

[文章编号] 1000-4718(2009)02-0293-06

促红细胞生成素通过 PI3 - K/Akt 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖

张新金, 马业新[△], 文渊, 徐雪晶

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨促红细胞生成素(EPO)对血管紧张素 II (Ang II)诱导的心脏成纤维细胞(CFs)增殖的影响,以及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3 - K/Akt)信号途径和一氧化氮合酶(NOS)的作用。方法: 应用胰酶和胶原酶双酶和差速贴壁法分离培养新生大鼠 CFs 细胞,应用 EPO、Ang II、PI3 - K 抑制剂 LY294002、NOS 抑制剂 L - NAME 不同因素干预。细胞计数和 MTT 法作出 CFs 的生长曲线,检测 CFs 的增殖。化学酶法检测 CFs 培养液中的一氧化氮(NO)浓度以及总 NOS 和其亚型的活性。Western blotting 检测 Akt、p - Akt、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白的表达。结果: Ang II 促 CFs 增殖的作用显著。EPO 剂量依赖性的增加 CFs 培养液中的 NO 浓度,同时剂量依赖性的抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖。在给药后第 4 d,和单纯的 Ang II 相比,浓度为 5×10^3 U/L、 1×10^4 U/L 和 2×10^4 U/L EPO 对 CFs 增殖的抑制率分别达到了 24.4%、41.5% 和 50.5%。EPO 显著提高 Akt 的磷酸化水平,促进 eNOS 蛋白的表达。应用 PI3 - K 抑制剂 LY294002 和 NOS 抑制剂 L - NAME 均能使培养液中的 NO 浓度也随之下降,EPO 抑制 Ang II 诱导 CFs 增殖的作用均被阻断。但 LY294002 同时阻断了 eNOS 蛋白表达,而 L - NAME 对 eNOS 没有影响。结论: EPO 可剂量依赖性的抑制 Ang II 诱导的新生大鼠 CFs 的增殖。其作用机制是通过激活 PI3 - K/Akt 信号途径促使 CFs 中 eNOS 表达来促进 NO 的生成,从而抑制 CFs 的增殖。

[关键词] 促红细胞生成素; 成纤维细胞; 血管紧张素 II; 一氧化氮合酶; 1 - 磷脂酰肌醇 3 - 激酶

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Erythropoietin inhibits the proliferation of neonatal rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II via PI3 - K/Akt signaling pathway

ZHANG Xin - jin, MA Ye - xin, WEN Yuan, XU Xue - jing

(Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. E - mail: drmayexin@sina.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of erythropoietin (EPO) on the proliferation of rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II (Ang II) and to identify the roles of phosphatidylinositol - 3 - kinase/Akt (PI3 - K/Akt) signaling pathway and nitric oxide synthase (NOS) in this process. **METHODS:** Neonatal rat cardiac fibroblasts (CFs) were isolated by collagenase, trypsinase and technique of differential attachment. EPO, Ang II, LY294002 (an inhibitor of PI3 - K), and L - NAME (an inhibitor of NOS) were added in related group respectively. Growth curves of CFs were established by cell counting and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The levels of nitric oxide (NO), and the activities of NOS and its isoforms were measured by chemical enzymic method. The expressions of Akt, p - Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by Western blotting. **RESULTS:** Ang II markedly enhanced the proliferation of CFs. The NO level in CFs culture fluid was increased and the proliferation of CFs induced by Ang II was suppressed by EPO in a dose dependent manner. After 4 d of administrations, the proliferation ratio of CFs was suppressed 24.4%, 41.5% and 50.5% by EPO at doses of 5×10^3 U/L, 1×10^4 U/L and 2×10^4 U/L respectively. The expressions of phosphated Akt, p - Akt, and eNOS were all up - regulated by EPO. The effect of EPO on NO was blocked by LY294002 and L - NAME, and the suppression of CFs proliferation induced by Ang II was diminished similarly. However, LY294002 also down - regulated the expression of eNOS but the L - NAME had no effect on it. **CON-**

[收稿日期] 2007 - 12 - 25 **[修回日期]** 2008 - 04 - 21

[△]通讯作者 E - mail: drmayexin@sina.com

CONCLUSION: EPO suppresses the proliferation of neonatal rat CFs induced by Ang II in dose dependent manner. The suppressive effects may be due to up-regulating the expression of eNOS and enhancing the production of NO via activating the PI3-K/Akt signaling pathway.

[KEY WORDS] Erythropoietin; Fibroblasts; Angiotensin II; Nitric-oxide synthase; 1-Phosphatidylinositol 3-kinase

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种细胞因子,临床上主要作为促进红细胞生成的药物广泛应用。最近的研究发现,EPO具有独立于促进红细胞生成外的细胞保护作用,尤其对神经细胞和心肌细胞的保护成为其保护作用的研究热点^[1,2]。正常心脏组织中,心肌细胞占到了约75%的容积,而心肌细胞细胞数却只占心脏细胞总数的30% - 40%,心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是心脏数目最多的细胞^[3]。心肌重构和心肌纤维化是很多心脏疾病的病理改变,这些纤维化的组织主要是CFs的增殖以及其合成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[4]。血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)促进CFs增殖和胶原合成的作用非常显著^[5]。在大多数的心血管疾病如高血压、慢性心功能不全的病人,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的激活,血中Ang II的增加是共同的病理生理变化。这就导致心脏中CFs的增殖,促使心脏发生心肌纤维化等病理改变。以往对EPO心脏保护的研究中,主要集中在心肌细胞上面。而对于数量最多,作用复杂而且重要的CFs却很少涉及。本研究的目的是探讨EPO对Ang II诱导的CFs增殖的影响及其机制,为进一步阐明对心肌重构和纤维化的机制提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 材料和试剂

Sprague-Dawley 乳鼠(出生1-3 d)由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。重组人EPO(Merck, Calbiochem)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K)抑制剂LY294002、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂N-硝基-L-精氨酸甲酯(N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)、四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma),纤维连接蛋白(Fibronectin)、波形蛋白(vimentin)、 α -肌动蛋白(α -actin)抗体以及SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。蛋白激酶B(Akt)、磷酸化的蛋白激酶B(p-Akt)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide

synthase, iNOS)兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),辣根过氧化物酶偶联羊抗鼠IgG抗体(Proteintech Group, Inc.)。NO和NOS活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),II型胶原酶、新生小牛血清(newborn calf serum, NCS)和Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco modified Eagle medium, DMEM)(Invitrogen)。

2 心脏成纤维细胞的分离、培养和鉴定

无菌条件下在超净工作台内取下乳鼠心脏,剪去心房和大血管,磷酸缓冲液冲洗去掉残血,剪成约1 mm × 1 mm × 1 mm的小块,0.125%的胰酶和1 g/L浓度的II型胶原酶复合消化。收集消化液1000 × g离心8 min。用含10% NCS的DMEM培养基5% CO₂ 孵箱中37 °C 1 h,差速贴壁法去掉未贴壁的心肌细胞。培养至90%融合以上时,0.25%胰酶和0.02%乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)消化传代。实验应用2-3代细胞。细胞爬片后用免疫组化SABC法鉴定Fibronectin和vimentin阳性、 α -actin阴性,证实为成纤维细胞。

3 实验分组

分为对照组、EPO干预组、 10^{-7} mol/L Ang II组、EPO(1×10^3 、 5×10^3 、 10×10^3 、 20×10^3 U/L) + 10^{-7} mol/L Ang II组、 10^{-5} mol/L LY294002 + EPO(1×10^4 U/L) + 10^{-7} mol/L Ang II组和 10^{-4} mol/L L-NAME + EPO(1×10^4 U/L) + 10^{-7} mol/L Ang II组。各组细胞均为同一批细胞,分别种于6孔板中。细胞计数和MTT实验时 1×10^4 cells/well。做Western blotting检测时以 2×10^5 细胞种于50 mm的平皿中。

4 细胞计数和MTT

将CFs以 1×10^4 cells/well种于6孔板中,每组设5孔,以10% NCS中DMEM培养基5% CO₂ 孵箱中37 °C培养24 h,换成0.5% NCS DMEM培养基同步化。24 h后,按上述分组分别加入不同的干预药物,EPO、LY294002和L-NAME在Ang II之前1 h加入。分别在给药后的0 d、1 d、2 d、3 d、4 d用细胞计数板对各组进计数。MTT采用同样的实验方案,只是将6孔板换成96孔板,每孔种植的细胞数调整为 4×10^3 cells/well。在加药的0 d、1 d、2 d、3 d、4 d进行实验。每孔加入浓度为5 g/L MTT 20 μ L,孵育4 h后吸净培养液,加入150 μ L二甲基亚砷(dimethyl

sulphoxide, DMSO), 摇床上振荡 15 min, 在 490 nm 波长处酶标仪检测吸光度值。

5 NO 浓度和 NOS 活性的检测

将 CFs 以 5×10^4 cells/well 种于 24 孔板中, 以 10% NCS DMEM 培养基 5% CO₂ 孵箱中 37 °C 培养 24 h, 换成 0.5% NCS DMEM 培养基同步化。24 h 后, 按上述分组分别加入不同的干预药物, EPO、LY294002 和 L-NAME 在 Ang II 之前 1 h 加入。在加入 Ang II 后 24 h, 收集培养液, 对其中 NO 浓度和 NOS 活性进行检测。实验过程按试剂盒标准程序进行, NO 浓度和 NOS 活性分别在 550 nm 和 530 nm 处, 通过分光光度计比色后计算出各样品的浓度和活性。用总 NOS 的活性减去 iNOS 的活性就得到了组成型表达的一氧化氮合酶 (constitutive nitric oxide synthase, cNOS) 的活性。

6 Western blotting 检测 Akt, p-Akt, eNOS, iNOS 蛋白表达

将 CFs 以 4×10^5 细胞种于 50 mm 的平皿中, 在不同的干预药物加入 24 h 后收集蛋白。细胞裂解液裂解细胞后, 收集裂解液 4 °C 以 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液冻存。8% - 10% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulphate, SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转到聚偏 (二) 氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上。封闭液室温 2 h, 1:1000 兔抗鼠 Akt, p-Akt 和 1:800 eNOS, iNOS 多克隆抗体 4 °C 过夜, TBS-T 洗脱。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 II 抗 37 °C 孵育 2 h, TBS-T 洗脱。ECL 发光试剂盒显色、显影, Bio-Rad 凝胶成像系统成像, 吸光度值分析。

7 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS12.0 统计分析软件做多组间单因素方差分析, 组间比较用 q 检验。

结 果

1 细胞计数结果

从细胞计数结果得到的 CFs 生长曲线来看, Ang II 对 CFs 促增殖作用明显, 给药后第 4 d, Ang II 组比对照组细胞增殖率提高了 83.3% ($P < 0.01$)。EPO 则剂量依赖性的抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖。在给药后第 4 d, 浓度为 5×10^3 U/L、 1×10^4 U/L 和 2×10^4 U/L EPO 对 CFs 的抑制率分别达到了 24.4%、41.5% 和 50.5% ($P < 0.01$), 见图 1A。PI3-K 抑制剂 LY294002 和 NOS 抑制剂 L-NAME 均能阻断 EPO 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖的抑制作用, 见图 1B。

2 MTT 结果

MTT 结果和细胞计数的结果类似, 和细胞计数得到的生长曲线基本吻合, 见图 1C、D。

3 NO 浓度的检测结果

在单独应用 Ang II 干预后 CFs 培养基中 NO 的浓度显著的降低, 应用 EPO 则显著的提高 NO 的浓度, 抑制 Ang II 的作用, 强度随剂量的增加而加强。当 EPO 的浓度达到 5×10^3 U/L 时, 已经能显著的增加 NO 的浓度 ($P < 0.01$)。PI3-K 抑制剂 LY294002 和 NOS 抑制剂 L-NAME 均能显著降低 CFs 培养基中 NO 的浓度, 明显减弱 EPO 对 NO 的浓度提升的作用, 见图 2。

4 NOS 活性的检测结果

在 NOS 活性检测的结果中, 总 NOS 活性和培养基中 NO 的浓度变化呈一致性。亚型检测显示, 正常情况下, iNOS 的活性很低, 以 cNOS 的活性为主。iNOS 的活性在各组总 NOS 活性中所占比例均比较小。Ang II 干预后, 正常的 cNOS 活性被抑制, 同时 cNOS 的活性也轻度增加。EPO 同样可以使总 NOS 活性明显的下降, 且具有明显的剂量依赖性。在亚型分析上我们则可以看到, EPO 对 iNOS 的活性抑制非常的显著, 同时也很明显的促进了 cNOS 的活性。PI3-K 抑制剂 LY294002 也明显的抑制 cNOS 的活性, 几乎完全阻断了 EPO 对 cNOS 活性的促进作用, L-NAME 则使总 NOS 和各亚型的活性均降至很低的水平, 见表 1。

表 1 各组 NOS 以及亚型的活性

Tab 1 The activities of NOS and its isoforms in each group (10^3 U/L, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Total NOS	iNOS	cNOS
Con	1.132 \pm 0.039	0.134 \pm 0.007	0.998 \pm 0.051
E10	2.257 \pm 0.152*	0.108 \pm 0.009	2.149 \pm 0.143*
A1	0.879 \pm 0.078 [▲]	0.298 \pm 0.014	0.581 \pm 0.041 [▲]
AE1	0.903 \pm 0.804 [▲]	0.267 \pm 0.021	0.636 \pm 0.057 [▲]
AE5	1.875 \pm 0.142* [▲]	0.211 \pm 0.017	1.664 \pm 0.149* [▲]
AE10	2.375 \pm 0.147* [▲]	0.204 \pm 0.016	2.171 \pm 0.187* [▲]
AE20	2.479 \pm 0.201* [▲]	0.195 \pm 0.013	2.284 \pm 0.203* [▲]
AE10LY	0.913 \pm 0.813* [▲]	0.236 \pm 0.026	0.667 \pm 0.056* [▲]
AE10LN	0.573 \pm 0.318* [▲]	0.213 \pm 0.015	0.360 \pm 0.017* [▲]

* $P < 0.01$ vs group A1; [▲] $P < 0.01$ vs group AE10; [▲] $P < 0.01$ vs group Con. Con: control; E10: 10^4 U/L EPO; A1: 10^{-7} mol/L Ang II; AE1: 10^3 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE5: 5×10^3 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10: 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE20: 2×10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10LY: 10^{-5} mol/L LY294002 + 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10LN: 10^{-4} mol/L L-NAME + 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II.

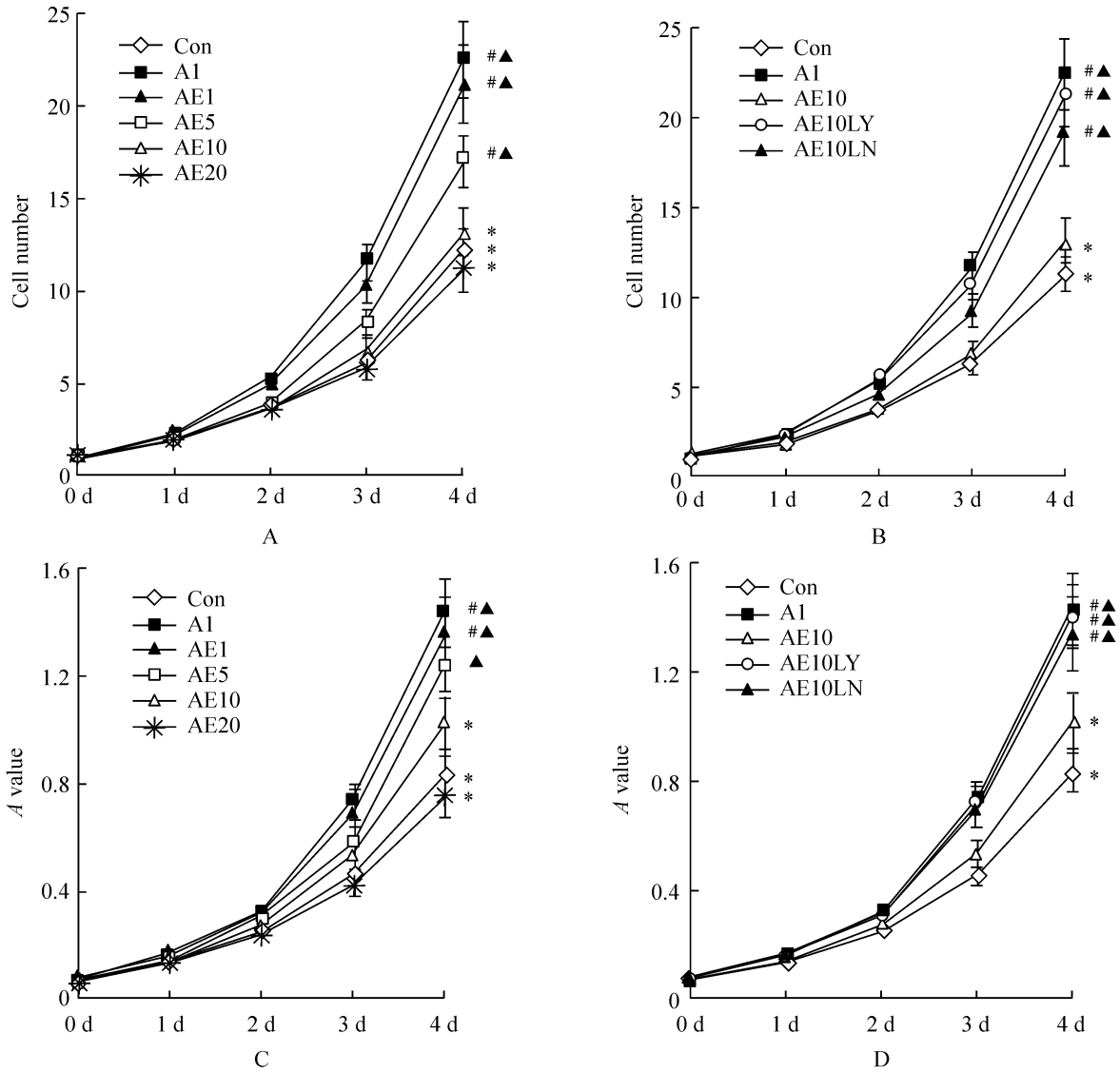


Fig 1 Growth curves of CFs by cell counting and MTT ($\bar{x} \pm s$, $n=8$). A and B: cell counting; C and D: MTT. * $P < 0.01$ vs group A1; # $P < 0.01$ vs group AE10; ▲ $P < 0.01$ vs group Con. Con: control; E10: 10^4 U/L EPO; A1: 10^{-7} mol/L Ang II; AE1: 10^3 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE5: 5×10^3 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10: 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE20: 2×10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10LY: 10^{-5} mol/L LY294002 + 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; AE10LN: 10^{-4} mol/L L-NAME + 10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II.

图1 细胞计数和 MTT 结果

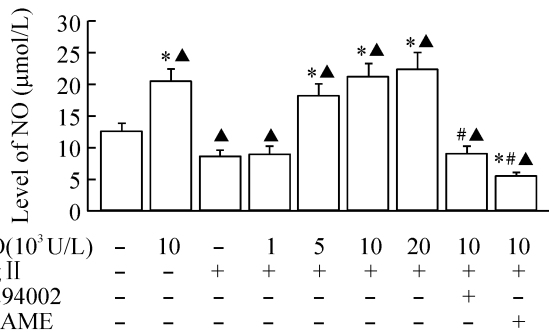


Fig 2 The level of NO in each group $\bar{x} \pm s$, $n=8$. * $P < 0.01$ vs group 10^{-7} mol/L Ang II; # $P < 0.01$ vs group 1×10^4 U/L EPO + 10^{-7} mol/L Ang II; ▲ $P < 0.01$ vs group control.

图2 各组 NO 的浓度

5 Akt, p-Akt, eNOS 和 iNOS 蛋白 Western blotting 结果

EPO 对 CFs 中总 Akt 蛋白的表达没有明显影响,但促其磷酸化的作用非常明显。Ang II 则能显著抑制 Akt 的磷酸化,但其去磷酸化的作用明显被 EPO 抑制。Ang II 也同样显著抑制 eNOS 的表达, EPO 的作用下明显增加。在加用 PI3-K 抑制剂 LY294002 后, eNOS 表达明显减少, EPO 的作用被阻断。iNOS 的表达则变化不大, Ang II 能轻微增加其表达, EPO 和 LY294002 对其有轻微的抑制作用。无论是 PI3-K 抑制剂 LY294002 还是 NOS 抑制剂 L-NAME 均能阻断 EPO 的作用,见图 3A-C。

讨 论

正常组织损伤后修复需要生成适量新的结缔组织。这样成纤维细胞就必须增殖迁移到损伤的位置,并通过产生、粘附、收缩和集聚 ECM 来修复损伤。在正常的损伤修复后,纤维细胞可能通过凋亡消失,这样组织才得以保持正常的生理功能。如果因为其它因素造成这种修复过程一直进行,纤维细胞持续存在,这样就导致纤维过度沉积,许多的纤维化疾病由此而产生^[6-8]。心肌纤维化的病理改变中,CFs 是主要的效应细胞,其过度增殖是这种病理改变的关键环节。内源性的抑制心肌肥厚和纤维化的系统包括四类:促进环鸟苷一磷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)产生的物质如心房利尿钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和脑利尿钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、激肽系统、NO 以及 Ang II 的 AT2 受体。NO - cGMP 信号途径是它们的共同核心机制,调控 NO - cGMP 信号途径对 Ang II 的抑制可能作为治疗心肌肥厚、心肌纤维化的一个新的靶点^[9]。最近的研究表明,EPO 能通过 PI3 - K/Akt 促使心肌细胞中 eNOS 表达以及磷酸化来促进 NO 的生成^[10]。若应用 EPO 外源性的促进 NOS 合成 NO,通过 NO - cGMP 信号途径抑制 CFs 的增殖,有可能起到抑制心肌纤维化的作用。

本研究通过细胞计数和 MTT 制作细胞生长曲线来评估 CFs 增殖的变化,结果一致的证实,EPO 抑制了 Ang II 诱导的 CFs 的增殖,且具有明显的剂量依赖性。在同时对各组 NO 生成的情况进行的检测也表明,生长快速的实验组比生长受抑制的浓度明显升高,差异显著。以往的研究已证实,NO 能够抑制成纤维细胞和血管平滑肌的增殖^[11,12]。NO 发挥其生物效应主要通过激活可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC),然后合成 cGMP 来发挥作用^[13]。为了探讨其相关的信号转导机制,我们分别应用了 PI3 - K 抑制剂 LY294002 和 NOS 抑制剂 L - NAME。应用 EPO 的各组除 LY294002 + EPO + Ang II 组和 L - NAME + EPO + Ang II 组外,NO 的浓度均明显的高于 Ang II 组。同时,LY294002 和 L - NAME 也均阻断了 EPO 抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖的作用。PI3 - K 抑制剂 LY294002 几乎全部阻断了 EPO 的促 NO 合成的作用,这说明激活 PI3 - K/Akt 信号途径是其主要的机制。

对 eNOS 和 iNOS 的检测中我们可以看到,在 EPO 抑制了 Ang II 诱导的 CFs 增殖的时候,EPO 促进 NOS 的活性主要在于 eNOS 这个亚型,对 iNOS 的

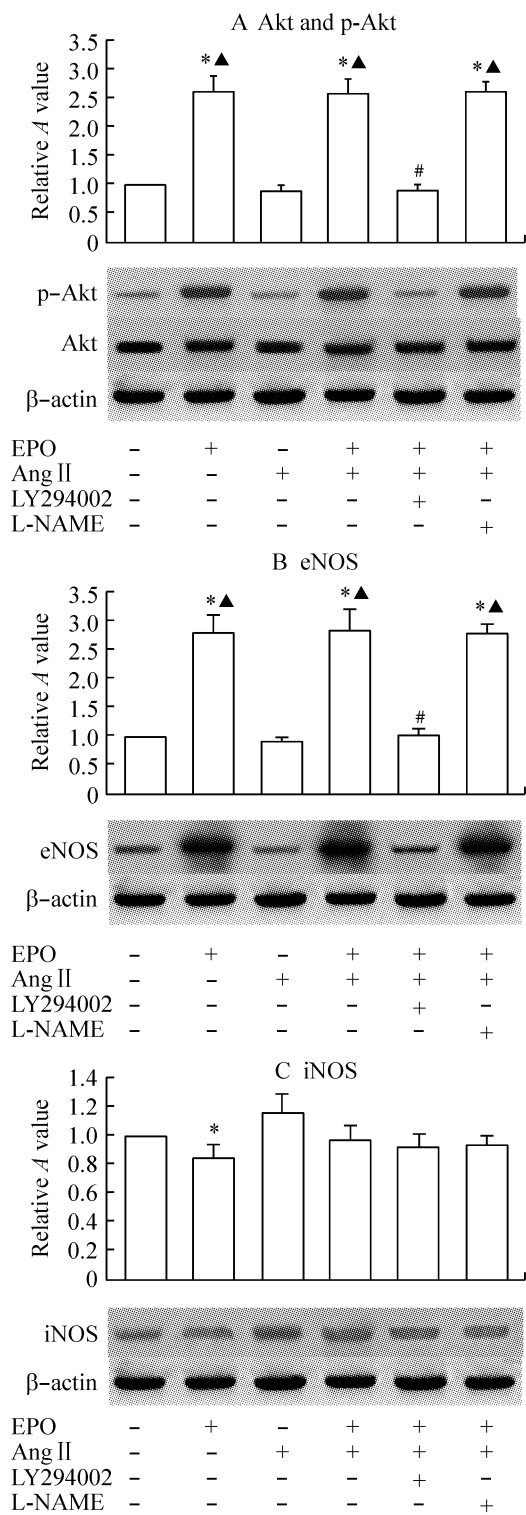


Fig 3 The expressions of Akt, p - Akt, eNOS, and iNOS in each group by Western blotting. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. The A value was justified by β -actin and the A value of group C was defaulted as 1. The A value of each group was the ratio as compared with group C. Bar graph of A only displayed the value of p - Akt. * $P < 0.01$ vs group A1; * $P < 0.01$ vs group AE10; $\blacktriangle P < 0.01$ vs group C.

图 3 Western blotting 检测 Akt、p - Akt、eNOS 和 iNOS 蛋白的表达

影响不是很明显。同时加入 PI3 - K 抑制剂 LY294002 后, EPO 促进 eNOS 蛋白表达的作用就被阻断。本研究对总 Akt 和 p - Akt 蛋白检测的结果还表明, EPO 激活 PI3 - K 后主要是促进 Akt 磷酸化, 对总 Akt 蛋白表达的影响不明显。传统的观点认为, NOS 是 Ca^{2+} 和钙调蛋白依赖的酶, 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加时引起期激活。但现在证明, 在激活 Akt 的时候, 则不需要 Ca^{2+} 和钙调蛋白的参与。激活 PI3 - K/Akt 通路, 促进 eNOS 的表达来保护心肌也是很重要的心脏保护机制^[14]。对 NOS 活性的检测的结果表明, 其总的活性和 NO 的浓度变化一致。为了明确本研究中 NOS 各亚型活性的情况, 我们对其活性进一步亚型分析。结果显示, EPO 促进的主要是 cNOS 的活性, iNOS 变化不明显。NOS 有三个亚型, 均可以在心脏中检测到表达^[15]。eNOS 和 nNOS 是组成性的表达, 生理状态下有一定的量的表达来维持正常生理机能, 它们合称为 cNOS。心脏中的 cNOS 以 eNOS 表达占绝大多数, nNOS 是脑组织中的优势亚型。iNOS 为诱生型, 在合适的条件刺激下能够大量的持续的表达。我们的实验结果显示, EPO 促进的主要是 cNOS 的活性。由于心脏中 cNOS 以 eNOS 表达占绝大多数, 我们检测结果也显示, eNOS 蛋白表达的增加是主要的。因此我们推断, EPO 促进 cNOS 的活性主要是通过增加了 eNOS 的活性。

在整体实验和离体心脏的 Langendorff 灌流的缺血再灌注模型中, EPO 均可以通过激活 PI3 - K/Akt 信号途径产生许多的保护效应^[16]。CFs 在心肌缺血再灌注损伤和心脏重构中是重要的相关细胞, 但在 EPO 心脏保护的研究中, 焦点主要是集中在心肌细胞, 目前很少聚焦到 CFs 上。实际上, 心肌细胞上的 EPO 受体表达的非常低, 而 CFs 上 EPO 受体表达是心肌细胞的数十倍, 甚至高于红细胞膜。本研究首次证实, EPO 能够通过激活 PI3 - K/Akt 信号途径剂量依赖性的抑制 Ang II 诱导的 CFs 的增殖, 为 EPO 的心脏保护研究提供了又一新的机制。

[参 考 文 献]

- [1] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(7):999 - 1007.
- [2] Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(7):4044 - 4049.
- [3] Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, et al. Myocardial changes in pressure overload - induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation [J]. *Eur Heart J*, 1991, 12(4):488 - 494.
- [4] MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(2):251 - 263.
- [5] 汪祥海, 伍卫, 方昶, 等. Rho 激酶在血管紧张素 II 刺激大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(6):1098 - 1101.
- [6] Eckes B, Zigrino P, Kessler D, et al. Fibroblast - matrix interactions in wound healing and fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(4):325 - 332.
- [7] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [J]. *J Pathol*, 2003, 200(4):500 - 503.
- [8] 李裕舒, 罗明华. 心房颤动患者心房 I 型胶原重构与左心房扩大 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(4):804 - 806.
- [9] Booz GW. Putting the brakes on cardiac hypertrophy: exploiting the NO - cGMP counter - regulatory system [J]. *Hypertension*, 2005, 45(3):341 - 346.
- [10] Burger D, Lei M, Geoghegan - Morphet N, et al. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up - regulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1):51 - 59.
- [11] Dubey RK, Overbeck HW. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet - derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth [J]. *Cell Tissue Res*, 1994, 275(1):133 - 141.
- [12] Takizawa T, Gu M, Chobanian AV, et al. Effect of nitric oxide on DNA replication induced by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 1997, 30(5):1035 - 1040.
- [13] Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411(2 - 3):334 - 350.
- [14] Wang YG, Ahmad N, Kudo M, et al. Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide - induced late preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(3):H1125 - H1131.
- [15] Shah AM, MacCarthy PA. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 86(1):49 - 86.
- [16] Para CJ, Kim J, Riel RU, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20):20655 - 20662.