

· 基础研究 ·

## 高糖状态下心肌成纤维细胞 I、III 型胶原表达变化的观察

戴斌<sup>1</sup>, 崔猛<sup>2</sup>, 张宏<sup>3</sup>

(1. 天津医科大学总医院内分泌科, 天津 300052; 2. 天津医院创伤骨科, 天津 300211; 3. 天津医科大学代谢病医院肥胖代谢科, 天津 300070)

**摘要:**目的 探讨高糖对大鼠心肌成纤维细胞 I、III 型胶原表达的影响。方法 采用胰酶消化法和差速贴壁分离法获取心肌成纤维细胞, 采用正常糖(5.5 mmol/L, 对照组)和高糖(25 mmol/L, 高糖组)干预。用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)方法检测 I、III 型前胶原 mRNA 表达, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)观察 I、III 型胶原蛋白水平的变化。结果 与对照组比较, 高糖刺激 12 h 可使心肌成纤维细胞 I、III 型前胶原 mRNA 表达增加, I、III 型前胶原 mRNA 表达在 12 h 升高, 在 24 h 达高峰, I 型前胶原 mRNA 升高幅度高于 III 型前胶原 mRNA; 高糖刺激 48 h 可使 I、III 型胶原蛋白表达增加, I 型胶原蛋白升高幅度高于 III 型胶原。结论 高糖可促进大鼠心肌成纤维细胞合成 I、III 型胶原。

**关键词:** 葡萄糖; 心肌; 成纤维细胞; I 型胶原; III 型胶原

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)15-1724-03

## Observation on expression change of type I and III collagen of cardiac fibroblasts under high glucose state

Dai Bin<sup>1</sup>, Cui Meng<sup>2</sup>, Zhang Hong<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Department of Traumatic Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 3. Department of Obesity Metabolism, Metabolic Disease Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of high glucose on the expression of type I and III collagen in rat cardiac fibroblasts. **Methods** Rat cardiac fibroblasts were obtained by pancreatic enzyme digestion method and the differential sidewall separation method. Normal glucose (5.5 mmol/L, control group) and high glucose (25 mmol/L, high glucose group) were adopted for conducting intervention. The mRNA expressions of type I and III procollagen were detected by real-time PCR and the changes of type I and III collagen levels were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the high glucose 12 h stimulation could increase the mRNA expression of I and III procollagen in rat cardiac fibroblasts. The mRNA expression of collagen was increased at 12 h and reached the peak at 24 h. The increasing amplitude of type I collagen mRNA was higher than that of type III collagen. The high glucose 48 h stimulation could increase the expression of type I and III collagen. The increasing amplitude of type I collagen was higher than that of collagen type III. **Conclusion** High glucose could promote the synthesis of type I and III collagen in rat cardiac fibroblasts.

**Key words:** glucose; myocardium; fibroblasts; type I collagen; type III collagen

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DC)是一种独立的、特异的糖尿病并发症,与继发于高血压、冠心病或瓣膜性心脏病的病理、生理改变不完全相同。DC是由糖代谢紊乱引起的心肌细胞原发性损伤及心肌功能障碍,其临床特征主要以左心室肥厚及心肌舒缩功能缺损为主,随着病程的进展会出现充血性心力衰竭,是糖尿病患者致残和致死的重要原因之一。临床研究发现,糖尿病患者多表现为向心性心室肥厚,可伴有左心室功能受损,心脏顺应性下降。除心肌细胞肥大外,心肌纤维化及间质重构亦是DC时心室舒缩功能障碍、心力衰竭的主要机制之一<sup>[1]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 出生 1~3 d 的 SD 幼鼠 15 只,平均体质量 8.5 g,购自天津医科大学动物实验中心。DMEM 培养基购于美国 Sigma 公司。胎牛血清购于英国 Gibco 公司,胰蛋白酶购于美国 Sigma 公司,Vimentin 波形蛋白单克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。I 型前胶原羧基端肽(P I CP)与 III 型前胶原氨基端肽(P III NP)ELISA 试剂盒购于美国 BPB 公司。Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,定量 PCR 相关试剂购于

日本 TaKaRa 公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将幼鼠处死后剪取心尖组织。DMEM 洗,剪碎,II 型前胶原酶消化后收集上清液。加入 10% 胎牛血清,离心重悬细胞,于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养 2 h,吸去上清液,重新加入培养液,原代培养细胞生长成细胞单层。用 0.25% 胰蛋白酶消化以后,以 1:2 比例传代培养。经 3 次传代后,已纯化为心肌成纤维细胞,实验选用 3~5 代细胞。行抗波形蛋白多克隆抗体免疫组织化学染色鉴定,结果为阳性。

**1.2.2 试验分组** 所有细胞共分成 2 组。(1)高糖组:高糖培养定义为 DMEM25 培养基中含葡萄糖 25 mmol/L;(2)对照组:正常糖 DMEM5.5 培养基中含葡萄糖 5.5 mmol/L。各组细胞均刺激 6、12、24 h 后,弃去培养液,加 Trizol、氯仿,离心收集细胞沉淀。抽提总 RNA,逆转录 cDNA,以预先设计好的引物进行目的基因的扩增。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 测 6、12、24 h 各组细胞 I、III 型前胶原的 mRNA 表达** I、III 型前胶原 mRNA 表达以逆转录的 cDNA 为模板,扩增各组细胞 I、III 型前胶原的 mRNA,内参

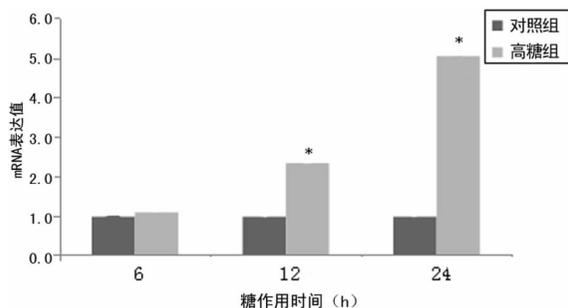
使用 GAPDH。 $\alpha 1$  (I 型)前胶原扩增的上游引物:5'-AGC CAC CAG CCC CTC ACT-3';下游引物 5'-CGA GGT AGT CTT TCA GCA ACA CAG T-3';扩增片断长度为 160 bp。 $\alpha 1$  (III 型)前胶原上游引物:5'-CAA CAC CGA TGA GAT TAT G-3';下游引物:5'-TCA GGA TTG CCG TAG C-3';扩增片断长度为 344 bp。GAPDH 上游引物:5'-GGG GTG ATG CTG GTG CTG AG-3',下游引物 5'-GAT GCA GGG ATG ATG TTC TG-3' 扩增片段 370 bp。反应条件:逆转录 65 °C 10 min,25 °C 5 min;预变性 94 °C 4 min;循环 94 °C 30 s;50 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 40 s;共 40 个循环。

**1.2.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA)测各组细胞 24、48、72 h 3 个时间点的 I、III 型胶原蛋白的表达** I 与 III 型胶原蛋白表达由 P I CP 与 P III NP 决定,根据 ELISA 试剂盒说明操作以检测 P I CP 与 P III CP 的表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。结果取均值,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间均数的比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

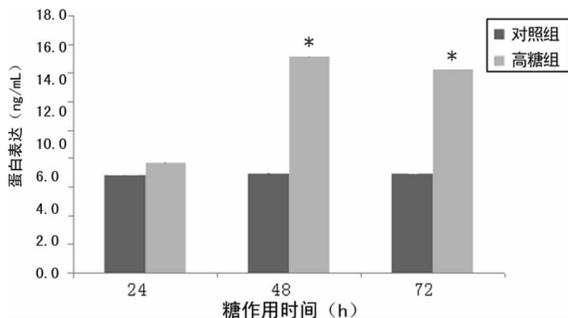
**2 结 果**

**2.1 两组细胞 I 型胶原表达比较** 与对照组比较,高糖组细胞经高糖培养后 I 型前胶原 mRNA 表达显著上升,呈时间依赖性,培养 12 h 后升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),24 h 达高峰;I 型胶原蛋白表达在 24 h 升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),在 48 h 升高达峰值,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 72 h 有所降低,与对照组比较升高仍差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1、2。



\*:  $P < 0.05$  与对照组比较。

图 1 两组细胞 I 型前胶原 mRNA 表达比较

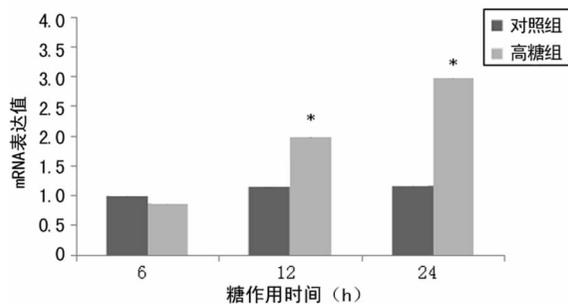


\*:  $P < 0.05$  与对照组比较。

图 2 两组细胞 I 型胶原蛋白表达比较

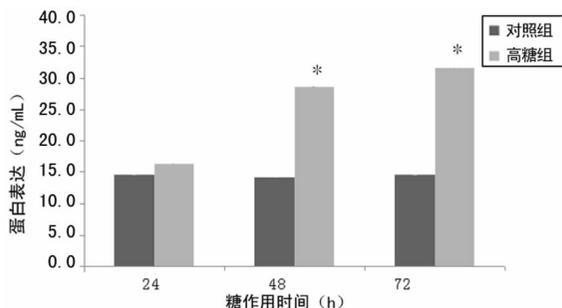
**2.2 两组细胞 III 型胶原表达比较** 与对照组比较,高糖组细胞经高糖培养后 III 型前胶原 mRNA 表达呈时间依赖性上升,12 h 升高差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),24 h 升高达高峰(图 3)。高糖刺激胶原的 mRNA 表达升高,I 型胶原 mRNA 升高幅度较 III 型胶原明显。与对照组比较,高糖组 III 型胶原蛋白表达呈时间依赖性上升,24 h 升高但差异无统计学意义( $P >$

0.05),48 h 明显升高差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),72 h 达高峰(图 4)。与对照组比较,48 h 时 I 型胶原蛋白升高幅度较 III 型胶原明显。



\*:  $P < 0.05$  与对照组比较。

图 3 两组细胞 III 型前胶原 mRNA 表达比较



\*:  $P < 0.05$  与对照组比较。

图 4 两组细胞 III 型胶原蛋白表达比较

**3 讨 论**

糖尿病是一种威胁全人类健康的疾病,发病率逐年增加。而糖尿病目前已被视为冠心病的等危症,因为糖尿病显著升高心血管疾病的发病率和死亡率。有研究发现,糖尿病患者并发冠心病是非糖尿病患者的 4 倍。然而,糖尿病导致冠心病的发生是多因素、多途径的,其具体机制目前尚未完全明确。糖尿病动物模型和临床研究发现糖尿病心脏心肌细胞显著肥大、细胞外基质增加、心脏纤维化和舒缩功能减退,导致心室壁僵硬程度增加,呈现类似限制性心肌病的改变<sup>[2-5]</sup>。

心肌成纤维细胞是心脏组织中数目最多的细胞,遍布于心肌组织,包裹心肌细胞并连接细胞间质<sup>[6-7]</sup>。心肌成纤维细胞是心肌纤维化的主要效应细胞,其过度增殖,胶原分泌增加在心肌纤维化发生、发展中起着重要作用。高血糖是导致心肌纤维化及间质重构的重要因素,有研究表明,糖基化终末产物可诱导心肌成纤维细胞增殖<sup>[8-9]</sup>。高血糖可通过多种途径促使心脏纤维化<sup>[10-12]</sup>,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。其信号调节机制复杂。深入探索高糖诱导心肌纤维化的分子机制对防治糖尿病心肌病的进行性发展具有重要意义。

心肌成纤维细胞是心脏分泌胶原的主要细胞,是维持心脏生理和病理性重塑的主要调节因素<sup>[13-15]</sup>。本实验观察到高糖培养鼠心肌成纤维细胞,可促进 I、III 型胶原 mRNA 和蛋白表达显著上升,表明心肌成纤维细胞的胶原合成在转录和翻译后水平进行。高糖刺激鼠心肌成纤维细胞 I、III 型胶原增殖并呈时间依赖性,培养 12 h mRNA 即升高,而蛋白在 48 h 明显升高,蛋白延后于 mRNA 水平的升高表明了反应的连续性和顺序性。高糖刺激胶原 mRNA 表达升高,I 型胶原 mRNA 升高幅度较 III 型胶原明显。III 型胶原蛋白表达呈时间依赖性上升,

24 h 升高但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 48 h 明显升高差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 72 h 达高峰。48 h 时 I 型胶原蛋白升高幅度较 III 型胶原明显。

高糖促进胶原合成, 从而促进纤维化。本研究证实高糖可以促进大鼠心肌成纤维细胞增殖, I、III 胶原 mRNA 及蛋白表达增多, I 型胶原升高幅度较 III 型胶原明显。其具体上下游信号通路有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S, Negut C, et al. Diabetic cardiomyopathy: a metabolic perspective[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93(8A): 13-16.
- [2] Depre C, Young ME, Ying J, et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(6): 985-996.
- [3] Mazumder PK, O'neill BT, Roberts MW, et al. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts[J]. *Diabetes*, 2004, 53(9): 2366-2374.
- [4] Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, et al. Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart[J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2587-2595.
- [5] Wang RP, Qian YJ, Chen ML. The clinical and pathological findings of diabetic heart disease in the aged[J]. *Chin J Internal Med*, 1998, 37(10): 677-679.
- [6] 郝嘉, 游凯. 心肌成纤维细胞的特性和调节[J]. *心血管病学进展*, 2011, 32(3): 405-408.
- [7] Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the Renaissance cell[J]. *Circ Res*, 2009, 105(12): 1164-1176.
- [8] 李洁, 刘乃丰, 魏芹. 罗格列酮抑制糖基化终产物诱导心

肌成纤维细胞增殖和结缔组织生长因子及 Smad 的表达[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2010, 26(6): 479-483.

- [9] Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(5): 487-495.
- [10] Falcão-Pires I, Palladini G, Gonçalves N, et al. Distinct mechanisms for diastolic dysfunction in diabetes mellitus and chronic pressure-overload[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(5): 801-814.
- [11] 赵树梅, 沈璐华, 李虹伟, 等. 吡格列酮下调高糖培养的心肌成纤维细胞促纤维化因子表达[J]. *临床心血管病杂志*, 2009, 25(3): 223-226.
- [12] Lee YJ, Kim JS, Kang DG, et al. Buddleja officinalis suppresses high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation: role of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and matrix metalloproteinases[J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235(2): 247-255.
- [13] Mir SA, Chatterjee A, Mitra A, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) attenuates interleukin-6 (IL-6)-induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(4): 2666-2677.
- [14] 邹平, 吴立玲, 吴丹, 等. 高糖促进成年大鼠心脏成纤维细胞 periostin 表达及其信号转导机制[J]. *生理学报*, 2010, 62(3): 247-254.
- [15] Wu W, Muchir A, Shan J, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused by mutation in lamin A/C gene[J]. *Circulation*, 2011, 123(1): 53-61.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-02-28)

(上接第 1723 页)

大学学报: 医学版, 2007, 28(4): 91-93.

- [2] 陈言智, 严国胜. 急诊应用胺碘酮治疗快速性心律失常的临床分析[J]. *中外医学研究*, 2011, 9(22): 127-128.
- [3] 张秀玲, 王立民. 胺碘酮治疗急诊快速型心律失常的疗效观察[J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3(23): 39-40.
- [4] 谭小强, 赖沙毅, 王红, 等. 胺碘酮治疗部分快速性心律失常的临床观察[J]. *右江医学*, 2006, 34(5): 478-479.
- [5] 杨向宁, 邓光启. 心律失常的用药经验[J]. *中国医药导报*, 2006, 3(27): 88.
- [6] 张存泰. 如何安全应用抗心律失常药物[J]. *临床心血管病杂志*, 2009, 25(3): 161-162.
- [7] 危小军, 谢东明, 廖伟, 等. 静脉注射毛花苷 C, 普罗帕酮, 胺碘酮控制快速型室上性心律失常 98 例[J]. *陕西医学杂志*, 2006, 35(4): 476-478.
- [8] 张凤林, 马冰. 急诊应用心律平治疗阵发性室上性心动过速效果观察[J]. *中原医刊*, 2006, 33(18): 40-41.
- [9] 刘勇强. 急诊应用胺碘酮治疗快速型心律失常疗效分析

[J]. *临床合理用药杂志*, 2011, 4(12): 49.

- [10] 陈文丽. 胺碘酮静脉给药治疗快速性心律失常[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6(6): 135.
- [11] 陈素芹. 胺碘酮治疗快速性心律失常 63 例临床疗效观察[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2008, 16(9): 32-32.
- [12] 黄辉权. 急诊应用胺碘酮治疗快速性心律失常的疗效观察[J]. *中国实用医药*, 2011, 6(10): 146-147.
- [13] 李永勤, 王敏, 范艳梅, 等. 胺碘酮和毛花苷 C 转复阵发性房颤的疗效比较[J]. *陕西医学杂志*, 2008, 37(4): 474-475.
- [14] 苏丹霞, 胡梅荣. 胺碘酮治疗快速性心律失常的临床观察[J]. *中国现代医生*, 2008, 46(2): 84-85.
- [15] 魏承发. 胺碘酮治疗快速性心律失常 40 例临床观察[J]. *现代医药卫生*, 2008, 24(8): 1194-1195.
- [16] 尤艳. 胺碘酮治疗恶性室性心律失常 68 例有效性和安全性分析[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(9): 2158-2159.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2013-01-30)