

心室成纤维细胞促进新生大鼠心肌细胞肥大的作用

龚素珍, 刘培庆, 鲁伟, 符史干, 潘敬远

(中山医科大学生理教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究新生大鼠心室成纤维细胞条件培养液促进心肌细胞肥大的作用。【方法】成纤维细胞和心肌细胞培养。【结果】成纤维细胞条件培养液能明显增大心肌细胞的表面积, 增加心肌细胞的蛋白含量和 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 的掺入, 上述作用以第3天的条件培养液作用最强, 具有剂量依赖性。内皮素A受体(ETAR)拮抗剂BQ₁₂₃能部分阻断成纤维细胞条件培养液促进心肌细胞肥大作用, 而血管紧张素II(Ang II)的I型受体拮抗剂CV11974和 α -肾上腺素受体拮抗剂酚胺唑啉(regitin)却无此效果。百日咳毒素(PTX)和蛋白激酶C(PKC)抑制剂staurosporine(ST)也能部分阻断成纤维细胞条件培养液促进心肌细胞肥大作用。【结论】成纤维细胞条件培养液(FCGM)中含有促使心肌细胞肥大的物质, 这些物质可能是内皮素-1(ET-1)等, 培养液的促肥大作用可能与PTX敏感的G蛋白及PKC有关。

关键词: 成纤维细胞; 心肌/药物作用; 肥大/药物作用; 细胞培养

中图分类号: R 331.36 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0171-05

The Effect of Ventricular Fibroblast Promotion Hypertrophy on Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes

GONG Su-zhen, LIU Pei-qing, LU Wei, FU Shi-gan, PAN Jing-yun

(Department of Physiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To study the effect of ventricular fibroblast promotion hypertrophy on cultured neonatal rat cardiomyocytes. 【Method】Culture of fibroblast and cardiomyocyte. 【Results】Cultured neonatal rat ventricular fibroblast conditioned growth medium (FCGM) could significantly increase cell surface area and protein content, and promote $[^3\text{H}]\text{-leucine}$ incorporation on neonatal rat cardiomyocyte, this response was the strongest in the third day, and had dose-dependent effect. BQ₁₂₃, an endothelin A type receptor antagonist, partially blocked the hypertrophy effect, but angiotensin II (Ang II) I-type receptor antagonist CV11974 and α -adrenergic receptor antagonist regitin did not. The FCGM-induced increase in cardiomyocyte protein synthesis and cell surface area was inhibited partly by pertussis toxin (PTX) and PKC inhibitor staurosporine (ST). 【Conclusions】There were substances on promotion-hypertrophy of cardiomyocytes in FCGM, they might be ET-1 and others. The hypertrophic response was related with PTX sensitive G protein and PKC.

Key words: fibroblast; myocardium/pharmacology; hypertrophy/pharmacology; cell culture

心脏由心肌细胞和非心肌细胞组成。非心肌细胞, 主要是成纤维细胞, 其次是内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞等。心肌细胞和非心肌细胞在功能、分化能力以及心脏中的所占百分比等方面均明显不同。心肌细胞收缩能力强、出生后无分化能

力、占心脏细胞总数的30%^[1]; 非心肌细胞中除平滑肌细胞外均无收缩能力、但具有很强的分化能力、占心脏细胞的70%^[1]。过去很长一段时间, 人们一直认为非心肌细胞对心肌细胞仅具有结构上的支持、保护作用, 近年来, 人们逐渐了解到非心肌

收稿日期: 1999-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870888)

作者简介: 龚素珍(1965-), 女, 江西永修人, 博士生, 助理研究员。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

细胞还具有自分泌和旁分泌功能,能产生某些可溶性物质,影响心肌细胞的结构和生理功能,对心脏具有重塑作用(remodeling)^[2-5]。成纤维细胞在非心肌细胞中占绝大部分,作者利用新生大鼠心脏成纤维细胞条件培养液(fibroblast conditioned growth medium, FCGM),探讨成纤维细胞是否分泌活性物质来影响心肌细胞结构和功能,以及它们作用的可能的信号传导途径。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞和心脏成纤维细胞的分离和培养

取1~3 d龄的SD大鼠(雌雄不限,中山医科大学实验动物中心提供),在无菌条件下开胸取出心脏,立即置入4℃D-Hanks液中,剪取心室肌,充分洗净残血,剪成1 mm³大小的碎块,弃去D-Hanks液,加入0.08 g/L胰蛋白酶8~10 mL,在磁力搅拌器上37℃消化8~10 min,弃去首次的消化悬液,加入胰蛋白酶消化液消化10 min,如此重复消化,直至组织块消失。分别收集每次消化悬液,加等量含 $\varphi=4\%$ 血清DMEM培养液(Sigma)离心(2 000 r/min, 800型离心沉淀器,半径为5 cm),弃上清,加入含 $\varphi=10\%$ 血清DMEM培养液,吹散沉淀细胞,同条件下再次离心,将各次离心后沉淀细胞合并, $\varphi=10\%$ 血清DMEM培养液制成细胞悬液,分种于25 mL玻璃培养瓶中,置37℃、 $\varphi=5\%$ CO₂培养箱内,根据心肌细胞和成纤维细胞贴壁时间的不同,采用差速贴壁1 h,分别获得心肌细胞和成纤维细胞。培养的前48 h,在心肌细胞的培养液中加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)0.1 mmol/L,以抑制成纤维细胞的增殖。

1.2 成纤维细胞条件培养液(FCGM)的获取

将成纤维细胞传代,接种于50 mL的玻璃培养瓶至融合状态,在含 $\varphi=1\%$ 血清DMEM培养液中孵育24 h,然后置入8 mL/瓶的无血清培养液(DMEM、胰岛素10 mg/L、转铁蛋白10 mg/L、Vit C 100 μ mol/L、Vit B₁₂ 1.5 μ mol/L、青霉素 1×10^5 U/L、链霉素100 mg/L)。在第3天、第5天、第7天和第9天分别收集成纤维细胞的条件培养液,用0.45 μ m滤膜过滤,贮于-20℃,待用。传代后的成纤维细胞,采用抗鼠sarcomeric-actin抗体^[9]免疫细胞化学染色鉴别,纯度达95%。

1.3 心肌细胞表面积[A/(μ m²)]测定

将贴壁生长的心肌细胞消化脱落后,用图象处

理系统测定心肌细胞的周径和表面积,每瓶测5个视野,每个视野测15~20个细胞,取其平均值。每组2瓶,重复3次实验。

1.4 心肌细胞蛋白质[m(protein in a flask)/(μ g)]测定

差速贴壁后,吸出未贴壁的心肌细胞悬液,配成约 0.4×10^9 /L,以3 mL的液体量接种于25 mL的玻璃培养瓶中。48 h后换为含 $\varphi=1\%$ 血清的DMEM培养液,72 h换为FCGM,同时加入多种干预因素,培养72 h后收集细胞,用Bradford法^[7]测定心肌细胞蛋白质含量,并根据各瓶细胞数,计算出每瓶细胞的总蛋白质含量和每个心肌细胞的蛋白质含量。实验重复3次。

1.5 心肌细胞的[³H]-Leu掺入(n[³H]-Leu incorporation)/(min⁻¹)测定

将含有0.1 mmol/L Brdu、计数值为 0.4×10^9 /L的心肌细胞接种于24孔培养板上,每孔1 mL,48 h换为含 $\varphi=1\%$ 血清DMEM培养液,72 h换为含有[³H]-Leu 37 kBq/孔(北京原子能研究所)以及各种干扰因素的FCGM,继续培养72 h,用D-Hanks液充分冲洗,以洗去游离的同位素,将细胞收集于玻璃纤维滤膜上,然后用 $\varphi=10\%$ 三氯乙酸和无水乙醇再冲洗。滤膜烘干后置于含4 mL闪烁液的液闪杯中,用FJ-2107P液体闪烁仪(国营二六二厂制造)测定放射性强度。实验重复3次。

1.6 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间数据处理根据处理方差齐性分析结果,采用非配对t检验, $P<0.05$ 被认为有意义。

2 结果

2.1 FCGM对培养新生大鼠心肌细胞表面积、蛋白质含量及[³H]-Leu掺入的影响

无血清DMEM培养液培养成纤维细胞,与未经成纤维细胞培养过的无血清DMEM培养液(C)相比,第3天、第5天和第7天的FCGM明显增加心肌细胞表面积、蛋白质含量和[³H]-Leu掺入(图1),而心肌细胞计数值无明显变化(0.4×10^9 /L)。同时,照片显示经FCGM培养72 h的心肌细胞(图2A)明显大于无血清DMEM培养液培养72 h的心肌细胞(图2B)。

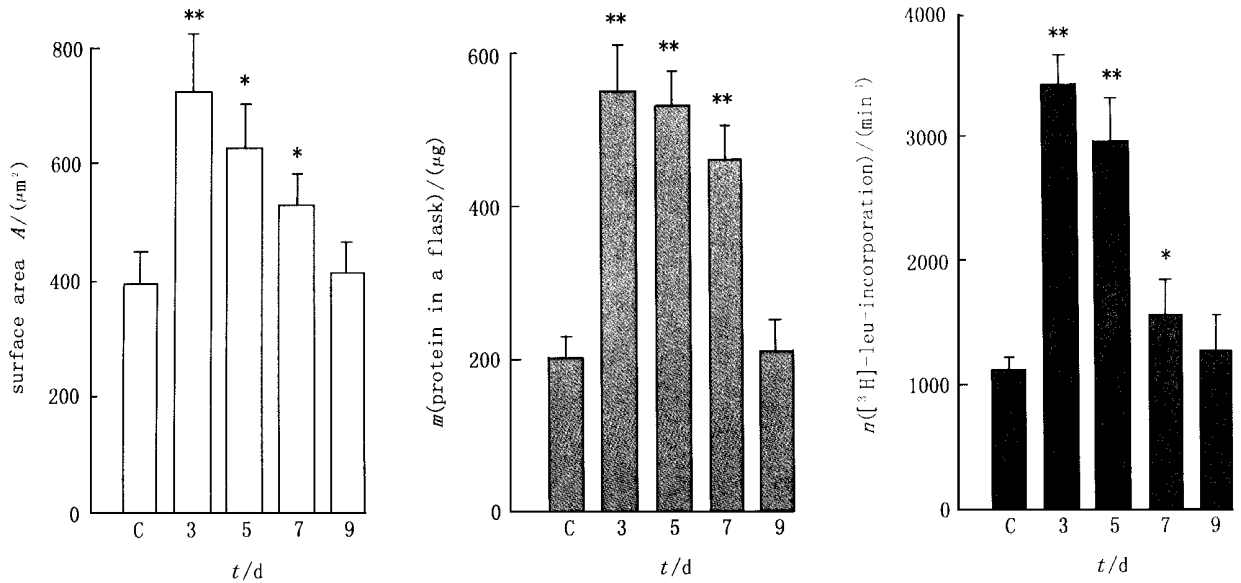


图1 不同时间收集的FCGM对心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]$ -Leu掺入的影响

Fig. 1 Effect of collected FCGM at different time on cell surface area protein

content and $[^3\text{H}]$ -Leu incorporation at cardiomyocytes

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control group

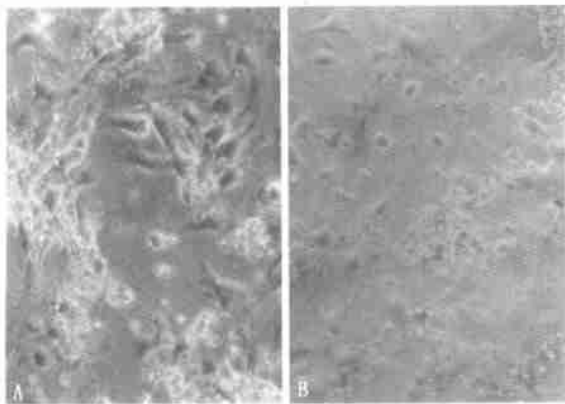


图2 培养的心肌细胞

Fig. 2 Cultured cardiomyocyte

A: Cardiomyocyte cultured for 72 h by FCGM ($\times 150$); B: Cardiomyocyte cultured for 72 h by serum-free DMEM ($\times 150$)

用第3天收集的FCGM与无血清DMEM培养液混合,配成含不同体积分数(100%、80%、60%、40%和20%)的培养液培养心肌细胞72 h,然后测定心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]$ -Leu掺入。与无血清DMEM培养液(C)相比,含40%以上的FCGM的培养液,能增加心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]$ -Leu掺入(图3)。心肌细胞计数值无明显变化($0.4 \times 10^9/\text{L}$)。

2.2 BQ123、CV11974和酚胺唑啉(regitin)对ECGM促进心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]$ -Leu掺入的影响

无血清DMEM培养液(C)培养心肌细胞3 d,其表面积为(395.8 ± 55.0) μm^2 ,蛋白质含量为(475.3 ± 49.2) μg , $[^3\text{H}]$ -Leu掺入率为(1139.3 ± 89.7) min^{-1} ,第3天收集的FCGM培养心肌细胞3 d,细胞表面积为(722.1 ± 126.4) μm^2 ,蛋白含量为(987.5 ± 101.5) μg , $[^3\text{H}]$ -Leu掺入率为(3463.4 ± 204.7) min^{-1} ,上述数据比较, $P < 0.05$ 。FCGM能明显增加心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]$ -Leu掺入。内皮素A型受体(ETAR)拮抗剂BQ123(1×10^{-6} mol/L)和FCGM共同孵育心肌细胞3 d时,细胞表面积为(496.3 ± 56.0) μm^2 ,蛋白含量为(506.3 ± 53.6) μg , $[^3\text{H}]$ -Leu掺入率为(2546.8 ± 304.5) min^{-1} ;血管紧张素II(Ang II)的I型受体拮抗剂CV11974(0.1×10^{-3} mol/L)和FCGM共同孵育心肌细胞3 d时,细胞表面积为(714.5 ± 81.6) μm^2 ,蛋白含量为(962.1 ± 77.0) μg , $[^3\text{H}]$ -Leu掺入率为(3348.4 ± 494.2) min^{-1} , α -肾上腺素受体拮抗剂regitin(1×10^{-6} mol/L)和FCGM共同孵育心肌细胞3 d时,细胞表面积为(689.7 ± 73.1) μm^2 ,蛋白含量为(977.3 ± 89.1) μg , $[^3\text{H}]$ -Leu掺入率为(3491.7 ± 445.7) min^{-1} ,结果显示ET_A受体拮抗剂BQ123可

以阻断 FCGM 的这种作用, Ang II 的 I 型受体拮抗剂 CV11974 和 α -肾上腺素受体拮抗剂 regitin 无阻

断作用。心肌细胞计数值为 $1 \times 10^9/L$ 。

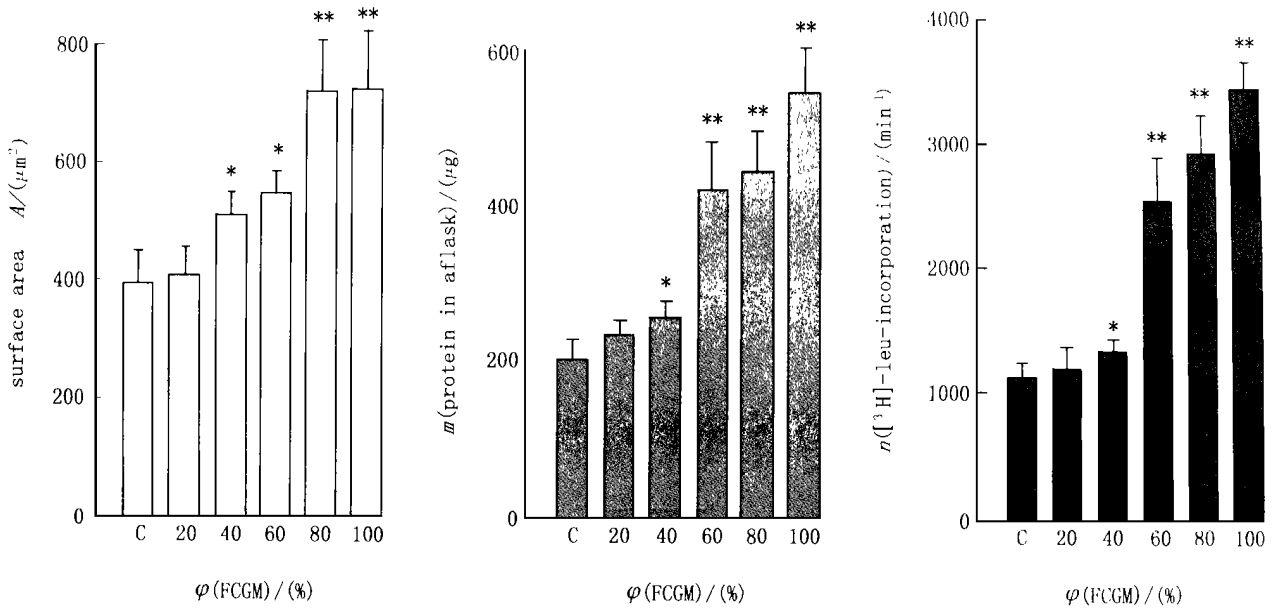


图3 不同体积分数的 FCGM 对心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入的影响

Fig. 3 Effect of different volume fraction of FCGM on cell surface area, protein content and $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ incorporation in cardiomyocytes

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control group

2.3 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 和蛋白激酶 C 对 FCGM 促进心肌细胞表面积、细胞蛋白质含量和 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入的影响

实验用第 3 天收集的 FCGM 在无血清 DMEM 培养液中用 PTX (1×10^{-6} mol/L) 预处理 1 h, 再换为含有 PTX (1×10^{-6} mol/L) 的 FCGM 培养心肌细胞 72 h, 细胞表面积为 $(510.2 \pm 65.7) \mu\text{m}^2$, 蛋白含量为 $(520.1 \pm 34.7) \mu\text{g}$, $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入率为 $(2648.7 \pm 284.1) \text{min}^{-1}$, 与含 FCGM 的对照组比较, $P < 0.05$, 提示 PTX 能明显抑制 FCGM 促进心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入。用第 3 天收集的 FCGM, 在无血清 DMEM 培养液中用蛋白激酶 C 抑制剂 staurosporine (ST, 1×10^{-6} mol/L) 预处理 1 h, 再换为含有 ST (1×10^{-6} mol/L) 的 FCGM 培养心肌细胞 72 h, 细胞表面积为 $(499.7 \pm 68.0) \mu\text{m}^2$, 蛋白含量为 $(560.4 \pm 73.5) \mu\text{g}$, $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入率为 $(2471.5 \pm 310.2) \text{min}^{-1}$, 与含 FCGM 的对照组比较, $P < 0.05$, 表明 ST 也能明显抑制 FCGM 促进心肌细胞表面积、蛋白质含量和 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 的掺入。心肌细胞计数值为 $1 \times 10^9/L$ 。

3 讨论

本研究结果表明, FCGM 能明显促进心肌细胞表面积增大、蛋白质含量增多和 $[^3\text{H}]\text{-Leu}$ 掺入增加, 但对心肌细胞计数值无影响, 即 FCGM 促进心肌细胞肥大而不引起心肌细胞增生。ETAR 阻断剂 BQ123 能部分阻断 FCGM 所致的心肌细胞的肥大作用, 而 Ang II 的 I 型受体阻断剂 CV11974 和 α -肾上腺素受体阻断剂 regitin 却无明显的影响, 提示 FCGM 具有促进心肌细胞肥大作用, 其成分可能含有内皮素-1 (ET-1)。百日咳毒素 (PTX) 和 PKC 抑制剂 ST 也能部分阻断 FCGM 的促进心肌细胞的肥大作用, 提示 FCGM 促心肌细胞肥大作用可能与 PTX 敏感的 G 蛋白和 PKC 有关。

越来越多的资料显示, 在心脏局部存在自分泌和旁分泌的调节通路, 成纤维细胞除了对其周围的心肌细胞具有支持、保护作用外, 在无刺激物和机械牵拉刺激时也能分泌某些可溶性物质, 对心肌细胞具有营养作用^[4~9]。我们的结果也显示成纤维细胞的条件培养液 (FCGM) 能够促进新生大鼠心肌

细胞表面积增大、蛋白质合成速率增加以及蛋白质总量增多,但对心肌细胞计数值没有影响,表明成纤维细胞可以分泌生物活性物质促进心肌细胞肥大,同时我们也观察到 FCGM 促心肌细胞的肥大作用具有时间依赖性和剂量依赖性。

成纤维细胞不仅为心肌细胞的支持细胞,本身具有分泌功能,影响自身和周围心肌细胞的结构和功能^[2,8]。Suzuki^[9]等发现在成纤维细胞的培养液中含有分子质量为 2.5 ku,能促进心肌细胞搏动的内皮素。Harada 等^[9]采用放射免疫测定法也发现在成纤维细胞的培养液中含有相当量的 ET-1,同时用 Northern blot 技术检测到 ET-1 mRNA 在成纤维细胞表达,而在心肌细胞未发现 ET-1 mRNA 的表达,说明 ET-1 是由成纤维细胞分泌,而不是心肌细胞所分泌。我们观察到 ETAR 拮抗剂 BQ₁₂₃能部分阻断 FCGM 的促心肌细胞肥大作用,而 Ang II 的 I 型受体拮抗剂 CV11974 和 α -肾上腺素受体拮抗剂 regitin 无阻断作用,这些结果表明,FCGM 中含有促进心肌细胞肥大的 ET-1。有资料报道,Ang II 促心肌细胞肥大作用是通过心肌细胞本身分泌 ET-1 来实现的^[10],心肌细胞也具有分泌 ET-1 的作用,所以我们尚不知 FCGM 中的 ET-1 是成纤维细胞分泌的,还是心肌细胞分泌的。另外 BQ₁₂₃仅能部分阻断 FCGM 的促心肌细胞肥大作用,表明 FCGM 还可能含有其它的促心肌细胞肥大的因子。

我们观察到,用百日咳毒素预处理心肌细胞可部分抑制 FCGM 增大细胞表面积、增加细胞蛋白质含量和促进 [³H]-Leu 掺入的作用,表明 FCGM 诱导的心肌细胞肥大反应涉及百日咳毒素敏感的 G 蛋白,我们的结果还表明,PKC 在 FCGM 促心肌细胞肥大反应中也起重要的作用,因为用 PKC 抑制剂 staurosporine 能阻断 FCGM 诱导心肌细胞肥大的反应,这些或许与 ET-1 促心肌细胞肥大的信号转导途径有关。

许多学者大多采用非心肌细胞和心肌细胞复合培养的方法来研究这两类细胞之间的相互作用^[4,6]。非心肌细胞影响心肌细胞的结构和功能可能通过这两种情况来进行:非心肌细胞分泌某些可溶性的物质进入细胞间液;邻近的非心肌细胞和心肌细胞由于直接接触,细胞表面分子之间相互作用或者在特异性间隙上通过通道进行分子或离子交换,在这些

情况下,作用是双向的,除了非心肌细胞影响心肌细胞外,心肌细胞也会分泌某些物质反过来影响非心肌细胞的生长和增殖^[6]。本实验采用 FCGM 来观察其对心肌细胞的营养作用,排除了心肌细胞的反向作用及成纤维细胞和心肌细胞之间的分子、离子交换作用,有充足的理由说明成纤维细胞能分泌某些物质,具有促进心肌细胞肥大的作用。

参考文献:

- [1] Eghbali M, Czaja M J, Zeydel M, *et al*. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1988, 20: 267.
- [2] Yu H, Gallagher A M, Garfin P M, *et al*. Prostacyclin release by rat cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 1997, 30 (5): 1047.
- [3] Nishida M, Springhorn J P, Kelly R A, *et al*. Cell-cell signaling between adult rat ventricular myocytes and cardiac microvascular endothelial cells in heterotypic primary culture [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(3): 1934.
- [4] Guo W N, Kamiya K, Kada K J, *et al*. Regulation of cardiac K^v 1.5 K⁺ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30: 157.
- [5] Long C S, Hennich C J, Simpson P C. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes [J]. *Cell Reg*, 1991, 2(1): 1081.
- [6] Harada M, Itoh H, Nakagawa O, *et al*. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy [J]. *Circulation*, 1997, 96(10): 3737.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anz Biochem*, 1976, 72(2): 248.
- [8] Kim N N, Villarreal F J, Printz M P, *et al*. Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts [J]. *Am J Physiol*, 1995, 296 (Endocrinol Metab 32): E426.
- [9] Suzuki T, Tsuruda A, Katah S H, *et al*. Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rate assay of myocytes cultured in a serum-free medium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 9: 2087.
- [10] Ito H, Hirata Y, Adachi S, *et al*. Endothelin-1 an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(4): 398.

(编辑 张敏瑞)