

# 二甲双胍抑制血管紧张素 II 诱导的成年大鼠心脏成纤维细胞增殖

白剑, 张娜, 花颖, 王丙剑, 戴庆, 康丽娜, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心内科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 二甲双胍; 心脏成纤维细胞; 血管紧张素 II; 一氧化氮; 内皮型一氧化氮合酶

[摘要] **目的** 观察二甲双胍对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的成年大鼠心脏成纤维细胞 (CF) 增殖的影响, 并探讨其可能机制。**方法** 通过胰酶、胶原酶 II 联合消化法获取成年大鼠 CF, Ang II (100 nmol/L) 刺激 CF 建立细胞增殖模型, 并给予不同浓度 (10、50 及 200  $\mu$ mol/L) 二甲双胍进行干预。采用噻唑蓝法观察 CF 的增殖情况, EdU 掺入法测定 CF 的 DNA 合成能力。免疫印迹法检测内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (p-eNOS) 蛋白表达情况, 硝酸还原酶法测定 CF 培养上清一氧化氮 (NO) 含量。**结果** Ang II 刺激 48 h 能够明显促进成年大鼠 CF 增殖 ( $P < 0.05$ ), 二甲双胍呈浓度依赖性抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖, 二甲双胍呈浓度依赖性增加 CF 内 eNOS 磷酸化水平和 NO 含量 ( $P < 0.05$ ), eNOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 能阻断二甲双胍抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖的作用 ( $P < 0.05$ )。**结论** 二甲双胍能抑制 Ang II 诱导的成年大鼠 CF 增殖, 与二甲双胍激活 CF 内 eNOS/NO 通路有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Metformin Inhibits Angiotensin II-induced Proliferation of Adult Rat Cardiac Fibroblasts

BAI Jian, ZHANG Na, HUA Ying, WANG Bing-Jian, DAI Qing, KANG Li-Na, and XU Biao

(Department of Cardiology, Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] Metformin; Cardiac Fibroblast; Angiotensin II; Nitric Oxide; Endothelial Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of metformin on angiotensin II (Ang II)-induced proliferation of adult rat cardiac fibroblasts (CF) and its underlying mechanism. **Methods** The adult rat CF was isolated by a combination of trypsin and collagenase II digestion. The cell proliferation was induced by Ang II (100 nmol/L) stimulation, and the CF was treated with metformin in different concentrations (10, 50, and 200  $\mu$ mol/L). The proliferation of CF was evaluated by MTT assay, and the DNA synthesis was detected by EdU incorporation. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) were detected by Western blot. The level of NO in CF culture supernatant fluids was measured by nitrate reductase method. **Results** Stimulation with Ang II for 48 h induced the proliferation of adult rat CF, and this effect was inhibited by pretreatment of CF with metformin in a concentration-dependent manner. Metformin significantly increased the phosphorylation level of eNOS in CF as well as the level of NO in cell culture supernatant fluids in a concentration-dependent manner. In addition, pretreatment of CF with eNOS inhibitor L-NAME markedly attenuated the inhibitory effect of metformin on Ang II-induced cell proliferation. **Conclusion** Metformin inhibits Ang II-induced proliferation of adult rat CF, and this effect may be associated with the activation of the eNOS/NO pathway.

[收稿日期] 2014-09-01

[修回日期] 2014-12-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81000055, 81070195)

[作者简介] 白剑, 博士, 住院医师, 主要从事心力衰竭的药物和基因治疗、动脉粥样硬化的发病机制研究, E-mail 为 baijian100@126.com。张娜, 硕士, 主要从事冠心病的发病机制研究。通讯作者徐标, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心力衰竭和高血压的发病机制、心肌修复、心脏重构及血管内皮功能研究, E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。

心肌纤维化是心脏病理性重构的一个重要构成部分,在高血压、心肌梗死、心力衰竭等多种心血管疾病中广泛存在,可引起心功能不全、心律失常,甚至心脏性猝死,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>,其病理特征主要表现为心脏成纤维细胞(cardiac fibroblast, CF)增殖、胶原合成增加和各型胶原比率失调、排列紊乱<sup>[2]</sup>。二甲双胍是临床常用的降糖药物,近年来的研究表明二甲双胍具有心血管保护作用。Sasaki等<sup>[3]</sup>发现二甲双胍能够明显减轻心力衰竭动物心脏中的胶原沉积,并能改善心功能。另外, Xiao等<sup>[4]</sup>亦发现二甲双胍能够明显抑制后负荷过重引起的小鼠心肌纤维化,这些研究提示二甲双胍除了能够控制血糖,还具有抑制心肌纤维化的作用。本实验以成年大鼠 CF 为研究对象,探讨二甲双胍对血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)诱导的成年大鼠 CF 增殖的影响及其机制,为临床防治心肌纤维化及心脏病理性重构提供新的思路 and 实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

8 周龄雄性 SD 大鼠,由南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心提供;二甲双胍、噻唑蓝[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、N-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)购自 Sigma 公司;低糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;胶原蛋白酶 II 购自 Worthington 公司;5-乙炔基-2-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)检测试剂盒购自 Invitrogen 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;抗波形蛋白抗体购自 Abcam 公司;抗内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)抗体、抗磷酸化内皮型一氧化氮合酶(p-eNOS)(ser1177)抗体购自 BD 公司;抗 GAPDH 抗体购自 Millipore 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 抗体购自杭州联科生物公司。

### 1.2 成年大鼠 CF 的培养

参考文献[5],取 8 周龄雄性 SD 大鼠,腹腔注射氯胺酮(50 mg/kg)和地西泮(5 mg/kg)混合麻醉后,无菌条件下迅速取出大鼠心脏,预冷 PBS 缓冲液清洗,并去除心脏中的血管、心房及心包膜组织;将修剪后的心室剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的碎块,加入 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶,4℃ 冰箱过夜;12 h 后弃去胰酶,加入 0.1% 胶原蛋白酶 II,37℃ 消化 20

min,加入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 终止消化。消化的悬浊液经 200 目筛网过滤后,以 4℃、1500 r/min 离心 10 min;用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基重悬细胞,并接种到 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置入 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h,采用差速贴壁法,轻轻吸弃上清液(内含未贴壁的心肌细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等),剩下的贴壁细胞即为 CF,补充含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基继续培养。细胞生长达到 90% 汇合时按 1:3 传代,第 1 代细胞用波形蛋白抗体进行细胞纯度鉴定,选用第 2 代细胞进行实验。

### 1.3 实验分组及给药

给予成年大鼠 CF 不同浓度的二甲双胍或 L-NAME(100 μmol/L) + 二甲双胍预处理,1 h 后加入 Ang II(终浓度 100 nmol/L),并持续刺激 48 h 后进行增殖检测,实验分组:正常对照组、二甲双胍对照组(10、50、200 μmol/L)、Ang II 对照组(100 nmol/L)、L-NAME 对照组(100 μmol/L)、二甲双胍干预组(Ang II + 不同浓度二甲双胍)、L-NAME 干预组(Ang II + 200 μmol/L 二甲双胍 + 100 μmol/L L-NAME)。CF 给予不同浓度的二甲双胍刺激 12 h 后,检测细胞内 eNOS、p-eNOS(ser1171)的表达及上清中 NO 含量,实验分组:对照组、不同浓度(10、50、200 μmol/L)二甲双胍组。

### 1.4 MTT 法检测 CF 增殖

成年大鼠 CF 按 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 后分组处理,继续培养 48 h 后每孔分别加入 MTT(5 g/L) 20 μL,培养箱中孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 150 μL DMSO,用平板摇床振荡 10 min,酶标仪在 570 nm 波长处测定每孔的吸光度值,用只加培养液不加细胞的空白孔调零。每组均重复 3 次。

### 1.5 EdU 掺入法检测 CF DNA 合成

成年大鼠 CF 以 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔接种于预先铺有爬片的 6 孔板中,培养 24 h 后分组处理。处理结束后将 EdU 加入培养基中(终浓度为 10 μmol/L),37℃ 培养箱中继续培养 48 h;48 h 后取出细胞爬片,冷丙酮液固定 10 min,根据检测试剂盒提供的步骤检测 EdU;最后用 PBS 冲洗爬片,加入 DAPI(0.5 mg/L)避光孵育 10 min,PBS 冲洗后荧光封片剂封片,置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。EdU 阳性的细胞核呈红色荧光,提示该细胞发生 DNA 合成。每张爬片计数 10 个高倍视野,并计算每个视野中 EdU 阳性细胞比例,10 个视野取平均即为该爬片上 EdU 阳性

CF 的比例。每组均重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 eNOS、p-eNOS 的蛋白表达

成年大鼠 CF 给予不同浓度的二甲双胍(10、50、200  $\mu\text{mol/L}$ )孵育 12 h,冷 PBS 洗 2 遍,细胞刮刮下贴壁细胞,细胞裂解液裂解细胞后,收集裂解液于 4℃ 条件下以 12000 r/min (14400  $\times$  g) 离心 15 min,吸取上清液冻存。使用 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并转移至 PVDF 膜,封闭后加入一抗以 1:1000 稀释,GAPDH 抗体 1:3000 稀释,4℃ 过夜,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 均按 1:5000 稀释),化学发光法曝光显示相应条带,Quantity One 图像分析软件分析目标条带的光密度(optical density,OD)值。每组均重复 3 次。

1.7 NO 浓度检测

将成年大鼠 CF 以  $4 \times 10^4$  个细胞/孔接种于 24 孔板,培养 24 h 后给予不同浓度的二甲双胍(10、50、200  $\mu\text{mol/L}$ )孵育 12 h,收集细胞培养上清液,用硝酸还原酶法检测 NO 浓度,具体操作步骤按 NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行。每组均重复 3 次。

1.8 统计学方法

所有计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的均值比较采用成组比较的  $t$  检验,多组间的均值比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成年大鼠 CF 的鉴定

倒置显微镜下,原代成年大鼠 CF 呈梭形或多角形,胞质淡而几乎透明,显得很薄,折光性弱;细胞核较大,呈椭圆形,无自发性搏动。取培养的第 1 代细胞进行波形蛋白免疫荧光染色,激光共聚焦荧光显微镜下可见 CF 胞浆呈绿色荧光(波形蛋白阳性),超过 95% 的细胞为波形蛋白染色阳性,提示培养获得的 CF 纯度较高(图 1)。

2.2 二甲双胍对 Ang II 诱导的 CF 增殖的影响

Ang II (100 nmol/L) 刺激细胞 48 h 后 CF 增殖明显增加 ( $P < 0.05$ ),而二甲双胍(10、50、200  $\mu\text{mol/L}$ )可以呈浓度依赖性抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖 ( $P < 0.05$ )。Ang II (100 nmol/L) 刺激细胞 48 h 显著增加 CF 的 DNA 合成能力 ( $P < 0.05$ ),而二甲双胍(10、50、200  $\mu\text{mol/L}$ )呈浓度依赖性抑制

Ang II 诱导的 CF 的 DNA 合成 ( $P < 0.05$ ;图 2)。

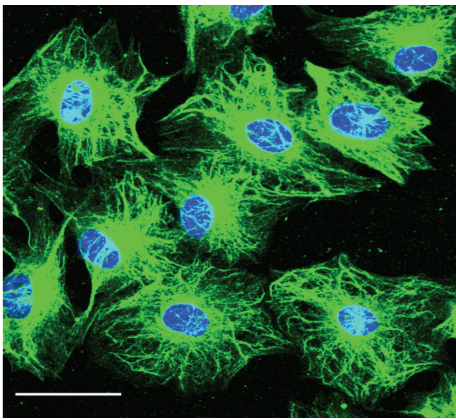


图 1. 波形蛋白免疫荧光染色鉴定成年大鼠 CF(比例尺 = 50  $\mu\text{m}$ )

Figure 1. Immunofluorescence staining of adult rat CF with vimentin

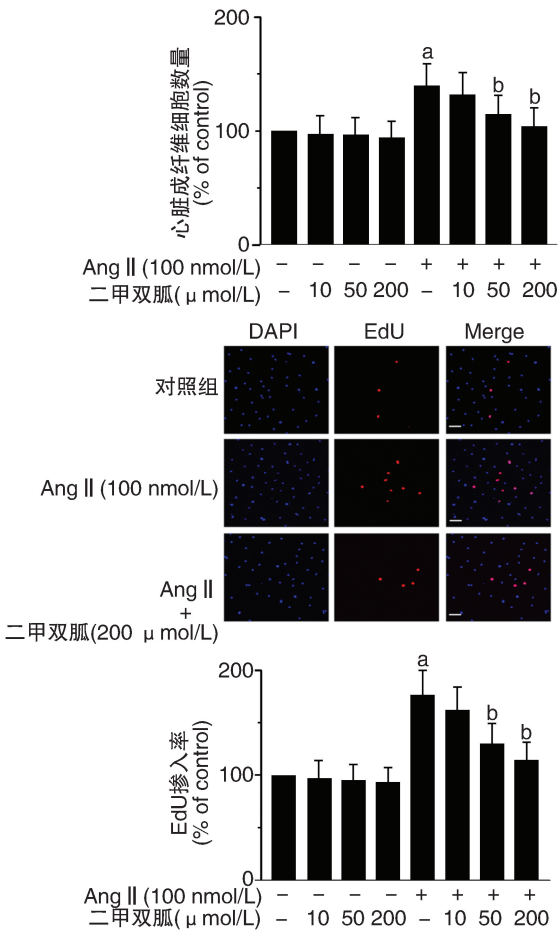


图 2. 二甲双胍抑制 Ang II 诱导的成年大鼠 CF 增殖(比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) a 为  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 Ang II 对照组比较。

Figure 2. Metformin inhibits Ang II-induced adult rat CF proliferation

2.3 二甲双胍对 CF 内 eNOS/NO 活性的影响

二甲双胍刺激 CF 12 h 对 CF 内总 eNOS 蛋白表达无明显影响,但呈剂量依赖性地促进 eNOS 磷酸化( $P < 0.05$ )。随着二甲双胍浓度(10、50 和 200  $\mu\text{mol/L}$ )的增加,细胞培养液中 NO 浓度明显增加( $P < 0.05$ ;图 3)。

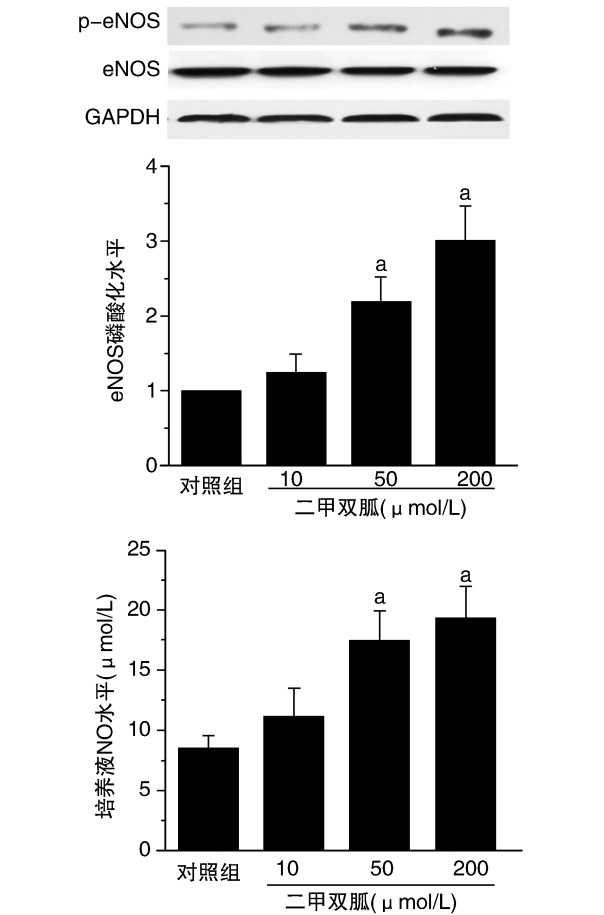


图 3. 二甲双胍增加 CF 内 eNOS 的磷酸化和细胞培养液中 NO 浓度 a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Figure 3. Metformin increases the phosphorylation of eNOS in adult rat CF and the concentration of nitric oxide in cell culture medium

2.4 eNOS/NO 通路在二甲双胍抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖中的作用

MTT 法和 EdU 掺入法显示,eNOS 抑制剂 L-NAME(100  $\mu\text{mol/L}$ )对 CF 的增殖并无影响;二甲双胍明显抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖作用,但该抑制作用被 L-NAME 抵消( $P < 0.05$ ;图 4)。

3 讨论

二甲双胍是临床广泛应用的一线降糖药物,近

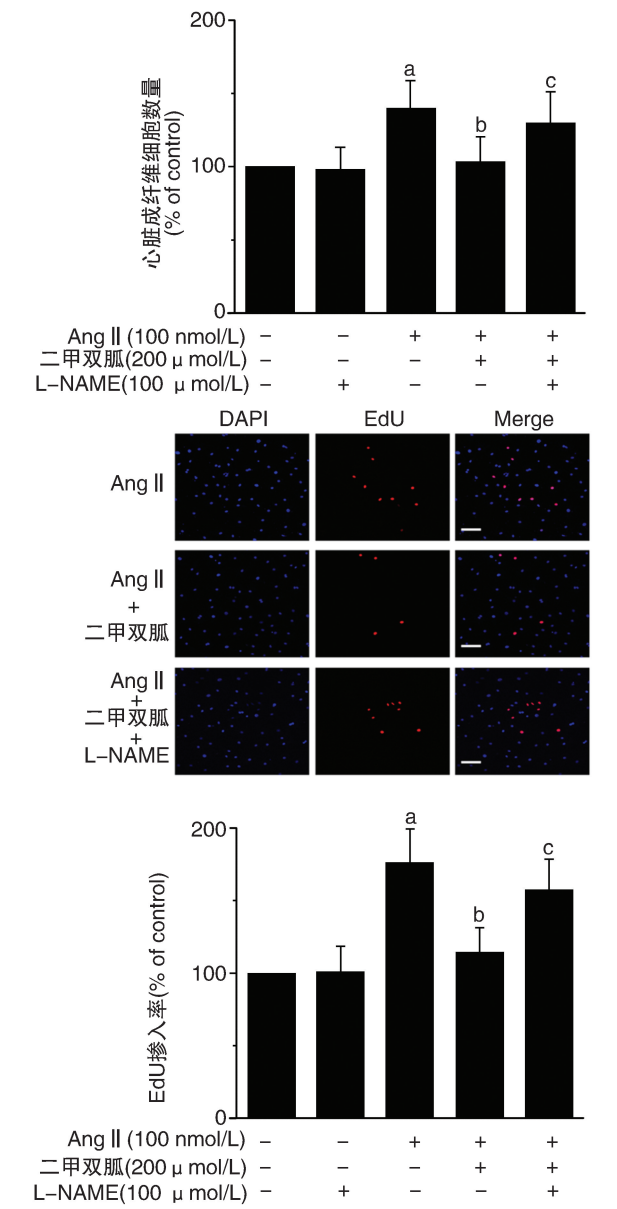


图 4. L-NAME 阻断二甲双胍抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖的作用(比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ , 与 Ang II 对照组比较;c 为  $P < 0.05$ , 与二甲双胍干预组比较。

Figure 4. L-NAME attenuates the inhibitory effect of metformin on Ang II-induced adult rat CF proliferation

年来越来越多的证据表明二甲双胍除了能够降低血糖、改善胰岛素抵抗,还具有独立的心血管保护作用(不依赖于其降糖作用)。UKPDS 研究发现二甲双胍治疗可以显著减少肥胖糖尿病患者心血管事件发生率和全因死亡率<sup>[6]</sup>;Eurich 等<sup>[7]</sup>通过 Meta 分析发现,对于糖尿病合并心力衰竭的患者,二甲双胍是唯一能够减少全因死亡率的降糖药物,提示二甲双胍具有较强的保护心功能的作用。近年来的动物实验发现二甲双胍能够明显抑制实验动物



(狗、小鼠、大鼠)的心肌纤维化,从而改善心室重构、提高心脏功能<sup>[3,4,8]</sup>。因此,抑制心肌纤维化可能是二甲双胍心脏保护的重要机制之一。

本研究以体外培养的成年大鼠 CF 为模型,通过 Ang II 诱导 CF 增殖,建立细胞增殖模型,并采用 MTT 法及 EdU 掺入法来评估 CF 的增殖情况,结果一致证实,Ang II (100 nmol/L)持续刺激细胞 48 h 可明显促进 CF 增殖,而二甲双胍能够呈剂量依赖性地抑制 Ang II 诱导的成年大鼠 CF 增殖。由于 CF 是心肌纤维化的主要效应细胞,其过度增殖和胶原表达增多是心肌纤维化的重要病理基础<sup>[9]</sup>。因此,这一研究结果提示二甲双胍可以通过抑制 CF 的增殖来抑制心肌纤维化。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是细胞能量调节的感受器,也是二甲双胍的主要效应物,研究表明二甲双胍的降糖效应主要通过激活 AMPK 来介导<sup>[10-11]</sup>。最近, Gundewar 等<sup>[12]</sup>发现二甲双胍抑制小鼠心肌梗死后心室重构的作用亦主要通过激活心脏中的 AMPK 及其下游的 eNOS 通路来实现的。在循环系统中, eNOS 是 AMPK 下游的一个重要靶标,激活的 AMPK 可以促进 eNOS ser1177 位点的磷酸化,增加 NO 水平<sup>[13-14]</sup>。而 NO 可以作为细胞信使分子,激活细胞内可溶性鸟苷酸环化酶,进而升高细胞内环鸟苷酸水平,抑制 CF 的生长与增殖<sup>[15]</sup>。

为探讨相关的信号转导机制,本研究检测了不同浓度二甲双胍对 CF 内 eNOS/NO 活性的影响,结果发现二甲双胍呈浓度依赖性增加 CF 内 eNOS 的磷酸化水平和细胞培养液中 NO 的浓度,提示二甲双胍能够激活 CF 内的 eNOS/NO 通路;而进一步的研究发现, eNOS 抑制剂 L-NAME 可阻断二甲双胍抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖的作用。因此我们推断,二甲双胍抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖的作用主要与其激活 CF 内的 eNOS/NO 通路有关。

综上所述,本研究发现二甲双胍可以抑制 Ang II 诱导的成年大鼠 CF 增殖,这一作用与二甲双胍激活 CF 内的 eNOS/NO 通路有关。这一研究结果为二甲双胍的心脏保护作用提供了进一步的理论依据,也为临床防治心肌纤维化提供新的治疗思路。

# [参考文献]

[1] Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac

fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71 (4): 549-574.

- [2] 唐惠芳, 吴书林, 邓春玉. 辛伐他汀减轻舒张功能不全心力衰竭大鼠心肌纤维化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (11): 976-980.
- [3] Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs; role of AMP-activated protein kinase [J]. Circulation, 2009, 119 (19): 2 568-577.
- [4] Xiao H, Ma X, Feng W, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF beta1-Smad3 signalling pathway [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87 (3): 504-513.
- [5] Teunissen BE, Smeets PJ, Willemsen PH, et al. Activation of PP-ARdelta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75 (3): 519-529.
- [6] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)[J]. Lancet, 1998, 352 (9131): 854-865.
- [7] Eurich DT, McAlister FA, Blackburn DF, et al. Benefits and harms of antidiabetic agents in patients with diabetes and heart failure: systematic review[J]. BMJ, 2007, 335 (7618): 497.
- [8] Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, et al. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301 (2): H 459-468.
- [9] Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation[J]. Circ Res, 2010, 106 (11): 1 675-680.
- [10] Musi N, Hirshman MF, Nygren J, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51 (7): 2 074-081.
- [11] Kristensen JM, Treebak JT, Schjerling P, et al. Two week of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306 (10): E1 099-109.
- [12] Gundewar S, Calvert JW, Jha S, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure [J]. Circ Res, 2009, 104 (3): 403-411.
- [13] Lee CH, Lee SD, Ou HC, et al. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15 (6): 10 334-349.
- [14] 陈 灿, 刘江华, 祖旭宇, 等. 胰岛素信号通路与动脉粥样硬化 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (1): 62-66.
- [15] Wang S, Wang X, Yan J, et al. Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts; correlated with NO-cGMP signalling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 567 (1-2): 26-35.

(此文编辑 文玉珊)