

• 基础研究 •

松弛素对高糖环境心脏成纤维细胞胶原基因表达的影响

王 萍, 李虹伟, 王宇朋, 张 盼, 陈 晖, 马文英

【摘要】 目的 探讨人重组松弛素(rhRLX)对高糖环境大鼠心脏成纤维细胞胶原基因表达的影响。方法 原代培养 Sprague-Dawley 大鼠心脏成纤维细胞。用 RT-PCR 方法分别观察在正常糖(NG, 5.6 mmol/L)和高糖(HG, 25 mmol/L)环境下二代成纤维细胞胶原基因和松弛素基因的表达;rhRLX(100 μg/L)分别与 NG, HG 共同作用 72 h 后成纤维细胞胶原基因的表达。结果 HG 促进 I 型前胶原 mRNA 和 III 型前胶原 mRNA 的表达, rhRLX 可以抑制上述作用。HG 组松弛素基因的表达比较明显。结论 rhRLX 对 HG 促进的 I 型和 III 型胶原基因的表达具有抑制作用。

【关键词】 松弛素; 胶原; 心脏; 成纤维细胞

【中图分类号】 R365

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)01-0069-04

Effects of relaxin on collagen gene expression in cardiac fibroblasts under high glucose conditions

WANG Ping, LI Hongwei, WANG Yupeng, et al

Heart Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University,
Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To determine the influence of recombinant human relaxin (rhRLX) on collagen gene expression in cardiac fibroblasts (CFs) under high glucose (HG) conditions. Methods CFs were isolated from Sprague-Dawley rats and cultured primarily. The mRNA levels of type I, type III collagen and RLX in CFs after 3 passages under normal glucose (NG, 5.6 mmol/L) and high glucose (HG, 25 mmol/L) conditions were assessed by RT-PCR. rhRLX (100 μg/L) was cocultured with CFs under NG and HG conditions for 72 h respectively, then the mRNA levels of type I and type III collagen were detected. Results HG increased the expression of type I and type III collagen, which was inhibited by rhRLX. The RLX mRNA expression was stronger in HG group than in NG group. Conclusion rhRLX inhibits the HG-enhanced overexpression of type I and type III collagen.

【Key words】 relaxin; collagen; heart; fibroblasts

松弛素(relaxin, RLX)是1926年 Hisaw 从怀孕的猪黄体细胞中提取出的妊娠相关激素。生物体内多种组织细胞均可以合成和分泌 RLX, 黄体和前列腺是 RLX 生成的主要部位。非生殖系统, 如大脑、胃肠道及心房、心室^[1]也发现有 RLX、RLX 前体或 RLX 样活性物质的存在。近年大量实验资料显示: RLX 对多种组织器官(包括心脏)的纤维化都具有防治作用, 可能是机体内源性抗纤维化因子。RLX 能够抑制高血压大鼠的心肌纤维化; 形成

心肌纤维化的 β₂ 肾上腺素受体转基因小鼠^[1], 接受 RLX 治疗 2 周, 成纤维细胞的增殖显著受到抑制, 心脏胶原含量显著下降。RLX 能够抑制受前纤维化因子, 如血管紧张素 II (Ang II) 作用的心脏成纤维细胞的增殖和活化。RLX 拮抗心肌纤维化有一定的优点: 起效迅速; 剂量依赖; 对正常组织没有影响。

近年来大量研究发现, 独立于高血压、冠心病和其他心脏基础疾病外, 糖尿病导致心脏结构和

作者单位: 100050 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院心脏中心
通讯作者: 李虹伟, Tel: 010-63139780

功能的改变。即使不同时存在高血压、动脉粥样硬化,糖尿病患者心力衰竭的发生率较高^[2,3]。此外,糖尿病是多种心脏病的高危因素,而且如果心脏基础病合并糖尿病,其预后更差。糖尿病动物发生心肌梗死后生存率更低,左室重塑及心肌纤维化、心肌细胞的凋亡更严重^[4,5]。心肌纤维化是导致糖尿病心脏损害的主要病理过程之一,心肌纤维化表现为胶原大量沉积,增加了心室壁的僵硬,降低了心室顺应性,导致心室收缩及舒张功能不全。

高血糖是糖尿病的主要病理表现。高血糖本身及其上调前纤维化因子-Ang II^[6,7],转化生长因子 β_1 (transforming growth factor, TGF β_1)^[8]等的表达都可以导致心脏成纤维细胞数目和心肌间质胶原成分的增多,即导致心肌纤维化。笔者推论,重组人松弛素 (recombinant human relaxin, rhRLX) 能够抑制或延缓、逆转高血糖引起的心肌纤维化。为了证实这一推论,本研究进行相关的体外实验。此外,在心血管病理状态下,心脏也有 RLX 的表达和释放。已有研究显示,心力衰竭患者血浆和心脏局部 RLX 表达增加,并且和心力衰竭的程度呈正相关^[9]。自发性高血压大鼠心脏 RLX mRNA 和蛋白水平显著升高^[10]。在异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血损伤模型中,心脏和血浆中 RLX 水平明显升高^[11]。这些研究结果提示在病理条件下,RLX 的表达发生变化。因此,本研究额外观察高血糖是否可以导致 RLX 表达的变化。

1 材料和方法

1.1 实验材料 出生 1~3d 的 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不限,由维通利华实验动物技术公司提供;rhRLX 购自美国 R & D 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Trizol Reagen 购自美国 Invitrogen 公司;抗鼠波形蛋白单克隆一抗、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;胰蛋白酶购自美国 Amresco 公司;引物由北京奥科生物公司合成和纯化。

1.2 实验方法 (1)心脏成纤维细胞的分离和培养:在无菌条件下取大鼠心脏,用 0.25% 的胰酶消化心肌组织,差速贴壁 60 min,获得心脏成纤维细胞,用含 DMEM+10% 胎牛血清+谷氨酰胺+双抗的培养液培养心脏成纤维细胞。通过细胞形态学万方数据

和波形蛋白免疫组化染色鉴定心脏成纤维细胞,心脏成纤维细胞的纯度为 95%。传代细胞用 0.125% 胰酶消化。以二代至四代心脏成纤维细胞为研究对象。(2)实验分组:正常糖 (normal glucose, NG) 组:DMEM 内含 5.6 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM。NG + rhRLX 组:DMEM 内含 5.6 mmol/L D-葡萄糖 + 100 μ g/L 的 rhRLX。高糖 (high glucose, HG) 组:DMEM 内含 25 mmol/L D-葡萄糖。HG + rhRLX 组:DMEM 内含 25 mmol/L D-葡萄糖 + 100 μ g/L 的 rhRLX。OSM 组:DMEM 培养液内含 5.6 mmol/L D-葡萄糖 + 19.4 mmol/L 甘露糖。(3)RT-PCR:①RT-PCR 步骤:提取总 RNA。紫外分光法确定 RNA 的量和纯度。逆转录反应合成单链 cDNA。mRNA 逆转录成 cDNA 程序:37 $^{\circ}$ C 保温 60 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,以灭活反转录酶,4 $^{\circ}$ C 1~5 min,可迅速放入 -80 $^{\circ}$ C 长期冻存。RT-PCR 体系:cDNA 2 μ l;10 \times Buffer 2.5 μ l;dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ l;正向引物 (20 μ mol/L) 0.25 μ l;反向引物 (20 μ mol/L) 0.25 μ l;Taq 酶 (2 $\times 10^6$ U/L) 0.5 μ l;ddH₂O 19 μ l。所有 RT-PCR 的扩增体系相同。②引物序列: β -actin 引物序列 (349bp):正向引物:GAAATCGTGCGTGACATTA;反向引物:TAGGAGCCAGGGCAGTAA。Pro-collagen I 引物序列 (196bp):正向引物 5'-TTCACCTACAGCAGCCTTGT-3';反向引物:5'-TTGGGATGGAGGGAGTTTAC-3'。Pro-collagen III 引物序列 (201bp):正向引物 5'-TTGAATATCAAACACGCAAGGC-3';反向引物 5'-GGTCACTTTCCTGTTGACGA-3'。relaxin-1 引物序列 (213bp):正向引物 5'-CGTTGAGCGATTCGTTGT-3';反向引物 R5'-CTCCGTATCAGCAGAGTTTTCAG-3'。

取 PCR 扩增产物 10 μ l 置于 1.5% 琼脂糖中电泳 (电压 80 V, 电流 40 mA, 电泳时间 60 min)。将电泳完毕的琼脂糖凝胶置于紫外成像扫描仪上观察并照相。用图像分析软件进行分析,分别用 Pro-collagen I / β -actin、Pro-collagen III / β -actin、RLX-1 / β -actin 灰度值表示 mRNA 的表达量。

1.3 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件包进行统计分析。所有计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组资料比较采用方差分析 (one-way ANOVA), 组间差异用 SNK 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 mRNA 表达结果

如图 1 和图 2 所示,与 NG 组比较,HG 组 I 型前胶原 mRNA 和 III 型前胶原 mRNA 的表达均明显增加($P < 0.01$);OSM 组和 NG 组与 HG 组比较,I 型前胶原 mRNA 的表达和 III 型前胶原 mRNA 均没有明显差别($P > 0.05$);HG + rhRLX 组 I 型前胶原 mRNA 和 III 型前胶原 mRNA 的表达均明显减少($P < 0.01$)。

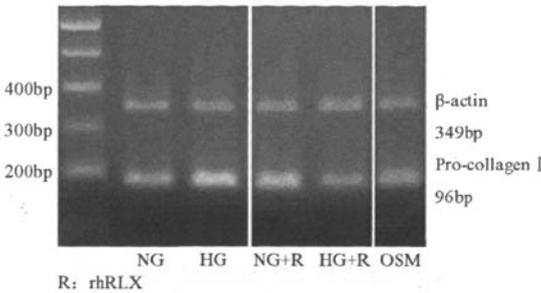


图 1 各组 I 型前胶原 mRNA 的电泳图(n=3)

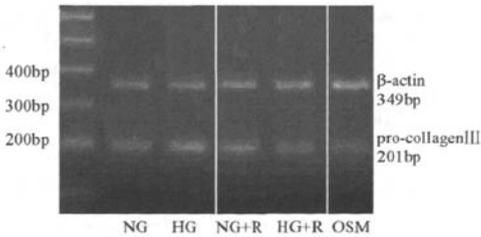


图 2 各组 III 型前胶原 mRNA 的电泳图(n=3)

如图 3 和表 1 所示,HG 组 RLX-1 mRNA 的表达明显强于 NG 组($P > 0.05$)。

3 讨论

心脏成纤维细胞是一种在细胞外基质内能自由移动的多潜能细胞,能合成胶原等细胞外基质成分,心脏成纤维细胞的增殖和(或)胶原蛋白合成分泌的“过度”增加是纤维化发生的细胞生物学基础。

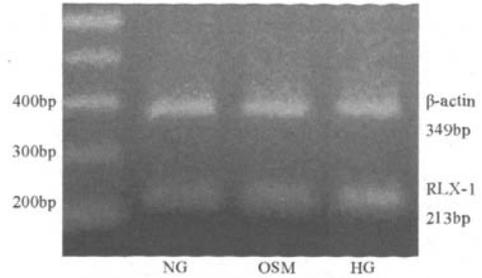


图 3 各组 RLX-1 mRNA 的电泳图(n=3)

在心肌细胞外间质中,I 型和 III 型胶原占主要部分。I 型胶原占胶原总量的 85%,具有较大张力,但伸展回缩性小,主要聚合成粗纤维网,其多少决定着心脏的僵硬程度;III 型胶原占 11%,具有较大伸展回弹性,主要形成细纤维网,与室壁弹性有关。它们的适当比值对维持心肌组织结构及心脏功能的完整性具有重要意义。心肌胶原合成分为细胞内前胶原合成和细胞外前胶原转化聚合成胶原纤维的两个阶段,前胶原需在蛋白水解酶的作用下裂解氨基和羧基末端才能发生构型改变,形成胶原纤维的相互交联和三螺旋结构。大多数研究都发现高糖增加 I 型胶原的合成^[12],对 III 型胶原的研究较少。本研究观察高糖对 I 型胶原和 III 型胶原合成的影响。HG 组 I 型前胶原 mRNA 的表达明显高于 NG 组,HG 组 III 型前胶原 mRNA 表达明显高于 NG 组。提示高糖增加成纤维细胞内 I 型和 III 型前胶原的表达,此外,高糖对 I 型胶原纤维形成的促进作用比对 III 型胶原纤维形成的促进作用强。本研究表明,OSM 组 I 型和 III 型前胶原的表达与 NG 组比较没有差异,这说明高糖促进的 I 型和 III 型前胶原的表达是由于高糖浓度导致的,而不是高渗透压引起的。

本研究中 NG + rhRLX 组 I 型前胶原 mRNA 和 III 型前胶原 mRNA 的表达都比 NG 组明显,提示在转录水平 100 μg/L rhRLX 可能是促进前胶原的表达;另外,有研究显示给予低剂量 rhRLX(使血清

表 1 各组 Pro-collagen I , Pro-collagen III , RLX-1 mRNA 的比较(n=3)

组别	Pro-collagen I /β-actin	Pro-collagen III /β-actin	RLX-1/β-actin
NG	2.85 ± 0.22	0.61 ± 0.06	0.38 ± 0.04
NG + rhRLX	4.95 ± 0.08 [△]	1.37 ± 0.19 [△]	
HG	4.90 ± 0.12 [*]	1.39 ± 0.06 [*]	1.08 ± 0.81 [*]
HG + rhRLX	2.51 ± 0.09 [△]	0.94 ± 0.07 [△]	
OSM	3.05 ± 0.17	0.57 ± 0.04	0.41 ± 0.15

注:与 NG 组比较,* $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$;rhRLX 干预组和未干预组间比较,[△] $P < 0.01$

浓度维持 20 $\mu\text{g/L}$ 的雌性和雄性大鼠心输出量增加和外周血管阻力降低,但高剂量 rhRLX(血清浓度达 80 $\mu\text{g/L}$)不改变动物心输出量和外周血管阻力,表明血管对 rhRLX 呈剂量依赖的双向反应^[12,13]。雌性大鼠妊娠期间 RLX 的血浓度是 50~100 $\mu\text{g/L}$,本研究中 rhRLX 的作用浓度是 100 $\mu\text{g/L}$,其他浓度的 rhRLX 可能抑制 I 型前胶原 mRNA 和 III 型前胶原 mRNA 的表达。此外,rhRLX 能够完全抑制高糖引起的 III 型前胶原 mRNA 的表达上调,但不能完全抑制高糖引起的 I 型前胶原 mRNA 的表达上调。这提示高糖对不同类型胶原合成的促进作用是通过不同机制实现的,rhRLX 对高糖环境促进 III 型胶原表达的机制能够完全拮抗。在 Samuel 等^[1]的研究中,未发现乳鼠心脏成纤维细胞 RLX-1 mRNA 的表达。本研究发现,NG 环境下培养的乳鼠心脏成纤维细胞 RLX-1 mRNA 的表达很微弱。HG 促进心脏成纤维细胞 RLX-1 mRNA 的表达,提示在一定的病理条件下(糖尿病)心脏成纤维细胞能够产生 RLX。

结论:人 rhRLX 能够抑制高糖环境下心脏成纤维细胞胶原的合成。高糖能够促进内源性 RLX 的表达。

参考文献

- [1] Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, *et al.* Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis *in vivo*[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(9):4125-4133.
- [2] Hamby RI, Zonerach S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. *JAMA*, 1974, 229(13):1749-1754.
- [3] Wold LE, Relling DP, Colligan PB, *et al.* Characterization of contractile function in diabetic hypertensive cardiomyopathy in adult rat ventricular myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(9):1719-1726.
- [4] Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, *et al.* Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(1):165-172.
- [5] Backlund T, Palojoki E, Saraste A, *et al.* Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodeling after myocardial infarction in experimental diabetes[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(2):325-330.
- [6] Fiordaliso F, Li B, Latini R, *et al.* Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II-dependent[J]. *Lab Invest*, 2000, 80(4):513-527.
- [7] Asbun J, Manso AM, Villarreal FJ. Profibrotic influence of high glucose concentration on cardiac fibroblast functions: effects of losartan and vitamin E[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(1):H227-H234.
- [8] Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, *et al.* Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase C beta 2 activation and diabetes[J]. *Diabetes*, 2002, 51(9):2709-2718.
- [9] Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, *et al.* The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure[J]. *FASEB J*, 2001, 15(12):2187-2195.
- [10] Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao C, *et al.* Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2005, 46(2):412-418.
- [11] Zhang J, Qi YF, Geng B, *et al.* Effect of relaxin on myocardial ischemia injury induced by isoproterenol[J]. *Peptides*, 2005, 26(9):1632-1639.
- [12] Debrah DO, Conrad KP, Danielson LA, *et al.* Effects of relaxin on systemic arterial hemodynamics and mechanical properties in conscious rats: sex dependency and dose response[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 98(3):1013-1020.
- [13] Debrah DO, Conrad KP, Novak J, *et al.* Recombinant human relaxin (rhRLX) modifies systemic arterial properties in conscious rats irrespective of gender, but in a biphasic fashion[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1041:155-162.

(收稿日期:2008-09-12;修回日期:2009-01-08)