文章编号:1000-5404(2009)06-0541-04

论著

促红细胞生成素联合粒细胞集落刺激因子对乳鼠缺氧心肌细胞的保护作用

付振虹,董 蔚,盖鲁粤 (解放军总医院心血管内科,北京 100853)

摘 要:目的 研究促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)联合粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)对缺氧心肌细胞的保护作用。**方法** 分离乳鼠心肌细胞。采用95% N_2 +5% CO_2气体充分置换的1%胎牛血清DMEM培养液培养24 h,建立缺氧心肌细胞模型。研究不同浓度的EPO和G-CSF对缺氧心肌细胞的保护作用。观察在最佳作用浓度时,EPO、G-CSF和联合用药对缺氧心肌细胞的保护作用。采用流式细胞仪检测各组心肌细胞的存活率、凋亡率和坏死率。**结果** 缺氧心肌细胞的死亡率(26.73%)和其中凋亡细胞与总死亡细胞的比例(70.05%)明显高于正常心肌细胞(5.63%、37.83%)。EPO 1 U/ml浓度开始发挥对缺氧心肌细胞的保护作用,5、25和125 U/ml的保护作用相似;G-CSF 6 ng/ml开始发挥对缺氧心肌细胞的保护作用,150 ng/ml保护作用最强,30、750 ng/ml保护作用相似。EPO(5 U/ml)、G-CSF(30 ng/ml)和联合用药[EPO(5 U/ml)+G-CSF(30 ng/ml)]明显减少缺氧心肌细胞的凋亡率[(8.01±2.28)%、(7.08±0.16)%、(4.57±0.99)%,与缺氧心肌细胞(18.73±1.08)%比较,$P<0.01$]和总死亡率[(11.88±3.69)%、(11.60±0.65)%、(8.15±3.16)%,与缺氧心肌细胞(26.73±1.30)%比较,$P<0.01$);EPO组与G-CSF组保护作用相近($P>0.05$);联合给药组保护作用明显强于单独EPO或G-CSF给药组($P<0.01$)。**结论** EPO和G-CSF对缺氧心肌细胞具有保护作用,5 U/ml EPO和30 ng/ml G-CSF是减轻缺氧心肌细胞损伤的最佳剂量。二者联合给药,保护效果优于单独用药。

关键词: 缺氧;心肌细胞;促红细胞生成素;粒细胞集落刺激因子;细胞凋亡
中图法分类号: R322.11;R364.4;R977 **文献标识码:** A

Combination of erythropoietin with granulocyte-colony stimulating factor protects neonatal rat cardiomyocytes from hypoxia *in vitro*

FU Zhen-hong, DONG Wei, GAI Lu-yue (Department of Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To evaluate the potential protective effects of erythropoietin (EPO) in combination with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on hypoxia cardiomyocytes. Methods After left ventricular cardiomyocytes were isolated from neonate rat, the cells were inoculated in a cultural atmosphere of 95% N_2 and 5% CO_2 for 24 h to establish hypoxia cardiomyocytes model. The protective effects of EPO and G-CSF at different concentrations were evaluated for the optimal concentration. Then the protective effects of EPO in combination with G-CSF were investigated under the optimized concentrations. The survival, apoptotic and necrotic rates of cardiomyocytes were assessed by flow cytometry. Results The mortality and ratio of apoptotic cells to total necrotic cell were higher in hypoxia cardiomyocytes than normal cells significantly (26.73% *vs* 5.63%, 70.05% *vs* 37.83%, $P<0.01$). At the condition of 1 U/ml EPO and 6 ng/ml G-CSF, protective effect was observed, When the concentrations of EPO was 5, 25, and 125 U/ml, similar outcome was seen. G-CSF of 150 ng/ml showed the most effective, and 30 and 750 ng/ml were similar. The apoptotic rate and total necrotic rate of hypoxia cardialmyocytes were significantly lower in EPO(5 U/ml), G-CSF (30ng/ml) and combination groups than in the hypoxia group [(18.73±1.08)%, (8.01±2.28)%, (7.08±0.16)% *vs* (4.57±0.99)%, $P<0.01$, (26.73±1.30)%, (11.88±3.69)%, (11.6±0.65)% *vs* (8.15±3.16)%, $P<0.01$). The protective effects of EPO and G-CSF were similar ($P>0.05$), and the combination group was much better than EPO and G-CSF alone groups ($P<0.01$). Conclusion EPO and G-CSF exert protective effect on hypoxia cardiomyocytes, and the optimized concentration for EPO is 5 U/ml and for G-CSF is 30 ng/ml. The protective effects of EPO in combination with G-CSF on hypoxia cardiomyocytes are better than EPO or G-CSF alone.

Key words: hypoxia; cardiomyocyte; erythropoietin; granulocyte-colony stimulating factor; cell apoptosis

作者简介: 付振虹,女,河北省秦皇岛市人,博士,主治医师,主要从事冠心病及动脉粥样硬化的发病机制和治疗方面的研究。E-mail:fuzhenh@sina.com.cn
通信作者: 董 蔚,E-mail:301dongw@sina.com
收稿日期: 2008-08-04;**修回日期:** 2008-11-07

目前已有报道细胞因子治疗心肌梗死,包括促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)[1,2]和粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)[3]分别应用于急性心肌梗死的治疗。但两种细胞因子联合应用的治疗效果以及发生保护作用的具体机制少见报道。本实验在建立乳鼠心肌细胞缺氧模型的基础上,观察了 EPO 和 G-CSF 联合应用治疗缺氧心肌细胞的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验采用新生健康 Wistar 乳鼠(0~1 日龄)60 只,由解放军总医院实验动物中心提供。动物合格证号:SCXK 京 2007-0001。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、特级胎牛血清(Gibco 公司);胰蛋白酶(粉剂, Amresco 公司);4,6-联脒-2-苯基吲哚(DAPI,KPL 公司);结晶紫染色液(北京尚柏生物)。EPO(重组人促红细胞生成素注射液,商品名利血宝,3 000 IU/支),G-CSF(重组人粒细胞集落刺激因子注射液,商品名惠尔血,150 μg/支)。

1.2 实验方法

1.2.1 乳鼠心肌细胞的分离培养及缺氧模型的建立 当日生乳鼠 60 只,取心尖前 1/2 心室肌,用 PBS 冲洗干净残留血迹,眼科剪尽量剪碎,以 5 倍于组织的 0.08% 胰酶消化 10 min,弃上清;0.08% 胰酶 37 ℃水浴振荡消化 10 min 后加含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液终止消化,收集消化液;以 1 000 × g 离心 10 min 弃上清,用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液重悬细胞,经 100 μm 孔径的筛网过滤后的细胞悬液以 $1\times10^4/cm^2$ 密度接种于 25 cm^2 培养瓶中,37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养。1~2 h 后换培养瓶,去掉已贴壁的成纤维细胞;隔日换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,心肌细胞生长 2~3 d,密度达到 80%。选择生长状态良好的心肌细胞构建缺氧模型。细胞用 PBS 冲洗 2 次,采用 95% N_2 + 5% CO_2 气体充分置换的 1% 胎牛血清 DMEM 培养液培养,培养瓶内的空气也用 95% N_2 + 5% CO_2 气体充分置换,密封后封口膜密闭,37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。

结晶紫染色:去除培养基,PBS 漂洗 2 次,4% 甲醛固定1 h,PBS 漂洗 2 次,滴加结晶紫染液数滴覆盖细胞,30 min 后吸除染液,PBS 冲洗干净后镜下观察。

DAPI 标记:去除培养基,PBS 漂洗 2 次,70% 乙醇固定 1 h,PBS 漂洗 2 次,加入 DAPI 溶液至终浓度 10 μg/ml,4 ℃过夜标记细胞,PBS 漂洗至少 6 次,洗去未结合的 DAPI。荧光显微镜下观察。通过磷脂酰结合蛋白 Ⅴ(Annexin Ⅴ)联合碘化丙啶(PI)双染法,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.2 EPO、G-CSF 及联合用药对乳鼠缺氧心肌细胞的保护作用

1.2.2.1 不同浓度的 EPO 和 G-CSF 对缺氧心肌细胞的保护作用 选择生长状态良好的心肌细胞,密度达到 80% 以上后消化,以 2×10^4/ml 的密度接种在 96 孔板中,150 μl/孔。2 d 后细胞生长均匀,贴壁良好,构建缺氧模型。培养液中分别加入不同浓度(0.2、1、5、25、125 U/ml)的 EPO、不同浓度(1.2、6、30、150、750 ng/ml)的 G-CSF,每种浓度加样 3 个孔。正常对照组不进行缺氧干预,缺氧组中不给予药物保护。气体充分置换后,封口膜密闭,37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。24 h 后取出细胞,结晶紫染色,观察心肌细胞的生长情况。在 200 倍显微镜下每组计数 10 个视野,计算其平均值。

1.2.2.2 EPO 联合 G-CSF 对乳鼠缺氧心肌细胞的保护 选择生长状态良好的心肌细胞($>1\times10^6$/瓶)按照培养顺序,进行分 5 组干预:正常对照组、缺氧组、缺氧 + EPO(5 U/ml)组、缺氧 + G-CSF(30 ng/ml)组、缺氧 + EPO(5 U/ml) + G-CSF(30 ng/ml)组,每组 3 瓶细胞。缺氧干预后分别加入上述浓度的药物,密封后封口膜密闭,37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 6 h。6 h 后进行流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

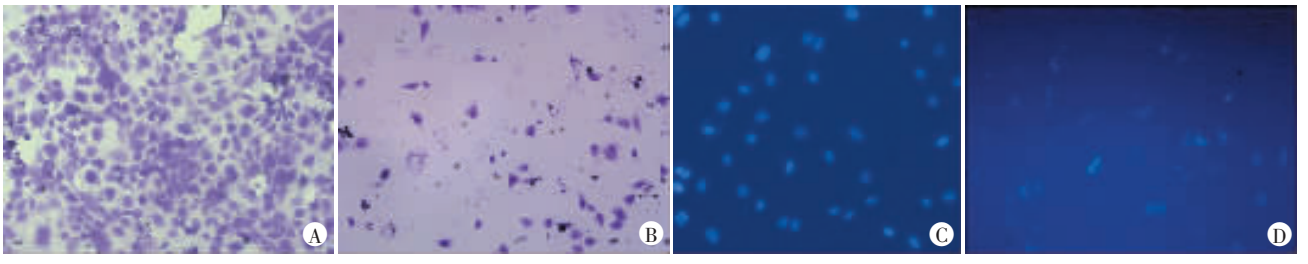
处理计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,组内比较采用配对 t 检验,不同组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 乳鼠心肌细胞的分离培养及缺氧模型的建立

2.1.1 细胞形态学观察和生长特点 从剪碎的乳鼠心肌组织中刚刚分离获得的心肌细胞呈圆形,折光性强,培养 24~48 h后贴壁生长良好,细胞形态不规则,呈多边形或短柱状,部分心肌细胞有节律的自主跳动,随培养时间的延长,部分心肌细胞聚集成簇,有节律的跳动,心肌细胞大小形态规整,分布均匀,以多边型为主。缺氧处理的心肌细胞,失去原有的规则排列,形态各异,以不规则形态为主,大部分细胞坏死,核碎裂,空泡形成,培养液中存在大量坏死细胞碎片(图 1)。

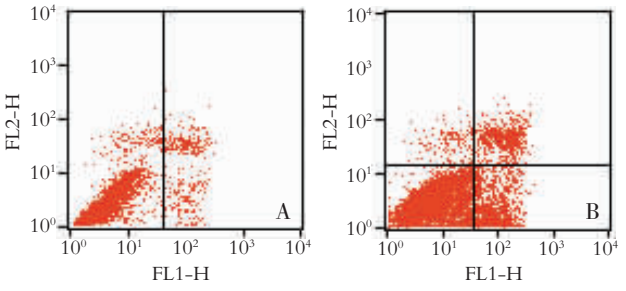
2.1.2 流式细胞仪检测结果 流式细胞仪检测结果显示正常心肌细胞的存活率[(92.11 ± 0.59)%]明显高于缺氧心肌细胞[(70.87 ± 1.07)%,$P<0.01$],凋亡率[(2.13 ± 0.52)%]、



A:正常对照组结晶紫染色(×100);B:缺氧组结晶紫染色(×100);C:正常对照组 DAPI 染色(×200);D:缺氧组 DAPI 染色(×200)

图 1 正常心肌细胞和缺氧心肌细胞的形态学观察

坏死率[(3.5 ± 0.17)%]和总死亡率[(5.63 ± 0.35)%]明显低于缺氧心肌细胞[(18.73 ± 1.08)%、(8.01 ± 0.22)%、(26.73 ± 1.30)%,$P<0.01$]。正常心肌细胞中凋亡细胞在总死亡细胞中所占的百分比为 37.83%,缺氧心肌细胞为 70.05%,差异显著($P<0.01$,图 2)。



A:正常对照组;B:缺氧组

图 2　流式细胞仪检测心肌细胞的凋亡

2.2　不同浓度的 EPO 和 G-CSF 对缺氧心肌细胞的保护作用

2.2.1　不同浓度的 EPO 对缺氧心肌细胞的保护作用　　EPO 的保护作用存在临界值,0.2 U/ml 时未见明显保护作用($P>0.05$),1 U/ml 时减少心肌细胞凋亡($P<0.01$)。随着浓度的增加,缺氧心肌细胞的凋亡坏死数量有逐渐减少的趋势,但是达到 5 U/ml 时保护作用增加不明显,5、25 和 125 U/ml 的保护作用相似($P>0.05$)。见表 1。

2.2.2　不同浓度的 G-CSF 对缺氧心肌细胞的保护作用　　G-CSF的保护作用同样存在临界值,1.2 ng/ml 时未见明显保护作用($P>0.05$),6 ng/ml 时减少心肌细胞凋亡($P<0.01$)。随着浓度的增加,缺氧心肌细胞的凋亡坏死数量有逐渐减少的趋势,但是达到 150 ng/ml 后保护作用增加不明显,反而有减弱的趋势,150 ng/ml 保护作用最强($P<0.01$),750 ng/ml 保护作用略有减弱。30 ng/ml 和 750 ng/ml 保护作用相似($P>0.05$),其余各浓度组之间保护作用差异显著(表 1)。

表 1　不同浓度的 EPO、G-CSF 时缺氧心肌细胞的存活数($\bar{x}\pm s$)

EPO 浓度(U/ml)	200 倍视野下细胞	G-CSF 浓度(ng/ml)	200 倍视野下细胞
0.2	322 ± 80	1.2	234 ± 52
1	554 ± 50[b]	6	380 ± 77[a]
5	738 ± 60[b]	30	708 ± 79[b]
25	818 ± 70[b]	150	812 ± 90[b]
125	812 ± 113[b]	750	718 ± 107[b]

缺氧组:234 ± 60;正常对照组:1 090 ± 122

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,分别与缺氧组比较

2.3　EPO 联合 G-CSF 对缺氧心肌细胞的保护

2.3.1　细胞形态学观察　　从表 1 可见,EPO(5 U/ml)、G-CSF(30 ng/ml)以及联合用药[EPO + G-CSF,(904.0 ± 125.8)]对缺氧心肌细胞都有明显的保护作用($P<0.01$),EPO、G-CSF 保护作用相近($P>0.05$),联合给药保护作用明显强于单独用药(与 EPO 比较,$P<0.01$;与 G-CSF 比较,$P<0.01$;图 3)。

2.3.2　流式细胞仪检测结果(图 4,表 2)

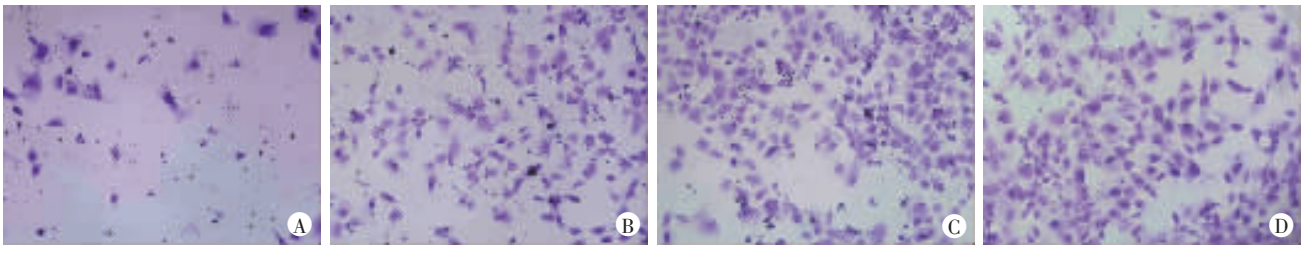
2.3.2.1　存活率　　各组细胞之间差异显著($P<0.01$),正常对照组存活率最高,缺氧组存活率最低。EPO 组、G-CSF 组和联合给药组之间存活率接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.2.2　凋亡率　　各组细胞之间差异显著($P<0.01$),正常对照组凋亡率最低,缺氧组凋亡率最高;干预组中,联合治疗组凋亡率最低,明显低于单独给药组($P<0.01$)。

2.3.2.3　坏死率　　各组细胞与缺氧组相比差异显著($P<0.01$),其余各组之间接近,差异无统计学意义($P>0.05$)。

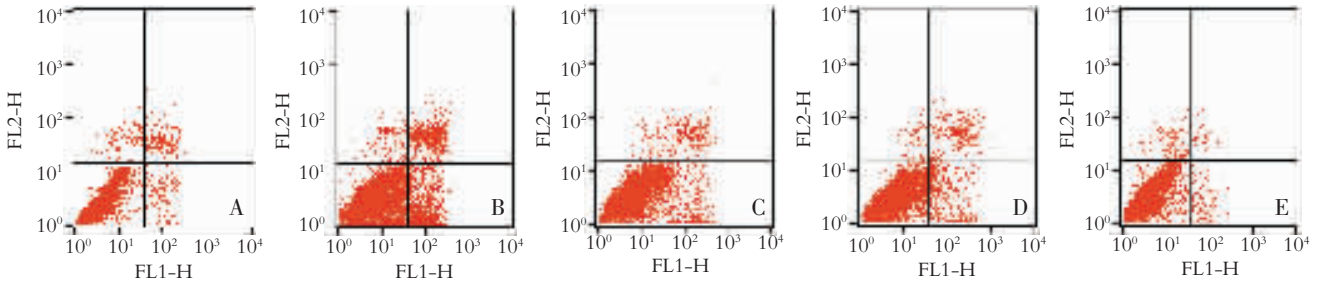
2.3.2.4　总死亡率　　各组细胞之间差异显著($P<0.01$),正常对照组总死亡率最低,缺氧组总死亡率最高。EPO 组、G-CSF 组高于联合给药组($P<0.01$)。

5 组细胞中,凋亡细胞占总死亡细胞的比例分别为 37.83%、70.05%、67.42%、61.03%、56.07%,差异显著($P<0.001$),其中 EPO 组、G-CSF 组高于联合给药组($P<0.01$),EPO 组与 G-CSF 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:缺氧组;B:缺氧 + EPO(5 U/ml)组;C:缺氧 + G-CSF(30 ng/ml)组;D:缺氧 + EPO + G-CSF 组

图 3　不同药物干预下存活的心肌细胞结晶紫染色　(×100)



A:正常对照组;B:缺氧组;C:缺氧 + EPO 组;D:缺氧 + G-CSF 组;E:缺氧 + EPO + G-CSF 组

图 4　流式细胞仪检测各组心肌细胞的凋亡

表2 5组心肌细胞存活率、凋亡率、坏死率及总死亡率比较

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	存活率	凋亡率	坏死率	总死亡率
正常对照组	92.11 ± 0.59	2.13 ± 0.52	3.50 ± 0.17	5.63 ± 0.35
缺氧组	70.87 ± 1.07	18.73 ± 1.08	8.01 ± 0.22	26.73 ± 1.30
缺氧 + EPO(5 U/ml)组	85.24 ± 3.37[a]	8.01 ± 2.28[ab]	3.87 ± 1.41[a]	11.88 ± 3.69[ab]
缺氧 + G-CSF(30 ng/ml)组	86.57 ± 1.15[a]	7.08 ± 0.16[ab]	4.52 ± 0.81[a]	11.60 ± 0.65[ab]
缺氧 + EPO + G-CSF 组	89.05 ± 2.39[a]	4.57 ± 0.99[a]	3.58 ± 2.34[a]	8.15 ± 3.16[a]

a: $P < 0.01$, 与缺氧组比较; b: $P < 0.01$, 与缺氧 + EPO + G-CSF 组比较

3 讨论

近年来文献报道 EPO 对体外培养的心肌细胞具有促进细胞生存、抑制细胞凋亡等保护作用。Calvillo 等[4]在培养的成年大鼠心肌细胞缺氧损伤中发现,在培养基中加入 100 ng/ml 的 rhEPO 后,能使细胞的凋亡率降低 50%,而对细胞死亡中占较低比例的细胞坏死率并无显著影响,在培养的新生大鼠心肌细胞缺氧损伤中发现,在培养基中加入 10 U/ml 的 rhEPO 能抑制心肌细胞凋亡关键效应酶半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)的活化,明显降低心肌细胞凋亡率。叶亮等[5]研究显示,EPO 可以使缺氧诱导的心肌细胞凋亡率由 48% 下降到 28%,氧化应激诱导的心肌细胞凋亡率由 60% 下降到 43%。从而证实 EPO 对体外培养的哺乳动物心肌细胞具有以抗凋亡为主的保护效应。

动物实验显示,G-CSF 可以通过促进干细胞向梗死心肌归巢,抑制心肌细胞凋亡,促进血管新生,从而改善心功能和防止左室重塑达到治疗急性心肌梗死的作用[6]。Harada 等[7]检测了 G-CSF 对双氧水诱导的心肌细胞凋亡的效果,结果显示,G-CSF 预处理明显减少双氧水诱导的心肌细胞凋亡,酪氨酸激酶 2(JAK2)抑制剂 AG490,阻止了 G-CSF 的作用,腺病毒转染的心肌细胞显性负相信号转导与转录激活因子(STAT-3),抑制 G-CSF 的保护作用。

关于 EPO 和 G-CSF 对体外培养的缺氧心肌细胞的保护作用的报道较少,有效的治疗浓度、2 种细胞因子联合治疗少见报道。本研究中,我们尝试应用不同浓度的 EPO 和 G-CSF,以求找到 2 种细胞因子体外发挥心肌细胞保护作用的最佳浓度,并证实 2 种细胞因子联合作用具有更大的保护作用。结果显示,EPO 从 1 U/ml 的浓度开始发挥对缺氧心肌细胞的保护作用,随浓度增加,保护作用有逐渐增强的趋势,5 U/ml、25 U/ml和 125 U/ml 的保护作用相似,因此我们认为 5 U/ml 是最适宜的作用浓度。G-CSF 则从 6 ng/ ml 的浓度开始发挥对缺氧心肌细胞的保护作用,随浓度增加,保护作用逐渐增强的趋势,30 ng/ml 以后,保护作用没有明显增强,因此我们认为 30 ng/ml 是最适宜的作用浓度。实验还显示在达到最佳浓度后,随着浓度的增加,对心肌细胞的保护作用并不会有相应的增强,反而会有一定程度的下降。这一实验结果表明,如果要进一步提高对心肌细胞的保护作用,不能单纯依靠增加药物浓度来获得,必须要找到另外一种途径和方法来增加这种效应。作为 2 种结构和功能不同、但对心肌细胞同样具有保护作用的细胞因子,两者是否存在一定的协同和叠加效应,是本实验研究的重点和主要目的。EPO 和 G-CSF 的最佳作用浓度的获得,为进一步研究 2 种细胞因子联合对缺氧心肌细胞的保护作用奠定了基础。

在进一步的联合观察中显示,培养基中加入 5 U/ml EPO 能使缺氧心肌细胞的凋亡率下降 57.23%,30 ng/ml G-CSF 能够使缺氧心肌细胞的凋亡率下降 62.20%,联合干预组使缺氧心肌细胞的凋亡率下降 75.60%。EPO、G-CSF 能够对缺氧心肌细胞产生明显的保护作用,2 种细胞因子联合保护作用更强,凋亡率明显低于单独给药组。不仅证实了 2 种细胞因子对缺氧心肌细胞的保护作用是通过抗细胞凋亡实现的,而且证实了 2 种细胞因子联合对心肌细胞凋亡的保护作用有明显的放大效应,为细胞因子联合治疗急性心肌梗死奠定基础。

参考文献:

[1] Zhang D, Zhang F, Zhang Y, *et al*. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction[J]. Cardiology, 2007, 108(4): 228 - 236.

[2] Camici G G, Stallmach T, Hermann M, *et al*. Constitutively overexpressed erythropoietin reduces infarct size in a mouse model of permanent coronary artery ligation[J]. Methods Enzymol, 2007, 435: 147 - 155.

[3] Li Y, Fukuda N, Yokoyama S, *et al*. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 549(1 - 3): 98 - 106.

[4] Calvillo L, Latini R, Kajstura J, *et al*. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(8): 4802 - 4806.

[5] 叶 亮, 杜心灵, 夏家红, 等. 重组人红细胞生成素对心肌梗死治疗作用的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(39): 2776 - 2780.

[6] Cho S W, Gwak S J, Kim I K, *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor treatment enhances the efficacy of cellular cardiomyoplasty with transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in infarcted myocardium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(2): 573 - 582.

[7] Harada M, Qin Y, Takano H, *et al*. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes[J]. Nat Med, 2005, 11(3): 305 - 311.

(编辑 吴培红)