

# $\alpha 7$ nAChR 激动剂对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其分子机制

符宇<sup>1</sup>, 谈智<sup>2,3</sup>, 吴涛<sup>1</sup>, 耿登峰<sup>1</sup>

(中山大学 1.孙逸仙纪念医院心内科,广东广州,510120; 2.中山医学院生理教研室,  
3.中山医学院高血压研究所,广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨  $\alpha 7$  烟碱乙酰胆碱受体( $\alpha 7$  nAChR)激动剂对血管紧张素 II (Ang II)诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其分子机制。【方法】培养出生 2~3d 大鼠心肌成纤维细胞(CF),取传代 2~4 代细胞,分为①空白对照组(control);②模型组(Ang II  $10^{-7}$  mol/L);③ACh 预处理组:ACh + Ang II 组(ACh  $10^{-4}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L);④ $\alpha 7$ nAChR 激动剂组: $\alpha 7$ nAChR 激动剂 + Ang II 组(PNU-282987  $5 \times 10^{-6}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L);⑤ $\alpha 7$ nAChR 拮抗剂组:ACh + 甲基牛扁碱柠檬酸盐(MLA) + Ang II 组(ACh  $10^{-4}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L + MLA  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)。干预 24 h 后,应用 CCK-8 试剂盒检测 CF 的增殖能力,western blot 检测胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha 7$  烟碱乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7$ nAChR)、核中 p65 蛋白表达;Real-time PCR 检测  $\alpha 7$ nAChR 的 mRNA 表达。【结果】Ang II 干预 24h,CF 增殖显著提高,胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、核中 p65 蛋白的表达明显升高, $\alpha 7$ nAChR 的 mRNA 和蛋白水平均表达降低;ACh、 $\alpha 7$ nAChR 激动剂预处理后抑制 CF 增殖,胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA 和核中 p65 蛋白的表达降低, $\alpha 7$ nAChR 的 mRNA 和蛋白水平均表达升高;ACh+MLA 预处理,CF 增殖再次提高,胶原蛋白 I、纤维化因子  $\alpha$ -SMA、核中 p65 蛋白的表达再次明显升高, $\alpha 7$ nAChR 的 mRNA 和蛋白水平均表达降低。【结论】 $\alpha 7$ nAChR 激动剂抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞的增殖和胶原合成,其机制可能与 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**关键词:**心肌成纤维细胞;血管紧张素 II;胆碱能抗炎通路; $\alpha 7$  烟碱乙酰胆碱受体

中图分类号:R54 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2016)01-0023-06

## Effect of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist on Angiotensin II -induced Cardiac Fibroblasts Proliferation and Collagen Synthesis

FU Yu<sup>1</sup>, TAN Zhi<sup>2,3</sup>, WU Tao<sup>1</sup>, GENG Deng-feng<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, SunYat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2.Zhongshan School of Medicine, Physiology Teaching and Research Section, Guangzhou 510080, China; 3.Zhongshan School of Medicine, Institute of High Blood Pressure, Guangzhou 510080, China)  
Corresponding to: GENG Deng-feng; Email:dr.dfengg@hotmail.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of an  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7$  nAChR) agonist on cardiac fibroblast (CF) proliferation and collagen synthesis induced by angiotensin II (AngII) and to determine its molecular mechanism. 【Methods】 CF were cultured from hearts of Sprague-Dawley rats. The CF were divided into the following five groups: ① control group; ② model group (AngII  $10^{-7}$  mol/L); ③ ACh preconditioning group: ACh + Ang II group (ACh  $10^{-4}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L); ④  $\alpha 7$ nAChR agonist group:  $\alpha 7$ nAChR agonist + Ang II group (PNU-282987  $5 \times 10^{-6}$  mol/L + AngII  $10^{-7}$  mol/L); ⑤  $\alpha 7$ nAChR antagonist group: ACh + Methyllycaconitine citrate (MLA) + AngII group (ACh  $10^{-4}$  mol/L + AngII  $10^{-7}$  mol/L + MLA  $10^{-6}$  mol/L). The CCK-8 assay was used to test the proliferation of CF. Protein expression of collagen I,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA),  $\alpha 7$ nAChR, and p65 were analyzed by western blotting. The mRNA expression of  $\alpha 7$ nAChR was measured by real-time PCR. 【Results】 Incubation with Ang II induced significant proliferation of CF. Expressions of collagen I,  $\alpha$ -SMA, and p65 were significantly increased, while the  $\alpha 7$ nAChR protein and mRNA levels were significantly decreased. PNU-282987 significantly

收稿日期:2015-09-02

基金项目:国家自然科学基金(81270377);广东省自然科学基金(2014A030313092,2014A030313062)

作者简介:符宇,硕士研究生;E-mail:fyy0717@126.com;耿登峰,通信作者,主任医师,E-mail:dr.dfengg@hotmail.com

inhibited the AngII-induced CF proliferation; deregulated expressions of collagen I,  $\alpha$ -SMA, and p65; and up-regulated  $\alpha$ 7nAChR protein and mRNA levels. Preconditioning with ACh + MLA restored the proliferation of CF and the expressions of collagen I, fibrosis factor  $\alpha$ -SMA, and p65, while the  $\alpha$ 7nAChR protein and mRNA levels decreased. 【Conclusion】 An $\alpha$ 7nAChR agonist can inhibit AngII-induced CF proliferation and collagen synthesis, in part by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathways.

**Key words:** cardiac fibroblasts; angiotensin II; cholinergic anti-inflammatory pathway;  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(1):23-28]

心肌重塑是多种心血管疾病的重要病理结果,最终可导致心力衰竭,心律失常,是影响心血管疾病临床过程和预后的重要因素。心肌的细胞及细胞外基质的改变,心肌细胞的肥大、成纤维细胞的增殖和细胞外基质积聚共同构成了心肌重塑的病理基础,心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)在心室重塑中发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。在引起心肌重塑的因素中,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)对 CF 的增殖和胶原合成起重要作用<sup>[2]</sup>。胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP) 是中枢神经系统通过胆碱能神经及其递质调节或抑制局部或全身炎症反应的通路。 $\alpha$ 7 烟碱乙酰胆碱受体( $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha$ 7 nAChR)是 CAP 通路上的关键受体<sup>[3]</sup>。目前可通过迷走神经刺激(vagus nerve stimulation, VNS)、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)及  $\alpha$ 7nAChR 激动剂来激活 CAP。以往研究发现,心肌梗死后给予慢性 VNS能够改善心脏结构及功能,提示激活 CAP 有改善心肌梗死后心室重塑的作用<sup>[4]</sup>;  $\alpha$ 7nAChR 基因敲除鼠,心肌梗死后血管生成明显减少<sup>[5]</sup>。既往研究仅限于动物水平,未对其机制进行深入探讨,在细胞学水平,尤其是在心室重塑中起重要作用的心肌成纤维细胞,尚缺乏这方面的研究。本实验以 CF 为研究对象,研究  $\alpha$ 7nAChR 激动剂对 Ang II 诱导的 CF 的增殖及胶原合成的影响,进一步探讨其作用机制,为心肌梗死后心室重塑的防治提供新的靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

出生 2 ~ 3 d SD 大鼠,SPF 级,雌雄不拘,由中山大学北校区实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司。胰蛋白酶、Ang II 购自 Sigma 公司。胶原蛋白 I 抗体、

$\alpha$ -SMA 抗体购自 Santa Cruz 公司。 $\alpha$ 7nAChR 抗体、 $\alpha$ 7nAChR 激动剂(PNU-282987)、 $\alpha$ 7nAChR 阻断剂(甲基牛扁碱柠檬酸盐 Methyllycaconitine citrate, MLA) 购自 Abcam 公司。P65 抗体购自于 Cell Signaling Technology 公司。CCK-8 试剂(日本同仁化学)

### 1.3 实验分组

实验细胞共分成 5 组: ①空白对照组(control); ②模型组(Ang II  $10^{-7}$  mol/L); ③ACh 预处理组:ACh + Ang II 组(ACh  $10^{-4}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L); ④ $\alpha$ 7nAChR 激动剂组: $\alpha$ 7nAChR 激动剂 + Ang II 组(PNU-282987  $5 \times 10^{-6}$  mol/L + Ang II  $10^{-7}$  mol/L); ⑤ $\alpha$ 7nAChR 拮抗剂组:ACh+甲基牛扁碱柠檬酸盐(Methyllycaconitine citrate, MLA)+ Ang II 组(ACh  $10^{-4}$  mol/L+Ang II  $10^{-7}$  mol/L + MLA  $1 \times 10^{-6}$  mol/L)。

### 1.4 新生大鼠心肌 CF 分离、培养及分组给药

无菌开胸剪取心尖部(心室肌)组织,眼科剪刀剪碎成  $1 \text{ mm}^3$  大小,  $0.6 \text{ g/L}$  胰蛋白酶消化,重复 3 ~ 5 次。将各次消化所得细胞收集。用含有  $100 \text{ mL/L}$  胎牛血清的 DMEM 培养基,在体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中培养,孵育 80 min,差速贴壁法弃心肌细胞,弃原培养基,重新加入含有  $100 \text{ mL/L}$  胎牛血清的 DMEM 培养基。隔天以 PBS 清洗后换培养基。

取传代 2 ~ 4 代的 CF,接种于 6 孔板或 96 孔板中,待 6 孔板中的心肌成纤维密度达到 80%后饥饿 24 h, ACh 预处理组、 $\alpha$ 7nAChR 激动剂组、 $\alpha$ 7nAChR 拮抗剂组分别给予乙酰胆碱( $1 \times 10^{-4}$  mol/L)、PNU-282987( $5 \times 10^{-6}$  mol/L)、乙酰胆碱( $1 \times 10^{-4}$  mol/L)+ $\alpha$ 7nAChR 拮抗剂( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)预处理 2 h 后,连同模型组,以 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h。

### 1.5 Western Blot 检测胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha$ 7nAChR、核中 p65 表达

将各组药物处理后的细胞,弃培养液,用预冷

PBS洗细胞 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液,刮起细胞,静止 15 min,收集裂解液(根据试剂盒说明提取细胞核中 p65 蛋白),超声粉碎 30 s, 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min( $r = 13.5\text{ cm}$ )离心 10 min,吸走上清,BCA 法测定总蛋白浓度。取 20  $\mu\text{g}$  的上述样品加样至 SDS-PAGE 凝胶,电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上,膜在室温下用 50 g/L 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h。一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 洗膜后二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜后用 ECL 液显影,将结果进行图像分析。

按照以上步骤检测胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、 $\alpha 7nAChR$  在总蛋白中的表达,以及 p65 在核中的表达。利用 Image J 图像分析软件检测蛋白灰度值,以目的条带与 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

### 1.6 Real-time PCR 检测 $\alpha 7nAChR$ mRNA 的表达

采用 Trizol 法提取 CF 总 RNA,逆转录成 cDNA。反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预热 3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,53.5  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。 $\alpha 7nAChR$  上游引物为 5'-ATGCCAGCAA CATATGATTC-3',下游引物为 5'-ACTGCAG ATCACCTCACTCTA-3',产物大小为 528 bp。通过 real-time PCR,检测各组处理后  $\alpha 7nAChR$  mRNA 的表达变化。

### 1.7 CCK-8 试剂盒检测 CF 的增殖能力

采用 CCK-8 试剂盒对心肌成纤维细胞的增殖能力进行检测。将细胞接种值 96 孔板中,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,置于温箱继续培养 24 h 后将培养基更换为无血清的培养基饥饿 24 h,采用不同预处理 2 h 后,采用不同处理因素干预 24 h 后,将 96 孔板中的培养基更换为含有 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 的 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基,继续温箱中孵育 2 ~ 2.5 h 后置酶标仪下(波长 450 nm)检测。

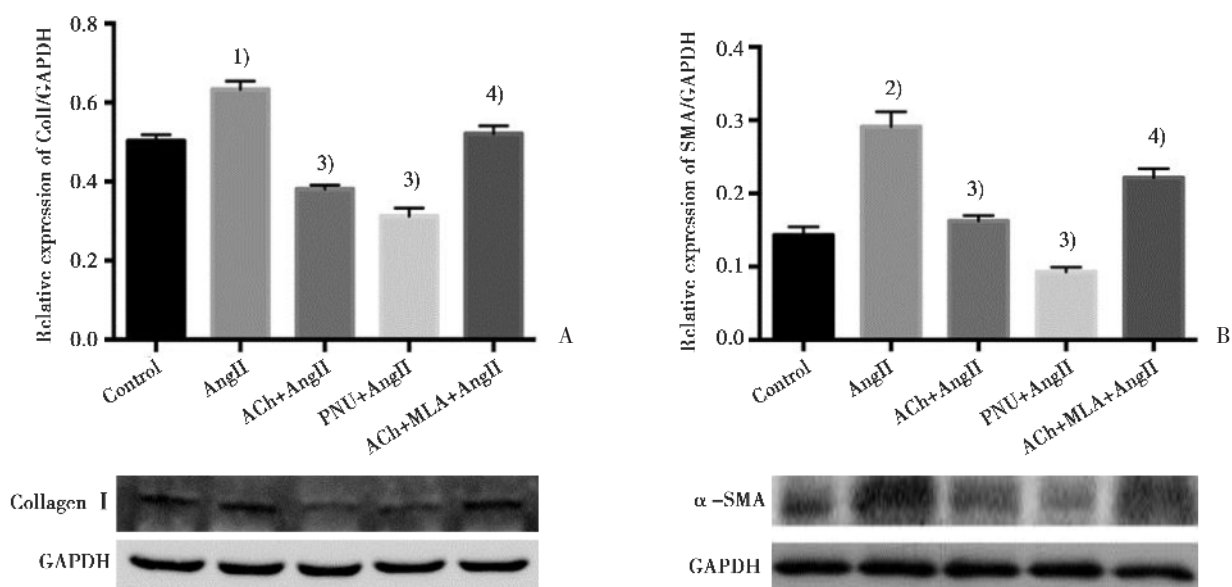
### 1.8 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计软件进行数据统计,所有数据采用均数  $\pm$  标准差表示。各组之间的差异采用方差分析。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、核中 p65 蛋白质水平表达

Western blot 结果显示,Ang II ( $10^{-7}\text{ mol/L}$ )刺激 CF 24 h 后,胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、核中 p65 的蛋白表达水平显著上调( $P < 0.01$ )。ACh 预处理组、 $\alpha 7nAChR$  激动剂组分别加入 ACh、PNU-282987 预处理 2 h 后,再加入 Ang II ( $10^{-7}\text{ mol/L}$ )干预 24 h,胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、细胞核中 p65 的蛋白表达水平显著下降( $P < 0.01$ )。而  $\alpha 7nAChR$  拮抗剂组,加

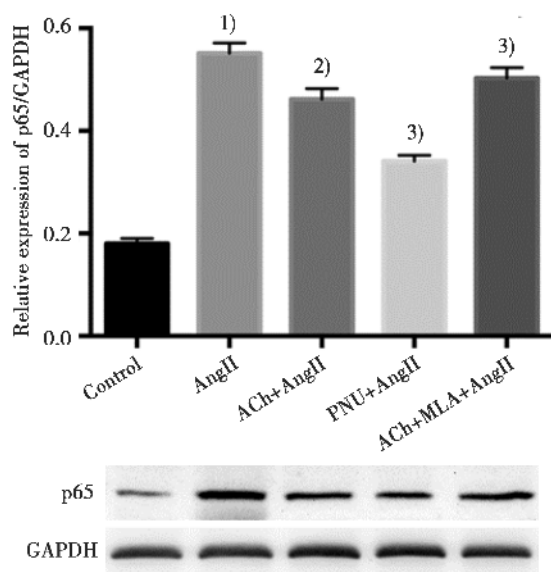


Western blot analysis for protein expression of (A)Collagen I, (B) $\alpha$ -SMA. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of GAPDH expression. Data are shown as means  $\pm$  SD. One-way ANOVA ( $F = 148.6, P < 0.001$  for Collagen I;  $F = 112.0, P < 0.001$  for  $\alpha$ -SMA). 1)  $P = 0.002$ , 2)  $P < 0.001$  compared with control. 3) all  $P < 0.001$  compared with Ang II group. 4) both  $P < 0.01$  compared with ACh + Ang II group.  $n = 15$ .

图 1  $\alpha 7nAChR$  激动剂对心肌成纤维细胞中胶原蛋白 I、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的影响

Fig.1 Effect of  $\alpha 7nAChR$  agonist (PNU-282987) on the expression of Collagen I,  $\alpha$ -SMA in CF

入 ACh+MLA 预处理 2 h 后,再加入 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h, 胶原蛋白 I、 $\alpha$ -SMA、核中 p65 的蛋白表达水平再次显著上调( $P < 0.01$ , 图 1、2)。



Western blot analysis for protein expression of p65. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of GAPDH expression. Data are shown as means  $\pm$  SD. One-way ANOVA ( $F = 226.9$ ,  $P < 0.001$ ). 1)  $P < 0.001$  compared with control. 2)  $P = 0.004$ , 4)  $P < 0.001$  compared with Ang II group. 3)  $P = 0.009$  compared with ACh + Ang II group.  $n = 15$ .

图 2  $\alpha$ 7nAChR 激动剂对心肌纤维细胞核中 p65 的影响  
Fig.2 Effect of  $\alpha$ 7nAChR agonist (PNU-282987) on the protein expression of p65 in the nucleus of CF

## 2.2 $\alpha$ 7nAChR 蛋白质、mRNA 水平表达

Western blot 结果显示, Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 刺激 CF 24 h 后,  $\alpha$ 7nAChR 的蛋白表达水平下调( $P < 0.01$ )。ACh 预处理组、 $\alpha$ 7nAChR 激动剂组分别加入 ACh、PNU-282987 预处理 2 h 后, 再加入 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h,  $\alpha$ 7nAChR 的蛋白表达水平显著下降( $P < 0.01$ )。而  $\alpha$ 7nAChR 拮抗剂组加入 ACh+MLA 预处理 2 h 后, 再加入 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h,  $\alpha$ 7nAChR 的蛋白表达水平再次显著上调 ( $P < 0.01$ )。Real-time PCR 检测  $\alpha$ 7nAChR 的 mRNA 水平表达结果与蛋白质表达结果相一致。(图 3)

## 2.3 CCK-8 试剂盒检测 CF 增殖能力

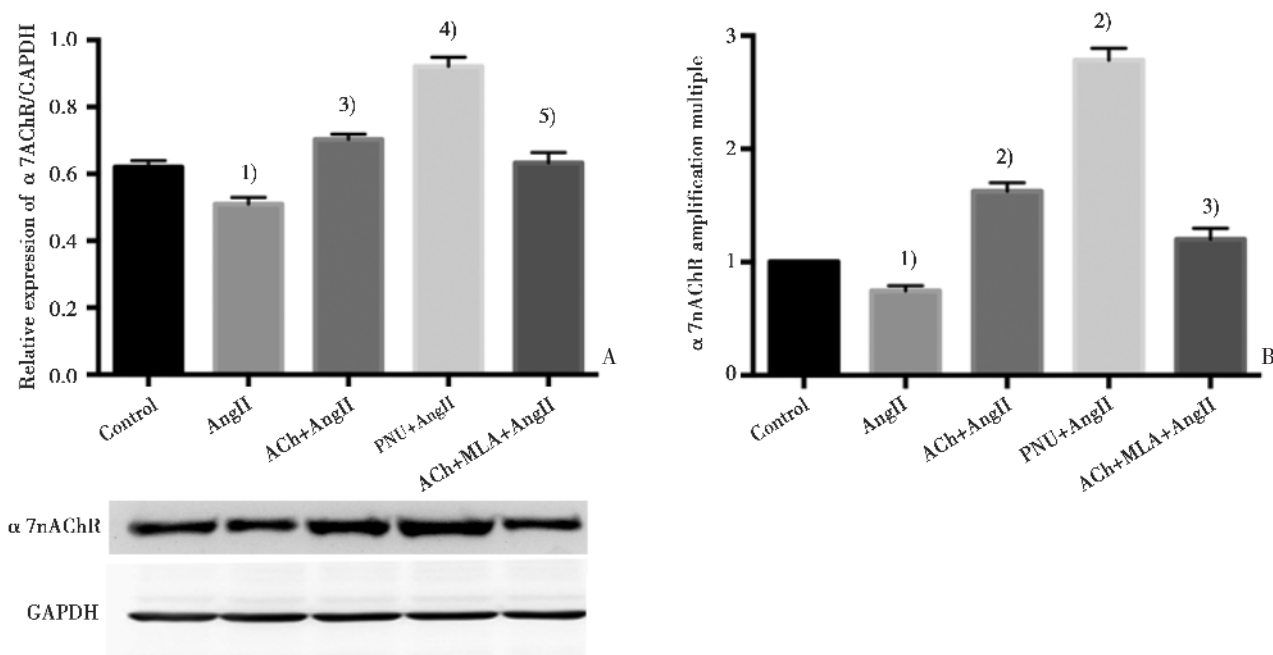
与 control 组相比, Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 可显著刺激 CF 的增殖活化 ( $1.74 \pm 0.11$ ,  $P < 0.001$ ); 而 ACh 预处理组、 $\alpha$ 7nAChR 激动剂组分别加入 ACh、

PNU-282987 预处理 2 h 后, 再加入 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h, 均可抑制 Ang II 诱导的增殖(分别为  $1.41 \pm 0.08$ ;  $1.35 \pm 0.12$ ; 均  $P < 0.01$ );  $\alpha$ 7nAChR 拮抗剂组加入 ACh+MLA 预处理 2 h 后, 再加入 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 干预 24 h, ACh 抑制增殖作用减弱 ( $1.60 \pm 0.09$ ,  $P = 0.006$ , 图 4)。

## 3 讨论

心室重塑的发展过程被认为是各种病因导致晚期心脏功能衰竭共同的发病机制。CF 增殖和胶原合成在心肌纤维化中起至关重要的作用, 是病理性心肌纤维化和心室重塑的关键性调节子。心肌梗死后心肌局部肾素血管紧张素系统的过度激活是促进心室重塑的启动因素。作为肾素血管紧张素系统核心分子的 Ang II 在心肌梗死后心室重塑过程中扮演着重要角色。正常情况下, 心肌胶原网络与心肌细胞形成有机的整体, 共同维持着心脏结构和功能的完整性。但当胶原含量由正常的 3%~5% 增至 20% 时, 心肌细胞被增生的胶原网包围和“封闭”, 心脏收缩功能发生障碍。因此, 心肌胶原蛋白含量的变化反映了心肌组织结构与成分的重塑。在心肌胶原中, I 型胶原蛋白占 80%~85%, 因此, I 型胶原蛋白的含量变化直接影响心室重塑的发展进程。

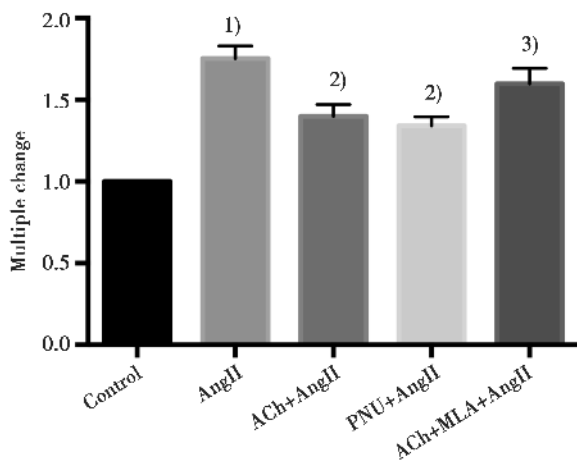
CAP 首先是由 Borovikova<sup>[6]</sup> 等人发现、命名并在 Nature 上发表文章, 他们通过人外周血巨噬细胞培养和动物模型的研究发现, 刺激外周迷走神经或用 ACh 刺激, 能抑制全身炎症反应综合征, 将其命名为“胆碱能抗炎通路”。Wang<sup>[7]</sup> 等人进一步研究发现, 对敲除  $\alpha 7$  亚基基因的小鼠进行外周迷走神经电刺激, 这种炎症抑制作用将不会发生,  $\alpha 7$ nAChR 是 CAP 通路上的关键受体。目前关于 CAP 与心室重塑的研究较少, 且未对其机制进行深入探讨。Li 等先结扎大鼠左冠状动脉 2 周制作心肌梗死后慢性心力衰竭模型, 然后植入一个微型可遥控的神经电刺激器刺激右侧迷走神经 6 周, 结果发现, 迷走神经慢性刺激可以显著改善血流动力学并延长 140 d 后生存期, 该研究未对其机制进行探讨, 作者推测这种保护作用基于对于泵衰竭及心室重塑的改善<sup>[8]</sup>。ACh 和  $\alpha 7$ nAChR 激动剂可用于激活 CAP 通路, 临床上已用于治疗阿尔茨海默病和溃疡性结肠炎等疾病<sup>[9]</sup>。然而, 其对心



A: Western blot analysis for protein expression of  $\alpha 7nAChR$ . Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of GAPDH expression. Data are shown as means  $\pm$  SD. One-way ANOVA ( $F = 129.2, P < 0.001$ ). 1)  $P = 0.004$  compared to control. 3)  $P = 0.001$ , 4)  $P < 0.001$  compared with Ang II group. 5)  $P = 0.009$  compared with ACh + Ang II group.  $n = 15$ . B: Real time PCR analysis for mRNA expression of  $\alpha 7nAChR$ . Bar graphs showing the expression level, presented as  $\alpha 7nAChR$  /GAPDH. Data are shown as means  $\pm$  SD. One-way ANOVA ( $F = 335.3, P < 0.001$ ). 1)  $P = 0.005$  compared with control. 2) both  $P < 0.001$  compared with Ang II group. 3)  $P = 0.003$  compared with ACh + Ang II group.  $n = 15$ .

图 3  $\alpha 7nAChR$  激动剂 (PNU-282987) 对 CF 中  $\alpha 7nAChR$  蛋白水平和 mRNA 水平表达的影响

Fig.3 Effects of  $\alpha 7nAChR$  agonist (PNU - 282987) on the protein and mRNA level expression of  $\alpha 7nAChR$  in CF



CCK 8 kit to detect proliferation ability of CF. Bar graphs showing the OD value, presented as OD value of each group/OD value of control. Data are shown as means  $\pm$  SD. One-way ANOVA ( $F = 53.85, P < 0.001$ ). 1)  $P < 0.001$  compared with control. 2) both  $P < 0.01$  compared with Ang II group. 3)  $P = 0.006$  compared with ACh + Ang II group.  $n = 15$ .

图 4  $\alpha 7nAChR$  激动剂 (PNU-282987) 对 CF 增殖能力的影响

Fig.4 Effects of  $\alpha 7nAChR$  agonist (PNU - 282987) on the proliferation ability of CF

室重塑保护作用是否通过  $\alpha 7nAChR$  介导及可能的机制如何,目前研究尚未清楚。

本研究观察到,经 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L)刺激 24 h 后,ACh 预处理组,在  $\alpha 7nAChR$  的蛋白和 mRNA 水平均显著上调的同时,明显抑制 CF 增殖、胶原蛋白 I 和纤维化因子  $\alpha$ -SMA 的表达。由于 ACh 是胆碱受体的非特异性激动剂,本实验进一步加入  $\alpha 7nAChR$  特异性受体激动剂 (PNU-282987) 预处理,结果发现, $\alpha 7nAChR$  的蛋白和 mRNA 水平均显著上调,同时,显著抑制 Ang II 诱导心肌成纤维细胞增殖、降低胶原蛋白 I 和纤维化因子  $\alpha$ -SMA 的表达。并且,当我们在 ACh 预处理的同时,加入  $\alpha 7nAChR$  特异性受体拮抗剂 (ACh+MLA) 预处理后,结果发现,Ach 抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖及胶原合成的作用明显减弱。从上述结果我们可以推论出,CAP 抑制 Ang II 诱导的心肌纤维化是通过  $\alpha 7nAChR$  介导的, $\alpha 7nAChR$  在抑制 Ang II 诱导的心肌纤维化中起着至关重要的作用。

核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 是一种能够控制许多基因表达的转录因子,在调节

免疫与炎症反应过程中的细胞的增殖与凋亡中扮演着重要的角色。在正常的心肌成纤维细胞中, NF- $\kappa$ B 与其特异性抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合, 可防止 NF- $\kappa$ B 活化, 主要存在与胞浆中, 不发挥转录活性。当 I $\kappa$ B 被磷酸化降解后, 释放 NF- $\kappa$ B, 使 NF- $\kappa$ B 可快速入核转变成转录活性, 所以细胞核中 p65 的可以反映 NF- $\kappa$ B 通路活化情况。NF- $\kappa$ B 信号通路的激活在心室重塑的发生发展中起关键性作用<sup>[10-11]</sup>。本研究发现, ACh、PNU-282987 预处理后能显著降低细胞核内 NF- $\kappa$ B 二聚体蛋白中 p65 的表达, 而 ACh+MLA 预处理组中, 核内 p65 表达水平再次显著升高, 提示 CAP 可能通过激活  $\alpha$ 7nAChR 抑制 NF- $\kappa$ B 的转位入核进而抑制心肌纤维化。

NF- $\kappa$ B 信号通路可能并非  $\alpha$ 7nAChR 激动剂抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维化的唯一通路。有研究发现, 体内基因转染 TGF- $\beta$ 1 可诱导心肌纤维化<sup>[12]</sup>; 在 TGF- $\beta$ 1 基因敲除小鼠不出现 Ang II 诱导的心肌肥厚反应<sup>[13]</sup>。另有研究发现, Ang II 可通过结合 AT1 受体, 通过酪氨酸激酶途径激活细胞外信号调节激酶(ERK), 从而导致心肌纤维化<sup>[14]</sup>。在 Ang II 诱导的心肌纤维化模型中,  $\alpha$ 7nAChR 与 ERK、TGF- $\beta$ 1 信号通路之间的关系有待进一步明确。

综上所述, CAP 抑制 Ang II 诱导的心肌纤维化通过  $\alpha$ 7nAChR 介导,  $\alpha$ 7nAChR 激动剂可抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞的增殖和胶原合成, 其机制可能与 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

#### 参考文献

- [1] HORN MA, GRAHAM HK, RICHARDS MA, et al. Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: collagen accumulation in the young and loss in the aged [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(1): 82-90.
- [2] JIA L, LI Y, XIAO C, et al. Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 221-231.
- [3] XIONG J, XUE FS, YUAN YJ, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(19): 2720-2726.
- [4] ZHAO M, HE X, BI XY, et al. Vagal stimulation triggers peripheral vascular protection through the cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(3): 345.
- [5] YU JG, SONG SW, SHU H, et al. Baroreflex deficiency hampers angiogenesis after myocardial infarction via acetylcholine- $\alpha$ 7-nicotinic ACh receptor in rats [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(30): 2412-2420.
- [6] BOROVIKOVA LV, IVANOVA S, ZHANG M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. *Nature*, 2000, 405(6785): 458-462.
- [7] WANG H, YU M, OCHANI M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$ 7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 384-388.
- [8] LI M, ZHENG C, SATO T, et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats [J]. *Circulation*, 2004, 109(1): 120-124.
- [9] VAN ASSCHE G, RUTGEERTS P. Anti-TNF agents in Crohn's disease [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(1): 103-111.
- [10] GU Y, WANG X, WANG X, et al. Artemisinin attenuates post-infarct myocardial remodeling by down-regulating the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 227(3): 161-170.
- [11] GONZALEZ A, RAVASSA S, BEAUMONT J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(18): 1833-1843.
- [12] LIJNEN PJ, PETROV VV, FAGARD RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor- $\beta$ 1 [J]. *Mol Genet Metab*, 2000, 71(1-2): 418-435.
- [13] SCHLUTER KD, WENZEL S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 119(3): 311-325.
- [14] MIURA M, HATA Y, HIRAYAMA K, et al. Critical role of the Rho-kinase pathway in TGF- $\beta$ 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(5): 849-859.

(编辑 孙慧兰)