

[文章编号] 1000-4718(2009)04-0802-04

# TGF-β<sub>1</sub> 对体外培养的大鼠心肌细胞肥大和凋亡的影响

石永英<sup>1</sup>, 董 颖<sup>2</sup>, 石永华<sup>4</sup>, 刘启才<sup>3</sup>, 林晓圳<sup>1</sup>, 刘世明<sup>1</sup>, 陈敏生<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 广州医学院第二附属医院心内科, 广东 广州 510260; <sup>2</sup> 生理教研室,

<sup>3</sup> 分子生物中心, 广东 广州 510182; <sup>4</sup> 山西省阳泉市第一人民医院神经内科, 山西 阳泉 045000)

**[摘要]** 目的: 探讨转化生长因子 β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) 对大鼠心肌细胞肥大和凋亡的影响。方法: 建立 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的体外大鼠心肌细胞肥大模型。透射电镜观察心肌细胞形态。碘化丙啶 (PI) 染色标记法检测心肌细胞 RNA 含量。实时荧光定量 PCR (Real time PCR) 检测心肌细胞胚心基因肌球蛋白重链 β 亚型 (β-MHC) 的表达。TdT-FragEL 染色检测心肌细胞凋亡。Annexin/7AAD 双染法、直接免疫荧光标记法经流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率及心肌细胞中 caspase-3 水平。结果: TGF-β<sub>1</sub> 刺激 24 h 后, 心肌细胞 β-MHC mRNA 水平明显高于对照组 (P < 0.01); PI 染色结果 TGF-β<sub>1</sub> 组 RNA 含量明显增高, 并呈剂量依赖性 (P < 0.01)。TdT-FragEL 染色观察, TGF-β<sub>1</sub> 可增加心肌细胞凋亡率 (P < 0.01)。与对照组相比, TGF-β<sub>1</sub> 可明显上调心肌细胞中 caspase-3 (P < 0.01); TGF-β<sub>1</sub> 诱导的心肌细胞凋亡率增加 (P < 0.01)。透射电镜观察 TGF-β<sub>1</sub> 可诱导心肌细胞肥大和凋亡。结论: TGF-β<sub>1</sub> 可同时诱导心肌细胞肥大和凋亡, 诱导凋亡可能与 caspase-3 有关。

**[关键词]** 转化生长因子 β; 心肌细胞; 肥大; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

**[KEY WORDS]** Transforming growth factor beta; Cardiomyocytes; Hypertrophy; Apoptosis; Caspase-3

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

转化生长因子 β<sub>1</sub> (transforming growth factor β<sub>1</sub>, TGF-β<sub>1</sub>) 是一种调控细胞生长的重要细胞因子, 参与免疫调节、创伤修复、胚胎发生、细胞增殖与凋亡、造血调控等过程。实验研究发现血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 可促进心肌成纤维细胞分泌 TGF-β<sub>1</sub>, 并通过 TGF-β<sub>1</sub> 参与心肌细胞肥大过程。TGF-β<sub>1</sub> 可刺激心肌细胞合成收缩蛋白, 使其转变为心肌样细胞而增厚; 同时通过调控细胞外基质合成和降解参与心肌肥厚、心肌纤维化的形成。心肌细胞凋亡可为肥大的促发因素, 心肌细胞肥大又可导致细胞凋亡, 心肌细胞肥大和凋亡相互促进。本实验将探讨体外实验时 TGF-β<sub>1</sub> 对心肌细胞肥大和凋亡的双重影响和可能机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

1.1 动物 1-3 d 龄 SD 大鼠。

1.2 试剂 TGF-β<sub>1</sub>、凋亡检测试剂盒 Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit 为 Calbiochem 产品。Trizol 总 RNA 提取试剂及 RT-PCR 两步法试剂盒 SuperScript™ III 购自 Invitrogen。RNA 引物由 TaKaRa 公司合成。SYBR® Green I 荧光定量 PCR 试剂盒为 Stratagene 产品。

1.3 实验分组 实验分为 4 组, 包括空白对照组、TGF-β<sub>1</sub> 不同剂量组 (0.1 μg/L、1 μg/L、3 μg/L)。TGF-β<sub>1</sub> 作用 24 h。

### 2 方法

2.1 原代心肌细胞的培养 按照 Simpson 改良法<sup>[1-3]</sup> 分离培养新生大鼠心肌细胞, 0.25% 胰酶溶液消化分离心肌细

胞, 经差速贴壁分离法使心肌成纤维细胞分离。将细胞混悬于含 5-溴脱氧尿嘧啶及 20% 胎牛血清 DMEM 培养液中, 按 1 × 10<sup>9</sup> cells/L 密度接种于不同细胞培养板中, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。48 h 后更换为 10% 胎牛血清的培养液。48 h 后换无血清培养液。无血清培养 24 h 后加入药物刺激心肌细胞 24 h。

2.2 心肌细胞形态学观察及鉴定<sup>[4]</sup> 倒置相差显微镜下动态观察。

2.3 PI 标记心肌细胞双链 RNA 心肌细胞中 RNA 含量增加可间接表示心肌细胞呈肥大表现<sup>[1]</sup>。PI 是一种荧光染料, 可以对双链 DNA 和 RNA 进行荧光标记<sup>[2]</sup>。细胞经药物刺激 24 h 后用无水乙醇 -20 °C 固定过夜; 用 DNaseI 消化 DNA, 在 37 °C 温育 40 min。用 D-H 液稀释的 PI 染料 (0.05 g/L), 在 4 °C 放置 30 min。荧光倒置显微镜下观察记录结果; Image-Pro Plus 图像分析软件分析图像结果。

2.4 实时 RT-PCR Trizol 法经裂解、纯化、沉淀、洗涤及溶解等步骤提取总 RNA。按 SuperScript™ III 说明书进行两步法逆转录及 PCR 说明进行普通 PCR。用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法检测 mRNA 的表达。根据基因库中序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计特异引物如下: β-MHC 上游引物 5'-TGC AGT TAA AGG TGA AGG C-3', 下游引物 5'-CAG GGC TTC ACA GGC AT-3', 合成产物 203 bp; GAPDH 上游引物 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TGG TAT-3', 下游引物 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3', 合成产物 130 bp; PCR marker 作为标准分子量内参照进行产物鉴

[收稿日期] 2008-04-08 [修回日期] 2008-07-29

△通讯作者 Tel: 020-81340206; Fax: 020-81340206; E-mail: dongqistar@hotmail.com

定。反应在 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪 (Stratagene) 上进行, 变性、退火、延伸条件如下: ①94 °C 5 min; ②94 °C 50 s, 56 °C 50 s, 72 °C 50 s, 40 个循环; ③72 °C 7 min。Excel 工作表中用  $\Delta\Delta Ct$  法分析循环阈值, 相对定量 mRNA<sup>[5]</sup>。所有 PCR 反应均重复 1 次。

**2.5 荧光 TdT-FragEL 片段检测试剂盒凋亡染色** 室温下用 4% 多聚甲醛/PBS 固定细胞 10-30 min; 蛋白酶 K (1/100 Tris 稀释) 行组织通透。阳性对照: 1 g/L DNaseI 用 1 × TBS 稀释, 在室温下孵育 20 min; 阴性对照: TdT 酶 (ddH<sub>2</sub>O 稀释)。用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 5 × TdT 缓冲液, 室温孵育 30 min 后吸干 TdT; 加 60 μL TdT 混合液 (冰上配制: 每 57 μL FragEL reation Mix 加入 3 μL TdT 酶), 37 °C 保湿避光孵育 1-1.5 h。荧光倒置显微镜下细胞凋亡表达为绿色荧光, 每组取 5 个 ×100 高倍视野, 计数 500 个细胞中凋亡细胞个数, 取平均百分值为凋亡率。

**2.6 FCM 检测细胞凋亡和 caspase-3 细胞经给药刺激 24 h 后用 0.25% 胰酶消化约 2.5 min, 收集细胞液于 15 mL 离心管中 1 000 r/min 离心 5-10 min。加入预冷的 75% 乙醇 2 mL 轻柔吹打固定为单细胞悬液。Annexin/7AAD 双染法或直接免疫荧光标记法经流式细胞仪 (BD 公司) 分别上机进行细胞凋亡、caspase-3 的检测。**

**2.7 电镜观察心肌细胞形态** 同前方法收集细胞后, 离心成细胞团块, 2.5% 戊二醛-多聚甲醛固定, 1% 四氧化锇固定, 乙醇逐级脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 超薄切片机半薄切片 (1 μm) 定位后, 进行超薄切片 (厚度 50-70 nm), 醋酸铀、柠檬酸染色, 上机观察 (JEOL 公司)。

**2.8 统计学处理** 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SPSS11.0 统计软件包进行统计分析, 采用方差分析及 *t* 检验。

**结 果**

**1 倒置显微镜观察心肌细胞**

刚分离的心肌细胞呈球形, 培养 24 h 后细胞贴壁生长, 伸出伪足呈三角形、多边形等, 多数细胞出现自发性搏动。48 h 后细胞伸出伪足相互交织成网, 逐渐形成细胞簇或细胞单层, 放射状排列的同心圆状, 搏动呈同步性。培养的心肌细胞在 3-7 d 内细胞形态和细胞搏动良好。

**2 PI 标记心肌细胞双链 RNA**

PI 标记的心肌细胞倒置荧光显微镜下呈红色荧光, 荧光亮度及面积与 RNA 表达量呈正相关。对照组 PI 荧光强度为 (63.55 ± 2.59), TGF-β<sub>1</sub> (0.1 μg/L) 组、TGF-β<sub>1</sub> (1 μg/L) 组、TGF-β<sub>1</sub> (3 μg/L) 组为分别为 (72.68 ± 3.12)、(75.36 ± 3.29) 及 (80.57 ± 3.56), 均较对照组明显增高, 且呈剂量依赖性 (*P* < 0.01), 见图 1。

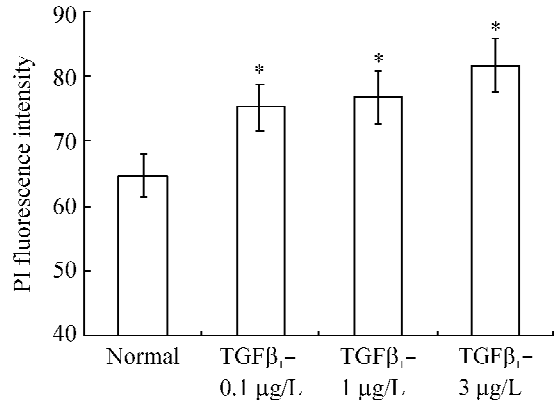


Fig 1 Expression of cardiomyocytes RNA marked with PI.  $\bar{x} \pm s$ . *n* = 6. \* *P* < 0.01 vs normal group.

图 1 PI 标记心肌细胞双链 RNA 表达

**3 实时 RT-PCR 检测胚心基因 β-MHC mRNA**

相对于对照组, TGF-β<sub>1</sub> 组 β-MHC mRNA 均明显增高 (*P* < 0.01), 其中 TGF-β<sub>1</sub> (3 μg/L) 组 β-MHC 最高 (10.77 ± 0.46), 见表 1、图 2。

表 1 实时 RT-PCR 检测 TGF-β<sub>1</sub> 对心肌细胞肥大基因 β-MHC 的表达

Tab 1 Effect of TGF-β<sub>1</sub> on expression of β-MHC mRNA in cardiomyocytes by RT-PCR ( $\bar{x} \pm s$ . *n* = 6)

Group	Average ct	$\Delta ct$	$\Delta\Delta ct$	$2^{-\Delta\Delta ct}$
Normal	15.85 ± 0.56	-4.28 ± 0.25	0	1
TGF-β <sub>1</sub> 0.1 μg/L	15.88 ± 0.46	-4.47 ± 0.51	-0.19 ± 0.05	1.14 ± 0.08 <sup>Δ</sup>
TGF-β <sub>1</sub> 1 μg/L	13.48 ± 0.84	-7.71 ± 0.34	-3.43 ± 0.06	10.77 ± 0.46 <sup>Δ</sup>
TGF-β <sub>1</sub> 3 μg/L	14.46 ± 0.23	-5.35 ± 0.53	-1.07 ± 0.04	2.10 ± 0.11 <sup>Δ</sup>

<sup>Δ</sup>*P* < 0.01 vs normal control group.

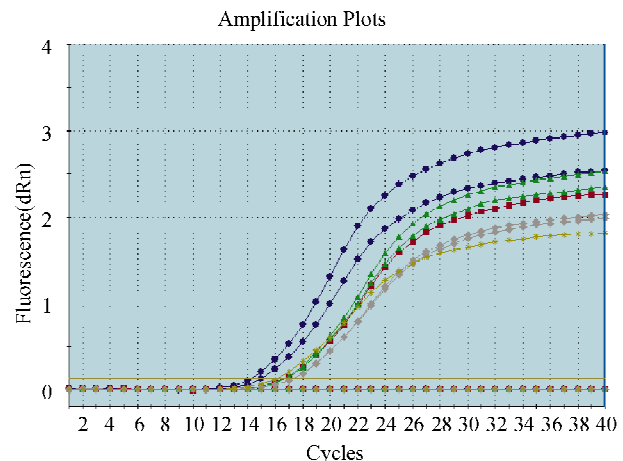
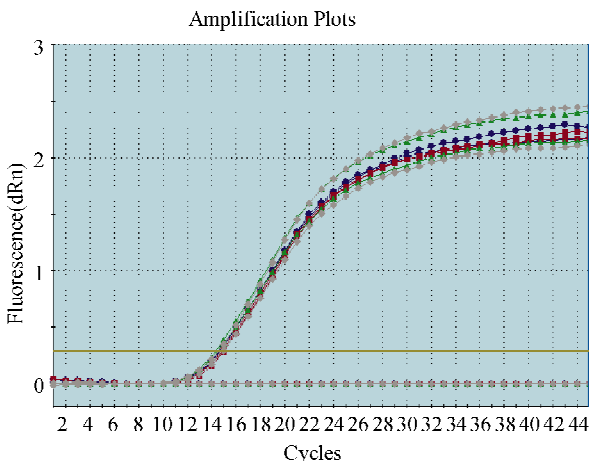


Fig 2 Effect of TGF-β<sub>1</sub> on β-MHC detected by real time RT-PCR. left: express of GAPDH. right: express of β-MHC in different groups.

图 2 实时 RT-PCR 检测 TGF-β<sub>1</sub> 对心肌细胞肥大基因 β-MHC 的影响

4 荧光 TdT-FragEL 片段法检测心肌细胞凋亡  
体外培养的原代心肌细胞中,对照组凋亡率为 2.3%;

TGF-β<sub>1</sub> 作用后心肌细胞凋亡率明显增高达到 9.4%,与对照组比较有显著差异(P<0.01),见图 3。

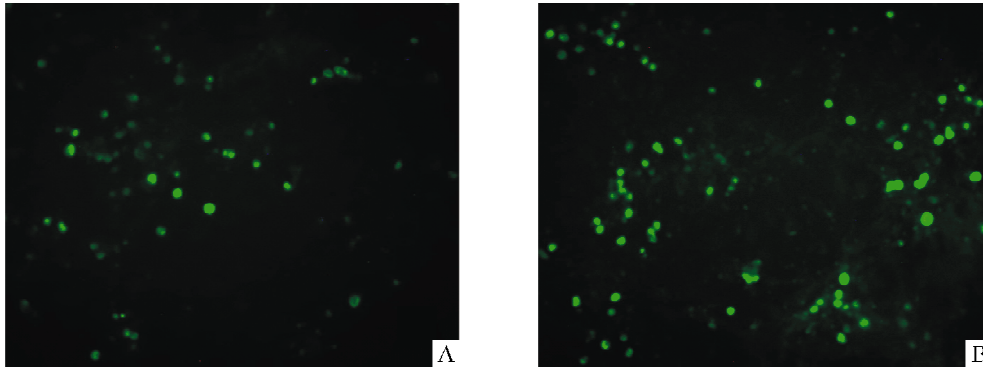


Fig 3 Effect of TGF-β<sub>1</sub> on apoptosis of rat ventricular cardiomyocytes detected by FragEL(×200). A: Normal control; B: TGF-β<sub>1</sub>(3 μg/L). TGF-β<sub>1</sub> can induce cardiomyocytes apoptosis.

图 3 TGF-β<sub>1</sub> 对大鼠心肌细胞凋亡的影响

5 FCM 检测细胞凋亡

与对照组相比,TGF-β<sub>1</sub> 各组心肌细胞凋亡率均增高,并呈剂量依赖性(P<0.01),TGF-β<sub>1</sub> 各组凋亡相关因子 caspase-3 均明显增高(P<0.01),见表 2。

表 2 FCM 检测心肌细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达

Tab 2 Apoptotic rate and caspase-3 detected by FCM( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Group	Rate of apoptosis (%)	Caspase-3
Normal	4.45 ± 1.12*	2.70 ± 0.35
TGF-β <sub>1</sub> 0.1 μg/L	10.90 ± 2.15*	15.30 ± 1.86
TGF-β <sub>1</sub> 1 μg/L	12.88 ± 1.96*	18.70 ± 1.88
TGF-β <sub>1</sub> 3 μg/L	15.40 ± 2.54*	23.00 ± 2.72

\*P<0.05 vs normal control group.

6 电镜观察

电镜下观察心肌超微结构,对照组心肌细胞形态均匀,心肌细胞内肌丝排列整齐,心肌细胞核内染色质正常,线粒体形态正常(图 4A,×8 000)。TGF-β<sub>1</sub> 组心肌细胞核浓缩,染色质核边集,线粒体空泡变,细胞凋亡(图 4B,×5 000);同时观察到 TGF-β<sub>1</sub> 组心肌细胞肌丝增多,排列紊乱,线粒体肿大明显,呈细胞肥大表现(图 4C,×10 000)。

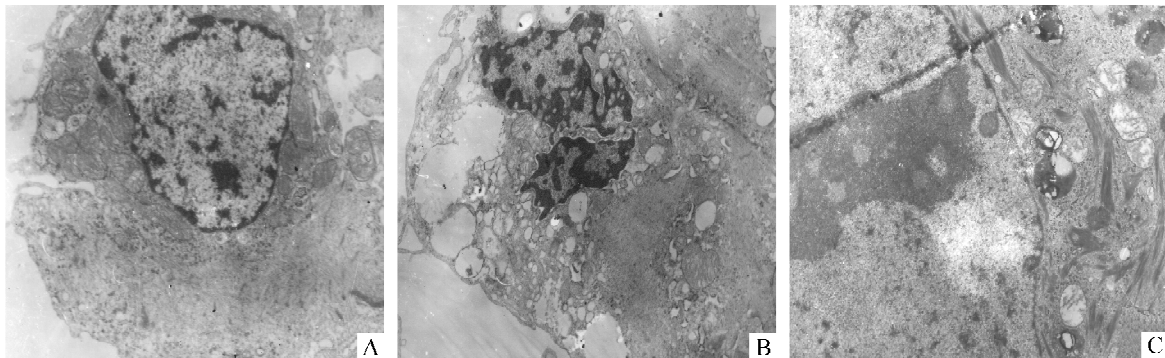


Fig 4 Hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes detected by electron microscope. A: Normal control group cardiomyocytes were uniformly in appearance and regularity in row of actin filament. Caryotin inside caryon and cytomicrosome are eumorphism(×8 000). B: TGF-β<sub>1</sub> group cardiomyocytes expressed apoptosis by concentrate of caryon and vacuolated of cytomicrosome. C: Cardiomyocytes showed hypertrophy with increase of actin filament and tumefaction of cytomicrosome in TGF-β<sub>1</sub> group.

图 4 电镜观察心肌细胞形态学改变

讨 论

TGF-β<sub>1</sub> 在心血管疾病的发生发展中起重要作用。有研究显示,一些与高血压心肌肥厚有关的体液因素如 AngII、NPY 等均可以刺激心肌细胞分泌 TGF-β<sub>1</sub>,并通过 TGF-β<sub>1</sub> 诱导心肌肥大,血清 TGF-β<sub>1</sub> 水平与高血压水平呈正相关<sup>[6]</sup>。但是,TGF-β<sub>1</sub> 引起高血压心肌细胞肥大的作用机制

并不明确<sup>[7-8]</sup>。心肌细胞肥大的主要表现为心肌收缩蛋白如 MLC-2 等的上调,早期应答基因如 c-fos、c-myc 等及心脏胚胎基因如 ANF、α-sk actin、β-MHC 等的表达。心肌细胞肥大时,胚心基因 β-MHC 表达增加,细胞表型从“收缩表型”向“合成表型”转变,心肌细胞收缩性降低,重新获得合成能力,因此 β-MHC 增加被认为是心肌细胞肥大的特征之一。目前关于 TGF-β<sub>1</sub> 在心肌细胞肥大中具体的作用机制

国内外少见报道, TGF- $\beta_1$  在体外是否引起 MHC 转换仍不清楚。

高血压时心肌肥大与凋亡的关系已有共识, 心肌细胞在各种刺激因素的影响下可发生异常细胞凋亡, 凋亡心肌被胶原纤维取代, 产生心肌纤维化、心肌肥厚。Teiger 等用大鼠胸主动脉缩窄引起的心脏肥大模型首次证实了心肌细胞的凋亡与心肌肥大密切相关<sup>[9]</sup>。卢江华等<sup>[10]</sup>的实验发现细胞凋亡参与了心肌肥大早期的形成过程。在自发性高血压大鼠 (SHR) 左心室肥厚的研究中同样发现肥厚心肌组织可表达凋亡调节蛋白 Bax 等, 显示 SHR 左心室心肌肥厚的同时存在细胞凋亡<sup>[11]</sup>。多种细胞因子均参与了心肌细胞肥大和凋亡的调控过程, 但 TGF- $\beta_1$  致肥大效应是否与凋亡增加有关, 目前还不清楚。

Caspase-3 则是细胞凋亡通路中的关键蛋白酶, 它的作用底物分别参与了 DNA 修复、mRNA 裂解、类固醇生物合成和细胞骨架重建等过程。Caspase-3 受到体内外因素刺激时可被激活, 导致多种细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本实验通过建立原代培养的心肌细胞肥大模型, 观察 TGF- $\beta_1$  对心肌细胞的肥大和凋亡的作用。结果显示 TGF- $\beta_1$  可使胚心基因  $\beta$ -MHC mRNA 水平明显增高, 心肌细胞 RNA 含量增加。同时 TGF- $\beta_1$  可诱导心肌细胞凋亡率明显增加, 并显著上调 caspase-3, 推测 TGF- $\beta_1$  可能通过 caspase-3 诱导心肌细胞凋亡。电镜观察也显示心肌细胞在 TGF- $\beta_1$  诱导下同时存在肥大和凋亡表现。

本实验结果显示 TGF- $\beta_1$  可同时促进原代培养的心肌细胞发生肥大和凋亡, 为进一步探讨 TGF- $\beta_1$  对心肌细胞肥大与凋亡的关系建立实验基础。在心肌细胞中, TGF- $\beta_1$  的信号通路如 Smads 的激活是否与同时出现的细胞肥大和凋亡密切相关, 以及 Smads 通路对下游蛋白的作用等问题均有待进一步研究。随着细胞凋亡研究的深入, 我们可能从新的角度认识高血压病, 心肌细胞凋亡干预有望成为新的治疗途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Lokuta A, Kirby MS, Gaa ST. On establishing primary cultures of neonatal rat ventricular myocytes for analysis over long periods [J]. *Cardiovasc Electrophysiol*, 1994, 5 (1):50-62.
- [2] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol [J]. *Circ Res*, 1982, 50 (1):101-116.
- [3] 陈爱兰, 陈敏生, 何兆初, 等. 伊贝沙坦对血管紧张素 II 所致心肌细胞蛋白质合成和肌球蛋白重链表达的影响 [J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2006, 12(6):475-477.
- [4] 邸美仙, 李应东. 乳鼠心肌细胞的培养 [J]. *中医学杂志*, 2007, 25(3):474-475.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [6] Phyllis A, Manikkam S. Transforming growth factor  $\beta$  signaling, vascular remodeling, and hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(25):2721-2723.
- [7] Schroder D, Heger J, Piper HM, et al. AngII stimulates apoptosis via TGF-beta1 signaling in ventricular cardiomyocytes of rat [J]. *J Mol Med*, 2006, 84(11):975-983.
- [8] Yun SH, Shin JO, Lim BK, et al. Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Coxsackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse [J]. *Virus Res*, 2007, 126(1-2):62-68.
- [9] Weibin Shi, Chuanxi Sun, Bin He, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF  $\beta$  type I receptor [J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(2):291-300.
- [10] 卢江华, 肖 静, 罗红琳, 等. 后负荷增大引起的心肌肥厚过程中细胞凋亡的变化规律 [J]. *生物医学工程杂志*, 2001, 18(2):169-172.
- [11] 刘继东, 鹿克凤, 张 欣, 等. 自发性高血压大鼠心肌 fas 基因表达与左室肥厚关系探讨 [J]. *高血压杂志*, 2003, 11(3):272-274.
- [12] 王秀丽, 董红岩, 杨金霞, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-2 对去血清培养诱导的 293T 细胞凋亡的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(3):548-551.