensin II (Ang II)-stimulated cardiac fibroblasts. **Methods:** The cultured neonatal rat cardiac fibroblasts were pre-treated with beraprost followed with Ang II (100 nmol/L) stimulation for 24 h. Total collagen and cross linked collagen were examined in culture medium. Lysyl oxidase (LOX) expression was determined with real time PCR and western blot. **Results:** Beraprost dose-dependently inhibited collagen secretion with Ang II stimulation, among which 10 μ mol/L presented with the most robust suppression. Beraprost (10 μ mol/L) pre-treatment for 4 h followed with Ang II stimulation significantly reduced collagen secretion, as well as the cross linked degree and ratio of cross linked collagen to non-cross linked collagen, accompanying with decreasing mRNA and protein expression of LOX. **Conclusion:** Beraprost inhibited cross linked collagen in Ang II-stimulated cardiac fibroblasts, which may be associated with suppression of LOX expression.

[Key words] beraprost; cardiac fibroblast; cross linked collagen; lysyl oxidase

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 169-172, 187]

心肌纤维化指心肌组织中胶原纤维过量积聚、胶原浓度显著升高及胶原性状发生改变, 是多种心脏疾病发展到一定阶段的共同病理改变, 已成为心血管疾病的独立危险因素^[1]。胶原交联是指胶原分子内部和胶原分子之间通过共价键结合而形成的

联结; 在衰老、糖尿病、高血压等因素引发的心肌纤维化过程中, 均有不同程度的心肌胶原交联程度的增加。交联后的胶原分子理化性质和生物学性能均发生变化, 变得僵硬、不容易溶解和被蛋白酶降解, 造成含有胶原的基质蓄积, 是心肌纤维化的重要特征^[2-3]。赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)作为催化胶原交联的关键酶在其中发挥着重要作用^[4]。

前列环素(prostacyclin, PGI₂)作为前列腺素家族的重要成员, 具有抑制血小板聚集、舒张血管等

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金(12KJB310012); 南通市自然科学基金(BK2011044, BK2012087)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangw@ntu.edu.cn

多种心血管保护效应^[5-7]。既往研究发现多种前列素类似物均可以抑制心肌成纤维细胞增殖,但其对胶原交联是否有影响尚不明确。本研究利用 PGI₂ 类似物贝前列素(beraprost),观察其对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 刺激下心肌成纤维细胞胶原交联及 LOX 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1~3 d 龄的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(南通大学实验动物中心), DMEM (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国), 胰酶(碧云天生物技术研究所), 胃蛋白酶(BBI 公司, 加拿大), 贝前列素(Cayman Chemical 公司, 美国), Ang II (Sigma-Aldrich 公司, 美国), TRIzol、逆转录试剂盒、SYBR Green Premix (TaKaRa 公司, 日本), PCR 引物(LOX 引物 F: 5'-GCAAGCTTCTGCTGGAGGA-3', R: 5'-TCATAACATCCGGGACTCAA-3', 18S 引物 F: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3', R: 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3', 上海生物工程技术有限公司), GAPDH 抗体(Sigma-Aldrich 公司, 美国), LOX 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗(Santa Cruz 公司, 美国), ECL 显色液(Thermo 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 心肌成纤维细胞的培养及处理

取 1~3 d 新生 SD 大鼠心室, 胰蛋白酶消化法获得细胞悬液, 置于培养箱中。1.5 h 后, 利用细胞差速贴壁原理, 附于皿底的绝大多数为心肌成纤维细胞。待细胞生长至汇合状态后, 常规传代, 本试验采用第 3 代细胞。融合的细胞给予不同浓度的贝前列素(0~40 $\mu\text{mol/L}$) 预处理不同的时间后(0~24 h), 再给予 Ang II (100 nmol/L) 刺激, 继续培养 24 h。发现贝前列素 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 4 h 对胶原交联的作用最强, 后续实验即采用贝前列素 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 4 h 后进一步观察相应指标。

1.2.2 羟脯氨酸含量测定

细胞经上述处理后, 吸取培养基, 根据既往研究中操作程序测定细胞培养基中羟脯氨酸的含量^[8]。

1.2.3 胶原交联程度检测

采用胃蛋白酶限制性降解法测定胶原交联程度, 具体操作为: 细胞经上述处理后, 吸取培养液, 加入预冷的 1 mol/L 醋酸(pH 3.0~3.5, 含胃蛋白酶 10 $\mu\text{g/ml}$) 5 ml, 保鲜膜封口, 4 $^{\circ}\text{C}$ 匀速搅拌消化 1.5 h。消化后立即放入冷冻离心机中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 18 000 r/min 离

心 60 min, 使上清与沉淀分开。上清液中含胃蛋白酶可溶性胶原即非交联胶原(non-cross linked collagen), 沉淀物中含胃蛋白酶不溶性胶原即交联胶原(cross linked collagen), 取上清与沉淀用上述方法测定羟脯氨酸含量, 分别计算交联与非交联胶原的含量, 并以两者比值反映胶原交联程度^[8]。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, RNA 定量后用逆转录试剂盒合成 cDNA, 用实时荧光定量 PCR 法(ABI7500 型 PCR 仪) 检测 LOX 的 mRNA 水平, 18S 作为对照。

1.2.5 Western blot

细胞处理后, 提取总蛋白质, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至聚偏氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, LOX(1:1 000) 及 GAPDH(1:5 000) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 2 h, 加入 ECL 显色液, 在荧光凝胶成像系统中显像。用凝胶图像处理系统 Image J 分析目标蛋白条带灰度, 与管家基因 GAPDH 的密度比值表示蛋白的表达水平。

1.3 统计学方法

应用 Stata 13.0 统计软件对数据进行分析, 结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贝前列素抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌

胶原中羟脯氨酸的含量比较稳定, 占胶原蛋白总量的 13.4%, 测定羟脯氨酸的含量便可计算出胶原分泌水平, 单位以每毫升体积中所含的羟脯氨酸的微克数来表示。新生大鼠心肌成纤维细胞用不同浓度的贝前列素(0~40 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 4 h, 再给予 Ang II (100 nmol/L) 继续培养 24 h 发现, Ang II 能明显增加心肌成纤维细胞培养基中胶原分泌($P < 0.01$), 贝前列素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 4 h 能明显抑制心肌成纤维细胞胶原分泌含量, 其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用最强($P < 0.01$)。若将细胞先给予贝前列素(10 $\mu\text{mol/L}$) 预处理不同时间(0~24 h) 后再给予 Ang II 刺激, 发现贝前列素预处理 4 h 或者 12 h 对 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌均有抑制作用, 其中预处理 4 h 效果最为明显($P < 0.01$)。单独给予贝前列素对心肌成纤维细胞胶原分泌没

有明显影响(图 1)。

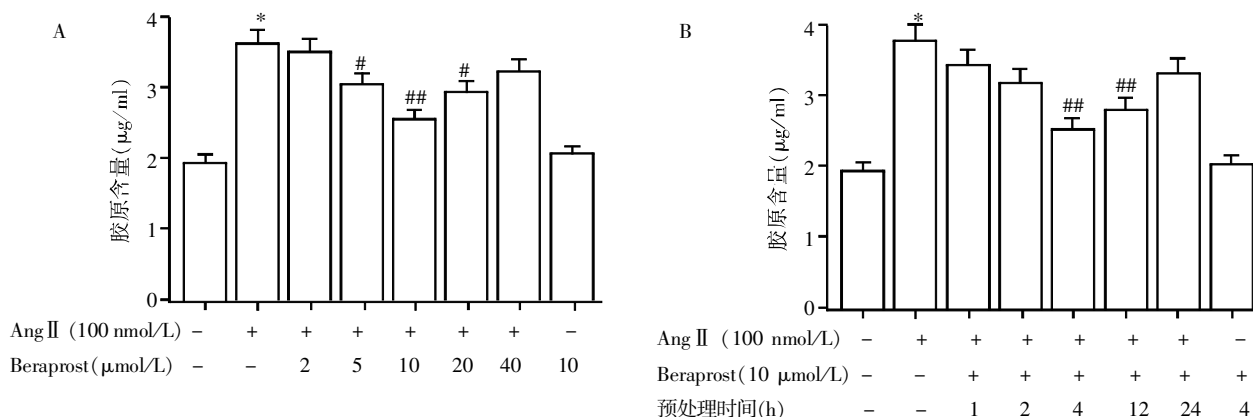
2.2 贝前列素抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原交联

Ang II 刺激下心肌成纤维细胞总胶原和交联胶原均明显增加($P < 0.01$),贝前列素($10 \mu\text{mol/L}$)预处理 4 h 可以明显抑制 Ang II 刺激造成交联程度的增加,主要表现为总胶原分泌减少,交联胶原

水平明显下降($P < 0.01$),而非交联胶原明显变化($P > 0.05$),两者比例明显减少($P < 0.01$,图 2)。

2.3 贝前列素抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞 LOX 表达

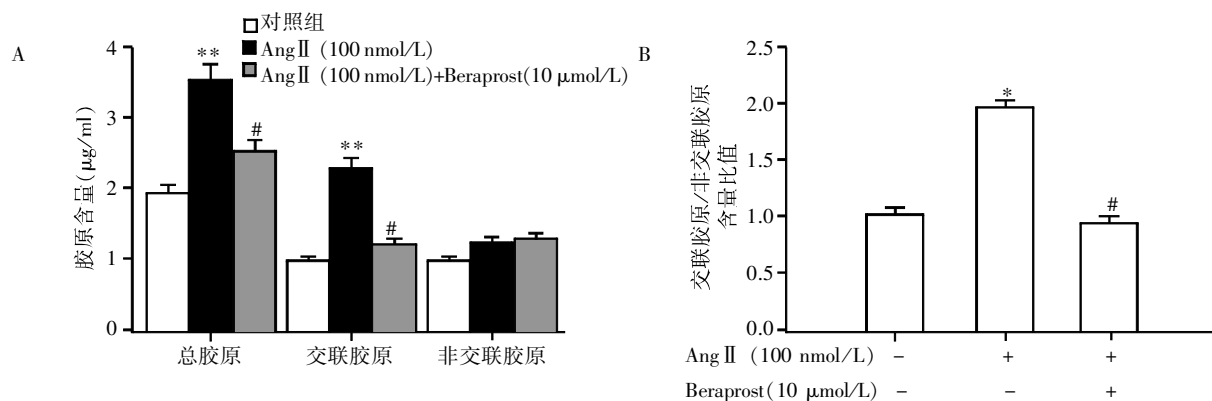
Ang II 可明显增加心肌成纤维细胞 LOX mRNA 与蛋白表达($P < 0.01$),贝前列素($10 \mu\text{mol/L}$)预处理 4 h 后,LOX mRNA 与蛋白表达均明显下降($P < 0.05$,图 3)。



与无药物刺激组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 刺激组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n = 4$)。

图 1 贝前列素对 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌的影响

Figure 1 Effects of beraprost on collagen secretion in Ang II-stimulated cardiac fibroblasts



与无药物刺激组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ang II 刺激组比较, # $P < 0.01$ ($n = 4$)。

图 2 贝前列素对 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原交联的影响

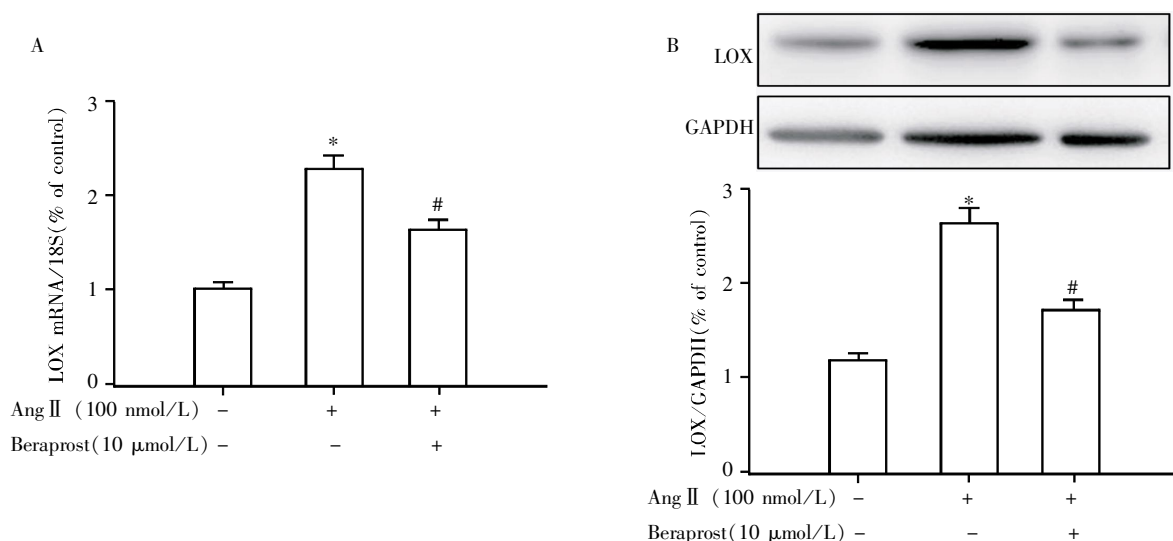
Figure 2 Effects of beraprost on cross-linked collagen in Ang II-stimulated cardiac fibroblasts

3 讨论

研究发现多种前列环素类似物对成纤维细胞增殖具有一定的抑制作用。贝前列素能降低正常大鼠成纤维细胞静息状态下的增长速率及 DNA 合成,抑制胶原表达,但此效应在自发性高血压大鼠成纤维细胞中并不明显^[9];盐敏感高血压大鼠长期给予贝前列素后,能够改善心脏舒张功能,避免心室纤维化的进展^[10]。伊洛前列素可以抑制转化生长因子- β 介导下真皮细胞和 NIH3T3 细胞中的胶原沉积^[11],西卡前列素能有效抑制小鼠心肌成纤维细

胞中包括 I 型胶原在内的多种细胞外基质基因的上调^[12]。本研究发现,贝前列素预处理后能明显降低 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌,且呈现明显的剂量及时间依赖性,这对于降低心肌硬度和改善心功能具有十分重要的意义。

胶原蛋白的主体部分为杆状三螺旋结构,能高度耐受胃蛋白酶的消化作用;但分子两端的末端肽则能被胃蛋白酶选择性消化水解^[13]。在最适 pH 2.5~3.0 条件下,胃蛋白酶能对胶原分子进行有限降解,其结果是胶原主体分子保持完整,末端肽被切割下来。由于胶原纤维分子间的共价交联键是通过末端肽的赖氨



A: 实时荧光定量 PCR(n=3); B: Western blot 检测 LOX 蛋白水平(n=5)。与无药物刺激组比较, *P<0.01; 与 Ang II 刺激组比较, #P<0.05。

图3 贝前列素对 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞 LOX 表达的影响

Figure 3 Effects of beraprost on LOX expression in Ang II-stimulated cardiac fibroblasts

酸或羟赖氨酸的相互作用形成的,故末端肽被切割下来后,交联在一起的胶原大分子结构即被破坏,胶原分子便从胶原纤维中解离出来^[14]。本研究提示,在 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞分泌胶原在胃蛋白酶中的溶解性明显降低,即交联胶原比例增加;贝前列素预处理后能显著降低胶原的交联程度,而对非交联胶原没有明显影响,这对于维持交联纤维的稳定、保持心肌间质结构的完整、降低心肌僵硬具有重要的意义。

LOX 是由细胞分泌的、作用于细胞外基质胶原和弹性蛋白的赖氨酸残基从而产生分子交联的一种胺氧化酶,基因家族包括 LOX、类赖氨酰氧化酶 1 (lysyl oxidase-like 1, LOXL1)、LOXL2、LOXL3 和 LOXL4 等 5 个成员。不同成员功能相类似,广泛分布于多种组织细胞中,具有维持细胞外基质稳定性、调节细胞表型,抑制肿瘤的发生发展与转移,促进外周血单核细胞、血管平滑肌细胞趋化运动等功能^[4]。LOX 主要介导细胞外基质蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白赖氨酸源性交联的产生,在胶原和弹性蛋白由可溶性单体转变为不溶性纤维的过程中发挥重要作用。胶原前体在形成稳定的三螺旋结构并被分泌到细胞外环境中后,首先由氨肽酶和羧肽酶将胶原前体氨基端和羧基端的非螺旋部分裂解,胶原前体聚集为纤维原,然后由 LOX 将纤维原胶原蛋白肽链上的一些赖氨酰和羟赖氨酰残基上的氨基氧化,脱去氨基形成醛基,并自动地与邻近的醛基和氨基形成链内或链间共价交联,从而使心肌胶原纤维硬度增加,心功能下降^[15]。研究发现贝前列素

可以明显抑制 LOX 的活性,进而能阻止成熟的胶原纤维的生成,抑制胶原交联,改善心肌纤维化^[16]。

综上所述,贝前列素可抑制 Ang II 刺激下心肌成纤维细胞胶原分泌和交联程度的增加,机制可能与下调赖氨酰氧化酶表达有关,这为心肌纤维化的防治提供了新的策略与思路。

[参考文献]

- [1] Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(4): 549-574
- [2] de Jong S, van Veen TA, de Bakker JM, et al. Biomarkers of myocardial fibrosis[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(5): 522-535
- [3] Susic D, Varagic J, Ahn J, et al. Collagen cross-link breakers: a beginning of a new era in the treatment of cardiovascular changes associated with aging, diabetes, and hypertension[J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2004, 4(1): 97-101
- [4] Marturano JE, Xylas JF, Sridharan GV, et al. Lysyl oxidase-mediated collagen crosslinks may be assessed as markers of functional properties of tendon tissue formation[J]. Acta Biomater, 2014, 10(3): 1370-1379
- [5] Barbieri SS, Amadio P, Gianellini S, et al. Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin regulates arterial thrombus formation by suppressing tissue factor in a sirtuin-1-dependent-manner[J]. Circulation, 2012, 126(11): 1373-1384
- [6] Harding P, Murray DB. The contribution of prostaglandins