

·基础研究·

## 钙蛋白酶对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞增殖及纤维化模型的影响

马 越, 余 洋, 贾岩岩, 陈少锐, 叶建涛, 马韵子, 李卓明, 刘培庆\*  
(中山大学药学院, 广东 广州, 510006)

**摘 要:** 【目的】研究钙蛋白酶在血管紧张素 II(Ang II)诱导的心肌纤维化中的作用及作用机制。【方法】原代培养 SD 大鼠心肌成纤维细胞(CF), 取传代 2-4 代细胞, 预先给予不同浓度 calpain 抑制剂 PD150616, 观察对 Ang II 诱导致纤维化模型的影响。实验分为空白对照组(control)、模型组(Ang II)、低浓度给药组(Ang II+ PD150616\_5  $\mu\text{mol/L}$ )、高浓度给药组(Ang II+ PD150616\_10  $\mu\text{mol/L}$ )。Edu 检测 CF 增殖, Western blot 检测纤维化因子纤连蛋白(FN)、结缔组织生长因子(CTGF)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)蛋白表达, 同时检测 calpain 激活的下游产物 Cleaved  $\alpha$ -Fodrin 以及胞浆中 p-I $\kappa$ B 与细胞核内 P65、NFAT4 的蛋白水平变化。【结果】PD150616 显著抑制由 Ang II 诱导的 CF 增殖及 FN、CTGF、 $\alpha$ -SMA 等纤维化因子表达上调。Ang II 显著提高 Cleaved  $\alpha$ -Fodrin 的表达, PD150616 可阻断 Ang II 的作用, 提示 calpain 受 Ang II 激活, 是 Ang II 作用的下游因子。PD150616 可抑制 Ang II 引起的胞内 I $\kappa$ B 磷酸化和胞核中 p65、NFAT4 的表达上调, 提示 calpain 的作用与 NF- $\kappa$ B、NFAT4 转位入核的信号通路相关。【结论】calpain 在 Ang II 刺激诱导心肌纤维化过程中发挥重要作用, 其机制可能与 NF- $\kappa$ B 和 NFAT 信号通路的激活有关。

**关键词:** 钙蛋白酶; 心肌纤维化; 血管紧张素 II

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)04-0491-07

## Effect of Calpain on Angiotensin II-induced Proliferation and Fibrosis in Cardiac Fibroblasts

MA Yue, YU Yang, JIA Yan-yan, CHEN Shao-ru, YE Jian-tao, MA Yun-zi, LI Zhuo-ming, LIU Pei-qing\*  
(School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effect of calpain on angiotensin II (Ang II)-induced myocardial fibrosis and the possible mechanisms. 【Methods】Cardiac fibroblasts (CF) were primary cultured from hearts of Sprague-Dawley rats. Ang II was treated to induce myocardial fibrosis and the effect of the pharmacological calpain inhibitor PD150616 was studied. Edu assay was used to test the proliferation of CF. Protein expression of fibronectin (FN), connective tissue growth factor (CTGF),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Cleaved  $\alpha$ -Fodrin which indicates the activation of calpain, the cytoplasmic p-I $\kappa$ B, as well as the nuclear p65 and NFAT4, were measured by Western blot analysis. 【Results】PD150616 significantly inhibited Ang II-induced CF proliferation and up-regulation of FN, CTGF and  $\alpha$ -SMA, suggesting that calpain plays a role in myocardial fibrosis. The expression of cleaved  $\alpha$ -Fodrin was remarkably increased by Ang II, which was reversed by PD150616, suggesting that calpain was downstreamly activated by Ang II. PD150616 inhibited Ang II-induced cytoplasmic I $\kappa$ B phosphorylation and up-regulation of nuclear p65 and NFAT4, indicating that the effect of calpain on myocardial fibrosis is probably through the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and NFAT4. 【Conclusion】Calpain, when activated by Ang II, can induce myocardial fibrosis, probably through the activation of NF- $\kappa$ B and NFAT signaling pathways.

**Key words:** calpain; myocardial fibrosis; angiotensin II

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4):491-497]

收稿日期: 2013-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(81000072, 81072641)

作者简介: 马越, 硕士研究生, E-mail: xiexiellen@sina.com; \* 通信作者: 刘培庆, 教授, 研究方向: 心血管药理学, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

心肌纤维化是心脏组织异常重构(cardiac remodeling, CR)的主要病理改变之一,主要表现为心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CF)异常增殖、心肌间质胶原过度沉积及各型胶原比例失调<sup>[1]</sup>。其中,CF 在心肌纤维化进程中起着至关重要的作用,是主要的功能细胞。CF 一方面参与胶原、纤连蛋白(fibronectin, FN)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成和分泌<sup>[1]</sup>。另一方面,CF 通过转化生长因子 TGF- $\beta$  等细胞因子的合成及 NF- $\kappa$ B、活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)等信号通路的激活,促进 CF 的增殖和胶原的合成<sup>[1-2]</sup>。在影响心肌纤维化的众多神经内分泌激素及细胞因子中,血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 通过 AT1 受体诱导 CF 的增殖和 ECM 的沉积,是重要的促纤维化因子<sup>[1,3]</sup>。钙蛋白酶(calpain)是细胞内  $Ca^{2+}$  依赖性半胱氨酸蛋白酶,其活性受  $Ca^{2+}$  的浓度影响,具有水解肌原纤维蛋白的活性。Calpain 一般以酶原形态存在于细胞质中,由 80 ku 的催化亚基和 28 ku 的调节亚基构成。当被  $Ca^{2+}$  激活时,calpain 发生自溶迅速降解为 76 ku 和 18 ku 的亚基,导致构象变化而表现蛋白水解酶的活性。活化后的 calpain 可水解细胞骨架蛋白、蛋白激酶和磷酸酶以及激素受体,对于细胞的增殖、迁移、凋亡等活动产生重要的影响<sup>[4-6]</sup>。近年国内外研究发现,calpain 的激活在充血性心衰、心肌梗死等多种心脏疾病的病理过程中起关键作用<sup>[6-7]</sup>。Calpain 与心血管重构密切相关。在充血性心衰病人的心脏组织中,心室重构与 Ang II 浓度升高、Ang II 受体表达上调密切相关,与之伴随的是 calpain 的表达上调,提示 calpain 在 Ang II 介导的心肌重构中起关键作用<sup>[6]</sup>。Calpain 是 Ang II 诱导的心血管重构的下游调控因子。当 Ang II 与 AT1 受体结合后,促进表皮生长因子受体 EGFR 的反式激活,刺激细胞分裂素活化蛋白激酶,从而激活 calpain<sup>[8]</sup>。在 Ang II 的刺激下,calpain 可刺激丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶的激活,使心肌细胞中的 NFAT 核转位,从而导致心肌肥大<sup>[8]</sup>。Calpain 还可通过激活 NF- $\kappa$ B 引起血管炎症反应<sup>[8]</sup>。抑制 calpain 的活性,对心脏有一定的保护作用。对小鼠过表达 calpastatin 后,在 Ang II 诱导的血管重构中,大动脉和肾动脉的改变都得到了-定的控制,胶原沉积的减少,显著地改善由 Ang II 诱导的左心室肥大和血管重构<sup>[8]</sup>。基于上述研究

结果,我们推测 calpain 也可能通过影响心肌成纤维细胞介导心肌纤维化参与心脏重构进程。因此,本研究旨在探讨 calpain 在心肌纤维化中的作用,特别是对 Ang II 诱导的 CF 增殖和纤维化因子表达的影响以及可能的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

SD 大鼠,雄性,体质量约 150 g,清洁级,中山大学实验动物中心提供。动物心脏的解剖操作依照实验动物管理规定进行。

### 1.2 主要试剂

BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blot 印迹发光试剂盒购自于 Pierce 公司;PD150616、FN、NFATC4 抗体购自于 Santa Cruz 公司,cTGF- $\alpha$ -SMA 抗体购自于 Abcam 公司,Cleaved  $\alpha$ -Fodrin、p-I $\kappa$ B、P65 抗体购自于 Cell Signaling Technology 公司;Edu 细胞增殖检测试剂盒购自于广州市锐博生物科技有限公司。

### 1.3 大鼠原代 CF 的分离、培养及分组给药

在无菌条件下开胸取 SD 大鼠心脏,浸于无血清 DMEM 培养基中,洗去血污,去除心房组织与大血管。收集心室组织,减碎,转移至 15 mL 离心管中,离心弃去培养基。加入 4 mL 1g/L II 型胶原酶,转移至锥形瓶中,在 37 °C 恒温槽中轻轻振荡,消化 45 min。吸取细胞悬浮液,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,1000 r/min( $r=16$  cm)离心 5 min,弃去上清液,再加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打。锥形瓶中剩余的心室组织加入 4 mL 2.5 g/L 胰酶继续消化,于 37 °C 恒温槽中振荡 4 min,所得细胞悬浮液按前法处理。如是重复 3 次。最后剩余的心室组织加入 3 mL 1g/L II 型胶原酶继续消化,所得细胞悬浮液按前法处理。重复 1 次。将各次所得的细胞悬浮液合并,1000 r/min 离心 7 min,弃去上清,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打成细胞悬液接种于培养瓶中。置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的孵育箱中孵育 60 min,差速贴壁法弃去心肌细胞,弃去原培养基,重新加入含 100 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,将其接种于 96 孔板或

小皿中。孵育 18 h 待细胞贴壁后,弃去原培养基,加入无血清 DMEM 培养基再孵育 12 h 后,将细胞分为空白对照组(control)、模型组(Ang II)、低浓度给药组(Ang II + PD150616\_5  $\mu\text{mol/L}$ )、高浓度给药组(Ang II + PD150616\_10  $\mu\text{mol/L}$ )。PD150616 是  $\mu$ -calpain 和 m-calpain 的细胞渗透性、非竞争性、选择性、非肽类钙蛋白酶抑制剂,主要针对钙蛋白酶的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点作用,可特异性抑制两种 calpain。根据文献[9]及预实验结果确立 PD150616 给药浓度,低浓度和高浓度给药组分别给予 calpain 抑制剂 PD150616 5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 。孵育 60 min 后,连同模型组,以 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 诱导 CF 增殖,每隔 12 h 补加一次 Ang II,孵育 24 h。

#### 1.4 Edu 细胞增殖检测

EdU (5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,在细胞增殖时插入正在复制的 DNA 分子中,基于 EdU 与染料的共轭反应可进行细胞增殖检测分析。取对数生长期 CF,以每孔细胞数  $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,按上述给药方法处理。药物处理后进行 Edu 标记孵育 2 h。细胞固化 30 min 后进行 Apollo 染色和 DNA 染色。在荧光显微镜下检测。

#### 1.5 Western blot 检测蛋白的表达

将各组药物处理后的细胞,弃培养液,用预冷 PBS 洗细胞 3 次,加入 RIPA 裂解液裂解,收集裂解液,12 000 r/min ( $r=13.5$  cm) 离心 25 min 后取上清得总蛋白。

细胞经冷冻 PBS 洗涤后,悬浮在 400  $\mu\text{L}$  缓冲液 (含 pH 7.9 HEPES 液 10 mmol/L、 $\text{MgCl}_2$  1.5 mmol/L、KCl 10 mmol/L、DTT 1 mmol/L、PMSF 100 mmol/L) 中,混匀后冰置 10 min,剧烈涡旋 15 s,12 500 r/min ( $r=13.5$  cm) 离心 10 s 吸弃上清,加入 50  $\mu\text{L}$  缓冲液 (含 pH 7.9 HEPES 液 20 mmol/L、 $\text{MgCl}_2$  1.5 mmol/L、NaCl 420 mmol/L、EDTA 0.2 mmol/L、Glycerol 250 mL/L、DTT 1 mmol/L、PMSF 100 mmol/L) 中,冰置 30 min,12 000 r/min ( $r=13.5$  cm) 离心 5 min,取上清得核蛋白。

BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白 20  $\mu\text{g}$  进行 11% SDS-PAGE 电泳 (70 V, 30 min  $\rightarrow$  120 V, 75 min), 电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上 (230 mA, 90 min), 以 50 mL/L 牛奶封闭 1 h。一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,以 ECL 显影、曝光。

按照以上步骤检测 FN、cTGF、 $\alpha$ -SMA、Cleaved

$\alpha$ -Fodrin、p-I $\kappa$ B 在总蛋白中的表达,以及 p65、NFAT4 在核中的表达。利用 Image J 图像分析软件检测蛋白条带的灰度值,以目的条带与 tubulin、 $\beta$ -actin 或 histone-H 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

#### 1.6 统计学处理

使用 Graphpad prism 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 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Calpain 对 Ang II 诱导的 CF 增殖的影响

在荧光显微镜下,经 EdU 标记的 CF 呈梭形,显红色荧光。 $10^{-7}$  mol/L Ang II 刺激 24 h 后,CF 增殖数目显著增加 ( $P < 0.01$ )。经浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  或 10  $\mu\text{mol/L}$  的 calpain 抑制剂 PD150616 预处理后,Ang II 诱导的 CF 增殖受到显著抑制 ( $P < 0.01$ )。PD150616 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 单独给药不影响心肌成纤维细胞的增殖 ( $P > 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 Calpain 对 Ang II 作用的 CF 纤维化相关因子表达的影响

纤连蛋白 (fibronectin, FN)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 是重要的纤维化因子,其过度表达与心肌纤维化的发生发展密切相关。Western blot 结果显示,以  $10^{-7}$  mol/L Ang II 对 CF 刺激 24 h 后, FN、CTGF、 $\alpha$ -SMA 的蛋白表达水平显著上调 ( $P < 0.01$ )。分别加入不同浓度 calpain 抑制剂 PD150616 (5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 1 h 后,再加入 Ang II 刺激 24 h, FN、CTGF、 $\alpha$ -SMA 的蛋白表达量有显著下降 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性 (图 2)。

### 2.3 Ang II 对 calpain 的激活

当 calpain 被激活,可将骨架蛋白  $\alpha$ -Fodrin (240 ku) 水解为 150 ku 和 145 ku 两单位的碎片<sup>[10]</sup>。因此,通过检测  $\alpha$ -Fodrin 降解碎片的表达,可用于反映 calpain 的激活情况。从图 3 可见,Ang II 作用 24 h 后, $\alpha$ -Fodrin 降解蛋白的表达显著提高 ( $P < 0.05$ ), 而预处理 calpain 抑制剂 PD150616 的 CF 中, $\alpha$ -Fodrin 降解显著减少 ( $P < 0.05$ ), 且 10  $\mu\text{mol/L}$  PD150616 对  $\alpha$ -Fodrin 降解的抑制作用明显强于

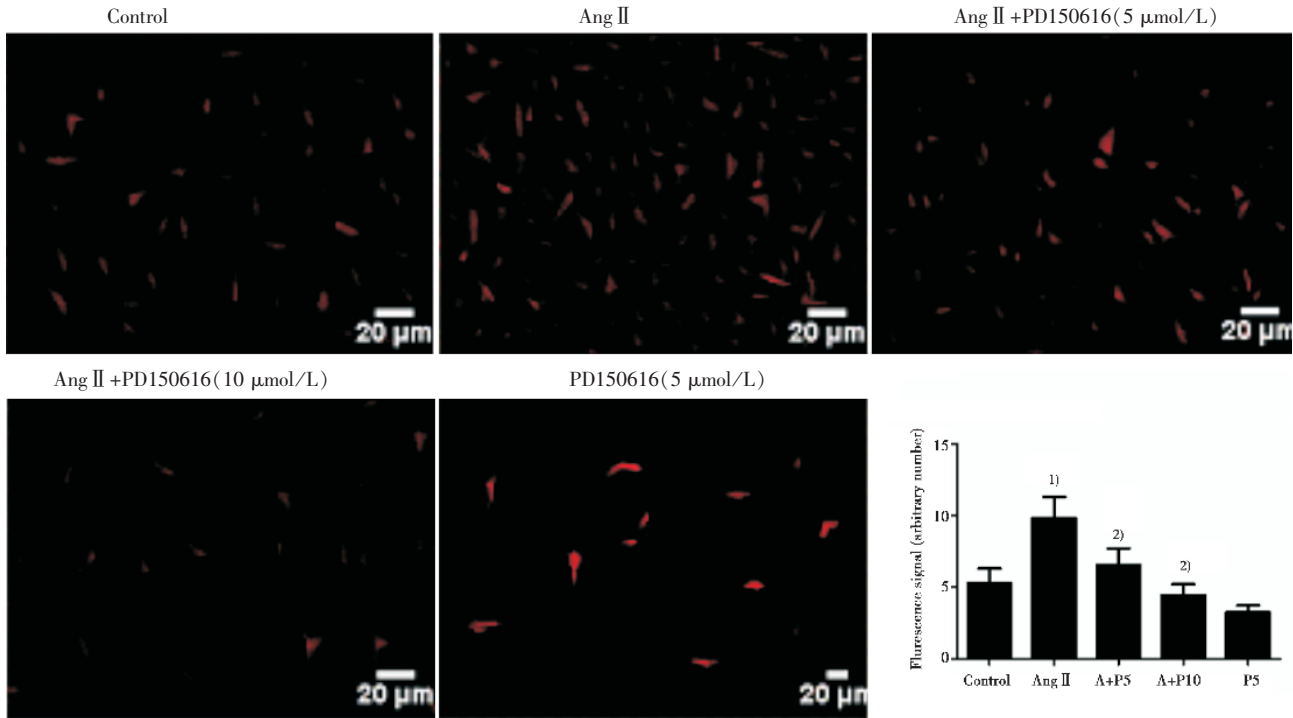


图 1 钙蛋白酶抑制剂 PD150616 对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of calpain inhibitor PD150616 on the Angiotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts

Images showed cardiac fibroblasts proliferation indicated by Edu fluorescence staining. Bar graph showed Edu fluorescence intensity. A+P5; Ang II +PD150616(5 μmol/L);A+P10; Ang II +PD150616(10 μmol/L);P5;PD150616(5 μmol/L). Data are shown as means ± S.E.M. 1)*P* < 0.01 compared to control. 2)*P* < 0.01 compared to Ang II group. *n* = 8.

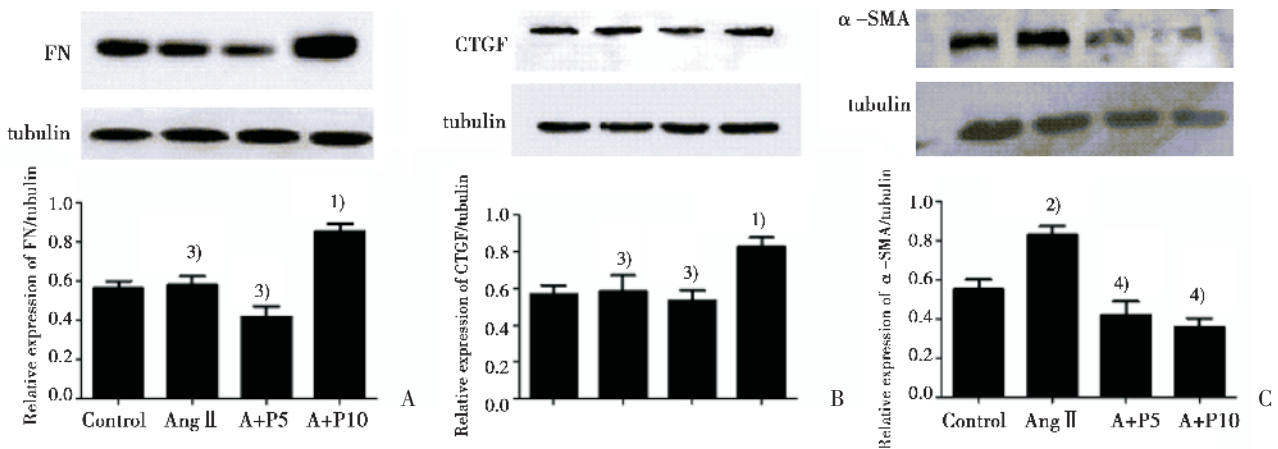


图 2 钙蛋白酶抑制剂 PD150616 对心肌成纤维细胞中纤连蛋白(FN)、结缔组织生长因子(CTGF)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达的影响

Fig.2 Effects of calpain inhibitor PD150616 on the expression of fibronectin (FN), connective tissue growth factor (CTGF) and α-smooth muscle actin (α-SMA) in Angiotensin II-stimulated cardiac fibroblasts

Western blot analysis for protein expression of (A) FN, (B) CTGF, and (C) α-SMA. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of tubulin expression. A+P5; Ang II +PD150616(5 μmol/L);P+P10; Ang II +PD150616(10 μmol/L). Data are shown as means ± S.E.M. 1)*P* < 0.01, 2)*P* < 0.001 compared to control. 3)*P* < 0.01, 4)*P* < 0.001 compared to Ang II group. *n* = 8.

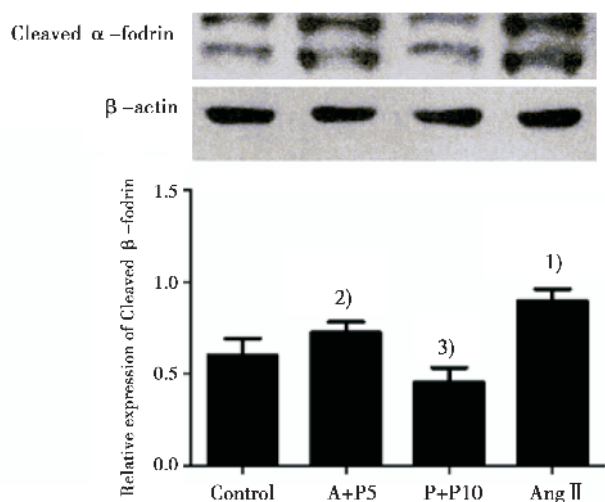


图3 血管紧张素 II 与钙蛋白酶抑制剂 PD150616 对心肌成纤维细胞中 Cleaved  $\alpha$ -Fodrin 表达的影响

Fig.3 Effects of Angiotensin II and calpain inhibitor PD150616 on the expression of cleaved  $\alpha$ -Fodrin in cardiac fibroblasts

Western blot analysis for protein expression of cleaved  $\alpha$ -Fodrin. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of  $\beta$ -actin expression. A+P5; Ang II +PD150616 (5  $\mu$ mol/L); P+P10; Ang II +PD150616 (10  $\mu$ mol/L). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. 1)  $P < 0.05$  compared to control. 2)  $P < 0.05$ , 3)  $P < 0.01$  compared to Ang II group.  $n = 8$ .

5  $\mu$ mol/L。结果提示 Ang II 可诱导 calpain 的激活, PD150616 可抑制 Ang II 对 calpain 的激活。

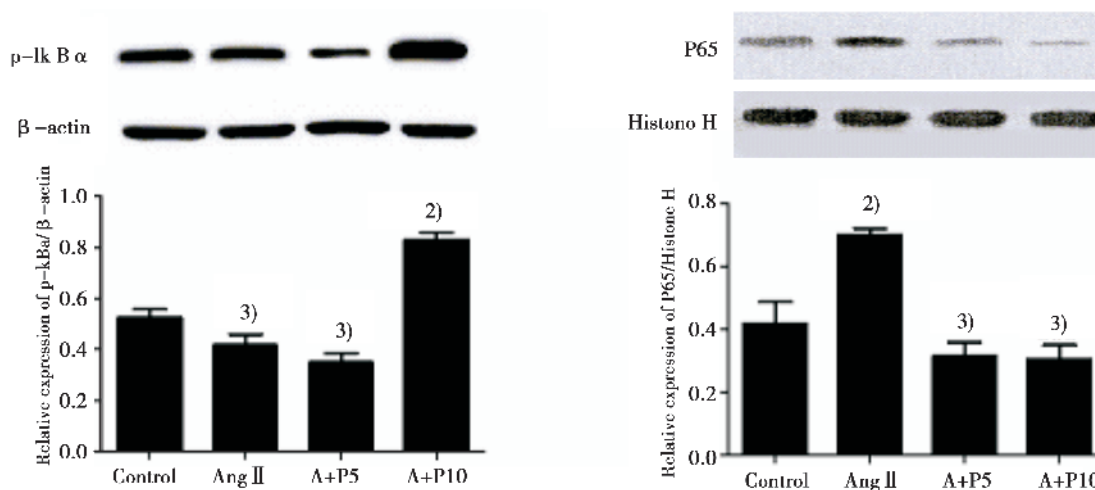


图4 钙蛋白酶抑制剂 PD150616 对心肌成纤维细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

Fig.4 Effects of calpain inhibitor PD150616 on NF- $\kappa$ B signaling pathway in cardiac fibroblasts

Western blot analysis for protein expression of cytoplasmic p-I $\kappa$ B $\alpha$  and nuclear p65. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of p-I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$ -actin and p65/Histone H. A+P5; Ang II +PD150616 (5  $\mu$ mol/L); A+P10; Ang II +PD150616 (10  $\mu$ mol/L). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. 1)  $P < 0.01$ , 2)  $P < 0.001$  compared to control. 3)  $P < 0.001$  compared to Ang II group.  $n = 8$ .

## 2.4 Calpain 对 CF 中 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

核因子 NF- $\kappa$ B 是与纤维化相关的重要通路之一。当 NF- $\kappa$ B 通路被激活,胞浆中 NF- $\kappa$ B 的抑制因子 I $\kappa$ B 发生磷酸化并降解,从而使 NF- $\kappa$ B 由 p65 和 p50 组成的二聚体蛋白转位到细胞核中,从而发挥调控目的基因转录的作用。通过研究 calpain 抑制剂对 I $\kappa$ B 的磷酸化水平和核中 p65 表达水平的影响,可探讨 calpain 对 Ang II 诱导的 CF 增殖中 NF- $\kappa$ B 通路的作用。经 10<sup>-7</sup> mol/L Ang II 刺激 24 h 后,CF 胞浆中 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平及胞核中 p65 的蛋白表达量与 control 组相比有显著提高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。PD150616 可显著抑制由 Ang II 引起的 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化和 p65 表达上调,且呈剂量依赖 ( $P < 0.01$ , 图 4)。

## 2.5 Calpain 对 CF 中 NFAT 信号通路的影响

NFAT 信号通路与 Ang II 诱导的心肌纤维化密切相关。通过检测细胞核中 NFAT4 的表达,探讨 calpain 是否作用于该信号通路,以及该作用是否影响 CF 增殖。NFAT4 蛋白表达水平受 Ang II 刺激显著上调 ( $P < 0.05$ ),calpain 抑制剂 PD150616 可显著抑制 NFAT4 蛋白表达 ( $P < 0.05$ , 图 5)。

## 3 讨论

Calpain 可能是 Ang II 介导心脏重构的重要信号分子,既往主要在心肌细胞或心脏组织上研究

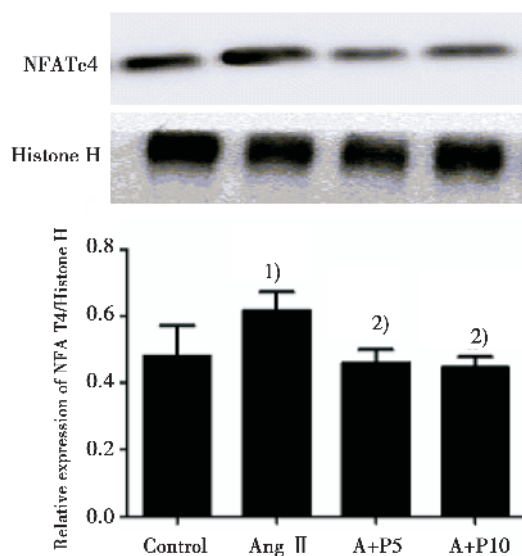


图 5 钙蛋白酶抑制剂 PD150616 对心肌成纤维细胞中 NFAT 信号通路的影响

Fig.5 Effects of calpain inhibitor PD150616 on nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling pathway in cardiac fibroblasts

Western blot analysis for protein expression of nuclear NFAT4. Bar graphs showing the expression level, presented as percentage of Histone H expression; A+P5: Ang II +PD150616 (5  $\mu\text{mol/L}$ ); A+P10: Ang II +PD150616 (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. 1)  $P < 0.05$  compared to control. 2)  $P < 0.05$  compared to Ang II group.  $n = 8$ .

Calpain介导心脏重构的作用<sup>[1]</sup>。心脏重构是心血管疾病常见的一种病理生理状态,是指心脏结构的重整,包括心脏生物学及几何学的改变。心脏重构主要包括心肌细胞肥大、非肌性细胞增生及心肌纤维化(心肌基质重构)等改变,间质、心肌成纤维细胞、胶原和冠脉血管都参与这一过程,而心肌间质纤维化是心脏重构的主要形式之一,因此我们推测 calpain 可能直接作用于 CF 促进心肌纤维化进程从而介导心脏重构。为了探讨 calpain 的作用及其作用机制,我们采用 Ang II 诱导 CF 增殖与纤维化因子表达,在此模型上研究 calpain 抑制剂 PD150616 对 Ang II 诱导的心肌纤维化的影响。

经  $10^{-7}$  mol/L Ang II 刺激 24 h 后,CF 细胞增殖明显提高,纤维化因子 FN、CTGF、 $\alpha$ -SMA 的表达显著上调,表明心肌纤维化细胞模型建立成功。Calpain 抑制剂 PD150616 能显著抑制由 Ang II 诱导的 CF 增殖,并降低 FN、cTGF、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达,且呈一定的剂量依赖性,提示 calpain 可能为

Ang II 诱导的心肌纤维化中的关键环节,抑制 calpain 的作用可改善心肌纤维化。

以往研究提示 calpain 为 Ang II 诱导的心血管重构的下游调控因子<sup>[10]</sup>。本研究通过检测 calpain 作用的下游骨架蛋白  $\alpha$ -Fodrin 的降解程度,用于反映 calpain 的激活情况。结果表明,calpain 受 Ang II 激活,PD150616 能显著抑制 Ang II 对 calpain 的激活作用。该结果与以往研究结果相一致,确认 calpain 为 Ang II 作用的下游因子。Ang II 对 calpain 的作用可能与 AT1 受体激活引起效应蛋白 PLC 活化,继而催化 PIP2 生成 IP3,引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加,从而激活 calpain 等分子机制相关<sup>[3]</sup>。同时,上述结果进一步提示,在心肌纤维化进程中,calpain 受 Ang II 激活而介导 CF 增殖及纤维化因子表达;抑制 calpain 的活性可阻断由 Ang II 诱导的心肌纤维化。

Calpain 在 Ang II 诱导的心肌纤维化中的作用与 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活相关。Calpain 抑制剂 PD150616 能明显抑制胞浆中 NF- $\kappa$ B 的抑制因子 I $\kappa$ B 磷酸化,并能降低核内 NF- $\kappa$ B 二聚体蛋白中 p65 的表达,提示 calpain 可能通过诱导 NF- $\kappa$ B 的转位入核促进心肌纤维化。NF- $\kappa$ B 是一种能够控制许多基因表达的转录因子,主要参与免疫与炎症反应过程中的细胞功能调控如细胞的增殖与凋亡。NF- $\kappa$ B 信号通路的激活在心肌肥大、心脏重构的发生发展中起关键作用<sup>[11]</sup>,也是 Ang II 诱导的心血管纤维化的重要通路<sup>[12]</sup>。Calpain 可通过作用于 I $\kappa$ B $\alpha$  上的 PEST 多肽序列参与 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[13-14]</sup>。过表达 calpain 抑制蛋白 calpastatin 小鼠的心脏中,NF- $\kappa$ B 的转位入核明显降低,表明 calpain 与 NF- $\kappa$ B 通路的激活密切相关。本研究结果与上述报道相一致,证明了 calpain 对 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活是心肌纤维化过程中 CF 增殖和纤维化因子表达的重要机制。

除 NF- $\kappa$ B 以外,calpain 的作用亦与 NFAT 信号通路的激活相关。NFAT 是一类与众多信号途径相联系具有广泛生理功能的转录因子。静息细胞中,NFAT 位于胞浆中;当细胞被激活,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加,钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 受激活,引起 NFAT 发生核转位。CaN/NFAT 信号通路的激活与心肌肥大、心肌纤维化等多种心脏病的发生发展密切相关<sup>[14]</sup>。在 CF 中,Ang II 可通过  $\text{Ca}^{2+}$  依赖途径和氧化应激依赖途径诱导 NFATC4

的激活<sup>[15]</sup>。本研究发现,calpain 抑制剂 PD150616 可显著抑制由 Ang II 诱导的核内 NFATC4 表达上调,表明 calpain 可通过激活 NFAT 参与 Ang II 诱导的心肌纤维化。

综上所述,本研究表明 calpain 在 Ang II 诱导的心肌纤维化中起关键作用,Ang II 通过激活 calpain 诱导 CF 增殖和纤维化因子表达,其作用机制与 NF- $\kappa$ B、NFAT 信号通路的激活相关。抑制 calpain 可抑制 NF- $\kappa$ B、NFAT 的转位入核,从而抑制 CF 增殖及 FN、CTGF、 $\alpha$ -SMA 表达上调。本研究提示 calpain 可能作为防治心肌纤维化的潜在靶点。

#### 参考文献:

- [1] Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(4): 537-543.
- [2] Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors[J]. *Circ Res*, 1991, 69(2): 483-490.
- [3] Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system[J]. *Am J Physiology-Cell Physi*, 2007, 292(1): C82-C97.
- [4] Goll DE, Thompson VF, Li HQ, et al. The calpain system[J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83(3): 731-801.
- [5] Zatz M, Starling A. Mechanisms of disease: Calpains and disease[J]. *New Eng J Med*, 2005, 352(23): 2413-2423.
- [6] Yang D, Ma S, Tan Y, et al. Increased expression of calpain and elevated activity of calcineurin in the myocardium of patients with congestive heart failure[J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(1): 159-164.
- [7] 杨永健,周兴文,张鑫,等. 血管紧张素转换酶抑制剂对梗死心肌组织钙蛋白酶的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 868-871.
- [8] Yang Yong-jian, Zhou Xing-wen, Zhang Xin, et al. Effect of ACE inhibitor on calpain system in infarcted myocardium in rats[J]. *Chin J Pathophysiology*, 2005, 21(5): 868-871.
- [9] Letavernier E, Perez J, Bellocq A, et al. Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II -induced hypertension[J]. *Circ Res*, 2008, 102(6): 720-728.
- [10] 徐雯,姚克,王凯军,等. 钙蛋白酶抑制剂 PD150606 对鼠氧化性白内障的预防作用[J]. *中华眼科杂志*, 2003, 39(7): 401-404.
- [11] XU Wen, YAO Ke, WANG Kai-jun, et al. Prevention of oxidative cataract by PD150606 -an inhibitor of calpains[J]. *Chin J Op Ht Hal Mol*, 2003, 39(7): 401-404.
- [12] Tsuji T, Ohga Y, Yoshikawa Y, et al. Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca<sup>2+</sup> overload; possible link to the proteolysis of alpha-fodrin[J]. *Am J Physiology-Heart and Circul Phys*, 2001, 281(3): H1286-H1294.
- [13] Li Y, Ha T, Gao X, et al. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(4): H1712-H1720.
- [14] Xu S, Zhi H, Hou X, et al. IkappaBbeta attenuates angiotensin II-induced cardiovascular inflammation and fibrosis in mice[J]. *Hypertension*, 2011, 58(2): 310-316.
- [15] Shumway SD, Maki M, Miyamoto S. The PEST domain of I kappa B alpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain[J]. *J Bio Chem*, 1999, 274(43): 30874-30881.
- [16] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2004, 94(1): 110-118.
- [17] Fujii T, Onohara N, Maruyama Y, et al. G alpha(12/13)-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor -induced NFAT activation in cardiac fibroblasts [J]. *J Bio Chemistry*, 2005, 280(24): 23041-23047.

(编辑 孙慧兰)