论著

文章编号:1000-5404(2005)19-1918-03

低氧促进大鼠心脏成纤维细胞胶原蛋白合成

严 俊,高钰琪,张 恒,王培勇,谢增柱 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究低氧(2%氧)对成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞胶原蛋白合成、总蛋白合成及Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA表达的影响。**方法** 分离培养成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞,采用液体闪烁计数方法检测心脏成纤维细胞胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率来观察细胞胶原蛋白合成变化,并检测^{3}H-亮氨酸掺入率观察细胞总蛋白合成的变化,采用RT-PCR检测Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA的表达。**结果** 成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞在低氧第24、48小时胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率较常氧组显著增加,分别增加132%($P < 0.05$)和163%($P < 0.01$);低氧12 h起Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA表达显著高于常氧培养的细胞。**结论** 低氧能够直接促进体外培养的成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞胶原蛋白合成和Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA的表达,提示低氧对心脏成纤维细胞胶原合成代谢的直接调节可能是低氧性心肌纤维化的重要机制。

关键词: 低氧;心脏成纤维细胞;胶原

中图法分类号: R322.11; R364.33; R364.4 **文献标识码**: A

Hypoxia promotes the collagen synthesis in cultured cardiac fibroblasts of adult rat

YAN Jun, GAO Yu-qi, ZHANG Heng, WANG Pei-yong, XIE Zeng-zhu (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of hypoxia on collagen protein and total protein synthesis and the expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ mRNA in cultured cardiac fibroblasts of male adult rat. **Methods** Cardiac fibroblasts (CFs) were isolated from adult Wistar rat ventricle and cultured *in vitro* either in normoxic or hypoxic condition. The changes of collagen protein and total protein synthesis were determined by measuring the collagenase sensitive ^{3}H-proline incorporation and the ^{3}H-leucine incorporation respectively. The changes of expression of pro-α1(Ⅰ) collagen and pro-α1(Ⅲ) mRNA were measured by RT-PCR. **Results** The collagenase sensitive ^{3}H-proline incorporation of CFs was increased by 132% ($P<0.05$) and 163% ($P<0.01$) after 24-hour and 48-hour exposure to hypoxia (2% O_2) respectively. The level of pro-α1(Ⅰ) collagen mRNA and pro-α1(Ⅲ) mRNA was significantly elevated in the cells exposed to hypoxia for 12 h, 24 h, 48 h. **Conclusion** Hypoxia alone can up-regulate collagen synthesis in cardiac fibroblasts of adult rat, which may be one of the important mechanisms that hypoxic myocardial fibrosis occurs.

Key words: hypoxia; cardiac fibroblasts; collagen

心肌纤维化(myocardial fibrosis)是指胶原蛋白在心肌间质中的过度沉积导致心肌组织的胶原浓度增加,它被认为是心肌重塑过程中决定心功能转归的一个关键环节[1,2]。心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)是心肌组织中合成胶原蛋白的主要细胞,研究表明多种促纤维化因素均可促进离体培养的CFs合成胶原蛋白[2,3]。低氧是导致心肌重塑发生发展的一种常见和重要的刺激因素,可见于机体整体的乏氧性低氧(如高原环境、呼吸衰竭)和心脏局部低氧(如冠状动脉粥样硬化,冠状血管重塑),并且国内外均有报道低氧也是导致心肌纤维化的重要因素[4,5],但是关于其发生发展机制尚缺乏系统和深入的研究。本实验通过观察低氧对分离培养的大鼠心脏成纤维细胞胶原蛋白合成及Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA表达的影响,初步探讨低氧导致心肌纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

Ⅳ型胶原酶、胰蛋白酶(1:250)及Ⅶ型胶原酶(美国,Sigma公司);DMEM/F12、D-PBS及胎牛血清(美国,Hyclone公司);ITS-X(美国,Gibco公司);L-[3,4-^{3}H]脯氨酸(比活度1.517×10^{12}Bq/mmol)和L-[4,5-^{3}H]亮氨酸(比活度1.628×10^{12}

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100063)
Supportedby the National Natural Science Foundation of China (30100063)

作者简介:严 俊(1972-),男,贵州省安顺市人,博士研究生,讲师,主要从事心脏病理生理基础方面的研究。电话:(023)68752339-8210

通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331

收稿日期:2005-01-11;**修回日期**:2005-03-12

Bq/mmol)(中国原子能科学研究院同位素研究所);维生素 C 钠盐(美国,Sigma 公司);Tripure Isolation Reagent(瑞士,Roche 公司);AMV 反转录试剂盒(美国,Promega);引物合成及 *Taq* DNA 聚合酶(上海生工)。CO_2 孵箱为美国 Nuaire 公司产品(NU-4750E 及 NU-4950E,NU-4950E 为可调氧浓度的 CO_2 孵箱)。

1.2　心脏成纤维细胞的分离培养

采用组织块消化、差速贴壁的方法分离培养成年雄性 Wistar 大鼠(200 ± 10)g 的心脏成纤维细胞[6],细胞的肌细胞肌动蛋白免疫组化染色阴性,血管内皮细胞Ⅷ因子相关抗原染色阴性,波形蛋白染色阳性,常规培养、传代,取第 2 ~ 3 代细胞进行实验。

1.3　实验分组

心脏成纤维细胞以(1.0 ~ 1.2)×10^4/cm^2的密度接种于 24 孔培养板(胶原蛋白合成和总蛋白合成检测)或 6 孔培养板(Ⅰ、Ⅲ型胶原前 α 肽链 mRNA 表达检测),待细胞生长融合至单层后进行实验,即根据 CFs 体外培养的生长特性[6],接种 4 ~ 5 d 后,经含 ITS-X 的无血清 DMEM/F12 培养 48 h,再换液(含 ITS-X 的无血清 DMEM/F12)后分组孵育,常氧组置于普通培养箱,低氧组置于可调氧浓度的培养箱(2% O_2)。

1.4　胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率检测心脏成纤维细胞胶原蛋白合成的变化

分别检测低氧 24、48 h CFs 胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率[7]的改变,细胞^{3}H-脯氨酸(3.7 × 10^4 Bq/孔)的孵育时间均为 24 h,加入^{3}H-脯氨酸的同时加入维生素 C 钠盐(终浓度 50 μg/ml)。孵育完毕后从每个培养孔中取 2 份等量(400 μl)的培养基分别经胶原酶(Ⅶ型,100 U/ml)消化(37 ℃,4 h)和对照孵育后,10% TCA 终止消化,4 ℃沉淀 30 min,离心弃上清,10% TCA 冲洗、重复离心,仔细清除上清后加入 0.3 mol/L NaOH/1% SDS、50 ℃水浴 2 h 以溶解沉淀,得到的样本做液体闪烁计数,均相测定 Bq。每个培养孔的对照孵育样本与胶原酶消化样本的 Bq 差值即胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入,也就是胶原蛋白的^{3}H-脯氨酸掺入。

取出培养基后,剩余的细胞经冲洗、消化,收集成细胞悬液,常规细胞计数。

1.5　^{3}H-亮氨酸掺入率检测心脏成纤维细胞胶原蛋白合成的变化[8]

分别检测低氧 24、48 h CFs ^{3}H-亮氨酸掺入率的改变,细胞^{3}H-亮氨酸((3.7 × 10^4 Bq/孔)的孵育时间均为 24 h。孵育结束后,吸除培养基后,D-PBS 冲洗、胰酶消化收集细胞悬液于离心管中,10% TCA 沉淀,离心、冲洗沉淀、弃上清后同样以 0.3 mol/L NaOH/1% 溶解沉淀,得到的样本做液体闪烁计数,均相测定 Bq。

1.6　RT-PCR 检测Ⅰ、Ⅲ型胶原前 α 肽链 mRNA 表达

CFs 分组孵育 6、12、24、48 h 后,Tripure 提取的细胞总 RNA,按试剂盒说明反转录合成 cDNA,然后以 cDNA 产物为模板分别进行目的片断的 PCR 扩增。引物序列及扩增条件如下:

Collagen α1(Ⅰ):引物序列:5′-TGCCGTGACCTCAAGATGTGCACAAGCGTGCTGTAGGTGA-3′,GenBank Z78279,产物 462 bp,53 ℃ 30 个循环。

Collagen α1(Ⅲ):5′-AGATCATGTCTTCACTCAAGTCTTTACATTGCCATTGGCCTGA-3′,GenBank AJ005395,产物 463 bp,55 ℃ 30 个循环。

GAPDH(内参物):5′-TGGAAAGCTGTGGCGTGATGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3′,GenBank M17701,产物 408 bp,58℃ 26 个循环。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后成像,用 Quantity one 4.4 软件进行图像分析,通过比较 $IOD_{collagen}/IOD_{GAPDH}$ 来反映Ⅰ、Ⅲ型胶原前 α 肽链 mRNA 表达量的变化。

1.7　统计学分析

实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　低氧对心脏成纤维细胞胶原蛋白、总蛋白合成的影响

成年 Wistar 大鼠 CFs 在低氧 24、48 h,培养基中胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入较常氧组显著增加,分别增加 132% 和 163%(表 1)。而低氧组和常氧组的细胞内^{3}H-亮氨酸掺入率在 24 h 时基本相同,低氧 48 h 细胞的^{3}H-亮氨酸掺入率较常氧组有所降低,但差别不显著($P > 0.05$)(表 2)。

表 1　低氧对成年 Wistar 大鼠心脏成纤维细胞胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率的影响(Bq, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of hypoxia on the collagenase sensitive ^{3}H-proline incorporation of adult Wistar rat cardaic fibroblasts (Bq, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Culture time	
	24 h	48 h
Control	209.92 ± 114.24	468.15 ± 95.35
Hypoxia	488.37 ± 88.95 *	1 233.18 ± 232.36 **

$F = 27.74$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* control

表 2　低氧对成年 Wistar 大鼠心脏成纤维细胞^{3}H-亮氨酸掺入率的影响(Bq, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Effect of hypoxia on the ^{3}H-leucine incorporation of adult Wistar rat cardaic fibroblasts (Bq, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Culture time	
	24 h	48 h
Control	1 086.67 ± 346.74	1 876.63 ± 608.17
Hypoxia	1 193.64 ± 430.07	1 379.46 ± 380.43

细胞计数的结果表明低氧组与常氧组的细胞数量基本一致(表 3),所以实验中得到的胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率和^{3}H-亮氨酸掺入率可排除细胞数量的影响。

表 3　细胞计数结果(cells/cm^2, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

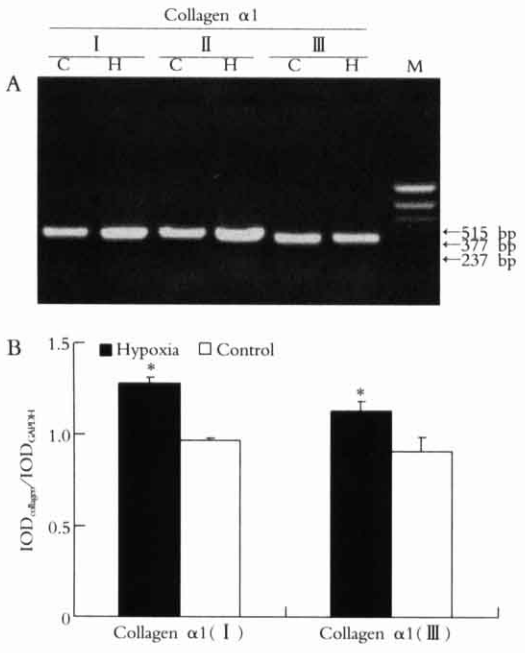
Tab 3　Results of cell counting of adult Wistar rat cardaic fibroblasts (cells/cm^2, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Culture time	
	24 h	48 h
Control	2.80 ± 0.09	2.63 ± 0.17
Hypoxia	2.98 ± 0.29	2.61 ± 0.25

2.2　低氧对心脏成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原前 α 肽链 mRNA 表达的影响

常氧组和低氧组 CFs 均可见明显的Ⅰ、Ⅲ型胶原前 α 肽链和 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 扩增条带,CFs 低氧培养自 12 h

后462 bp和463 bp的条带密度就显著高于相应的常氧组(图1A),而常氧组与低氧组的408 bp条带(内参照GAPDH)强度基本一致。实验以不同批次的细胞独立进行3次,扩增产物的积分光密度(IOD)分析结果见图1B。



A: RT-PCR C: Control; H: Hypoxia; M: Marker

B: Quantitative analysis $F=29.78$, *: $P=0.00$, *vs* control

图1 低氧对成年Wistar大鼠心脏成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链mRNA表达的影响

Fig 1 Collagen αl(Ⅰ) and collagen αl(Ⅲ) mRNA level of adult Wistar rat cardaic fibroblasts exposed to hypoxia for 12 h

3 讨论

胶原蛋白合成增加是引起心肌间质胶原过度沉积从而导致心肌纤维化的一个关键环节,而心肌组织中负责胶原蛋白代谢的主要细胞是CFs。研究证明离体培养的CFs亦合成胶原蛋白,并且主要以可溶性胶原蛋白的形式分泌至细胞外[9],因此直接检测细胞外培养基中胶原蛋白合成的变化能够反映离体培养的CFs合成胶原蛋白的情况。在研究刺激因素对离体培养的CFs胶原蛋白合成的影响时要排除细胞数量的变化所产生的影响,实验应该在CFs生长至融合成细胞单层时进行,并可同时进行细胞计数[8]。在本实验中,CFs低氧24、48 h时胶原酶敏感的^{3}H-脯氨酸掺入率均较常氧显著升高,提示低氧可直接促进CFs胶原蛋白合成,这一作用可能是低氧性心肌纤维化的重要机制之一。而^{3}H-亮氨酸掺入率在低氧与常氧组之间并无显著差别,表明低氧促进CFs胶原蛋白合成并非是总蛋白合成增加的结果,低氧调节CFs的蛋白质合成具有一定的特异性。

CFs合成的胶原蛋白以Ⅰ、Ⅲ型胶原为主,研究表明多种促纤维化因素(如血管紧张素Ⅱ、内皮素-1)在促进离体培养的CFs合成胶原蛋白的同时,也能使CFs Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链的mRNA表达增加[2,3]。本实验的结果表明低氧可促进CFs Ⅰ、Ⅲ型胶原前α肽链的mRNA的表达,提示低氧促进CFs合成胶原蛋白可能是由于胶原蛋白mRNA水平增加所致。

已有不少的研究报道,低氧可促进不同类型的间充质细胞表达胶原蛋白mRNA[10,11],但是其具体的作用机制尚不明确。CFs可产生和分泌多种自/旁分泌因子,如血管紧张素Ⅱ、内皮素-1、转化生长因子-β1等[1,2],这些调节因子均能够调节CFs生长和胶原蛋白的合成和mRNA表达;另一方面,低氧也可激活能够调节胶原蛋白mRNA表达的转录因子(如AP-1)[2],所以低氧对CFs胶原蛋白合成以及mRNA表达的影响是通过CFs的自/旁分泌活性的改变还是低氧本身直接调节胶原蛋白mRNA表达和蛋白合成仍有待深入的研究。

参考文献:

[1] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling[J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 215-262.

[2] Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2002, 91(12): 1103-1113.

[3] Booz G W, Baker K M. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(4): 537-543.

[4] 刘 兵,谢增柱,王仕军. 缺氧对大鼠心肌胶原网架改建的作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(9): 667-670.

[5] Pelouch V, Dixon I M, Golfman L, *et al*. Role of extracellular matrix proteins in heart function[J]. Mol Cell Biochem, 1993, 129(2): 101-120.

[6] 严 俊,高钰琪,谢增柱. 成年大鼠心脏成纤维细胞的分离培养[J]. 中国局解手术学杂志, 2001, 10(4): 370-373.

[7] Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, *et al*. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism[J]. Circulation, 1997, 96(11): 3954-3962.

[8] Dubey R K, Gillespie D G, Jackson E K. Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors[J]. Hypertension, 1998, 31(4): 943-948.

[9] Bashey R I, Donnelly M, Insinga F, *et al*. Growth properties and biochemical characterization of collagens synthesized by adult rat heart fibroblasts in culture[J]. J Mol Cell Cardiol, 1992, 24(7): 691-700.

[10] Falanga V, Martin T A, Takagi H, *et al*. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1(I) procollagen in human dermal fibroblasts[J]. J Cell Physiol, 1993, 157(2): 408-412

[11] Norman J T, Clark I M, Garcia P L. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts[J]. Kidney Int, 2000, 58(6): 2351-2366.

(编辑 薛国文)