

挤压伤大鼠血清促心脏成纤维细胞增殖作用

刘水平, 陈玉川, 王江峰, 成建定, 刘小山, 李朝晖
(中山大学中山医学院法医病理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要【目的】观察挤压伤大鼠血清对培养的心脏成纤维细胞的增殖作用。【方法】培养 1~3 d 龄 SD 大鼠心脏成纤维细胞, 观察挤压伤大鼠血清和正常大鼠血清对培养的心脏成纤维细胞数量、蛋白质含量、 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶核苷($[^3\text{H}]$ -TdR)和 $[^3\text{H}]$ -脯氨酸($[^3\text{H}]$ -Proline)掺入的影响。【结果】与正常大鼠血清组比较, 挤压伤大鼠血清使培养的心脏成纤维细胞的数量($\times 10^9/\text{L}$)、总蛋白含量($\mu\text{g}/2\text{mL}$)分别由 0.33 ± 0.01 、 163.3 ± 24.1 增加至 0.50 ± 0.02 和 324.6 ± 52.2 , $[^3\text{H}]$ -Proline 和 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入后测得的每分钟脉冲数则分别由 1211.7 ± 140.7 、 1104.8 ± 113.9 上升至 2000.7 ± 96.2 和 2066.2 ± 223.5 。【结论】肢体挤压伤大鼠血清可促进培养的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成。

关键词 挤压; 损伤; 成纤维细胞; 增殖

中图分类号 R541

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2003)06-0544-03

Effects of Crush Injury Rat Serum on Cell Proliferation in Cultured Cardiac Fibroblasts

LIU Shui-ping, CHEN Yu-chuan, WANG Jiang-feng, CHENG Jian-ding, LIU Xiao-shan, LI Zhao-hui
(Department of Forensic Pathology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of crush injury rat serum on cell proliferation in cultured neonatal rat cardiac fibroblasts. 【Methods】1-3 d old neonatal rat cardiac fibroblasts were cultured *in vitro* and the effects of crush injury rat serum on cell numbers, total protein content, $[^3\text{H}]$ -TdR and $[^3\text{H}]$ -Proline incorporation were observed in cultured rat cardiac fibroblasts. 【Results】Compared with normal rat serum group, crush injury rat serum increased cell numbers ($\times 10^9/\text{L}$) and total protein contents ($\mu\text{g}/2\text{mL}$) of cardiac fibroblasts from 0.33 ± 0.01 , 163.3 ± 24.1 to 0.50 ± 0.02 and 324.6 ± 52.2 , the CPM of $[^3\text{H}]$ -Proline and $[^3\text{H}]$ -TdR after incorporation increased from 1211.7 ± 140.7 , 1104.8 ± 113.9 to 2000.7 ± 96.2 , 2066.2 ± 223.5 . 【Conclusion】Crush injury rat serum can increase cell proliferation and collagen synthesis in cultured rat cardiac fibroblasts.

Key words: crush; injury; fibroblast; proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(6): 544 ~ 545]

对于挤压伤所致心脏损伤的具体机理, 目前尚未完全阐明。作者前期研究表明, 挤压伤早期心脏损伤与血浆心钠素(ANP)和内皮素-1(ET-1)失衡及心脏 ANP 和 ET-1 分泌失调有重要联系^[1, 2], 挤压伤大鼠血清可促进培养的新生大鼠心肌细胞肥大, 影响心肌细胞的功能^[3]。心脏包含心肌细胞和

心脏间质细胞, 心肌细胞数量仅占心脏细胞总数的 1/3, 间质细胞占心脏细胞总数的 2/3, 其中成纤维细胞占间质细胞的 90%。成纤维细胞对心肌细胞结构具有支持、保护作用, 并具有自分泌和旁分泌功能, 能合成和分泌生物活性物质, 调节自身胶原的产生及周围心肌细胞的形态结构和生理功

收稿日期 2003-06-08

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(950301); "211 工程"重点学科建设基金资助项目(中山医科大学 98)

作者简介 刘水平(1968-), 男, 江西南丰人, 博士, 讲师. E-mail: liu@gzsums.edu.cn

能,维持心脏的正常生长^[4]。病理状态下,心脏成纤维细胞增生和胶原纤维在间质中异常聚集可影响心脏的硬度和心室功能^[5]。基于上述原因,本实验观察挤压伤大鼠血清对培养的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响,探讨挤压伤后心脏损伤过程中心脏成纤维细胞功能的改变,拟进一步阐明挤压伤大鼠心脏损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠血清制备

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠由中山大学中山医学院实验动物中心提供,采用文献[1]的方法复制挤压伤模型,12 h后断颈取血,常规分离血清,过滤除菌,-20℃保存;正常大鼠血清以相同方法制备。

1.2 心脏成纤维细胞的培养

经差速贴壁后获得的心脏成纤维细胞,加入含体积分数10%小牛血清的DMEM培养液继续培养,至融合状态时进行传代,实验用2~3代成纤维细胞。

1.3 细胞计数

将已传代1~2次的成纤维细胞接种于25 mL培养瓶中,每瓶2 mL(0.1×10⁹/L),每5瓶为1组,待细胞长至亚融合状态,将培养基换含体积分数0.4%血清DMEM液培养,24 h后分别加入正常大鼠血清和挤压伤大鼠血清0.3 mL继续培养48 h,移去培养液,用PBS洗涤,加入等量的1.25 g/L胰蛋白酶37℃消化细胞,使之悬浮,然后进行细胞计数。

1.4 心脏成纤维细胞的蛋白定量

将0.5×10⁹/L细胞接种于25 mL培养瓶中,每瓶2 mL,24 h更换为含体积分数0.4%血清的DMEM培养液,48 h加入挤压伤大鼠血清,对照组加入正常大鼠血清,血清的终体积分数为15%,培养48 h后收集细胞于离心管中,PBS溶液洗2次,加入体积分数10%预冷的三氯乙酸4℃放置30 min,移去三氯乙酸,加入1 mol/L NaOH 0.5 mL以溶解蛋白,室温放置2 h,用Bradford法测细胞总蛋白含量^[6]。

1.5 心脏成纤维细胞 [³H]-脯氨酸([³H]-Proline)和 [³H]-胸腺嘧啶核苷([³H]TdR)掺入测定

将已传代1~2次的成纤维细胞接种于25 mL培养瓶中,每瓶2 mL(0.1×10⁹/L),每5瓶为1组,待细胞长至亚融合状态,将培养基换含体积分数0.4%血清DMEM液培养,24 h后每瓶加入 [³H]-Proline 或 [³H]TdR 7.4×10⁴Bq 以及正常或挤压伤大鼠血清,继续培养48 h,移去培养液,用D-Hanks液充分冲洗,以洗去游离的同位素,用体积分数10%三氯乙酸4℃固定30 min,再用预冷的PBS液清洗2次,最后用含10 g/L SDS的0.1 mol/L的NaOH溶液0.5 mL裂解细胞,37℃,12 h后收集裂解液,取0.2 mL于含有5 mL闪烁液(二甲苯闪烁液3 mL,无水乙醇2 mL)的测量杯中,摇匀放置在液体闪烁计数仪上进行放射活性计数测定。

1.6 统计学处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验组同对照组比较用 *t* 检验,检验水准,α=0.05。

2 结果

表1为挤压伤大鼠血清对培养的心脏成纤维细胞数量和总蛋白含量的影响结果。大鼠心脏成纤维细胞传代培养48 h后,细胞呈梭形,并互相融合,与正常血清处理的大鼠心脏成纤维细胞组比较,挤压伤大鼠血清能明显增加培养的大鼠心脏成纤维细胞数量和蛋白质含量($P < 0.01$)。

表1 挤压伤大鼠血清对培养的心脏成纤维细胞数量和蛋白含量的影响

Table 1 Effects of crush injury rat serum on cell number and total protein content in cultured cardiac fibroblasts $\bar{x} \pm s$

| Group | <i>n</i> | Cell number (×10 ⁹ /L) | Protein content (μg/2 mL) |
|------------------------|----------|--------------------------------------|------------------------------|
| Normal rat serum | 6 | 0.33±0.01 | 163.3±24.1 |
| Crush injury rat serum | 6 | 0.50±0.02 ¹⁾ | 324.6±52.2 ¹⁾ |

1) Compare with normal rat serum, $P < 0.01$

表2为挤压伤大鼠血清对培养的心室成纤维细胞 [³H]-proline 和 [³H]-TdR 掺入的影响结果,以相同浓度的正常大鼠血清处理的心脏成纤维细胞组相比,15%挤压伤大鼠血清能显著增加心脏成纤维细胞 [³H]-proline 和 [³H]-TdR 的掺入量($P < 0.01$)。

表2 挤压伤大鼠血清对培养的心室成纤维细胞 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入的影响

Table 2 Effects of crush injury rat serum on $[^3\text{H}]$ -proline and $[^3\text{H}]$ -TdR incorporation in cultured cardiac fibroblasts

| Group | n | $\bar{x} \pm s, \text{min}^{-1}$ | |
|------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | $[^3\text{H}]$ -proline | $[^3\text{H}]$ -TdR |
| Normal rat serum | 6 | 1 211.7 \pm 140.7 | 1 104.8 \pm 113.9 |
| Crush injury rat serum | 6 | 2 000.7 \pm 96.2 ¹⁾ | 2 066.2 \pm 223.5 ¹⁾ |

1) Compare with normal rat serum, $P < 0.01$

3 讨论

研究表明,成纤维细胞对其周围的心肌细胞起支持、保护作用,并分泌某些可溶性物质,以营养心肌细胞、影响自身和周围心肌细胞的结构和功能^[1-3]。心脏成纤维细胞能合成细胞外基质蛋白,如I型和III型胶原纤维、基底膜IV型胶原、纤维连接蛋白和层粘连蛋白。基质的合成与分解保持平衡状态是心脏正常发育和完美功能的关键^[7]。

本实验表明,与正常大鼠血清比较,挤压伤大鼠血清能明显促进培养新生大鼠心脏成纤维细胞数量,总蛋白含量, $[^3\text{H}]$ -proline 和 $[^3\text{H}]$ -TdR 的掺入。细胞 $[^3\text{H}]$ -proline 掺入的增加表明细胞胶原蛋白合成增加,而 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入是检测细胞DNA合成的敏感指标, $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入增加说明细胞分裂增多,综合上述指标分析,挤压伤大鼠血清能促进心脏成纤维细胞胶原的合成和细胞增殖。心脏成纤维细胞增生和胶原纤维在间质中的异常聚集可影响心脏的硬度和心室功能,心脏成纤维细胞在心脏的病理重塑中起重要作用^[5],心脏成纤维细胞所合成的I型和III型胶原纤维,是心脏间质的主要组成部分,心脏胶原纤维基质的结构重塑可引起心脏收缩和舒张功能的障碍,最终导致心力衰竭^[8]。

作者的前期研究表明,挤压伤大鼠血清可显著

增加培养大鼠心肌细胞表面积、蛋白质含量及 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸($[^3\text{H}]$ -Leu)掺入率,引起心肌细胞的肥大^[3]。结合本实验说明,挤压伤大鼠心脏损伤在一定程度上与心肌细胞的肥大和心脏成纤维细胞增殖有关,但上述效应是血浆中的何种生物活性物质所致,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘水平,陈玉川,郭薇,等. 肢体挤压伤大鼠早期心脏损伤的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(12): 729.
- [2] 刘水平,陈玉川,郭薇,等. 挤压伤大鼠血浆内皮素含量与心脏损伤的关系[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(1): 27.
- [3] 刘水平,陈玉川,郭薇,等. 挤压伤大鼠血清对心肌细胞蛋白质合成的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11): 1429.
- [4] Harada M, Itoh H, Nakagawa O, *et al.* Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes[J]. Circulation, 1997, 96(10): 3737.
- [5] Weber K T, Brilla C G. Myocardial fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20(Suppl 1): S48.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1): 248.
- [7] Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation[J]. Basic Res Cardiol, 1992, 87(Suppl 2): 183.
- [8] Brilla C G, Rupp H. Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure[J]. Cardiologia, 1994, 39(12 Suppl 1): 389.

(编辑 黄小延)