

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1717-04

钙调神经磷酸酶参与心衰患者心肌重构的信号转导

胡厚祥, 高兴玉, 李治明, 李小平, 罗勇

(川北医学院附属医院心血管内科, 四川南充 637000)

[摘要] 目的:探讨血管紧张素 II (Ang II)介导的钙调神经磷酸酶 (CaN)信号通路参与心力衰竭 (CHF)患者心肌重塑的机制。方法:选择因瓣膜性心脏病接受二尖瓣置换术的 CHF 病人 39 例,正常对照 38 例(其中 8 例来自意外死亡的器官捐献者)。彩色多普勒超声心动图仪检测心脏扩大和心功能参数。放免法检测血浆及心肌组织 Ang II 浓度,免疫沉淀法测心肌组织 CaN、活化 T 细胞核因子 (NFAT₃)、锌指转录因子 (GATA₄) 磷酸化及蛋白表达, RT-PCR 检测肌球蛋白重链 (β -MHC) mRNA 表达。结果:Ang II 分别与心脏扩大参数呈显著正相关,而与心功能参数呈显著负相关。CHF 患者心肌组织 CaN 蛋白表达、CaN 磷酸化、GATA₄ 蛋白表达及 β -MHC mRNA 表达明显高于对照组,随心功能恶化其表达逐渐增加;NFAT₃ 磷酸化随心功能恶化而减弱。结论:肾素血管紧张素系统 (RAS) 激活的 CaN 信号通路在 CHF 患者心肌重构机制中可能起重要作用。

[关键词] 心力衰竭,充血性;心肌重构;钙神经素;血管紧张素 II;信号转导;肌球蛋白重链

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Calcineurin is involved in signal transduction of myocardial remodeling in patients with congestive heart failure

HU Hou-xiang, GAO Xing-yu, LI Zhi-ming, LI Xiao-ping, LUO Yong

(Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the involvement of calcineurin (CaN) signal pathway mediated by angiotensin II (Ang II) in the myocardial remodeling mechanism in patients with congestive heart failure (CHF). **METHODS:** 39 patients of mitral valve disease with CHF were randomly selected and 30 cases of healthy persons were included as controls. Cardiac function parameters were measured by echocardiography. Concentration of Ang II in plasma and myocardial tissues were determined by radioimmunoassay. Immunoprecipitation was used to assay the protein expression and phosphorylation of CaN, nuclear factor of activated T cells (NFAT₃), zinc finger transcription factor (GATA₄) in myocardial tissues. The mRNA expression of β -myosin heavy chain (β -MHC) was measured by RT-PCR. **RESULTS:** The Ang II concentrations in patients with CHF were positively correlated with the parameters of the cardiac dilation respectively, but negatively correlated with the parameters of cardiac function. Compared to the control group, protein of CaN and GATA₄, phosphorylation of CaN, and β -MHC mRNA expression in myocardial tissues in CHF groups were highly expressed and their expression were positively correlated to the levels of CHF, but the phosphorylation of NFAT₃ was negatively correlated with the levels of CHF. **CONCLUSION:** CaN signal pathway may play important roles in the myocardial remodeling in CHF.

[KEY WORDS] Heart failure, congestive; Myocardial remodeling; Calcineurin; Angiotensin II; Signal transduction; Myosin heavy chains

心肌重构是心肌组织对瓣膜病、高血压、急性心肌梗死及先天性心脏病等常见临床疾病的一种基本应答^[1]。虽然钙阻滞剂 (calcium channel blockers, CCBs) 可部分逆转肥厚的心肌,但阻断钙内流并不能完全逆转肥厚的心肌,提示细胞内贮 Ca²⁺ 释放可能对心肌肥厚也有重要影响^[2,3]。近年来,我们用 Ang II 刺激心肌细胞外钙跨膜内流,用雷尼丁 (ryanodine, RY) 刺激心肌细胞内贮钙的释放,发现刺激细胞

外钙内流及内贮钙的释放均可导致心肌细胞内游离钙的增加,心肌细胞生长与细胞内游离钙的变化有关而与其来源无关,而抑制钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 可抑制心肌细胞生长,说明 CaN 信号通路在心肌重构中起重要作用^[3]。因此,本研究从 Ang II 入手,结合临床选择不同程度心衰患者进行研究,探讨钙敏感的 CaN 信号通路是如何调节心肌重构的发生机制,加深对心肌重构的信号转导机制的认识。

[收稿日期] 2004-12-30 [修回日期] 2005-05-20

Tel:0817-2262404; E-mail:huhouxiang326@yahoo.com.cn

材 料 和 方 法

1 对象

选择因瓣膜性心脏病接受二尖瓣置换术的 CHF 病人 39 例,男 20 例,女 19 例,年龄 23 - 56 岁[平均 (42 ± 6) 岁]。根据 NYHA 心功能分级标准分级,心功能 II 级组 12 例、III 级组 15 例、IV 级组 12 例。HP500 型彩色多普勒(M 型)超声心动图仪术前 1 周检测心功能参数,包括左室舒张末内径(LVEDd)、左室后壁厚度(LVPW)、室间隔厚度(IVS)、左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、心输出量(CO)和心脏指数(CI)。胸片测心胸比率(heart/thorax rate, HTR)。正常对照 38 例,其中 8 例来自意外死亡的器官捐献者,性别、年龄与疾病组无显著差异。

2 方法

2.1 心肌取材 二尖瓣置换术者手术中夹取少许左室乳头肌,意外死亡者于死亡后 3 - 4 h 内夹取左室乳头肌,立即置于液氮中冷冻保存,3 个月内同批作光镜病理检查及相关的分子生物学实验。

2.2 主要试剂 兔抗人 CaN 抗体、兔抗人 NFAT₃ 抗体、兔抗人 GATA₄ 抗体、CaN 磷酸化抗体均购自 Santa Cruz(美国)。¹²⁵I - Ang II 试剂盒(北京北方生物技术研究所)。

放免法检测血浆及心肌组织 Ang II 浓度,检测方法按试剂盒说明书操作。直线回归方程计算出各血浆样品管浓度对数值,取反对数即为各血浆样品管的 Ang II 浓度(ng/L)。心肌 Ang II 含量(ng/g)的计算:先通过直线回归方程计算出各心肌样品管浓度对数值,取反对数即为各心肌样品管的 Ang II 浓度(ng/g),再将该值除以心肌样品浓度(ng/g)得到。

免疫沉淀法(IP - Western)检测心肌组织钙调神经磷酸酶(CaN)、活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT₃)磷酸化及蛋白表达、锌指转录因子(zinc finger transcription factor, GATA₄)蛋白表达,详细过程参考文献^[4]。采用考马斯亮蓝法进行蛋白浓度检测,用相应的抗体沉淀相应的蛋白,SDS - PAGE 蛋白质聚丙烯酰胺电泳,蛋白转膜、封闭,辣根过氧化物酶标记 II 抗,化学发光试剂增强反

应,X 光片曝光显影,重复 6 次。

2.3 反转录 PCR(RT - PCR) RT - PCR 检测肌球蛋白重链(β - myosin heavy chain, β - MHC) mRNA 的表达。用 β - MHC 引物扩增 β - MHC cDNA 片段,并与内参照(GADPH)同时扩增。β - MHC 引物(上海 SAGON): 上游引物 5' - TGGAGTACAAAAAGCTGCTGGAACG - 3', 下游引物 5' AGCTCAGCATTTCATCTTCC - 3', 扩增片段为 412 bp; 内参照 GAPDH 引物: 上游引物 5' - ACGGCAAATCAACGGCACAGTCA - 3', 下游引物 5' - TGGGGGCATCGGCAGAAGG - 3' 扩增片段长度为 231 bp。按下列条件进行扩增:94 °C 变性 1.5 min → 55 °C 退火 1 min → 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 10 min, 取出反应管置 4 °C 10 min, 即可进行电泳,重复 6 次。

3 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 统计软件进行方差分析、t 检验及相关分析。

结 果

1 心衰患者临床资料

心功能 II 级、III 级、IV 级组血浆及心肌组织 Ang II 浓度均高于正常对照组($P < 0.01$),随心功能恶化其含量逐渐增加(表 1)。

表 1 心衰患者血浆及心肌组织 Ang II 水平

Tab 1 Ang II levels in serum and myocardium tissue in patients with congestive heart failure ($\bar{x} \pm s$)

Group	Serum(ng/L)	Myocardium tissue(ng/g)
Normal	278.21 ± 64.76	245.30 ± 26.10
II/NYHA	482.92 ± 122.43 **	368.10 ± 84.10 **
III/NYHA	507.85 ± 70.03 **	381.20 ± 47.00 **
IV/NYHA	589.25 ± 28.70 **	391.60 ± 20.64 **

Normal serum ($n = 30$), normal myocardium tissue ($n = 8$), II/NYHA ($n = 12$), III/NYHA ($n = 15$), IV/NYHA ($n = 12$). ** $P < 0.01$ vs normal group.

心力衰竭病人,不同心功能组临床资料显示,心功能越差,HTR 及 LVEDd 越大,LVEF、FS、CO 及 CI 越低(表 2)。

表 2 心功能不全患者资料

Tab 2 Clinical data of different groups in patients with different cardiac function ($\bar{x} \pm s$)

Group	HTR	LVEd(mm)	LVEF(%)	FS(%)	CO(L/min)	CI(L/min · m ²)
II/NYHA	0.47 ± 0.03	48.7 ± 6.7	53.0 ± 3.8	29.9 ± 3.3	4.3 ± 0.8	2.83 ± 0.27
III/NYHA	0.56 ± 0.06 ^{##}	57.7 ± 7.6 ^{##}	42.6 ± 7.7 [#]	27.7 ± 6.9 [#]	4.0 ± 0.5 [#]	2.76 ± 0.53 [#]
IV/NYHA	0.65 ± 0.08 ^{##Δ}	61.0 ± 9.8 ^{##Δ}	30.4 ± 7.5 ^{##ΔΔ}	18.2 ± 5.8 ^{##Δ}	3.3 ± 0.3 ^{##ΔΔ}	2.08 ± 0.24 ^{##Δ}

II/NYHA group ($n = 12$), III/NYHA ($n = 15$), IV/NYHA ($n = 15$). [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs II/NYHA group; ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs IV/NYHA group.

相关分析表明, Ang II 分别与心胸比例(HTR)、LVEd、LVPW 和 IVS 呈显著正相关, 相关系数及 P 分别为 0.66、 <0.01 , 0.38、 <0.01 , 0.31、 <0.05 和 0.30、 <0.05 ; 而与左室 EF、左室短轴缩短率(FS)、CO 和 CI 呈显著负相关, 相关系数及 P 分别为 -0.54、 <0.01 , -0.44、 <0.01 , -0.39、 <0.01 和 -0.36、 <0.05 。

2 病理检查

HE 染色显示, 正常组心肌纤维排列整齐, 横纹清楚。心衰患者心肌纤维走向紊乱、横断面肌丝大小不一、部分心肌细胞肥大、胞浆空泡变性以核周围明显, 肌丝呈颗粒或丝网状、间质增宽, 且病变随功能恶化而加重。

3 心肌组织 CaN 蛋白表达及磷酸化

免疫沉淀检测 CHF 患者心肌组织 CaN 蛋白表达, 凝胶成像系统分析吸光度(A, mm^2), 对照组 2.12 ± 0.12 、心功能 II 级组 2.18 ± 0.18 、心功能 III 级组 3.82 ± 0.39 、心功能 IV 级组 5.12 ± 0.45 。心功能 II 级组与对照组相比差异无显著(均 $P > 0.05$), 心功能 III 级组、心功能 IV 级组与对照组相比差异非常显著($P < 0.01$), 随心功能恶化 CaN 蛋白表达逐渐增加(图 1)。



Fig 1 CaN protein expression in patients with congestive heart failure. $n = 8$.

图 1 心力衰竭患者心肌组织 CaN 蛋白表达

CHF 患者心肌组织 CaN 磷酸化结果经凝胶成像系统分析吸光度(A, mm^2), 对照组 1.68 ± 0.13 、心功能 II 级组 2.41 ± 0.14 、心功能 III 级组 3.67 ± 0.29 、心功能 IV 级组 4.92 ± 0.54 。各心衰组与对照组相比差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 随心功能恶化 CaN 磷酸化逐渐增加(图 2)。



Fig 2 CaN phosphorylation in patients with congestive heart failure. $n = 8$.

图 2 心力衰竭患者心肌组织 CaN 磷酸化

4 心肌组织 NFAT₃ 蛋白表达及磷酸化

免疫沉淀法检测 CHF 患者心肌组织 NFAT₃ 蛋白表达, 凝胶成像系统分析吸光度(A, mm^2), 对照组 2.68 ± 0.13 、心功能 II 级组 2.73 ± 0.16 、心功能 III 级组 2.80 ± 0.29 、心功能 IV 级组 2.58 ± 0.08 。各心衰

组与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)(图 3)。



Fig 3 NFAT₃ protein expression in patients with congestive heart failure. $n = 8$.

图 3 心力衰竭患者心肌组织 NFAT₃ 蛋白表达

心肌组织 NFAT₃ 磷酸化结果经凝胶成像系统分析吸光度(A, mm^2), 对照组 3.93 ± 0.46 、心功能 II 级组 2.88 ± 0.35 、心功能 III 级组 2.17 ± 0.19 、心功能 IV 级组 1.75 ± 0.11 。各 CHF 组 NFAT₃ 磷酸化与对照组相比, 差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌组织 NFAT₃ 磷酸化随心功能恶化逐渐减弱(图 4)。



Fig 4 NFAT₃ phosphorylation expression in patients with congestive heart failure. $n = 8$.

图 4 心力衰竭患者心肌组织 NFAT₃ 磷酸化

5 心肌组织 GATA₄ 蛋白表达

免疫沉淀法检测 CHF 患者心肌组织 GATA₄ 蛋白表达, 其结果经凝胶成像系统分析吸光度(A, mm^2), 对照组 0.99 ± 0.09 、心功能 II 级组 1.46 ± 0.13 、心功能 III 级组 1.91 ± 0.38 、心功能 IV 级组 2.46 ± 0.17 。各心衰组与对照组相比无显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 随心功能恶化 GATA₄ 蛋白表达逐渐增加(图 5)。



Fig 5 GATA₄ protein expression in patients with congestive heart failure. $n = 8$.

图 5 心力衰竭患者心肌组织 GATA₄ 蛋白表达

6 心肌组织肌球蛋白重链(β -MHC) mRNA 表达

RT-PCR 结果显示, 心肌组织 β -MHC mRNA 表达(β -MHC/GAPDH A value 比值), 对照组 0.41 ± 0.04 、心功能 II 级组 0.87 ± 0.03 、心功能 III 级组 0.93 ± 0.03 、心功能 IV 级组 1.14 ± 0.10 , 各心衰组与正常对照组相比差异显著, $P < 0.05$ 。各心衰组心肌组织 β -MHC mRNA 表达随心功能恶化而逐渐增加(图 6)。

讨 论

CHF 病人在发生发展和靶器官损害上, 循环 RAS 有着其重要的作用, 而局部 RAS 可能对靶器官

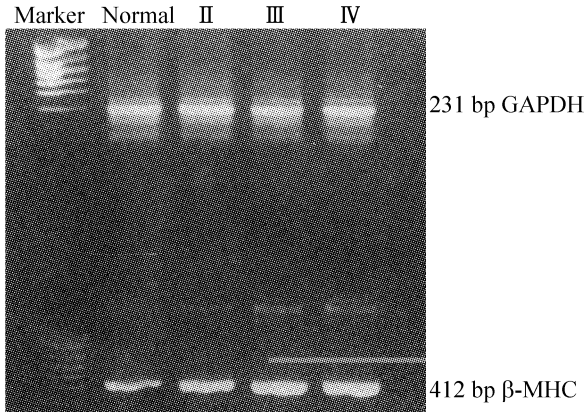


Fig 6 Expression β -MHC mRNA in myocardium of patients with congestive heart failure. $n=8$.

图6 心力衰竭患者心肌组织 β -MHC mRNA

的影响更为重要^[5]。RAS 的主要效应分子 Ang II 为心肌肥大刺激因子,可使心肌细胞内 Ca^{2+} 编码发生改变,在 CaN 等 Ca^{2+} 敏感酶系的介导下,通过对一系列转录因子的活化而实现对基因转录的调节,从而使细胞表型发生改变以适应环境,即通过一系列信号转导最终导致心肌肥大^[6-8]。本研究中 CHF 病人临床资料显示,CHF 病人 Ang II 含量明显增高,Ang II 与心脏扩大参数、心肌肥厚参数呈正相关,而与心功能参数呈显著负相关,进一步说明 RAS 在心肌肥厚、心腔扩大、心肌收缩力下降等 CHF 的病理过程中可能起重要作用。

虽然致心肌肥厚的各种刺激因素不同,但是心肌细胞肥厚的细胞分子机制却相似,即细胞体积增大、蛋白合成增加、胚胎型心脏基因表达上调等^[8-10]。最近报道^[10,11],CaN 在心肌肥厚中起重要作用,提出心肌细胞内存在一种新的致心肌肥厚的信号转导通路,即 CaN - NFAT₃ (活化 T 细胞核因子)信号转导通路。心肌细胞在心肌肥厚因素如 Ang II 刺激下,可通过增加心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 激活 CaN,使 NFAT₃ 去磷酸化并进胞核,去磷酸化的 NFAT₃ 再与锌指转录因子(GATA₄)相互作用,活化多种心肌肥厚的相关基因,最终导致心肌重构。本结果显示,虽然心功能 II 级患者与正常对照相比,CaN 蛋白表达量增加没有显著差异,但其磷酸化是增强的。从总的趋势来看,随心功能恶化,CHF 患者心肌组织 CaN 蛋白表达逐渐增加,CaN 磷酸化也逐渐增强。心肌组织 NFAT₃ 的蛋白表达量虽然没有发生变化,但 NFAT₃ 磷酸化逐渐减弱,处于去磷酸化状态,而导致其下游信号分子 GATA₄ 的激活,且实验结果也显示 GATA₄ 表达量随心功能恶化而增加,进一步导致心肌肥大。说明 RAS 诱导的心肌重构病理

过程中,CaN - NFAT₃ - GATA₄ 信号通路的激活可能是其重要机制之一。

MHC 决定心肌细胞能量释放和纤维缩短的速度。本结果表明, β -肌球蛋白重链表达明显增加。说明 RAS 通过激活 CaN - NFAT₃ - GATA₄ 信号通路,出现了肌球蛋白的胎儿化现象,进一步恶化心功能。据此,我们认为 RAS 的激活,其主要效应分子 Ang II 浓度的增加,导致钙敏感 CaN - NFAT₃ - GATA₄ 信号通路的激活,在 CHF 患者心肌重构中可能起着重要作用,阻断该信号通路可能有效地抑制心肌细胞生长。

[参 考 文 献]

- [1] Moldentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin transcriptional pathway for cardiac hypertrophy[J]. Cell, 1998, 93(2): 215 - 228.
- [2] 张鑫,杨永健,周兴文,等. 钙通道阻滞剂对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(9): 879 - 881.
- [3] 杨永健,祝善俊,祝之明,等. 钙激动剂调控对心肌细胞生长的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(1): 46 - 48.
- [4] Li X, Yang Y, Hu Y, et al. $\delta_v\beta_6$ - Fyn signaling promotes oral cancer progression [J]. The J Bio Chem, 2003, 278(43): 41646 - 41653.
- [5] Zhu ZM, Zhang SH, Wagner C, et al. Angiotension AT_{1b} receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT_{1a} receptor - deficient mice[J]. Hypertension, 1998, 31(2): 1171 - 1177.
- [6] Yatani A, Honda R, Tymitz KM, et al. Enhanced Ca^{2+} channel currents in cardiac hypertrophy induced by activation of calcineurin - dependent pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(3): 249 - 259.
- [7] Molckentin JD. Calcineurin and beyond: Cardiac hypertrophic signaling[J]. Circ Res, 2000, 87(5): 731 - 738.
- [8] Diedrichs H, Chi M, Boelck B, et al. Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2004, 6(1): 3 - 9.
- [9] Hasenfuss G. Alteration of calcium - regulatory proteins in heart failure[J]. Cardiovasc Res, 1998, 37(1): 279.
- [10] Williams RT. Calcium: outside/inside homeostasis and signalling[J]. Biochem Biophys Acta, 1998, 1448(2): 153 - 165.
- [11] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2004, 93(1): 111 - 118.