· 实验研究 ·

Syndecan-1 对大鼠心肌成纤维细胞生物学行为影响*

雷娟,薛声能,欧冰,黄波水,陈颖,伍卫

摘 要:目的 评估 syndecan-1(Sdc1)对大鼠心肌成纤维细胞生物学行为的影响,为心肌梗死(MI)后心室重构的防治提供依据。**方法** 体外分离培养 SD 大鼠乳鼠心肌成纤维细胞,分别转染 Sdc1 siRNA 质粒和 Sdc1 高表达质粒,并设立空白对照组、无关序列和空载质粒作为阴性对照。采用流式细胞术检测细胞增殖,CCK-8 法检测细胞活力,酶联免疫法(ELISA)检测胶原(羟脯氨酸)分泌能力及 Transwell 细胞迁移实验检测细胞迁移能力。**结果** Sdc1 siRNA 组心肌成纤维细胞 S 期比例、增殖指数、细胞活力、胶原(羟脯氨酸)分泌量和迁移细胞数分别为(8.36 ± 0.23)%、(13.2 ± 0.5)%、(1.72 ± 0.12)、(1162.3 ± 60.4) pg/mL 和 170 个/孔,明显高于空白对照和阴性对照组($P < 0.01$);Sdc1 高表达质粒组心肌成纤维细胞 S 期比例、增殖指数、细胞活力、胶原(羟脯氨酸)分泌量和迁移细胞数分别为(6.48 ± 0.22)%、(10.8 ± 0.6)%、(1.30 ± 0.11)、(346.8 ± 52.1) pg/mL 和 50 个/孔,明显低于空白对照和空载质粒组($P < 0.01$)。**结论** Sdc1 能够抑制心肌成纤维细胞的增殖、活力、迁移和分泌能力。

关键词:syndecan-1;细胞增殖;细胞迁移;胶原分泌;生物学行为

中图分类号:R 541.4 **文献标志码**:A **文章编号**:1001-0580(2017)12-1704-04 DOI:10.11847/zgggws2017-33-12-08

Influence of syndecan-1 on biological behaviors of rat myocardial fibroblasts

LEI Juan, XUE Sheng-neng, OU Bing, et al (*Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province* 510120, China)

Abstract: Objective To explore the influence of syndecan-1 (Sdc1) on biological behaviors of myocardial fibroblasts, and to provide an experimental basis for the prevention of ventricular remodeling after myocardial infarction. **Methods** Myocardial fibroblasts of Sprague-Dawley (SD) rats were cultivated *in vitro*. Sdc1 siRNA plasmid and Sdc1 high expression plasmid were transferred into myocardial fibroblasts, respectively. Blank control, unconcerned sequence and empty vector plasmid were used as negative control. Flow cytometry was used to detect cell proliferation. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8) was used to detect cell viability. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect collagen (hydroxyproline) secretion. Transwell method was used to evaluate vertical migration of the cells. **Results** The proportion of S phase cells (8.36% ± 0.23%), proliferation index (13.2% ± 0.5%), cell viability (1.72 ± 0.12), collagen (hydroxyproline) secretion (1162.3 ± 60.4 pg/ml), and the number of migration cells (170 cells/hole) for the myocardial fibroblasts transferred with Sdc1 siRNA plasmid were all higher than those in the myocardial fibroblasts of blank control and negative control group (all $P < 0.01$). The proportion of S phase cells (6.48% ± 0.22%), proliferation index (10.8% ± 0.6%), cell viability (1.30 ± 0.11), collagen (hydroxyproline) secretion (346.8 ± 52.1 pg/ml), and the number of migration cells (50 cells/hole) for the myocardial fibroblasts transferred with high Sdc1 expression plasmid were all lower than those of the myocardial fibroblasts of blank control and empty vector plasmid group ($P < 0.01$ for all). **Conclusion** Sdc1 can inhibit proliferation, activity, collagen secretion and migration capacity of myocardial fibroblasts.

Key words: syndecan-1; cell proliferation; cell migration; collagen secretion; biological behavior

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是冠心病患者严重的心脏事件,其后的心室重构可导致心力衰竭、心跳骤停、恶性室性心律失常甚至心源性猝死,严重威胁人类健康。据世界卫生组织报道,全球每年有 1 600 万人死于心血管疾病,其中 29% 的人死于 MI 及其并发症[1]。多年来人们一直尝试各种治疗方法以期逆转心室重构、改善 MI 预后,但效果却不尽人意。MI 后心室重构的发生、发展是一个涉及多阶段、多因素异常积累的复杂过程。心肌成纤维细胞的异常增殖、迁移和胶原纤维的异常分泌是影响心室重构发生、发展的关键因素,任何能够影响心肌成纤维细胞上述生物学行为的因素均有可能影响心室重构。

Syndecan-1(Sdc1)是一种由硫酸乙酰肝素链和硫酸软骨素链修饰的Ⅰ型跨膜蛋白多糖,主要表达于上皮细胞表面,以共受体方式参与细胞 – 细胞、细胞 – 基质间黏附以及细胞的迁移[2]。近年来有研究发现,Sdc1 与肿瘤细胞的多种生物学行为密切相

* **基金项目**:广东省科技计划项目(2013B021800096)

作者单位:中山大学孙逸仙纪念医院,广东 广州 510120

作者简介:雷娟(1977 –),女,广东乐昌人,副主任医师,医学博士,研究方向:冠心病及其并发症的综合诊治。

数字出版日期:2017 – 5 – 2 16:46

数字出版网址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170502.1646.012.html

关[3],但 Sdc1 是否参与了心肌成纤维细胞生物学行为的调控尚不清楚。研究发现,Sdc1 在 MI 后表达上调[4];Sdc1 过表达能够改善 MI 后心室重构[5],具体机制尚不明确。本研究通过将 Sdc1 小干扰 RNA(siRNA)及 Sdc1 高表达质粒转染体外培养的心肌成纤维细胞,观察改变 Sdc1 表达后心肌成纤维细胞的增殖、活力、胶原分泌和迁移能力等生物学行为变化,旨在明确 Sdc1 在 MI 后心室重构中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 带有目的片段大鼠 Sdc1 cDNA 质粒 pCMV - Sport6.1 - Sdc1(美国 ATCC 公司);Sdc1 高表达质粒由诺赛基因组研究中心有限公司构建。空载质粒 pEGFP - C2(美国 Clontech 公司)。Sdc1 siRNA 干扰序列由广州永诺生物科技有限公司化学合成,上游:5′-AGG AGG AAU UCU AUG CCU GAT T-3′,下游:5′-UCA GGC AUA GAA UUC CUC CUT T-3′;无关序列上游:5′-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3′,下游:5′-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3′。Sdc1 兔多克隆抗体(zymed)、甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3 - phosphate dehydrogenase,GAPDH)兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(美国 Affinity BioReagents 公司);增强型化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司);Bradford 蛋白定量试剂(上海碧云天生物技术研究所),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)(日本同仁化学研究所),Transwell 24 孔板(美国 Corning 公司)。

1.2 心肌成纤维细胞分离培养与基因转染 胰酶消化和差速贴壁法分离 Sprague-Dawley(SD)大鼠乳鼠心肌成纤维细胞[6],37 ℃,5% CO_2 条件下,用含 10% 胎牛血清的细胞培养基(Dulbecco′s modified Eagle medium,DMEM)进行体外培养。细胞融合 90% 时进行传代,按 1.5 ~ 2.0 × 10^5 个/孔密度接种至 6 孔板中,待细胞长至对数生长期 70% 融合后,予以更换含 0.5% 胎牛血清的正糖培养基饥饿 24 h,使细胞进入同步化状态。饥饿后更换含 10% 胎牛血清的培养基,进行分组转染。实验设空白对照组(0.9% NaCl)、NC siRNA 组(转染无关序列)、Sdc1 siRNA 组(转染 Sdc1 siRNA 序列)、空载质粒组(转染空载质粒)、Sdc1 组(转染 Sdc1 高表达质粒),每组 5 孔。

1.3 指标与方法

1.3.1 心肌成纤维细胞中 Sdc1 蛋白表达检测 采用蛋白质印迹法,收集各组细胞,提取总蛋白,Bradford 法行蛋白定量后取 40 μg 蛋白上样,通过 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS - PAGE)分离后,湿法电转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜;5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 Sdc1 兔多克隆抗体(1∶100)、GAPDH 兔多克隆抗体(1∶100),4 ℃过夜;用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)与 Tween - 20 的混合液(PBST)洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1∶2 000)室温孵育 2 h;ECL 发光液发光,胶片显色。扫描胶片,用 BandScan 5.0 软件分析,结果以样品光密度与 GAPDH 光密度比值表示。

1.3.2 细胞增殖能力检测 采用流式细胞术,收集各组细胞培养液至流式专用管,加 1 mL PBS 洗涤细胞 1 次,用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化细胞,1 mL PBS 洗涤剩余细胞 1 次(所有清洗液和细胞消化液均收集入上述专用管中),800 g 离心 6 min,去上清,PBS 清洗 1 次;以 1 mL PBS 重悬细胞,取 300 μL 细胞悬液,将细胞逐滴加入 700 μL 预冷的无水乙醇中,4 ℃避光固定过夜;800 g 离心 10 min,去上清;PBS 清洗 2 次,重悬细胞于 500 μL 含 100 U/mL 的 RNase A 的 PBS 中 37 ℃避光孵育 30 min,加 2 mg/mL 溴化乙锭(PI)至终浓度为 50 μg/mL,避光孵育 30 min。上流式细胞仪以标准程序检测细胞生长周期,并计算 S 期比率和增殖指数。S 期比率 = S/(G0/G1 + S + G2/M);增殖指数 = (S + G2/M)/(G0/G1 + S + G2/M)。

1.3.3 心肌成纤维细胞活力检测 采用 CCK-8 法,按 2.0 ~ 3.0 × 10^3 个/孔密度接种细胞至 96 孔板。在干净的 Eppendorf 管中将 CCK - 8 与培养基按每孔 10 μL∶100 μL 的比例预混合;吸干 96 孔板中需要检测的实验孔,用 PBS 洗涤 1 次;加入预混好的 CCK - 8 和培养基的混合液;37 ℃孵育 0.5 ~ 1 h,待开始显色后于酶标仪下读取 450 nm 处吸光度(*A*)值。

1.3.4 细胞胶原(羟脯氨酸)分泌能力[7-8]检测 采用 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法,收集各组细胞培养上清液,采用双抗体夹心法检测羟脯氨酸表达,严格按说明书操作。将 10 000 pg/mL标准品配制成 0 ~ 5 000 pg/mL 系列浓度的标准液用于制备标准曲线。各待测蛋白样品取 100 μL 加入酶标板,37 ℃覆膜孵育 90 min;弃去孔内液体,用洗涤液洗板 2 次;每孔加入生物素抗体工作液 100 μL,37 ℃覆膜孵育 60 min;弃去孔内液体,反复洗板 3 次,每次浸泡 1 min;每孔加入 A、B、C 3 种工作液各 100 μL,37 ℃反应 30 min;弃去孔内液体,反复洗板 5 次,每次浸泡 1 ~ 2 min;每孔加入已在 37 ℃平衡 30 min 的底物溶液 100 μL,37 ℃避光反应,当标准孔前 3 ~ 4 孔出现明显的梯度蓝色

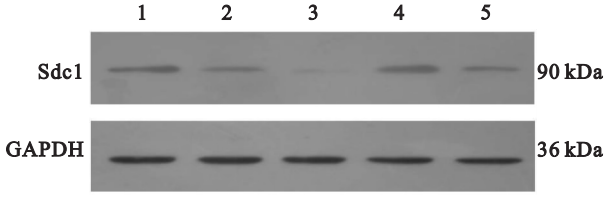
时，每孔加入终止液 100 μL，终止反应（显色时间不超过 30 min），在酶标仪上读取每孔 450 nm 吸光度（*A*）值，在标准曲线上查出相应浓度。

1.3.5　细胞迁移能力检测　采用 Transwell 法，对数生长期细胞常规消化后用含 0.5% 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的目的培养基制成细胞悬液，调整密度为 1.0×10^5 个/mL，取 100 μL 细胞悬液加入 transwell 上室，在下室内加含 10% FBS 的目的培养基 500 μL，继续培养 16 h，取出 transwell 上室，PBS 洗 3 次，并用棉签轻轻拭去微孔膜上层细胞，4% 多聚甲醛固定 30 min，结晶紫染色 15 min，随机选取 4 个视野（×200）在倒置显微镜下计数移至微孔膜下面的细胞数，取其平均值。

1.4　统计分析　计量资料以均数 ± 标准差表示，应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析，多组间均数的比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用最小显著差法；$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　转染 Sdc1 siRNA 和 Sdc1 高表达质粒对细胞 Sdc1 蛋白表达影响（图 1）　蛋白印迹结果显示，与空白对照组和 NC siRNA 组比较，Sdc1 siRNA 组心肌成纤维细胞中 Sdc1 蛋白表达明显下降，其反应条带的校正灰度值分别为空白对照组和 NC siRNA 组的 19.6% 和 25.3%。与空白对照组和空载质粒组比较，Sdc1 组心肌成纤维细胞中 Sdc1 蛋白表达明显上升，其反应条带的校正灰度值分别为空白对照组和空载质粒组的 1.98 倍和 2.33 倍。



注：1：空白对照组；2：NC siRNA 组；3：Sdc1 siRNA 组；4：Sdc1 组；5：空载质粒组。

图 1　转染 Sdc1 siRNA 对心肌成纤维细胞中 Sdc1 蛋白表达影响

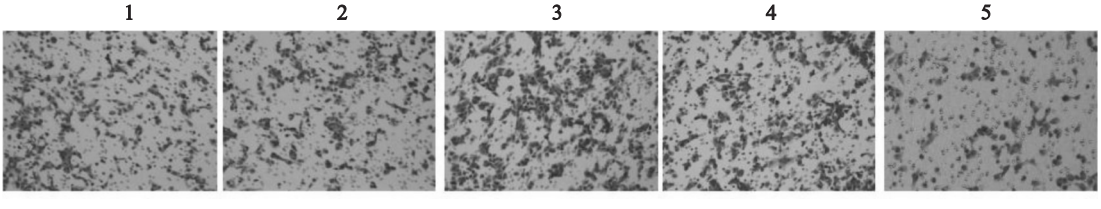
2.2　Sdc1 对心肌成纤维细胞增殖及活力影响（表 1）　与空白对照组和 NC siRNA 组比较，Sdc1 siRNA 组心肌成纤维细胞 S 期比例、增殖指数和细胞活力均明显升高（$P<0.01$）；与空白对照组和空载质粒组比较，Sdc1 组心肌成纤维细胞 S 期比例减少，增殖指数和细胞活力减低（$P<0.01$）。与空白对照组比较，空载质粒组细胞 S 期比例、增殖指数和细胞活力差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表 1　Sdc1 对心肌成纤维细胞增殖及活力影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组别	S 期比例（%）	增殖指数（%）	细胞活力（OD）值
空白对照组	7.54 ± 0.22	11.9 ± 0.5	1.58 ± 0.12
NC siRNA 组	7.48 ± 0.22	11.7 ± 0.5	1.54 ± 0.13
Sdc1 siRNA 组	8.36 ± 0.23^{ab}	13.2 ± 0.5^{ab}	1.72 ± 0.12^{ab}
空载质粒组	7.72 ± 0.24	12.1 ± 0.5	1.60 ± 0.13
Sdc1 组	6.48 ± 0.22^{acd}	10.8 ± 0.6^{acd}	1.30 ± 0.11^{acd}

注：与空白对照组比较，a $P<0.01$；与 NC siRNA 组比较，b $P<0.01$；与空载质粒组比较，c $P<0.01$；与 Sdc1 siRNA 组比较，d $P<0.01$。

2.3　Sdc1 对细胞迁移影响（图 2）　Transwell 细胞迁移实验结果显示，空白对照组、NC siRNA 组、Sdc1 siRNA 组、空载质粒组、Sdc1 组心肌成纤维细胞迁移能力分别为（110 ± 18）、（100 ± 20）、（170 ± 26）、（120 ± 20）、（50 ± 10）个/孔；与空白对照组和 NC siRNA 组比较，Sdc1 siRNA 组心肌成纤维细胞的迁移能力明显增强（$P<0.01$）；与空白对照组和空载质粒组比较，Sdc1 组心肌成纤维细胞迁移能力明显减弱（$P<0.01$）。



注：1：空白对照组；2：NC siRNA 组；3：Sdc1 siRNA 组；4：空载质粒组；5：Sdc1 组。

图 2　Sdc1 对心肌成纤维细胞迁移能力影响（结晶紫染色，×200）

2.4　Sdc1 对心肌成纤维细胞胶原分泌能力影响　空白对照组、NC siRNA 组、Sdc1 siRNA 组、空载质粒组、Sdc1 组心肌成纤维细胞胶原（羟脯氨酸）分泌量分别为（802.3 ± 51.9）、（786.6 ± 55.9）、（1 162.3 ± 60.4）、（821.1 ± 56.2）、（346.8 ± 52.1）pg/mL；与空白对照组和 NC siRNA 组比较，Sdc1 siRNA 组心肌成纤维细胞胶原分泌能力明显升高（$P<0.01$）；NC siRNA 组与空白对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；与空白对照组和空载质粒组比较，Sdc1 组心肌成纤维细胞胶原分泌能力下降（$P<0.01$）；空载质粒组与空白对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨 论

MI 后心室重构包括心肌细胞的重构和心肌间质的重构。心肌细胞的重构指的是心肌细胞的坏死、凋亡、溶解、吸收和增生不良性肥大等。心肌间质的重构则主要表现为胶原的沉积和纤维化。近年来,MI 后心肌间质的重构受到学者们的广泛重视,被认为是导致 MI 后心室重构并进展为心力衰竭和心律失常的一个重要原因[9]。研究显示,国内每年有 350 万人死于心血管疾病,其中死于 MI 及其并发症的人数超过 100 万[10]。心血管疾病已经成为 21 世纪最大的公共卫生问题之一[11]。

心肌间质的体积虽然仅占心肌组织的 2.5%,但其所含的细胞数却是心肌细胞的 2 倍,是构成心肌细胞支架、维持心脏几何构型和协调心腔舒张充盈的基础。心肌成纤维细胞是心肌间质内的数量优势细胞,其主要的生物学行为有增殖、迁移和分泌胶原等。心肌成纤维细胞参与了 MI 后心室重构的全过程,是 MI 后心室重构的主要效应细胞。任何能够影响心肌成纤维细胞生物学行为的因素最终均将影响心室重构。

Sdc1 是体内上皮细胞表达的一种硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,可结合一系列配体如黏附分子、胞外基质成分、生长因子、细胞因子等,以共受体方式参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的相互作用,调节细胞黏附、组织分化、血管形成等诸多生理病理过程[12]。研究发现,Sdc1 在 MI 后表达上调,在体转染携带 Sdc1 的重组腺病毒使 Sdc1 过表达,能够抑制胶原蛋白的过度分泌,优化Ⅰ型和Ⅲ型胶原的比例,改善 MI 后心室重构[5]。本研究将 Sdc1 siRNA 及高表达 Sdc1 的质粒转染体外培养的大鼠心肌成纤维细胞,结果显示,体外沉默 Sdc1 表达后心肌成纤维细胞的增殖、活力、迁移和胶原(羟脯氨酸)分泌能力均明显升高;上调 Sdc1 表达后心肌成纤维细胞的增殖、活力、迁移和胶原(羟脯氨酸)分泌能力明显降低。提示,Sdc1 参与了心肌成纤维细胞生物学行为的调控,高水平的 Sdc1 能够抑制心肌成纤维细胞的增殖、活力和迁移能力,减少胶原蛋白的过度分泌;调控心肌成纤维细胞的生物学行为很可能是 Sdc1 改善 MI 后心室重构的机制之一。

参考文献

[1] Celermajer DS, Chow CK, Marijon E, et al. Cardiovascular disease in the developing world: prevalences, patterns, and the potential of early disease detection[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(14): 1207 - 1216.

[2] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block[J]. Circ Res, 2005, 96(5): 488 - 500.

[3] Couchman JR, Gopal S, Lim HC, et al. Syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour[J]. Int J Exp Pathol, 2015, 96(1): 1 - 10.

[4] Lei J, Xue SN, Wu W, et al. Increased level of soluble syndecan-1 in serum correlates with myocardial expression in a rat model of myocardial infarction[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 359(1): 177 - 182.

[5] Lei J, Xue SN, Wu W, et al. Sdc1 overexpression inhibits the p38 MAPK pathway and lessens fibrotic ventricular remodeling in MI rats[J]. Inflammation, 2013, 36(3): 603 - 615.

[6] McManus MC, Boland ED, Simpson DG, et al. Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model[J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 81(2): 299 - 309.

[7] Bradshaw AD, Baicu CF, Rentz TJ, et al. Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing[J]. Circulation, 2009, 119(2): 269 - 280.

[8] 解辉,潘晓黎,吴伟. 糖尿病心肌病心肌细胞纤维化的病理改变[J]. 中华老年心脑血管疾病杂志, 2008, 10(5): 374 - 376.

[9] Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 482 - 490.

[10] Hua Wei, Zhang LF, Wu YF, et al. Incidence of sudden cardiac death in China: analysis of 4 regional populations[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(12): 1110 - 1118.

[11] 刘奕婷,王巍,时景璞. PCI 术后急性心肌梗死患者再发影响因素分析[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(4): 558 - 562.

[12] Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology[J]. Nature, 2007, 446(7139): 1030 - 1037.

收稿日期: 2017-01-23 (解学魁编校)