

血管紧张素 诱导心肌细胞肥大后缝隙连接 蛋白 Cx43 表达的变化

杨 军¹, 伍 卫¹, 梁蔚文², 王景峰¹, 潘秋辉², 方 昶¹, 黄至斌¹
(中山大学附属第二医院 1.心内科, 2.医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】研究血管紧张素 诱导心肌细胞肥大后连接蛋白 43 (Cx43) 表达的变化及与细胞周期分布的关系。【方法】分离培养大鼠心肌细胞,用血管紧张素 诱导心肌肥大,72h 后用 RT-PCR 和免疫荧光方法观察心肌细胞 Cx43 基因和蛋白表达, 用流式细胞仪测定法观察心肌细胞周期分布变化以及 Cx43 表达量的关系。【结果】血管紧张素 处理后的心肌细胞表现细胞肥大且细胞活力增强, S 期、G₂-M 期细胞百分比增加, 细胞内 G₂-M(二倍体) DNA 含量降低, Cx43 蛋白表达低于对照组, Cx43 mRNA 表达水平也较对照组明显下调, Cx43 蛋白表达下调与细胞周期分布的改变相关。【结论】血管紧张素 诱导心肌细胞肥大后 Cx43 基因表达明显下调, 导致 Cx43 蛋白表达亦出现下调, 这一改变可能与心肌肥大过程中的细胞周期变化有关, 提示血管紧张素 可能通过调控 Cx43 基因的表达而参与缝隙连接重构过程, 而 Cx43 表达的变化可能与心肌肥大的机制有关。

关键词: 血管紧张素 ; 心肌细胞肥大; 连接蛋白 43; 缝隙连接; 细胞周期

中图分类号: R512.36; Q784

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)03- 0292- 05

Correlation of Expression of Connexin 43 and Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Angiotensin

YANG Jun¹, WU Wei¹, LIANG Wei-wen², WANG Jing-feng¹, PANG Qiu-hui², FANG Chang¹, HUANG Zhi-bin¹
(1. Department of Cardiology, 2. Lin Bai-xin Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study the effects of angiotensin , as a mediator of cardiac hypertrophy, on expression of connexin 43 (Cx43) in cultured neonatal rat ventricular myocytes and correlation of expression of Cx43 and cardiomyocyte hypertrophy. 【Methods】 Cardiomyocytes were isolated from newborn Wistar rats. Angiotensin was added into the media to induce myocyte hypertrophy. Cultures were exposed to 10⁻⁶ mol/L angiotensin for 72 h, Cx43 expression was characterized by RT-PCR and immunofluorescence methods. 【Results】 Immunofluorescence analysis revealed decreased Cx43 immunoreactivity in cells treated for 72 h with angiotensin . RT-PCR analysis demonstrated there was an obvious decrease of Cx43 mRNA level in the cells exposed to angiotensin for 72 h. The changes of expression of connexin 43 were related to its entrance into S phase of the cell cycle. 【Conclusion】 Angiotensin down-regulates gap junctions in cultured neonatal rat ventricular myocytes by decreasing Cx43 synthesis. Signal transduction pathways activated by angiotensin under pathophysiologic conditions of cardiac hypertrophy could initiate remodeling of gap junctions.

Key words: angiotensin ; cardiomyocyte hypertrophy; connexin 43; gap junction; cell cycle

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):292- 296]

心肌肥大是多种心血管疾病过程中的一个共同的病理过程, 尽管心肌肥大曾被认为是心脏的

一种适应性代偿反应, 但目前已认识到心肌肥大 (myocardial hypertrophy) 是心血管疾病中的一种独

收稿日期: 2007-01-08

基金项目: 广东省教育厅千百十工程项目资助 (A002002009)

作者简介: 杨 军(1972-), 男, 主治医师, 医学博士生, 主要从事冠心病和电生理研究, E-mail: yangjunincn@163.com; 伍卫, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: wu.wei@medmail.com.cn

立危险因素,心肌肥大本身即明显增加心血管病死亡率,而其内在机制认为与心肌肥大所致的电生理重构有关。目前发现细胞间缝隙连接的变化在心肌电生理重构起着重要作用。缝隙连接蛋白43(connexin 43, Cx43)是心肌细胞间隙连接的主要蛋白成分,该连接构成相邻细胞间亲水管道,对于细胞间信息传导,细胞的生长、分化及维持心肌节律性同步收缩有重要意义^[1]。有学者发现心肌肥大后的心肌Cx43表达下降^[2-4],但也有学者报道实验性高血压引起心肌肥大时其心肌Cx43表达无改变^[5]或Cx43表达增加^[6];而对于心肌肥大过程中Cx43改变的机制以及血管紧张素对缝隙连接蛋白重构的影响至今还鲜见报道,我们通过本实验观察了血管紧张素对心肌Cx43基因和蛋白表达及细胞周期影响,探讨心肌肥大过程中Cx43的变化及血管紧张素对缝隙连接蛋白重构的可能作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM-F12培养基(Gibco);胎牛血清(BCS,四季青公司);血管紧张素(Sigma);5-溴脱氧嘧啶核苷(Sigma);胰蛋白酶(Difco);兔抗大鼠Cx43多抗(博士德公司);FITC-羊抗兔IgG(博士德公司);缙沙坦原药(北京诺华制药有限公司);RNA逆转录试剂盒(TOYOBO公司);Trizol RNA提取液(MRC公司);PCR引物(北京赛百特公司合成);PCR主要试剂购自TAKARA公司;其它常用生化试剂均为国产分析纯。流式细胞检测仪(Epics Altra型,美国Beckman Counter公司)。

1.2 心肌细胞培养及分组

每次取1~3 d龄的Wistar大鼠20只,按改良的simspon法进行心肌细胞培养。主要过程为:将大鼠心室肌用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,离心弃上清后,加入含20%胎牛血清的DMEM-F12培养液重新悬浮细胞。将细胞悬液转移至75 cm²培养瓶中,置于5% CO₂培养箱内37 差速贴壁90 min,再取未贴壁细胞均匀地接种96孔及6孔培养板上继续培养。仅在培养第一天中加0.1 mmol/L的5-溴脱氧嘧啶核苷抑制非心肌细胞生长,24 h后换无5-溴脱氧嘧啶核苷的培养基^[8]。约3 d后,心肌细胞成簇生长并出现搏动。1周左右,细胞密集

紧密接触,达到同步收缩,此时培养心肌细胞可用于实验。实验分为两组:血管紧张素组:每天所换培养液中加入血管紧张素(以无血清培养液溶解)使终浓度为1.0×10⁻⁶ mol/L,正常对照组(control):培养液中加入等量无血清培养液。处理72 h后在显微镜下观察细胞形态,细胞计数,同时分别取两组细胞作MTT、细胞周期检测、免疫荧光和RT-PCR检测。

1.3 四氮甲唑蓝(MTT)法测定对心肌细胞增殖的影响

采用MTT法检测细胞的增殖活性。取原代培养心肌细胞接种于96孔平底细胞培养板上,每组10个孔,培养24 h,然后换含10 mL/L血清的培养液,24 h后,实验组换用添加含浓度为1.0×10⁻⁶ mol/L血管紧张素的无血清的培养液200 μL,对照组换含相同浓度DMSO的无血清的培养液200 μL,72 h后,加入MTT(5 μg/L)20 μL/孔继续培养4 h。加入二甲基亚砷原液200 μL/孔,酶联免疫检测仪下选择波长490 nm测定酶联免疫吸附A值。

1.4 流式细胞仪测定细胞周期

取血管紧张素(终浓度1.0×10⁻⁶ mol/L)处理72 h后的细胞及对照细胞制成单细胞悬液,以750 mL/L酒精固定细胞后,加入200 μL PI(0.1×10⁻³ mg/L),4 染色1 h后上机检测。流式细胞检测仪检测。经数据获取软件分析,重复4次。

1.5 免疫荧光检测Cx43表达

细胞以1.0×10⁵/mL的密度接种于置小盖玻片的24孔培养板,取血管紧张素处理72 h后,取出盖玻片,PBS冲洗,950 mL/L乙醇固定,1% TritonX-100室温孵育20 min。滴加一抗Cx43,4 过夜后滴加Cy3-羊抗兔IgG(1 100),荧光显微镜下观察并进行照相分析。

1.6 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

参照Genebank资料设计并合成引物^[9]。引物序列为:Cx43, F: 5'-TTGTTTCTGTCCACCAGTAAC-3', R: 5'-GATGAGGAAGGAAGAGA-AGC-3',扩增序列长度为588bp; -actin, F: 5'-CACGGCATTGTAACCAACTG-3',5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3',扩增长度为400 bp。取处理72 h后的细胞按TRIZOL试剂盒所示方法提取总RNA,取6 μL RNA逆转录成cDNA。PCR反应条件:94 变性2 min后,94 30 s,55 30 s,72 45 s顺序

循环 35 次,最后 72 延伸 5 min。电泳及图像扫描及定量分析。测目的基因与 β -actin 的 RT-PCR 产物电泳带的 OD 值比。

1.7 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 11.0 及 Excel 统计软件分析,两组间比较用独立样本 t 检验或配对 t 检验,变量间的相关分析采用双变量相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下心肌细胞观察结果

镜下观察可见在加用血管紧张素刺激后,心肌细胞较正常对照组表现明显肥大。细胞计数显示正常对照组和血管紧张素组分别为 5.66 ± 0.57 和 $5.88 \pm 0.86 (10^5/mL)$ 。血管紧张素组细胞计数表现出增加趋势,但两组间差别没有统计学意义 ($n=4, P > 0.05$)。

2.2 血管紧张素对细胞增殖的影响

结果显示,正常对照组 A 值为 0.190 ± 0.016 ,血管紧张素组 A 值为 0.214 ± 0.024 ,提示血管紧张素可增强心肌细胞活力($n=4, P < 0.01$)。

2.3 血管紧张素对细胞周期的影响

血管紧张素组中 S 期、G₂-M 期细胞百分比增加($n=4, P < 0.05$), G₀-G₁ 期细胞百分比与正常对照组相比有减少趋势,但无统计学差异($n=4, P > 0.05$)。血管紧张素刺激心肌细胞 72 h,细胞内 G₂-M (二倍体)DNA 含量低于对照组 ($P < 0.05$), G₀-G₁ (单倍体)DNA 含量与对照组比较未显示出统计学差异($n=4, P > 0.05$)。结果提示培养心肌细胞在血管紧张素作用下出现心肌肥大(表 1)。

表 1 两组心肌细胞细胞周期分布和 DNA 含量的比较

Table 1 The ratio of cell cycle phase and DNA content ($\bar{x} \pm s$)

	The ratio of cell cycle phase (%)			DNA content	
	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	G ₀ -G ₁	G ₂ -M
Control group	0.95 \pm 0.03	0.02 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	102 \pm 3	198 \pm 26
Angiotensin group	0.94 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02	0.034 \pm 0.01	95 \pm 6	183 \pm 29
t	1.93	-4.15	6.72	2.05	3.17
P	0.096	0.027	0.011	0.088	0.043

2.4 血管紧张素对 Cx43 蛋白表达的影响

在培养心肌细胞 Cx43 呈明显阳性反应,较强

红色荧光表达在细胞膜及胞浆中(图 1)。血管紧张素组其反应明显弱于对照组(图 2),单位面积荧光计数结果(荧光阳性细胞数/mm²)正常对照组和血管紧张素组分别为 67.15 ± 11.87 和 41.88 ± 4.87 ,显示两者差异有显著性($n=4, P < 0.05$)。

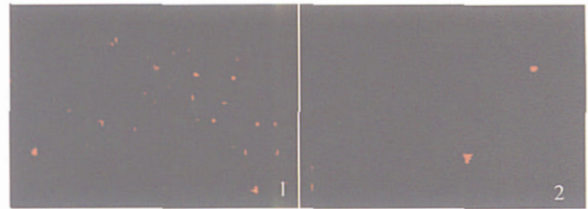


图 1 对照组心肌细胞 Cx43 的表达

图 2 血管紧张素组心肌细胞 Cx43 的表达

Fig.1 Positive expression of connexin 43 in cultured neonatal rat ventricular myocytes ($\times 600$)

Fig.2 Positive expression of connexin 43 in cultured neonatal rat ventricular myocytes treated for 72 h with angiotensin ($\times 600$)

2.5 血管紧张素对 Cx43mRNA 表达的影响

血管紧张素组和对照组 Cx43 及 β -actin 的 mRNA 表达水平电泳分析见图 3,各基因的 RT-PCR 产物电泳带的位置与理论值相符,两组 OD 值比分别为 0.671 ± 0.123 和 0.414 ± 0.116 。对照组和处理组 β -actin 的 mRNA 表达水平相似,而与正常对照组相比,Ang 可显著减少 Cx43mRNA 的表达($n=4, P < 0.01$)。

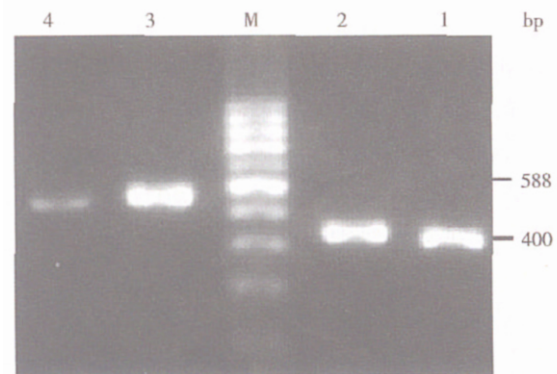


图 3 心肌细胞 Cx43 和 β -actin mRNA 的表达

Fig. 3 Impact of Angiotensin on expression of Cx43 mRNA in cultured neonatal rat ventricular myocytes

as compared with control group (3) the expression of Cx43 decreased significantly in Angiotensin group (4), 1 and 2 respectively display expression of β -actin in control group and Angiotensin group

2.6 Cx43 表达与细胞周期特征变化的相关性

对血管紧张素处理后心肌细胞 Cx43 表达与细胞周期分布变化进行双变量相关性分析后发现:血管紧张素处理后 Cx43 蛋白表达的变化,即免疫荧光检测中单位面积荧光阳性细胞计数,与 Cx43 mRNA 表达水平的变化相关($r=0.995$, $P < 0.01$),而前者与 S 期细胞百分比变化呈负相关($r=-0.912$, $P < 0.05$),与细胞内 G_2 -M(二倍体)DNA 含量呈正相关($r=0.896$, $P < 0.05$);但与 G_2 -M 期细胞百分比, G_0 - G_1 (单倍体)DNA 含量的变化以及 MTT 测得的吸附 A 值变化未表现出明显相关关系($P > 0.05$)。结果提示: Cx43 表达的变化与心肌细胞的细胞周期改变可能相关。

3 讨论

心肌肥大作为心血管疾病中的一种独立危险因素明显增加心血管病死亡率,其机制与心肌肥大所致的电生理重构有关。心肌电生理重构包括细胞膜离子通道的变化和/或细胞间缝隙连接的变化,在某些情况下后者显得更为重要。细胞缝隙连接(Gap Junction,GJ)是心肌细胞间唯一具有电连接作用的细胞间连接形式,相邻细胞间通过 GJ 进行着信息和能量物质的交换,并对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程也起着重要的调控作用^[1]。在连接蛋白这个多基因大家族中,其中 Cx43 是心肌最主要的连接蛋白,尤其是心室肌细胞间电流的主要导体。

本实验通过有效致心肌细胞肥大剂量的血管紧张素处理后培养心肌细胞 72 h 后,心肌细胞出现明显肥大,同时更多细胞进入 S 期,心肌细胞的细胞周期分布特征也提示心肌细胞在经血管紧张素处理后处于肥大状态。而在免疫荧光检测中可观察到肥大心肌细胞的 Cx43 蛋白的表达出现下调。这一结果与国内外多数学者从在体实验中观察到的结果一致^[2-4,7]。而作为缝隙连接的主要结构蛋白,心肌 Cx43 表达下调可导致心肌兴奋性、传导性改变,故更易发生心律失常,这也可能是心肌肥大为何成为心血管疾病的一种独立危险因素的重要原因。实验中同样也看到血管紧张素处理后的心肌细胞的 Cx43mRNA 表达水平也出现明显下调,提示 Cx43 蛋白表达下调与基因水平的调控有关,血管紧张素可能通过基因水平的

调控参与了肥大心肌的缝隙连接蛋白的重构过程。

本实验中发现血管紧张素诱导心肌细胞肥大后 Cx43 基因和蛋白表达出现明显下调,而在心肌肥大过程中 Cx43 的变化可能并非如此简单。如有学者就发现慢性压力超负荷引起的肥大心肌左心室 Cx43 在每个心肌表达及分布形式与正常无显著差别^[2,7]。而 Dodge^[9]用 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的血管紧张素作用于培养乳鼠心室肌 6 h 和 24 h 后,发现 Cx43 蛋白的表达增加。Formigli 等^[9]证实增加猪心脏的容量负荷可以引起 Cx43 增加,并伴有心室肥厚。Peters 等在对 5 例主动脉瓣狭窄所致左室肥厚的左室心肌活检标本的研究中,发现无缺血的肥大心肌细胞每单位体积的缝隙连接中 Cx43 含量减少 40%^[2]。同时国内也有学者用去甲肾上腺素或苯肾上腺素诱导心肌肥大,作用 48 h 后发现培养大鼠心肌细胞中 Cx43 蛋白表达减少,推测可能与心肌细胞进入 S 期有关^[11]。因此,在心肌肥大过程中 Cx43 的变化可能是十分复杂的,其演变规律目前并不是十分明确^[12],目前国内外学者对心肌肥大时 Cx43 变化观察的结果并不尽相同,其原因可能与观察的动物模型和动物种属不同有关,而心肌细胞 Cx43 表达本身的变化也很有可能具有与心肌肥大进程相关的时相特征,正如有学者通过对心室机械负荷增加引起心肌肥大和心力衰竭的模型分析所发现的;在早期阶段, Cx43 表达上调;而在心力衰竭晚期阶段,则心肌传导速度及 Cx43 表达下调^[13]。

与此同时,虽已有学者证实: Cx43 参与细胞生长的调节,并与横纹肌肉瘤分化以及平滑肌细胞的表型改变有关^[10,14],而在心肌肥大过程中的作用目前仍不确定。实验中我们不仅发现血管紧张素

诱导心肌细胞肥大后 Cx43 基因和蛋白的表达均出现明显下调,而且我们还发现 Cx43 蛋白表达的变化与细胞周期分布变化相关:提示血管紧张素诱导心肌细胞肥大后 Cx43 蛋白表达的变化可能是心肌肥大过程中的一个重要特征,心肌细胞肥大后出现以 Cx43 表达水平下调为主要特征的缝隙连接蛋白重构,而这种重构已发现与心律失常的发生机制密切相关。但 Cx43 变化在心肌肥大和心肌重塑中的时相特征和具体意义,以及与胞内信号转导的关系,仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] CRUCIANI V, MIKALSEN S O. Connexins, gap junction intercellular communication and kinases [J]. *Biol Cell*, 2002, 94(7-8): 433-443.
- [2] ITOH M, TAKEISHI Y, NAKADA, et al. Long-term treatment with angiotensin type 1 receptor antagonist, CV-11974, restores beta-catenin mRNA expression in volume-overloaded rabbit hearts [J]. *Heart Vessels*, 2002, 17(1): 36-41.
- [3] EMDAD L, UZZAMAN M, TAKAGISHI Y, et al. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin type 1 receptor blockade [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(2): 219-231.
- [4] UZZAMAN M, HONJO H, TAKAGISHI Y, et al. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2000, 86(8): 871-878.
- [5] 闫纯英,林吉进,李玉光,等. 心肌肥大时间隙连接分布的改变及其对传导特性的影响 [J]. *中国分子心脏病杂志*, 2003,2(3):7-10.
- [6] GUO R, LIU L, BARAJAS L. RT-PCR study of the distribution of connexin 43 mRNA in the glomerulus and renal tubular segments [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275: R439-R447.
- [7] KOSTIN S, DAMMER S, HEIN S, et al. Connexin43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2):426-436.
- [8] DODGE S M, BEARDSLEE M A, DARROW B J, et al. Effects of angiotensin on expression of the gap junction channel protein Connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(4): 800-807.
- [9] FORMIGLI L, IBBA-MANNESCHI L, PERNA A M, et al. Altered connexin 43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading [J]. *Histol Histopathol*, 2003, 18(2):359-369.
- [10] 林仲翔,张志谦,韩亚玲,等. 连接蛋白基因表达与横纹肌肉瘤分化关系研究 [J]. *中国科学(B辑)*, 1994,6(24): 623-628.
- [11] 张 骅,楼定安,单芷茵,等. 连接蛋白 43 在培养心肌肥大时的表达及其意义 [J]. *中华病理学杂志*, 1998, 27, (6),436-438.
- [12] SAFFITZ J E, KLEBER A G. Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart [J]. *Circ Res*, 2004, 94(5): 585-591.
- [13] ZHUANG J, YAMADA K A, SAFFITZ J E, et al. Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes [J]. *Circ Res*, 2000, 87(4): 316-322.
- [14] RAMA A, MATSUSHITA T, CHAROLIDI N, et al. Up-regulation of connexin43 correlates with increased synthetic activity and enhanced contractile differentiation in TGF-beta-treated human aortic smooth muscle cells [J]. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(5): 375-386.

(编辑 孙慧兰)

2007年中法暨中欧时间医学国际会议第一轮通知

近年随着生物钟理论的确立,以生物节律指导临床诊断、治疗的时间医学迅速发展,成为一门多学科交叉的备受关注的前沿学科。时间生物学不但推动了生物学、医学数学、药理学及药学的发展,而且涉及到临床诸学科如中医学、内科学、外科学、神经精神病学、护理学、航天医学、运动医学及军事医学等多学科,也对从事基础研究及临床医疗的人员提出了新的思路和挑战。鉴此,中山大学、法国国立卫生和健康研究院将共同主办《2007年中法暨中欧时间医学国际会议》。会议期间将安排中国、法国及欧洲著名的时间医学专家作相关的学术报告,并进行论文交流。

会议时间:2007年9月6日-8日;会议地点:广州;主办单位:中山大学、法国国立卫生和健康研究院;承办单位:中山大学肿瘤防治中心;协办单位:法国驻广州总领事馆。信函报名:请填写好会议报名表(回执),于2007年5月31日前寄至广州东风东路651号中山大学肿瘤防治中心实验研究部孙健(邮编510060),联系电话:020-87343187,传真:020-87343170。E-mail报名:传报名表到 chronomedicine2007@yahoo.com.cn。会议注册费:报到时现金支付。国内:代表800元,学生400元;国外:代表300欧元,学生150欧元。论文提交方式:采用Word文档,发送E-mail至 chronomedicine2007@yahoo.com.cn。截稿日期:2007年5月31日。论文经审稿录用可参加大会交流。与会者授予国家级继续教育学分。欢迎未投稿者参加。

(会议筹委会)