

• 基础研究 •

N-乙酰半胱氨酸对血管紧张素 II 致成纤维细胞增殖及纤维连接蛋白表达的作用研究

田家齐 黎明江 吴限 黄亚敏

【摘要】 目的:探讨不同浓度 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对血管紧张素 II 致成纤维细胞(CFs)增殖及纤维连接蛋白(FN)表达的影响。 方法:分离培养 1~3 日龄 SD 大鼠乳鼠的 CFs,分组加入不同浓度的血管紧张素 II (Ang II)及 NAC 进行干预。1 组加入普通培养基(含 10% FBS 的 DMEM 培养液);2 组在普通培养基中加入终浓度为 $2.5 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ 的 Ang II;3 组在普通培养基中加入终浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ 的 Ang II;4 组在普通培养基中加入终浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ 的 Ang II 和 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 的 NAC;5 组在普通培养基中加入终浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ 的 Ang II 和 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 的 NAC。采用免疫荧光法检测各组 FN 的蛋白表达水平;CCK8 法检测各组 CFs 的增殖活性,RT-PCR 检测各组 FN 的 mRNA 表达水平。 结果:与 1 组相比,2 组 CFs 增殖活性、FN mRNA 及蛋白表达水平均明显升高(P 均 < 0.01)。与 1 组及 2 组相比,3 组 CFs 增殖活性、FN mRNA 及蛋白表达水平均明显升高(P 均 < 0.01)。在培养基中加入 NAC 进行干预,4 组和 5 组与 3 组相比,CFs 增殖活性、FN mRNA 及蛋白表达水平均明显降低(P 均 < 0.01);5 组较 4 组 CFs 增殖活性、FN mRNA 及蛋白表达水平均明显降低(P 均 < 0.01)。 结论:NAC 在抑制 CFs 增殖及减轻 FN 在心肌间质沉积的过程中发挥重要作用。

【关键词】 成纤维细胞;纤维化;N-乙酰半胱氨酸;血管紧张素 II

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.01.011

Effects of N-acetylcysteine on angiotensin II -induced proliferation and fibronectin expression of fibroblasts

TIAN Jiaqi¹, LI Mingjiang², WU Xian², HUANG Yamin². 1. Department of Cardiology, Zhongxiang People's Hospital of Hubei Province, Zhongxiang Hospital of Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 431900; 2. Department of Cardiology, Remin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of different concentrations of N-acetylcysteine (NAC) on angiotensin II (Ang II)-induced proliferation and fibronectin (FN) expression of fibroblasts (CFs). **Methods:** The CFs were isolated and cultured from 1 day to 3 days old Sprague Dawley (SD) rats. Different concentrations of Ang II and NAC were added to the CFs of different groups. Group 1 was cultured in ordinary medium (DMEM with 10% FBS). Group 2 was cultured in ordinary medium with a final concentration of $2.5 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ Ang II. Group 3 was cultured in ordinary medium with a final concentration of $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ Ang II. Group 4 was cultured in ordinary medium with a final concentration of $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ Ang II and $5.0 \mu\text{mol/L}$ NAC. In group 5, a final concentration of $5.0 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ Ang II and $10.0 \mu\text{mol/L}$ NAC were added into ordinary medium. The expression of

基金项目:国家自然科学基金(81170085)

作者单位:431900 湖北省钟祥市人民医院内科(田家齐);430060 武汉大学人民医院内科(黎明江,吴限,黄亚敏)

通信作者:黎明江,Email:mingjiangli@yahoo.com.cn

FN protein in each group was detected by immunofluorescence. The proliferative activity of CFs in each group was detected by CCK8 assay. The expression of FN mRNA in each group was detected by RT-PCR. **Results:** Compared with group 1, the CFs proliferation and the expression of the FN mRNA and protein in group 2 were significantly increased (all $P < 0.01$). Compared with group 1 and group 2, the CFs proliferative activity and the FN mRNA and protein expression in group 3 were significantly increased (all $P < 0.01$). Compared with the group 3, the proliferative activity of CFs and the expression of FN mRNA and protein in group 4 and group 5 were significantly decreased (all $P < 0.01$). The CFs proliferative activity and the FN mRNA and protein expression in group 5 were significantly lower than those in group 4 (all $P < 0.01$). **Conclusions:** NAC plays an important role in inhibiting the proliferation of CFs and alleviating FN deposition in cardiac interstitium.

【Key words】 Cardiac fibroblasts; Fibrosis; N-acetylcysteine; Angiotensin II

心肌纤维化的主要特征是成纤维细胞(cardiac fibroblast, CFs)的过量增殖,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)生成与降解的平衡紊乱。生理情况下,CFs通过促进胶原蛋白合成与分泌来替换老化的胶原结构,以维持心肌组织的稳定^[1]。当各种病因造成心肌正常结构破坏时,CFs过度活化、增殖,并最终导致心肌纤维化。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是ECM的重要成分。研究表明, FN 过量生成与组织炎症反应、组织纤维化及硬化过程、机体损伤修复等存在密切联系,但目前有关 FN 与心肌纤维化关系、N-乙酰半胱氨酸(NAC)对CFs增殖影响的研究仍然较少。本研究通过血管紧张素 II (Ang II)刺激CFs建立体外纤维化模型,探讨 NAC 在 Ang II 诱导CFs增殖及FN合成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1~3 日龄 SD 大鼠乳鼠购于湖北省疾病预防控制中心实验动物部。总 RNA 提取试剂盒、三氯甲烷、异丙醇购于国药集团有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒购于 TaKaRa 公司;牛血清白蛋白购于吉诺生物医药技术有限公司;纤维连接蛋白抗体、CY3 标记山羊抗兔抗体购于武汉阿斯本生物技术有限公司;NAC、Ang II、II 型胶原酶和胰蛋白酶购自 Sigma 公司;CCK8 试剂盒购自 biosharp 公司。PCR 扩增仪、荧光定量 PCR 仪购于 Life Technologies 公司;普通光学显微镜、倒置显微镜购于 Olympus 公司;成像系统购于 Qimaging 公司。

1.2 CFs 的分离、提取与培养

将乳鼠置于无菌泡沫板上固定,于乳鼠剑突正

中稍偏左处剪开胸骨,暴露并取出心脏。去除心腔内残留血液、心房和血管组织后将心室肌剪碎,0.125%胰蛋白酶及 0.08% II 型胶原酶消化心肌组织,1 000 r/min 离心 10 min,加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液,置于 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养 90 min,弃上清,采用差速贴壁法获取 CFs。随后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养,当 CFs 生长融合达 90% 时,加入含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合液消化已贴壁的 CFs。细胞离心后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液,接种至培养皿进行传代。实验采用第 3~5 代 CFs。

1.3 CFs 的分组

选用生长较好的第 3~5 代 CFs,用无血清 DMEM/F12 培养液进行细胞同步化后继续培养 12 h。弃上清后,对细胞进行分组处理:1 组加入普通培养基(含 10% FBS 的 DMEM 培养液);2 组在普通培养基中加入终浓度为 2.5×10^{-7} μmol/L 的 AngII;3 组在普通培养基中加入终浓度为 5.0×10^{-7} μmol/L 的 AngII;4 组在普通培养基中加入终浓度为 5.0×10^{-7} μmol/L 的 AngII 和 5.0 μmol/L 的 NAC;5 组在普通培养基中加入终浓度为 5.0×10^{-7} μmol/L 的 AngII 和 10.0 μmol/L 的 NAC。

1.4 CCK8 法检测 CFs 的增殖活性

CFs 按每孔 200 μL 接种 96 孔板,分组给予不同处理,每组设 5 个复孔。分组培养 24 h 后,每孔加入 CCK8 溶液 10~20 μL,充分震荡后,继续孵育 4 h,酶标仪于 560 nm 波长处测量各孔光密度值(OD 值),细胞增殖活性(%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{对照组}}) / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.5 免疫荧光法检测 CFs 中 FN 的蛋白表达水平

各组 CFs 按不同处理条件培养 24 h,将 CFs 细

胞爬片用 4% 多聚甲醛固定 30 min,破膜后滴加 3% 过氧化氢溶液,避光孵育 20 min。洗涤后加入抗 FN 抗体(1 : 100),4℃ 孵育过夜,加入 CY3 标记山羊抗兔二抗,室温孵育 50 min。4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色后,荧光显微镜下观察。每张玻片随机选取 5~7 个视野,应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算 FN 蛋白在 CFs 中的含量。红色荧光为 FN,蓝色荧光为 DAPI 着色的细胞核。

1.6 RT-PCR 检测 CFs 中 FN 的 mRNA 表达水平

各组 CFs 按不同处理条件培养 24 h 后,根据试剂盒说明书进行细胞 RNA 的抽提和 cDNA 的合成及转录。引物序列如下:FN 基因正向引物 5'-GCCCTTACAGTTCCAAGTTCC-3',反向引物 5'-AAACCGTGTAAGGGTCAAAGC-3';GAPDH 基因正向引物 5'-CGCTAACATCAAATGGGGTG -3',反向引物 5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 1 min,95℃ 变性 15 s、58℃ 退火 20 s、72℃ 延伸 45 s,共 40 个循环。采用 StepOne 软件,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 FN mRNA 的相对表达水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,实验数据采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAC 对 Ang II 致 CFs 增殖的影响

与 1 组相比,2 组 CFs 增殖活性明显升高($P<0.01$);与 1 组及 2 组相比,3 组 CFs 增殖活性明显升高(P 均 <0.01)。在培养基中加入 NAC 进行干预,与 3 组相比,4 组和 5 组 CFs 增殖活性均明显降低(P 均 <0.01);5 组较 4 组 CFs 增殖活性明显降

低($P<0.01$)。见表 1。

2.2 NAC 对 Ang II 致 CFs FN 蛋白表达的影响

由图 1 可见,1 组 FN 分布均匀,且量较少;2 组和 3 组 FN 逐渐增多,且分布散乱。从 1 组到 3 组,随培养基中 Ang II 水平的升高,FN 的表达增加,其中 3 组 FN 的表达最高。4 组和 5 组 FN 的表达与 3 组相比有所减少。

图像分析软件计算结果与图片显示的趋势一致。与 1 组相比,2 组 FN 蛋白的表达水平明显升高($P<0.01$);与 1 组及 2 组相比,3 组 FN 蛋白的表达水平明显升高(P 均 <0.01)。在培养基中加入 NAC 进行干预,4 组和 5 组与 3 组相比,FN 蛋白的表达水平明显减少(P 均 <0.01);5 组 FN 蛋白的表达水平较 4 组明显降低($P<0.01$)。见表 1。

2.3 NAC 对 Ang II 致 CFs FN mRNA 表达的影响

与 1 组相比,2 组 FN mRNA 的表达水平明显升高($P<0.01$);与 1 组及 2 组相比,3 组 FN mRNA 的表达水平明显升高(P 均 <0.01)。在培养基中加入 NAC 进行干预,4 组和 5 组与 3 组相比,FN mRNA 的表达水平明显降低(P 均 <0.01);5 组 FN mRNA 的表达水平较 4 组明显降低($P<0.01$)。见表 1。

3 结论

心肌纤维化时 ECM 过度沉积^[2],ECM 是生物体的重要构成组分,可支持并连接组织细胞结构,调控组织细胞的生长发育及机体的生理活动。ECM 由细胞合成并分泌到细胞外,分布于细胞间或细胞表面。FN 属于大分子糖蛋白,是 ECM 的组成成分,可促进细胞与纤维间质的黏附连接,增强吞噬细胞的吞噬能力。

表 1 各组 CFs 增殖活性和 FN 表达水平的比较

	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组
CFs 增殖活性/%	2.89±0.08	3.11±0.06 ⁽¹⁾	3.35±0.05 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.79±0.14 ⁽³⁾	2.59±0.14 ⁽³⁾⁽⁴⁾
FN 蛋白	134.66±2.23	473.84±3.99 ⁽¹⁾	540.44±3.99 ⁽¹⁾⁽²⁾	70.84±0.80 ⁽³⁾	53.63±0.98 ⁽³⁾⁽⁴⁾
FN mRNA	1.00±0.20	3.67±0.60 ⁽¹⁾	6.64±0.28 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.72±0.12 ⁽³⁾	0.40±0.06 ⁽³⁾⁽⁴⁾

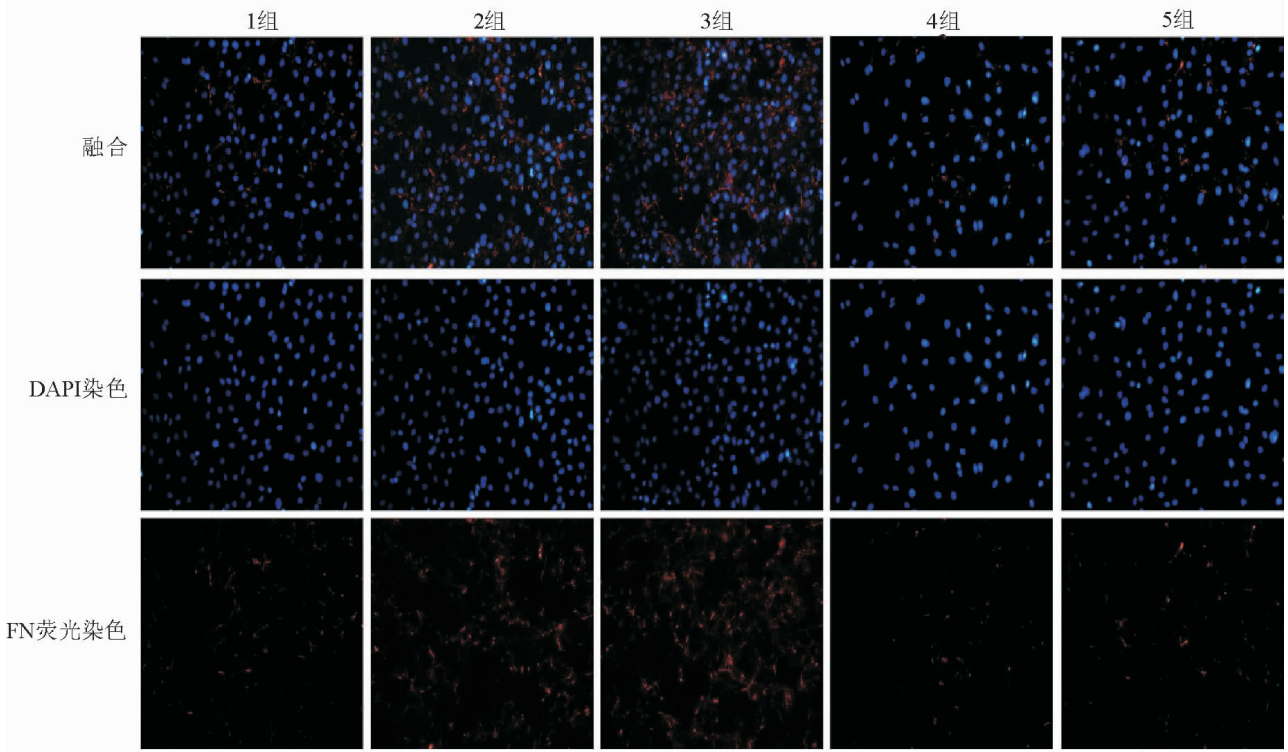
注:与 1 组相比,⁽¹⁾ $P<0.01$;与 2 组相比,⁽²⁾ $P<0.01$;与 3 组相比,⁽³⁾ $P<0.01$;与 4 组相比,⁽⁴⁾ $P<0.01$

心肌纤维化是多种因素相互作用的结果,神经体液分泌轴的紊乱可导致信号转导通路的调节失衡,进而加速心血管疾病的进展。研究证实在各种

刺激因素作用下,Ang II 的大量生成可激活交感神经系统及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS),引起多种生物活性物质的产生与释放,Ang II 长期持

续而强烈的作用可造成不可逆性心肌损伤。Ang II 的过度表达可诱导心肌细胞肥大,促进 CFs 向肌成纤维细胞转化。肌成纤维细胞是导致胶原蛋白降解与失衡的主要细胞^[8],其迁移能力远大于 CFs。在多种趋化因子的作用下,肌成纤维细胞可迅速迁移、增殖,使细胞间质与血管周围沉积大量胶原纤维,引起胶原数量及结构的紊乱,从而导致纤维化

的发生发展。此外,Ang II 还可上调炎性因子^[4]并影响微小 RNA(miRNA)^[5]的表达,通过多种作用机制影响心肌纤维化的过程。本研究发现,CFs 的增殖活性和 FN 的表达水平随 Ang II 浓度的增加而升高,随 NAC 浓度的增加而降低,说明 Ang II 可促进 CFs 增殖,并可增加 FN 在细胞间质的生成与沉积,而 NAC 可显著抑制 Ang II 对 CFs 的作用。



注:纤维连接蛋白(FN)呈红色荧光,4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色细胞核呈蓝色荧光(×200)

图 1 免疫荧光法检测各组 CFs 中 FN 的表达

NAC 的作用是多方面的。首先,NAC 作为抗氧化剂,是细胞内还原型谷胱甘肽的前体,可抑制并清除机体氧化应激反应产生的氧自由基,调节细胞的能量代谢。氧化应激是心肌纤维化的重要机制,可促进心室重构及心肌纤维化的进展,持续而强烈的心肌适应性损伤最终导致心力衰竭^[6-7]。Aragno 等^[8]研究表明,大量氧化活性物质的生成增加了糖尿病大鼠模型组 I 型、IV 型胶原蛋白和 FN 的表达,减弱了心肌收缩力和心脏的射血功能。Worou 等^[9]发现,氧化应激反应在 Ang II 刺激引起的大鼠纤维化过程中发挥重要作用。其次,NAC 是一氧化氮(NO)在体内的载体,通过激活鸟苷酸环化酶(GC)上调环磷酸鸟苷(cGMP)的表达^[10],增强氧的运输和释放,防止细胞损伤。此外,NAC 作为化痰药和抗炎药,在临床上用于治疗多种呼吸系统

疾病和急慢性肝脏疾病。刘卫青等^[11]研究表明,NAC 可明显减轻博来霉素所致的小鼠肺组织胶原蛋白沉积,减少肺泡灌洗液中炎性因子白细胞介素-4 的生成及核因子 $\kappa\beta$ 的活化,进而抑制肺组织纤维化的形成。上述研究表明 NAC 可通过多种途径参与机体的生理和病理过程。

心肌纤维化是多种心血管疾病发展至终末期的最终结局。本研究显示,NAC 在抑制 CFs 增殖及减轻 FN 在心肌间质沉积的过程中发挥重要作用,可能是潜在的抑制心肌纤维化的作用靶点。

参 考 文 献

[1] 蔡辉, 张蓓蓓. 心脏成纤维细胞在心肌纤维化中的作用[J]. 微循环学杂志, 2014, 24(4):80-82.
[2] 马金, 丁春华. 心脏成纤维细胞与心肌纤维化[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(3):269-272.
[3] Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are

- we talking about?[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57 (4):376-379.
- [4] Ma F, Li Y, Jia L, et al. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II [J]. PLoS One, 2012, 7(5):e35144.
- [5] Jiang X, Ning Q, Wang J. Angiotensin II induced differentially expressed microRNAs in adult rat cardiac fibroblasts[J]. J Physiol Sci, 2013, 63(1):31-38.
- [6] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301 (6):H2181-H2190.
- [7] Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1401-1438.
- [8] Aragno M, Mastrocola R, Alloatti GA, et al. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats[J]. Endocrinology, 2008, 149(1):380-388.
- [9] Worou ME, Belmokhtar K, Bonnet P, et al. Hemin decreases cardiac oxidative stress and fibrosis in a rat model of systemic hypertension via P13K/Akt signalling [J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(2):320-329.
- [10] 鲍红荣, 童立力. N-乙酰半胱氨酸的药理作用及其临床应用 [J]. 浙江临床医学, 2008, 10(9):1274-1275.
- [11] 刘卫青, 张晓晔, 朱敏, 等. N-乙酰半胱氨酸对博莱霉素致小鼠肺间质纤维化形成及 NF- κ B、IL-4 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013, 48(1):43-46.

(收稿:2017-04-16 修回:2017-11-24)

(本文编辑:胡晓静)

• 敬告读者 •

为了更好地服务读者和作者,提高稿件的处理速度和效率,缩短文章发表周期,《国际心血管病杂志》编辑部已全面启用远程采编系统(网址:<http://gjxxgzz.paperopen.com>)。进入网站,点击“作者投稿”栏,登记作者信息,注册成功后即可在线投稿。请作者以实名、常用电子邮箱和移动电话登记,以便于后续与您联系。

本刊编辑部