

IGFBP-3 在大鼠心肌纤维化和心肌成纤维细胞活化增殖中的表达

宋剑南^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 丁季飞^{1,2}, 徐盛松^{1,2}, 石开虎^{1,2}

摘要 目的 探究胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)在大鼠心肌纤维化和心肌成纤维细胞(CFs)活化增殖中的表达变化。方法 用40只SD大鼠随机等分成模型组和对照组,模型组大鼠用皮下注射异丙肾上腺素的方式建立心肌组织纤维化模型,对照组注射等质的生理盐水。用转化生长因子 β 1(TGF- β 1)刺激乳鼠CFs,使其增殖活化制备细胞模型组作为模型组,对照组为未经任何刺激正常培养等时长的CFs。大鼠心肌组织纤维化模型运用HE和Masson染色检测病理变化,用CCK-8测定CFs增殖活化程度,分别用qRT-PCR、Western blot检测IGFBP-3、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和I型胶原前胶原A1(COL1A1)的mRNA和蛋白表达情况。结果 与对照组比较,动物模型组中心肌组织胶原纤维增生,心肌细胞排列紊乱,细胞模型组中加入TGF- β 1刺激后CFs增殖活化明显。在动物和细胞模型组中与对照组相比,IGFBP-3、 α -SMA和COL1A1的蛋白和mRNA的表达显著增高。结论 IGFBP-3在纤维化心肌和加入TGF- β 1刺激后的CFs中表达明显升高,提示IGFBP-3在心肌纤维化病变过程中可能存在促进或抑制作用,有助于探索心肌纤维化的病理机制。

关键词 胰岛素样生长因子结合蛋白-3; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞; I型胶原; 增殖; 转化生长因子 β 1

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0263-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.021

心肌纤维化是指在多种病理性因素刺激下心肌组织细胞外基质中心肌胶原过量沉积及比例失调为主要表现的一种病理性过程,在房颤、心衰和心肌病等多种心脏疾病中普遍存在,但其发生发展机制迄今仍不明确^[1-2]。其中,心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的活化增殖使心肌间质中胶原沉

积,其作用在心肌纤维化的病变发生发展中十分关键^[3]。胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)是一组与体内胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)结合对细胞多种生物学效应产生影响的关键性分子蛋白。其中胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)是IGFBP系列中最主要的一种,在体内循环中占很高的比例,是IGFs的主要结合受体^[4]。研究^[5-6]表明,IGFBP-3与一些器官的纤维化有关,特别在肝纤维化中常有相关报道,但在心肌纤维化的病变中的研究报道甚少。现通过建立相关的动物和细胞模型,检测IGFBP-3在大鼠心肌纤维化和CFs活化增殖中的分子表达,分析其在心肌纤维化病变过程中起到相关的促进或抑制作用,从而为IGFBP-3在心肌纤维化的诊断与治疗提供新的依据,并探索心肌纤维化可能的发病原理与机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 在同样环境下给予相同且足够的水和饲料喂养动物,选40只6周左右SPF级雄性SD大鼠,体质量(200±30)g;40只约10g的清洁级SD乳鼠,由安徽医科大学实验动物中心选购,动物许可证号:scxk(皖)2017-001。

1.1.2 药品与试剂 盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, ISO)(上海禾丰制药有限公司,批号:41170302);转化生长因子- β 1(Peprotech,美国);CCK-8试剂(Sigma公司,美国);Western blot技术相关的一、二抗(Bioworld Technology公司,美国);逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 EPS电泳仪(上海天能科技有限公司,中国);PCR仪(Thermo Fisher Scientific公司,美国);Western blot技术相关的显影设备;高速冷冻离心机(Eppendorf公司,德国),CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific公司,美国)。

2019-11-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570295);安徽省自然科学基金(编号:1808085MH231)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

²安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:宋剑南,男,硕士研究生;

石开虎,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: shikaihu@gmail.com

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组和纤维化模型的构建 40 只雄性 SD 大鼠随机均分为对照组和模型组。在相同饲养环境下,模型组每天腹部皮下注射 ISO (5 mg/kg) 连续注射 2 周,建立 SD 大鼠心肌纤维化模型。对照组连续注射 2 周予以腹部皮下注射等剂量的生理盐水。

1.2.2 大鼠纤维化心肌标本的采集和处理 将处理后的模型组和对照组的大鼠处死,开胸取出大鼠心脏,等质量将心脏分为 2 份,取大鼠心房组织用于实验。其中 1 份用甲醛溶液脱水后,液体石蜡包埋,将包埋好的心肌组织切片,每片厚 5 μm,以留下一步实验。剩余心脏组织置于 -80 °C 冰箱待用。

1.2.3 HE、Masson 染色及胶原容积分数测定 将切片的心肌组织烘烤后用二甲苯脱去切片中的石蜡再经由高浓度到低浓度酒精冲洗。用苏木精染色后蒸馏水冲洗;经过盐酸酒精的分化后返蓝,蒸馏水冲洗后脱水处理,继续 HE、Masson 染色。图片采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析,每张切片取 3 个无血管的视野,计算心肌组织胶原容积分数 CVF (%) = 胶原面积 / 全视野面积 × 100%。

1.2.4 SD 乳鼠 CFs 的提取与培养 将 SD 乳鼠用乙醇浸泡 30 s 后,开胸取出心脏,用 PBS 清洗 3 次,挤出血凝块。将心脏放至高压灭菌 5 ml EP 管中,将心脏充分碾碎,加入 3 ml I 型胶原酶和胰蛋白酶的混合酶液(I 型胶原酶:胰蛋白酶比例为 1:2),37 °C 水浴消化,静置后,取上清液移至新 EP 管中,加入等量培养基混合,将 EP 管放入低速离心机(900 r/min 离心 8 min),重复上述操作 3 次。细胞培养 1.5 h 后再次更换培养基。通过高倍显微镜鉴别 CFs,将提取成功的细胞放入细胞培养箱中继续培养,传至 3~4 代可用于实验。

1.2.5 细胞分组 在相同条件下将 CFs 等细胞数量的种子培养皿中。对照组:正常未经处理的 CFs;模型组:CFs 使用 5 ng/ml 转化生长因子-β1 (transforming growth factor β1, TGF-β1) 分别刺激 24、48 h,使其活化。对照组和模型组均培育相同的时间后处理。

1.2.6 CCK-8 检测 TGF-β1 刺激的 CFs 增殖情况 将 CFs 分为 3 组,模型组:TGF-β1 刺激 CFs 增殖 24、48 h,对照组:未加 TGF-β1 刺激在相同条件下培养的 CFs。培养完成后用以细胞密度为 3 × 10⁶ /L 加于 96 孔板中,每孔 100 μl,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,培养 2 d 后处理。每孔加入 10 μl

CCK-8 试剂,避光孵育 2 h 后测定光密度(optical density, OD) 值,实验重复测量 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测 IGFBP-3、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA) 和 I 型胶原前胶原 A1 (type I collagen procollagen A1, COL1A1) 的蛋白表达 分别提取心肌组织和细胞的总蛋白,测蛋白浓度后,将蛋白保存于 -80 °C 冰箱待用。配制相应胶后,上样后用 SDS-PAGE 蛋白电泳体系进行电泳,经过湿转膜后 TBST 洗膜 2 × 10 min,脱脂牛奶封闭 1 h,洗膜 4 × 10 min,摇床上 4 °C 孵育 IGFBP-3、α-SMA、β-actin、COL1A1 的一抗(根据说明书,IGFBP-3 抗体用一抗稀释液以 1:800 进行稀释,α-SMA、β-actin、COL1A1 抗体以 1:1000 进行稀释)过夜后,再次洗膜 4 × 10 min,二抗(用 10 ml 二抗稀释液加入抗兔/山羊抗鼠的二抗 1 μl 进行稀释)室温孵育 90 min,洗膜 4 次,每次 10 min,最后蛋白采用 ECL 法显影。蛋白条带采用 Quantity One V 4.6 软件进行分析,进行吸光度值的检测,计算出蛋白表达水平。

1.2.8 qRT-PCR 技术检测 IGFBP-3、α-SMA 和 COL1A1 的 mRNA 表达 提取心肌组织和 CFs 的总 RNA,测定纯度和浓度后,按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行逆转录,逆转录后 cDNA 放在 -80 °C 保存。使用 qRT-PCR 检测目的基因。反应条件:50 °C、2 min,95 °C、10 min 预变性;95 °C、20 s 变性,60 °C、30 s 退火,72 °C、30 s 延伸,40 个循环的扩增阶段;以 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s 为熔解曲线阶段。以 β-actin 为内参,以 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 的相对表达量。表 1 为相关引物序列。

表 1 IGFBP-3、α-SMA、β-actin 和 COL1A1 的 qPCR 的引物序列

基因	序列(5'→3')
IGFBP-3	F: CTCTGCGTCAACGCTAGTGC
	R: CGGTCTTCTCCGACTCACT
α-SMA	F: TGGCCACTGCTGCTTCTCTTCTT
	R: GGGCCAGCTTCGTACTACTCTCT
COL1A1	F: GGAGAGAGCATGACCCATGG
	R: GGGACTTCTTGAGTTGCCA
β-actin	F: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAC
	R: ACCGAGCTCAGTAACAGTCCG

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,单因素变量两组之间比较采用 t 检验,多组均数的比较采用方差分析,数值变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE、Masson 染色及胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF) 测定分析 如图 1 示, HE 染色中蓝染的为细胞核, 红染的为胞质和胞外基质; Masson 染色心肌红染、心肌间质胶原纤维为蓝染。从 2 种染色中可以观察到, 与对照组比较 模型组心肌细胞增生肥大且排列紊乱, 胞外纤维组织明显增多。CVF 比较: 模型组大鼠心肌组织胶原容积分数百分比明显高于阴性对照组 ($t = 49.38, P < 0.05$), 差异有统计学意义。模型组与对照组的胶原纤维 CVF (%) 比较见表 2。

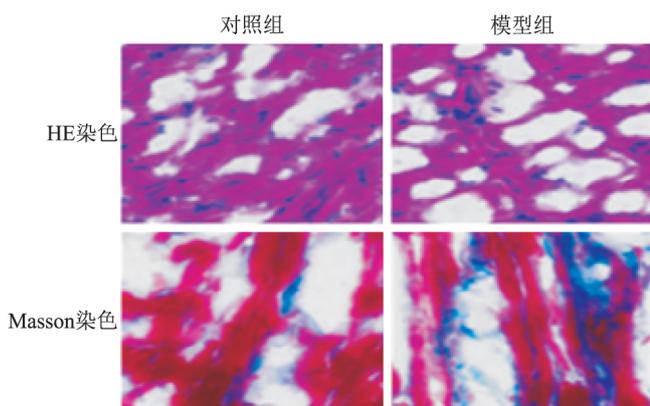


图 1 两组大鼠心肌组织 HE 和 Masson 染色的比较 ×400

表 2 对照组和模型组胶原纤维 CVF 测定 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	CVF (%)
对照	1.72 ± 0.35
模型	12.45 ± 1.29*

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 注射 ISO 后对大鼠心肌组织中 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 蛋白的影响 大鼠动物模型中, 在大鼠心肌组织中 IGFBP-3 蛋白表达水平模型组比对照组明显增高 ($t = 37.72, P < 0.05$) α -SMA 蛋白表达含量模型组比对照组明显增高 ($t = 56.03, P < 0.05$) ,COL1A1 的蛋白表达水平模型组高于对照组 ($t = 43.38, P < 0.05$) ,差异有统计学意义。见图 2。

2.3 注射 ISO 后对大鼠心肌组织中 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 mRNA 表达的影响 以 β -actin 内参检测 mRNA 的表达, IGFBP-3 的 mRNA 表达水平模型组明显高于对照组 ($t = 46.21, P < 0.05$) α -SMA 的 mRNA 表达水平模型组比对照组显著增高 ($t = 36.37, P < 0.05$) ,COL1A1 的 mRNA 表达水平模型组高于对照组 ($t = 79.58, P < 0.05$) ,差异有统

计学意义。见图 3。

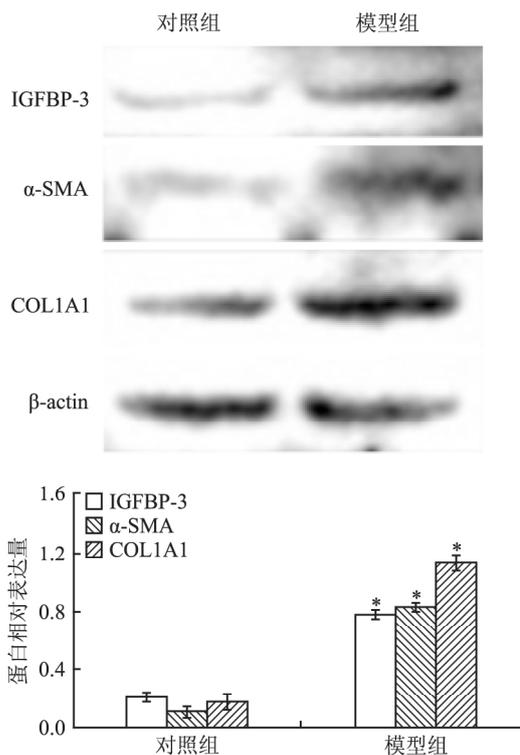


图 2 对照组和模型组 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达的变化
与对照组比较: * $P < 0.05$

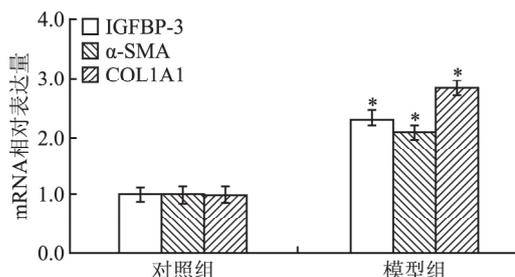


图 3 对照组和模型组 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 mRNA 表达的比较
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 CCK-8 法检测 TGF- β 1 刺激后 CFs 的细胞活力 CCK-8 实验结果见图 4, 加入 TGF- β 1 刺激 24 h ($t = 43.42, P < 0.05$) 和 48 h ($t = 104.60, P < 0.05$) 后 CFs 的细胞活力高于对照组, 差异有统计学意义。

2.5 加入 TGF- β 1 刺激后对 CFs 中 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 蛋白表达的影响 细胞模型中, 用 TGF- β 1 刺激 24 h CFs 所表达的 IGFBP-3 蛋白表达水平模型组明显高于对照组 ($t = 14.13, P < 0.05$) α -SMA 蛋白表达含量模型组与对照组比较显著增高 ($t = 26.29, P < 0.05$) ,COL1A1 的蛋白表

达水平模型组高于对照组 ($t = 13.83, P < 0.05$) ,用 TGF- β 1 刺激 48 h 的 CFs 比对照组表达的 IGFBP-3 ($t = 62.59, P < 0.05$) 、 α -SMA ($t = 129.30, P < 0.05$) 、COL1A1 ($t = 63.61, P < 0.05$) 的蛋白含量明显增高 ,且刺激 48 h CFs 的 IGFBP-3 ($t = 28.99, P < 0.05$) 、 α -SMA ($t = 105.25, P < 0.05$) 、COL1A1 ($t = 10.89, P < 0.05$) 的蛋白含量高于刺激 24 h ,差异有统计学意义。见图 5。

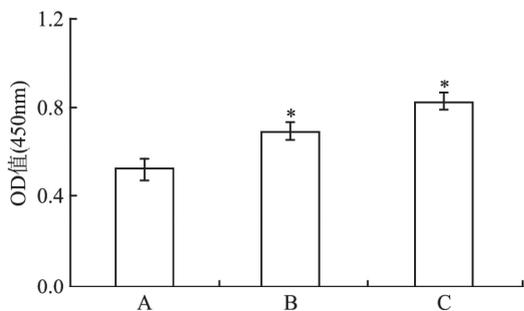


图4 对照组和用 TGF- β 1 刺激 CFs 24、48 h 的细胞活力比较

A: 未加 TGF- β 1 刺激的 CFs (对照组); B: TGF- β 1 刺激 24 h 的 CFs; C: TGF- β 1 刺激 48 h 的 CFs; 与对照组比较: * $P < 0.05$

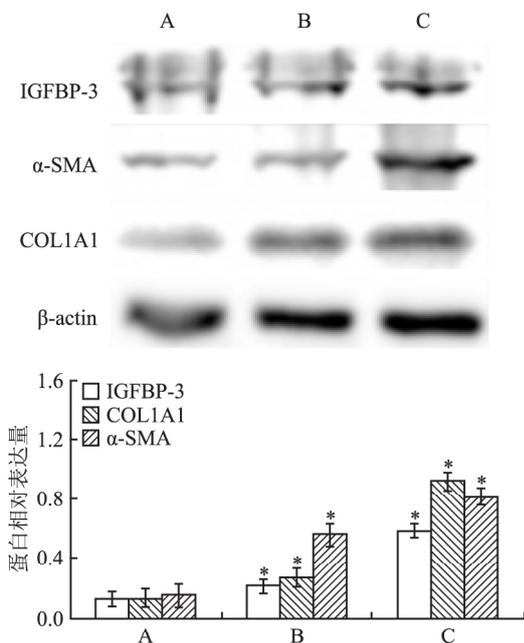


图5 TGF- β 1 刺激后的 CFs 模型组与对照组 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 的表达比较

A: 未加 TGF- β 1 刺激的 CFs 蛋白表达; B: TGF- β 1 刺激 24 h 的 CFs 蛋白表达; C: TGF- β 1 刺激 48 h 的 CFs 蛋白表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 加入 TGF- β 1 刺激后对 CFs 中 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 mRNA 表达的影响 以 β -actin 作为内参 ,采用相对定量法检测 mRNA 的表达 ,

TGF- β 1 刺激 24 h 后 CFs 所表达的 IGFBP-3 ($t = 45.00, P < 0.05$) 、 α -SMA ($t = 20.15, P < 0.05$) 、COL1A1 ($t = 58.20, P < 0.05$) 的 mRNA 含量升高 ,同样 ,TGF- β 1 刺激 48 h 后 CFs 所表达的 IGFBP-3 ($t = 17.77, P < 0.05$) 、 α -SMA ($t = 26.29, P < 0.05$) 、COL1A1 ($t = 37.24, P < 0.05$) 的 mRNA 含量亦升高 ,差异有统计学意义。见图 6。

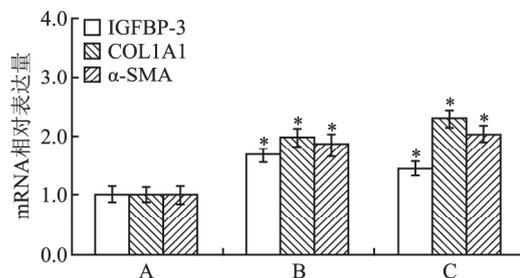


图6 对照组与 TGF- β 1 刺激的 CFs 24 h 和 48 h 的模型组的 IGFBP-3、 α -SMA 和 COL1A1 的 mRNA 含量比较

A: 未加 TGF- β 1 刺激 CFs 的 mRNA 表达 (对照组); B: TGF- β 1 刺激 24 h CFs 的 mRNA 表达; C: TGF- β 1 刺激 48 h CFs 的 mRNA 表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

心肌纤维化是心脏在多病理因素下相互作用、共同参与的结果。而心肌成纤维细胞增殖、活化及细胞外基质过度沉积和胶原比例失调 ,可进一步形成心肌纤维化^[7-8]。在心肌纤维化中 α -SMA、COL1A1 等蛋白过度表达 ,可作为心肌纤维化的检测指标。

IGFBP 调节 IGFs 与其受体的结合 ,对细胞内 IGF 相关的其他信号的同类传导与表达产生影响。IGFBP-3 在体内主要由肝脏的非实质细胞产生 ,但在其他器官细胞中也有表达 ,通过自分泌和旁分泌对细胞产生作用^[9-10]。相关研究^[11-13]表明 ,在心衰、心肌梗死等一些心血管疾病中促进 IGFBP-3 的表达可抑制 IGF-1 的信号转导以阻断 IGF-1R/PI3K/Akt 通路发挥出抑制细胞活化的作用 ,IGFBP-3 在一些肿瘤的增殖过程中也发挥拮抗增殖的作用 ,可促进癌细胞的凋亡。从以上可分析在心肌纤维化的病变和 CFs 活化增殖过程中 ,IGFBP-3 表达升高可能抑制细胞的活化 ,对心肌纤维化可能产生抑制作用。

通过构建大鼠心肌纤维化及 CFs 活化的模型 ,检测模型中 IGFBP-3 的表达含量并与对照组作对比。动物模型建立后心肌纤维化病理表现明显 ,细

胞实验中,加入 TGF- β 1 刺激后细胞增殖活化明显,检测模型组中 α -SMA、COL1A1 表达明显升高,结合以往文献^[14-15],说明其建立动物和细胞模型的方法可行。在动物模型和细胞模型中,模型组中 IGFBP-3 表达含量增高,说明纤维化心肌和活化 CFs 可影响组织和细胞中 IGFBP-3 的表达。

综上所述,在心肌纤维化的病理过程中 IGFBP-3 的表达水平明显升高,表明 IGFBP-3 可能参与心肌纤维化的病变过程并在其发生机制中起着重要作用,但其具体作用机制尚不明确,有待深入研究。

参考文献

- [1] 杨健康,石开虎,陶辉等. DNMT3A 与 CTGF 在 AAC 致大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(9): 1302-5.
- [2] Gyöngyösi M, Winkler J, Ramos I, et al. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside[J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(2): 177-91.
- [3] 代晨,陶辉,石开虎等. miR-369-5p 对 SD 大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(12): 1693-7.
- [4] Chang R L, Lin J W, Hsieh D J, et al. Long-term hypoxia exposure enhanced IGFBP-3 protein synthesis and secretion resulting in cell apoptosis in H9c2 myocardial cells[J]. *Growth Factors*, 2015, 33(4): 275-81.
- [5] Chishima S, Kogiso T, Matsushita N, et al. The relationship between the growth hormone/insulin-like growth factor system and the histological features of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Intern Med*, 2017, 56(5): 473-80.
- [6] Adamek A, Kasprzak A. Insulin-like growth factor(IGF) system in liver diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): E1308.
- [7] González A, Schelbert E B, Díez J, et al. Myocardial interstitial fibrosis in heart failure: biological and translational perspectives[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(15): 1696-706.
- [8] 石斌豪,徐宗佩,樊官伟. 基于 TGF- β 1/Smads 信号通路治疗心肌梗死后心肌纤维化的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 5-8.
- [9] Ranke M B. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3) [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(5): 701-11.
- [10] Jogie-Brahim S, Feldman D, Oh Y. Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease[J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(5): 417-37.
- [11] Lin K H, Kuo W W, Jiang A Z, et al. Tetramethylpyrazine ameliorated hypoxia-induced myocardial cell apoptosis via HIF-1 α /JNK/p38 and IGFBP3/BNIP3 inhibition to upregulate PI3K/Akt survival signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 334-44.
- [12] Ma Y, Han C C, Li Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibits IGF-1-induced proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by controlling bFGF and PDGF autocrine/paracrine loops[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 964-9.
- [13] Busch M, Krüger A, Gross S, et al. Relation of IGF-1 and IGFBP-3 with prevalent and incident atrial fibrillation in a population-based study[J]. *Heart Rhythm*, 2019, 16(9): 1314-9.
- [14] 刘发金,肖骅,唐雪娇等. 转化生长因子- β 1 对大鼠心房、心室成纤维细胞胶原表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(7): 540-6.
- [15] 支敏,陶辉,陈泽文,等. HDAC8 在异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 950-3.

Expression of IGFBP-3 in rat myocardial fibrosis and activation and proliferation of cardiac fibroblasts

Song Jiannan^{1,2}, Tao Hui^{1,2}, Ding Jifei^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Cardiovascular Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression changes of insulin-like growth factor binding protein-3(IGFBP-3) in rat myocardial fibrosis and cardiac fibroblasts(CFs) activation and proliferation. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into model group and control group. The model group rats were subcutaneously injected with isoproterenol to establish a model of myocardial tissue fibrosis. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) was used to stimulate the CFs of neonatal rats to make them proliferate and activate as a model group. The control group was CFs that were cultured normally without any stimulation. The rat myocardial tissue fibrosis model was used to detect pathological changes using HE and Masson staining, CCK-8 was used to determine the degree of CFs proliferation and activation, and qRT-PCR and Western blot were used to detect IGFBP-3 and α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen procollagen A1 (COL1A1) mRNA and protein expression. **Results** Compared with the control

糖基化终末产物诱导内皮微颗粒释放

陈英华 冯 波

摘要 目的 观察糖基化终末产物(AGEs)对内皮微颗粒(EMP)释放的影响。方法 予不同浓度 AGEs(100、200、400 $\mu\text{g/ml}$) 干预人脐带静脉内皮细胞(HUVECs) 12、24 h; 分别予抗糖基化终末产物受体(RAGE) 抗体、活性氧(ROS) 清除剂预处理内皮细胞, 再予 400 $\mu\text{g/ml}$ AGEs 干预内皮细胞 24 h。检测以上各组 EMP、RAGE、ROS。结果 AGEs 以浓度依赖方式, 而非时间依赖方式诱导内皮细胞分泌 EMP; 同时, AGEs 诱导内皮细胞 RAGE、ROS 表达水平增高。运用抗体阻断 RAGE 或 ROS 清除剂后, AGEs 诱导产生的 EMP 水平下降。结论 AGEs 与 RAGE 相互作用, 通过氧化应激途径诱导内皮微颗粒释放。

关键词 糖尿病; 内皮微颗粒; 糖基化终末产物; 活性氧

中图分类号 R 587.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0268-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.022

血管内皮细胞在受到损伤时, 发生细胞膜受损及部分细胞膜脱落, 进而形成外泌的膜性小囊泡, 即内皮微颗粒(endothelial microparticle, EMP)^[1]。目前临床观察性研究^[1-4]显示, 患有血管相关性疾病如糖尿病、冠心病、高血压、代谢综合征、高脂血症等的患者外周循环 EMP 水平明显增高, 同时体外实验提示 EMP 具有抑制内皮舒张功能, 促进氧化应激发生, 使内皮细胞损伤增加等作用^[1-5]。因此 EMP 不仅是血管损伤的生物学标记, 其本身也参与血管损

伤, 故探索 EMP 产生机制尤为重要。糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs) 是持续高血糖引起体内多种蛋白质和脂类非酶糖基化后生成的多种不同物质的统称, 是糖尿病患者的特点, 其在糖尿病血管病变中起至关重要作用^[6]。该课题拟探索 AGEs 对 EMP 分泌的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 胎牛血清白蛋白、D-葡萄糖、胎牛血清、EBM-2 细胞培养液、0.8 μm 微球、3 μm 微球购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 抗 RAGE 抗体、N-乙酰半胱氨酸购自美国 Abcam 公司; CD31-FITC、同型对照抗体 IgG1-FITC、RAGE 抗人单克隆抗体、GAPDH 抗人单克隆抗体购自美国 BD 公司; 反转录试剂盒、DCFH-DA 购自美国 Invitrogen 公司; SYBR Green RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司。荧光分光光度计 F98 购自上海棱光技术有限公司; 流式细胞仪 FACSCalibur 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 制备 将胎牛血清白蛋白与 D-葡萄糖溶于 PBS(pH 7.2~7.4) 溶液中, 使其终浓度分别为 50 g/L 和 500 mmol/L, 以 0.22 μm 一次性过滤器过滤除菌, 于隔水式恒温培育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 周。实验前用 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 透析, 除去未结合的葡萄糖, 使透析液中的葡萄糖浓度小于 0.03 mmol/L。同时在荧光分光光度计上以激发波长为 370 nm 测定荧光强度, 在 440 nm 处获得最大吸收峰, 证实生成为 AGEs。制备完毕的蛋白经低温风干后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 人脐静脉内皮细胞干预 无菌条件下取新

2019-11-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81600626); 上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养(编号: PWRq2015-07)

作者单位: 同济大学附属东方医院内分泌科, 上海 200120

作者简介: 陈英华, 女, 主治医师;

冯 波, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: joyinghua@sohu.com

group, myocardial tissue collagen fibers proliferated and myocardial cells were disordered in the animal model group. CFs stimulated by TGF- β 1 in the cell model group had significant proliferation and activation. Compared with the control group, the protein and mRNA expressions of IGFBP-3, α -SMA and COL1A1 were significantly increased in the animal and cell model groups. **Conclusion** The expression of IGFBP-3 in fibrotic myocardium and CFs stimulated by TGF- β 1 is significantly increased, suggesting that IGFBP-3 may promote or inhibit myocardial fibrotic lesions, which may be helpful to explore the pathological mechanism of myocardial fibrosis.

Key words IGFBP-3; myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts; type I collagen; proliferation; TGF- β 1