

N-乙酰半胱氨酸对大鼠心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响

郭晓玲[△] 段霄燕 董平剑

(武警成都医院内一科 四川 成都 610041)

摘要 目的:通过观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对大鼠心脏成纤维细胞(CFs)增殖和胶原合成的影响,探讨 NAC 对心脏重构的作用。方法:以培养的新生 SD 大鼠 CFs 为实验对象,给予不同浓度的 NAC 进行干预,48 小时后用 MTT 比色法检测 CFs 增殖水平,用 ³H 脯氨酸掺入法测定总胶原合成。结果:与对照组相比,不同浓度 NAC 作用下的 CFs 增殖水平和 ³H 脯氨酸掺入量均比对照组低,且具有浓度依赖性($p < 0.05$)。结论:NAC 能够抑制 SD 大鼠 CFs 增殖,并降低其胶原合成,因此 NAC 对心脏的病理性重构可能具有保护作用。

关键词: N-乙酰半胱氨酸;心脏重构;心肌纤维化;心脏成纤维细胞

中图分类号: Q95-3, R54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-256-03

Effect of N-acetyl-l-cysteine on proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts

GUO Xiao-ling[△], DUAN Xiao-yan, DONG Ping-jian

(First department of internal medicine of People's Armed Police Corps Hospital of Chengdu, 610041, Chengdu, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of N-acetyl-l-cysteine (NAC) on the proliferation and synthesis of collagen in cultured rat cardiac fibroblasts (CFs) and to explore its potential role in the process of cardiac remodeling. **Methods:** Neonatal Sprague-Dawley rat cardiac fibroblasts were isolated, cultured and treated in vitro with different concentrations of NAC. 48 hours later, the proliferation of CFs was determined by MTT assay and the collagen synthesis was analyzed by ³H-proline incorporation. **Results:** The proliferation level and ³H-proline incorporation of CFs decreased by NAC, which was concentration-dependent ($p < 0.05$). **Conclusion:** NAC can decrease the proliferation and collagen synthesis of neonatal Sprague-Dawley rat cardiac fibroblasts to some extent, which suggested it may play a protective role in cardiac remodeling.

Key words: N-acetyl-l-cysteine; cardiac remodeling; myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-256-03

前言

在多种病理情况下,如心肌梗塞后,心脏会发生以心肌纤维化为特征的重构,而心脏重构则是发生心力衰竭的病理生理基础之一。心脏成纤维细胞(CFs)是心肌纤维化的主要效应细胞,它的增殖和胶原合成是心肌纤维化的重要特征。因此,抑制成纤维细胞增殖和胶原生成对逆转心脏重构具有重要价值^[1]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-l-cysteine, NAC)是一种新型的抗氧化剂,在临床上已经取得了较为广泛的应用。除抗氧化作用外,有研究表明^[2]NAC 能在肺部起到抗纤维化的作用,但是关于 NAC 对心脏纤维化作用的研究却较少,本研究通过研究 NAC 对大鼠心脏成纤维细胞的作用来探讨其在心脏重构过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

作者简介:郭晓玲(1977-),女,主治医师,主要研究方向:高血压心脏病发病机制及治疗

[△]通讯作者:郭晓玲,电话:18908173269,

E-mail: 18908173269@189.cn

(收稿日期:2010-10-06 接受日期:2010-10-30)

出生 1d 的 SD 大鼠,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle's medium)为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料研究所;II 型胶原酶和胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司;NAC、四氮唑蓝(MTT)和二甲亚砜(DMSO)为美国 Sigma 公司产品;³H 脯氨酸放免试剂盒购自中国原子能研究所。

1.3 细胞培养

在无菌条件下取新生 SD 大鼠心脏,剪至约 1mm³ 小块,加入 1g/L II 型胶原酶,37℃ 恒温磁力搅拌器搅拌、辅助分离细胞,5min 收集一次细胞,所得细胞消化液离心 1000r/min × 5min,将沉淀的细胞重悬并过滤。采用差速贴壁法,在 37℃ 恒温 5% CO₂ 孵箱中将细胞培养 60min,弃去上清液,剩下的细胞即为成纤维细胞。加入含 10%胎牛血清的 DMEM 继续培养,3 天换液一次。在倒置显微镜下观察培养的细胞呈梭形,免疫荧光染色见纤维连接蛋白阳性、α 横纹肌肌动蛋白阴性,符合 CFs 染色特征,纯度达 98%以上。生长近融合时按照 1:3 传代,实验采用第 2-4 代细胞。

1.4 MTT 比色法测细胞增殖

将处于对数生长期的 CFs 细胞以 1 × 10⁴ 个 / ml 密度接种于 96 孔板。每孔 100μL。置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,24h

后换无血清 DMEM 培养液,使细胞进入生长静止期。在 37℃ 继续孵育 24h,加入 NAC,使每孔 NAC 终浓度为 0、10、20、40mmol/L,培养至 48h,每孔加入 5mg/ml 的 MTT20 μ l。继续培养 4h 后,吸弃培养液,各孔加 150 μ l 的 DMSO,平板摇床振荡 10min。以只加培养液不加细胞的空白孔调零,用酶联免疫检测仪于波长 490nm 测定吸光值。

1.5 细胞总胶原合成能力的 ^3H 脯氨酸掺入法测定

细胞按上述条件接种在 96 孔板中并培养 24h 至细胞进入生长静止期后,按每孔终浓度为 0、10、20、40mmol/L 加入 NAC,培养至 48h,每孔加入 $1.0 \times 10^3 \text{Bq}$ 的 ^3H 脯氨酸和 50mg/L 的抗坏血酸,继续孵育 4h。用台盼蓝染色法检查活细胞数。胰蛋白酶消化细胞呈细胞悬液后,用多头细胞收集器收集细胞至玻璃纤维滤纸上并烘干。将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中,每管加入闪烁液 0.5ml。用液态闪烁计数器测定放射性强度,所得数据以 cpm/孔表示。

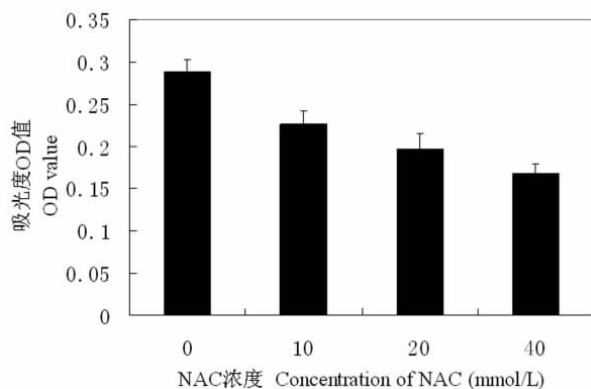


图 1 不同浓度 NAC 对 CFs 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.1 Effects of different concentrations of NAC on proliferation of CFs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

1.6 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析及 LSD-t 检验进行组间的两两比较。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 不同浓度 NAC 对 SD 大鼠 CFs 的 MTT OD 值的影响

细胞实验结果显示,与正常对照组相比,10、20、40mmol/L 的 NAC 对 CFS 细胞的生长均有抑制作用($P < 0.05$),并且不同浓度组间均有差异($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 不同浓度 NAC 对 SD 大鼠 CFs 的 ^3H 脯氨酸掺入量的影响

^3H 脯氨酸掺入法的结果显示,与正常对照组相比,NAC 作用 48h 后,CFs 总胶原的合成明显下降($P < 0.05$),并且随着 NAC 浓度的增大掺入量也随之下降($P < 0.05$) (图 2)。

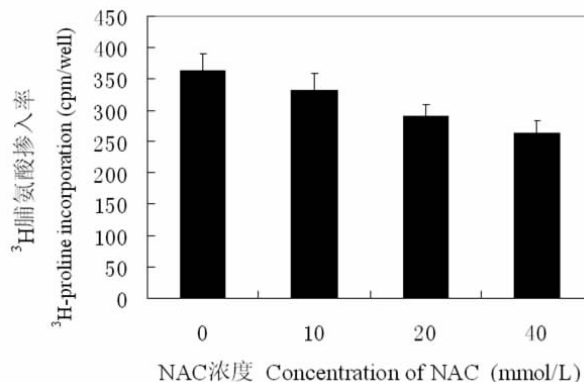


图 2 不同浓度 NAC 对 ^3H 脯氨酸掺入量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Effects of different concentrations of NAC on ^3H -proline incorporation($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

心脏的重构主要包括心肌实质重构和间质重构。实质重构主要是心肌细胞的病理性肥大或变性、坏死等造成的,而间质重构包括成纤维细胞的活化增生、细胞外基质胶原网组成和量的变化。在心肌梗死后,成纤维细胞以及细胞外基质在梗死部位及周边大量增生、浸润,取代了死亡的心肌细胞,使心脏发生纤维化,这个过程是心功能由代偿转向失代偿和心衰的重要步骤。I、III 型胶原蛋白由心肌成纤维细胞分泌,是构成心脏细胞外基质的主要成分。在心肌梗死的病理条件下,I、III 型胶原纤维病理性增生,造成了心肌组织实质与间质的比例失调,心肌细胞作为工作细胞其数量相对下降,在总体上表现为机体心脏功能不全^[9]。

NAC 是 L-半胱氨酸的乙酰化合物,结构中含有活跃的 -SH 基,为临床常用祛痰药,还可于解救对乙酰氨基酚引起的肝毒性反应。除此之外,NAC 作为巯基供给体,是一种较强的抗氧化剂,具有干扰自由基生成、清除已生成的自由基,以及调节细胞的代谢活性等作用。它还可以调节基因的表达和信号转导系统,发挥抗血管生成、抑制恶性肿瘤发展、抑制新生物的生

成和转移作用,在呼吸、神经系统和 AIDS 的临床实践中有广泛应用^[9]。在心血管系统,NAC 也受到了重视,在冠状动脉粥样硬化^[5]、心肌缺血再灌注损伤^[6]以及高血压心脏重构^[7]等情况下能够发挥对机体有益的作用。Bourraindeloup M 等^[7]发现在大鼠高血压模型中血浆 TNF α 浓度与心脏短轴缩短率的降低及心脏谷胱甘肽的缺乏显著相关。而给予 NAC 干预后,未对高血压产生影响,但使血浆 TNF α 浓度达正常水平,增加了短轴缩短率并限制了左室后壁的肥厚,抑制了基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的激活,减少了左室的胶原沉积,提示 NAC 可减缓高血压大鼠心脏重构的进程,有效保护心脏功能。李小波等^[8]综述了相关的文献报道,认为 NAC 可能通过直接影响血压、促进心脏的谷胱甘肽的合成从而抑制炎症因子对心脏的有害影响,或者通过谷胱甘肽直接抑制 NF- κ B 的激活等机制起到预防和逆转高血压心脏重构的效应。但相关的证据较少,对其机制仍需要进一步的研究,尤其是对成纤维细胞的直接作用研究较少。

胡建明等的研究^[9,10]表明,NAC 能够直接影响小鼠和人肺成纤维细胞的增殖和胶原合成,能够降低 cyclin E 表达,使细胞增殖阻滞于 G₁ 期,从而抑制细胞增殖,降低由 TGF- β_1 诱导

的或非经 TGF- β 诱导的胶原合成。本实验结果表明,NAC 对大鼠 CFs 增殖和胶原合成具有类似于在前述实验中提到的对肺成纤维细胞的抑制作用,但是对其具体机制以及 NAC 对病理情况下心脏整体纤维化的影响仍需要深入研究揭示。但是本实验初步的研究结果提示可以考虑使用 NAC 作为心脏病理性重构的潜在治疗手段,但需进一步研究其各方面的综合影响之后,才能为治疗提供更有力的依据。

参考文献(References)

- [1] Palatinus JA, Rhett JM, Gourdie RG. Translational lessons from scarless healing of cutaneous wounds and regenerative repair of the myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3):550-557
- [2] Sugiura H, Ichikawa T, Liu X, et al. N-acetyl-l-cysteine inhibits tgfbeta1-induced profibrotic responses in fibroblasts [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22:487-491
- [3] Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(3):482-490
- [4] 李毅敏,赵树仪. N-乙酰半胱氨酸的研究进展 [J]. *天津药学*, 2003, 15(2):50-53
Li Yi-min, Zhao shu-yi. The Progress of Study on N-acetyl-l-cysteine [J]. *Tianjin Medical Journal*, 2003, 15(2):50-53(In Chinese)
- [5] Shimada K, Murayama T, Yokode M, et al. N-acetylcysteine reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by reducing superoxide production [J]. *Circ J*, 2009, 73(7):1337-1341
- [6] Oliveira DM, Gomes ES, Mussivand T, et al. Effects of n-acetylcysteine on ischemic preconditioning: study in isolated rat hearts [J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2009, 24(1):23-30
- [7] Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, et al. N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats [J]. *Circulation*, 2004, 110:2003-2009
- [8] 李小波,陈绍良. N-乙酰半胱氨酸对高血压心脏重构的影响 [J]. *国际心血管病杂志*, 2006, 33(6):403-406
Li Xiao-bo, Chen shao-liang. The effect of N-acetyl-l-cysteine on cardiac remodeling in hypertension [J]. *Tianjin Medical Journal*, 2003, 15(2):50-53(In Chinese)
- [9] 胡建明,陈晓红,钟南山. 乙酰半胱氨酸对小鼠肺成纤维细胞系 3T3 增殖及胶原合成的影响 [J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29(14):837-840
Hu Jian-ming, Chen Xiao-hong, Zhong Nan-shan. [J]. The effect of N-acetyl-l-cysteine on proliferation and collagen synthesis of mice 3T3 lung fibroblasts. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2009, 29(14):837-840(In Chinese)
- [10] 胡建明,钟南山. 乙酰半胱氨酸抑制人肺成纤维细胞增殖及胶原合成机制的初步探讨 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(12):897-901
Hu Jian-ming, Zhong Nan-shan. A preliminary study on the mechanisms of N-acetylcysteine in the inhibition of proliferation and collagen synthesis of human pulmonary fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2009, 32 (12):897-901 (In Chinese)