

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.006

槲皮素对 TNF- α 诱导的乳鼠心肌成纤维细胞增殖及 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达的影响*章春¹,冯健²,李家富^{2 Δ}

(1.重庆市合川区人民医院心内科 401520;2.西南医科大学第一附属医院心内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究槲皮素对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的心肌成纤维细胞增殖及 P38MAPK、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达的影响。**方法** 通过胰酶消化法和差速贴壁法获得纯化的心肌成纤维细胞,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测心肌成纤维细胞的增殖,采用 Western blot 法测定 P38MAPK、HMGB1 蛋白的表达。**结果** 槲皮素对基础状态下的心肌成纤维细胞的增殖无影响,但对 TNF- α 诱导的心肌成纤维细胞的增殖有抑制作用,且各组细胞的吸光度(A)值随槲皮素浓度的增加而减小($P < 0.05$),各组细胞 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达随槲皮素浓度的增加而减弱($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素对 TNF- α 诱导的心肌成纤维细胞增殖有一定地抑制作用,其机制可能是通过 P38MAPK 信号通路抑制 HMGB1 的表达,参与抑制心肌成纤维细胞的增殖。

[关键词] 槲皮素;成纤维细胞;心肌;心室重构;高迁移率族蛋白类;丝裂素活化蛋白激酶**[中图分类号]** R542.2+3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)23-3189-03Effects of quercetin on proliferation and expression of P38MAPK and HMGB1 protein in neonatal rat cardiac fibroblasts induced by TNF- α Zhang Chun¹, Feng Jian², Li Jiafu^{2 Δ}

(1. Department of Cardiology, People's Hospital of Hechuan District, Chongqing 401520, China;

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of quercetin on proliferation and expression of P38MAPK and HMGB1 protein in neonatal rat cardiac fibroblasts induced by TNF- α . **Methods** Purified cardiac fibroblasts were obtained by trypsin digestion and differential adherence method. The proliferation of cardiac fibroblasts was detected by MTT assay. The expression of P38MAPK and HMGB1 protein was detected by Western blot. **Results** Quercetin had no effect on the proliferation of cardiac fibroblasts in the basal state but inhibited the proliferation of cardiac fibroblasts induced by TNF- α , and the A value of each group was increased with the increase of quercetin concentration($P < 0.05$). The expression of P38MAPK, HMGB1 were decreased with the increase of quercetin. **Conclusion** Quercetin may inhibit the proliferation of cardiac fibroblasts induced by TNF- α . The mechanism may be inhibit the expression of HMGB1 through P38MAPK signaling pathway.

[Key words] quercetin; fibroblasts; myocardium; ventricular remodeling; high mobility group; proteins; mitogen-activated protein kinase

心脏重塑是临床多种心血管疾病发展的终末病理表现,也是引起心功能不全和心力衰竭的内在原因。心脏重塑主要包括两方面的结构变化:心肌肥厚和心肌纤维化。其中,心肌成纤维细胞(CFs)是致心肌纤维化的主要作用细胞,心肌成纤维细胞增殖及细胞外基质沉积是心肌纤维化的主要表现,因此,抑制心肌成纤维细胞过度增殖是防止或逆转心脏重塑发生发展的关键之一。槲皮素属黄酮类化合物,存在于许多植物的花、叶、果实中,在心血管疾病治疗方面具有广泛的药理作用,如降血压、抗氧化、抗血小板聚集、抗炎等,对心肌肥厚和心肌纤维化也有一定的逆转作用^[1-3]。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为一种新发现的晚期炎性介质,可诱导细胞的迁移、分化和再生,导致细胞骨架重建,介导炎性反应,与缺血性心肌病、心肌缺血再灌注损伤、心室重塑等密切相关^[4-6]。因此,本研究旨在探索槲皮素对心肌成纤维细胞的影响及 HMGB1 在其中的作用。

1 材料与方

1.1 材料 出生 1~4 d SPF 级 SD 大鼠乳鼠[由西南医科大

学城北动物房提供,生产批号 SCXK(川)2013-17],胎牛血清、高糖 DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),重组人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)(Pepro Tech 公司),槲皮素(产品号 1001182803,美国 Sigma 公司),DAPI 溶液(江苏碧云天公司),兔抗大鼠多克隆波形蛋白抗体(Bioworld 公司),羊抗兔异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 IgG(北京中杉金桥生物技术公司),P38MAPK 抑制剂(SB203580,江苏碧云天公司),P38MAPK 抗大鼠单抗、兔抗大鼠 HMGB1 抗体(Cell Signaling 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代 CFs 培养 在无菌条件下解剖 1~4 d SD 大鼠乳鼠,取出心脏,放入盛有 PBS 液的容器中,反复冲洗,修剪心脏周围的神经、血管、心房等,冲洗干净,将心脏剪碎,用 37℃ 0.125%胰蛋白酶消化分离心脏碎块,用吸管反复吹打,收集上清液装入干净离心管(此步骤反复,直至碎块消失),加入等体积含 10%胎牛血清的培养液终止消化,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞沉淀并用 10%胎牛血清制成细胞悬液,放

* 基金项目:四川省科技厅国际合作项目(2012HH0011)。作者简介:章春(1987-),住院医师,硕士,主要从事心血管内科工作。 Δ

入 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育 150 min, 利用差速贴壁法获得心肌成纤维细胞, 细胞生长融合 90% 以上按 1:2 或 1:3 消化传代, 将第 2~4 代细胞用于实验。

1.2.2 细胞鉴定 用兔抗大鼠多克隆波形蛋白抗体通过免疫荧光法, 在荧光显微镜下观察心肌成纤维细胞的形态, 结合其生物学特性鉴定为 CFs。

1.2.3 实验分组 取生长良好的第 2、3 代细胞, 设置成两部分, 第 1 部分: 空白对照组 (不加任何干预因素)、槲皮素各浓度组 (25、50、75、100 μmol/L); 第 2 部分: 空白对照组 (不加任何干预因素)、TNF-α 组 (终浓度为 10 ng/mL)、TNF-α+槲皮素各浓度组 (25、50、100 μmol/L)、TNF-α+SB203580 组 (浓度为 10 μmol/L)。

1.2.4 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测各组细胞增殖能力 取对数生长期的 CFs, 0.25% 胰酶消化制成细胞悬液, 细胞计数并调整细胞悬液浓度, 接种于 96 孔板 (每组设 4 个复孔, 重复 3 次), 药物干预 24 h, 于干预结束 4 h 前, 每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL, 孵箱继续培养 4 h, 弃孔中培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砷, 避光震荡 10 min, 在酶联免疫吸附仪波长为 490 nm 处测定各组细胞吸光度 (A) 值, 了解细胞增殖情况。

1.2.5 Western blot 法检测各组细胞 P38MAPK、HMGB1 蛋

白表达 取出各组细胞, PBS 洗涤 3 次, 加入 150~250 μL 已配制好的裂解液, 冰上静置 15 min, 吸去含蛋白的裂解液放入一新 EP 管, 放入 4 °C 14 000×g 低温离心机离心 15 min, 上清液即为蛋白, 根据碧云天 BCA 法建立标准曲线测定蛋白浓度, 制备蛋白样品后上样, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 电泳结束后将蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后用 TBST 稀释的抗大鼠 P38MAPK 单抗 (1:1 000)、兔抗大鼠 HMGB1 抗体 (1:1 000)、羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗分别孵育 1 h, 电化学发光 (ECL) 荧光显像, 记录结果, 并用 Quantity One 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 相同时间点不同组别之间采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代心肌成纤维细胞的培养及鉴定 成功分离培养得到的原代 CFs 生长至第 2 天, 在倒置显微镜下观察呈椭圆形或不规则形, 细胞体较大, 细胞质透明, 多核, 无自发性搏动 (图 1)。经染色后的细胞在荧光显微镜下观察可见: 细胞呈长梭形, 细胞核被染为蓝色, 细胞质被染为红色, 结合波形蛋白强阳性反应结果可确定为 CFs (图 2、3)。

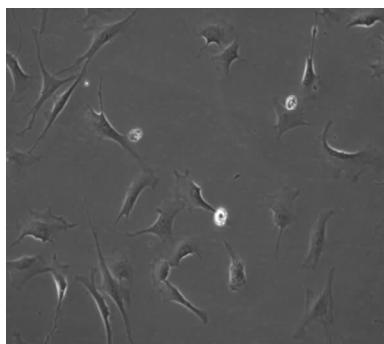


图 1 细胞生长第 2 天 (白光×200)

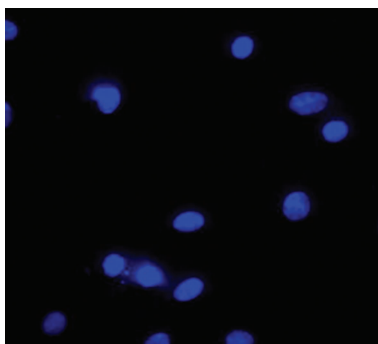


图 2 荧光显微镜下细胞核 (DAPI×400)

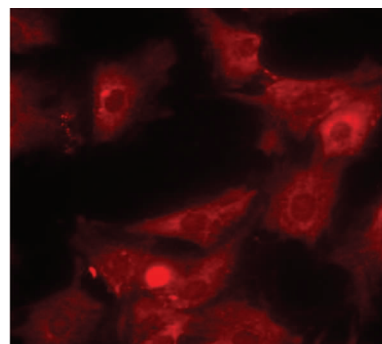
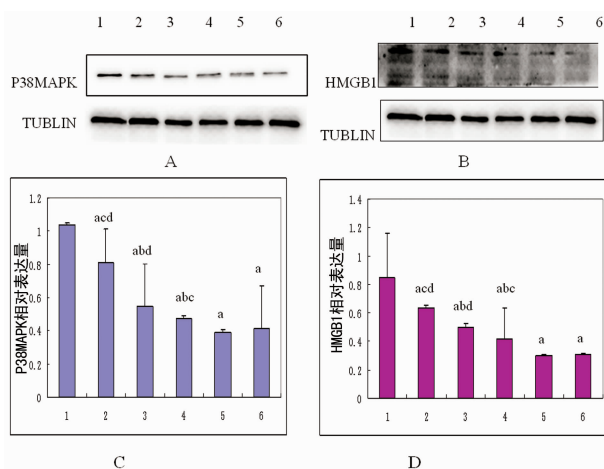


图 3 荧光显微镜下细胞质 (×400)



A: P38MAPK Western blot 图; B: HMGB1 Western blot 图; C: P38MAPK 蛋白表达分析图; D: HMGB1 蛋白表达分析图; 1: TNF-α 组; 2: TNF-α+槲皮素 25 μmol/L 组; 3: TNF-α+槲皮素 50 μmol/L 组; 4: TNF-α+槲皮素 100 μmol/L 组; 5: TNF-α+SB203580 组; 6: 对照组。^a: $P < 0.05$, 与 TNF-α 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 TNF-α+槲皮素 25 μmol/L 比较; ^c: $P < 0.05$, 与 TNF-α+槲皮素 50 μmol/L 组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 TNF-α+槲皮素 100 μmol/L 组比较。

图 4 各组 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达情况

2.2 槲皮素对各组细胞增殖能力影响 MTT 法检测不同浓度槲皮素干预 CFs 24 h 后的细胞增殖情况, 结果显示: 与对照组 (0.270 ± 0.023) 比较, 槲皮素各浓度组 (25、50、75、100 μmol/L 槲皮素组 A 值分别为 0.291 ± 0.027 、 0.278 ± 0.022 、 0.277 ± 0.025 、 0.244 ± 0.021), 对基础状态下的 CFs 增殖无影响 ($P > 0.05$); 此外, 结果还得出: 与对照组 (0.267 ± 0.004) 比较, TNF-α 能明显促进 CFs 增殖, 与 TNF-α 组 (0.523 ± 0.052) 比较, TNF-α+槲皮素各浓度组 (TNF-α+25、50、100 μmol/L 槲皮素组 A 值分别为 0.375 ± 0.046 、 0.319 ± 0.052 、 0.063 ± 0.004) CFs 增殖能力减弱, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

2.3 各组细胞 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达情况 Western blot 检测结果显示: 与对照组比较, TNF-α 组 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$), 与 TNF-α 组比较, TNF-α+槲皮素各浓度组 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达逐渐下调, TNF-α+SB203580 组的蛋白也明显下调 ($P < 0.05$), 提示槲皮素能抑制 TNF-α 诱导的 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达上调, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$), 可能是通过阻断 P38MAPK 信号通路发挥的作用。见图 4。

3 讨论

在心肌纤维化、心室重塑的形成过程中, 心肌成纤维细胞

为其主要作用细胞,它占心肌组织 2/3 的成分,参与细胞外基质的合成和沉积,与心脏的发育、结构、细胞信号传导等密切相关。CFs 的过度增殖及细胞外基质合成增加将导致心肌纤维化,最后发展为心力衰竭,严重危害人类健康。目前,越来越多的研究趋向认为,心肌纤维化是一种慢性炎性反应发生、发展的结果。CFs 在炎症因子的持续刺激下,可通过信号转导,激活信号通路,分泌更多的炎性介质,发生炎性级联反应,促进心肌纤维化^[7-8]。而 TNF- α 作为一种炎症性的细胞因子,当其作用于细胞时不仅会加速心肌细胞凋亡,刺激 CFs 增殖^[9],还会促进 HMGB1 的释放。HMGB1 在几乎所有的细胞中都有表达。近年来, HMGB1 作为一种新的晚期炎症因子,成为许多疾病研究的热点,在心血管疾病的发生、发展中也受到重视。P38MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶家族体系中的亚系成员,在炎症反应致心肌纤维化的过程中发挥了一定的调控作用^[10-11]。有研究利用 P38MAPK 抑制剂干预大鼠 CFs,成功地抑制 I 型胶原蛋白及基质金属蛋白酶-1 的表达,抑制 CFs 增殖,推断 P38MAPK 信号通路是 CFs 增殖形成的途径之一。而 HMGB1 要发挥生物学功能需通过 P38MAPK、核因子- κ B (NF- κ B) 等信号通路起作用。结合本实验结果显示, TNF- α 不仅能刺激 CFs 增殖,还能使炎性蛋白 HMGB1 表达上调,并且可能是通过 P38MAPK 信号通路参与细胞增殖的。

槲皮素作为一种具有多种心血管药理作用的药物而被广泛研究,其抑制细胞增殖作用也受到学术界关注。大量的研究显示,槲皮素对血管紧张素- II、转化生长因子- β 等多种因素引起的 CFs 增殖及基质金属蛋白酶的分泌具有抑制作用^[12-14],从而起抗纤维化作用。研究结果显示,槲皮素对正常生理状态下的 CFs 增殖无影响,但呈浓度依赖性地抑制 TNF- α 诱导的 CFs 增殖。槲皮素各浓度组 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达下调,呈浓度依赖性,加入 P38MAPK 抑制剂 (SB203580) 后,可抑制 TNF- α 促进的 CFs 增殖程度,并部分抑制 P38MAPK、HMGB1 蛋白表达。因此,通过 P38MAPK 途径 TNF- α 可促进 CFs 增殖、HMGB1 表达,使胶原蛋白合成增加、炎症反应加重,从而导致心肌纤维化。

综上所述,槲皮素能够抑制 TNF- α 诱导的乳鼠 CFs 增殖,其机制可能是通过 P38MAPK 信号途径,抑制 HMGB1 蛋白表达而发挥作用的,这为槲皮素在今后的临床干预、防治心肌纤维化提供了实验依据。

参考文献

[1] Gopalakrishnan A, Ram M, Kumawat S, et al. Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by increasing levels of VEGF and TGF- β 1[J]. Indian J Exp Biol, 2016, 54(3):187-195.

[2] Perez Vizcaino F, Bishop Bailey D, Lodi F, et al. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(3):919-925.

[3] Li M, Jiang Y, Jing W, et al. Quercetin provides greater cardio protective effect than its glycoside derivative rutin on isoproterenol-induced cardiac fibrosis in the rat[J]. Can J

Physiol pharmacol, 2013, 91(11):951-959.

- [4] Karuppagounder V, Giridharan W, Arumugam S, et al. Modulation of macrophage polarization and HMGB1-TLR2/TLR4 cascade play a crucial role for cardiac remodeling in senescence-accelerated prone mice[J]. PLoS One, 2016, 11(4).
- [5] Xu H, Su Z, Wu J, et al. The alarmin cytokine, high mobility group box1, is produced by viable cardiomyocytes and mediates the lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction via a TLR4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway[J]. Immunol, 2010, 184(3):1492-1498.
- [6] Wang WK, Lu QH, Zhang JN, et al. HMGB1 mediates hyperglycaemia-induced cardiomyocyte apoptosis via ERK/Ets-1 signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(11):2311-2320.
- [7] Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers[J]. Cardiology, 2012, 122(1):23-25.
- [8] Sriramula S, Francis J. Tumor necrosis factor-alpha is essential for angiotensin II-induced ventricular remodeling: role for oxidative stress [J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0138372.
- [9] Yu M, Zheng Y, Sun HX, et al. Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF- β 1 signaling pathway [J]. Molecules, 2012, 17(3):2738-51.
- [10] Li CY, Zhou Q, Yang LC, et al. Dual-specificity phosphatase 14 protects the heart from aortic banding-induced cardiac hypertrophy and dysfunction through inactivation of TAK1-P38MAPK/-JNK1/2 signaling pathway [J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(2):1-17.
- [11] Liu Z, Xue L, Liu Z, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis accelerates the progression of renal fibrosis in lupus nephritis by activating SMAD and p38 MAPK in TGF- β 1 signaling pathway[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016(24):1-13.
- [12] Hosokawa Y, Hosokawa I, Shindo S, et al. TLR3 agonist enhances CC chemokine ligand 20 production in IL-1 β -stimulated human gingival fibroblasts[J]. Cell Immunol, 2012, 73(5):470-473.
- [13] 吴扬, 顾玉梅. 银杏叶提取物抑制培养的乳鼠心肌细胞肥大及其信号传导机制的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(5):454-457.
- [14] Yan L, Zhang JD, Wang B, et al. Quercetin inhibits left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats and inhibits angiotensinII-induced H9C2 cells hypertrophy by enhancing PPAR- γ expression and suppressing AP-1 activity[J]. PLoS One, 2013, 8(9):72548-72548.