

促红细胞生成素对高糖环境诱导下体外培养心脏成纤维细胞的影响

罗南方, 张新金, 姜志华, 李建美

(云南省第二人民医院心内科, 云南省昆明市 650021)

[关键词] 促红细胞生成素; 心脏成纤维细胞; 高糖; I型胶原; III型胶原; α -平滑肌肌动蛋白

[摘要] 目的 探讨促红细胞生成素(EPO)对高糖环境诱导过程中体外培养的乳鼠心脏成纤维细胞(CF)增殖及其表型转化的影响。方法 用乳鼠原代细胞培养CF,在促进CF细胞表型转化的过程中,选用高糖培养基进行诱导,添加EPO进行干预。将同一批CF细胞随机分为3组:对照组(5.5 mmol/L葡萄糖)、高糖组(25 mmol/L葡萄糖)、高糖+EPO组(25 mmol/L葡萄糖,20 kU/L EPO)。采用免疫组织化学法鉴定CF,酶联免疫吸附法检测I型、III型胶原含量,Western blot检测纤维化指标 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达。结果 免疫组织化学染色结果为纤维连接蛋白、波形蛋白阳性, α -肌动蛋白阴性,证实培养的细胞为心脏成纤维细胞。与对照组比较,高糖组I型、III型胶原表达量都明显增加($P < 0.01$),而高糖+EPO组I型、III型胶原表达量都显著低于高糖组($P < 0.01$)。高糖组 α -SMA表达较对照组明显增高($P < 0.05$),而高糖+EPO组 α -SMA表达较高糖组明显降低($P < 0.05$)。结论 高糖环境下能有效的诱导CF发生表型转化,而EPO能够逆转在高糖环境作用下诱导发生的心肌纤维化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Erythropoietin on High Glucose-induced Cardiac Fibroblasts Cultured in Vitro

LUO Nan-Fang, ZHANG Xin-Jin, JIANG Zhi-Hua, and LI Jian-Mei

(Department of Cardiology, Second People's Hospital of Yunnan Province & Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650021, China)

[KEY WORDS] Erythropoietin; Cardiac Fibroblast; High Glucose; Type I Collagen; Type III Collagen; α -Smooth Muscle Actin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of erythropoietin (EPO) on proliferation and phenotypic transformation of neonatal rat cardiac fibroblast (CF) induced by high glucose in vitro. **Methods** CF cells were cultured from neonatal rat primary cells. In the process of promoting the phenotypic transformation of CF cells, high glucose medium was selected for induction, and EPO was added for intervention. The same batch of CF cells were randomly divided into three groups: control group (5.5 mmol/L glucose), high glucose group (25 mmol/L glucose), and high glucose + EPO group (25 mmol/L glucose with 20 kU/L EPO). CF cells were identified by using immunohistochemistry; Levels of type I and III collagens were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Expression of fibrosis marker α -smooth muscle actin (α -SMA) was detected by Western blot. **Results** Immunohistochemistry staining showed that fibronectin, vimentin were positive, and α -actin was negative; So, the cultured cells were CF cells. Compared with the control group, the expressions of type I and III collagens were significantly increased in high glucose group ($P < 0.01$). The expressions of type I and III collagens in high glucose + EPO group were significantly lower than those in high glucose group ($P < 0.01$). The expression of α -SMA in high glucose group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The expression of α -SMA in high glucose + EPO group was significantly lower than that in high glucose group

[收稿日期] 2014-10-15

[修回日期] 2015-05-19

[作者简介] 罗南方, 硕士, 住院医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 21500236@qq.com。通讯作者张新金, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 zxjgy2004@sina.com。姜志华, 硕士, 住院医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 544566756@qq.com。

($P < 0.05$). **Conclusions** High glucose can effectively induce the phenotypic transformation of CF cells. EPO can reverse myocardial fibrosis induced by high glucose environment.

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是最常见的独立于糖尿病性冠状动脉病变的心血管并发症之一,以左心室舒张和(或)收缩功能障碍为表现,也可伴有心力衰竭、心律失常、心源性休克,重症患者甚至猝死^[1-4]。高血糖是糖尿病的主要病理生理特征,也是糖尿病心肌病目前最明确的危险因素。已有研究证实,高血糖是导致心肌纤维化及间质重构的重要因素^[5]。心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblast, CF) 是心脏数目最多的细胞,约占心脏细胞总数的 60% ~ 70%,可以通过分泌多种细胞因子与生长因子、细胞外基质蛋白的合成与降解失衡、增殖、迁徙和表型转化等多种途径,参与病理性心室重塑的过程^[6]。因此寻找能够抑制 CF 过度增殖的药物对抑制心室重塑有重大意义。在过去的几十年中,促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 主要用于在慢性肾脏疾病中治疗贫血。最近,实验和临床数据证明 EPO 在心血管疾病中,包括急性心肌梗死、心力衰竭等中都有细胞保护作用^[7-9]。现在认为,EPO 的作用已不仅仅局限于促进红细胞生成;国外报道^[8,10-11]显示,EPO 具有促进新生血管形成、抑制细胞凋亡、减轻缺血再灌注损伤时的炎症反应等作用。EPO 对心脏细胞保护作用的发现,为临床心脏保护提供了新的思路和方法。本研究主要探讨 EPO 对糖尿病心肌病的保护作用。使 CF 生长在高糖环境下,诱导其发生表型转化,成为肌成纤维细胞;模拟糖尿病环境,在处理 CF 时利用 EPO 进行干预;研究在高糖环境诱导下体外培养的 CF 是否会受到 EPO 的影响,EPO 是否具有抗纤维化、抑制心室重构的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞

实验使用的动物是昆明医科大学动物科提供的 20 只 SD 乳鼠 (1 ~ 3 天内出生),雌雄均可。实验细胞首先采取原代细胞分离,然后进行细胞培养及细胞传代,使其生成较好的第 2 代 CF。

1.2 主要试剂和器材

胎牛血清: Gibco 公司; DMEM/F-12 培养基: Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶: Hyclone 公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体: Boster 公司; I 型、III 型胶原: Sigma 公司; α -肌动蛋

白 (α -actin) 抗体: Boster 公司; 波形蛋白 (vimentin) 抗体: Boster 公司; 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 抗体: Boster 公司; PV 通用型二步法免疫组织化学检测试剂: GBI 公司; DAB 染色试剂盒: ZSGB-BIO 公司; EPO: Merck 公司; BCA 法蛋白测定试剂盒: Beyotime 公司。

小镊子和手术剪 (一共 4 套), 75% 酒精棉球, 4 套玻璃皿, 无菌纱布, 冰, 50 mL 离心管, 100 mL 三角烧瓶及其他。

1.3 心脏成纤维细胞的体外分离及原代培养

无菌操作下取出出生后 1 ~ 3 天的 SD 乳鼠, 将其用大头钉固定于无菌泡沫板上, 用 75% 乙醇消毒胸、腹部皮肤。用 2 把弯镊子充分将皮肤撕开, 再用乙醇消毒, 用眼科虹膜剪在剑突处正中中线稍偏左上开胸, 使心脏自然跳出, 然后用弯镊子勾住心脏根部, 取出心脏, 放置于盛有冷 PBS 液的培养皿中。将鼠心脏全部取出后, 剪去心房, 剔除心脏上结缔组织、血管, 预冷 PBS 液清洗 2 ~ 3 次, 并用无菌吸管冲洗去除心室血污。将心室剪碎成 $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ 大小的碎块, 加入消化液 (0.5% II 型胶原酶和 0.1% 胰酶复合消化), 于 37°C 水浴, 第 1 次于 4 min 后收集消化后的上清并弃掉, 后面 2 ~ 5 次每次于 6 min 后收集消化后的上清, 并入等体积的含 20% 血清的培养基中, 终止消化, 1000 r/min 离心 10 min。将所得全部细胞置于 10% DMEM 培养液中, 于 37°C、5% CO_2 细胞培养孵箱培养 45 ~ 50 min。根据 CF 较心肌细胞贴壁速度快的原理, 用差速贴壁法, 倒掉上清液, 剩下的即为 CF, 加入 10% DMEM 培养液, 在 37°C、5% CO_2 孵箱中继续培养, 每 2 天换液 1 次。培养的 CF 3 ~ 4 天后约 80% ~ 90% 细胞融合, 用 0.1% 胰蛋白酶消化, 按 $1 \times 10^8/\text{L}$ 细胞密度接种、传代培养, 传代比例约 1:3。

1.4 实验分组

将同一批 CF 细胞随机分为 3 组: (1) 对照组: 葡萄糖的终浓度为 5.5 mmol/L; (2) 高糖组: 葡萄糖的终浓度为 25 mmol/L; (3) 高糖 + EPO 组: 25 mmol/L 葡萄糖 + 20 kU/L EPO。待细胞 80% ~ 90% 贴壁时, 换无血清的培养基培养 24 h, 然后在各组给予的环境下刺激 48 h, 进行各项指标的测定。

1.5 免疫组织化学法鉴定心脏成纤维细胞

CF 爬片后, 用免疫组织化学 SABC 法进行鉴定, 结果为 FN、波形蛋白阳性, α -肌动蛋白阴性, 证

实为 CF。

1.6 酶联免疫吸附法检测胶原含量

胶原含量测定采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 以空白孔调零, 用 450 nm 波长测定各孔的吸光度值, 计算出样品浓度。

1.7 Western blot 检测

采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测信号分子蛋白表达: 收集在不同的环境下培养 48 h 后的 CF, 吸除陈旧培养基, 用冰 PBS 液冲洗细胞 2 次 (避免培养基中血清对蛋白检测的干扰), 每孔中加入 70 μ L RIPA 细胞裂解液 (提取磷酸化蛋白时需注意加入裂解液 1/10 体积的磷酸化蛋白酶抑制剂, 避免磷酸化蛋白失活); 用细胞刮匙刮下细胞, 轻轻吹散混匀后, 收集细胞裂解液, 转移至 EP 管中, 超声细胞破碎仪充分裂解破碎细胞, 直至 EP 管中没有明显的白色絮状沉淀; 细胞充分裂解后, 4 $^{\circ}$ C、14000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (即为总蛋白) 分装成小

份后于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用, 避免蛋白反复冻融产生的损失。经纯化、电泳、转膜、抗体孵育、曝光及显影、定影后, 对 α -SMA 的相对表达量进行分析。

1.8 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计分析软件包进行统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异使用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏成纤维细胞的培养和鉴定

与心肌细胞分离培养后, CF 生长相对迅速, 2 ~ 3 天可达 80% ~ 90% 细胞融合。CF 的形态特征为体形较大, 胞浆通透, 为长梭形, 通常有着一到两个胞核, 并无自主的细胞搏动 (图 1)。细胞爬片后用免疫组织化学 SABC 法进行鉴定, 结果为 FN、波形蛋白阳性, 即胞浆内围绕细胞核的区域内有棕褐色颗粒物生成; α -肌动蛋白阴性, 即胞浆内没有棕褐色颗粒物形成, 由此可以证实此批细胞为 CF (图 2)。

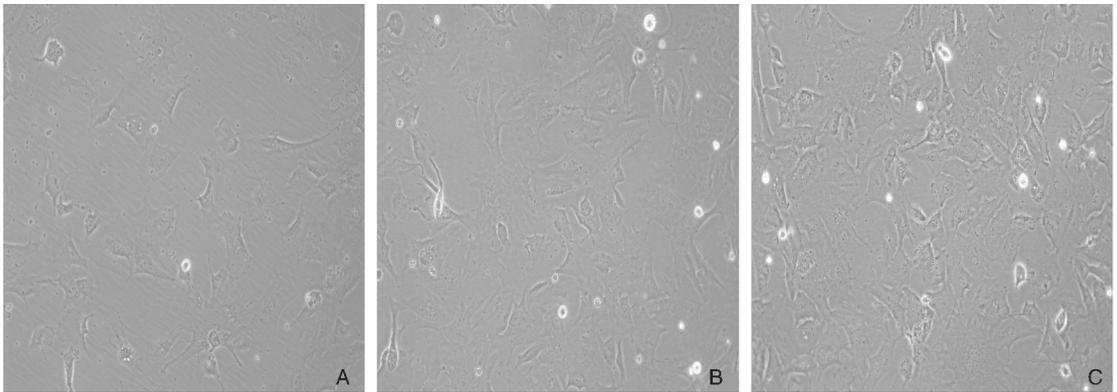


图 1. 不同培养时间的心脏成纤维细胞 (100 \times) A 为培养 24 h, B 为培养 48 h, C 为培养 72 h。

Figure 1. Cardiac fibroblasts with different culture time (100 \times)

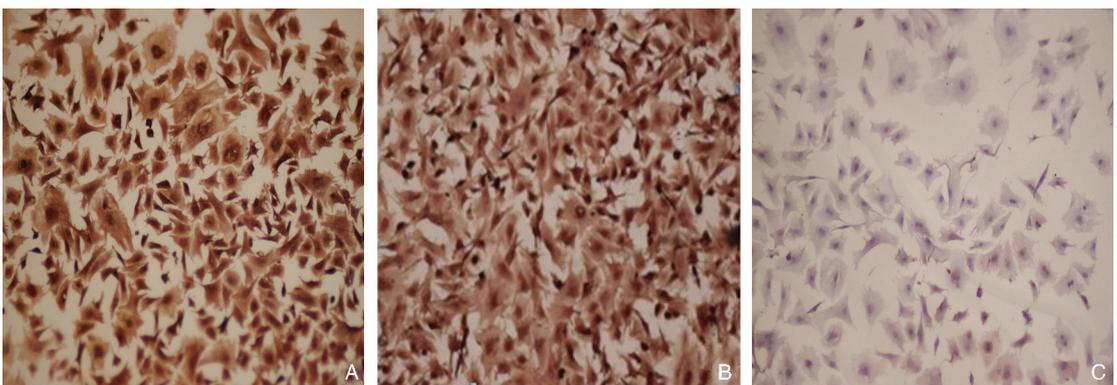


图 2. 心脏成纤维细胞的免疫组织化学染色 (100 \times) A 为 FN 阳性, B 为波形蛋白阳性, C 为 α -肌动蛋白阴性。

Figure 2. Immunohistochemical staining for cardiac fibroblasts (100 \times)

2.2 I 型、III 型胶原水平

各组细胞在实验过程中分别选取 24、48、72 h 不同的时间点,采用 ELISA 法检测各组细胞中 I 型、III 型胶原的生成水平。结果显示,与对照组比较,高糖组 I 型、III 型胶原的表达量明显增加($P < 0.01$);在高糖 + EPO 组中, I 型、III 型胶原的表达

水平都显著低于高糖组($P < 0.01$)。这种趋势在 48 h 时最显著,因此在后续的实验中选择 48 h 时间点作为实验的观察时间。实验表明:高糖能够诱导 I 型、III 型胶原生成量的增加,而 EPO 对 I 型、III 型胶原的生成具有抑制作用,差异具有统计学意义(表 1 和图 3)。

表 1. 不同时间点 3 组 I 型、III 型胶原水平($\mu\text{g/L}$)

Table 1. Levels of type I and III collagens at different time points in the three groups($\mu\text{g/L}$)

分 组	I 型胶原			III 型胶原		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	2152.78 ± 10.66	2350.84 ± 21.04	3906.14 ± 8.95	40.86 ± 0.85	41.12 ± 0.68	41.83 ± 0.75
高糖组	3095.47 ± 13.76 ^a	5797.98 ± 27.26 ^a	7233.68 ± 32.64 ^a	87.48 ± 0.36 ^a	109.80 ± 1.82 ^a	124.46 ± 1.76 ^a
高糖 + EPO 组	2171.28 ± 7.59 ^b	3229.80 ± 16.48 ^{ab}	3689.29 ± 4.48 ^b	71.46 ± 2.95 ^{ab}	62.98 ± 0.45 ^{ab}	74.17 ± 1.17 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组同时时间点比较; b 为 $P < 0.01$, 与高糖组同时时间点比较。

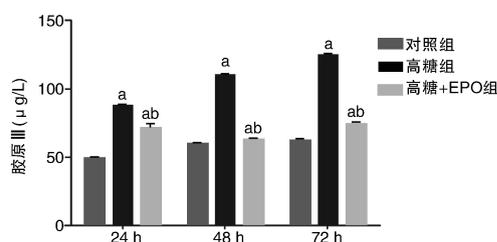
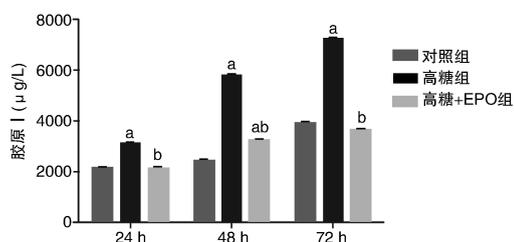


图 3. 不同时间点 3 组 I 型、III 型胶原水平柱状图 a 为 $P < 0.01$, 与对照组同时时间点比较; b 为 $P < 0.01$, 与高糖组同时时间点比较。

Figure 3. The histogram of levels of type I and III collagens at different time points in the three groups

2.3 α -SMA 的表达

使用 Western blot 方法检测经药物处理后目的蛋白 α -SMA 的表达情况,采用 Gel Dox™ XR + 凝胶成像系统获取图像,在 42 kDa 处显示特异性条带,此即 α -SMA(图 4);用 β -actin 作为内参蛋白,再将条带透光体积(Int)与内参蛋白条带相除得到 α -SMA 的相对表达量。结果表明, α -SMA 作为心脏间质纤维化指标参数,在高糖组表达明显升高,显著高于对照组($P < 0.05$);而在加入 EPO 药物干预的高糖 + EPO 组, α -SMA 较高糖组显著降低($P < 0.05$;图 5)。

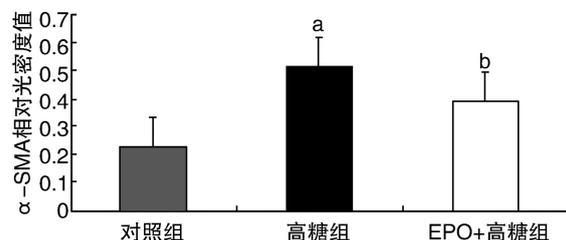


图 5. α -SMA 表达柱状图 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较。

Figure 5. The histogram of α -SMA expression

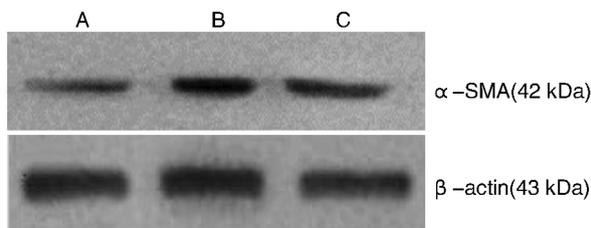


图 4. Western blot 检测 α -SMA 表达 A 为对照组, B 为高糖组, C 为高糖 + EPO 组。

Figure 4. The expression of α -SMA detected by Western blot

3 讨论

糖尿病心肌病,已成为现在主要的特异性心肌病,对人们的身心健康危害越来越大,已成为当今医学界研究的热点和难点。欧洲地区,糖尿病患者因糖尿病性心血管疾病死亡的人数占糖尿病总人数的七成左右,而其中要数 DCM 的死亡率最高。DCM 在功能上的定义为心室扩张、心肌细胞肥大、明显心肌间质纤维化、舒张功能障碍,伴或不伴收

缩功能障碍^[12]。目前对 DCM 的病理机制尚未完全明了,以至于至今还没有一个关于 DCM 十分明确的定义。因此,深入研究糖尿病心血管疾病发生的机制,研发有效的预防和诊疗措施应引起医学界各方重视。

心脏成纤维细胞是数量众多、作用十分复杂且重要的一种细胞。一部分学者认为 CF 活化是心脏纤维化形成过程中相当关键的步骤^[13],CF 的活化促进胶原沉积和间质纤维化,参与扩张性心肌病、高血压左心室肥厚、充血性心力衰竭及缺血性心肌病等心血管疾病的病理生理进程^[14]。以往对 EPO 心脏保护的研究中,主要集中在心肌细胞上面,对 CF 的研究甚少。实验证实 EPO 不仅具有促进造血功能的作用,还有着造血以外的多种生物学作用^[9]。Cai 等^[15]报道,提前一天向大鼠体内(腹腔)注入 5000 IU/kg 的 EPO,再制成离体心脏灌注模型,与未经任何药物处理的空白组比较,实验组左心室功能显著改善,约为前者的 3 倍;而在离体的心脏中发现,EPO 处理组的细胞凋亡面积明显减少,Caspase-3(促凋亡酶)的活性受到抑制。另有相关研究表明 EPO 能够缩小心肌梗死面积。

本研究中我们采用 EPO 对 CF 进行干预。从实验结果中可以看出,在高糖环境诱导下体外培养的 CF 发生表型转化后,使用 EPO 药物干预的高糖 + EPO 组与高糖组比较,无论是 I 型、III 型胶原还是 α -SMA 的表达量,高糖 + EPO 组均较高糖组大幅度降低。证实 EPO 能够使处于高糖诱导下的 CF 的纤维化过程发生逆转,与本实验最初的设想相一致。

EPO 是否对 DCM 有明确的保护作用及其作用机制目前还不十分清楚,但是很多研究已证实 EPO 可以明显抑制各种原因引起的心室重构。推测 EPO 对 DCM 的保护作用有可能是经多方面信号、多途径来起作用的,但是无论是在分子水平、细胞水平、器官水平还是整体水平上我们对其仍缺乏深入认识,相信随着研究 EPO 对 DCM 保护作用的不断深入,对 EPO 在心血管疾病的治疗应用将产生深远影响,为心血管疾病的临床预防和治疗带来新的思路。

[参考文献]

- [1] Yu BC, Chang CK, Ou HY, et al. Decrease of peroxisome proliferator-activated receptor delta expression in cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80(1): 78-87.
- [2] Samuel CS, Hewitson TD, Zhang Y, et al. Relaxin amelio-

rates fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy[J]. Endocrinology, 2008, 149(7): 3 268-293.

- [3] Cai L, Li W, Wang GW, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway [J]. Diabetes, 2002, 51(6): 1 938-948.
- [4] Tschöpe C, Walther T, König J, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene [J]. FASEB, 2004, 18(7): 828-835.
- [5] 邹平, 吴立玲, 吴丹, 等. 高糖促进成年大鼠心脏成纤维细胞 Periostin 表达及其信号转导机制[J]. 生理学报, 2010, 62(3): 247-254.
- [6] Adeghate E, Kalsaz H, Veress G, et al. Medicinal chemistry of drugs used in diabetic cardiomyopathy [J]. Curr Med Chem, 2009, 17(6): 517-551.
- [7] Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin [J]. JAMA, 2005, 293(1): 90-95.
- [8] Parsa CJ, Kim J, Riel RU, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts [J]. Biol Chem, 2004, 279(20): 20 655-662.
- [9] Ruifrok WP, de Boer RA, Westenbrink BD, et al. Erythropoietin in cardiac disease: new features of an old drug [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 585(2-3): 270-277.
- [10] van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, et al. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(1): 125-133.
- [11] Ferrario M, Arbustini E, Massa M, et al. High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study [J]. Int J Cardiol, 2011, 147(1): 124-131.
- [12] Fonarow GC, Srikantlum P. Diabetic cardiomyopathy [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2006, 35(3): 575-599.
- [13] Zeisberg M, Strutz F, Müller GA, et al. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis [J]. J Nephrol, 2000, 13(Suppl 3): 111-120.
- [14] Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network [J]. JACC, 1989, 13(7): 1 637.
- [15] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation, 2003, 108(1): 79-85.

(此文编辑 曾学清)