·基础研究·

Pravastatin 抑制心肌成纤维细胞胶原基因表达及其机制研究

郑舒展，冯　健，余　琴，李家富△

（泸州医学院附属医院心内科，四川泸州 646000）

摘　要：目的　探讨 pravastatin(Prav)对血管紧张素Ⅱ(angiotension Ⅱ，AngⅡ)诱导的 Wistar 大鼠心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts，CF)胶原基因表达及其作用机制。**方法**　取 1～3 日龄 Wistar 大鼠心室，以酶消化法分离培养大鼠 CF。用 MTT 法测定细胞增殖，RT-PCR 方法测定Ⅰ、Ⅲ型前胶原基因(PⅠCP、PCⅢ)表达。将 CF 分为：(1)空白对照组(A 组)：不加干预药物；(2)AngⅡ组(B 组)：AngⅡ 10^{-6} mol/L；(3)Prav＋AngⅡ组：在加入 AngⅡ 10^{-6} mol/L 基础上再分别加入 Prav 10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} mol/L，分别为 C、D、E 组；(4)Prav 10^{-4} mol/L＋AngⅡ 10^{-6} mol/L ＋甲羟戊酸(MVA)10^{-4} mol/L 组(F 组)；(5)Prav 10^{-4} mol/L＋AngⅡ 10^{-6} mol/L＋焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯(GGPP)10^{-5} mol/L 组(G 组)；(6)Prav 10^{-4} mol/L＋AngⅡ 10^{-6} mol/L＋焦磷酸法呢酯(FPP)10^{-5} mol/L 组(H 组)。**结果**　Prav 呈浓度依赖性的抑制 AngⅡ刺激下的 CF 增殖($P<0.01$)。F、G 组可完全阻断 Prav 的抑制作用，与 E 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。H 组对 Prav 的作用无影响($P>0.05$)。**结论**　Prav 主要通过抑制甲羟戊酸途径减少成纤维细胞增殖和胶原基因的表达，减缓心肌纤维化过程。

关键词：pravastatin；心肌成纤维细胞；胶原；甲羟戊酸；焦磷酸法呢酯；焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯

doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.028　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2013)03-0310-03

Effect of pravastatin on the proliferation of the gene expression of cardiac fibroblast and its mechanism

Zheng Shuzhan，Feng Jian，Yu qin，Li Jiafu△

(*Department of Cardiovascular，Affiliated Hospital of Luzhou Medical College，Luzhou，Sichuan*，646000，*China*)

Abstract：Objective　To investigate the role of pravastain(Prav) in the proliferation of Wistar rat cardiac fibroblast(CF) and its mechanism. **Methods**　Neonatal Wistar rat cardiac fibroblasts(CF) were isolated and cultured in vitro. The influence of pravastatin on CF proliferation was determined by MTT assay. The mRNA levels of PⅠCP and PCⅢ were detected by RT-PCR. 8 groups including(1) group A：the control，(2) group B：AngⅡ(10^{-6} mol/L)，(3) group C：Prav(10^{-6} mol/L)＋ AngⅡ，(4)group D：Prav(10^{-5} mol/L)＋ AngⅡ，(5) group E：Prav(10^{-4} mol/L)＋ AngⅡ，(6) group F：Prav(10^{-4} mol/L)＋ AngⅡ＋ MVA(10^{-4} mol/L)，(7) group G：Prav(10^{-4} mol/L)＋ AngⅡ＋ GGPP(10^{-5} mol/L)，(8) group H：Prav(10^{-4} mol/L)＋ AngⅡ＋ FPP(10^{-5} mol/L). **Results**　Prav could inhibit the CF growth after treated by AngⅡ in a concentration-dependent manner($P<0.01$). Group F，G could markedly inhibit the action of Prav attenuating the cell proliferation compared to group E($P<0.01$)，but group H couldn′t ($P>0.05$). **Conclusion**　Prav exerted its effect possibly by inhibiting the MVA pathway to decrease fibroblast proliferation and gene expression，which could slow down fibrillation of cardiac muscle.

Key words：pravastatin；cardiac fibroblast；collegen；Mevalonic acid；MVA；farnesy-PP；FPP；geranylgeranyl-PP；GGPP

心肌纤维化(myocardial fibrosis，MF)系心肌细胞外基质中胶原纤维过量积聚、胶原含量显著升高或胶原成分发生改变的病理过程，是心肌重构的一个重要特征，可导致充血性心力衰竭、恶性心律失常和猝死，因此研究 MF 的发生机制及寻求防治 MF 的有效措施具有重要的临床意义。血管紧张素Ⅱ(angiotension Ⅱ，AngⅡ)是目前研究表明最重要的致心肌肥厚因子，可直接通过 1 型受体介导刺激心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts，CF)增殖，胶原合成[1-2]。他汀类降脂药物为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂，近年研究表明该类药物可延缓心肌重构，但其具体机制有待进一步阐明。本研究拟观察 pravastatin 对 AngⅡ诱导的 CF 增殖及胶原合成的影响及其作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物和试剂　1～3 日龄的 Wistar 大鼠(清洁动物)20 只，雌雄不限，由泸州医学院实验动物中心提供。总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司；RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司；AngⅡ、Pravastatin、MTT、甲羟戊酸(Mevalonic acid，MVA)、焦磷酸法呢酯(farnesy-PP，FPP)、焦磷酸牛龙牛儿基牛龙牛儿酯(geranylgeranyl-PP，GGPP)均为 Sigma 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　无菌条件下取 Wistar 大鼠心室，剪碎，0.125%胰蛋白酶消化分离细胞，所得全部细胞置于含 10%小牛血清的 DMEM 培养基中，在 5% CO_2、37 ℃、孵箱中培养 60～90 min，差速贴壁法除去心肌细胞，剩下的细胞即为 CF。细胞生长至汇合状态采用 0.25%胰蛋白酶消化传代，2～4 代细胞用于实验，经倒置显微镜、免疫组化纤维黏连蛋白染色阳性鉴定为 CF。将培养的 CF 分为：(1)空白对照组(A 组)：不加干预药物。(2)AngⅡ组(B 组)：AngⅡ 10^{-6} mol/L。(3)Prav＋AngⅡ组：Prav 10^{-6} mol/L ＋ AngⅡ 10^{-6} mol/L (C 组)，

作者简介：郑舒展(1982～)，主治医师，硕士，主要从事心血管内科的研究。　△　**通讯作者**，Tel：13882796628；E-mail：ljf-198@163.com。

Prav 10^{-5} mol/L ＋AngⅡ 10^{-6} mol/L(D 组)，Prav 10^{-4} mol/L ＋ AngⅡ 10^{-6} mol/L(E 组)。(4)Prav10^{-4} mol/L＋AngⅡ 10^{-6} mol/L＋MVA10^{-4} mol/L 组(F 组)。(5)Prav 10^{-4} mol/L ＋ AngⅡ 10^{-6} mol/L＋GGPP10^{-5} mol/L 组(G 组)。(6)Prav 10^{-4} mol/L＋AngⅡ 10^{-6} mol/L＋FPP 10^{-5} mol/L 组(H 组)。每组重复4 孔。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞增殖　取对数生长期 CF 接种于 96 孔板，37℃、5%CO_2 及饱和湿度下培养 24 h 后，换 1%血清 DMEM 培养液培养 24 h 使细胞进入生长静止期，药物干预 48 h，各组于药物刺激结束前 4 h 加入 MTT 20 μL，4 h 后终止培养，吸弃孔内培养上清液，加入 150 μL 二甲基亚砜，振荡 10 min 使使结晶充分溶解，在酶联免疫检测仪上 490 nm 处测定吸光度值(A)。

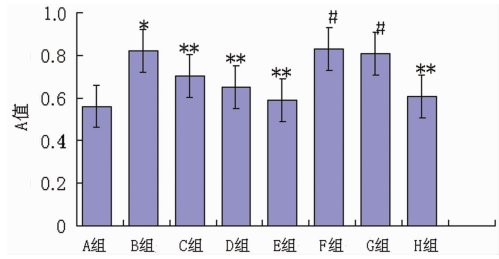
1.2.3 细胞总 RNA 提取及 RT-PCR　总 RNA 提取及 RT-PCR 按说明书进行，取 1 μL 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书方法先逆转录合成第 1 条 cDNA，Random 9mers 作引物，逆转录酶为 AMV，逆转录反应体系总体积为 10 μL，反应条件为：30 ℃ 10 min，50 ℃ 20 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min，1 个循环。以 cDNA 为模板用引物经 PCR 方法进行扩增。引物采用 primer primer 5 软件设计并由大连宝生物公司合成，引物序列为 PICP：上游 5′-TGC CGT GAC CTC AAG ATG TG-3′，下游 5′-CAC AAG CGT GCT GTA GGT GA-3′。PCⅢ：上游 5′-CCA CCC TGA ACT CAA GAG C-3′，下游 5′-TGA ACT GAA AGC CAC CAT T-3′ 。GAPDH：上游 5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′，下游 5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′。PⅠCP，GAPDH 的扩增条件为：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，共 30 个循环。PⅠCP 扩增片段大小为 462 bp，GAPDH 片段大小 452 bp。PCⅢ的扩增条件为：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min，共 30 个循环，产物片段大小为 212 bp。每组 RT-PCR 重复 3 次。PCR 产物上样于 2%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)，0.5×TBE 作为电泳缓冲液，以 5 V/cm 电压电泳时间 45 min。应用凝胶成像系统分析，以目的基因片段/GAPDH 片段的条带光密度值比值来表示其相对量。

1.3 统计学处理　采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析；计量资料组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　　果

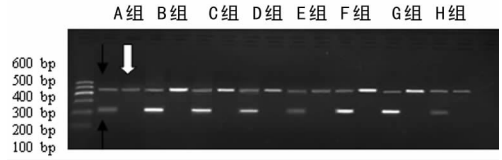
2.1 Prav 对 AngⅡ刺激下 CF 增殖的影响　图 1 显示，AngⅡ明显促进 CF 的增殖，与 A 组比较($P<0.01$)。Prav(10^{-6} mol/L、10^{-5} mol/L、10^{-4} mol/L)呈浓度依赖性的抑制 AngⅡ刺激下的 CF 增殖。加入 MVA、GGPP 后 F、G 组可完全阻断 Prav 的抑制作用，与 E 组比较有统计学意义($P<0.01$)。H 组对 Prav 的作用无影响，与 E 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 Prav 对 AngⅡ刺激下成纤维细胞 PⅠCP、PCⅢmRNA 表达的影响　AngⅡ明显刺激Ⅰ、Ⅲ型前胶原基因的表达，与 A 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。Prav 各浓度组 C、D、E 组与 B 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)，抑制作用具有浓度依赖性。加入 MVA，GGPP 后 F、G 组可完全阻断 Prav 的抑制作用，与 E 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。H 组对 Prav 的作用无影响，与 E 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)，见图 2、3。



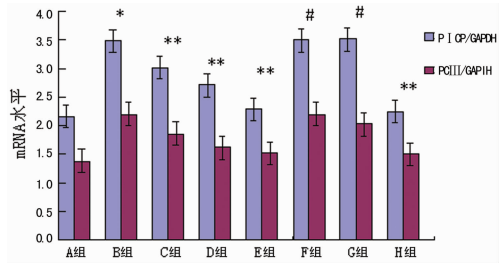
*：$P<0.01$，与 A 组比较；**：$P<0.01$，与 B 组比较；#：$P<0.01$，与 E 组比较。

图 1　Prav 对 AngⅡ刺激下 CF 增殖影响各组的比较



GAPDH：452 bp；PⅠCP：462 bp；PCⅢ：212 bp。

图 2　RT-PCR 电泳图



*：$P<0.01$，与 A 组比较，**：$P<0.01$，与 B 组比较；#：$P<0.01$，与 E 组比较。

图 3　Prav 对 AngⅡ作用下 PICP、PCⅢmRNA 表达的影响

3 讨　　论

心肌成纤维细胞过度增殖导致心肌纤维化发生发展，肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的激活是心肌纤维化的重要调控因素，其中 AngⅡ是重要的促细胞生长因子。本研究显示 AngⅡ直接作用于 CF，明显刺激新生大鼠的心脏 CF 增殖和胶原基因的表达。胶原是心肌细胞外间质的主要成分，其中Ⅰ型胶原最多，Ⅲ型次之，胶原网在维护心脏结构和功能完整性上起重要作用，心肌胶原的组成及含量与心脏的收缩和舒张功能密切相关[3]。

已有研究表明，他汀类药物具有减轻心肌重构的作用[4-5]，最近一项对随机临床试验的 Meta 分析显示：除了抑制心肌重构的作用之外，他汀类药物还可以增加慢性心力衰竭患者的左室射血分数，改善心脏功能[6]。他汀类药物的非降脂作用主要在于其抗炎症、抗氧化，抑制细胞增殖[7]，抑制生长因子的表达[8]等作用。辛伐他汀可抑制脂多糖诱导的 CF 血管紧张素 1 型受体的蛋白表达，从而拮抗 AngⅡ的作用[9]。普伐他汀发挥抗炎效应能减少心梗大鼠梗死区域的胶原含量从而改善心肌重构[10]。本研究观察 Prav 直接作用于体外培养的 CF，显示 Prav 呈浓度依赖性的逆转 AngⅡ的刺激增殖作用，抑制 CF 的 PICP、PCⅢmRNA 表达，表明 Prav 从转录水平调节胶原的合成，拮抗 AngⅡ诱导的心肌纤维化。

他汀类药物的主要作用机制是通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶，在肝脏抑制胆固醇的合成，同时也阻断甲羟戊酸和这一通路上其他重要的类异戊二烯中间体的生成，如 MVA、FPP、GGPP 等[11]。GGPP 和 FPP 是小 GTP 蛋白转录后修饰的重要脂质附属物，提供异戊二烯基团使小 GTP 蛋白活化从而促进细胞增殖和分化。小 GTP 蛋白属于 Ras 超家族，包括 Ras、Rho 和 Rac 等，由于 Rho 家族是龙牛儿基化作用的主要目标，所以抑制 Rho 的信号转导活性及其与下游效应分子 Rho 激酶的结合可能是介导他汀类药物对血管壁细胞及心脏细胞的某些非调脂效应的机制[12-13]。他汀类药物抑制 HMG-CoA 还原酶后，抑制了由 MVA 代谢产生的 GGPP、FPP 的合成，从而阻止小 GTP 蛋白的活化。FPP 主要提供法尼酯基团，与 Ras 的活化有关；Rho 蛋白活化依赖于 GGPP 提供的二牛龙牛儿基团，AngⅡ可诱导新生 SD 大鼠 CFBs 的 Rho 激酶 mRNA 转录并活化 Rho 激酶，抑制 Rho 激酶活化对 AngⅡ刺激的 CFBs 增殖与胶原合成具有明显的抑制作用[14]。Porter KE 等研究显示通过抑制 Rho 的龙牛儿基化或者抑制 Rho 激酶的活性，可以达到同使用辛伐他汀后人心房肌成纤维细胞的增殖受抑制一样的效果[15]。本实验表明 GGPP 逆转 Prav 的作用而 FPP 则不能，说明 Prav 主要通过抑制甲羟戊酸途径，其中可能抑制 Rho 蛋白减少成纤维细胞增殖和胶原基因的表达，从而减缓心肌纤维化过程。

参考文献：

[1] Vivar R，Soto C，Copaja M，et al. Phospholipase C/protein kinase C pathway mediates angiotensin Ⅱ-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor[J]. J Cardiovasc Pharmacol，2008，52(2)：184-190.

[2] 周有华，王杨，董战玲，等. NO 参与 AngⅡ诱导心肌成纤维细胞胶原含量的变化[J]. 海南医学院学报，2009，15(10)：1193-1197.

[3] McCurdy S，Baicu CF，Heymans S，et al. Cardiac extracellular matrix remodeling：fibrillar collagens and secreted protein acidic and rich in cysteine(SPARC)[J]. J Mol Cell Cardiol，2010，48(3)：544-549.

[4] Chang SA，Kim YJ，Lee HW，et al. Effect of rosuvastatin on cardiac remodeling，function，and progression to heart failure in hypertensive heart with established left ventricular hypertrophy[J]. Hypertension，2009，54(3)：591-597.

[5] Zhao XY，Li L，Zhang JY，et al. Atorvastatin prevents left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats[J]. Int Heart J，2010，51(6)：426-431.

[6] Zhang L，Zhang S，Jiang H，et al. Effects of statin treatment on cardiac function in patients with chronic heart failure：a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Clin Cardiol，2011，34(2)：117-123.

[7] 张宇，欧阳平，罗烨，等. 普伐他汀对肿瘤坏死因子-α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 syndecan-4 蛋白表达的影响[J]. 南方医科大学学报，2010，30(5)：998-1001.

[8] Dai QM，Lu J，Liu NF. Fluvastatin attenuates myocardial interstitial fibrosis and cardiac dysfunction in diabetic rats by inhibiting over-expression of connective tissue growth factor[J]. Chin Med J，2011，124(1)：89-94.

[9] 刘少伟，赵连友，郑强荪，等. 脂多糖对心肌成纤维细胞血管紧张素Ⅱ2 型受体蛋白表达的影响及辛伐他汀的干预效应[J]. 中华高血压杂志，2007，15(5)：415-418.

[10] Li TS，Takahashi M，Suzuki R，et al. Pravastatin improves remodeling and cardiac function after myocardial infarction by an anti- inflammatory mechanism rather than by the induction of angiogenesis[J]. Ann Thorac Surg，2006，81(6)：2217-2225.

[11] Hernandez-PO，Perez SD，Navarro AJ，et al. Effects of the 3 hydroxy 3 methylglutaryl-CoA reductase inhibitors，atorvastatin and simvastatin，on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells[J]. J Clin Invest，1998，101(12)：2711-2719.

[12] Takemoto M，Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2001，21(11)：1712-1719.

[13] Copaja M，Venegas D，Aránguiz P，et al. Simvastatin induces apoptosis by a Rho-dependent mechanism in cultured cardiac fibroblasts and myofibroblasts[J]. Toxicol Appl Pharmacol，2011，255(1)：57-64.

[14] 汪祥海，伍卫，杨军，等. Rho 激酶在血管紧张素Ⅱ刺激大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成中的作用[J]. 中国病理生理杂志，2007，23(6)：1098-1101.

[15] Porter KE，Turner NA，O'Regan DJ，et al. Simvastatin reduces human atrial myofibroblast proliferation independently of cholesterol lowering via inhibition of RhoA[J]. Cardiovasc Res，2004，61(4)：745-755.

（收稿日期：2012-11-02　修回日期：2012-12-19）

《重庆医学》——中文核心期刊，欢迎投稿，欢迎订阅！