

新生自发性高血压大鼠心肌细胞与成纤维细胞的相互作用

陈天宝, 吴可贵, 谢良地, 许昌声, 林 明

(福建省高血压研究所, 福建省福州市 350000)

[主题词] 高血压; 心肌细胞; 成纤维细胞; 酪氨酸蛋白激酶抑制剂; 细胞培养; 大鼠

[摘要] 为研究自发性高血压大鼠心肌细胞与成纤维细胞在体外培养下的相互作用。收集上述细胞的 24 h 培养上清液作为这两种细胞的条件培养基, 观察血管紧张素 ①I 型受体拮抗剂洛沙坦或酪氨酸蛋白激酶抑制剂金雀异黄素对细胞 $^3\text{H-TdR}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率的影响。结果发现, 心肌成纤维细胞培养基可明显促进这两种细胞的生长, 该作用不能被洛沙坦抑制, 而可被金雀异黄素抑制。心肌细胞培养基无促进这两种细胞生长作用。结果提示, 成纤维细胞可能分泌酪氨酸蛋白激酶介导的促生长因子, 调控心肌细胞和心肌成纤维细胞的生长。

[中图分类号] R544.1

[文献标识码] A

高血压左心室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)的发生发展过程中心肌细胞(cardiac myocyte, CM)和成纤维细胞(cardiac fibroblast, CFB)是否通过合成和分泌肽类激素而相互作用呢? 目前对此知之甚少。本研究拟通过细胞培养探讨新生自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)CM和CFB间可能存在的相互作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞和成纤维细胞的分离、培养和鉴定

出生1~2天SHR40~50只, 上海高血压研究所引种本所动物室(普通级)自行繁殖, 采用酶解法将左心室心肌消化成单细胞悬液, 经差速贴壁分离法分离出CM和CFB, 用含20%小牛血清(FCS, 杭州四季清公司)的DMEM(Gibco公司)于5%CO₂、37℃培养箱(美国Revco公司)中培养。CM培养48h后进入实验; CFB每三天换液一次, 第二代细胞进入实验。经上述方法制备的CM显微镜下搏动细胞比例占总细胞的95%以上, 肌动蛋白单克隆抗体(福州迈新公司)免疫组织化学染色阳性细胞占95%以上。CFB波形蛋白单克隆抗体(福州迈新公司)免疫组织化学染色阳性细胞占90%以上。

1.2 心肌细胞和成纤维细胞条件培养基的制备

CM以 1.5×10^5 /孔接种于24孔培养板, 48h后吸弃培养基, DMEM冲洗两遍, 换以不含血清的DMEM孵育12h, 再换以新鲜的DMEM继续培养, 24h后收集上清液为CM条件培养基(myocyte conditioned medium, MCM)。CFB接种密度为 6.0×10^4 /孔, 长至次汇合状态时再以类似CM方法收集CFB条件培养基(fibroblast conditioned medium, FCM)。以培养于空白孔中24h的DMEM作为对照。

1.3 $^3\text{H-TdR}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率检测

CM以 1.5×10^5 /孔、CFB以 5.0×10^4 /孔接种于24孔培养板, 48h后换以无血清DMEM孵育48h, 使细胞处于G₀/G₁期, 再按以下分组: 对照组: 加入上述新鲜制备的对照培养基。④MCM组: 培养的CM和CFB分别分成三个亚组。MCMa组: 加入等量新鲜制备的MCM; MCMb组: 加入MCM和 10^{-6}mol/L Ang ⑤iv 型受体拮抗剂洛沙坦(Dupond公司); MCMc组: 加入MCM, 并分别加入酪氨酸蛋白激酶抑制剂金雀异黄素(Sigma公司)25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 。④FCM组: 培养的CM和CFB分成三个亚组。FCMa组: 加入FCM; FCMb组: 加入FCM和洛沙坦; FCMc组: 加入FCM和金雀异黄素。再分别加入1 μCi /孔 $^3\text{H-TdR}$ 或 $^3\text{H-Leu}$ (北京原子能科学研究所), 孵育30h后终止反应, 0.45 μm 微孔滤膜负压抽滤, 生理盐水和10%三氯醋酸先后冲洗滤膜, 滤膜干燥后置于内含4 mL PPO/POPOP/二甲苯闪烁液的闪烁杯中过夜, 再在液体闪烁计数器(Tri-carb2300, 美国Pakard公司)上测定放射性强度。

[收稿日期] 2002-05-28

[修回日期] 2002-11-22

[作者简介] 陈天宝, 男, 1970年7月出生, 福建人, 硕士, 主治医师, 现在福建省泉州市第一医院内科工作。吴可贵, 男, 1937年8月出生, 福建人, 博士研究生导师, 教授, 主任医师, 主要研究方向为心血管流行病学与人群防治研究。本文通讯作者。谢良地, 男, 1962年6月出生, 福建人, 教授, 主治医师, 硕士研究生导师, 英国帝国理工学院博士后, 主要研究方向为高血压、冠心病、动脉硬化、心功能不全等基础和临床研究。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验采用 Excel 数据分析软件单因素或双因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 成纤维细胞的促细胞生长作用

和对照组比较, FCMa 组 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率增加 $43.3\% \pm 1.2\%$ ($P < 0.01$), CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率增加 $13.6\% \pm 0.9\%$ ($P < 0.01$), 提示 FCM 可增加 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率。MCMa 组 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率与对照组比较无明显变化, 提示 MCM 不影响 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率(表 1)。

2.2 成纤维细胞促细胞生长作用机制

FCMb 组 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率与 FCMa 组比较无明显变化, 提示 10^{-6} mol/L 洛沙坦不能抑制 FCM 促 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率、CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率作用(表 1)。100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素使 FCM 诱发的 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率降至空白对照组水平($P > 0.05$), 提示金雀异黄素可抑制 FCM 促细胞生长作用(表 2)。

表 1. CM 和 CFB 条件培养基对 SHR 心肌细胞 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率和心肌成纤维细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)。

组别	CFB $^3\text{H-TdR}$	CM $^3\text{H-Leu}$
对照组	100 \pm 0.8	100 \pm 1.1
FCMa 组	143.3 \pm 1.2 ^a	113.6 \pm 0.9 ^a
FCMb 组	148.5 \pm 6.5	112.2 \pm 8.0
MCMa 组	81.8 \pm 4.1	104.9 \pm 5.7

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 金雀异黄素对成纤维细胞促心肌成纤维细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)。

组别	$^3\text{H-TdR}$
对照组	100 \pm 0.8
0 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素	143.3 \pm 1.2
25 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素	140.8 \pm 1.2
50 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素	130.4 \pm 2.3
100 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素	111.4 \pm 1.7 ^a
150 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素	102.2 \pm 1.4 ^a

a: $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 金雀异黄素组比较。

3 讨论

CM 和 CFB 作为心脏中细胞数最多的两种成分, 具有合成和分泌多种肽类激素的功能, 通过 G 蛋白激酶或酪氨酸蛋白激酶信号传导通路参与了心

脏的多个与生长相关的过程, 与高血压时心肌肥厚的形成和发展有关。研究表明, CM 可合成 FGF^[1]、EGF^[2]、IGF^[3]、TGF- β_1 ^[4]、Ang ① ^[6,7] 等, 通过自分泌和旁分泌作用使 CM 的蛋白合成增加、成纤维细胞增殖、胶原合成增加, 最终心肌肥厚并纤维化。同样, 研究发现牵拉 CFB 也能促进合成和分泌 FGF、TGF- β_1 、Ang ① 以及内皮素 1, 对自身和 CM 肥大起重要作用。还有研究发现, CFB 可合成和分泌一种分子量 45~50 kDa 的不明旁分泌蛋白因子, 起自分泌和旁分泌作用^[8]。

$^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 $^3\text{H-Leu}$ 掺入率增加分别反映细胞 DNA 合成(细胞增殖)和蛋白合成(细胞肥大)增加。本研究结果发现, CFB 体外培养上清液可使 CFB $^3\text{H-TdR}$ 掺入率和 CM $^3\text{H-Leu}$ 掺入率增加, 即可促进 CFB 增殖、CM 肥大, 提示 CFB 培养基可能含有某种或某些促细胞生长因子。 10^{-6} mol/L 洛沙坦并不能抑制 FCM 的促生长作用, 所以认为 Ang ① 未参与此作用。有学者应用抗 IGF、PDGF^[5]、FGF、TGF- β_1 、EGF 抗体中和相应生长因子, 发现 FCM 促增殖作用并未受影响, 因而排除这五种因子作用的可能^[8]。本研究未能鉴定出 FCM 促细胞生长因子的具体性质, 但很明显, 这种生长因子促增殖作用是经酪氨酸蛋白激酶系统传导的。

本实验结果提示, CFB 可能分泌经酪氨酸蛋白激酶介导的生长因子, 通过自分泌、旁分泌对 CM 和 CFB 发挥促生长作用。

[参考文献]

- [1] Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur J Cell Biol*, 1995, **68** (3): 330-335
- [2] Fujino T, Hasebe N, Fujita M, et al. Enhanced expression of heparin-binding EGF-like growth factor and its receptor in hypertrophied left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 1998, **38** (2): 365-374
- [3] Guo W, Kamiya K, Yasui K, et al. Paracrine hypertrophic factors from cardiac nonmyocyte cells downregulate the transient outward current density and Kv4.2 K^+ channel expression in cultured rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (1): 157-165
- [4] Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, et al. Angiotensin ① stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β_1 and endothelin 1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 1998, **40** (2): 352-363
- [5] Suzuki J, Baba S, Ohno I, et al. Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor-B expression in myocardial tissues in hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol*, 1999, **8** (4): 223-231
- [6] Sadoshima J, Izumo S. Autocrine secretion of angiotensin ① mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Contrib Nephrol*, 1996, **118**: 214-221
- [7] Dostal DE, Rothblum KN, Conrad KM, et al. Detection of angiotensin IV and angiotensin ① in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol*, 1992, **263** (4 Pt 1): C851-C863
- [8] Long CS, Henrich CJ, Simpson PC. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul*, 1991, **2** (12): 1081-095

(此文编辑 文玉珊)