

氧化苦参碱对转化生长因子 $\beta 1$ 诱导大鼠心肌成纤维细胞增殖与分化的抑制作用

乔璐, 李博, 李庆

郑州市第一人民医院, 河南 郑州 450008

[摘要] 目的: 观察氧化苦参碱(Oxymatrine, OM) 干预对转化生长因子 $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 刺激的 SD 大鼠心肌成纤维细胞 (Cardialfibroblasts, CFs) 增殖、分化的抑制作用, 并探讨其作用机制。方法: 体外培养新生大鼠 CFs, 分离纯化后分为对照组 (使用无血清 DMEM 培养)、TGF- $\beta 1$ 组 (单纯 TGF- $\beta 1$ 诱导) 和观察组 (使用 TGF- $\beta 1$ 加 OM 干预) 3 组。MTT 法检测 CFs 增殖情况, ELISA 法检测 I 型胶原 (Collagen-I, CoL-I) 和 III 型胶原 (Collagen-III, CoL-III) 含量, RT-PCR 法检测 Smad2 mRNA 表达, Western blot 法检测增殖细胞核抗原 (PCNA)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、Smad2 及 Smad3 蛋白表达情况。结果: 与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组 CFs 增殖水平、CoL-I、CoL-III、PCNA、 α -SMA、Smad2 mRNA 及 Smad2/3 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与 TGF- $\beta 1$ 组比较, 观察组上述指标均降低 ($P < 0.05$), 除 CoL-I 外, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: OM 能够明显抑制 TGF- $\beta 1$ 诱导 CFs 增殖、分化水平, 降低胶原蛋白的合成水平, 作用机制与其能够干预 Smad2 及 Smad3 蛋白表达有关, 具有临床应用价值。

[关键词] 氧化苦参碱 (OM); 心肌成纤维细胞 (CFs); 抑制作用; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 11-0006-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.11.002

Oxymatrine Has Inhibitory Effect on Proliferation and Differentiation of Cardial Fibroblasts in Rats Induced by Transforming Growth Factor- $\beta 1$

QIAO Lu, LI Bo, LI Qing

Abstract: Objective: To observe the inhibitory effect of oxymatrine(OM) on the proliferation and differentiation of cardial fibroblasts (CFs) in SD rats induced by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and explore its mechanism. **Methods:** Separated and purified CFs of neonatal rats in vitro, and divided them into the control group(cultured by serum-free DMEM), the TGF- $\beta 1$ group(simply induced by TGF- $\beta 1$) and the observation group(intervened by TGF- $\beta 1$ and OM). Detected the proliferation of CFs by MTT method, the content of collagen-I(CoL-I) and collagen-III (CoL-III) by ELISA method and the expression of mRNA of Smad2 by RT-PCR method. Detected the expressions of proliferating cell nuclear antigen(PCNA), α -smooth muscle actin (α -SMA) and protein expressions of Smad2 and Smad3 by Western blot method. **Results:** Compared with those in the control group, the proliferation of CFs and the expressions of CoL-I, CoL-III, PCNA, α -SMA and protein expressions of Smad2 Smad2/3 in the TGF- $\beta 1$ group were obviously increased($P < 0.05$). Compared with those in the TGF- $\beta 1$ group, the above indexes(except CoL-I)in the observation group were decreased, differences were significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** OM can obviously inhibit the levels of proliferation and differentiation of CFs induced by TGF- $\beta 1$ and decrease the translation level of collagen. Its mechanism is related to the intervention of the protein expressions of Smad2 and Smad3, which maintains high value in clinical practice.

Keywords: Oxymatrine (OM); Cardial fibroblasts (CFs); Inhibitory effect; Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); Animal experiment; Rats

心肌纤维化是由胶原纤维大量积聚、心肌胶原浓度比例失衡引起的^[1-2]。心肌成纤维细胞(Cardialfibroblasts, CFs)是心肌

[收稿日期] 2018-05-05

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目 (162300410252)

[作者简介] 乔璐 (1968-), 女, 副主任中药师, 研究方向: 中药临床药理学。

组织的重要组成部分,病理增殖分化过度时会大量分泌胶原蛋白,是形成心肌纤维化的病理基础^[3-4]。转化生长因子- $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)是心肌纤维化形成的重要调控因子,在作用于 CFs 后,主要通过 TGF- β 信号通路中的 Smads 蛋白,转导和调节相关基因表达,促进胶原纤维的合成及纤维化的发展^[5-6]。氧化苦参碱(Oxymatrine, OM)为苦参的有效成分,具有抗纤维化、抗炎等作用。既往研究已证实 OM 对心肌细胞受损有保护作用,且能够有效治疗心肌纤维化^[7]。因此,本研究进一步通过 OM 干预接受 TGF- $\beta 1$ 刺激的 CFs 增殖模型,观察 OM 对该模型的抑制作用及干预机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验动物选取出生 1~3 d 内的新生 SD 大鼠 480 只,雌雄不限,购自长沙天勤生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2014-0011。

1.2 药品与试剂 98% OM(陕西帕尼尔生物科技有限公司); TGF- $\beta 1$ 、荧光定量 PCR 试剂盒、Vimentin 兔抗人波形蛋白及 Fibronectin 兔抗体(美国 Pepro Tech 公司);兔抗 PCNA、 α -SMA 抗体和 DAB Kit(上海瑞齐生物技术有限公司);大鼠 I 型胶原纤维(CoL-I)、III 型胶原纤维(CoL-III)ELISA 试剂盒(上海晶天生物科技有限公司);RNA 提取试剂盒(北京中杉金桥公司),Smad2、Smad3 XP Rabbit mAb(赛信通(上海)生物试剂有限公司)。

1.3 CFs 的培养及鉴定 用 75% 的乙醇对新生 SD 大鼠皮肤进行消毒,固定大鼠四肢,剪取心脏前 1/3 部分组织,洗净后转入青霉素小瓶中,剪为大小不超过 1 mm³ 的碎块,平铺在培养瓶底,加入含有 10% 血清的 DME 培养基,倒置培养瓶于 95% 饱和湿度的培养箱中培养,4 h 后翻转培养瓶,保证培养基浸过组织块后继续置于培养箱中孵育,每隔 1 天更换培养液^[8]。待细胞生长面积没过瓶底后进行传代,将传代后 3 代的 CFs 作为实验对象。通过免疫细胞化学法染色证实细胞中存在波形蛋白及纤维连接蛋白表达者,为 CFs。培养的 CFs 分为对照组、TGF- $\beta 1$ 组及观察组。

1.4 MTT 法检测 CFs 增殖情况 细胞接种、步骤同上。对照组(无血清 DME)及 TGF- $\beta 1$ 组采用浓度为 20 ng/mL TGF- $\beta 1$ 孵育 24 h;先对观察组采用 3.78 $\times 10^{-4}$ mol/L 的 OM 预处理后,再加入浓度为 20 ng/mL TGF- $\beta 1$ 孵育 24 h,通过免疫检测仪上 490 nm 波长处测定光吸收值(A490 值),判断各组 CFs 增殖情况。

1.5 ELISA 法检测 CoL-I、CoL-III 含量 将所有处理过的 CFs 消化离心,经磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)制成细胞悬液,待细胞浓度达到 1 $\times 10^6$ 个/mL 后,采用复冻融破坏细胞,诱导细胞分泌蛋白,1 500 r/min 离心 30 min 后,用 ELISA 法检测 CoL-I、CoL-III 含量,含量越高则表明细胞胶原表达越多,以上操作严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.6 RT-PCR 检测 Smad2 mRNA 表达水平 用 RNA 提取试剂

盒提取处理好的 CFs 的总 RNA,逆转录合成 cDNA;严格按照 YBR Premix Ex Taq 试剂盒操作,加入上、下游引物(Smad2 上游序列: ACCACTCTCTC-CCCTGTCAAT,下游序列: CAAACCTAAGCAGAAG-CTCTCC; β -actin 上游序列: CACCC GCGAG-TACAACCTTC,下游序列: CCCATACCCACC ATCA-CACC。)进行 PCR 反应。根据 2^{- $\Delta\Delta Ct$} 进行 Smad2 mRNA 的相对表达量分析。

1.7 Western blot 检测 α -SMA、PCNA、Smad2 及 Smad3 表达水平 TGF- $\beta 1$ 刺激 1 h、24 h 后,离心收集细胞,检测 α -SMA、PCNA、Smad2 及 Smad3 表达水平。PBS 反复洗涤,根据蛋白提取试剂盒提取总蛋白,通过 BCA 蛋白定量试剂盒对处理好的 CFs 行蛋白定量,上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,转膜,1% BSA 封闭,加一抗稀释液(1:1 000),洗膜后加二抗稀释液(1:5 000),对所得样本行免疫蛋白印记分析,通过 ECL 化学发光试剂盒显像,并分析各蛋白条带灰度值,以 β -actin 为内参标准,分别计算 α -SMA、PCNA、Smad2 及 Smad3 灰度值与 β -actin 灰度值的比值。

1.8 统计学方法 采用 SPSS22.0 软件进行分析,计数资料以 n , % 表示,行 χ^2 检验,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行独立 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用重复测量数据的方差分析 3 组 CFs 增殖水平、胶原蛋白及 Smads 间的差异性及各时间点测量值的时间差异性。

2 结果

2.1 原代 CFs 形态特征 见图 1。显微镜观察组织块培养的 CFs 生长情况,3~5 天后 CFs 游出组织块,呈形态饱满的菱形、多角形胞体,均为贴壁生长,胞质透明且折光性强。6~10 天后细胞排列紧密,且呈相互融合状态。传代培养保留了原代的特点,采用反复差速贴壁方法培养,纯度更高。免疫细胞化学法染色后,显微镜下可见波形蛋白细胞胞质被染成棕黄色,纤维连接蛋白染色呈强阳性,均符合 CFs 染色特征,纯度超过 99%。

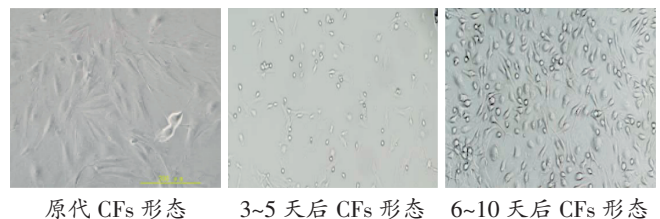


图 1 各时期 CFs 形态 ($\times 200$)

2.2 各组大鼠 CFs 增殖水平及 CoL-I、CoL-III 含量结果比较 见表 1。与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组 CFs 的 CoL-I、CoL-III 含量均增加 ($P < 0.05$); 与 TGF- $\beta 1$ 组比较, 观察组 CFs 的 A490、CoL-III 均明显降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠 CFs Smad2 mRNA、PCNA、 α -SMA、Smad2 和 Smad3 表达结果比较 见表 2、图 2。与对照组比较, TGF- $\beta 1$

组 Smad2 mRNA、PCNA、 α -SMA、Smad2 和 Smad3 明显升高 ($P < 0.05$); 与 TGF- β 1 组比较, 观察组的 Smad2 mRNA、PCNA、 α -SMA、Smad2 和 Smad3 均明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 CFs 增殖水平及 CoL-I、CoL-III 含量结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	A490	CoL-I (ng/mL)	CoL-III (ng/mL)
对照组	0.41 $\pm$ 0.03	2.57 $\pm$ 0.05	2.95 $\pm$ 0.03
TGF- β 1 组	0.53 $\pm$ 0.03 ^①	3.86 $\pm$ 0.02 ^①	3.81 $\pm$ 0.02 ^①
观察组	0.39 $\pm$ 0.04 ^②	3.62 $\pm$ 0.05	3.12 $\pm$ 0.04 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, ② $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 CFs Smad2 mRNA、PCNA、 α -SMA、Smad2 和 Smad3 表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad2 mRNA	PCNA(灰度值)	α -SMA(灰度值)	Smad2(灰度值)	Smad3(灰度值)
对照组	3.26 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.03
TGF- β 1 组	5.57 $\pm$ 0.03 ^①	0.76 $\pm$ 0.04 ^①	0.84 $\pm$ 0.03 ^①	1.02 $\pm$ 0.03 ^①	0.97 $\pm$ 0.04 ^①
观察组	3.52 $\pm$ 0.04 ^②	0.43 $\pm$ 0.03 ^②	0.53 $\pm$ 0.02 ^②	0.58 $\pm$ 0.04 ^②	0.76 $\pm$ 0.05 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, ② $P < 0.05$

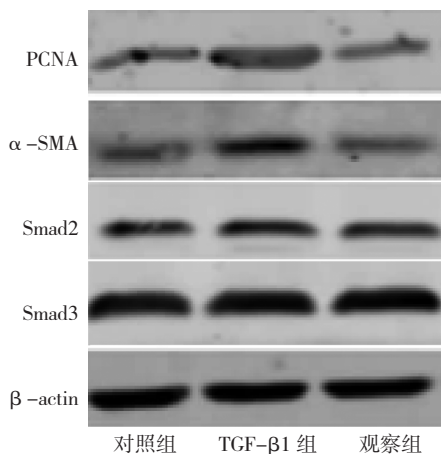


图 2 各组大鼠 CFs PCNA、 α -SMA、Smad2 和 Smad3 蛋白印迹结果比较

3 讨论

心肌纤维化的形成原因与胶原比例失衡有关, 其病理基础则是由 CFs 的增殖分化过度引起的^[9-10]。TGF- β 1 是目前治疗器官纤维化的重要靶标, 是调控细胞增殖分化的重要因子, 促进细胞外基质沉淀积聚, 诱导 CFs 的增殖分化, 刺激胶原蛋白的高表达, 进而导致细胞外基质降解与合成失衡, 最终引发心肌纤维化^[11]。相关研究表明, Smad 蛋白为 TGF- β 信号通路中的主要分子, Smad 信号能够介导胶原蛋白的合成, 且 TGF- β 1 发挥其生物学作用也是通过 Smads 信号通路完成的^[12-13]。

本研究结果显示, CFs 经过 TGF- β 1 的诱导处理后, TGF- β 1 组的 CFs 的 A490 值明显较对照组高, 但观察组 OM

预处理后的 A490 值则明显低于 TGF- β 1 组。提示 TGF- β 1 能够诱导 CFs 增殖, 但 OM 能够有效抑制 CFs 的增殖。研究表明, OM 有较强的抗皮肤、肝纤维化的作用, 能够抑制肝星状细胞中 TGF- β 1 的表达^[14]。原因可能是 OM 为中药苦参的有效成分, 是四环喹啉类结构生物碱, 具有抗心律失常、抑制胶原活动度及抗纤维化等作用。

PCNA 为 DNA 合成和复制的辅助因子, 是反应细胞增殖情况的标志分子之一, PCNA 的增加能表明细胞增殖活跃, 可参与肺纤维化的进展^[15]。 α -SMA 是肌细胞的标志物, 可以作为成纤维细胞转化为肌成纤维细胞的标志物, α -SMA 的高表达状态提示胶原蛋白的合成增加^[16]。肌细胞外间质主要成分是 CoL-I、CoL-III, 当心肌纤维化发展时, 胶原蛋白表达上调, 细胞外基质沉积, 导致心脏功能受损。研究证实, TGF- β 1 能够明显诱导 CFs 增殖, 并促进胶原蛋白的合成^[17]。本研究结果表明, TGF- β 1 组 CFs 的 PCNA、 α -SMA、CoL-I、CoL-III 均明显高于对照组。证实 TGF- β 1 能够诱导 CFs 大量增殖, 且在 TGF- β 1 刺激下, 大量成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 而经过转变的成纤维细胞则会合成和分泌大量胶原, 引起细胞外基质沉积, 促进心肌纤维化的进展。而观察组的 PCNA、 α -SMA、CoL-I、CoL-III 均明显低于 TGF- β 1 组, 提示 OM 能够改善胶原及细胞外基质大量堆积的情况, 阻止纤维化进展。

赵娜等^[18]研究发现苦参素能够抑制 TGF- β /Smads 信号通路, 有效改善糖尿病心病大鼠的心肌纤维化发展。国外研究发现, 心肌纤维化与 TGF- β 1 诱导的 Smads 的磷酸化以及磷酸化的 Smads 核移位有关^[19]。本研究结果也显示, TGF- β 1 组 CFs Smad2 基因、Smad2、Smad3 蛋白表达明显高于对照组, 而观察组上述指标的表达则明显低于 TGF- β 1 组。提示心肌纤维化的发展与 Smad2、Smad3 密切相关。且可以从中发现 OM 能够有效抑制 TGF- β 1 的表达, 从而降低 Smad2、Smad3 蛋白表达水平, 起到阻断 TGF- β /Smads 信号通路, 减少细胞外基质的堆积, 降低胶原蛋白的大量分泌, 抗纤维化的作用。

综上, OM 能够明显抑制 TGF- β 1 诱导的 CFs 增殖与分化, 主要作用机制可能与降低心肌纤维化发生发展的 Smad2、Smad3 蛋白表达, 进而阻断 TGF- β /Smads 信号系统有关。具体作用机制还需进一步的临床研究。

【参考文献】

- [1] 郝嘉, 游凯. 心肌成纤维细胞的特性和调节[J]. 心血管病学进展, 2011, 32(3): 405-408.
- [2] Zhang CL, Li YH, Zhou HX, et al. Protective effects of Ginseng mixture on myocardial fibrosis in rats[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2014, 7(9): 730-734.
- [3] 袁书国, 何凤屏, 徐新. 微小 RNA 与心血管疾病心肌纤维化关系的研究进展[J]. 广东医学, 2013, 34(13): 2099-

- 2101.
- [4] 马金, 丁春华. 心脏成纤维细胞与心肌纤维化[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(3): 269-272.
- [5] 马瑞, 魏红亮, 陈林宝, 等. 氧化苦参碱对大鼠缺血再灌注心肌损伤的保护机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(31): 6028-6030.
- [6] Seeland U, Haeseler C, Hinrichs R, et al. Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta (1) (TGF-beta (1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2002, 32(5): 295.
- [7] 赵阳. 氧化苦参碱对 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制[J]. 山东医药, 2015, 55(37): 29-31.
- [8] 肖健, 王志农, 朱镇, 等. TGF- β 1 与缺血再灌注心肌细胞凋亡的关系[J]. 山东医药, 2008, 48(47): 29-30.
- [9] Thum T. Noncoding RNAs and myocardial fibrosis[J]. Nature Reviews Cardiology, 2014, 11(11): 655-663.
- [10] Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, et al. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis [J]. European Heart Journal, 2017, 38(18): 1413.
- [11] 张国华. TGF- β 1/Smads 信号通路在高血压心肌纤维化中的调控机制研究进展[J]. 山东医药, 2014, 54(7): 85-87.
- [12] 马惠宁, 徐士欣, 吕仕超, 等. 芪参益气滴丸干预 TGF- β 1 刺激心脏成纤维细胞增殖的效应机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1948-1951.
- [13] 柴大军, 徐军霞, 许昌声, 等. 视黄醇 X 受体激动剂通过调控 Smad2 通路抑制 TGF- β 1 诱导的心肌成纤维细胞胶原合成[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(12): 2228-2232.
- [14] 陈源文, 李定国, 吴建新, 等. 氧化苦参碱对转化生长因子- β 1 促肝星状细胞活化及跨膜信号转导影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2005, 14(1): 31-33.
- [15] 王少霞, 李杨, 杨蕾蕾, 等. 大鼠放射性肺损伤进程中 PAI-1、P21WAF1/CIP1、 α -SMA 和 PCNA 表达的变化及意义[J]. 中国体视学与图像分析, 2011, 16(4): 400-407.
- [16] 于秀文, 曾林祥. Notch 信号通路对肌成纤维细胞转化中 α -SMA 表达变化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(13): 20-24.
- [17] 曾翼, 赵诚, 王霏, 等. 二苯乙烯苷对 TGF- β 1 诱导新生大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其机制[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(3): 362-367.
- [18] 赵娜, 潘硕, 张勇, 等. TGF- β /Smads 信号通路参与苦参素抑制糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化及改善心功能作用[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(11): 1056-1060.
- [19] Hough C, Radu M, Doré JJ. Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling[J]. Plos One, 2012, 7(8): e42513.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)