论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2630-04

硫酸吲哚酚诱导心肌细胞肥大的研究

杨 可,孙 蕾,管 旭,肖堂利,徐新丽,何 婷,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 研究尿毒症毒素硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)对心肌细胞肥大的影响及其可能的机制。**方法** 不同浓度的IS(100、250、500、1 000 μmol/L)孵育体外培养的新生大鼠心肌细胞(RNCM)3 h后,2,7-dichlorofluorescin dictate(DCFH-DA)荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)水平。500 μmol/L IS孵育心肌细胞24 h后,Real-time PCR检测心肌细胞肥大标志基因心房尿钠肽(atrial natriuretic peptide, ANF)、B型尿钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)及β肌球蛋白重链(beta-myosin heavy chain, β-MHC)的mRNA表达。500 μmol/L IS孵育NRCM 48 h后,^{3}H亮氨酸掺入法检测心肌细胞蛋白合成速率,α-actinin免疫荧光染色观察心肌细胞面积。**结果** IS可以剂量依赖性的诱导心肌细胞ROS生成增多($P<0.05$),500 μmol/L IS孵育可以导致心肌细胞肥大标志基因ANF、BNP和β-MHC mRNA表达上调,并显著增加心肌细胞^{3}H亮氨酸摄入量和细胞面积($P<0.05$)。**结论** IS能够诱导体外培养的新生大鼠心肌细胞肥大,其机制可能与诱导氧化应激增强有关。

[关键词] 硫酸吲哚酚;心肌细胞;肥大;氧化应激
[中图法分类号] R-332;R322.11;R971.1 [文献标志码] A

Cardiomyocyte hypertrophy induced by indoxyl sulfate *in vitro*

Yang Ke, Sun Lei, Guan Xu, Xiao Tangli, Xu Xinli, He Ting, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the function and mechanism of indoxyl sulfate (IS) in inducing cardiac hypertrophy. **Methods** Rat neonatal cardiac myocytes (RNCMs) were isolated and treated with IS (100, 250, 500 and 1 000 μmol/L) for 3 h before using fluorescence probe 2,7-dichlorofluorescin dictate (DCFH-DA) to detect the variation of production of intracellular reactive oxygen species (ROS). RNCMs were incubated with IS (500 μmol/L) for 24 h, and then real-time PCR was applied to determine the expression of atrial natriuretic peptide (ANF), B-type natriuretic peptide (BNP) and beta-myosin heavy chain (β-MHC) mRNA. The cardiomyocytes were treated with IS (500 μmol/L) for 48 h, ^{3}H-leucine incorporation assay and immunocytochemical technique were adopted to measure protein synthesis rate and to mark α-smooth muscle actin (α-actinin) to observe morphology of RNCMs separately. **Results** IS caused a dose-dependent increase of ROS synthesis ($P<0.05$), and the expression levels of ANF, BNP and β-MHC mRNA were enhanced as well. IS (500 μmol /L) also exerted its function in increasing protein synthesis rate ($P<0.05$) and cell area in RNCMs. **Conclusion** IS can induce hypertrophy in cardiomyocytes, probably through the enhancement of oxidative stress.

[**Key words**] indoxyl sulfate; cardiac myocyte; hypertrophy; oxidative stress

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270290,30700316). Corresponding author: Zhao Jinghong, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

尿毒症心肌病是慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)患者最常见的并发症,同时也是CKD患者的首要死亡原因,主要表现为心肌肥大、变性和心肌间质纤维化,尤其以左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)为其最主要的心脏结构改变。尿毒症心肌病的发病机制至今尚未完全明确,以往认为尿毒症时的高血压和容量负荷是主要因素,但控制血压和容量负荷后尿毒症心肌病仍持续进展,因此,尿毒症时特有的内环境改变可能在尿毒症心肌病进展过程中发挥着不可忽视的作用。在致心肌肥厚的多种因素中,氧化应激日益引起人们的关注[1-3]。氧化应激是指活性氧(ROS)及其代谢产物过量聚集,并通过激活相关信号通路调控某些效应基因的转录与表达,从而对细胞产生多种毒性作用的一种病理状态。研究发现,大量生成的

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270290,30700316)
[通信作者] 赵景宏,电话:(023)68774321,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.0943.007.html(2013-10-14)

ROS可以过度激活丝裂原激活蛋白激酶MAPKs并转至细胞核周围,进而调控某些肥大相关基因(如ANP、BNP、β-MHC)的转录,引起心肌细胞体积增大、肌节数量增多、心肌胶原含量增加等,最终导致心肌肥厚[4-6]。

在尿毒症患者体内,由于肾功能减退造成患者体内大量毒素蓄积,特别是蛋白结合毒素,常规透析也不能将它们有效清除。这些毒素均可刺激细胞内ROS过量生成,导致尿毒症高氧化应激状态,并且由于它们在血循环中长时间大量存在,对心血管系统的危害尤为突出[7]。硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate, IS)是一种极具代表性的蛋白结合尿毒症毒素,它对肾脏及心血管系统的损害作用一直是人们研究的重点。我们在以往的研究中发现,IS可以诱导血管内皮细胞功能失调,通过促氧化应激和活化NF-κB抑制一氧化氮的生成,并可能因此在尿毒症加速性动脉粥样硬化形成过程中发挥重要作用[8]。而在尿毒症状态下,循环中大量存在的IS是否可以通过促氧化应激诱导心肌细胞损伤,同样值得我们深入研究,以此深入揭示尿毒症患者特有的内环境紊乱与心肌损害之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

动物:新生0~3 d的SPF级SD大鼠10只,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供。

主要试剂:IS(美国Sigma aldrich公司),DMEM-H培养基(美国GIBCO公司),胎牛血清(美国GIBCO公司),胰酶(美国Sigma aldrich公司),Ⅱ型胶原酶(美国Sigma aldrich公司),5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)(美国Sigma aldrich公司),羊血清(武汉博士德公司),平滑肌肌动蛋白α-actinin单克隆抗体及FITC标记山羊抗小鼠二抗(武汉博士德公司),^{3}H-亮氨酸(美国PerkinElmer公司),活性氧检测试剂盒(碧云天公司),RNAiso Plus (TaKaRa),SYBR® Premix *Ex Taq*™(Perfect for Real Time, TaKaRa),Prime Script® RT Reagent (Kit with gDNA Eraser, TaKaRa)。

1.2 新生大鼠心肌细胞的原代培养

取出生3 d以内的SD大鼠10只,酒精消毒后取心脏,并立即放入预冷的PBS液(pH 7.4)中反复冲洗,去除心房、血管及结缔组织,仅留心尖部心室肌,并修剪成小块。PBS清洗数次后加入0.125%胰酶轻轻吹打,待组织悬液变浑浊弃上清液并加入胎牛血清终止消化,重复3次。向剩余心肌组织中加入0.1% Ⅱ型胶原酶,与胰酶消化液一同放入恒温培养箱(5% CO_2、95% O_2、37 ℃,美国NAPCO4520)中消化60 min。待观察到含Ⅱ胶原酶的组织消化液呈淡黄色流沙状时,取出消化液并用200目滤网过滤,收集滤液,4 ℃、1 500 r/min离心5 min,弃上清液后加入PBS重悬,重复1次后,加入含20%胎牛血清的DMEM培养基重悬,置培养箱中进行差速贴壁,之后吸取细胞悬液入新的培养瓶,于培养箱中培养。细胞培养48 h,向培养基中加入成纤维细胞生长抑制剂BrdU(0.1 mmol/L)。此时,镜下观察可见80%的心肌细胞融合和90%的心肌细胞搏动。培养72 h后,加入不同浓度的IS(100、250、500和1 000 μmol/L)孵育3 h或加入500 μmol/L的IS分别孵育24和48 h后进行后续实验。各实验中的对照组NRCMs采用正常培养条件。

1.3 活性氧自由基(ROS)检测

心肌细胞在不同浓度的IS(100、250、500和1 000 μmol/L)中孵育3 h,弃去含有IS的培养液,先用无血清DMEM培养液清洗细胞3次,每次5 min,再加入含有10 μmol/L DCFH-DA的无血清DMEM(仅阳性对照加入Rosup)。于恒温培养箱孵育细胞1 h,用无血清培养液清洗细胞3次,之后用PBS清洗2次,以充分去除未进入细胞的DCFH-DA。使用488 nm激发波长,525 nm发射波长,荧光酶标仪(美国Thermo公司)检测荧光强弱,再用荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)观察探针荧光亮度。

1.4 ^{3}H亮氨酸掺入法实验

500 μmol/L IS孵育NRCM 48 h后,加入无血清培养基稀释好的^{3}H亮氨酸(1 μCi/μL),培养18 h后用无血清DMEM或生理盐水洗涤细胞3次,待孔板干燥后加入闪烁液,用液闪仪(LS6500,美国Beckman公司)检测每分钟计数率(cpm),并换算为蛋白合成量(pmol)。

1.5 免疫荧光染色

用24孔板培养心肌细胞并爬片,72 h后加入500 μmol/L的IS孵育48 h,然后用预冷的PBS清洗细胞3次,4%多聚甲醛于室温下固定细胞8 min后PBS洗片3次,0.3% Triton X-100作用5 min后PBS洗片3次,山羊血清37 ℃封闭20 min滴加一抗α-actinin(稀释比例1∶200)4 ℃孵育过夜,PBS洗涤3次后,滴加FITC标记山羊抗小鼠二抗,37 ℃避光孵育1 h,PBS洗涤3次后DAPI染色5 min,荧光倒置显微镜观察细胞大小,运用Imagepro plus软件测定心肌细胞表面积,每组测量5个视野,每个视野测量5~10个细胞,然后进行统计学分析。

1.6 Real-time RCR

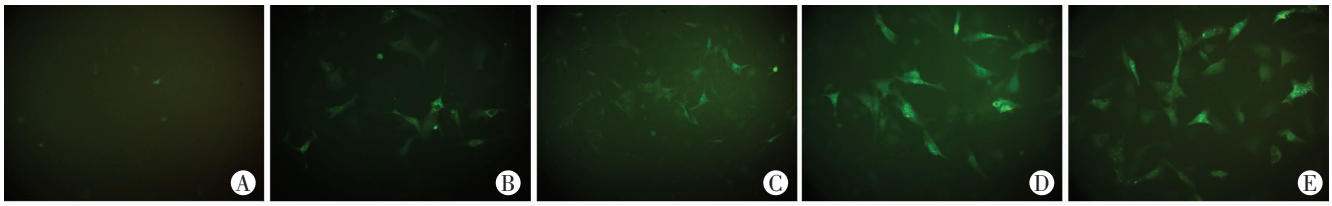
心肌细胞培养72 h后加入500 μmol/L IS孵育24 h,弃培养基,PBS洗涤细胞3次,加入Trizol,然后刮取细胞并加入1/5 Trizol体积量的三氯甲烷,混匀室温放置15 min后4 ℃,12 000×*g*离心15 min;吸取上层液相入新的EP管,加入等体积异丙醇,混匀后室温放置10 min,4 ℃,12 000×*g*离心10 min;弃液,加入75%无水乙醇,4 ℃,12 000×*g*离心10 min,弃液,干燥后加入适量DEPC水溶解沉淀;检测各组RNA浓度,上样量设定为1 000 ng,RNA逆转录为cDNA(反应体系10 μL);RT-PCR摸索3种引物及内参最佳退火温度(ANF、BNP、β-MHC及GAPDH最佳退火温度分别为63.5、64、65 ℃和64 ℃);Applied Biochemicals 7500 PCR System Software进行Real-time PCR反应和分析(反应体系为10 μL)。各个引物序列见表1。

表1 引物名称及相应碱基序列

引物名称	扩增长度(bp)	上游碱基序列	下游碱基序列
ANF	205	5′-ATGGGCTCCTTCTCCATCAC-3′	5′-TTCATCGGTATGCTCGCTCA-3′
BNP	236	5′-TGGGAAGTCCTAGCCAGTCT-3′	5′-GATCCGGTCTATCTTCTGCC-3′
β-MHC	196	5′-TGACAGTCGGGAGAACCAG-3′	5′-CCGAACTGTCTTGGCATTGC-3′
GAPDH	221	5′-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3′	5′-TCAGCTCTGGGATGACCTTG-3′

1.7 统计学分析

使用SPSS 17.0软件分析数据。计量资料用$\bar{x} \pm s$表示,多组间差异比较用单因素方差分析,多组间两两比较用Newman-Keuls法。检验水准为0.05。



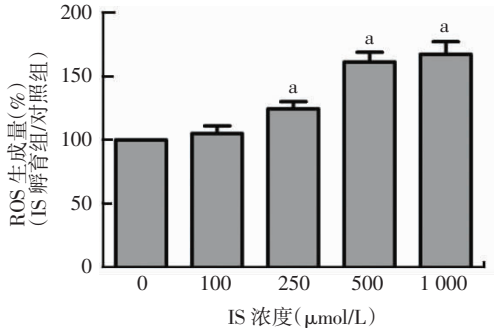
A:对照组;B:IS 100 μmol/L组;C:IS 250 μmol/L组;D:IS 500 μmol/L组;E:IS 1 000 μmol/L组

图1 不同浓度IS孵育心肌细胞3 h后DCFH-DA探针检测细胞内ROS的荧光强度变化 (荧光倒置显微镜 ×200)

2 结果

2.1 IS剂量依赖性的诱导心肌细胞ROS生成增多

使用DCFH-DA探针检测细胞内ROS浓度,结果发现250、500和1 000 μmol/L IS均可显著诱导心肌细胞ROS的生成,并呈剂量依赖性增强。500 μmol/L IS孵育可以导致心肌细胞ROS含量较对照组升高1.679倍($P<0.05$),各组ROS生成量以对照组为100%基准值进行计算和统计学分析,见图1、2。上述结果表明,IS可以诱导心肌细胞氧化应激增强。在后续实验中,均选取500 μmol/L作为IS处理浓度。



a:$P<0.05$,与对照组比较(IS 0 μmol/L)

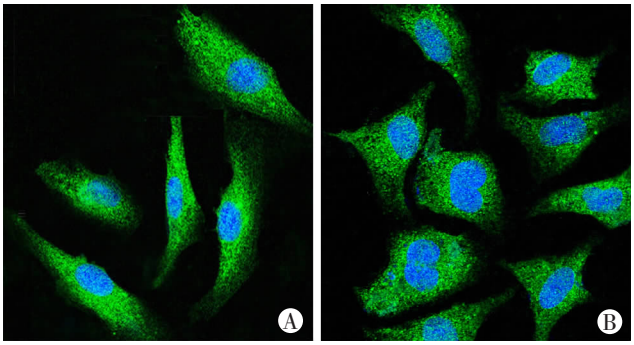
图2 不同浓度IS孵育心肌细胞3 h荧光酶标仪检测细胞内ROS的生成情况

2.2 IS诱导心肌细胞蛋白合成速率增加

采用液闪仪测定心肌细胞^{3}H-亮氨酸的摄入量,结果表明,500 μmol/L孵育48 h可以显著增加心肌细胞^{3}H-亮氨酸的摄入量,统计学分析提示对照组^{3}H-亮氨酸的cpm为(834.1±48.0),心肌细胞合成的蛋白量为(0.021±0.001)pmol;而IS孵育组^{3}H-亮氨酸的cpm则增加至(1 874.0±157.5),心肌细胞合成的蛋白量增加至(0.048±0.004)pmol($P<0.05$)。提示IS可以诱导心肌细胞蛋白合成加速。

2.3 IS诱导心肌细胞面积增加

荧光显微镜观察α-actinin染色发现,500 μmol/L IS孵育48 h后,心肌细胞形态较对照组增大;运用Imagepro plus软件测定心肌细胞表面积,结果发现,IS组心肌细胞面积(3 090.0±80.3)μm^{2}较对照组(1 235.0±43.5)μm^{2}显著增加,见图3。提示IS孵育可以导致心肌细胞体积增大。



A:对照组;B:IS 500 μmol/L组

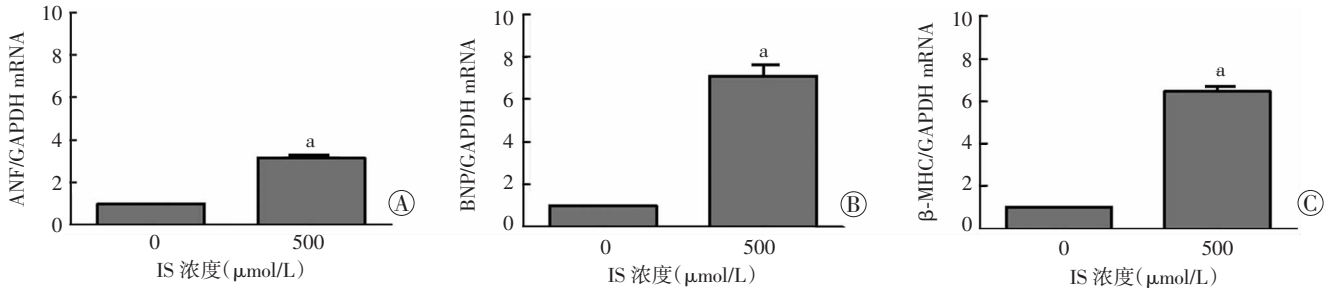
图3 α-actinin免疫荧光染色观察IS(500 μmol/L)孵育48 h后心肌细胞的大小 (×400)

2.4 IS诱导心肌细胞肥大标志基因ANF、BNP和β-MHC mRNA表达上调

IS孵育24 h后,Real-time PCR检测心肌肥大标志基因ANF、BNP和β-MHC mRNA的表达变化,结果表明,与对照组比较,500 μmol/L IS孵育显著上调NRMCs上述3种基因的mRNA表达,BNP和β-MHC mRNA的表达增加尤为显著,分别较对照组上升7.71倍和6.76倍($P<0.05$),见图4。

3 讨论

尿毒症心肌病是CKD终末期患者最常见的心脏病变,也是此类患者的首位死亡原因。左心室肥厚(LVH)



A:ANF mRNA表达;B:BNP mRNA表达;C:β-MHC mRNA表达 a:$P<0.05$,与对照组比较(IS 0 μmol/L)

图4 Real-time PCR检测IS对心肌细胞ANF、BNP和β-MHC mRNA表达的影响

是尿毒症心肌病最显著的特征,在CKD早、中期即开始逐渐显现,至尿毒症透析患者发生率已高达75%,并成为心室舒张功能失调、心律失常和心力衰竭的重要病理基础,是尿毒症患者生存率降低的独立危险因素[1-2]。但尿毒症患者发生LVH的机制并未完全阐明,因此,深入揭示尿毒症LVH的发生机制并探索有效干预措施具有非常重要的临床意义。

近年来研究表明,尿毒症患者体内继发性甲状旁腺激素升高、钙磷代谢紊乱和高氧化应激水平等都具有促进LVH发生的可能,其中氧化应激在心肌肥厚中的作用尤其引人关注[9]。尿毒症患者体内的高氧化应激水平与肾功能减退之后的大量毒素蓄积有关,并且很多蛋白毒素如晚期糖基化终末产物(AGEs)、对甲酚硫酸盐(PCS)、吲哚酚硫酸盐(IS)等并不能通过透析清除,长时间滞留体内并造成机体进行性损害。在这些毒素中,IS和PCS因在体外成功合成,已作为代表性的尿毒症毒素广泛应用于基础研究。

IS来源于人体每日摄入的蛋白,在终末期肾功能衰竭患者体内IS可升高近50~500倍,血清中IS浓度可高达557 μmol/L。既往研究表明,IS在CKD患者并发的心血管疾病中扮演着重要角色。Sato等[10]报道CKD患者血清中高水平的IS与肾小球滤过率呈负相关,并且是LVH的重要危险因素。5/6肾切除尿毒症实验动物模型研究发现,口服的毒素吸附剂AST-120可以降低血清中IS的浓度,改善心肌纤维化[11]。这些临床和基础研究均提示尿毒症毒素IS与心肌损害直接存在着密切关联。因此,在本研究中,我们通过体外实验观察尿毒症毒素IS是否可以直接诱导心肌细胞肥大,以进一步揭示尿毒症时LVH的发生机制。

我们的实验发现500 μmol/L的IS可以显著诱导新生大鼠心肌细胞^{3}H亮氨酸摄入增加,这提示IS可加快细胞代谢速率,而细胞肥大和细胞内蛋白合成速率的增加呈正相关关系[7]。同时,α-actinin免疫荧光染色进一步证实IS可以导致心肌细胞增大。在心功能不全时,由于心肌细胞受到刺激,能够快速、大量的合成ANF、BNP和β-MHC;而已有研究证明心肌肥大时这3种基因的mRNA表达量均会明显增高,因此它们一直被视作心肌肥大的标志性基因[11]。为进一步印证IS对心肌细胞的影响,我们采用Real-time PCR检测500 μmol/L IS孵育24 h后心肌细胞ANF、BNP和β-MHC的mRNA表达变化,结果发现ANF、BNP和β-MHC这3种肥大标志基因的mRNA表达显著增加。这也再次证实了尿毒症IS的确可以直接诱导心肌细胞肥大。我们和其他学者的研究均表明氧化应激是IS诱导血管内皮细胞损伤的重要途径,而氧化应激同样也是LVH发生的主要诱因,因此,明确IS诱导的心肌细胞肥大是否与氧化应激有关有助于揭示其内在机制。为此,在本研究中,我们进一步观察了IS对心肌细胞ROS生成的影响,结果发现IS可以剂量依赖性的促进心肌细胞ROS生成,结合文献报道ROS生成增多是心肌细胞肥大和LVH的重要促发因素[4],我们推测尿毒症毒素IS诱导的心肌细胞肥大可能与其导致的氧化应激增强有关。本研究只在体外观察了IS对心肌细胞肥大的影响,而IS与尿毒症心肌病的关系还有待于通过更深入的体外和体内研究进行探讨。

综上所述,我们认为在CKD状态下,由于肾功能严重减退,具有氧化特性的尿毒症毒素在血循环中长时间蓄积并作用于心肌细胞,最终会引起心肌细胞中ROS过量生成,并导致心肌细胞肥大和LVH的发生和发展,这可能是尿毒症心肌病发生的一个重要机制。因此,有效清除CKD患者体内的各种毒素,特别是蛋白结合毒素将有助于尿毒症心肌病的防治。

参考文献:

[1] Ronco C, McCullough P, Anker S D, *et al*. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 703-711.

[2] Cerasola G, Nardi E, Palermo A, *et al*. Epidemiology and pathophysiology of left ventricular abnormalities in chronic kidney disease: a review [J]. J Nephrol, 2011, 24(1): 1-10.

[3] Fujii H, Nakai K, Fukagawa M. Role of oxidative stress and indoxyl sulfate in progression of cardiovascular disease in chronic kidney disease [J]. Ther Apher Dial, 2011, 15(2): 125-128.

[4] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6): H2181-H2190.

[5] Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(2): 676-685.

[6] Meijers B K, Bammens B, De-Moor B, *et al*. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients [J]. Kidney Int, 2008, 73(10): 1174-1180.

[7] Fujii H, Nishijima F, Goto S, *et al*. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(7): 2089-2095.

[8] Yang K, Nie L, Huang Y, *et al*. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein [J]. Toxicol Lett, 2012, 215(2): 77-83.

[9] 吴蕊, 涂玲. 氧化应激与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(1): 110-113.

[10] Sato B, Yoshikawa D, Ishii H, *et al*. Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction [J]. Am J Cardiol, 2013, 111(5): 712-716.

[11] Lekawanvijit S, Kompa A R, Manabe M, *et al*. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41281.

(**收稿**:2013-07-14;**修回**:2013-09-09)

(编辑 王 红)