

川芎嗪对 Nogo 基因调控心肌成纤维细胞增殖作用的影响

聂虎¹, 冉迅², 曾智³

1. 四川大学华西医院 急诊科(成都 610041); 2. 贵阳医学院附属医院 心内科(贵阳 550004);
3. 四川大学华西医院 心内科(成都 610041)

【摘要】目的 探讨 Nogo 基因对心脏成纤维细胞增殖的调控作用,以及川芎嗪干预心肌成纤维细胞增殖的机理。**方法** 培养新生大鼠心肌成纤维细胞,以实时荧光定量 PCR 和 Western blot 方法检测血管紧张素Ⅱ和不同浓度川芎嗪对培养心肌成纤维细胞 Nogo 表达和胶原合成的影响。**结果** 在川芎嗪干预后,由血管紧张素Ⅱ诱导的 Nogo-A mRNA、胶原Ⅰ mRNA 表达升高出现了下降($P<0.05$),而 Nogo-B mRNA 的表达下降在川芎嗪干预后有所恢复,与对照组相比,Nogo-A 蛋白和 Nogo-B 蛋白亦出现类似变化。**结论** 血管紧张素Ⅱ诱导大鼠心肌成纤维细胞胶原蛋白合成增加,而川芎嗪对其具有抑制作用,川芎嗪的抗纤维化作用可能与 Nogo 基因的调控作用有关。

【关键词】 川芎嗪 心肌成纤维细胞 血管紧张素Ⅱ Nogo

Effect of Tetramethylpyrazine on Nogo Gene Regulation of the Proliferation in Cardiac Fibroblast NIE Hu¹, RAN Xun², ZENG Zhi³. 1. Department of Emergency, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 3. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of different doses of Tetramethylpyrazine (TMP) on collagen synthesis and Nogo expression in cardiac fibroblasts and the potential role of Nogo in myocardial fibrosis. **Methods** The cultured neonatal rat cardiac fibroblasts were induced by angiotensin Ⅱ and TMP at the same time. The mRNA expression of Nogo-A, Nogo-B and collagen Ⅰ were detected with real-time fluorescence quantitative PCR. And Nogo protein was semi-quantitatively detected by using Western blot method. **Results** Under the intervention of TMP, the increased mRNA expression of Nogo-A and collagen Ⅰ induced by angiotensin Ⅱ were decreased, while the decreased mRNA expression of Nogo-B was increased. Compared with the control group, the expression of Nogo-A protein and Nogo-B protein showed similar changes as evaluated with Western blot. **Conclusion** TMP could inhibit collagen synthesis in cardiac fibroblast induced by angiotensin Ⅱ. The accompanying differential expression of Nogo-A and Nogo-B indicated that the anti-fibrosis effect of TMP might be related to the regulation effects of Nogo gene.

【Key words】 Tetramethylpyrazine Cardiac fibroblast Angiotensin Ⅱ Nogo

心肌重塑是临床上各种心脏疾病病理生理学发生发展过程中非常重要的环节之一,是机体在心脏负荷过重的情况下所采取的一种代偿方式,以达到维持正常心输出量和重要器官血流灌注的目的^[1-3]。作为心肌重塑病理生理发展过程中的核心,即心肌纤维化的调控将直接影响到心脏疾病患者的心脏结构和功能,并与最终预后有着密切的关系。

近期研究发现,Nogo 在心力衰竭的病理生理过程中发生了极有意义的变化^[4]。作为与心脏血管疾病有关的重要激素——血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)对心肌成纤维细胞的影响已在许多研究中得到证实,但其机理尚不十分清楚^[5]。而许多研究发现,川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)能通过抑制 AngⅡ诱导的大鼠心肌成纤维细胞的增殖,减少胶原Ⅰ(collagen Ⅰ)的分泌与合成,从而发挥其抗心肌纤维化的作用^[6]。本研究拟通过观察 AngⅡ及不同治疗剂量

的川芎嗪对培养心肌成纤维细胞胶原蛋白合成及 Nogo 表达的影响,探讨 Nogo 基因在调控心肌纤维化的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

川芎嗪标准品购自曼思特生物科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清(美国 GIBCO 公司);胰蛋白酶、胶原酶(上海华美生物技术公司);抗 β -actin 抗体、波形蛋白抗体、纤维连接蛋白抗体(武汉博士德生物工程有限公司);Nogo 抗体(Abcam 公司);Ang Ⅱ(美国 Sigma 公司);Taq DNA 聚合酶、dNTP(立陶宛 MBI 公司);引物探针由上海生物工程有限公司合成,引物序列 Nogo-B(131 bp)R-Nogo-B F: 5'-CTCAGTGGTTGTTGACCTCCT-3', R-Nogo-B R: 5'-CCAAGGCAATGTAGGCCGTT-3', Nogo-B-TM: 5'-CTGGCACCAAACACCACTCC-3'; Nogo

A (217 bp) R-Nogo-A F: 5'-CTCAGTGGATGA GACCCTTT-3', R-Nogo-A R: 5'-GTTACCAAGG TATCCATGTTCT-3', Nogo-A-TM: 5'-CTGCTG CVCTCTCTTCCTTCTC-3'; collagen I (126 bp) R-collagen I F: 5'-GTGCTAAGGGTGAAGCTG GT-3', R-collagen I R: 5'-CATCAGCACCAGGG TTTCCAG-3', R-collagen I TM: 5'-CACCACGC ACACCCTGGGGAC-3'(反向探针)。

1.2 新生大鼠心肌成纤维细胞的培养及鉴定

Sprague-Dawley 雄性新生大鼠(1~2 d)由四川大学实验动物中心提供。处死大鼠后取其心脏,采用胰酶消化法和差速贴壁法培养心肌成纤维细胞,待细胞生长至汇合状态时,以 1:2 传代。实验采用第 2~4 代细胞。对培养的细胞进行形态学观察,采用常规免疫组化 SP 法染色,检测纤维连接蛋白、波形蛋白和血管内皮细胞 V III 因子的表达进行成纤维细胞鉴定。

1.3 Ang II 和川芎嗪对心肌成纤维细胞 Nogo 表达及胶原生成的影响

1.3.1 细胞分组 将培养的成纤维细胞(第 2~4 代)分为 5 组。空白对照组:加入含 10% 胎牛血清的 DMEM; Ang II 组:0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II + 含 10% 胎牛血清的 DMEM; 低、中、高剂量川芎嗪组:0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II + 含 10% 胎牛血清的 DMEM + 川芎嗪(20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 mg/mL 、2 mg/mL)。

1.3.2 各组细胞分组处理 将培养的成纤维细胞在无血清培养基中继续培养 24 h 后,按其分组分别加入 Ang II 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 或不同浓度的川芎嗪继续培养 72 h。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 Nogo-A、Nogo-B、胶原 I 的 mRNA 表达 取 $10 \times \text{buffer}(\text{Mg}^{2+} \text{ free})$ 3 μL 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL 、dNTP (25 mmol/L) 0.36 μL 、上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、Taq 酶(5 $\text{U}/\mu\text{L}$) 0.3 μL 、ddH₂O 15.34 μL 、cDNA 模板 5 μL 配成总量 30 μL 反应体系进行 PCR 扩增。

胶原 I 检测反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,然后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,分别在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,循环 37 次后再延伸 7 min。

Nogo 检测反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,然后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,分别在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,循环 45 次。

目的基因的表达采用相对定量法,即以 $\beta\text{-actin}$

作为内参,计算 ΔCt ,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测 Nogo 蛋白 提取细胞总蛋白,采用 BCA 法定量蛋白浓度。所得蛋白于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电转至 PVDF 膜后在杂交盒中并加入足量 3% BSA 封闭,以 PBS-T 稀释液按 1:1000 的比例稀释检测蛋白的一抗[Nogo (A+B)]后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内振荡孵育过夜。去掉一抗孵育液后以足量洗液振荡洗涤 10 min,共 3 次。用封闭液按 1:20 000 比例稀释 HRP 标记的二抗(体积为 5 mL)后在室温振荡孵育 1 h,倾倒二抗孵育液后以足量洗液振荡洗涤 3 次,每次 10 min。以电化学发光、显影和定影方法对胶片进行拍照和扫描,以 GAPDH 蛋白为内参照,凝胶图像处理系统分析目标条带的相对灰度值。

1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个均数之间比较用单因素方差分析, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 培养心肌成纤维细胞的鉴定

镜下细胞形态学观察可见原代培养的心肌成纤维细胞呈不规则三角形,胞质淡而透明,折光弱,细胞核较大,呈椭圆形,通常含 2~3 个核,无自发性搏动。免疫细胞化学染色纤维连接蛋白染色呈阳性,波形蛋白(vimentin)染色呈阳性,血管内皮细胞 VIII 因子相关抗原染色阴性(图 1),符合成纤维细胞的染色特征,鉴定为所需的心肌成纤维细胞。

2.2 川芎嗪对 Ang II 诱导的 Nogo 表达和胶原 I 合成变化的影响

实时荧光定量 PCR 检测显示 Ang II 刺激后 Nogo-A mRNA、胶原 I mRNA 表达升高,Nogo-B mRNA 表达下降,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

在不同浓度川芎嗪干预下,Ang II 诱导的 Nogo 和胶原 I 表达发生变化。与对照组相比,Nogo-A 和胶原 I 表达在 Ang II 诱导增加的基础上出现了不同程度的下降,且随干预药物川芎嗪剂量的增加有逐渐下降的趋势。低浓度川芎嗪(20 $\mu\text{g/mL}$)干预组与 Ang II 组比较,Nogo-A 和胶原 I 表达有所下降且 Nogo-B 表达有增加,但两组间差异无统计学意义。中、高浓度组(0.2 mg/mL 和 2 mg/mL)与 Ang II 组比较,Nogo-A、B 和胶原 I 表达变化差异均有统计学意义($P < 0.05$,附表)。

图 1 培养心肌成纤维细胞波形蛋白(A)、纤维连接蛋白(B)和血管内皮细胞Ⅷ因子的表达。SP ×40

Fig 1 Expression of vimentin (A), fibronectin (B) and factor Ⅷ (C) in cultured cardiac fibroblasts. SP ×40

附表 川芎嗪对诱导的 Nogo mRNA、胶原 I mRNA 和 Nogo 蛋白的影响

Table Effect of Tetramethylpyrazine on Ang Ⅱ induced changes of Nogo mRNA, collagen I mRNA and Nogo protein expression

Group	n	Gene (2 ^{-ΔΔCt})			Protein	
		Nogo-A	Nogo-B	Collagen I	Nogo-A	Nogo-B
Control	20	0.09-0.22	1.41-1.74	0.54-0.62	0.1064±0.0126	0.3028±0.0254
Ang Ⅱ	20	0.50-0.62 *	0.76-1.00 *	0.93-1.07 *	0.2872±0.0211 *	0.1728±0.0178 *
TMP 20 μg/mL	20	0.44-0.57 *	0.93-1.32 *	0.93-1.00 *	0.2655±0.0206 *	0.2082±0.0202 *
0.2 mg/mL	20	0.35-0.54 *	1.15-1.41△	0.76-0.87 *·△·#	0.2062±0.0196 *·△	0.2287±0.0217△
2 mg/mL	20	0.31-0.47 *·△·#	1.15-1.52△·#	0.66-0.76 *·△·#·☆	0.1927±0.0203 *·△·#	0.2468±0.0209△·#

* P<0.05, vs. control group; △ P<0.05, vs. Ang Ⅱ group; # P<0.05, vs. TMP 20 μg/mL group; ☆ P<0.05, vs. TMP 0.2 mg/mL group

川芎嗪干预下,Ang-Ⅱ刺激产生的 Nogo-A 蛋白表达量增加随川芎嗪的干预剂量出现不同程度的下降,而 Nogo-B 蛋白表达量的下降趋势则在川芎嗪干预下出现不同程度增加(图 2,附表)。

发生发展^[5]。尽管 Ang Ⅱ介导的心肌重塑过程还存在许多争论,但可以明确,通过结合 Ang I 受体,Ang Ⅱ介导了包括血管收缩、有丝分裂、心肌肥大与纤维化、炎症及心肌细胞凋亡等多种心血管生理反应^[7]。Ang Ⅱ促进心肌纤维化发生的作用主要体现在其促进心肌细胞增殖、胶原生成和细胞外基质沉积^[8,9]。

Nogo 蛋白是一组参与组织损伤后再生的跨膜蛋白,主要包括 Nogo-A、B、C 三种类型。现有研究发现,Nogo 基因的产物功能具有广泛的多样性,已有较多研究发现其在肿瘤抑制、细胞凋亡、神经系统再生抑制、血管内膜损伤复制等多种病理生理过程中都发挥着极其重要的作用^[10]。那么,作为一个功能广泛的基因,其在心肌纤维化和心肌重塑方面是否有潜在的尚不为人知的作用呢?在动物心衰模型和心衰患者中,国外学者 Bullard 等^[4]观察研究发现,Nogo-A 和 Nogo-B 的表达会随着心力衰竭的进展及治疗后心功能的改善而发生变化。Bullard 等用基因工程敲除 LIM 基因,减少 LIM 蛋白(肌动蛋白相关的细胞骨架蛋白)的表达,造成心力衰竭的动物模型,发现心力衰竭时,Nogo-A 增加,Nogo-B/C 降低;心力衰竭改善后,Nogo-A 下降,Nogo-B/C 增加。在终末期心力衰竭的患者同样如此,在用左心室辅助装置或心脏移植后 Nogo-A 下降,Nogo-B 增

图 2 各组心肌成纤维细胞 Nogo-A 和 Nogo-B 蛋白的 Western blot 检测

Fig 2 Semi-quantitative detection of Nogo-A and Nogo-B protein by using Western blot

1: Control group; 2: Ang Ⅱ group; 3: TMP 20 μg/mL group; 4: TMP 0.2 mg/mL group; 5: TMP 2 mg/mL group

3 讨论

研究发现,在心肌重塑的发生发展过程中,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)起着关键性作用,尤其是 Ang Ⅱ及其受体起了核心的作用^[4]。Ang Ⅱ作为肾素-血管紧张素系统的重要活性因子,通过自分泌和旁分泌发挥作用,促进心肌纤维化的

加,但 Nogo-C 几乎没有变化。同时发现心力衰竭的指标〔心房利钠肽(ANP)〕和纤维化指标〔结缔组织生长因子(CTGF)〕增加,同样在心力衰竭改善后下降。随后对心脏进行免疫组织化学染色,共聚焦显微镜发现 Nogo 主要定位于成纤维细胞和血管床,心肌细胞无阳性染色。在成纤维细胞,Nogo 定位于细胞膜和细胞浆。这一现象提示,Nogo 基因与心力衰竭过程中心肌重塑的发生发展过程可能存在着某种联系,甚至可能以某种形式参与了心肌纤维化和心肌重塑的调控。

本研究中观察到,心肌成纤维细胞在 Ang II 作用下,胶原 I mRNA 表达较对照组明显增高,这与以往研究一致。同时,在 Ang II 介导下,伴随胶原 I 表达的变化,Nogo-A 在 Ang II 刺激下出现 mRNA 表达和蛋白合成增加,Nogo-B 则出现完全相反的变化,这与 Bullard 等^[4]在心衰动物模型和心衰患者中所观察到的 Nogo-A、Nogo-B 的变化一致。这一一致性进一步提示我们,在 Ang II 作为主要介导因素的心肌纤维化及心肌重塑乃至心衰发生发展的过程中,Nogo 基因的调控极有可能起着某种重要的作用。尽管其机理尚不明确,但我们可以推测,在心力衰竭发生发展过程中,也许正是由于压力超负荷能够诱导 Nogo-A 表达上调,通过 RhoA/ROCK 通路的调节作用,导致各种炎症反应而促进心肌纤维化的发生,而这也可能是 Ang II 诱导心肌纤维化的又一新的机制。

川芎嗪作为从川芎中提取的生物碱,通过促进心肌细胞钙内流而具有正性肌力作用,在临床被广泛应用于治疗各种心脑血管疾病。川芎嗪还可通过抑制成纤维细胞的 DNA 和胶原合成,而发挥其在各种脏器组织中的抗纤维化作用^[11]。国内已有学者^[6]发现,川芎嗪能通过抑制 Ang II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞的增殖,从而减少 I 型胶原的分泌与合成,以及能通过减缓压力超负荷大鼠心肌胶原的沉积,从而发挥其抑制心肌纤维化和保护心肌的作用。但川芎嗪抗心肌纤维化作用的具体机制尚不清楚。

本研究发现,在 Ang II 诱导心肌成纤维细胞胶原 I 及 Nogo 表达变化的基础上,给予不同干预剂量的川芎嗪处理,心肌成纤维细胞的胶原 I 和 Nogo 表达出现了不同程度的相反的变化。在川芎嗪处理组,心肌成纤维细胞胶原 I 及 Nogo-A mRNA 表达与单纯 Ang II 干预组相比出现了下降,而 Nogo-B

mRNA 表达则出现了增加,Nogo-A 和 Nogo-B 蛋白的表达也出现了类似的变化。而且这种变化具有浓度依赖性,在中、高浓度川芎嗪组(0.2 mg/mL 和 2 mg/mL),川芎嗪的对抗 Ang II 诱导的纤维化作用尤为明显。这一结果也提示,川芎嗪在抑制 Ang II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的同时,对于 Nogo 基因的表达也有着同样的影响。

综上所述,不同剂量的川芎嗪对于 Ang II 诱导大鼠心肌成纤维细胞胶原蛋白合成增加具有抑制作用,同时川芎嗪可以下调 Nogo-A mRNA 及其蛋白的表达,并上调 Nogo-B mRNA 及其蛋白的表达,而且这种对抗纤维化作用具有一定的量效关系。结合已有的关于 Nogo-A 和 Nogo-B 在心衰模型中的变化表明,Nogo 基因的调控作用可能参与了 Ang II 的促心肌重塑作用,而川芎嗪的抗纤维化作用可能与 Nogo 基因的调控作用有关。

参 考 文 献

- 1 Stewart JA Jr, Wei CC, Brower GL, *et al.* Cardiac mast cell- and chymase-mediated matrix *met* metalloproteinase activity and left ventricular remodeling in mitral regurgitation in the dog. *J Mol Cell Cardiol*, 2003; 35(3): 311-319.
- 2 Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, 2003; 108(11): 1395-1403.
- 3 Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Therapeut*, 2009; 123(2): 255-278.
- 4 Bullard TA, Protack TL, Aguilar F, *et al.* Identification of Nogo as a novel indicator of heart failure. *Physiol Genomics*, 2008; 32(2): 182-189.
- 5 Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(1): 11-34.
- 6 Zhang DM, Qin Y, Lu XY, *et al.* Effects of tetramethylpyrazine on angiotensin II induced proliferation and type I collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts. *J Chin Integr Med*, 2009; 7(3): 232-236.
- 7 Stewart JA, Lazartigues E, Lucchesi PA, *et al.* The angiotensin converting enzyme 2/Ang-(1-7) axis in the heart: a role for mas communication? *Circ Res*, 2008; 103(11): 1197-1199.
- 8 Zhong JC, Yu XY, Lin QX, *et al.* Enhanced angiotensin converting enzyme 2 regulates the insulin/Akt signalling pathway by blockade of macrophage migration inhibitory factor expression. *Br J Pharmacol*, 2008; 153(1): 66-74.
- 9 Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, *et al.* Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*, 2006; 1080: 76-84.
- 10 Oertle T, Schwab ME. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol*, 2003; 3(4): 187-94.
- 11 江美芳. 川芎嗪注射液的临床应用进展. *中国现代药物应用*, 2008; 2(9): 109-110.

(2012-05-07 收稿, 2012-07-27 修回)

编辑 沈进