DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.012

论著

文章编号:1000-5404(2000)11-1046-04

bFGF、TGFβ1在心肌细胞肥大中与cAMP、cGMP的关系研究

罗惠兰[1],何作云[2] ([1]空军总医院心血管内科,北京 100036;[2]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子β1(TGFβ1)在心肌细胞肥大过程中与cAMP cGMP的关系及意义。方法 分离培养大鼠心肌细胞,分组并使细胞内cAMP或cGMP增加,用放免法检测细胞体积与数量的关系,并用免疫细胞化学及原位杂交技术检测细胞中bFGF、TGFβ1表达的变化。结果 培养细胞中cAMP增加时细胞体积增大,数量比例无变化,bFGF、TGFβ1蛋白及mRNA表达明显增加($P<0.05$)。细胞中cGMP增加时细胞体积缩小,数量比例不变,bFGF和TGFβ1蛋白及mRNA表达明显减少($P<0.05$)。结论 cAMP、cGMP可能与心肌细胞bFGF、TGFβ1的表达调节有关。cAMP可诱导,而cGMP可抑制心肌细胞bFGF、TGFβ1表达。

关键词:心肌肥大;细胞培养;bFGF;TGFβ1
中图法分类号:R542.2;R977 文献标识码:A

Relationship between bFGT, TGFβ1 and cAMP, cGMP in cardiac myocyte hypertrophy *in vivo*

LUO Hui-lan, HE Zuo-yun (Department of Cardiovascular Diseases, General Hospital of Air Force, Beijing 100036, China)

Abstract: Objective To explore the relationship and the significance between basic fibrobalst growth factor (bFGF), transforming growth factor β1 (TGFβ1) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) during the development of cardiac myocyte hypertrophy. Methods Cardiac myocytes were isolated from newborn Wistar rats and divided into control, cAMP and cGMP groups. In control group, the cells were cultivated in serum-free medium. In cAMP and cGMP groups, the cells were cultured in serum-free medium with 8-bromo-cAMP and sodium nitroprusside respectively. The cell volume and amount were measured with radioimmunoassay. The expressions of bFGF and TGFβ1 were determined with immunohistochemical and *in situ* hybridization methods. Results In cAMP group, the cell volume was increased but the amount was not changed. The expressions of bFGF, TGFβ1 protein and mRNA has a significant elevation compared with those of control group ($P<0.05$). The increased cGMP induced by the additional sodium nitroprusside made the cells shrink but no change in the amount. The expressions of bFGF, TGFβ1 protein and mRNA were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). Conclusion cAMP and cGMP might be associated with the regulation of bFGF and FGF β1 expressions in cardiac myocytes. cAMP probably enhances while cGMP suppresses the expressions of these two factors.

Key words: cardiac hypertrophy; cell culture; bFGF; TGFβ1

大量研究表明,心肌肥大与心血管病人病死率呈显著正相关,因此,阐明其发病机制已成为心血管病研究的重要课题。动物模型研究发现,心脏血液动力学超负荷(压力/容量超负荷)可刺激心肌细胞分泌多种生长因子,进而通过旁分泌作用诱导心肌细胞肥大[1],其中bFGF、TGFβ1便是两个重要因子,他们在心肌细胞肥大时可能发挥了重要的调控作用[2]。但是,bFGF、TGFβ1在调控心肌细胞肥大过程中与cAMP、cGMP的关系尚未见报道。本研究拟探讨心肌细胞肥大时bFGF、TGFβ1表达与cAMP、cGMP的关系及意义。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:罗惠兰(1960—),女,贵州省贵阳市人,硕士,主治医师,主要从事心肌肥厚的发病机制及其防治方面的研究。电话:(0201)885630
收稿日期:2000-03-02;修回日期:2000-10-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　心肌细胞培养

新生 Wistar 大鼠(3 d 以内), 无菌操作下取出心脏, 剪除心房, 将心室放于 0.1%胰蛋白酶中, 剪碎后置 4 ℃冰箱消化 1 h, 离心, 加入培养液 M199(含 10%小牛血清)制成细胞悬液, 以差速贴壁法获取心肌细胞, 接种于 12 孔板中, 37 ℃, 5%CO_2, 温箱中培养, 24 h 后开始见细胞搏动, 4 d 时, 细胞基本融合, 用于试验。

1.2　实验分组

将培养细胞分为对照组、cAMP 组和 cGMP(硝普钠)组。

1.2.1　对照组细胞以无血清培养, cAMP 组细胞经无血清培养 24 h 后加入 8-Bromo-cAMP(0.1 mmol/L, 宝灵曼公司), cGMP 组细胞经无血清培养 24 h 后加入硝普钠(硝普钠为 NO 供体, 可增加细胞内 cGMP 浓度)(1 mmol/L, 北京医科大学病理教研室赠)。48 h 时分别加入^{3}H-Leu 或 ^{3}H-TdR(1 μCi/ml 培养基), 37 ℃继续培养 4 h, 然后用液体闪烁仪测定放射性计数(cpm), 代表 3 组细胞^{3}H-leu 和^{3}H-TdR 的掺入率, 每批实验均重复 4 次。

1.2.2　对照组细胞以无血清培养, cAMP 组细胞经无血清培养 24 h 后加入 8-bromo-cAMP(0.1 mmol/L), cGMP 组细胞经无血清培养 24 h 后加入硝普钠(1 mmol/L), 分别于培养 30 min, 3、24、48、72 h 后, 3 组细胞均用 1%多聚甲醛及 70%乙醇固定细胞 30 min, 晾干后−20 ℃冰箱保存。

1.2.3　bFGF、TGFβ1 免疫细胞化学检测　　细胞片用 S-P 法作 bFGF、TGFβ1 免疫细胞化学检测(bFGF、TGFβ1 抗体及试剂盒购自北京中山公司)、DAB 显色, 染色强度以(+)表示。

1.2.4　bFGF、TGFβ1 原位杂交检测　　bFGF、TGFβ1 质粒菌种由军事医学科学院提供, 质粒扩增, *EcoR* Ⅰ / *Hind* Ⅲ酶切回收, 地高辛(随机引物法)标记 cDNA 探针, 作细胞片 mRNA 原位杂交, 染色强度以(+)表示。

对免疫细胞化学及原位杂交结果行图像分析(北航医学图像分析管理系统 Mias ehe), 半定量分析。

1.3　统计学方法

结果数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用组间 t 检验进行分析。

2　结果

2.1　cAMP 刺激心肌细胞肥大效应的观察

结果表明, cAMP 可诱导培养心肌细胞^{3}H-Leu 掺入率显著增加, 而对^{3}H-TdR 掺入率无明显影响, 提示 cAMP 可明显刺激培养心肌细胞蛋白质合成, 诱导心肌细胞肥大, 但无促增殖作用(即细胞体积增大, 细胞数量比例不增加)。cGMP 诱导培养细胞^{3}H-Leu 掺入率显著减少, 而对^{3}H-TdR 掺入率亦无明显影响, 提示 cGMP 可明显抑制培养心肌细胞蛋白质合成, 使心肌细胞体积减小, 但无抑制增殖作用(即细胞体积减小, 细胞数量比例不减少), 见表 1。

表 1　**cAMP、cGMP 对心肌细胞^{3}H-Leu 和^{3}H-TdR 掺入率的影响($\bar{x}\pm s$)**

Tab 1　Effects of cAMP, cGMP on the ^{3}H-Leu and ^{3}H-TdR incorporation rate in cardiocytes($\bar{x}\pm s$)

Group	n	^{3}H-Leu(min^{-1})	^{3}H-TdR(min^{-1})
Control	4	280±67	221±86
cAMP	4	3 251±573 **	218±92
cGMP	4	106±54 *	220±87

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2　cAMP 诱导心肌细胞肥大或 cGMP 抑制心肌细胞肥大时 bFGF、TGFβ1 mRNA 及蛋白表达的变化

在培养的对照组心肌细胞中, bFGF 蛋白及 mRNA 水平仅有弱阳性表达, 主要分布于细胞浆, 加入 cAMP 后 bFGF 蛋白及 mRNA 表达的细胞数及染色强度均明显增加, 见图 1、2。加入 cGMP 后结果相反, 见图 3、4。

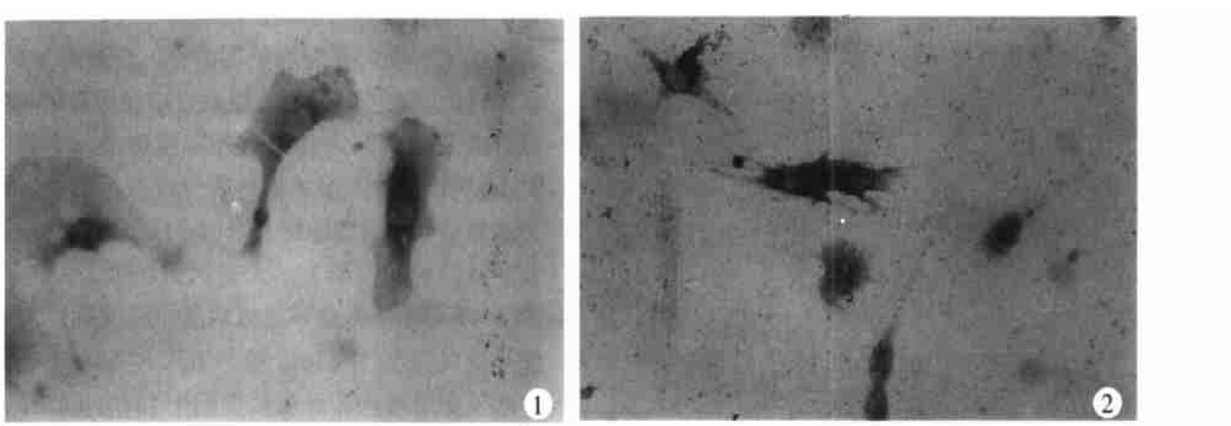


图 1　**cAMP 组心肌细胞 bFGF 蛋白表达**　(S-P× 400)

Fig 1　Expression of bFGF protein in cardiocytes of cAMP group　(S-P× 400)

图 2　**cAMP 组心肌细胞 TGFβ1 mRNA 表达**　(ISH× 400)

Fig 2　Expression of TGFβ1 mRNA in cardiocytes of cAMP group　(ISH× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

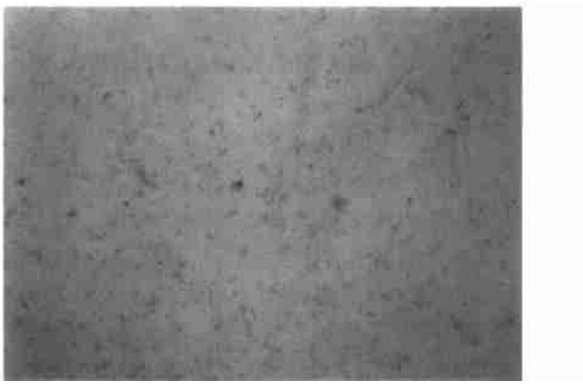


图 3 cGMP 组心肌细胞 TGFβ1 表达 (S-P×400)

Fig 3 Expression of TGFβ1 protein in cardiocytes of cGMP group (S-P×400)



图 4 cGMP 组心肌细胞 bFGF mRNA 表达 (ISH×400)

Fig 4 Expression of bFGF mRNA in cardiocytes of cGMP group (ISH×400)

图像分析结果,示培养细胞中加入 8-溴-cAMP 后 bFGF 蛋白水平的表达明显高于对照组,药物效应、时间效应、药物与时间交互效应均有显著差异($P<0.05$)。加入硝普钠(cGMP 增高)组 bFGF 蛋白水平表达明显少于对照组,药物效应、时间效应、药物与时间交互效应差异有显著性($P<0.05$)。升高细胞内 cAMP 浓度,bFGF mRNA 表达明显高于对照组($P<0.01$)。升高细胞内 cGMP 浓度,bFGF mRNA 表达明显低于对照组($P<0.01$),尤以 48 h 明显。TGFβ1 蛋白表达与 bFGF 有相似的结果,见图 5~7。

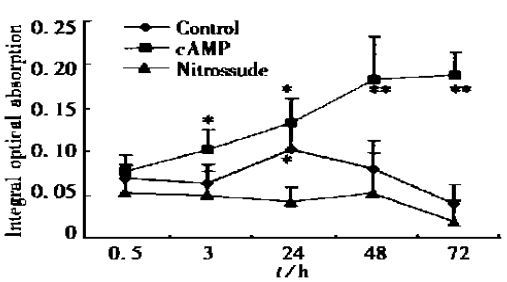


图 5 bFGF 蛋白表达的定量分析

Fig 5 Image analysis of basic fibroblast growth factor protein expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

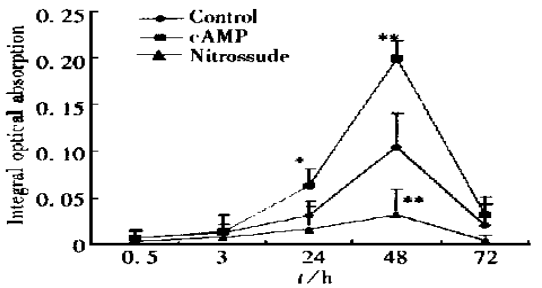


图 6 bFGF mRNA 表达的定量分析

Fig 6 Image analysis of basic fibroblast growth factor mRNA expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

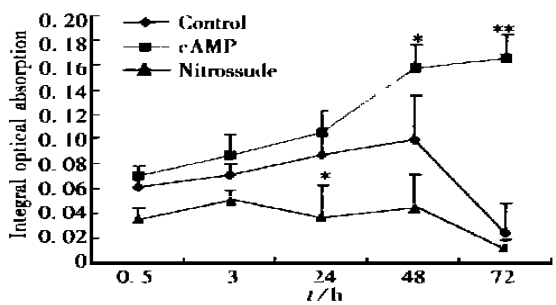


图 7 TGF mRNA 表达的定量分析

Fig 7 Image analysis of TGF mRNA expression ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

在心肌肥大的发病学中,血液动力学作用最早为人们所重视,压力和/或容量超负荷引起心室壁张力增高的多种刺激均可导致心肌细胞肥大,一般认为成年心肌细胞已丧失分裂增殖能力[3]。心脏对于急、慢性血液动力学改变的应激主要通过增加原有细胞的蛋白质合成及细胞肥大和细胞外基质增加来实现[4]。因此,心肌肥大的实质是蛋白质合成能力增强。有关压力超负荷与心肌细胞肥大蛋白合成能力之间的第二信使联系已有初步研究。大量研究证实,cAMP-蛋白激酶 A(PKA)系统是介导机械刺激心肌细胞肥大的第二信号途径之一[5,6],Riva 等[7]加入 8-Bromo-cAMP 至培养的鼠皮层星状神经胶质细胞中 bFGF mRNA 表达增高,提示 bFGF 基因受 cAMP 调控。本研究结果表明,8-Bromo-cAMP 刺激心肌细胞代谢活力升高,^{3}H-Leu 掺入率显著增加,在心肌细胞肥大的同时,bFGF、TGFβ1 表达也显著升高,而 cGMP 起抑制作用。

本研究结果提示心肌细胞确能表达 bFGF、TGFβ1,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并且这种表达与超负荷后心肌 cAMP 信号系统活动有关。因此推测 bFGF、TGFβ1 也可能以类似方式参与人体心肌肥大的病理过程，其发生顺序是压力或容量超负荷－心肌细胞内第二信号系统活化－bFGF、TGFβ1 表达，通过旁分泌途径－细胞内蛋白质合成增加－细胞肥大及心肌间质纤维化，而 cGMP 可抑制该过程，因此推测高血压病心肌细胞在压力超负荷中可用硝普钠等 NO 供体类药升高心肌细胞内 cGMP 浓度，预防心肌肥大的发生。

参考文献：

[1] 何作云，冯 兵，周小波，等. 急性压力超负荷心脏局部碱性成纤维细胞生长因子和肾素血管紧张素系统的变化及意义[J]. 中华心血管病杂志，1999，27(1)：64－67.

[2] Gray M O, Long C S, Kalinyak J E, *et al*. Angiotensin II stimu-lates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-β1 and endothelin-1 from fibroblasts[J]. Cardiovasc Res, 1998, 40(2): 352－363.

[3] Mann D L. Load induction of cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 1989, 21(Suppl Ⅲ): S11－S30.

[4] Morkin E. Replacement of myosin during development of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 1974, 35(Suppl Ⅱ): S37－S48.

[5] Gupta M, Gura M A. Cardiac hypertrophy: Old concepts, new perspectives M01 cell[J]. Biochem, 1997, 176(1－2): 273－279.

[6] Osaki J, Haneda T, Sakai H, *et al*. cAMP-mediated c-fos expression in pressure-overload acceleration of protein synthesis in adult rat heart[J]. Cardiovasc Res, 1997, 33(3): 631－640.

[7] Riva M A. Molteui R. L-deprenyl potentiates cAMP-induced elevation of FGF-2 mRNA levels in rat cortical astrocytse[J]. Neuroreport, 1997, 8(9-10): 1 265－1 268.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2000)11-1049-01

经验与短篇

糖耐量低减危险因素的病例对照研究

A case-control study for the risk factors of impaired glucose tolerance

王 建，李明秀，徐 静 （第三军医大学附属新桥医院营养科，重庆 400037）

为明确糖耐量低减（Impaired glucose tolerance，IGT）发生的危险因子及影响转化过程的积极因素，减少 DM 及 IGT 的发生率，引导 IGT 的良性转归，有着相当重要的意义。本研究探讨了 IGT 发生的危险因素，现报告如下。

1 材料和方法

对象：我院 1996 年 10 月至 1998 年 6 月重庆市 10 个市级机关单位 35 岁以上人群 2800 例进行 DM 普查。按 WHO(1985)诊断标准筛检出的 118 例 IGT 者作为病例组；从本次普查中随机整群抽取一单位的正常人群 217 例作为对照组。调查采用统一表格，由我科医生及体检病房医生询问被调查的病例和对照组，调查的内容主要有：年龄、性别、民族、肥胖史、饮食习惯等。测量身高、血压、血糖。病例和对照在检查前 1 d 内禁食高脂类食物，停止体育锻炼，并于次日晨空腹先抽取静脉血测定空腹血糖(Limosis plasma glucose，LPG)、血脂；然后口服 75 g 葡萄糖水于 2 h 后抽取静脉血浆血测定 2 h 血糖值即 OGTT 2 h 血糖。诊断参照 1985 年 WHO 标准。无糖尿病症状，空腹血糖 6.1～7.8 mmol/L，OGTT 2 h 血糖 7.8～11.1 mmol/L 时诊断为 IGT。

检测方法：血糖测定采用氧化酶法(PAP 法)，试剂由深圳中山生化制品实业有限公司产。甘油三脂(TG)采用 GPO/POD 酶法。总胆固醇(CH)采用 PAP 法。高密度脂蛋白(HDL)采用磷钨酸沉淀法。低密度脂蛋白(LDL)＝(TC-HDL)－1/5TG，极低密度脂蛋白(VLDL)＝TG/2.2。测试仪器为 ISP-M 半自动生化仪(荷兰产)。

统计学处理：数据处理在 IBM-PC/XT 上进行。

2 结果

单因素非条件 logistic 回归分析：年龄，肥胖史、高血压史、高血脂史、体育活动、服药史、体重、收缩压、空腹血糖、身高质量指数(Body mass index，BMI)这些变量在两组间差异有显著性($P<0.05$，OR 95%CI >1，$\beta>0$)。

多因素非条件 Logistic 回归模型分析：年龄、舒张压、空腹血

（下转 1055 页）

作者简介：王 建(1970－)，男，湖南省武冈市人，医师。电话：(023)68755635

收稿日期：1999-09-27；修回日期：2000-06-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net