

OMT 抑制钙调神经磷酸酶改善醛固酮诱导的心肌成纤维细胞增殖*

付凌云^{1,2,3,4}, 蒋朝晖^{1,2,3,4}, 罗 红^{1,2,3,4}, 沈祥春^{1,2,3,4}, 甘诗泉^{1,2,3,4**}

(1. 贵州医科大学 药学院 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 药学院 贵州省特色天然药物高效利用工程中心, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 药学院 贵州省普通高等学校天然药物药理与成药性评价重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 药学院 贵阳市天然药物药理与成药性评价重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 观察氧化苦参碱(OMT) 对醛固酮(ALD) 诱导心肌成纤维细胞(CFs) 增殖分化模型的干预作用, 探讨其对钙调神经磷酸酶(CaN) 表达的影响。方法: 采用胰酶消化法、差速贴壁法获得体外培养 1~3 d 新生 SD 乳鼠 CFs, 建立 ALD 诱导 CFs 增殖模型, 采用波形蛋白(Vimentin) 免疫细胞化学法鉴定 CFs; 将鉴定并传代的 2~3 代 CFs 分为对照组(等量蒸馏水)、ALD 组(1×10^{-7} mol/L)、OMT 组(1×10^{-7} mol/L ALD 及 7.56×10^{-4} mol/L OMT) 及 CaN I 组[1×10^{-7} mol/L ALD 及 CaN 抑制剂环孢素 A(CsA1)], 作用 24 h; 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 测定 CaN mRNA 水平, Western blot 法测定 CaN 蛋白表达水平。结果: Vimentin 鉴定分离培养的细胞结果阳性, 提示分离细胞为 CFs; ALD 诱导 24 h 时, 与对照组比较, ALD 组 CaN mRNA 及 CaN 蛋白的表达水平升高($P < 0.01$); 与 ALD 组比较, OMT 组 CaN mRNA 及 CaN 蛋白的表达水平降低($P < 0.01$)。结论: OMT 能够抑制 ALD 诱导的 CFs 增殖, 其机制可能与抑制 CaN 基因表达有关。

[关键词] 大鼠, Sprague-Dawley; 氧化苦参碱; 醛固酮; 心肌; 成纤维细胞; 钙调神经磷酸酶; 细胞增殖; 基因表达

[中图分类号] R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1203-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.016

OMT Inhibiting Calmodulin Neurophosphatase in Aldosterone Induced Proliferation of Myocardial Fibroblasts

FU Lingyun^{1,2,3,4}, JIANG Zhaohui^{1,2,3,4}, LUO Hong^{1,2,3,4}, SHEN Xiangchun^{1,2,3,4}, GAN Shiquan^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, School of Pharmaceutic Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Guizhou Engineering Center for High Efficiency Utilization of Natural Medicines, School of Pharmaceutic Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Evaluation of Pharmacology and Patent Pharmacology of Natural Medicines in Universities of Guizhou, School of Pharmaceutic Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4. Key Laboratory of Evaluation of Pharmacology and Patent Pharmacology of Natural Medicines in Guiyang, School of Pharmaceutic Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of oxymatrine (OMT) on the proliferation and differentiation of myocardial fibroblasts induced by aldosterone (ALD) and explore the effect of OMT on the expression of calmodulin (CaN). **Methods:** CFs of newborn SD mice cultured for 1~3 days in vitro was obtained and CFs Proliferation Model induced by ALD was established by the method of trypsin di-

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81560588); 贵州省科学技术研究重点资助项目[黔科合 JZ 字(2015)2002 号]; 贵州省高等学校科技创新人才团队项目[黔教合人才团队字(2014)31]; 贵州省高层次创新型人才百层次人才项目[黔科合人才(2015)4029 号]; 贵州省科技创新团队项目[黔科合人才团队(2015)4025 号]; 贵州省大学生创新创业训练计划项目(201510660002); 贵州省中医药管理局中医药、民族药医药科学技术研究课题(QZYY-2018-086)

** 通信作者 E-mail: 503888243@qq.com

网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.015.html>

gestion and differential adhesion. CFs was authenticated by vimentin immunocytochemistry. Generation 2 and 3 CFs were divided into four groups: control group, ALD group (1×10^{-7} mol/L), OMT group (1×10^{-7} mol/L ALD and 7.56×10^{-4} mol/L OMT) and CaN I group [1×10^{-7} mol/L ALD and CaN inhibitor cyclosporine A (CsA)]. CaN mRNA level was determined by Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and CaN protein expression was determined by Western blot. **Results:** The result of cells isolated and cultured by identification of vimentin was positive and indicated that the isolated cells were CFs. The expression of CaN mRNA and CaN protein in ALD group was higher than that in control group at 24 h after induction ($P < 0.01$). The expression of CaN mRNA and CaN protein in OMT group was lower than that in ALD group ($P < 0.01$). **Conclusion:** OMT can inhibit the proliferation of CFs induced by ALD, and its mechanism may be related to the inhibition of CaN gene expression.

[**Key words**] rats, Sprague-Dawley; oxyamrine; aldosterone; myocardium; fibroblasts, calcineurin; cell proliferation; genetic expression

目前,心血管疾病已成为影响人们身心健康的焦点问题,心肌纤维化是多种心脏疾病发展到一定阶段的共同病理过程,其特点为心肌成纤维细胞(CFs)增生和细胞外基质沉积,最终引起心脏组织形成永久的瘢痕,导致心力衰竭^[1-2]。因此,抑制心肌纤维化成为临床上治疗心血管疾病的关键。氧化苦参碱(OMT)是从苦参中提取的一种生物碱,具有多种药理作用,可抑制细胞凋亡及抗肿瘤,还有防止纤维组织增生及炎症的作用^[3];OMT对肠道、心脏和肝脏等多种组织的损伤具有保护作用,可用于治疗乙肝感染、心肌纤维化及肝纤维化^[4-5]。本课题组前期研究发现,OMT能够改善醛固酮(ALD)诱导的CFs增殖^[6];钙调神经磷酸酶(CaN)是一种多功能信号酶,广泛分布于各组织中,CaN介导的信号通路在心肌肥大和成纤维细胞增殖中发挥重要的作用^[7]。但OMT与CaN的关系未见报道,本研究在课题组前期研究的基础上,采用OMT处理ALD诱导的CFs增殖,采用环孢素A(CsA)作为CaN激活的抑制剂,观察处理过的CFs细胞中CaN mRNA及蛋白表达,进一步探讨CaN在OMT抑制ALD诱导的CFs增殖中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

1.1.1 实验动物 实验用健康1~3 d新生的SD乳鼠,雌雄不限,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(黔)2012-0001。

1.1.2 试剂及仪器 OMT(南京泽郎医药科技有限公司,由实验室进一步精制,HPLC > 98%,批号

2008021)、ALD(Sigma公司,批号A9477)、波形蛋白(Vimentin)兔单克隆抗体(BOSTER公司,批号BM0135)、环孢素A(Sigma公司,批号082M4014V)、PP2B-A(Santa Cruz Biotechnology公司,批号C2129)、Anti-GAPDH antibody(abcam公司,ab9485)、Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H + L Proteintech公司,批号SA00001-2)、DMi1型倒置显微镜(德国Leica公司)、CFX型凝胶成像系统仪(美国BIO-RAD公司)及Universal Hood II型实时荧光定量PCR仪(美国BIO-RAD公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠CFs的分离制备与培养 取新生1~3 d的SD乳鼠10只,麻醉后用75%乙醇消毒胸腹部皮肤、固定四肢、胸部向上、用眼科剪剪开胸部皮肤及肋骨暴露心脏,更换眼科剪和眼科镊,取下正在搏动心脏的心尖部分,放在盛有预冷PBS的培养皿中,洗净残留血污后转移到盛有预冷PBS的青霉素小瓶中,吸弃PBS,将心室组织浸润青霉素-链霉素混合液中30 s,加入预冷的PBS清洗2遍,加入新鲜预冷的PBS用眼科剪剪成大小约1 mm³碎块,用PBS反复洗净残血(3遍),加入0.25%的胰酶6 mL,放入4℃冰箱中软化组织5 h。5 h后弃上清液,加入0.08%的胰酶5 mL,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育6 min,吸管吹打组织块1 min,自然沉淀,收集上清至15 mL EP管中,加入等量的含15%胎牛血清的DMEM培养基终止消化,1 000 r/min离心8 min,弃上清后加入0.5 mL含15%胎牛血清的DMEM培养基吹打混匀,得到第1次单细胞悬液。未消化的组织块再加入0.08%胰蛋白酶5 mL,按以上步骤重复消化8次,

直至组织块消化完全。将所有收集细胞悬液接种于培养瓶内,置于 5% CO₂、37 ℃ 培养箱差速贴壁 1.5 h,弃去培养基,加入新鲜含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,进行 CFs 培养,用传代后的 2~3 代细胞进行后续研究。

1.2.2 CFs 鉴定 采用免疫细胞化学染色 SP 法联合 DAB 法染色鉴定 CFs,对细胞内特异性 Vimentin 进行染色,通过抗原与抗体特异性结合的原理,化学反应使标记抗体的显色剂显色进行鉴定。

1.2.3 细胞分组 根据课题组前期研究结果^[6],当 ALD 浓度为 1×10^{-7} mol/L,作用时间为 24 h 能成功构建 ALD 诱导 CFs 增殖模型,OMT 低(L, 3.78×10^{-4} mol/L)、高(H, 7.57×10^{-4} mol/L)剂量均可以抑制 ALD 诱导的 CFs 增殖;因此本研究 ALD 浓度使用 1×10^{-7} mol/L,作用时间 24 h,OMT 剂量为 7.57×10^{-4} mol/L。将 2~3 代 CFs 细胞分为分为对照组(等量蒸馏水)、ALD 组(1×10^{-7} mol/L)、OMT 组(1×10^{-7} mol/L ALD 及 7.56×10^{-4} mol/L OMT)及 CaN I 组[1×10^{-7} mol/L ALD 及 1×10^{-7} mol/L CaN 抑制剂环孢素 A(CsA1)]。

1.2.4 CaN mRNA 的表达 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测,CFs 生长达到研究要求时,各组加入相应浓度药物处理 24 h,收集细胞,采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,取总 RNA 1 μg 进行逆转录反应,取逆转录产物 2 μL 进行 PCR 扩增反应。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,CaN (242 bp)的上游引物序列为 5'-ACTG-GCATGCTCCCCAGCGGA-3',下游引物序列为 5'-GTGCCGTTAGTCTCTGAGGCG-3'。内参照为甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH,92 bp),上游引物序列为 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3',下游引物序列为 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'。扩增结束后以 GAPDH 为参照,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 CaN mRNA 相对含量。

1.2.5 CaN 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测,CFs 生长达到研究要求时,各组加入相应浓度药物处理 24 h,收集细胞,提取总蛋白,按组别标记,-80 ℃ 保存备用。BCA 法进行蛋白定量,之后上样,用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,1% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h,加入 CaN 抗体(即一抗)和羊抗兔 IgG 抗体(即二抗)后进行孵育,分别进行免疫蛋白印迹分析,用 ECL 化学发光试剂盒显像,凝胶图像系统分析各蛋

白条带灰度值,并以 GAPDH 为内参标化各样品蛋白电泳条带的灰度值作为 CaN 蛋白相对表达水平。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件包,进行统计学处理。计数资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *student-t* test,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 CFs 的形态学观察

在心脏的所有细胞类型中,与其他细胞相比,CFs 缺乏基底膜,细胞形状呈扁平 and 梭型,贴壁生长且无自发性搏动,见图 1。

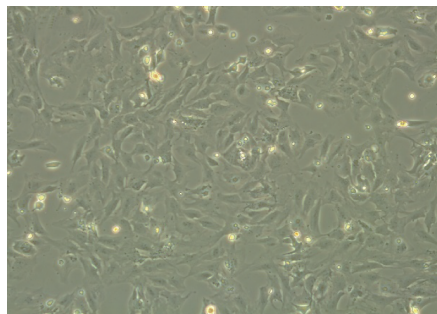


图 1 倒置显微镜下原代 CFs(400 ×)

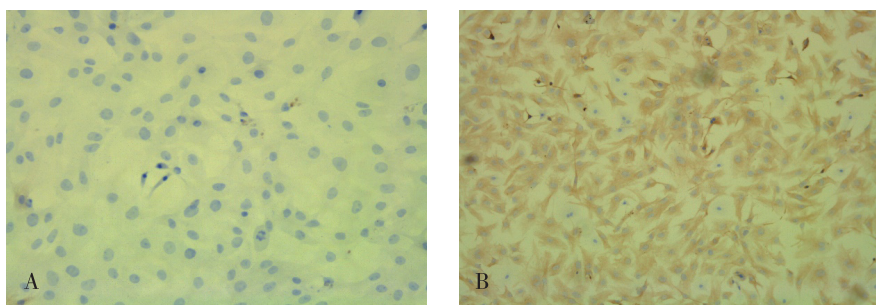
Fig. 1 Primary generation under inverted microscope CFs

2.2 原代 CFs 鉴定

Vimentin 是间质细胞特有的,但是在心脏中仅 CFs 为间质细胞,因此波形蛋白可以作为鉴定 CFs 的标记物。普通光学倒置显微镜下观察 CFs 鉴定结果,阴性对照组(PBS 代替一抗)细胞核呈蓝紫色(图 2A);Vimentin 阳性组,细胞质被染成棕黄色,细胞核呈蓝紫色(图 2B)。CFs Vimentin 鉴定为强阳性反应。说明实验所分离的细胞为 CFs,且纯度大于 99%。

2.3 CaN mRNA 表达

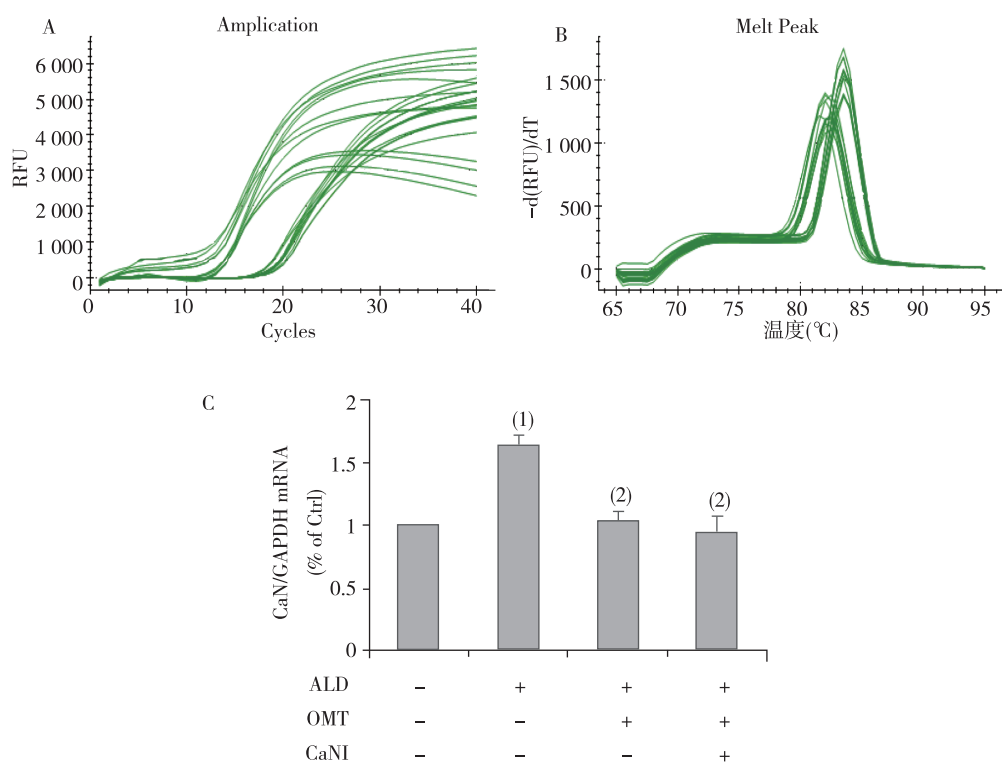
图 3A 和 3B 显示 CaN mRNA 基因特异性扩增良好。与对照组比较,ALD 组的 CaN mRNA 的表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 ALD 组比较,OMT 组 CaN mRNA 的表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 ALD 组比较,CaN I 组 CaN mRNA 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);OMT 组与 CaN I 组 CaN mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3C。



注:A 为 Vimentin 阴性对照组,B 为 Vimentin 阳性组

图 2 原代 CFs 的鉴定(SP、DAB, ×400)

Fig. 2 Identification of primary CFs



注:A 为 CaN 和 GAPDH 的扩增曲线,B 为 CaN 和 GAPDH 的熔融曲线,C 为不同处理组 *CaN* mRNA 的相对含量;(1) 与对照组比较, $P < 0.01$;(2) 与 ALD 组相比, $P < 0.05$

图 3 不同处理组 CFs 细胞中 *CaN* mRNA 表达水平

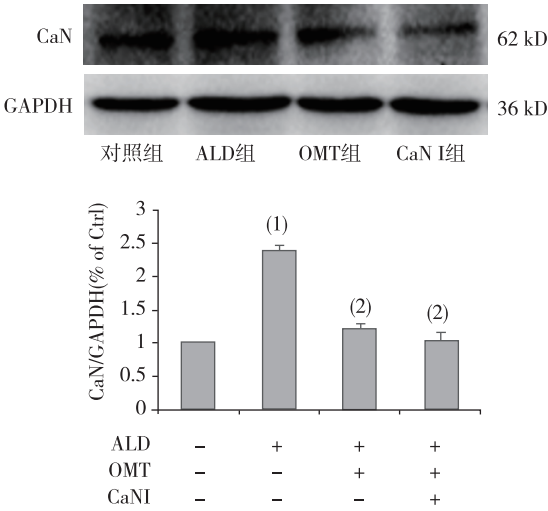
Fig. 3 Expression of *CaN* mRNA in CFs cells treated with different treatments

2.4 CaN 蛋白表达

Western blot 结果显示,与对照组比较,ALD 组 CaN 蛋白表达水平增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 ALD 组比较,OMT 组 CaN 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 ALD 组比较,CaN I 组 CaN 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);OMT 组与 CaN I 组 *CaN* 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。如图 4。

3 讨论

心血管疾病是一系列涉及循环系统的疾病。在多种心血管疾病中都存在心肌纤维化这一病理变化,心肌纤维化被认为与心脏性猝死、心律失常、左心室功能障碍、心力衰竭密切相关。它的特点是心室壁的结构重排,包括 CFs 增殖和细胞外基质蛋白过度沉积,导致心肌僵硬和舒张功能障碍,最终



(1)与对照组比较, $P < 0.01$; (2)与 ALD 组相比, $P < 0.05$

图 4 图 4 不同处理组 CFs 细胞中
CaN 蛋白表达水平

Fig. 4 Expression of CaN protein in CFs cells
treated with different treatments

导致心脏衰竭^[8]。因此,研究心肌纤维化的病理特点及其发病机制成为了医学上的重中之重,研究抗心肌纤维化的药物,对临床上防治心血管疾病的发生具有重要的意义。研究表明 ALD 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的一部分起到了极其重要的作用。ALD 水平过量增多会导致心脏和肾脏功能不全和结构损坏,继而引起胶原沉积、左心室肥大、细胞形态学变化、心肌纤维化和心功能不全^[9-10]。大量研究显示,ALD 与 CaN 信号通路密切相关,大鼠血管外膜成纤维细胞中的 ALD 水平与 CaN 信号通路相关,且选用 CaN 抑制剂 CsA 可以降低 ALD 水平^[11]。Sun 等^[12]研究显示,ALD 可以介导 CsA 引起的肾损伤。因此,ALD 是诱导心肌纤维化的一个重要的因素,且与 CaN 有密切的关系。

OMT 是从苦参中提取的一种生物碱,随着对 OMT 的不断研究,国内外对 OMT 和心肌纤维化关系的报道越来越多。研究表明,OMT 能够改善心肌纤维化、心肌梗死、心力衰竭等,且与 p38MAPK、MIF/mTOR、ERK 等信号有关^[13-14]。但其与 CaN 的关系未见报道,本研究采用 CsA 作为 CaN 激活的抑制剂,用于研究 CaN 信号在 ALD 诱导 CFs 增殖中的作用。qRT-PCR 结果和 Western blot 结果共同证实,ALD 诱导细胞后,CaN mRNA 和 CaN 蛋白表达均增加;加入 CaN 抑制剂,CaN mRNA 和

CaN 蛋白表达均降低,差异有统计学意义,说明 CaN 抑制剂减弱了 ALD 诱导 CFs 增殖的作用。然而本研究还发现 OMT 也降低了 CaN 的 mRNA 和蛋白水平,且与 OMT/CaN 抑制剂联用组没有显著差异,说明 OMT 对 ALD 诱导的 CFs 增殖的抑制作用可能经 CaN 介导。

综上所述,qRT-PCR 和 Western blot 的结果一致证实,OMT 抑制 ALD 诱导的 CFs 增殖与 CaN 有关,为 OMT 对心血管疾病的防治及其作用机制研究提供新的理论依据和实验基础。

4 参考文献

[1] WANG Y Z, WU X M. SMOC1 silencing suppresses the angiotensin II-induced myocardial fibrosis of mouse myocardial fibroblasts via affecting the BMP2/Smad pathway [J]. *Oncology Letters*, 2018,16(3):2903-2910.

[2] GIANLUCA L P, ERICA R, GIULIO P. Cardiac fibrosis in regenerative medicine: destroy to rebuild [J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2018,10(20):S2376-S2389.

[3] ZHOU Y J, GUO Y J, YANG X L, et al. Anti-cervical cancer role of matrine, oxymatrine and sophora flavescens alkaloid gels and its mechanism [J]. *Journal of Cancer*, 2018,9(8):1357-1364.

[4] ZHOU R, XU Q B, XU Y H, et al. Oxymatrine attenuated isoproterenol-induced heart failure in rats via regulation of COX-2/PGE2 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 12(84): 1359-1366.

[5] XU J, LI C M, LI Z W, et al. Protective effects of oxymatrine against lipopolysaccharide/Dgalactosamine-induced acute liver failure through oxidative damage, via activation of Nrf2/HO1 and modulation of inflammatory TLR4 signaling pathways [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1):1907-1912.

[6] 付凌云, 黄海锋, 徐旖旎, 等. 氧化苦参碱抑制 p38MAPK 磷酸化改善醛固酮诱导心肌成纤维细胞增殖 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015,22(21):103-107.

[7] WILKINS B J, DAI Y S, BUENO O F, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2004, 94(1):110-118.

[8] DING Y F, PENG Y R, SHEN H, et al. Guolou Xiebai decoction inhibits cardiac dysfunction and inflammation in cardiac fibrosis rats [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16(49): 1-8.

[9] LIAO C W, LIN L Y, HUANG C S, et al. Time course

- and factors predicting arterial stiffness reversal in patients with aldosterone-producing adenoma after adrenalectomy: prospective study of 102 patients[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1038):20862–20873.
- [10] ROBERT H, JA'N R, TOMA'S Z, et al. Long-term effect of specific treatment of primary aldosteronism on carotid intima-media thickness [J]. *Journal of Hypertension*, 2015, 33(1097):874–882.
- [11] LI J, ZHANG Y G, LUO L M, et al. Urotensin II promotes aldosterone expression in rat aortic adventitial fibroblasts[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(2):2921–2928.
- [12] SUN Q L, LI M, RUI H L, et al. Inhibition of local aldosterone by eplerenone reduces renal structural damage in a novel model of chronic cyclosporine a nephrotoxicity [J]. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 2015, 16(2):301–310.
- [13] ZHANG Y Y, ZHANG Y, TANG J Y, et al. Oxymatrine inhibits homocysteine mediated autophagy via mif/mtor signaling in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 45(5):1893–1903.
- [14] XU Y N, XIAO H, LUO H, et al. Inhibitory effects of oxymatrine on TGF- β 1-induced proliferation and abnormal differentiation in rat cardiac fibroblasts via the p38MAPK and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(4):5354–5362.
- (2018-07-01 收稿, 2018-09-17 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 1202 页)

- [10] 樊慧蓉, 慈小燕, 李薇, 等. 抗乙肝候选新药替芬泰的体外转运机制研究[J]. *药学报*, 2016, 51(8):1233–1239.
- [11] 樊慧蓉, 慈小燕, 李薇, 等. 抗乙肝候选新药替芬泰对细胞色素 P450 酶的体外抑制和诱导作用研究[J]. *药学报*, 2016, 51(12):1864–1870.
- [12] MENG F C, XU W R, LI Y Z, et al. In silico molecular docking study of repensine and bentysrepinine against HBV DNA polymerase [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1):39–44
- [13] FEI J Y, WU L, ZHANG Y Z, et al. Pharmacokinetics-on-a-chip using label-free sers technique for programmable dual-drug analysis [J]. *ACS Sens*, 2017, 2(6):773–780.
- [14] MASIMIREMBWA C M, BREDBERG U, ANDERSSON T B. Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(6):515–528.
- [15] THOMPSON T N. Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21(5):412–449.
- (2018-07-07 收稿, 2018-09-15 修回)
中文编辑: 文箴颖; 英文编辑: 丁廷森