

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.06.004

HO-1 对 Ang II 诱导大鼠心肌纤维化的影响

谷颖 金鑫 李霞 沈彩云 石朋[△]

(济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 **目的** 探讨血红素氧合酶-1 (HO-1) 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导大鼠心肌纤维化的作用。**方法** 培养 Wistar 大鼠心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs), 随机分为 4 组: 正常对照组、Ang II 组 (加入 Ang II)、Hemin 组 (加入 Ang II 和 HO-1 诱导剂氯化血红素 hemin) 和 ZnppIX 组 (加入 Ang II 和 HO-1 抑制剂锌原卟啉-9 ZnppIX), 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测各组细胞的增殖率, Western blot 检测各组细胞 HO-1 蛋白的表达。**结果** Ang II 组较正常对照组心肌成纤维细胞增殖率显著升高 ($P < 0.01$); 与 Ang II 组比较, Hemin 组细胞增殖率显著下降 ($P < 0.01$), HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 Ang II 组比较, ZnppIX 组细胞增殖率无明显变化 ($P > 0.05$), HO-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** HO-1 对 Ang II 诱导的大鼠心肌纤维化具有抑制作用。

关键词 血红素氧合酶-1; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞; 血管紧张素 II

中图分类号: R541.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)12-395-04

Effect of HO-1 on Ang II-induced myocardial fibrosis in rats

GU Ying, JIN Xin, LI Xia, SHEN Caiyun, SHI Peng

(Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of heme oxygenase-1 (HO-1) on angiotensin II (Ang II)-induced myocardial fibrosis in rats. **Methods** Cultured neonatal Wistar rats' cardiac fibroblasts (CFs) were randomly divided into 4 groups, the normal group, the Ang II group (added Ang II), the Hemin group (added Ang II and hemin which could induce more HO-1) and the ZnppIX group (added Ang II and Zinc protoporphyrin-9 which could reduce HO-1). The proliferation of cardiac fibroblasts of each group was detected by MTT assay. The expression of HO-1 protein in cardiac fibroblasts was detected by Western blot. **Results** The proliferation rate of cardiac fibroblasts in Ang II group was significantly higher than that in normal group ($P < 0.01$). The proliferation rate of Hemin group was significantly lower than that of Ang II group ($P < 0.01$), while the expression of HO-1 protein was significantly increased ($P < 0.01$). However, there was no significant change in cell proliferation rate in the ZnppIX group compared with the Ang II group ($P > 0.01$), while the expression of HO-1 protein was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** HO-1 could inhibit the Ang II-induced myocardial fibrosis in rats.

Keywords: Heme oxygenase-1; Myocardial fibrosis; Cardiac fibroblasts; Angiotensin II

心肌纤维化是指在正常的心肌组织结构中胶原纤维过量积聚、胶原浓度显著升高或胶原成分发生改变的病理过程。该病理变化是临床多种心血管疾病发展到终末阶段的必经过程。其中, 心肌成纤维细胞的增殖和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的沉积为心肌纤维化的主要特征^[1]。心

肌纤维化可引起心脏僵硬增加, 顺应性降低, 影响心脏的舒张和收缩功能, 导致心衰。目前, 预防和逆转心肌纤维化已成为心衰研究和防治的重要目标。血红素氧合酶-1 (HO-1) 及其产物对机体具有抗炎、抗氧化、扩血管、调控细胞增殖与凋亡等作用, 对心血管系统的疾病防治具有积极的临床意义, 但国内尚无 HO-1 对心肌纤维化的影响研究。本文使用 HO-1 诱导剂和抑制剂分别作用于血管

[△][通信作者] 石朋, E-mail: bler-8456@163.com

紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌成纤维细胞, 检测心肌成纤维细胞增殖率, 观察心肌纤维化程度, 探讨 HO-1 对心肌纤维化的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生 1~2d 的 Wistar 大鼠 16 只, 雌雄不限, 购自山东大学实验动物中心。动物实验符合动物伦理学要求。

1.1.2 主要试剂与仪器 高糖 DMEM 培养基及胎牛血清 (FBS) 购自美国 Hyclon 公司; 氯化血红素 (hemin)、锌原卟啉-9 (ZnppIX)、Ang II、鼠抗波形蛋白单克隆抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、DAPI 均购自美国 Sigma 公司; HO-1 山羊多克隆抗体和内参 GAPDH 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 胰酶和 I 型胶原酶均购自美国 Gibco 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 四甲基偶氮唑盐溶液购自河北凯力昂生物科技有限公司。CO₂ 培养箱 (德国 HERA cell 240 公司); 倒置显微镜 (德国 leicadm4000B); 荧光显微镜 (日本 OLYMPUS 产品); PALphaimager TM2200 凝胶图像分析仪 (美国 Alpha innotech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 心肌成纤维细胞的原代及传代培养 无菌条件下取出新生大鼠心脏组织, 放入 PBS 液中, 切取心室组织部分, 反复冲洗去除心室内的血液, 转移入 EP 管中, 剪成 1mm³ 的组织碎块, 静置 5min 后, 弃上清以去除红细胞。以 0.05% I 型胶原酶和 0.125% 胰酶 37.0℃ 反复消化 6 次, 然后收集细胞悬液, 以离心半径为 15cm、800r/min 离心 10min, 重悬后用 200 目滤网过滤, 将所得细胞培养 90min (差速贴壁法分离成纤维细胞), 成纤维细胞贴壁后, 弃去未贴壁的细胞, 贴壁细胞继续在含 15% FBS 的 DMEM 培养液内培养, 待细胞长满瓶底约 80%~90% 进行传代, 实验取传代 2~4 代细胞。加药处理前 24h 换为无血清培养液培养。

1.2.2 心肌成纤维细胞鉴定 波形蛋白正常情况下表达于成纤维细胞等间质细胞中, 在心肌细胞中不表达, 所以可根据波形蛋白阳性表达来鉴别心肌成纤维细胞。取第 2 代传代心肌成纤维细胞接种于 6 孔培养板内, 2d 后吸弃培养液, 使用 4% 多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 室温封闭 30min, 5%

BSA 室温摇床封闭 30min, 加 1:200 鼠抗波形蛋白抗体 (一抗) 4℃ 过夜。次日加 1:200 FITC 标记的 IgG (二抗) 室温避光孵育 30min, PBS 清洗, 然后磷酸甘油封片, 最后于荧光显微镜下观察, 拍片。

1.2.3 实验分组和药物干预 将心肌成纤维细胞随机分为 4 组: 分别为正常对照组 (常规培养), Ang II 组 (加入 Ang II, 终浓度为 10⁻⁵ mol/L), Hemin 组 (加入 Ang II 和 HO-1 诱导剂 hemin, 终浓度分别为 10⁻⁵ mol/L、2 × 10⁻⁵ mol/L), ZnppIX 组 (加入 Ang II 和 HO-1 抑制剂 ZnppIX, 终浓度分别为 10⁻⁵ mol/L、5 × 10⁻⁶ mol/L) [2-3]。

1.2.4 MTT 测定细胞增殖率 待培养皿细胞生长至 80%~90% 密度时予以消化, 收集成纤维细胞铺于 96 孔板中, 每孔铺 1 × 10⁴ 个细胞, 每组设 9 个复孔, 待培养孔中细胞生长至 80%~90% 时, 不同组分别予以换液加药, 加药后继续于细胞培养箱内培养 48h, 加入 15μl MTT 溶液, 37℃ 避光孵育 4h, 弃去培养孔中液体, 每孔加入 150μl 二甲基亚砷, 于酶标仪中震荡混匀 10min, 测定 450nm 处吸光度值 (OD 值)。细胞增殖率 (%) = 实验组 OD₄₅₀/对照组 OD₄₅₀ × 100%。

1.2.5 心肌成纤维细胞 HO-1 蛋白表达检测 提取心肌成纤维细胞总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度, 按每孔 60μg 上样, 依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭, 并加入 HO-1 山羊多克隆抗体 (1:200 稀释) 和内参抗体 (GAPDH), 于 4℃ 孵育过夜, 次日 TBST 洗膜, 然后加入相应的二抗即辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 单克隆抗体 (1:5000), 化学发光法检测目的蛋白即 HO-1 的表达水平, 采用 Image J 软件对显影的条带进行灰度分析, 目的蛋白显色条带灰度与内参显色条带灰度比值代表目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

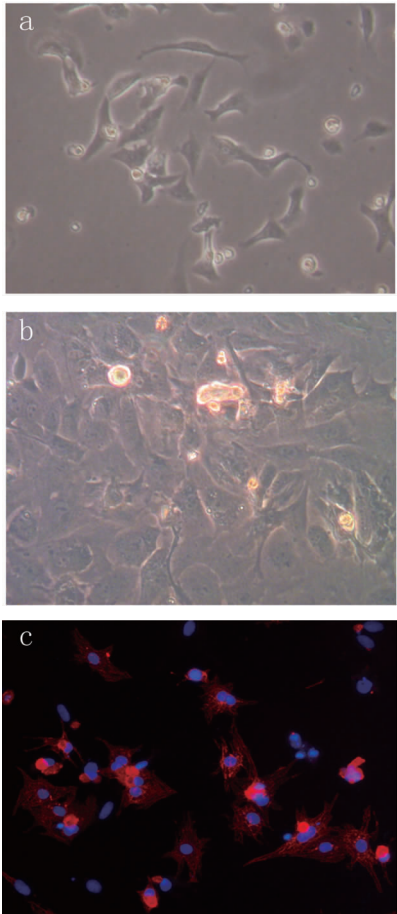
采用 SPSS21.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.0167$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌成纤维细胞培养及鉴定

大部分 CFs 培养 90min 后贴壁, 显微镜下可见细胞成梭形或三角形, 均匀散在分布 (见图 1a)。CFs 生长迅速, 约 2~3d 即呈现融合状态, 细胞增

多,胞体增大,细胞排列密集,未见细胞搏动(见图 1b)。用波形蛋白行免疫荧光染色,鉴定心肌成纤维细胞纯度,结果示 90% 以上细胞染色阳性,提示经差速贴壁后获得细胞绝大多数为心肌成纤维细胞(见图 1c)。



注:a. 原代培养 24h 心肌成纤维细胞
 b. 传代培养 48h 心肌成纤维细胞
 c. 乳鼠波形蛋白免疫荧光染色心肌成纤维细胞
 图 1 大鼠心肌成纤维细胞(×200)

2.2 各组细胞间细胞增殖率情况

4 组间细胞增殖率的比较,差异有统计学意义($F=8.394, P<0.05$)。Ang II 组与正常对照组相比,OD 值及细胞增殖率显著增加($P<0.01$); Hemin 组与 Ang II 组比较,OD 值及细胞增殖率显著下降($P<0.01$),而 ZnppIX 组与 Ang II 组比较,OD 值及细胞增殖率无明显变化($P>0.05$)。见表 1。

2.3 各组心肌成纤维细胞 HO-1 蛋白表达

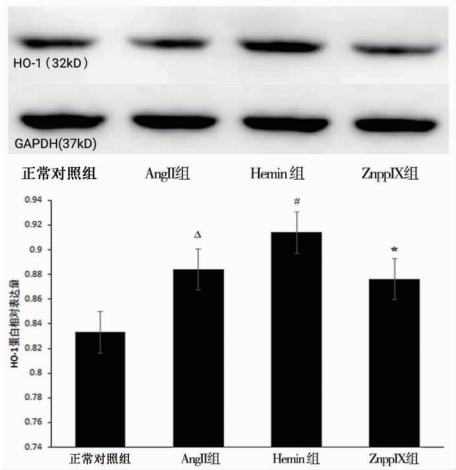
Ang II 组较正常对照组 HO-1 升高($P<0.01$),Hemin 组较 Ang II 组 HO-1 表达进一步升高($P<0.01$);ZnppIX 组较 Ang II 组 HO-1 表达水平

降低($P<0.01$)。

表 1 各组细胞间 OD 值及细胞增殖率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	细胞增殖率/%
正常对照组	0.82 ± 0.04	100 ± 0.00
Ang II 组	1.28 ± 0.06	156 ± 10.19 [△]
Hemin 组	0.83 ± 0.02	101 ± 5.02 [#]
ZnppIX 组	1.31 ± 0.01	160 ± 7.40 [*]
<i>F</i> 值	4.896	8.394
<i>P</i>	0.007	0.000

注:与正常对照组比较,△ $P<0.01$;与 Ang II 组比较,[#] $P<0.01$;与 Ang II 组比较,^{*} $P>0.01$



注:与正常对照组比较,△ $P<0.01$
 与 Ang II 组比较,[#] $P<0.01$
 与 Ang II 组比较,^{*} $P<0.01$

图 2 Western blot 检测心肌成纤维细胞
 HO-1 蛋白表达水平

3 讨论

随着医疗技术的日新月异,心血管疾病的诊治水平也不断提升,但心衰仍为心脏疾病中难以攻克的最
 后堡垒,及早阻止心衰进展成为心血管疾病治疗的目标之一,而心肌纤维化是导致心肌重构促进心衰形成的关键环节^[4],因此,心肌纤维化的相关研究也一直是心血管领域的研究热点。

HO-1 是血红素氧合酶家族中的一员,是体内血红素代谢的重要起始酶和限速酶,能够催化血红素分解为胆绿素、一氧化碳和铁离子。HO-1 属诱导型,广泛分布于哺乳动物多种组织细胞中,生理状态下只有少量表达,缺血、缺氧、血红素、应激等因素可诱导其显著表达^[5-6]。近年研究提示 HO-1

与心血管疾病有着密切的联系,对心血管的自我保护和机体稳态的维持起重要作用^[7-9],但对心肌纤维化的影响未见相关报道。本文采用离体大鼠成纤维细胞作为研究对象,Ang II 刺激体外培养的心肌成纤维细胞,结果显示 10^{-5} mol/L 的 Ang II 作用心肌成纤维细胞后,细胞增殖率比正常对照组明显增加,证实了 Ang II 可促使心肌成纤维细胞增殖,加重心肌纤维化。与文献报道的 Ang II 过度表达可能会促使心肌成纤维细胞过度增殖一致^[10]。故本实验以 Ang II 刺激的增殖细胞为模型,研究 HO-1 高表达及低表达后心肌成纤维细胞增殖情况。本文结果显示,Hemin 组经过血管紧张素 II 刺激及 HO-1 诱导剂氯化血红素作用后,与单纯经过血管紧张素 II 刺激的 Ang II 组比较,HO-1 表达升高,心肌成纤维细胞增殖率下降;ZnppIX 组经过血管紧张素 II 刺激及 HO-1 抑制剂锌原卟啉-9 作用后,与单纯经过血管紧张素 II 刺激的 Ang II 组比较,HO-1 表达下降,细胞增殖率却无明显变化;证明了 HO-1 可抑制 Ang II 刺激引起的心肌成纤维细胞增殖,进而延缓心肌纤维化的进展,因此,本研究推断 HO-1 通过抑制心肌成纤维细胞的增殖,在一定程度上抑制了心肌纤维化,延缓心室重构,进而抑制了心衰的进展。

综上所述,对于 Ang II 诱导的心肌纤维化,HO-1 可以起到抑制作用,但其具体作用机制尚不明确,可能与血红素产物一氧化碳、胆绿素、和亚铁离子等有关,还有待于进一步研究。因此,HO-1 有可能成为治疗心肌纤维化的一个潜在靶点,为我们防治心衰提供新思路。

参考文献:

- [1] 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,2014,4(3):269-272. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2014.03.021.
- [2] Xue H, Guo H, Li YC, et al. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects liver cells from ischemia/reperfusion injury in cirrhotic rats[J]. World J Gastroenterol. 2007 Oct 28;13(40):5384-90. DOI:10.3748/wjg.v13.i40.5384.
- [3] 赵榆华,迟路湘,陈一茂.血管紧张素 II 诱导乳鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报,2004,26(20):1819-1822. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2004.20.008.
- [4] Braunwald E. The war against heart failure; the Lancet lecture[J]. Lancet, 2015, 385(9970):812-824. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61889-4.
- [5] Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, et al. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(6):739-745. DOI:10.1165/rcmb.4816.
- [6] Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, et al. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver[J]. FASEB J, 2004, 18(7):854-856. DOI:10.1096/fj.03-0643fje.
- [7] 刘璐,曹剑,黄鑫,等.上调血红素氧合酶 1 对代谢综合征大鼠心功能的影响及可能机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2016,18(1):67-70. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2016.01.018.
- [8] Jazwa A, Stoszek M, Tomczyk M, et al. HIF-regulated HO-1 gene transfer improves the post-ischemic limb recovery and diminishes TLR-triggered immuneresponses-Effects modified by concomitant VEGF overexpression[J]. Vascu Pharmacol, 2015, 71:127-138. DOI:10.1016/j.vph.2015.02.011.
- [9] Foo RS, Siow RC, Brown MJ, et al. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits angiotensin II-mediated rat cardiac myocyte apoptosis but not hypertrophy[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(1):1-7. DOI:10.1002/jcp.20723.
- [10] Boza P, Ayala P, Vivar R, et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation[J]. Mol Immunol, 2016, 74:96-105. DOI:10.1016/j.molimm.2016.05.001.

(收稿日期 2019-05-30)

(本文编辑:石俊强)