

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2015) 02 - 0107 - 03

芝麻素对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原分泌的影响

曹雨朦¹ 郑书国² 赵梦秋² 任尤楠² 涂鹏程¹ 李方圆¹ 陈雪祎¹ 常雪允¹

(皖南医学院 1. 临床医学院; 2. 药理学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 观察芝麻素对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌成纤维细胞(CF) 增殖及胶原分泌的影响, 并探讨其可能机制。方法: 应用双酶消化和差速贴壁法获得纯化的心肌成纤维细胞, 采用 MTT 法测定芝麻素对 Ang II 诱导的成纤维细胞增殖的影响, 羟脯氨酸法测定胶原含量, ELISA 法测定转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 水平, 比色法测定细胞总抗氧化能力(T-AOC) 及丙二醛(MDA) 含量。结果: 芝麻素可显著抑制 Ang II 诱导的成纤维细胞增殖和胶原分泌, 抑制 TGF- β_1 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时可提高细胞抗氧化能力, 减少脂质过氧化产物 MDA 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 芝麻素可明显抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成, 其机制可能与提高成纤维细胞的抗氧化能力、减少氧化损伤、下调 TGF- β_1 蛋白表达有关。

【关键词】芝麻素; 心肌成纤维细胞; 血管紧张素 II; 氧化应激

【中图分类号】R 285.5 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.02.002

Effect of sesamin on collagen secretion and cardiac fibroblasts proliferation induced by angiotensin II

CAO Yumeng ZHENG Shuguo ZHAO Mengqiu REN Younan TU Pengcheng LI Fangyuan CHEN Xuewei CHANG Xueyun

Clinical School, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the effect of sesamin on the collagen secretion and proliferation of cardiac fibroblasts (CF) induced by angiotensin II (Ang II) as well as the potential mechanisms. **Methods:** Cardiac fibroblasts were isolated from neonatal rats with trypsin and collagenase digestion and purified by differential attachment technique. MTT assay was applied to assess the effect of sesamin on the proliferation of cardiac fibroblasts after stimulation with Ang II. Hydroxyproline method was used to determine the collagen content, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of TGF- β_1 level and colorimetric method for evaluation of the cellular total antioxidant capacity (T-AOC) and malonaldehyde (MDA) level. **Results:** Sesamin significantly suppressed Ang II induced CF proliferation and collagen secretion as well as TGF- β_1 expression($P < 0.05$ or $P < 0.01$), whereas boosted cellular T-AOC and led to decrease of MDA level($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Sesamin is capable of suppressing Ang II induced CF proliferation and collagen synthesis. The potential mechanisms might involve boosted antioxidant capacity and down-regulation of TGF- β_1 expression.

【Key words】 sesamin; cardiac fibroblasts; angiotensin II; oxidative stress

心肌纤维化(MF) 是高血压心肌重构的关键病理特征之一, 也是导致心脏功能衰竭的主要原因。减少胶原沉积、抑制 MF, 是改善高血压性心肌重构的关键环节, 也是高血压治疗的重要目标之一。持续高血压可引起肾素血管紧张素系统(RAS) 激活, 导致循环及心脏局部血管紧张素 II (Ang II) 水平升高, 上调转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的表达进而导致纤维化^[1]。高血压还可诱导氧化应激, 损伤机体抗

氧化系统, 进而促进 MF 进程^[2], 抗氧化剂能减轻心梗所致的心肌重构^[3], 提示抗氧化剂可能是防治高血压心肌重构的有效措施之一。

芝麻素是芝麻中的主要活性成分, 具有抗氧化^[4]、抗高血压^[5]等多种药理作用。本实验在文献报道^[6]基础上进一步观察芝麻素对 Ang II 诱导的 CF 增殖及胶原分泌的影响, 在细胞水平上初探芝麻素干预 MF 的可能机制。

基金项目: 安徽省大学生创新创业训练计划项目(AH201310368112)

收稿日期: 2014-07-16

作者简介: 曹雨朦(1993-), 女, 2011 级本科生, (电话) 0553-3932464, (电子信箱) 892466332@qq.com;

郑书国, 男, 副教授, 硕士生导师, (电话) 13955300871, (电子信箱) zhengsg2000@163.com, 通讯作者。

1 材料与方法

1.1 动物 新生SD大鼠,购自于南京市江宁区青龙山实验动物中心。

1.2 药品与试剂 芝麻素,上海纯优生物科技有限公司; DMEM 培养基, Hyclone; 胰蛋白酶、胎牛血清(FBS), Gibco; II型胶原酶, sigma; Ang II, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 波形蛋白(Vimentin)一抗, 博奥森生物技术有限公司; α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)一抗, 碧云天生物技术研究所; SABC 试剂盒, DAB, 武汉博士德生物工程有限公司; 大鼠 TGF- β_1 酶联免疫检测试剂盒, 上海朗顿生物技术有限公司; 羟脯氨酸试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 方法

1.3.1 CF分离培养与鉴定 乳鼠用75%乙醇浸泡10s后转移至超净台,取出心脏置于预冷D-Hanks液中。取心尖于洗去血污后剪成约1mm×1mm×1mm碎块置于酶消化液中,37℃消化10min,更换消化液,消化10min收集上清,加入培养基(10%FBS)洗涤,离心弃上清后加预冷培养基(10%FBS)吹打悬浮,置冰中备用。剩余组织块重复上述过程,收集细胞悬液合并离心,培养基洗涤后接种。培养1.5h后,更换新鲜培养液。待细胞长至近融合时消化传代,实验采用第2~6代细胞。显微镜下观察细胞形态,采用免疫细胞化学染色法鉴定。

1.3.2 CF增殖测定 按 1×10^4 /孔的密度将细胞接种于96孔培养板,分为对照组、Ang II组及Ang II+芝麻素组。无血清培养液培养12h后,芝麻素各组加入相应浓度芝麻素孵育12h。除对照组外,其余各组均加入Ang II孵育24h。MTT法检测细胞增殖,以OD值表示细胞增殖水平,增殖抑制率(%) = (Ang II组OD值 - 给药组OD值) / Ang II组OD值 × 100%。

1.3.3 羟脯氨酸测定 按 1×10^5 /孔的密度将细胞接种于24孔培养板,细胞分组同上。收集培养上清液,按说明测定羟脯氨酸含量。

1.3.4 TGF- β_1 含量测定 细胞的分组及处理同1.3.3。收集上清液,按说明书测定TGF- β_1 含量。

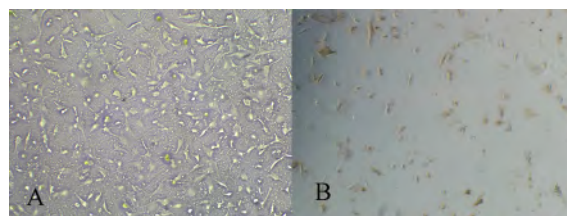
1.3.5 MDA及T-AOC水平测定 同1.3.3项下收集细胞培养上清液后按试剂盒说明测定MDA, PBS洗涤细胞,超声破碎细胞,离心后蛋白定量并按说明测定T-AOC。

1.4 统计学处理 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采

用 q 检验。

2 结果

2.1 CF鉴定 倒置显微镜下观察,正常心肌成纤维细胞呈梭形、多角形,无搏动,胞质淡而透明,折光弱,中央卵圆核,胞质向外伸出突起。免疫细胞化学染色鉴定 α -SMA表达阴性(图1A),Vimentin表达阳性(图1B),符合CF特征。



A: α -SMA 蛋白表达阴性; B: Vimentin 蛋白表达阳性

图1 CF鉴定(×100)

2.2 芝麻素对CF增殖及胶原分泌的影响 胶原蛋白含量采用羟脯氨酸法测定。由表1可见,Ang II能明显促进CF增殖及胶原分泌($P < 0.01$),而芝麻素对Ang II诱导的增殖及胶原分泌具有显著抑制作用($P < 0.01$)。

表1 芝麻素对CF增殖及胶原分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	终浓度 (mol/L)	OD 值	抑制率 (%)	Hydroxyproline ($\mu\text{g/mL}$)
control	-	0.42 ± 0.02	-	32.85 ± 2.70
Ang II	10^{-7}	0.59 ± 0.04 ^{aa}	-	44.77 ± 3.34 ^{aa}
Sesamin	10^{-4}	0.44 ± 0.01 ^{bb}	24.09	33.92 ± 1.64 ^{bb}
Sesamin	10^{-5}	0.48 ± 0.03 ^{bb}	21.48	36.43 ± 3.97 ^{bb}
Sesamin	10^{-6}	0.53 ± 0.06	9.39	40.51 ± 2.57
F 值	-	23.19	-	21.53

注:与Control组相比^{aa} $P < 0.01$;与Ang II组相比^{bb} $P < 0.01$

2.3 芝麻素对TGF- β_1 蛋白表达的影响 Ang II能明显增加心肌成纤维细胞TGF- β_1 表达水平($P < 0.01$),中剂量和高剂量芝麻素均可显著抑制Ang II诱导的TGF- β_1 表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表2 芝麻素对心肌成纤维细胞TGF- β_1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终浓度(mol/L)	TGF- β_1 (pg/mL)
control	-	131.91 ± 21.30
Ang II	10^{-7}	179.82 ± 13.97 ^{aa}
Sesamin	10^{-4}	140.32 ± 18.65 ^{bb}
Sesamin	10^{-5}	153.12 ± 13.48 ^b
Sesamin	10^{-6}	162.92 ± 17.58
F 值	-	5.98

注:与Control组相比^{aa} $P < 0.01$;与Ang II组相比^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$

2.4 芝麻素对 T-AOC 和 MDA 水平的影响 由表 3 可见,Ang II 组 CF 总抗氧化能力明显下降($P < 0.01$),脂质过氧化产物 MDA 含量明显升高($P < 0.01$),提示 Ang II 可引起细胞氧化损伤。芝麻素中、高剂量组 T-AOC 水平均明显升高($P < 0.01$),MDA 水平显著降低($P < 0.01$),提示芝麻素可有效提高心肌成纤维细胞抗氧化能力,减轻氧化损伤。

表 3 芝麻素对成纤维细胞 T-AOC 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终浓度 (mol/L)	T-AOC (U/mgprot)	MDA (nmol/mL)
control	-	1.72 ± 0.30	43.91 ± 5.35
Ang II	10 ⁻⁷	1.06 ± 0.15 ^{aa}	78.00 ± 4.68 ^{aa}
Sesamin	10 ⁻⁴	1.50 ± 0.13 ^{bb}	52.44 ± 5.20 ^{bb}
Sesamin	10 ⁻⁵	1.35 ± 0.12 ^{bb}	57.91 ± 5.86 ^{bb}
Sesamin	10 ⁻⁶	1.22 ± 0.11	64.67 ± 15.21
F 值	-	9.89	12.10

注:与 Control 组相比,aa $P < 0.01$;与 Ang II 组相比,bb $P < 0.01$

3 讨论

CF 是心肌间质的主要细胞成分,也是产生胶原的主要细胞。高血压时,CF 异常增殖并分泌大量胶原,导致细胞外基质异常沉积,引起心肌重构。羟脯氨酸主要存在于胶原蛋白,是其中特异的氨基酸成分,且含量相对恒定,因此通过测定其水平可以反映心肌纤维化程度^[7]。本研究显示,Ang II 能明显促进 CF 增殖和胶原分泌,提示 RAS 激活是高血压心肌重构重要参与因素之一。给予芝麻素预孵后,细胞增殖和胶原合成被抑制,提示芝麻素减轻高血压心肌重构与抑制 CF 增殖和胶原分泌有关。

研究表明,过表达 TGF-β₁ 能导致心肌肥厚和心肌纤维化^[8],而在 TGF-β₁ 基因缺陷小鼠模型则未见明显心肌重构效应^[9],提示 Ang II 诱导的心肌重构需 TGF-β₁ 介导。本研究结果显示,芝麻素能明显抑制 Ang II 诱导的 TGF-β₁ 表达,这一结果与其抑制 CF 增殖和胶原合成一致,提示芝麻素可能通过抑制 TGF-β₁ 表达而抑制 Ang II 诱导的 CF 增殖和胶原合成。

病理情况下,ROS 产生过多或抗氧化体系受损时,过量 ROS 不能及时清除,参与多种疾病的发展进程,如 ROS 能够直接上调 TGF-β₁ 蛋白表达,刺激 CF 增殖,并诱导胶原分泌^[10]。高血压可引起体内抗氧化系统受损并增加 ROS 生成,而过度激活的

RAS 也可增加 ROS 产生。ROS 既可直接引起组织细胞氧化损伤,又可反过来促进 Ang II 生成,形成恶性循环,共同促进心肌重构进程。本研究显示,芝麻素可明显增强 CF 抗氧化能力,减轻 Ang II 诱导的氧化损伤,提示芝麻素抑制 CF 增殖和胶原合成可能与增强细胞抗氧化能力有关。综上所述,芝麻素能明显抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成,其机制可能与提高细胞抗氧化能力、抑制 TGF-β₁ 表达有关。这一结果与前期发现的芝麻素可抑制高血压心肌重构作用一致,提示芝麻素可能通过抑制 CF 增殖和胶原合成而减轻高血压心肌重构。

【参考文献】

- [1] Uechi M, Tanaka Y, Aramaki Y, et al. Evaluation of the renin-angiotensin system in cardiac tissues of cats with pressure-overload cardiac hypertrophy [J]. American journal of veterinary research, 2008, 69(3): 343-348.
- [2] Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension: What Is the Clinical Significance [J]? Hypertension 2004, 44(3): 248-252.
- [3] 王执兵, 刘俊, 苏又苏, 等. N-乙酰半胱氨酸对心肌梗死心室重构的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2011, 27(6): 430-432.
- [4] Tada M, Ono Y, Nakai M, et al. Evaluation of antioxidative effects of sesamin on the in vivo hepatic reducing abilities by a radiofrequency ESR method [J]. Analytical Sciences 2013, 29(1): 89-94.
- [5] WU Xiangqi, KONG Xiang, ZHOU Yong, et al. Sesamin exerts renoprotective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high-fat-sucrose diet [J]. Eur J Pharmacol 2012, 683(1): 231-237.
- [6] Lijnen PJ, Petrov V, Semplicini A, et al. Angiotensin II-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species [J]. Hypertension 2006, 24(4): 757-766.
- [7] ZOU Yunzeng, Komuro I, Yamazaki T, et al. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts [J]. Circ Res, 1998, 82(3): 337-345.
- [8] Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, et al. Alterations of β-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-β₁ [J]. Am J Physiol 2002, 283: H1253-H1262.
- [9] Schultz J, Witt S, Glascock B, et al. TGF-β₁ mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II [J]. J Clin Invest 2002, 109(6): 787-796.
- [10] Lijnen PJ, Van Pelt JF, Fagard RH. Stimulation of reactive oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts [J]. Cardiovasc Ther 2012, 30(1): e1-e8.