

· 基础研究 ·

葡萄糖和醛固酮对大鼠心脏成纤维细胞增殖的影响

赵 慧¹, 崔 炜^{1*}, 张海林², 鲁静朝¹, 王 倩¹

(¹ 河北医科大学第二医院心内科/河北省心脑血管病研究所, 石家庄 050000; ² 河北医科大学基础医学院药理教研室, 石家庄 050017)

【摘要】目的 研究葡萄糖和醛固酮对大鼠心脏成纤维细胞增殖的影响。方法 差速贴壁法培养新生大鼠心脏成纤维细胞, 不同葡萄糖浓度培养液及醛固酮干预 24 h 后, 采用水溶性磷酸化四唑盐 (WST-1) 溴尿苷 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 掺入法同步测定细胞的代谢活性和 DNA 合成。结果 低糖组 WST-1 和 BrdU 两种方法测得的 $A_{450/690}$ 值分别为 0.270 ± 0.016 , 0.206 ± 0.018 。与低糖组相比, 高糖组细胞的代谢活性[WST-1: (0.385 ± 0.028) vs (0.417 ± 0.034)]和 DNA 合成[BrdU: (0.270 ± 0.029) vs (0.279 ± 0.045)]均显著增加 ($P < 0.01$), 两高糖组间细胞的代谢活性和 DNA 合成差异无统计学意义。低糖培养时, 醛固酮 (10^{-7} mol/L) 显著促进成纤维细胞的增殖 (WST-1: 0.317 ± 0.023 , $P < 0.01$; BrdU: 0.235 ± 0.018 , $P = 0.019$)。高糖培养时, 醛固酮的刺激成纤维细胞增殖作用不明显 ($P > 0.05$)。在不同糖浓度, 螺内酯均能显著抑制醛固酮引起的细胞代谢活性增强 ($P < 0.05$), 但对 DNA 合成的抑制并不明显 ($P > 0.05$)。进一步分析表明, 葡萄糖和醛固酮对成纤维细胞的 DNA 合成有交互作用 ($P = 0.012$)。结论 葡萄糖及醛固酮均可促进大鼠心脏成纤维细胞增殖; 当以较高浓度的葡萄糖对心脏成纤维细胞培养时, 醛固酮的刺激增殖作用可被掩盖。

【关键词】 醛固酮; 葡萄糖; 成纤维细胞; 心脏; 增殖

【中图分类号】 R542.23

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403 (2011) 03-0269-04

Effects of glucose and aldosterone on proliferation of rat cardiac fibroblasts

ZHAO Hui¹, CUI Wei^{1*}, ZHANG Hailin², LU Jingchao¹, WANG Qian¹

(¹Department of Cardiology, Second Hospital, Hebei Medical University, Institute of Cardiocerebrovascular Diseases of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China; ²Department of Pharmacology, Basic Medical School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of glucose and aldosterone on the proliferation of rat cardiac fibroblasts. **Methods** The neonatal SD rat cardiac fibroblasts (CFs) were isolated by the differential attachment technique. CFs were treated with different concentrations of glucose with or without aldosterone for 24 hours. DNA synthesis and metabolic activity of CFs were measured simultaneously with broxuridine (5-bromo-2'-deoxyurine, BrdU) incorporation and a water-soluble sulfonated tetrazolium (WST-1) ELISA respectively. **Results** Absorbance of CFs at 450/690 nm in low glucose media (5.6 mmol/L) was 0.270 ± 0.016 and 0.206 ± 0.018 detected with WST-1 and BrdU respectively. Compared with low concentration of glucose, high concentrations of glucose (15 and 25 mmol/L) significantly increased the metabolic activity [WST-1: (0.385 ± 0.028) vs (0.417 ± 0.034)] and DNA synthesis of CFs [BrdU: (0.270 ± 0.029) vs (0.279 ± 0.045), $P < 0.01$], while with no difference between the two high concentrations of glucose groups. Addition of aldosterone (10^{-7} mol/L) to low-glucose media resulted in significant increase (WST-1: 0.317 ± 0.023 , $P < 0.01$; BrdU: 0.235 ± 0.018 , $P = 0.019$) in proliferation of CFs. However, aldosterone exerted no effect on proliferation of CFs when incubated in high glucose media ($P > 0.05$). In three different glucose concentrations, spironolactone (10^{-6} mol/L) significantly inhibited aldosterone-induced metabolic activity increase in CFs measured by WST-1 ($P < 0.05$), but exerted no effect on DNA synthesis of CFs induced by aldosterone ($P > 0.05$). Further analysis suggested an interacting effects of aldosterone and glucose on CFs DNA synthesis ($P = 0.012$). **Conclusion** Both glucose and aldosterone could stimulate the proliferation of CFs. In high glucose concentration, the stimulatory effect of aldosterone may be masked.

【Key words】 aldosterone; glucose; fibroblasts; heart; proliferation

资料显示, 在大鼠心脏能局部合成醛固酮, 并且对心脏产生特异性作用^[1,2]; 醛固酮可通过非基因调节作用使细胞增殖^[3], 且其通过盐皮质激素受体

(mineralcorticoid receptor, MR) 调节的经典途径与非基因调节途径间存在信号串话^[4]。高浓度葡萄糖 (10~30 mmol/L) 刺激细胞增殖可见于大鼠心脏成

纤维细胞和人心脏成纤维细胞^[5]。研究表明,高葡萄糖血症可通过多种途径促使心脏纤维化,其机制包括暂时或持续的促进成纤维细胞增殖和增加成纤维细胞外基质的产生。但高浓度葡萄糖和醛固酮对人心脏成纤维细胞的增殖是否有协同作用,结论不一致^[5,6]。本研究以新生大鼠心脏成纤维细胞为模型,研究不同糖浓度和醛固酮对其增殖的影响,为心脏纤维化的发生提供了新的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

出生1~3d的SD大鼠,雌雄不限,购于河北医科大学动物中心;胰酶、醛固酮(alosterone, Ald)、螺内酯(spironolactone, Spi)和L-葡萄糖(Sigma公司);低糖DMEM培养基和DMEM/F12培养基(Gibco公司);D-葡萄糖(Amresco公司);胎牛血清(兰州民海生物公司);WST-1试剂盒和BrdU试剂盒(德国Boehringer Mannheim公司);ABC试剂盒(武汉博士德公司)。其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 心脏成纤维细胞的培养及鉴定

无菌条件下取出生1~3d的SD大鼠心脏,开胸剪取心室,采用胰蛋白酶消化法和差速贴壁法获取心脏成纤维细胞^[7]。在37℃,5%CO₂培养箱内培养,细胞生长至亚融合状态时,以1:2传代,实验所用细胞均为第二代细胞。链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin complex, SABC)法免疫组织化学染色波形蛋白、纤维黏连蛋白,阳性鉴定为所需的心脏成纤维细胞。

1.3 实验分组

将生长状态一致、处于对数生长期的第二代细胞随机分为9组:(1)低糖组(5.6mmol/L D-葡萄糖);(2)低糖+10⁻⁷mol/L Ald组;(3)低糖+10⁻⁷mol/L Ald+10⁻⁶mol/L Spi组;(4)高糖A组(15mmol/L D-葡萄糖);(5)高糖A+10⁻⁷mol/L Ald组;(6)高糖A+10⁻⁷mol/L Ald+10⁻⁶mol/L Spi组;(7)高糖B组(25mmol/L D-葡萄糖);(8)高糖B+10⁻⁷mol/L Ald组;(9)高糖B+10⁻⁷mol/L Ald+10⁻⁶mol/L Spi组。各组的培养液均用L-葡萄糖调节使其渗透压相等。

1.4 BrdU 和 WST-1 ELISA 法同步测定心脏成纤维细胞的 DNA 合成和代谢活性

按照参考文献^[8]进行。将生长良好的第一代细胞消化、收集、记数,调整浓度后接种于96孔板,每孔5000~6000个细胞。37℃、5%CO₂及饱和湿度下培养24h,弃去各孔培养液,以无血清低糖DMEM

培养液培养24h,使细胞进入静止生长期。根据实验分组加入各种处理因素(100μl/孔),作用24h后按试剂盒说明书测定吸光值。具体步骤如下:(1)加无菌100μmol/L BrdU标志液10μl/孔;(2)在培养箱孵育7h后,加入即用型WST-1溶液10μl/孔,继续孵育3h;(3)取出培养板,振荡器上300r/min振荡1min后,酶标仪450/690nm双波长测定A值,即WST-1检测值;(4)充分倾出液体,加FixDenat液200μl/孔,室温(15℃~25℃)培养30min;(5)充分倾出FixDenat液,加入新鲜配制的抗BrdU-POD工作液100μl/孔,室温培养90min;(6)充分倾出孔内的抗体工作液,200μl/孔PBS冲洗液(1×)冲洗3遍;(7)倾出上清液,加入底物液100μl/孔室温培养20min;(8)加入1mol/L H₂SO₄终止液(25μl/孔),振荡1min(300r/min)混匀,5min内于450/690nm波长测定吸光值(A),即BrdU检测值。每组设6个复孔(n=6)。每次测定设两个空白孔(培养液代替细胞)和一个背景对照孔(含细胞不加BrdU或WST-1标记液,余步骤不变)。

1.5 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数比较采用单因素方差分析,组与组之间分析采用多组均数的两两比较,交互作用采用两因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心脏成纤维细胞鉴定

倒置显微镜下,原代培养的心脏成纤维细胞12~16h后可观察到散在分布的单个纺锤样梭形细胞,折光强,似结晶小体。第2天后,细胞逐渐伸展成梭形或不规则三角形,胞质淡而几乎透明,折光弱,细胞核较大,呈椭圆形,通常含2~3个核,胞质向外伸出突起,细胞排列呈放射状或火焰状。无自发性搏动。免疫细胞化学染色,光镜下见细胞呈梭形或多角形,纤维黏连蛋白染色呈阳性,胞浆内围绕细胞核呈现棕黄色细密颗粒,呈细丝状,PBS对照呈阴性,符合成纤维细胞的染色特征。免疫组织化学检测波形蛋白、纤维黏连蛋白,阳性鉴定为所需的心肌成纤维细胞,纯度达94%(图1)。

2.2 不同糖浓度对成纤维细胞增殖的影响

WST-1和BrdU结果表明,低糖组两种方法测得的 $A_{450/690}$ 分别为 0.270 ± 0.016 , 0.206 ± 0.018 。与低糖组比较,高糖组(15,25mmol/L)细胞的代谢活

性 (0.385 ± 0.028 , 0.417 ± 0.034) 和 DNA 合成 (0.270 ± 0.029 , 0.279 ± 0.045) 均显著增高 ($P < 0.01$)。但高糖两组之间差异无统计学意义 (表 1)。

2.3 Ald 在不同糖浓度时对成纤维细胞增殖的影响

WST-1 和 BrdU 结果表明, 与低糖组比较, 低糖 + 10^{-7} mol/L Ald 组细胞的代谢活性和 DNA 合成均明显增高 ($P < 0.05$)。但高糖 + 10^{-7} mol/L Ald 组与对应的高糖组比较差异均无统计学意义 (表 1)。

2.4 Spi 对 Ald 刺激成纤维细胞增殖的影响

WST-1 和 BrdU 结果表明, 在不同糖浓度, 与加 Ald 组比较, Spi 均能显著抑制 Ald 引起的细胞代谢活性增强 ($P < 0.05$), 但对 DNA 合成的抑制并不明显 ($P > 0.05$; 表 1)。

2.5 糖和醛固酮对成纤维细胞增殖的交互作用

WST-1 和 BrdU 结果表明, 不同糖浓度对成纤维细胞代谢活性和 DNA 合成的影响不同 ($P < 0.01$); 10^{-7} mol/L Ald 对成纤维细胞代谢活性的影响有显著性差异 (WST-1, $P < 0.05$), 但其对成纤维细胞 DNA 合成的影响不明显 ($P > 0.05$); 两者

对成纤维细胞代谢活性的交互作用不明显 ($P = 0.085$), 但对成纤维细胞的 DNA 合成有交互作用 ($P = 0.012$; 图 2)。

3 讨论

肾素-血管紧张素-醛固酮系统在糖尿病的发病中也起到重要作用, 有大量证据证明在心血管组织中 Ald 通过非基因作用干扰细胞内胰岛素信号, 使糖代谢平衡受损^[9]。近些年来的研究显示, Ald 的非基因作用不能被其受体阻断剂所阻断, 但能影响经典的受体调节^[4], 可见高糖和 Ald 相互影响, 在糖尿病患者心脏纤维化过程中起到重要作用。

在本实验中, 为了排除渗透压的影响, 采用不被细胞代谢的 L-葡萄糖调节三种不同糖浓度培养液, 使其渗透压相同。在此情况下, 高糖仍显著刺激心脏成纤维细胞的增殖, 可见不论渗透压是否参与细胞增殖, 高糖的促增殖作用毋庸置疑。

关于 Ald 对心脏纤维化进展的影响是存在争议的。在高 Ald 大鼠模型的活体实验中体现了其促纤维化的作用, 但在一些体外培养大鼠成纤维细胞的

图 1 心脏成纤维细胞免疫组化 SABC 法检测波形蛋白 (A $\times 40$) 和纤维黏连蛋白 (B $\times 100$)

表 1 不同糖浓度、醛固酮、螺内酯对心脏成纤维细胞增殖的影响 ($A_{450/690}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	WST-1	BrdU
低糖组	0.270 ± 0.016	0.206 ± 0.018
低糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮组	$0.317 \pm 0.023^{**}$	$0.235 \pm 0.018^{*}$
低糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮 + 10^{-6} mol/L 螺内酯组	$0.265 \pm 0.041^{\#}$	0.205 ± 0.020
中糖组	$0.385 \pm 0.028^{**}$	$0.270 \pm 0.029^{**}$
中糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮组	0.405 ± 0.027	0.240 ± 0.032
中糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮 + 10^{-6} mol/L 螺内酯组	$0.361 \pm 0.015^{\#\#}$	0.238 ± 0.024
高糖组	$0.417 \pm 0.034^{**}$	$0.279 \pm 0.045^{**}$
高糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮组	0.415 ± 0.025	0.240 ± 0.017
高糖 + 10^{-7} mol/L 醛固酮 + 10^{-6} mol/L 螺内酯组	$0.384 \pm 0.015^{\#}$	0.243 ± 0.015

注: 与低糖组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与糖+醛固酮组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$

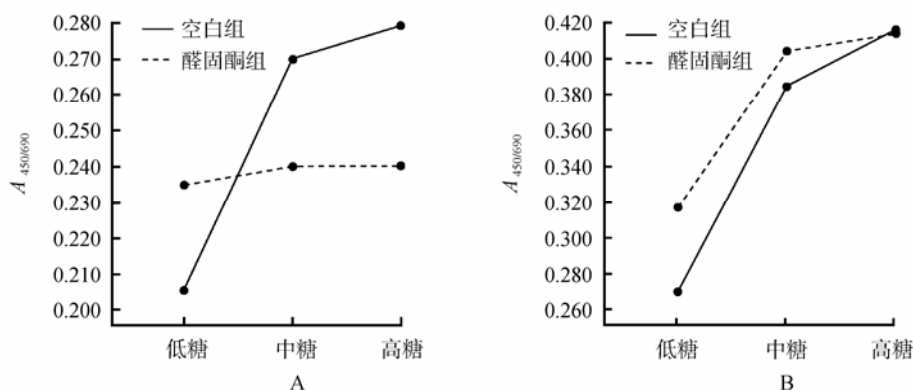


图 2 醛固酮和不同糖浓度的交互作用
A: BrdU 掺入法; B: WST-1 掺入法

数据提供了相反的结果^[10,11]。在本实验中,成纤维细胞在高糖环境下,Ald 对其代谢活性和 DNA 合成也均没有明显的影响。然而,在低糖环境中,Ald 的刺激增殖作用非常明显,且能被 Spi 阻断。这些结果提示葡萄糖和 Ald 可能有相同的促细胞增殖途径,Ald 的刺激增殖作用可能在高糖更强的作用下被掩盖了,或者两者之间还有不被人们所认识的拮抗作用。

Neumann 等^[5]报道,用 WST-1 法来测定细胞增殖,葡萄糖和 Ald 之间无协同作用,与本研究结果一致。本研究中,用 BrdU 掺入法测定 Ald 刺激成纤维细胞的 DNA 合成,其主效应不明显,但与不同 Ald 浓度之间的交互作用显著,表明 Ald 的促 DNA 合成作用被葡萄糖所掩盖。用两种方法同步测定的结果显示,低糖时,Ald 刺激下的细胞代谢活性和 DNA 合成都显著增加,且可被 Spi 阻断,明确了 Ald 的刺激增殖作用通过经典的受体途径起作用;高糖时,Ald 刺激增殖不明显,但 Spi 仍能抑制细胞代谢活性的增加,提示 Ald 对心脏成纤维细胞代谢活性的影响要大于对 DNA 合成的影响。

总之,Ald 的促成纤维细胞的增殖作用可通过 MR 经典途径及非基因调节起作用,其与高糖促进细胞增殖机制之间的相互影响有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] Delcayre C, Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling: the role of aldosterone[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(12): 1577-1584.
- [2] Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, et al. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling[J]. Kidney Int, 2000, 57(4): 1346-1351.
- [3] Lastra-Gonzalez G, Manrique-Acevedo C, Sowers JR. The role of aldosterone in cardiovascular disease in people with diabetes and hypertension: an update[J]. Curr Diab Rep, 2008, 8(3): 203-207.
- [4] Zollner S, Hwang KH, Wilzewski B, et al. Aldosterone: from biosynthesis to non-genomic action onto the proteome[J]. Steroids, 2008, 73(9-10): 966-972.
- [5] Neumann S, Huse K, Semrau R, et al. Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts *in vitro*[J]. Hypertension, 2002, 39(3): 756-760.
- [6] Sato A, Funder JW. High glucose stimulates aldosterone induced hypertrophy via type I mineralocorticoid receptors in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Endocrinology, 1996, 137(10): 4145-4153.
- [7] 冯丹, 徐江, 邹军. 缓激肽对卡托普利抑制新生大鼠心脏成纤维细胞增殖作用的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21(9): 552-554.
- [8] 林岚, 洪华山, 王一波, 等. 体外培养心脏成纤维细胞增殖的检测方法[J]. 福建医科大学学报, 2000, 34(01): 10-13.
- [9] Lastra-Lastra G, Sowers JR, Restrepo-Erazo K, et al. The role of aldosterone and angiotensin in insulin resistance: an update[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2009, 71(1): 1-6.
- [10] Rombouts K, Wielant A, Hellemans K, et al. Influence of aldosterone on collagen synthesis and proliferation of rat cardiac fibroblasts[J]. Br J Pharmacol, 2001, 134(1): 224-232.
- [11] Chai W, Garrelds IM, Arulmani U, et al. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective[J]. Br J Pharmacol, 2005, 145(5): 664-671.

(编辑: 王雪萍)