

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.002

文章编号: 1005-8982(2017)15-0005-06

## 整合素 $\beta_1$ -黏附斑激酶在心肌纤维化中的作用及机制\*

林传钦<sup>1</sup>, 翟秀丽<sup>2</sup>, 邓托<sup>1</sup>

(1.海南省农垦三亚医院 急诊科,海南 三亚 572000;2.海南省三亚市三林医院 防治科,海南 三亚 572025)

**摘要:目的** 初步探讨整合素  $\beta_1$ -黏附斑激酶(integrin  $\beta_1$ -FAK)在心肌细胞纤维化中的作用与机制。**方法** 将培养的心肌细胞随机分为对照组、血清脂多糖(LPS)处理组、integrin  $\beta_1$  抑制组、黏附斑激酶(FAK)抑制组及 integrin  $\beta_1$  阻断 +FAK 抑制组。免疫荧光双标法检测原代心肌细胞纯度,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)与实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、I 型胶原(Col1A1)、III 型胶原(Col3A1)和整合素  $\beta_1$ (integrin  $\beta_1$ )mRNA 水平的变化,Western blot 检测 FAK 的表达。**结果** ①与对照组比较,LPS 能够刺激心肌细胞上调 MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Col1A1、Col3A1 及 integrin  $\beta_1$  表达;②与 LPS 组比较,integrin  $\beta_1$  阻断可以抑制 LPS 诱导的 TGF- $\beta_1$ 、MMP-9、Col1A1 及 Col3A1 信使核糖核酸(mRNA)的上调( $P < 0.05$ ),并阻断 LPS 诱导的磷酸化 FAK 的激活( $P < 0.05$ );③FAK 蛋白抑制剂 PF-573228 可抑制 LPS 诱导的 TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 mRNA 上调水平,同时加入 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体显示相似的效果。**结论** Integrin  $\beta_1$  阻断能抑制 FAK 的磷酸化,下调 TGF- $\beta_1$ 、MMP-9、Col1A1 及 Col3A1 的表达,从而改善在持续炎症刺激条件下心肌细胞的纤维化反应进程,为未来临床治疗拓展新思路。

**关键词:** 心肌纤维化;整合素;黏附斑激酶;血清脂多糖

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

## Role and mechanism of integrin $\beta_1$ -FAK on myocardial fibrosis\*

Chuan-qin Lin<sup>1</sup>, Xiu-Li Zhai<sup>2</sup>, Tuo Deng<sup>1</sup>

(1. Department of Emergency, Hainan Province NongKen Sanya Hospital, Sanya, Hainan 572000, China; 2. Department of Prevention and Health Care, Sanya Sanlin Hospital, Sanya, Hainan 572025, China)

**Abstract: Objective** To study the effects and mechanisms of integrin  $\beta_1$ -FAK on myocardial fibrosis. **Methods** Cells were randomly divided into five groups: the blank control group, the LPS-stimulated group, integrin  $\beta_1$  blocking group, FAK blocking group, blocking integrin  $\beta_1$  and FAK group. Double-immunostaining was used to test the purity of myocardial cells. RT-PCR and q-PCR were used to detect the gene expression of MMP-9, TGF- $\beta$ , Col1A1, Col3A1 and integrin  $\beta_1$ . Western blot method was used to detect the expression of FAK protein. **Results** Compared with those in the control group, the LPS-treated cells exhibited a significant increase of MMP-9, TGF- $\beta$ , Col1A1, Col3A1 and integrin  $\beta_1$ , while blocking the integrin  $\beta_1$  prevented the increase in LPS-induced up-regulation of MMP-9, TGF- $\beta$ , Col1A1, Col3A1 and integrin  $\beta_1$  and inhibited the FAK phosphorylation. Furthermore, when the cells were treated with the FAK agonist, the expression of MMP-9 and TGF- $\beta$  decreased, and it had similar effect with blocking integrin  $\beta_1$ . **Conclusions** Our study suggests that inhibition of integrin  $\beta_1$  suppresses the FAK phosphorylation, and decreases

收稿日期:2016-12-08

\* 基金项目:三亚市医疗科技创新项目(No:YW1214)

expressions of MMP-9, TGF- $\beta$ , Col1A1, Col3A1, which contributes to alleviate the development of myocardial fibrosis under the condition of continuous inflammation stimulation and provides new ideas for the future clinical treatment stimulated H9c2 cardiomyocytes.

**Keywords:** myocardial fibrosis; integrin; focal adhesion kinase; lipase

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是以胶原过度沉积以及细胞外基质增多为特征的慢性病理过程,其发展在一定程度上影响着心肌梗死、高血压病、肥厚性心脏病及心力衰竭等多种心血管疾病的预后及转归<sup>[1-2]</sup>。尽管目前已有许多研究试图去揭示心肌纤维化的形成机制及所涉及的相关信号通路,例如心肌张力/压力的改变,转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta_1$ )信号通路的激活等<sup>[3-5]</sup>,但是总体而言,心肌纤维化的机制仍未完全明了,尚需进一步研究阐明。目前已有研究表明,心肌纤维化涉及到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的产生<sup>[6]</sup>。而整合素(Integrin)作为介导细胞外环境与细胞相互作用的重要信号转导分子,其与细胞周围ECM蛋白质的结合对细胞黏附、功能传递、增殖及分化等具有重要的调控作用<sup>[7-9]</sup>。然而,目前关于integrin $\beta_1$ 受体是否是介导心肌纤维化,整合素 $\beta_1$ (beta-1 integrins, integrin $\beta_1$ )激活后又通过何种信号通路来调控心肌纤维化等并不清楚。基于以上问题,本研究拟探讨integrin $\beta_1$ 在心肌纤维化中的作用与相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, D-PBS)、胎牛血清、DMEM/F12 细胞培养液及 L-谷氨酰胺(购自美国 Hyclone 公司),兔抗磷酸化黏附斑激酶抗体(anti-phospho-focal adhesion kinase, Anti-P-FAK)、Anti-FAK、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)、 $\alpha$ -Sarcomeric Alexa Fluor 488 及水溶性荧光染料(cyanine dye 3, Cy3)(购自美国 Abcam 公司),Anti-GAPDH 兔抗和辣根过氧化物酶标记(horse radish peroxidase, HRP)的羊抗兔二抗(购自美国的 Cell Signaling Technology 公司),DMEM、胎牛血清及胰酶消化液(Trypsin-EDTA)(购自美国 Gibco 公司),聚氰基丙烯酸正丁酯(Butyleanoacrylate, BCA)蛋白定量检测试剂盒(购自陕西省西安飞扬生物科技有限公司),RIPA 裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)(购自上海

碧云天生物技术有限公司,逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(购自美国 Thermo Scientific 公司),抗体(购自美国 Abcam 公司),其他试剂为国产分析纯,荧光倒置显微镜(购自日本奥林巴斯株式会社),酶联免疫检测仪、Power Pac™ 电泳仪、Trans-blot 电转仪、凝胶成像系统 Chemi Doc XRS(购自美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 原代心肌细胞分离** 取新生 48 h 内的(ICR)小鼠,断颈处死,75%乙醇浸泡 5 min 取出。在超净工作台将鼠腹面向上放置,用眼科剪剪开小鼠胸腔,充分暴露心脏。将获取的心脏放入含有冰的 D-PBS 液中,剪去心房,反复洗涤,至心室内无血渍。然后将心室肌剪碎(<1 mm<sup>3</sup>)并转移到离心管中,800 r/min 离心 5 min,弃去磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)后,加入 5 ml 0.5%胶原酶 II 的消化液,37℃水浴并振荡消化 10 min;吸取上层混悬液,加入等量的心肌培养基终止反应;剩余沉淀物再加胶原酶 II 消化液消化 3~5 次,直至组织块完全消化。200 目双重不锈钢细胞滤网过滤,收集滤液,800 r/min 离心 5 min;弃上清液,加入心肌培养基培养,用滴管反复、缓慢吹打,使细胞重浮,调整细胞密度,接种到培养皿中,置 37℃、5%二氧化碳 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养换液。

**1.2.2 免疫细胞化学鉴定原代心肌细胞** 将灭菌的盖玻片放入 6 孔培养板中,以  $3 \times 10^4$  个/孔密度接种细胞,培养 48 h 后用 PBS 洗涤细胞,之后加入 4%多聚甲醛固定 10 min,用 PBS 漂洗 3 次,1% Triton-100 通透细胞 10 min, PBS 漂洗 3 次,5%牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA)室温封闭 30 min,加入一抗(cTnT 和  $\alpha$ -Sarcomeric actinin),放置 4℃孵育过夜。PBS 洗涤 3 次  $\times$  5 min,加入二抗 488 和 Cy3, 37℃孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, DAPI(1:1 000)孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次,封片剂封片,荧光显微镜下观察。

**1.2.3 实验分组** 所有组细胞采用含 0.5%血清的 DMEM/F12 高糖培养基同化 24 h 后,进行分组。①对

照组(control):不作任何处理;②LPS组:使用 $1\mu\text{g/ml}$  LPS处理心肌细胞24h;③integrin  $\beta_1$ 阻断组:使用 $10\mu\text{g/ml}$  integrin  $\beta_1$ 封闭性抗体[HM $\beta_1$ -1(美国BD pharmingen公司)]预处理细胞2h后,再加入 $1\mu\text{g/ml}$  LPS处理24h;④FAK抑制组:使用 $1\mu\text{mol}$  PF-573228预处理细胞2h,与LPS处理组同一时间加入相同浓度LPS处理细胞24h;⑤integrin  $\beta_1$ 阻断+FAK抑制组:使用 $10\mu\text{g/ml}$  integrin  $\beta_1$ 封闭性抗体和 $1\mu\text{mol}$ 的FAK抑制剂PF-573228预处理细胞2h后,再加入 $1\mu\text{g/ml}$  LPS处理24h。

**1.2.4 RT-PCR 各处理组细胞** 用Trizol裂解细胞后提取总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA),终样品测定OD260/280确定RNA浓度,进行RT-PCR。RT-PCR反应以总体积 $20\mu\text{l}$ ,RNA样品500ng的体系,参照试剂盒[oligo(dT) 18 primer and a Revet Aid™ First Strand 互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) Synthesis Kit]反应条件进行逆转录,合成cDNA。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测基因(TGF- $\beta_1$ :正向5'-CCGCAACAACGCAATCTATG-3',反向5'-GCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3';MMP-9:正向5'-TCTGCCTGCACCACTAAAGG,反向5'-CAGGCTGTACCTTGGTCTG-3';Col1A1:正向5'-CAAGTCTCTTCTGGATCAAGT-3',反向5'-CCTTTATGCCTCTGTACCTTG-3';Col3A1:正向5'-GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG-3',反向5'-CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG; integrin  $\beta_1$ :正向5'-TCTCACCAAAGTAGAAAGCAGGGA-3',反向5'-ACGATAGCTTCATTGTTGCCATTC-3';GAPDH:正向5'-TGTGTCCGTCTGGATCTGA-3',反向5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3')的表达。

**1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)**测定各处理组细胞,用Trizol裂解细胞后提取总RNA,以总体积 $20\mu\text{l}$ ,RNA样品500ng的体系,参照试剂盒(oligo(dT) 18 primer and a Revet Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)反应条件进行qRT-PCR反应,合成cDNA。然后参照试剂盒(Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes)进行qRT-PCR测定相关基因的表达情况。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为对照,通过 $2^{-\Delta\Delta\Delta}$ 算法进行分析。

**1.2.6 Western blot 检测** 提取心肌细胞总蛋白,

测定蛋白含量。每孔道加入 $50\mu\text{g}$ 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)并将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。然后于 $50\text{g/L}$ 脱脂奶粉TBST(tris buffered saline with tween)缓冲液下室温封闭2h,分别加入1:1000兔抗p-FAK和FAK, $4^\circ\text{C}$ 振摇孵育过夜。TBS洗膜 $10\text{min}\times 3$ 次,加入二抗(1:6000),室温下振摇90min并洗膜。然后加入ECL试剂发光,采用Image-Pro Plus 6.0软件进行数据分析。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 13.0软件统计,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用方差分析,两两比较用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代心肌细胞的鉴定

原代心肌细胞接种24h后在显微镜下呈梭形或不规则扁平状,并逐渐铺展伸出伪足,相互交织成网,形成自发收缩细胞单层或细胞簇。对其进行心肌标志蛋白cTnT,  $\alpha$ -actinin免疫荧光染色,结果显示几乎所有细胞cTnT染色呈阳性,且cTnT阳性细胞同时表达 $\alpha$ -actinin蛋白(红色),证实分离所得原代心肌细胞纯度可达 $\geq 90\%$ 。见图1。

### 2.2 LPS诱导小鼠心肌细胞中基质金属蛋白酶9、TGF- $\beta_1$ mRNA的表达

在没有LPS的诱导下,心肌细胞会有基础性的基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)和TGF- $\beta_1$ 表达,而在加入0.1、0.5、1.0和

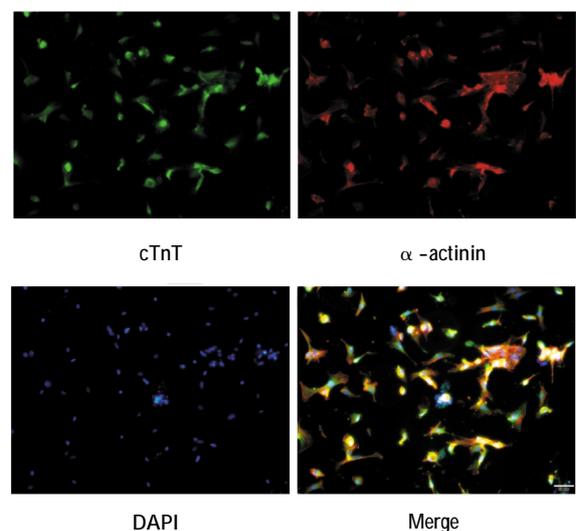


图1 免疫荧光检测心肌细胞标志物cTnT和 $\alpha$ -actinin

2.0  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 作用 24 h, 各组 MMP-9、TGF- $\beta_1$  表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (MMP-9:  $F=54.784, P=0.000$ ; TGF- $\beta_1$ :  $F=33.540, P=0.000$ )。随着 LPS 浓度的提升, MMP-9 和 TGF- $\beta_1$  表达均成梯度增加, 并于 LPS 浓度 1.0  $\mu\text{g/ml}$  时均达到一个较高峰值 (与 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS 比较, 0.1  $\mu\text{g/ml}$  LPS:  $t_{\text{MMP-9}}=3.980, P_{\text{MMP-9}}=0.016$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=4.214, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.014$ ; 0.5  $\mu\text{g/ml}$  LPS:  $t_{\text{MMP-9}}=10.400, P_{\text{MMP-9}}=0.000$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=4.923, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.008$ ; 1.0  $\mu\text{g/ml}$  LPS:  $t_{\text{MMP-9}}=14.080, P_{\text{MMP-9}}=0.000$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=16.625, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.000$ ; 2.0  $\mu\text{g/ml}$  LPS:  $t_{\text{MMP-9}}=9.368, P_{\text{MMP-9}}=0.001$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=12.612, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.000$ )。见图 2。

### 2.3 LPS 诱导小鼠心肌细胞中 I 型、III 型胶原和 integrin $\beta_1$ 受体的表达

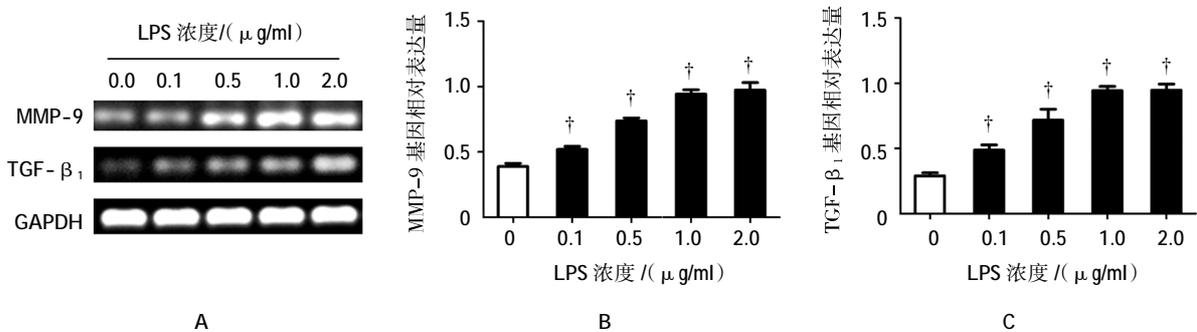
RT-PCR 和 qRT-PCR 结果显示, LPS 1.0  $\mu\text{g/ml}$  作用 24 h 后, 各组 mRNA 表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (Col1A1:  $F=89.769, P=0.001$ ; Col3A1:  $F=411.429, P=0.000$ ; integrin  $\beta_1$ :  $F=43.891, P=0.003$ )。LPS 组 Col1A1、Col3A1、integrin  $\beta_1$  mRNA 表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 (与对照组比较,  $t_{\text{Col1A1}}=9.475, P_{\text{Col1A1}}=0.001$ ;  $t_{\text{Col3A1}}=20.284, P_{\text{Col3A1}}=0.000$ ;  $t_{\text{integrin}\beta_1}=6.625, P_{\text{integrin}\beta_1}=0.003$ )。见图 3。

### 2.4 阻断 integrin $\beta_1$ 抑制 LPS 诱导的 H9c2 心肌细胞中 TGF- $\beta_1$ 、MMP-9、Col1A1、Col3A1 和 integrin $\beta_1$ mRNA 的表达

笔者采用 10  $\mu\text{g/ml}$  的 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体处理细胞 2 h, 之后用 1  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 孵育细胞 24 h, 各组 mRNA 表达经方差分析, 差异有统计学意义 (MMP-9:  $F=89.214, P=0.000$ ; TGF- $\beta_1$ :  $F=81.536, P=0.000$ ; Col1A1:  $F=272.390, P=0.000$ ; Col3A1:  $F=113.352, P=0.000$ ; integrin  $\beta_1$ :  $F=69.780, P=0.000$ )。结果显示: 加入 integrin  $\beta_1$  阻断剂预处理后, integrin  $\beta_1$  阻断剂可以抑制 LPS 诱导的 TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 mRNA 上调水平 (LPS 组与对照组比较:  $t_{\text{MMP-9}}=11.711, P_{\text{MMP-9}}=0.000$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=12.105, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.000$ ;  $t_{\text{Col1A1}}=21.559, P_{\text{Col1A1}}=0.000$ ;  $t_{\text{Col3A1}}=14.473, P_{\text{Col3A1}}=0.000$ ;  $t_{\text{integrin}\beta_1}=11.525, P_{\text{integrin}\beta_1}=0.000$ ; LPS 组与 integrin  $\beta_1$  阻断后比较:  $t_{\text{MMP-9}}=11.0461, P_{\text{MMP-9}}=0.000$ ;  $t_{\text{TGF-}\beta_1}=9.576, P_{\text{TGF-}\beta_1}=0.000$ ;  $t_{\text{Col1A1}}=18.525, P_{\text{Col1A1}}=0.000$ ;  $t_{\text{Col3A1}}=10.831, P_{\text{Col3A1}}=0.000$ ;  $t_{\text{integrin}\beta_1}=8.010, P_{\text{integrin}\beta_1}=0.000$ )。见图 4。

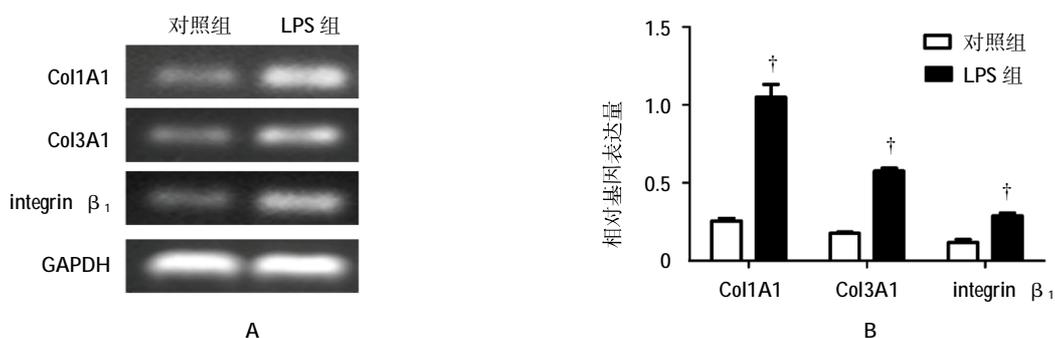
### 2.5 阻断 integrin $\beta_1$ 抑制 LPS 诱导的 H9c2 心肌细胞中 FAK 蛋白的磷酸化情况

各组 mRNA 表达及 FAK 蛋白活化水平, 经方差



A: qRT-PCR; B、C: 不同浓度 LPS 下 qRT-PCR 检测 ( $n=3$ )。† 与 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS 组比较,  $P<0.05$

图 2 PCR 检测不同浓度 LPS 时 MMP-9 和 TGF- $\beta_1$  的表达情况

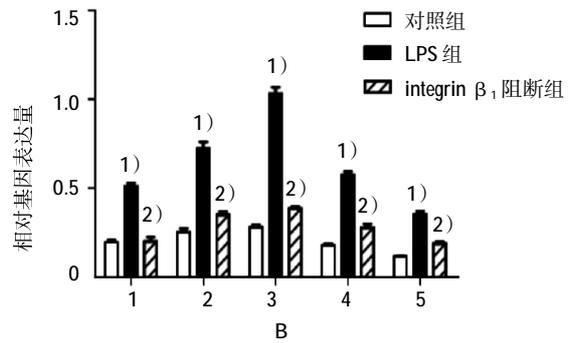
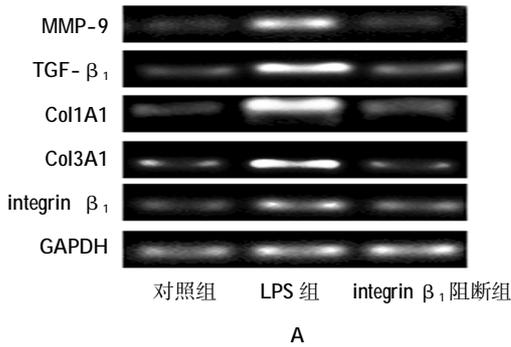


A: RT-PCR; B: qRT-PCR 检测 ( $n=3$ )。† 与对照组比较,  $P<0.05$

图 3 RCR 检测 I 型、III 型胶原和 integrin  $\beta_1$  受体的表达

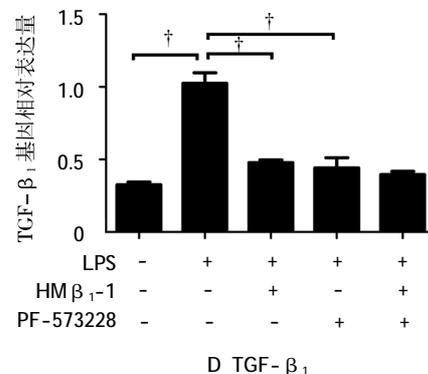
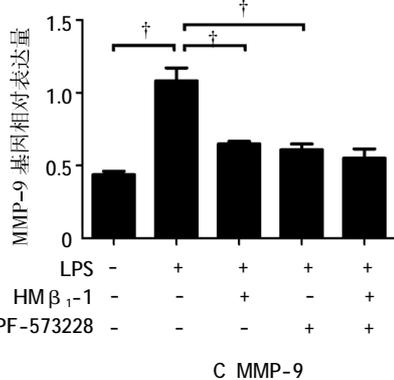
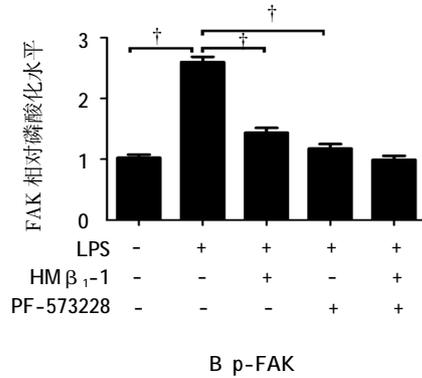
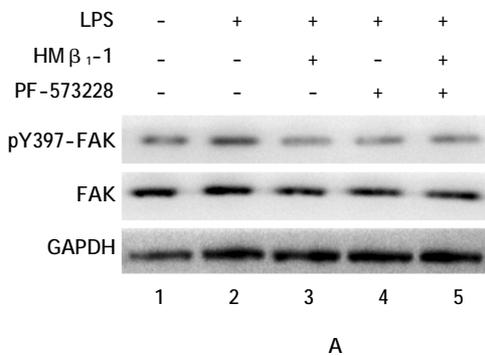
分析,差异有统计学意义(FAK: $F=21.050, P=0.000$ ; MMP-9: $F=34.633, P=0.000$ ; TGF- $\beta_1$ : $F=87.251, P=0.000$ )。结果显示,LPS 可以使磷酸化 FAK 蛋白表达上调,而阻断 integrin  $\beta_1$  抑制 LPS 诱导的磷酸化 FAK 蛋白的上调(见图5A)。分别加入 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体和 FAK 蛋白抑制剂 PF-573228 可以抑制 LPS 诱导的 TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 mRNA 上调水平,但同时加入 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体和 FAK 蛋白抑制

剂 PF-573228,与单独 integrin  $\beta_1$  抑制和 FAK 抑制相比并未显示出进一步的抑制(LPS 组与对照组比较: $t_{FAK}=8.503, P_{FAK}=0.000$ ;  $t_{MMP-9}=10.366, P_{MMP-9}=0.000$ ;  $t_{TGF-\beta_1}=15.548, P_{TGF-\beta_1}=0.000$ ; LPS 组与 integrin  $\beta_1$  抑制比较: $t_{FAK}=5.715, P_{FAK}=0.000$ ;  $t_{MMP-9}=8.1111, P_{MMP-9}=0.000$ ;  $t_{TGF-\beta_1}=11.494, P_{TGF-\beta_1}=0.000$ ; LPS 与 FAK 抑制比较: $t_{FAK}=6.238, P_{FAK}=0.000$ ;  $t_{MMP-9}=8.645, P_{MMP-9}=0.000$ ;  $t_{TGF-\beta_1}=14.080, P_{TGF-\beta_1}=0.000$ )。见图5。



A: RT-PCR; B: qRT-PCR 检测( $n=3$ )。1: MMP-9; 2: TGF- $\beta_1$ ; 3: Col1A1; 4: Col3A1; 5: integrin  $\beta_1$ 。1)与对照组比较,  $P<0.05$ ; 2)与 LPS 组比较,  $P<0.05$

图 4 RCR 检测 integrin  $\beta_1$  阻断后 TGF- $\beta_1$ 、MMP-9、Col1A1、Col3A1 及 integrin  $\beta_1$  的表达



A、B: FAK 在不同组的磷酸化水平; 其中, 1: 对照组; 2: LPS 组; 3: integrin  $\beta_1$  阻断组; 4: FAK 抑制组; 5: integrin  $\beta_1$  阻断 + FAK 抑制组。C、D: MMP-9 和 TGF- $\beta_1$  在不同组的表达( $n=3$ ); †LPS 组与对照组比较, LPS 组与 integrin  $\beta_1$  阻断组比较, LPS 组与 FAK 抑制组比较, 均  $P<0.05$ ; +、- 表示根据是否添加右边相应试剂, 进行相应的分组

图 5 integrin  $\beta_1$ 、FAK 通过 FAK 调节纤维化因子 MMP-9 和 TGF- $\beta_1$  的表达

### 3 讨论

心肌纤维化是高血压、心肌梗死及心力衰竭等多心血管疾病发展到一定阶段的共同病理改变,是心肌重构的主要表现之一<sup>[1]</sup>。细胞内胶原合成代谢与降解代谢失衡,Col1A1 与 Col3A1 合成比率升高,基质金属蛋白酶的表达和活性降低,最终导致胶原合成增加、降解降低,从而产生心肌的纤维化,心脏舒张与收缩功能下降,致使心力衰竭、心律失常等的发生<sup>[10]</sup>。

Integrin 是由约 220 kD 的糖基化蛋白组成的异二聚体,包括  $\alpha$ 、 $\beta$  两种亚基<sup>[11]</sup>。其表达于细胞表面,介导细胞外环境与细胞相互作用的重要信号转导分子,对于细胞黏附、细胞功能传递、细胞增殖及分化等具有重要的调控作用<sup>[12]</sup>。Integrin  $\beta_1$  作为主要的 I 型和 III 胶原受体,目前受到广泛关注。在本实验中,原代心肌细胞在 LPS 刺激诱导 24 h,心肌纤维化标志基因(TGF- $\beta_1$  和 MMP-9)表达上调,心肌纤维化程度增加,并伴随着细胞 Col1A1、Col3A1 及 integrin  $\beta_1$  表达的增加,而联合给予 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体处理后, integrin  $\beta_1$  表达减少,同时细胞 Col1A1、Col3A1 表达下调,TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 表达减弱,提示 integrin  $\beta_1$  信号可能成为治疗心肌纤维化的一种潜在靶点。

Integrin 不具有酶活性,必须通过激活下游分子来向细胞内传递信号<sup>[13]</sup>。FAK 作为 Integrin 的主要下游作用分子,在 Integrin 介导细胞迁移中起着必不可少的作用<sup>[14]</sup>。整合素与 ECM 蛋白质接触可导致 FAK 的酪氨酸磷酸化,从而激活 FAK<sup>[15]</sup>。本实验结果显示,原代心肌细胞在 LPS 刺激诱导 24 h,p-FAK 的表达上调,分别加入 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体和 FAK 蛋白抑制剂 PF-573228 均可以抑制 LPS 诱导的 TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 mRNA 的上调水平,但同时加入 integrin  $\beta_1$  封闭性抗体和 FAK 蛋白抑制剂 PF-573228,与单独加入 integrin  $\beta_1$  阻断组比较,并未有进一步抑制,表明 integrin  $\beta_1$  主要通过激活 FAK 参与心肌细胞纤维化的发生与发展。

综上所述,阻断 integrin  $\beta_1$  能抑制 FAK 的磷酸化,进而减少 Col1A1 与 Col3A1 合成,下调相关纤维化因子 TGF- $\beta_1$  和 MMP-9 的表达,从而改善在炎症刺激条件下心肌细胞的纤维化进程,为未来临床治疗拓展新思路。

### 参 考 文 献:

- [1] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOGIANNIS N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(4): 549-574.
- [2] 李淑梅,钟世顺,吴平生. 氯沙坦对自发性高血压大鼠心脏局部醛固酮的合成及其心肌纤维化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(4): 539-542.
- [3] ZHANG M, PAN X, ZOU Q, et al. Notch3 Ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction by inhibiting the TGF- $\beta_1$ /Smad3 pathway[J]. Cardiovasc Toxicol, 2016, 16(4): 316-324.
- [4] ZHANG J, CHENG Y, GU J, et al. Fenofibrate increases cardiac autophagy via FGF21/SIRT1 and prevents fibrosis and inflammation in the hearts of type 1 diabetic mice[J]. Clinical Science, 2016, 130(8): 625-641.
- [5] ZHANG F, DANG Y, LI Y, et al. Cardiac contractility modulation attenuate myocardial fibrosis by inhibiting TGF- $\beta_1$ /Smad3 signaling pathway in a rabbit model of chronic heart failure[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 294-302.
- [6] MACKENNA D, SUMMEROUR S R, VILLARREAL F J. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis[J]. Cardiovascular Research, 2000, 46(2): 257-263.
- [7] WANG H, ZHU Y, ZHAO M, et al. miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin beta 1 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2)[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70192.
- [8] ROY D C, HOCKING D C. Recombinant fibronectin matrix mimetics specify integrin adhesion and extracellular matrix assembly[J]. Tissue Engineering Part A, 2013, 9(3/4): 558-570.
- [9] RIOPEL M M, LI J, LIU S, et al.  $\beta_1$  integrin-extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function[J]. Lab Invest, 2013, 93(1): 31-40.
- [10] 刘兵,谢增柱. 慢性低氧致大鼠右心室心肌纤维化作用及其机制的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 15(13): 1941-1944.
- [11] CAMPER L, HOLMVALL K, WÄNGNERUD C, et al. Distribution of the collagen-binding integrin  $\alpha_10\beta_1$  during mouse development[J]. Cell & Tissue Research, 2001, 306(1): 107-116.
- [12] HEINO J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions[J]. Matrix Biology, 2000, 19(4): 319-323.
- [13] MIRANTI C K, BRUGGE J S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction[J]. Nature Cell Biology, 2002, 4(4): 83-90.
- [14] SCHLAEPFER D D, HUNTER T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs[J]. Trends in Cell Biology, 1998, 8(4): 151-157.
- [15] ZHAO X K, CHENG Y, CHENG M L, et al. Focal adhesion kinase regulates fibroblast migration via integrin beta-1 and plays a central role in fibrosis[J]. Scientific Reports, 2016, 14(6): 19276.