维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0129-04

骨髓间充质干细胞对肥大心肌细胞脂肪酸代谢影响的体外研究

卓文玉[1],陈 沅[1],田 杰[1],朱 静[2],向 平[1]

(1. 重庆医科大学附属儿童医院心血管内科;2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科医学研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨骨髓间充质干细胞对肥大心肌细胞脂肪酸代谢的影响及其机制。方法:体外培养的 Wistar 新生大鼠心肌细胞随机分为 3 组:正常对照组、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)作用组、骨髓间充质干细胞干预组,采用免疫荧光显微镜测定心肌细胞核因子 NF-κB 和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)PPARγ、PPARα 的活性,紫外分光光度法检测心肌细胞内游离脂肪酸(FFA)含量。结果:AngⅡ刺激乳鼠心肌细胞 NF-κB 活性增强,抑制 PPARα 和 PPARγ 活性减弱,增加心肌细胞内 FFA 蓄积($P<0.01$);MSCs 干预组心肌细胞 NF-κB 活性及心肌细胞内 FFA 含量较 AngⅡ作用组显著降低($P<0.01$ 和 $P<0.01$)而 PPARα 和 PPARγ 活性增强($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。结论:骨髓间充质干细胞可改善肥大心肌细胞的脂肪酸代谢,这可能是骨髓间充质干细胞移植改善心功能作用机制之一,NF-κB 及 PPARs 可能是其作用的信号通路之一。

【关键词】骨髓间充质干细胞;心肌细胞;NF-κB;游离脂肪酸

【中国图书分类法分类号】R329.21;R329.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-11

In vitro study on the effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the fatty acid metabolism of hypertrophic cardiomyocytes

ZHUO Wen-yu, et al

(*Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectives*: To inverstigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) on the fatty acid metabolism of hypertrophic cardiomyocytes and disclosure its mechanisms. *Methods*: Wistar neonate rat cardiomyocytes cultured in vitro were randomized into an angiotensin(Ang)-Ⅱ stimulating group(n=5), a MSCs treated Ang-Ⅱ stimulating group(Intervention group, n=5) and a normal control group(n=5). The activity of nuclear factor(NF)-κB and peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) α and γ were detected by immunofluorescence microscope, and intracellular free fatty acids(FFA) content by ultraviolet spectrophotometry. *Results*: Ang-Ⅱ stimulated the NF-κB activation of neonate rat cardiomyocytes to strengthen, inhibited the activation of PPARα and PPARγ to weaken and increased the accumulation of FFA($P<0.01$). For MSCs intervention group, the activation of NF-κB and the accumulation of FFA decreased significantly($P<0.01$ and $P<0.01$) while the activation of PPARα and PPARγ were up-regulated compared with the Ang-Ⅱ stimulating group($P<0.05$ and $P<0.01$). *Conclusion*: MSCs could improve the fatty acid metabolism of hypertrophic cardiomyocytes, which is probably one of the mechanisms of the marrow mesenchymal stem cell transplantation improving the heart functions, and NF-κB and PPARs may be the signal passage of function.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cell; Cardiomyocyte; Nuclear factor κB; Free fatty acids

心肌细胞的能量代谢障碍是导致心肌细胞坏死、纤维化的重要原因,与心力衰竭的发生发展有着密切的关系。近年来,干细胞在心脏疾病治疗中的运用已进行大量动物实验,并进入临床研究,显示了良好的应用前景。目前研究认为,骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSCs)移植能改善心肌功能,其可能机制为 MSCs 分化为心肌(样)细胞修复受损心肌组织[1],减少心肌组织纤维化,促进血管再生,改善心肌灌注[2],通过旁分泌[3]及信号转

作者介绍:卓文玉(1980-),女,硕士,研究方向:干细胞移植。

通讯作者:陈 沅,女,教授,E-mail:cy@mail.chcmu.com。

基金项目:国家自然科学基金(30371499);重庆市教委科学技术重点项目(渝教科[2002]18 号文)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

导途径[4]改善心肌组织重塑。在前期研究中也发现了 MSCs 移植可改善心功能[5],并利用抑制性消减杂交技术筛选了 MSCs 移植后的差异基因,其中一类与线粒体的合成有关[6]。线粒体是心肌细胞的能量工厂,因此,我们设想 MSCs 移植改善心功能可能与其改善心肌细胞的能量代谢有关,但目前国内外对有关 MSCs 对心肌细胞能量代谢的研究鲜有报道,为此,本实验利用非直接接触共培养方法探讨肥大心肌细胞在 MSCs 作用下的脂肪酸代谢情况,并分析 MSCs 对心肌能量代谢影响与改善心功能的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

5 周龄 Wistar 大鼠,体重(70 ± 10)g;0 ~ 3d 新生 Wistar 大鼠,由第三军医大学野战研究所实验动物中心提供。

1.2 药物和试剂

Dulbecco's Modified Eagle medium/F12 (1:1) 培养基[DMEM / F12(1:1),Hyclone];胎牛血清(FBS,Hyclone);胰蛋白酶(Promega);Ⅱ型胶原酶(Sigma);5- 溴脱氧核苷尿嘧啶(5-Bromodeoxyuridine,5-BrdU,Sigma);血管紧张素Ⅱ(Sigma);联咪二苯吲哚(4-6-Dia-idino-2-henylindole,DAPI,Roche);小鼠抗大鼠核因子 -κB(nuclear factor-κB,NF-κB)亚基 P65,过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor,PPARs)PPARγ (Santa Cruz);小鼠抗大鼠 PPARα(武汉博士德); 生物素 - 山羊抗小鼠 IgG、Cy3 抗生物素(北京中杉);游离脂肪酸测试盒(NEFA,南京建成)。

1.3 仪器

倒置相差显微镜(OlympusIX70,日本);荧光显微镜(Olym. pusBX51,日本);激光共聚焦显微镜(Leica TCS-NT,德国);紫外分光光度计(722 型,上海第三分析仪器厂);Transwell 插入式培养皿(Corning Costar,美国)。

1.4 方法

1.4.1 MSCs 的分离与纯化 分离成年大鼠股骨与胫骨,DMEM/F-12(1:1)冲出骨髓,离心,DMEM/F-12(1:1)完全培养液 (含 10%FBS 及 100IU/ml 青霉素、100g/ml 链霉素)重悬,置于 37℃,5%CO_2 饱和湿度培养箱培养。24h 后换液,以后每 3d 换液,至 80%~90%融合时传代。

1.4.2 新生大鼠心肌细胞分离、培养和心肌细胞肥大模型的建立 取出新生 Wistar 大鼠心脏,剪碎心肌组织以 0.1% Ⅱ型胶原酶 37℃分次水浴消化,收集消化液经钢网过滤后离心,重悬,差速贴壁后转细胞悬液入培养板。培养体系中含 12%FBS,100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素及 0.1mmol/L5-Br-du,置在 37℃、5% CO_2 孵箱中培养,48h 后换成正常培养基培养,每隔 48h 换液 1 次。

乳鼠心肌细胞成功培养 48h 后,换用无血清的培养基,同时,向培养基中加入 0.1μmol/L 血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)继续培养 12h。

1.4.3 MSCs 与肥大心肌细胞共培养体系的建立 MSCs 传至第 3 代时传代,以 2×10^5 个 / 孔的细胞数加入 transwell 共培养插件中,再将培养基沿侧壁缓慢注入下室小室,预培养 24h。向预先用 AngⅡ作用 12h 心肌细胞的孔中加入培养基,将插件中原有的培养液吸去,再插入到预培养心肌细胞的孔中,再向插件中加入完全培养基,完成非接触式共培养体系的装配,置入 5%CO_2、37℃恒温培养箱中。

1.4.4 免疫荧光检测 采用间接荧光法,PBS 代替一抗设为阴性对照。对照组、Ang-Ⅱ作用组和 MSCs 干预组:100%丙酮固定、0.1% Triton-X100 处理后,正常山羊血清或兔血清封闭 10min;分别加入 p65、PPARγ 及 PPARα 抗体,稀释度均为 1:100,4℃过夜;按生物素化二抗及 Cy3- 抗生物素试剂盒说明书进行,最后用 1μg/ml DAPI 复染,室温 5min,充分清洗后 50%甘油封片。

荧光显微镜随机选取 10 个非重复视野(200 倍)作细胞分类计数。以红色荧光在细胞核内及核周边集为阳性细胞,细胞总数以 DAPI 为标志计数,计算阳性细胞与细胞总数的比值,及其平均值和标准差。

1.4.5 心肌细胞内游离脂肪酸(Free fatty acid,FFA)含量的检测 严格按试剂盒说明书进行操作,进行比色,按公式计算每 10^6 个细胞中的游离脂肪酸含量(单位 nmol/10^6cells)。

1.5 统计学分析

数据采取均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较用 t 检验,SPSS11.0 统计分析软件进行处理,$P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 干预组心肌细胞 p65、PPARγ 及 PPARα 的表达

NF-κB 未激活时,亚基 p65 位于胞浆,阳性表达呈红色均一的荧光;激活后定位于细胞核,有时也可见其在胞浆向核内转移途中即在核膜边集。本实验观察到,AngⅡ作用组 p65 核移位现象明显,而加 MSCs 干预后则可抑制其激活,核移位细胞数较模型组减少($P<0.01$)(见图 1、表 1)。

PPARs 生理状态时处于激活状态,阳性表达位于胞核核周围区,呈红色均一的荧光;被抑制后,阳性表达减弱,在胞浆中均匀分布。本实验观察到,AngⅡ作用组阳性表达明显减弱,而加 MSCs 干预后则可减轻对 PPARs 抑制,即表现为 PPARα 及 PPARγ 阳性细胞率明显增加 ($P<0.01$ 和 $P<0.01$)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 MSCs 干预组阳性细胞与细胞总数比($\bar{x} \pm s$, n=6)

分组	NF-κB	PPARα	PPARγ
对照组	0.176 ± 0.063 79	0.674 ± 0.070 78	0.705 ± 0.109 95
Ang-Ⅱ	0.851 ± 0.083 95*	0.337 ± 0.037 74*	0.323 ± 0.058 67*
MSCs + Ang-Ⅱ	0.138 ± 0.073 82**	0.619 ± 0.081 64**	0.774 ± 0.115 70**

*模型组与正常组比较,t 分别为:-15.693、4.203、7.505,P<0.01,有显著性差异;

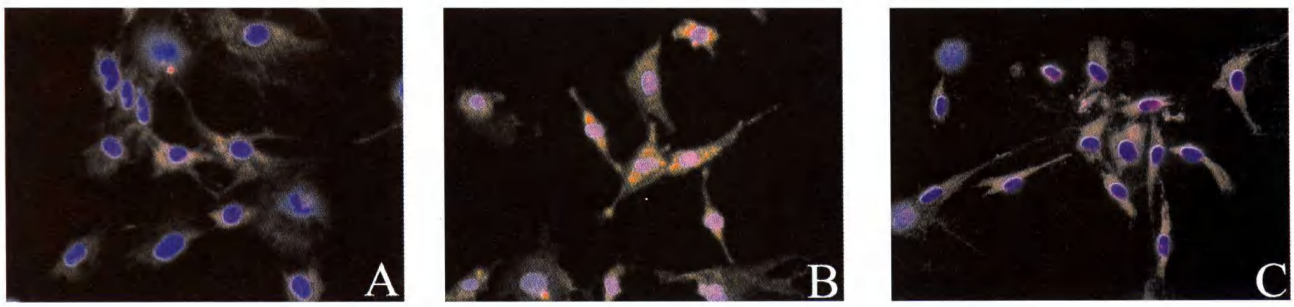
**MSCs 干预组与模型组比较,t 分别为:15.623、-3.131、-8.525、P<0.01,有显著性差异。

表 2 3 组心肌细胞内 FFA 检测

分组	Control	Ang-Ⅱ	MSCs + Ang-Ⅱ
FFA(nmol/10^6cell)	15.8 ± 1.5	25.0 ± 1.6*	17.6 ± 1.3**

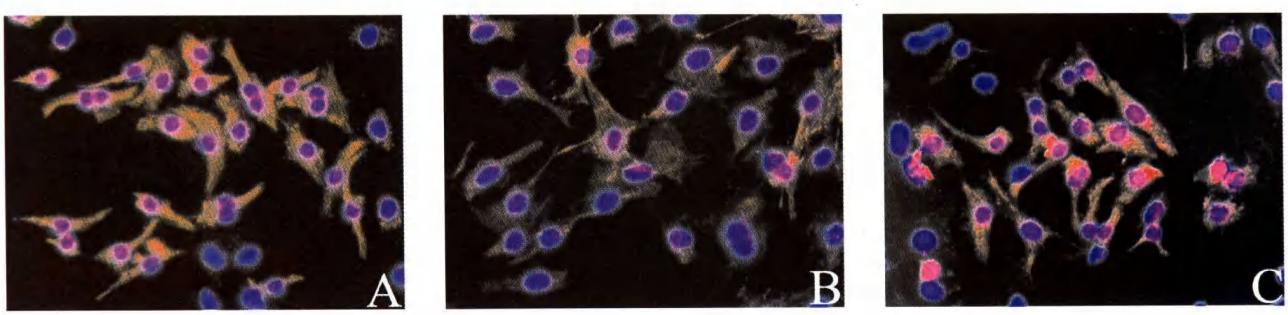
*模型组与正常组比较,t 为:-9.489,P<0.01,有显著性差异;

**MSCs 干预组与模型组比较,t 为:-7.980,P<0.01,有显著性差异。



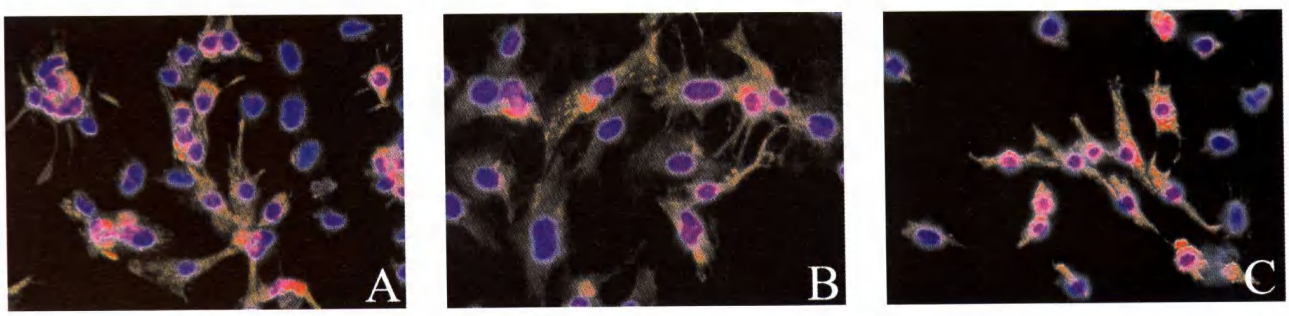
A.对照组; B.Ang-Ⅱ作用组; C.MSCs 干预组

图 1 3 组心肌细胞 p65 的表达(免疫荧光 ×400)



A.对照组; B.Ang-Ⅱ作用组; C.MSCs 干预组

图 2 3 组心肌细胞 PPARα 的表达(免疫荧光 ×400)



A.对照组; B.Ang-Ⅱ作用组; C.MSCs 干预组

图 3 3 组心肌细胞 PPARγ 的表达(免疫荧光 ×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

(见图 2、3 及表 1)。

2.2 MSCs 干预组心肌细胞内 FFA 的观察

对照组心肌细胞内 FFA 含量平均为 15.8 nmol/10^6cell,Ang-Ⅱ作用组细胞内 FFA 蓄积增加(P<0.01),MSCs 干预抑制细胞内 FFA 蓄积(P<0.01)。

3 讨 论

AngⅡ引起心肌细胞蛋白合成增加,体积增大,诱导心肌细胞肥大。有研究发现 PPARα 表达下调是心脏能量底物转换的一个基本组成部分[7],在实验中发现 AngⅡ作用的心肌细胞内游离脂肪酸蓄积增加,伴随 PPARα 活性减弱,提示肥大心肌细胞脂肪酸代谢障碍,与既往研究结果一致[7],因此可用 AngⅡ诱导的肥大心肌细胞作为模型研究 MSCs 对肥大心肌细胞脂肪酸代谢的影响。

MSCs 的移植改善宿主心功能已经取得共识,对其改善心功能的机制也有了一定的研究,但 MSCs 移植对心力衰竭发生发展重要原因的能量利用是否有影响尚未见报道。本实验首次利用 MSCs 与心肌细胞非直接接触共培养,探讨 MSCs 对心肌细胞脂肪酸代谢的影响及其机制。本实验发现,MSCs 作用能使 Ang-Ⅱ诱导的肥大心肌细胞内游离脂肪酸含量减少,可以推测 MSCs 可能通过增加线粒体对脂肪酸的摄取和氧化,促进肥大心肌对脂肪酸的利用。

本实验还发现 MSCs 能够抑制 NF-κB 的活性,而 MSCs 的移植可抑制心衰时心肌细胞 TNF-α,IL-1β 的表达[8],由于 TNF-α,IL-1β 是 NF-κB 的重要激活物,推测 MSCs 可能通过减少了 NF-κB 的激活物来抑制其活性。NF-κB 作为一种重要的核转录因子,在心衰的发病机制中发挥重要作用,有研究发现心肌肥厚时 NF-κB 激活,通过 p65 与 PPARβ/δ 作用下调其活性,而导致脂肪酸氧化降低[9],因此我们推测,MSCs 可能通过抑制 NF-κB 的活性,改善心肌的脂肪酸利用。

实验中发现在 MSCs 干预下,肥大心肌细胞中 PPARα 和 PPARγ 活性增加。PPARα 是心肌线粒体脂肪酸氧化的一个重要调控子[10],MSCs 可能激活 PPARα 上游信号,或通过促进一些天然配基的合成来增加 PPARα 的活性,从而上调肥厚心肌脂肪酸氧化关键酶的基因表达,以此改善肥大心肌的能量代谢,但其机制目前尚不清楚。尽管目前对 PPARγ 激活能否直接调节心肌的脂肪酸代谢仍存在较大的争议,但其激活对调节心肌重塑是有益的却得到肯定,NF-κB 调节被认为是其信号通路之一[11]。

研究表明,线粒体不仅是心肌细胞的能量工厂,而且参与了启动心肌细胞凋亡的发生过程。在课题前期研究中发现 MSCs 移植能促进线粒体合成有关基因的表达,推测 MSCs 能促进线粒体的合成,使能量合成增加,改善心脏功能[6]。本实验发现 MSCs 可以改善心肌细胞线粒体对脂肪酸的摄取和氧化利用,因此,我们可以推测:MSCs 可能通过改善线粒体的代谢、减少线粒体的损伤,减少心肌细胞凋亡,进而改善心功能。这与 MSCs 的移植可抑制病变心肌重建[12]和心肌细胞的凋亡[13]从而改善心肌功能等研究结果是一致的。

由此可以推测,MSCs 可以改善心肌细胞的能量代谢从而改善心肌细胞功能,但还需要更深入的研究去阐明它的机制,以便我们可以对干细胞移植对宿主的作用进行调控,使其临床应用更为安全和有效。

参 考 文 献

[1] Toma C,Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocytes phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation,2002;105(1):93-98.

[2] Tomita S,Mickle DAG,Richard DW,et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation[J]. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery,2002;123(6):1132-1140.

[3] Kinnaird T,MBBCh E,Stabile MD,et al. Local delivery of marrow-derive stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanism[J]. Circulation,2004;109:1 543-1 549;

[4] Hakuno D,Fukuda K,Makino S,et al. Bone marrow-derived regenerated sardiomyocytes(CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors[J]. Circulation,2002;105(1):380-386.

[5] 江德勤, 田 杰. 骨髓间充质干细胞移植对心肌病大鼠心功能的影响[J]. 中国介入心脏病学杂志,2005;13(6):408.

[6] 李 杨,陈 沅,田 杰,等. 骨髓间充质干细胞移植改善心肌病大鼠心功能相关基因的初步筛选[J]. 中华儿科学杂志,2006;44(10):787-791.

[7] 胡 琴,李隆贵,耿召华,等. 压力超负荷对大鼠心肌 PPARα 和 MCADmRNA 表达的影响[J]. 临床心血管杂志,2004;20(1):33-36.

[8] Guo J,Lin GS, Bao CY, et al. Anti-Inflammation Role for Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Myocardial[J]. Inflamma-

(下转第 165 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

探索影响膜内吸收的调节因素,可为临床治疗羊水量异常提供有效可行的方法。

本研究中,应用免疫组化技术检测到 AQP1 在人羊膜立方上皮细胞浆中可见棕黄色粗大颗粒,而成纤维细胞中仅有微弱表达。与 Mamn 等[8]的研究结果一致。AQP1 在人羊膜立方上皮细胞内的表达,说明羊膜上皮细胞能够快速易化羊膜腔和胎儿循环间的水转运,可能正是由于 AQP1 的存在,大量的水分才能通过 AQP1 的水孔快速进入羊膜腔。本实验证实:羊水过少患者的羊膜 AQP1 表达 AIOD 值低于正常产妇羊膜 AQP1 表达 AIOD 值;而羊水过多患者羊膜 AQP1 表达 AIOD 值明显高于正常产妇羊膜 AQP1 表达 AIOD 值。进一步提示:AQP1 在羊水膜内吸收以及维持羊水量平衡方面中可能起重要作用,其表达调控或功能一旦异常可能促进或者导致羊水量的改变。以上研究均为羊水的产生、吸收以及羊水量异常的治疗提供了分子生物学基础。

人羊膜组织中水通道蛋白的出现是一个新的发现。尽管 AQP1 在羊水转运中的功能重要性目前尚无结论。但它的出现表明对于羊水量异常的治疗渴望有新的治疗举措。如 AQP1 抑制剂可用于治疗羊水过多。AQP1 激动剂可用于治疗羊水过少。有关 AQP1 在羊水转运中确切作用有待进一步的研究证实。为羊水异常的治疗提供一种新的思路,从而有望减少羊水异常的发生,降低围生儿病率及围生儿死亡率,有利于优生优育。

参 考 文 献

[1] Saboori AM, Smith BL, Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh (D)-positive and negative erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988;85(11):4042-4045.

[2] Mann SE, Nijland MJ, Ross MG. Mathematic modeling of human amniotic fluid dynamics[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996;175(4Pt1):937-944.

[3] King LS, Yasui M, Agre P. Aquaporins in health and disease[J]. Mol Med Today, 2000;6(2):60-65.

[4] Towne JE, Horrod KS, Krane CM, et al. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000;22(1):34-44.

[5] Stamer WD, Peppel K, O'Donnell ME, et al. Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001;42(8):1803-1811.

[6] Daneshmand SS, Cheung CY, Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep: Role of passive permeability and vascular endothelial growth factor[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003;188(3):786-793.

[7] Faber JJ, Anderson DF. Absorption of amniotic fluid by amniochorion in sheep[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002;282(3):850-854.

[8] Mann SE, Ricke EA, Yang BA, et al. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002;187(4):902-907.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 132 页)

tion, 2007;30(3-4):97-104.

[9] Planavila A, Laguna JC., V á zquez-Carrera M. Nuclear Factor-κB Activation Leads to Down-regulation of Fatty Acid Oxidation during Cardiac Hypertrophy[J]. J Biol Chem, 2005;280(17):17464-17471.

[10] Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism[J]. Trends Cardiovase Ned, 2000;10(6):238-245.

[11] Makino N, Sugano M, atoh S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia [J]. Cell Biochem Biophys, 2006;44(1):65-71.

[12] Xu XH; Xu ZL; Xu YY, et al. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats[J]. Coron Artery Dis, 2005;16(4):245-255.

[13] 唐 滔,胡建国,杨进福,等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠心肌梗死后细胞凋亡的作用[J]. 中南大学学报(医学版),2004;29(3):274-278.

(责任编辑:谭乐勤)