

PKC β_2 途径抑制药物 LY333531 延缓高糖诱导心肌纤维化的实验研究

苏 文 苏兆林 陈 晖 李虹伟 王 萍

摘 要 **目的** 观察高糖对心脏成纤维细胞增殖及活化的影响及 PKC β_2 途径抑制剂 LY333531 的干预作用。**方法** 将大鼠心脏成纤维细胞在正常糖或高糖环境下培养,检测两组细胞的增殖数量、胶原蛋白的合成及 PKC β_2 蛋白的表达,并检测使用 LY333531 干预后心脏成纤维细胞增殖及活化指标的变化。**结果** 高糖可使 PKC β_2 蛋白表达增加,并能增加心脏成纤维细胞的增殖及 I 型、III 型胶原蛋白的合成,LY333531 阻断 PKC β_2 途径后可减少成纤维细胞增殖的数量及减少胶原蛋白的合成。**结论** LY333531 作为干预药物抑制 PKC β_2 途径可以在一定程度上延缓高糖诱导的心肌纤维化过程。

关键词 PKC β_2 途径 LY333531 高糖 心肌纤维化

中图分类号 R542.2;R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.006

PKC β_2 Pathway Inhibitor LY333531 Ameliorates High Glucose - induced Myocardial Fibrosis. Su Wen, Su Zhaolin, Chen Hui, et al. Department of Cardiology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective To observe the proliferation and activation of cardiac fibroblasts (CFs) in high glucose condition and explore the effect of PKC β_2 pathway inhibitor LY333531 on this process. **Methods** We cultured the rat CFs in normal glucose or high glucose media for a period of time, and observed the proliferation of CFs, the synthesis of collagen and the expression of PKC β_2 . We incubated CFs with high glucose in combination of LY333531, and assessed the proliferation and activation of CFs. **Results** High glucose increased the expression of PKC β_2 , and stimulated proliferation of CFs and synthesis of type I and type III collagen. LY333531 inhibited high glucose - mediated CFs' proliferation and collagen synthesis. **Conclusion** LY333531 can ameliorate high glucose - induced myocardial fibrosis by inhibiting PKC β_2 pathway.

Key words PKC β_2 pathway; LY333531; High glucose; Cardiac fibrosis

高糖环境中糖基化终末产物合成增多,氧化应激、炎性因子等激活,从而刺激心脏成纤维细胞的增殖及细胞外胶原的合成,引起糖尿病性心肌纤维化,使心脏顺应性和收缩功能下降,发生泵衰竭^[1]。糖尿病心肌纤维化进展的速度和程度决定了糖尿病心脏并发症的预后。而目前临床上使用的 ACEI、ARB、醛固酮拮抗剂等药物对延缓心肌纤维化虽具有一定作用,但其治疗效果有限^[2]。

PKC 是丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶家族的成员,在动物体内分布广泛,但其亚型具有种属及器官分布的特异性,人和大鼠心脏中主要分布的 PKC 亚型为

α 、 β_1 、 β_2 、 ϵ 和 δ ^[3,4]。文献报道,多种信号通路参与了心肌纤维化的过程,在各种原因导致的心肌纤维化中,PKC 途径的激活起到了至关重要的作用,而针对高糖引起的心肌纤维化过程,又以 PKC β_2 途径的作用更为显著^[5]。本实验在细胞水平上观察 PKC β_2 途径抑制剂 LY333531 对高糖诱导大鼠心脏成纤维细胞增殖及活化的影响,为临床上防治糖尿病心肌纤维化提供新的思路。

材料与方法

1. 实验材料:新生 1~3 天 SD 乳鼠,雌雄不限,由维通利华实验动物技术有限公司提供。DMEM 培养基:美国 Hyclone 公司产品,胎牛血清:美国 Gibco 公司产品,二甲基亚砜(DMSO)、MTT:美国 Sigma 公司产品,LY333531:美国 Enzo Life Science 公司产品,抗鼠波形蛋白单克隆一抗、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司,PICP、PⅢNP 定量酶联检测试剂盒:美国 EDL 公司产品。胞质蛋白膜蛋白提取试剂盒:北京普利莱基因技术有限公司。

2. 实验方法:(1)大鼠心脏成纤维细胞的原代、传代培养

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81100169);北京市自然科学基金资助项目(7122053)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院心脏中心(苏文、陈晖、李虹伟、王萍);261505 山东省高密市夏庄中心卫生院药剂科(苏兆林)

通讯作者:王萍,电子信箱:doctor_sue@163.com

及纯度鉴定:取 1~3 天 SD 乳鼠的心脏,将心肌组织剪碎,37℃ 胰酶消化,收集细胞,加入培养液(DMEM + 15% 胎牛血清 + 谷氨酰胺 + 双抗),差速贴壁 60min,获得心脏成纤维细胞。光学显微镜下观察细胞形态,并通过抗波形蛋白免疫组化染色法进行鉴定。传代培养后,2 代细胞能够达到 95% 为心脏成纤维细胞的纯度,以 2 代心脏成纤维细胞作为研究对象。(2)实验分组:正常糖(normal glucose, NG)组:培养液中含 5.6mmol/L D-葡萄糖的 DMEM,高糖(high glucose, HG)组:培养液中含 25mmol/L D-葡萄糖的 DMEM, HG + LY333531 组:培养液中含 25mmol/L D-葡萄糖的 DMEM、200nmol/L LY333531,渗透压对照(osmotic control, OSM)组:培养液中含 5.6mmol/L D-葡萄糖的 DMEM、19.4mmol/L 甘露糖。(3)MTT(噻唑蓝)法检测细胞增殖:二代心脏成纤维细胞以 5000 个/孔接种到 96 孔板上,贴壁后,加入无血清的 DMEM 培养液使细胞静息 24h。按实验分组加入各组培养液,作用 48h,培养结束前 4h 每孔加入 5mg/ml MTT 20 μ l,4h 后每孔加入 DMSO150 μ l 使紫蓝色沉淀溶解,在酶联免疫检测仪上 490nm 波长处测定光吸收值,用只加培养液不加细胞的空白对照孔调零。(4)ELISA 法测定各组 PICP、PⅢ NP 的表达量:采用双抗体夹心-ELISA 法,用抗大鼠 PICP 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的大鼠 PICP 与单抗结合,加入生物素化抗大鼠 PICP 多抗,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的生物素抗体与之结合,加入酶底物 TMB,出现蓝色,加终止液硫酸,颜色变黄,在 450nm 处测 A 值。画出标准曲线。将浓度作为 X 轴(对数轴),A 值作为 Y 轴(线性轴),根据样品 A 值在该曲线图上查出相应大鼠 PICP 含量。PⅢ NP 表达量的检测同 PICP。(5)Western blot 法检测各组 PKC β_2 活性:收集细胞后,按试剂盒说明分离细胞浆与细胞膜蛋白。将待检测蛋白样品上样,浓缩胶恒压 90V,约 20min;分离胶恒压 120V,通过预染蛋白 marker 来确定电泳停止时间。电泳结束后,转移至 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜置平皿,加 5% 脱脂奶粉封闭液,室温缓慢摇动 1h 进行封闭。封闭结束后加入抗 PKC β_2 抗体进行结合,封口,室温缓慢摇动过夜。加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:500)溶液 4ml,封口,置平皿室温缓慢摇动 1~2h。取出 PVDF 膜,ECL 显影,应用激光光密度仪扫描分析蛋白表达量。

3. 数据处理方法:使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,所有计量资料均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高糖对心脏成纤维细胞 PKC β_2 途径蛋白水平的影响:高糖孵育心脏成纤维细胞 48h 后,Western blot 法检测显示细胞胞质中 PKC β_2 表达量明显高于 NG 组(0.483 ± 0.016 vs 0.190 ± 0.017 , $P < 0.05$),同时胞膜上 PKC β_2 表达量亦高于 NG 组($0.453 \pm$

0.015 vs 0.390 ± 0.016 , $P < 0.05$)。而对于细胞 PKC β_2 表达总量来说,HG 组也是明显高于 NG 组(0.940 ± 0.102 vs 0.581 ± 0.017 , $P < 0.05$,图 1)。可见高糖环境可以很大程度上促进心脏成纤维细胞中 PKC β_2 途径的活化。

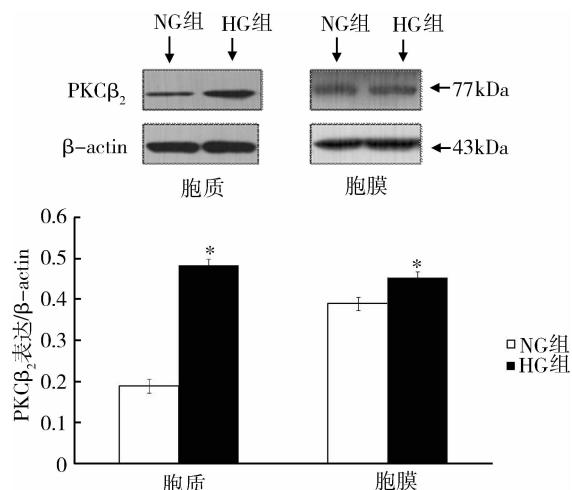


图 1 Western blot 法检测各组细胞胞质及胞膜中 PKC β_2 表达量
与 NG 组相比,* $P < 0.05$

2. 高糖对心脏成纤维细胞增殖的影响及 LY333531 的干预作用:HG 组的细胞吸光度值明显高于 NG 组(0.211 ± 0.020 vs 0.176 ± 0.016 , $P < 0.05$),可见高糖干预可以明显诱导细胞增殖。OSM 组与 NG 组的吸光度值相比则无统计学差异(0.182 ± 0.015 vs 0.176 ± 0.016 , $P > 0.05$),表明高糖对成纤维细胞的促增殖作用与渗透压无关。HG + LY333531 组的吸光度值明显低于 HG 组(0.167 ± 0.028 vs 0.211 ± 0.020 , $P < 0.05$),表明 LY333531 干预可抑制高糖诱导的心脏成纤维细胞增殖(图 2)。

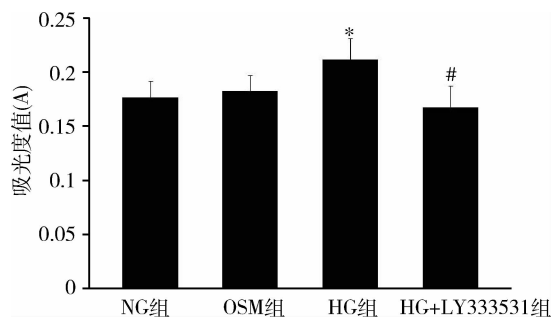


图 2 MTT 法检测各组成纤维细胞的增殖数量
与 NG 组相比,* $P < 0.05$;与 HG 组相比,# $P < 0.05$

3. 高糖对心脏成纤维细胞表达 PICP、PⅢ NP 含

量的影响及 LY333531 的干预作用:如表 1 所示, HG 组心脏成纤维细胞表达 PICP、PⅢNP 含量明显高于 NG 组,意味着高糖能促使心脏 I 型胶原和Ⅲ型胶原的表达。当加入 PKC β_2 途径抑制剂 LY333531 与高糖共同孵育心脏成纤维细胞时, PICP、PⅢNP 表达量较 HG 组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与 NG 组相比, PICP、PⅢNP 表达量仍稍高($P < 0.05$),可见抑制 PKC β_2 途径能很大程度上减少心脏 I 型胶原和Ⅲ型胶原的表达。

表 1 各组心脏成纤维细胞表达 PICP、PⅢNP 量

组别	PICP (ng/ml)	PⅢNP (ng/ml)
NG 组	6.491 ± 0.291	1.366 ± 0.141
HG 组	9.675 ± 0.705 *	3.340 ± 0.135 *
HG + LY333531 组	7.017 ± 0.207 #	1.700 ± 0.198 #

与 NG 组相比, * $P < 0.05$; 与 HG 组相比, # $P < 0.05$

讨 论

PKC 途径是细胞内多条信号通路的中心,参与了很多病生理过程,尤其是 PKC β_2 亚型,与糖尿病并发症密切相关^[6]。在本实验中, HG 组胞质中和胞膜上 PKC β_2 表达量均高于 NG 组,证明高糖环境可以很大程度上促进心脏成纤维细胞 PKC β_2 的表达。Xia 等^[7]发现糖尿病大鼠发生心肌肥厚时心脏内表达增加的主要是 PKC β_2 信号蛋白及结缔组织生长因子,此增加可以被抗氧化剂所拮抗,据此可推测高糖环境通过激活 PKC β_2 途径使氧化应激增加,进而促使心肌纤维化进展。

心肌纤维化体现为心肌细胞外基质含量的多少,由心脏成纤维细胞的增殖和活化决定^[8]。本实验用 MTT 法比较发现, HG 组心脏成纤维细胞的增殖数量明显高于 NG 组。而心脏成纤维细胞的活化则表现为其合成细胞外基质的增多,构成细胞外基质的蛋白质包括胶原蛋白、层粘连蛋白及纤维连接蛋白等,其中占据主要比例的是 I 型胶原和Ⅲ型胶原。而 I 型胶原形成前裂解的羧基末端形成 PICP,Ⅲ型胶原形成前裂解的氨基末端形成 PⅢNP,因此本实验采用 PICP 及 PⅢNP 分别代表 I 型和Ⅲ型胶原的合成量,检测发现高糖确实可以促进成纤维细胞合成胶原蛋白^[9]。LY333531 是目前公认的高选择性 PKC β_2 抑制剂,它在治疗糖尿病视网膜病变方面已经通过了Ⅲ期临床试验,而在治疗心肌纤维化方面的研究较

少^[10]。笔者选用 LY333531 作为干预药物,通过 MTT 法检测细胞增殖及 ELISA 法检测 PICP 及 PⅢNP 的含量,证实使用 LY333531 阻断 PKC β_2 途径可以抑制高糖环境下成纤维细胞的增殖和活化,进而抑制心肌纤维化的过程。

综上所述,本研究初步证实 PKC β_2 途径在高糖诱导心肌纤维化的过程中起到重要作用,而 LY333531 作为干预药物抑制 PKC β_2 途径可以在一定程度上延缓高糖诱导的心肌纤维化过程。

参考文献

- Ban C, Twigg S. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary [J]. Vasc Health Risk Manag, 2008, 4(3): 575-596
- Krum H, Shi H, Pitt B, *et al.* Clinical Benefit of eplerenone in patients with mild symptoms of systolic heart failure already receiving optimal best practice background drug therapy: Analysis of the EMPHASIS-HF Study [J]. Circ Heart Fail, 2013, 6(4): 711-718
- Naruse K, King GL. Protein kinase C and myocardial biology and function [J]. Circulation Research, 2000, 86(11): 1104-1106
- 闫美灵, 李京波. PKC 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(9): 7-9
- Mehta KD. Emerging role of protein kinase C in energy homeostasis: A brief overview [J]. World J Diabetes, 2014, 5(3): 385-392
- Lei S, Li H, Xu J, *et al.* Hyperglycemia-induced protein kinase C beta2 activation induces diastolic cardiac dysfunction in diabetic rats by impairing caveolin-3 expression and Akt/eNOS signaling [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2318-2328
- Xia Z, Kuo KH, Nagareddy PR, *et al.* N-acetylcysteine attenuates PKCbeta2 overexpression and myocardial hypertrophy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(4): 770-782
- Rao AD, Shah RV, Garg R, *et al.* Aldosterone and myocardial extracellular matrix expansion in type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Cardiol, 2013, 112(1): 73-78
- Flevari P, Theodorakis G, Leftheriotis D, *et al.* Serum markers of deranged myocardial collagen turnover: their relation to malignant ventricular arrhythmias in cardioverter-defibrillator recipients with heart failure [J]. Am Heart J, 2012, 164(4): 530-537
- Aiello LP, Vignati L, Sheetz MJ, *et al.* Oral protein kinase c beta inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2 [J]. Retina, 2011, 31(10): 2084-2094

(收稿日期: 2015-03-31)

(修回日期: 2015-04-13)