

异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚中核仁素的表达

严思敏¹, 吴 双¹, 蒋碧梅², 涂自智², 王慷慨², 肖献忠²

(1. 中南大学湘雅医学院临床医学专业 2008 级, 湖南长沙 410078;

2. 中南大学基础医学院病理生理学系)

摘要: **目的** 探讨异丙肾上腺素(ISO)所致小鼠心肌肥厚(hypertrophy)中核仁素的表达情况。 **方法** 采用体重 18~22 g 小鼠, 随机分为 3 组($n=10$): 生理盐水组、小剂量异丙肾上腺素组(ISO 每天 100 mg/kg)、大剂量异丙肾上腺素组(ISO 每天 150 mg/kg), 连续注药 1 周后, 称体重(BW), 从心脏取血测定 MDA、LDH 和 CK 含量, 取全心称重(HW); 光镜下观察心肌病理形态学改变; 免疫组织化学法及 Western-blot 检测核仁素的表达情况。

结果 (1) 小剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌纤维增粗, 心肌细胞呈束状分布, 排列较整齐, 而大剂量异丙肾上腺素组心肌纤维增粗, 排列紊乱, 纤维组织增生, 染色不均匀。与生理盐水组相比, 小剂量异丙肾上腺素组、大剂量异丙肾上腺素组小鼠心脏重量参数 HW/BW 显著增加($P<0.05$); (2) 与生理盐水组相比, 大、小剂量异丙肾上腺素组小鼠血清 MDA、LDH、CK 含量升高($P<0.05$); (3) 与生理盐水组相比, 小剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌核仁素蛋白表达上调($P<0.05$), 而大剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌核仁素的表达无明显改变。 **结论** 小剂量异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚中核仁素的表达上调, 而大剂量异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚中核仁素的表达改变不明显。

关键词: 核仁素; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚; 心脏

中图分类号: R542.2 文献标识码: A

Expression of Nucleolin in Myocardial Hypertrophy Mice Induced by Isoproterenol

YAN Simin, WU Shuang, JIANG Bimei, et al

(Clinical Medical Profession 2008 Grade, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: **Objective** Nucleolin (C23) is an important RNA-binding protein which has an effect on the proliferation and growth of cells. Recent study reveals that nucleolin can protect myocardial from ischemia-reperfusion injury. However, whether nucleolin plays a role in the cardiac myocyte hypertrophy remains unclear. We set out to detect the nucleolin in cardiac hypertrophy mice induced by administration of isoproterenol (ISO). **Method** C57/BLG6 mice with body weight between 18 and 22 g were recruited and randomly divided into three groups. A murine model of cardiac hypertrophy was employed by administering isoproterenol (ISO) subcutaneously for 7 days. Cardiac hypertrophy was quantified by heart weight-to-body weight ratios (HWI). We detected nucleolin by immunohistochemistry analysis and western-blot analysis. **Result** (1) Myocardial hypertrophy were observed in mice induced by low dosage of ISO (100 mg/kg · d) and even more significant in mice induced by high dosage of ISO (150 mg/kg · d) compared with the vehicle control group ($P<0.05$). (2) Elevated MDA, LDH and CK were observed in serum of low dosage group and were more remarkable in high dosage group in contrast to vehicle control group ($P<0.05$). (3) Nucleolin in low dosage group was higher than that in vehicle control group but it changed little in high dosage group ($P<0.05$). **Conclusion** Nucleolin in myocardial hypertrophy mice induced by

收稿日期: 2012-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(81170113, 81071556)。

作者简介: 严思敏, 本科在读, E-mail: yensimian@gmail.com. 通讯作者蒋碧梅, 博士, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 心肌的内源性保护, E-mail: jiangbimei@163.com.

low dosage of ISO was up-regulated while it is not significantly changed in mice induced by high dosage of ISO.

Key words: nucleolin; isoproterenol; hypertrophy; heart

心肌肥厚是心肌对各种心血管刺激因子如血流动力学负荷、生长因子以及激素等的适应性反应,是心肌细胞体积增大和蛋白含量增多为主要特征的代偿反应。持续的心肌肥厚会导致失代偿而发生扩张型心肌病、心源性猝死和充血性心力衰竭,被认为是心血管病的独立危险因素和预后信号^[1-2]。临床研究发现预防或逆转心肌肥厚能明显改善患者的预后,但如何预防及逆转心肌肥厚的发生成为现在研究的热点。随着进入分子生物学时代,在基因水平对心肌肥厚研究不断深入,发现多个基因在心肌肥厚中发挥重要作用。

核仁素(nucleolin, 又称 C23)为一种重要的 RNA 结合蛋白,是目前发现的 271 种核仁蛋白质中含量最多的一种,约占核仁蛋白质总量的 10%。它具有多种生物学功能,包括调控核糖体的生物合成与成熟,调控细胞增殖、生长、胚胎发生、胞质分裂、染色质复制与核仁的发生等过程^[3-6]。近年来的研究发现核仁素是一个心肌保护蛋白,可明显减轻心肌缺血-再灌注损伤,然而,核仁素在心肌肥厚的发生、发展中是否起作用,目前还不清楚。

本实验拟连续采用异丙肾上腺素(ISO)刺激,制备小鼠心肌肥厚模型,研究异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚中核仁素的表达情况,为进一步研究核仁素在心肌肥厚发生发展中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 C57/BLG6 小鼠 30 只,雌雄不拘,体重 18~22 g,购自南京大学模式动物研究中心。盐酸异丙肾上腺素(I5627, Sigma-Aldrich)、RIPA 中性裂解液、PMSF、BSA、兔抗核仁素单克隆抗体购于 Sigma-Aldrich 公司,辣根过氧化物抗兔 IgG, DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物技术公司。

1.2 动物模型制备与分组

异丙肾上腺素导致小鼠心肌肥厚模型的制备参考文献[7]。将小鼠随机分为 3 组($n=10$),生理盐水组、小剂量异丙肾上腺素组(ISO 每天 100 mg/kg)、大剂量异丙肾上腺素组(ISO 每天 150 mg/kg)。异丙肾上腺素组小鼠经背部皮下注射盐酸异

丙肾上腺素(溶解于 100 μ L 生理盐水),连续注射 7 天。生理盐水组注射 100 μ L 生理盐水,连续注射 7 天。实验期间各组动物饲养环境(室温 25 ± 1 $^{\circ}$ C,相对湿度 60%)、饮水和进食等条件基本一致。

1.3 心脏组织心重指数 HWI(HW/BW)测定

实验组及生理盐水组小鼠于末次给药后禁食 24 h,称量体重,麻醉后迅速开胸取出心脏,剪去心脏周围组织和血管称取全心重量,计算全心重/体重,作为心重指数(HWI)来判断心肌肥厚程度。

1.4 血清 MDA、LDH、CK 含量检测

采用临床生化自动分析仪进行检测。

1.5 心脏组织 HE 染色

取心脏后以 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋整个心脏,切片,常规 HE 染色。

1.6 心脏组织免疫组织化学染色

常规石蜡包埋切片,切片脱蜡,抗原修复,消除内源性过氧化物酶活性,3% 羊血清 1 mL(封闭液由纯羊血清 30 μ L + 10% TX 30 μ L + PBS 940 μ L 配制)封闭 50 min,一抗(一抗配制:封闭液 + PBS 1:1, C23 浓度为 1:200)孵育过夜,二抗(二抗配制:封闭液 + PBS 1:1,二抗兔浓度为 1:400)孵育 1.5 h。新鲜配置的 DAB 显色 1~2 min。在 400 倍视野下观察结果。

1.7 免疫印迹分析

称取小鼠心脏组织重量,按每 100 mg 组织加 1 mL 的比例加入 RIPA 中性裂解液, PMSF(按每 1g 组织 30 μ L),冰上孵育 30 min 后,用组织匀浆器于冰上研磨。将研磨液移入离心管,于 4 $^{\circ}$ C 以 14 000 rpm 离心 30 min,取上清液收集组织总蛋白。分装后置于 -80 摄氏度冰箱保存备用。取 30 μ g 蛋白裂解液,加入等体积 2 \times SDS 电泳加样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。样品经 12% SDS-PAGE 电泳分离,电转移法将胶上蛋白质转至醋酸纤维膜上。用封闭缓冲液(2% BSA, 50 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 值 7.5)室温下封闭 4 h。然后加入兔抗核仁素单克隆抗体(1:1 000 稀释)于摇床上,室温下孵育 2 h。用洗膜液洗去一抗后,加入辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 二抗(1:1 000 稀释)于摇床上,孵育 1 h,洗膜液洗去二抗。用 DAB 显色,进行灰度扫描及定量分析。GAPDH 抗体作为内对照。

1.8 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 异丙肾上腺素对小鼠心肌组织病理学改变及心脏重量指数的影响

心脏组织 HE 染色结果显示:生理盐水组心肌

细胞染色均匀,心肌纤维排列整齐,横纹清楚,而小剂量异丙肾上腺素组及大剂量异丙肾上腺素组均出现了心肌细胞直径明显变大,细胞间距变大,细胞间质增多,呈现区域性纤维化(图 1)。心脏组织心重指数 HWI(HW/BW)测定结果显示,小剂量异丙肾上腺素组及大剂量异丙肾上腺素组小鼠心脏重量参数 HW/BW 与生理盐水组相比显著增加,差异均有显著性。见图 2。

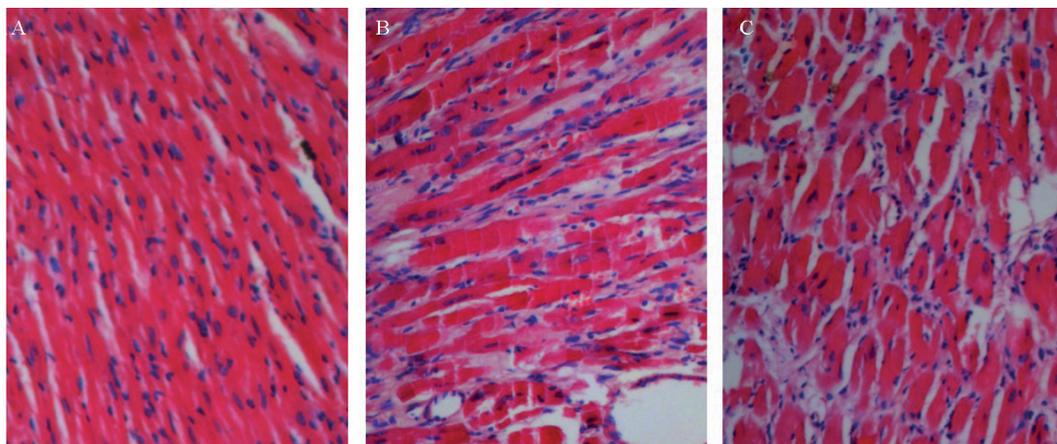


图 1 不同剂量异丙肾上腺素对小鼠心脏组织病理学改变的影响(×200) A:生理盐水组;B:小剂量异丙肾上腺素组(100 mg/kg);C:大剂量异丙肾上腺素组(150 mg/kg)

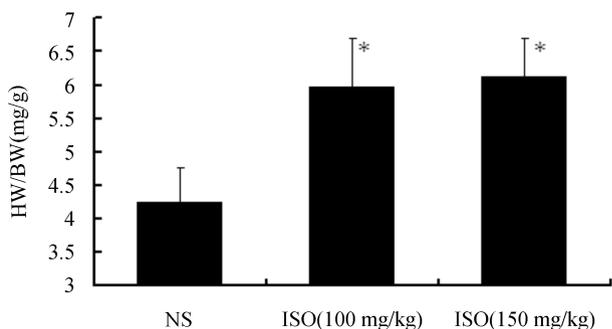


图 2 不同剂量异丙肾上腺素对小鼠心脏重量参数(HW/BW)的影响(*n* = 10) NS:生理盐水组;ISO(100 mg/kg):小剂量异丙肾上腺素组;ISO(150 mg/kg):大剂量异丙肾上腺素组.#与 NS 组比较,* :*P* < 0.05

2.2 不同剂量异丙肾上腺素对小鼠血清 MDA、LDH、CK 含量的影响

与生理盐水组相比,小剂量异丙肾上腺素组小鼠血清 MDA、LDH、CK 含量升高(*P* < 0.05),大剂量异丙肾上腺素组小鼠血清 MDA、LDH、CK 含量升高更显著(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 不同剂量异丙肾上腺素对小鼠血清 MDA、LDH、CK 含量的影响(*n* = 10)

组别	MDA(nmol/L)	LDH(U/L)	CK(U/L)
生理盐水组	3.62 ± 0.45	489.26 ± 101.41	449.76 ± 97.66
ISO(100 mg/kg)组	5.13 ± 0.58 ^a	859.64 ± 137.39 ^a	1233.48 ± 157.36 ^a
ISO(150 mg/kg)组	6.69 ± 1.35 ^{ab}	1299.06 ± 264.11 ^{ab}	1545.62 ± 345.55 ^{ab}

与生理盐水组比较,a;*P* < 0.05;与 ISO(100mg/kg)组比较,b;*P* < 0.05

2.3 不同剂量异丙肾上腺素对小鼠心脏中核仁素表达的影响

每组分别收集 3 只小鼠 3 个心脏的总蛋白,Western blot 检测结果发现,与生理盐水组相比,小剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌核仁素表达上调,而大剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌核仁素的表达无明显改变(图 3)。免疫组织化学结果也显示,与生理盐水组相比,小剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌阳性

的棕色颗粒增多,提示核仁素表达上调,而大剂量异丙肾上腺素组小鼠心肌中棕色颗粒的量与对照组相比,差异不明显(图4)。

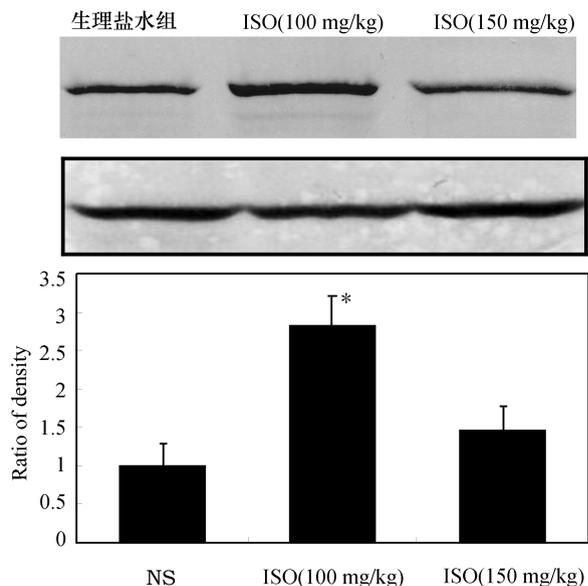


图3 Western blot 检测不同剂量异丙肾上腺素对小鼠心脏中核仁素表达的影响($n=3$) GAPDH:内对照;NS:生理盐水组;ISO(100 mg/kg):小剂量异丙肾上腺素组;ISO(150 mg/kg):大剂量异丙肾上腺素组.与NS组比较,*: $P<0.05$

3 讨 论

皮下连续注射 ISO 诱导心肌肥厚是经典的动物模型,ISO 一方面可促进心肌细胞总蛋白和收缩蛋白合成增加、心肌细胞肥大,另一方面可使心率加快,心室舒张期缩短而导致心肌供血不足,氧自由基堆积,促进心肌肥厚及纤维化,表现为心肌细胞体积增大和细胞外基质胶原纤维大量沉积^[8]。本实验研究结果显示,ISO 100 mg/kg 组和 ISO 150 mg/kg 组小鼠均出现心肌细胞直径明显变大,细胞间距变大,细胞间质增多,心肌间纤维细胞增加,呈现区域性纤维化,心脏重量指数、血清 MDA、LDH、CK 的含量均显著增加,与生理盐水组比较差异有显著性($P<0.01$),说明心肌肥厚模型制备成功。

临床研究表明逆转心肌肥厚能明显改善患者的预后。因此,防止心衰发生的关键在于控制心肌肥厚的不良进展^[9-11]。近年来,随着心肌肥厚发生和发展机制的深入研究,人们逐渐认识到心肌肥厚受多种因素的影响,机制复杂,尚未完全研究清楚。所以加强心肌肥厚相关基因的研究,对逆转心肌肥厚有一定的临床意义。

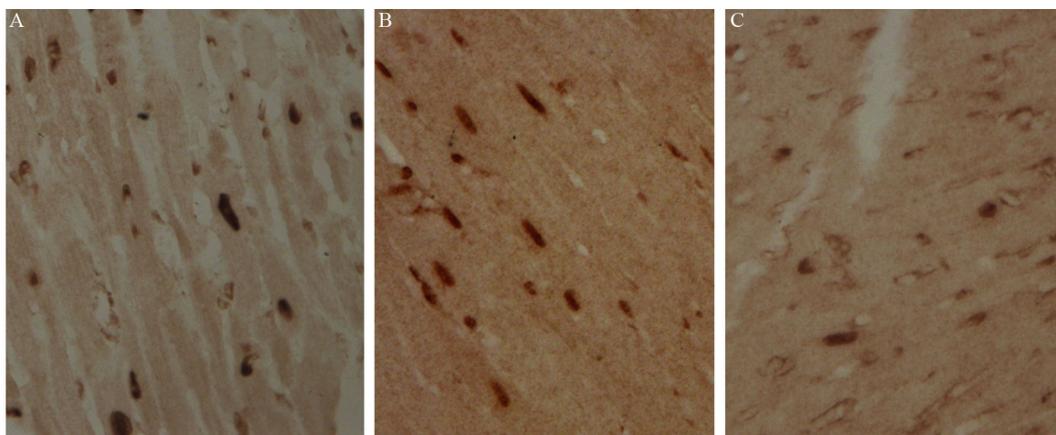


图4 免疫组织化学方法检测不同剂量异丙肾上腺素对小鼠心脏中核仁素蛋白表达的影响 $\times 200$ A:生理盐水组;B:小剂量异丙肾上腺素组(100 mg/kg);C:大剂量异丙肾上腺素组(100 mg/kg)

核仁素为 RNA 结合蛋白,是目前发现的 271 种核仁蛋白质中含量最多的一种,具有多种生物学功能。研究发现核仁素在细胞增殖、生长方面发挥着非常重要的功能^[3-6],而心肌肥厚早期主要表现为心肌细胞肥大和增殖^[12],因此推测核仁素可能在心肌肥厚发生、发

展中有重要作用。目前本研究组采用 Western blot 及免疫组织化学方法检测了异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚模型中心肌核仁素的表达情况,实验结果发现,小剂量(100 mg/kg)ISO 连续皮下注射 7 天后核仁素的表达上调,提示核仁素可能在心肌肥厚中发挥作用,结合

最近研究发现核仁素在糖尿病心肌肥厚也表达上调,而且核仁素过表达可抑制糖尿病心肌肥厚的发生,因此推测核仁素可能在异丙肾上腺素所致心肌肥厚中发挥作用。然而,150 mg/kg ISO 连续皮下注射 7 天后核仁素的表达与对照组相比改变不明显,血清 MDA、LDH、CK 的含量较小剂量组显著增加,结合以往的研究发现核仁素在心肌缺血再灌注损伤中表达下调^[13],考虑为 ISO 剂量过大,导致心肌缺血缺氧,心肌受损从而使得核仁素上升不明显。尽管目前已知核仁素参与细胞增殖、生长,推测其可能致心肌细胞肥厚,但核仁素是否在异丙肾上腺素所致心肌肥厚中起作用以及作用机制还有待于进一步的研究。

总体上,本实验发现的核仁素与心肌肥厚的发生发展存在一定关系,将对今后核仁素在心肌肥厚中的功能研究提供有用的信息。

参考文献:

- [1] Gradman AH,Alfayoumi F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure:management of hypertensive heart disease[J]. Prog Cardiovasc Dis,2006,48(5):326-641.
- [2] 褚春,杨军,王苏燕,等. 厄贝沙坦对心力衰竭大鼠心肌电生理失稳态和心室肌细胞 I(Ca-L) 电流的影响[J]. 中南医学科学杂志,2012,1(40):42-46.
- [3] Ginisty H,Sicard H,Roger B,et al. Structure and functions of nucleolin[J]. J Cell Sci,1999,112 (Pt 6):761-772.
- [4] Marjan M. Tajrish, Renu Tuteja, Narendra Tuteja. Nucleolin the most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus [J]. Communicative & Integrative Biology, 2011,4(3),267-275.
- [5] 王慷慨,蒋磊,鄂顺梅,等. 核仁素表达下调对 C2 C12 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中南大学学报:医学版,

2005,30(2):125-129.

- [6] Roselló-Lletí E, Rivera M, Cortés R, et al. Influence of heart failure on nucleolar organization and protein expression in human hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,418(2):222-228.
- [7] Stansfield WE,Tang RH,Moss NC,et al. Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2008 294(2):H645-650.
- [8] Erami M,Galindo CL,Tassa AT,et al. Doxycycline attenuates isoproterenol-and transverse aortic banding-induced cardiac hypertrophy in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008,324(3):1196-1203.
- [9] Bolognese L,Dellavesa P,Rossi L,et al. Prognostic value of left ventricular mass in uncomplicated acute myocardial infarction and one vessel coronary artery disease[J]. Am J Cardiol,1994,73(3):1-5.
- [10] Matthew J, Sleight P, Lonn E, et al. Heart Outcomes Prevention E-valuation (HOPE) Investigator. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril [J]. Circulation,2001,104(8):1615-1621.
- [11] 欧阳劲,陈伟. 氯沙坦钾对慢性心力衰竭患者尿液水通道蛋白 2 的影响[J]. 中南医学科学杂志,2012,5(40):484-486.
- [12] Bremer S,Klein K,Sedlmaier A,et al. Hepatoma-derived growth factor and nucleolin exist in the same ribonucleoprotein complex[J]. BMC Biochem,2013,14(1):2.
- [13] 张彬. 核仁素在大鼠缺血-再灌注损伤心肌中的表达及其抗心肌细胞凋亡作用研究[D]. 长沙:中南大学,2009:17-24.

(此文编辑:蒋湘莲)

医学小常识

禽流感

禽流感是禽流行性感病的简称,是由甲型流感病毒引起的禽类传染性疾病,容易在鸟类之间引起流行。人感染后的症状表现与人类流行性感病相似,但人禽流感症状重、并发症多、病死率高、疫苗接种无效。主要为高热、咳嗽、流涕、肌痛等。多伴有严重的肺炎,严重者心、肾等多种脏器功能衰竭死亡。禽流感死亡率高于非典。禽流感病毒可通过消化道和呼吸道进入人体,人类直接接触受禽流感病毒感染的家禽及其粪便或直接接触禽流感病毒也可以被感染。通过飞沫及接触呼吸道分泌物也是传播途径。

(南华大学药物药理研究所 秦旭平)