

丹酚酸B对转化生长因子 β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的影响^Δ

罗红^{1,2*}, 杨红宇², 沈祥春^{1#} (1. 贵阳医学院GLP中心, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院实验动物中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R285;R331 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0202-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.04

摘要 目的:探讨丹酚酸B对转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)诱导心肌成纤维细胞增殖的影响。方法:培养原代心肌成纤维细胞;采用波形蛋白、肌动蛋白及纤维连接蛋白免疫组化染色鉴定心肌成纤维细胞,计算阳性细胞率;加入TGF- β_1 ,使其终质量浓度为5、10、20、40 ng/ml,以MTT法测定细胞增殖活性;加入丹酚酸B 100 μ l,使其终浓度为10、30、100 μ mol/L,1 h后加100 μ l TGF- β_1 ,使其终质量浓度为20 ng/ml,以MTT法测定细胞增殖活性。结果:倒置显微镜下观察细胞呈梭形,排列较紧密,有的重叠交叉生长;免疫组化染色鉴定该细胞为心肌成纤维细胞,纯度>99%;10~40 ng/ml的TGF- β_1 均可显著诱导心肌成纤维细胞增殖,10~100 μ mol/L的丹酚酸B均可显著抑制TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞增殖。结论:丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖具有抑制作用。

关键词 转化生长因子 β_1 ; 丹酚酸B; 心肌成纤维细胞; 细胞增殖

Effects of Salvianolic Acid B on the Proliferation of Cardiac Fibroblast Induced by TGF- β_1

LUO Hong^{1,2}, YANG Hong-yu², SHEN Xiang-chun¹ (1. GLP Laboratory of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Laboratory Animal Center of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of salvianolic acid B on the proliferation of cardiac fibroblast induced by TGF- β_1 *in vitro*. METHODS: The cardiac fibroblasts were cultured primarily, which were identified by vimentin, actin and fibronectin immunohistochemical staining. The percentage of positive cells was calculated. The proliferation of cardiac fibroblast was reproduced by TGF- β_1 whose optimal concentration was 5, 10, 20 and 40 ng/ml and explored by MTT assay. The concentrations of cardiac fibroblast were 10, 30 and 100 μ mol/L after adding salvianolic acid B 100 μ l; 1 h later adding TGF- β_1 , that of cardiac fibroblast was 20 ng/ml. The proliferation activity of salvianolic acid B was detected by MTT assay. RESULTS: The cells were spindle-shaped and arranged closely under inverted microscope, and some crisscross. The immunohistochemical results confirmed that the cells were cardiac fibroblasts, with purity >99%. 10-40 ng/ml TGF- β_1 could inhibit the proliferation of cardiac fibroblast significantly; 10-100 μ mol/ml salvianolic acid B could significantly inhibit the proliferation of cardiac fibroblast induced by TGF- β_1 . CONCLUSIONS: Salvianolic acid B can inhibit the proliferation of cardiac fibroblast induced by TGF- β_1 .

KEYWORDS TGF- β_1 ; Salvianolic acid B; Cardiac fibroblasts; Cell proliferation

心力衰竭是全球心血管疾病发病和死亡的主要原因,高达50%的心力衰竭患者心脏收缩和舒张功能不全,而导致收

缩和舒张功能障碍的最主要原因是心肌纤维化,其主要表现为心肌组织胶原的过度沉积,引发心肌顺应性降低,收缩和舒

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:170.
- [2] 张文学. 中药羌活的化学成分研究[J]. 山西中医学院学报, 2008, 9(4):45.
- [3] 孙辉, 蒋舜媛, 陈世林. 高寒山区濒危药用植物羌活产地适宜性及生产区划分析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5):535.
- [4] 王珍, 陈士林, 黄林芳, 等. 羌活质量控制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(3):209.
- [5] 肖培根, 赵润怀, 龙兴超, 等. 中药资源可持续发展产销情况的宏观分析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17):2135.
- [6] 彭小红, 朱宏伟, 董生健, 等. 羌活资源的供需矛盾及解决对策[J]. 甘肃农业, 2006(6):136.
- [7] 陈燕, 易进海, 刘云华, 等. 中药羌活质量标准研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5):945.
- [8] 古丽娜, 沙比尔, 郭洪祝, 郭慧, 等. HPLC法测定羌活中阿魏酸、羌活醇、苯乙基阿魏酸酯和异欧前胡素[J]. 中草药, 2006, 37(6):937.
- [9] 俞科贤, 李福安, 魏全嘉, 等. 羌活醇提取物对肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织抗氧化酶的影响[J]. 中医杂志, 2011, 52(13):1135.
- [10] 张南平, 魏峰, 肖新月, 等. 中药资源的可持续利用现状与建议[J]. 中国药事, 2011, 25(11):1079.

(收稿日期:2013-06-03 修回日期:2013-09-03)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173586);贵州省国际科技合作计划项目(No.黔科合外G字[2009]700115号)

* 助理实验师。研究方向:药理学。E-mail:luohong1011@163.com

通信作者:教授。研究方向:药理学。电话:0851-6909828。E-mail:shenxiangchun@126.com

张功能受损,最终导致心力衰竭的发生^[1]。目前研究表明,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)在心肌纤维化病变中扮演十分重要的角色,其主要作用包括调控炎症反应、细胞外基质的沉积、心肌成纤维细胞的增殖与分化等。降低TGF- β_1 的表达可以减少细胞外基质的沉积,进而减轻心肌纤维化^[2-3]。

丹酚酸B(Salvianolic acid B)是从传统药材丹参中提取的水溶性成分之一,由3分子丹参素与1分子咖啡酸缩合而成,其结构中含有多个酚羟基,具有很强的抗氧化性。近年来的研究发现,丹酚酸B对心肌缺血再灌注损伤、脑缺血再灌注损伤有保护作用^[4];并且具有抗动脉粥样硬化,保护内皮细胞^[5],抗肝、肾、肺、胰腺纤维化,抗衰老,抗肿瘤等药理作用^[6]。因此,本研究采用TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖,以丹酚酸B为反应药物,探讨丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的影响。

1 材料

1.1 仪器

HF90/HF240型CO₂孵育箱(上海力申科学仪器有限公司);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);ELX800型酶联免疫检测仪(美国GE公司)。

1.2 药品与试剂

丹酚酸B(武汉阿拉丁试剂股份有限公司,纯度>98%);高糖DMEM培养基(美国Gibco公司);MTT(北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);胰蛋白酶(北京赛默飞生物化学制品有限公司);肌动蛋白兔单克隆抗体、波形蛋白兔单克隆抗体、纤维连接蛋白兔单克隆抗体(宜百康生物科技股份有限公司);二氨基联苯胺(DAB)染色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 动物

新生1~3 d的SD乳鼠,由贵阳医学院动物实验中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(黔)2012-001]。

2 方法

2.1 心肌成纤维细胞的培养

新生1~3 d的SD乳鼠,取下心尖部分,放在盛有PBS的培养皿中,用虹膜剪剪成大小约1 mm³的碎块,用少量培养液润洗并转入培养瓶,翻转培养瓶,加入4 ml含20%胎牛血清的培养基,置培养箱使组织块贴壁4 h,翻转培养瓶,让培养基浸没组织块,待细胞游出后进行反复差速贴壁,以纯化心肌成纤维细胞,采用3~5代细胞进行后续实验。

2.2 心肌成纤维细胞的鉴定

采用波形蛋白、肌动蛋白及纤维连接蛋白免疫组化染色,鉴定心肌成纤维细胞。细胞爬片后,采用4%的多聚甲醛固定30 min,0.5%的Triton破膜20 min,3%的H₂O₂孵育15 min以消除内源过氧化物活性,滴加山羊血清室温下孵育15 min,滴加一抗(1:200, V/V)4℃过夜,滴加二抗(1:200, V/V)室温下孵育15 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液室温下孵育15 min, DAB显色后自来水冲洗,采用不同体积分数的乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。所有片子均在显微镜下观察,选择单层生长的细胞,计算阳性细胞率。

2.3 TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖

将处于对数生长期的心肌成纤维细胞密度调至 1×10^5 ml⁻¹,每孔加入100 μ l接种于96孔培养板中,并设空白对照(只加培养液不加细胞)。细胞培养24 h后实验组各孔分别加100

μ l的TGF- β_1 ,使其质量浓度分别为5、10、20、40 ng/ml,培养24 h后每孔加入5 mg/ml的MTT溶液20 μ l,继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃上清液,每孔加入150 μ l二甲亚砷(DMSO),振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上490 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,以OD值表示细胞增殖活性,每个质量浓度设6个重复孔,重复3次。

2.4 丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的影响

将处于对数生长期的心肌成纤维细胞密度调至 1×10^5 ml⁻¹,每孔加入100 μ l接种于96孔培养板中,并设空白对照(只加培养液不加细胞)。细胞培养24 h后弃去原培养液,加丹酚酸B 100 μ l,使其浓度分别为10、30、100 μ mol/L(丹酚酸B低、中、高浓度组),1 h后加入100 μ l TGF- β_1 ,使其终质量浓度为20 ng/ml,24 h后弃去原培养液,PBS洗3遍,加入200 μ l空白DMEM培养基,每孔加入5 mg/ml的MTT溶液20 μ l,继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃上清液,每孔加入150 μ l DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上490 nm波长处测定OD值,每个质量浓度设6个重复孔,重复3次。另设TGF- β_1 (20 ng/ml)组,除不加丹酚酸B,其余操作同上。

2.5 统计学方法

实验数据均采用SPSS13.0软件进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌成纤维细胞形态

倒置显微镜下观察,培养的心肌成纤维细胞生长较慢,3 d左右开始从组织块边缘爬出,10 d呈融合状态,细胞呈梭形,排列较紧密,有的重叠交叉生长,胞核较大,呈椭圆形,胞浆透明,胞体较大,无自发搏动。心肌成纤维细胞见图1。

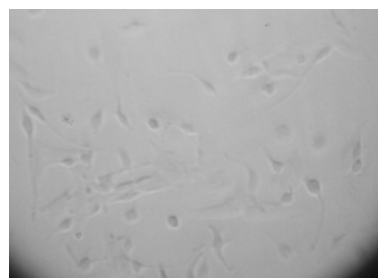


图1 心肌成纤维细胞(200 \times)

Fig 1 Cardiac fibroblasts(200 \times)

3.2 心肌成纤维细胞鉴定

免疫组化染色后,光镜下见细胞呈梭形或多角形,均符合成纤维细胞的染色特征。其中,波形蛋白、肌动蛋白染色后,胞质被染成棕黄色,呈阳性反应;纤维连接蛋白胞浆内围绕胞核呈现棕黄色的细密颗粒,呈细丝状,为阳性反应。波形蛋白、肌动蛋白及纤维连接蛋白染色均为阳性,鉴定该细胞为心肌成纤维细胞,纯度>99%。心肌成纤维细胞免疫组化鉴定结果见图2。

3.3 TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖

与质量浓度为0 ng/ml比较,TGF- β_1 质量浓度为10~40 ng/ml的OD值升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。根据增殖率,选择20 ng/ml为TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的最佳质量浓度。此外,对TGF- β_1 的质量浓度和心肌成纤维细胞的OD值进行相关分析,TGF- β_1 的质量浓度与心肌成纤维细胞的增殖之间呈正相关($r = 0.894, P < 0.01$)。

TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的量-效关系见表1。

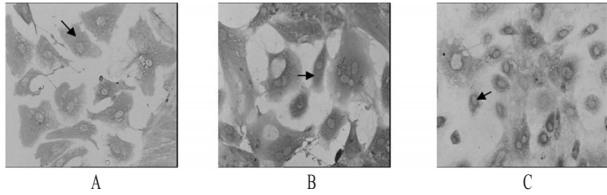


图2 心肌成纤维细胞免疫组化鉴定结果

A.波形蛋白;B.肌动蛋白;C.纤维连接蛋白

Fig 2 The immunocytochemistry results of cardiac fibroblast

A.vimentin; B. actin; C. fibronectin

表1 TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的量-效关系($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 The dose-effect relation of the proliferation of cardiac fibroblasts induced by TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度,ng/ml	OD值	增殖率,%
0	0.274±0.011	
5	0.287±0.010	104.62
10	0.293±0.017	107.06*
20	0.330±0.016	120.00**
40	0.352±0.032	128.00**

与0 ng/ml比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. 0 ng/ml: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的抑制作用

与空白对照组比较,TGF- β_1 组OD值升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与TGF- β_1 组比较,丹酚酸B高、中、低浓度组OD值降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明丹酚酸B能抑制TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞的增殖。对丹酚酸B的质量浓度和TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞的OD值进行相关分析,丹酚酸B的质量浓度与TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞增殖之间呈负相关($r=-0.603, P<0.01$)。丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的抑制作用见表2。

表2 丹酚酸B对TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The inhibitory action of inhibitory effect of salvianolic acid B on the proliferation of cardiac fibroblasts induced by TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度	OD值
空白对照组		0.350±0.027
TGF- β_1 组	20 ng/ml	0.582±0.113*
丹酚酸B低浓度组	10 μ mol/L	0.454±0.004 [#]
丹酚酸B中浓度组	30 μ mol/L	0.434±0.085 [#]
丹酚酸B高浓度组	100 μ mol/L	0.354±0.038 [#]

与空白对照组比较: * $P<0.01$;与TGF- β_1 组比较: [#] $P<0.01$

vs. blank control group: * $P<0.01$; vs. TGF- β_1 group: [#] $P<0.01$

4 讨论

TGF- β_1 能诱导成纤维细胞转化为心肌成纤维细胞并刺激细胞外基质蛋白的合成^[7-8],还能通过抑制基质金属蛋白酶的活性,诱导基质金属蛋白酶的抑制剂,如纤溶酶原激活物抑制剂和金属蛋白酶组织抑制剂的表达来减少细胞外基质的降解^[9],增加细胞外基质的沉积,加重心肌纤维化。本研究结果表明,TGF- β_1 的质量浓度与心肌成纤维细胞增殖呈显著正相

关,TGF- β_1 作用组心肌成纤维细胞增殖活跃;而丹酚酸B的质量浓度与TGF- β_1 诱导心肌成纤维细胞增殖呈显著负相关,10~100 μ mol/L的丹酚酸B能显著抑制由TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞增殖,随着丹酚酸B的浓度增大抑制作用逐渐增强,其作用机制可能与丹酚酸B抑制TGF- β_1 信号通路的下游蛋白表达有关。

目前有研究发现,丹酚酸B能显著抑制基质金属蛋白酶9诱导的心肌成纤维细胞迁移、胶原合成及分泌细胞因子等^[10-11]。本研究证实,丹酚酸B能显著抑制TGF- β_1 诱导的心肌成纤维细胞增殖,为传统药材丹参防治心肌纤维化提供了新思路和新靶点。但是,其具体机制以及如何调节目前尚不清楚,还有待深入研究。

参考文献

- [1] Goldsmith EC, Bradshaw AD, Spinale FG. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 2. Contributory pathways leading to myocardial fibrosis: moving beyond collagen expression[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(5): 393.
- [2] Kaur K, Zarzoso M, Ponce-Balbuena D, et al. TGF- β_1 , released by myofibroblasts, differentially regulates transcription and function of sodium and potassium channels in adult rat ventricular myocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):1.
- [3] Chen LX, Yang K, Sun M. Fluorofenidone inhibits transforming growth factor-beta1-induced cardiac myofibroblast differentiation[J]. *Pharmazie*, 2012, 67(5):452.
- [4] 高元锋,陈虎,张浩,等.丹酚酸B对大鼠心肌缺血保护作用及其机制研究[J].*时珍国医国药*, 2012, 23(11):2771.
- [5] 朱靖博,迟晓君,李丽.丹酚酸B对大鼠动脉粥样硬化的影响[J].*大连工业大学学报*, 2010, 29(7):240.
- [6] 王蓉,原永芳.丹酚酸B药理作用的研究概况[J].*中医药导报*, 2011, 17(4):130.
- [7] Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, et al. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3):522.
- [8] Patterson NL, Iyer RP, Bras LD, et al. Using proteomics to uncover extracellular matrix interactions during cardiac remodeling[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2013, 7(7/8):516.
- [9] Zeng QC, Guo Y, Liu L. Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix produced in vitro stimulates growth and metabolism of cultured ventricular cells[J]. *Int Heart J*, 2013, 54(1):40.
- [10] Liu X, Meng L, Shi Q, et al. Dermatotentin promotes adhesion, spreading and migration of cardiac fibroblasts in vitro[J]. *Matrix Biol*, 2013, 32(1):23.
- [11] Zhang Y, Wang Y, Liu Y, et al. Krüppel-like factor 4 transcriptionally regulates TGF- β_1 and contributes to cardiac myofibroblast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):1.

(收稿日期:2013-05-27 修回日期:2013-07-13)