

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0417-05

· 论 著 ·

多胺在异丙肾上腺素所致大鼠 心肌肥厚中的作用及意义*

林岩¹, 徐长庆^{2,3△}, 赵雅君², 王丽娜², 席玉慧², 李鸿珠², 李光伟¹(¹ 齐齐哈尔医学院病理生理教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; ² 哈尔滨医科大学病理生理教研室, ³ 黑龙江生物医药工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的: 研究多胺、鸟氨酸脱羧酶(ODC)及精胺/精胺乙酰基转移酶(SSAT)在异丙肾上腺素所致大鼠心肌肥厚中的作用及机制。方法: 异丙肾上腺素(ISO)皮下注射复制大鼠心肌肥厚模型, 应用反向高效液相色谱(RP-HPLC)、RT-PCR和Western blotting结合图像分析系统, 分别检测ISO作用不同时间点大鼠心肌组织多胺含量、ODC和SSAT mRNA和蛋白的表达。结果: 与对照组比较, 心脏重量参数在ISO注射后7 d时显著增加, ISO注射后1 d时腐胺含量增加($P < 0.05$), 5 d、7 d时显著增加($P < 0.01$); 精胺含量在ISO注射后3 d时开始增加, ISO注射后7 d时增加显著($P < 0.01$), 精胺含量略有增多($P < 0.05$), 总多胺池显著增加。心肌组织ODC和SSAT的mRNA表达在ISO注射后1 d时升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并持续在较高水平。心肌组织ODC和SSAT的蛋白表达分别在ISO注射后1 d和ISO注射后5 d时升高, ISO注射后7 d时显著升高($P < 0.01$)。结论: 大鼠心肌组织多胺含量增加和ODC、SSAT的表达增强可能参与ISO所致心肌肥厚的病理过程。

[关键词] 多胺; 鸟氨酸脱羧酶; 精胺/精胺乙酰基转移酶; 心肌肥厚; 异丙肾上腺素

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of polyamine on cardiac hypertrophy induced by isoproterenol in rats

LIN Yan¹, XU Chang-qing^{2,3}, ZHAO Ya-jun², WANG Li-na², XI Yu-hui², LI Hong-zhu², LI Guang-wei¹

(¹ Department of Pathophysiology, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161006, China; ² Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, ³ Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150086, China. E-mail: xucq45@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of polyamine, ornithine decarboxylase (ODC) and spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) cardiac hypertrophy induced by isoproterenol (ISO) in rats. **METHODS:** Cardiac hypertrophy in rats was induced by subcutaneous administration of isoproterenol. High performance liquid chromatography was used to measure the concentrations of polyamines. RT-PCR and Western blotting were used to determine the mRNA and protein expressions of ODC and SSAT during different time points. **RESULTS:** Compared with control group, heart weight index was increased markedly at ISO 7 d. The concentration of putrescine was increased at ISO 1 d ($P < 0.05$) and increased significantly at 5 d and 7 d ($P < 0.01$). The concentration of spermidine was increased at 3 d and increased significantly at 7 d. The concentration of spermine was increased and total pool of polyamine was increased significantly. The expression of ODC and SSAT mRNA were upregulated at 1 d ($P < 0.05$) and kept on high level ($P < 0.01$). The expressions of ODC and SSAT protein were upregulated at 1 d and 5 d ($P < 0.05$) and the changes were significant at 7 d ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** These results indicate that increased polyamine and the upregulated expression of ODC and SSAT in rat cardiac tissue may take part in the process of cardiac hypertrophy induced by isoproterenol.

[KEY WORDS] Polyamines; Ornithine decarboxylase; Spermidine/spermine N1-acetyltransferase; Cardiac hypertrophy; Isoproterenol

[收稿日期] 2008-03-07 [修回日期] 2008-10-15

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30770878); 黑龙江省青年科学技术专项基金资助项目(No. QC07C109); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划资助项目(No. 1153G055)

△通讯作者 Tel: 0451-86674548; E-mail: xucq45@126.com

心肌肥厚是多种心血管疾病的并发症,是心脏疾病的恶化因素,因此探明其机制显得尤为重要。研究证实^[1],交感神经系统在心肌细胞肥大、心肌细胞凋亡和坏死等心肌重构活动中起着非常重要的作用,连续用异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)刺激大鼠能引起心肌肥厚和心脏纤维化。

多胺包括腐胺(putrescine, Pu)、精脒(spermidine, Spm)、精胺(spermine, Sp)是一组脂肪胺类小分子化合物,广泛分布在几乎所有原核及真核生物的组织细胞内。生理 pH 时,多胺是质子化的分子,能与生物大分子相互作用并结合,在细胞生长、发育及分化中发挥作用。近年来发现,多胺的代谢改变参与许多疾病病理过程的发生。实验证明多胺参与心肌缺血的发生^[2]。Carmen 等^[3]证明多胺在去甲肾上腺素诱导的心房肌正性肌力作用中发挥作用。关于多胺及代谢关键酶在 ISO 所致大鼠心肌肥厚中的表达及其作用机制,国内尚未见报道,本实验拟研究上述问题。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

Trizol reagent、RNase-free 的 DNase I、TaKaRa ExTaq™ (TaKaRa), Reverse Transcription System (TaKaRa); DEPC; 异丙醇、无水乙醇、苯甲酰氯、甲醇(国产分析纯), 氯仿(国产色谱级)。异丙肾上腺素、腐胺、精脒、精胺、1,6-己二胺(均购自 Sigma)。

2 主要器材

Beckman 低温离心机; PCT-100 型 PCR 仪; 紫外凝胶检测和成像系统(Bio-Rad); LC-6A 高效液相色谱仪、CR-3A 数据处理机、SPD-66A 紫外检测器均为日本岛津(Shimadzu, Kyoto)产品; Hyper-sil ODS C18 柱(250 mm × 416 mm, 5 μm), 大连伊利特分析仪器有限公司产品。

3 动物和模型复制

健康 Wistar 大鼠, 体重 0.20 - 0.25 kg, 雌雄不拘, 由哈医大附属二院动物研究所提供。参照文献^[4]制备大鼠心肌肥厚模型: 大鼠背部皮下注射 ISO 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连续 7 d, 自由进食, 给水; 对照组大鼠背部皮下注射等体积的生理盐水。

4 实验分组

(1) 对照组(control); (2) ISO 给药 1 d 组; (3) ISO 给药 3 d 组; (4) ISO 给药 5 d 组; (5) ISO 给药 7 d 组。每组动物 10 只。

5 心脏重量参数的测定

分别在 ISO 注射后 1 d、3 d、5 d 和 7 d 后处死各

组大鼠, 处死前每只大鼠称量体重(body weight, BW), 3% 戊巴比妥钠(ip) 麻醉, 迅速开胸取出心脏, 剪去心脏周围组织和血管, 称全心重(heart weight, HW)。沿冠状沟将左心房剪下, 沿室间沟将右心室游离壁去除称左室重(left ventricular weight, LVW), 计算 HW/BW、LVW/BW 并以此判断心肌肥厚的程度。取心肌组织左室游离壁, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色, 光镜下观察心肌细胞及心肌间质的变化。将左心室置于液氮中保存备用。

6 心肌组织多胺含量的测定

取左心室约 150 mg, 加入 0.3 mmol/L 冷的高氯酸在冰水浴中制成匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 去除蛋白, 上清贮存在 -20 °C 直至分析使用。按本实验室建立的苯甲酰氯柱前衍生反向高效液相色谱法(HPLC 法)测定心肌组织中多胺的含量^[5], 用 nmol/g BW 表示多胺的含量。色谱条件: 流动相由甲醇和双蒸水组成, 采用梯度洗脱方法, 柱温 40 °C, 流速为 0.4 mL/min。紫外检测波长 229 nm, 20 min 完成洗脱。

7 鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)、精脒/精胺乙酰转移酶(spermidine/spermine N1-acetyltransferase, SSAT) mRNA 表达水平的 RT-PCR 检测

7.1 总 RNA 的提取 应用 Trizol 提取心脏总 RNA。依 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 数据判断 RNA 的纯度及含量。

7.2 DNase I 酶处理 RNA RNA 15 μL; DNase I 1 μL; 10 × DNase I buffer 5 μL; DEPC-H₂O 29 μL; 37 °C 水浴 30 min; 加入 Trizol reagent 及氯仿重新提取总 RNA。

7.3 逆转录(RT)反应 用 AMV 逆转录酶逆转 RNA, 合成第 1 链 cDNA, 取 RNA 1 μL, Random 9 mers 0.5 μL, RNase free dH₂O 3.75 μL, 总体积 10 μL。30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min。-20 °C 冰箱保存。

7.4 引物 依据文献的大鼠心肌组织中 ODC、SSAT cDNA 序列合成引物(TaKaRa), 见表 1。

表 1 ODC、SSAT 和 β-actin 的 PCR 引物序列

Gene	Primers sequences	Product length
ODC	Forward: 5' - gctcttccccgttactcc - 3'	455 bp
	Reverse: 5' - acgaaggctctcagggtcagta - 3'	
SSAT	Forward: 5' - cactctctctctgtcttc - 3'	533 bp
	Reverse: 5' - tagtctccatccctcttcac - 3'	
β-actin	Forward: 5' - gaagtgtgacgttgacatccg - 3'	250 bp
	Reverse: 5' - tgctgatccacatctgtgga - 3'	

7.5 聚合酶链反应(PCR)

① ODC 扩增条件 首次循环为 94 ℃ 2 min, 随后进行 32 次如下循环: 94 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 最后于 72 ℃ 延伸 5 min。

② SSAT 扩增条件 首次循环为 94 ℃ 2 min, 随后进行 32 次如下循环: 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 最后于 72 ℃ 延伸 5 min。

③ PCR 产物分析 取 8 μL 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 随后在凝胶成像系统下拍照, 并分别用 ODC、SSAT 和 β-actin 扩增条带的信号面积之比评定其 mRNA 水平。

8 心肌组织总蛋白的提取和蛋白质免疫印迹检测

取大鼠左心室样品, 液氮内研磨, 加入全细胞裂解液, 将匀浆冰上处理 30 min, 4 ℃、12 000 ×g 离心 15 min, 取上清进行蛋白质定量。取 50 μg 总蛋白样品于 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后转印至 PVDF 膜, 用 10% 无脂肪牛奶封闭后, 用 1:500 抗 ODC 和 SSAT 抗体(Santa) 4 ℃ 孵育过夜。用 II 抗(碱性磷酸酶标记, 稀释度 1:1 000) 室温孵育 1 h, 最后用 Western blue stabilized substrate for AP (Promega) 显色, 光密度扫描半定量分析显影条带^[4,5]。

9 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计学处理使用 SPSS 统计软件, 采用方差分析方法判断其差异显著性。

结 果

1 大鼠心肌肥厚时心脏重量参数及组织形态学的变化

与对照组比较[(HW/BW:(3.39 ± 0.25) mg/g 和 LVW/BW:(2.33 ± 0.11) mg/g], 大鼠皮下注射 ISO 1 d 至 5 d 时, 心脏重量参数 HW/BW、LVW/BW 无明显改变, 在 ISO 7 d 时 HW/BW 为(3.89 ± 0.35) mg/g, LVW/BW 为(2.67 ± 0.26) mg/g, 显著高于对照组($P < 0.01$)。

HE 染色可见 ISO 7 d 时心肌细胞胞浆变宽, 胞核变大, 相同倍数单位面积细胞数减少, 心内膜下层有大片纤维化区域和散在的局部心肌坏死灶, 其余的心肌纤维增粗, 排列紊乱, 具有明显的心肌肥厚纤维化表现, 见图 1、2。

2 ISO 作用不同时间心肌组织多胺含量的变化

与正常对照组相比, ISO 1 d 和 3 d 时大鼠左室心肌组织腐胺含量增加($P < 0.05$), 5 d 和 7 d 时腐胺含量显著增加, 分别是对照组的 2.1 倍和 2.3 倍($P < 0.01$); 精脒含量在 ISO 3 d 时开始增加($P < 0.05$),

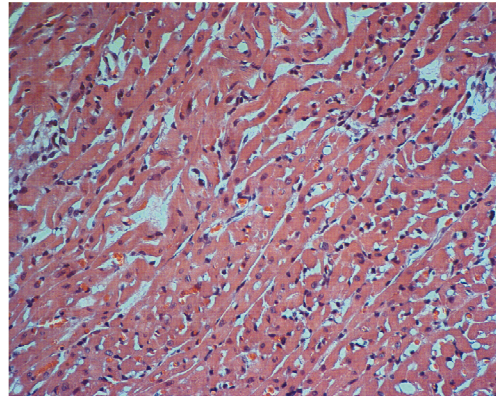


Fig 1 Myocardium tissue of rats in control group under light microscope (HE, ×200).

图 1 正常组心肌组织

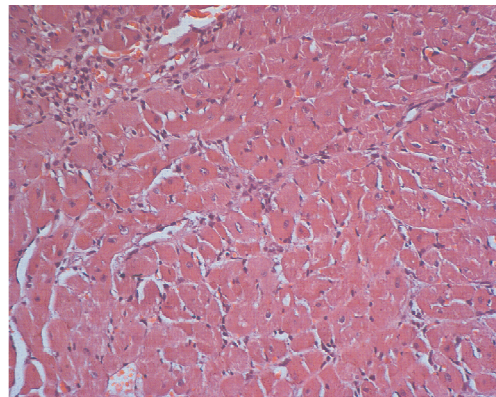


Fig 2 Rat myocardium tissue under light microscope in ISO 7 d group (HE, ×200).

图 2 ISO7 d 组心肌组织

并持续升高, ISO 5 d 和 7 d 时精脒含量增加显著, 分别增加了 30% 和 44% ($P < 0.01$); 精胺含量增加较晚, 在 ISO 5 d、7 d 时增多($P < 0.05$)。总多胺池在 ISO 3 d 时增多, 7 d 时约增加了 33% ($P < 0.01$), 见图 3。

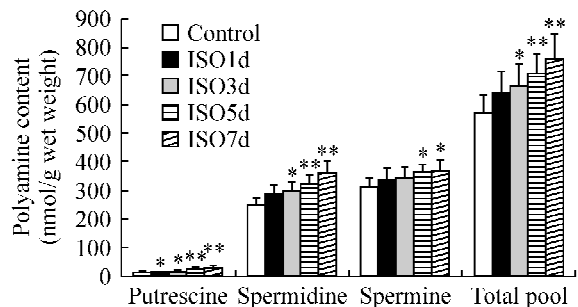


Fig 3 Changes of the content of polyamine in rat cardiac tissue during cardiac hypertrophy. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 3 心肌肥厚过程中大鼠心肌组织多胺含量的变化

3 ISO 作用不同时间 ODC、SSAT mRNA 的表达变化

RT-PCR 法检测心肌组织内 ODC、SSAT mRNA

的表达。结果显示, *ODC/β-actin* 的相对值与对照组相比, ISO 1 d 时 *ODC* 升高 ($P < 0.05$), ISO 3 d 时显著升高, 持续至 7 d, ISO 7 d 时 *ODC* 的表达量约为对照组的 1.9 倍 ($P < 0.01$), 见图 4。 *SSAT/β-actin* 的相对值与正常组相比, ISO 1 d 时 *SSAT* 表达量即显著增加 ($P < 0.01$), 持续至 ISO 7 d ($P < 0.01$), 7 d 时 *SSAT* 的表达量约为对照组的 4.9 倍 ($P < 0.01$), 见图 5。

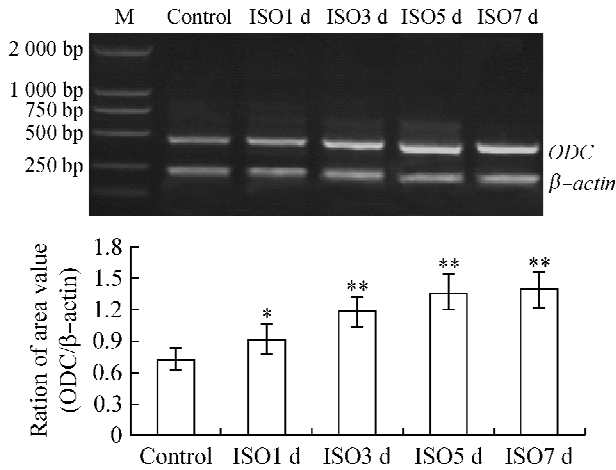


Fig 4 The RT-PCR amplification of ornithine decarboxylase (*ODC*) mRNA in cardiac hypertrophy induced by ISO. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 4 ISO 所致大鼠心肌肥厚过程中 *ODC* mRNA 的扩增

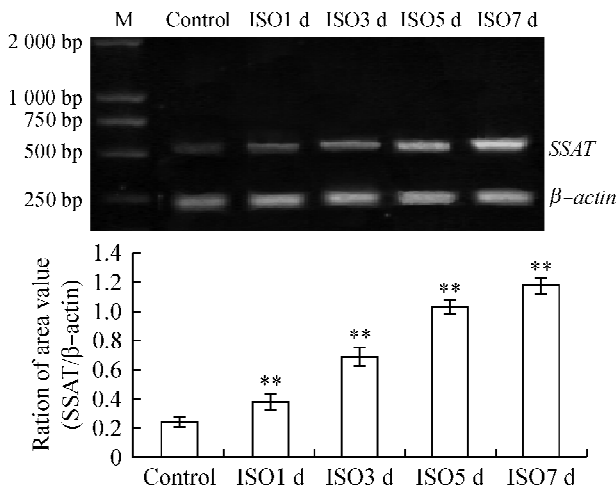


Fig 5 The RT-PCR amplification of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (*SSAT*) mRNA in cardiac hypertrophy induced by ISO. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 5 ISO 所致大鼠心肌肥厚过程中 *SSAT* mRNA 的扩增

4 ODC, SSAT 蛋白在 ISO 诱导的大鼠心肌肥大过程中的表达

ODC/actin 的相对值与对照组比较, ISO1 d 至 5 d 时 *ODC* 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), ISO7 d 时, *ODC* 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 约为对照组的 1.2

倍, 见图 6。 *SSAT/actin* 的相对值与对照组比较, ISO 5 d 时, *SSAT* 蛋白表达开始增加 ($P < 0.05$), ISO 7 d 时显著增加 ($P < 0.01$), 见图 7。

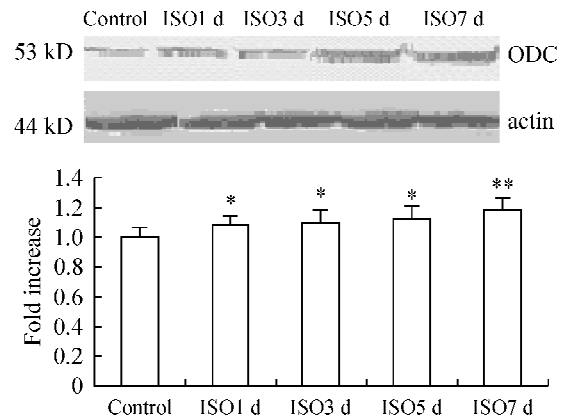


Fig 6 Expression of ornithine decarboxylase (*ODC*) protein during cardiac hypertrophy induced by ISO. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 6 异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥大过程中 *ODC* 蛋白的表达

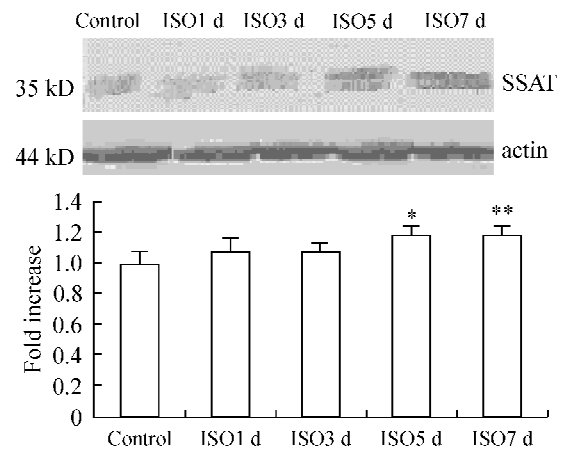


Fig 7 Expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (*SSAT*) protein during cardiac hypertrophy induced by ISO. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图 7 异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥大过程中 *SSAT* 蛋白的表达

讨 论

心肌肥厚与多种心血管疾病发展过程有关, 临床研究表明, 心肌肥厚不仅是心衰前的一种适应性反应, 而且是发生心肌缺血、心律失常和猝死的独立危险因素, 其发生机制尚未完全阐明。

交感神经过度兴奋, 儿茶酚胺长期强刺激可造成心肌细胞肥厚和心肌间质胶原改变。文献报道^[6-8], 连续用 β 受体激动剂异丙肾上腺素给大鼠皮下注射, 引起大鼠心肌肥厚和心脏纤维化、RAS 系

统激活。心肌生长是由于儿茶酚胺的直接刺激和通过肾上腺素能神经兴奋引起代谢变化、血流动力学改变和神经内分泌活动介导而造成。Boluyt 等^[9]报道,用 ISO 慢性刺激大鼠,可引起大鼠心肌肌浆网 Ca^{2+} - ATPase mRNA 表达下降,心肌细胞转化生长因子(TGF) - β_1 mRNA 水平增高,通过改变心肌基因表达而造成心肌肥厚和心脏纤维化。

多胺是细胞增殖调控的重要物质,ODC 是多胺合成的关键酶,在该酶的催化下,鸟氨酸脱羧基为腐胺,是动物细胞合成多胺的限速步骤。最新研究发现,在缺血的心肌细胞发生凋亡时,ODC 活性迅速增高,多胺含量增加,用二氟甲基鸟氨酸(ODC 不可逆抑制剂)抑制 ODC 活性和多胺含量可降低心肌细胞凋亡的发生^[10]。缺血/再灌注损伤时,心肌多胺代谢失衡,低浓度的外源性精胺干预对再灌注损伤心肌有保护作用^[11]。因此,以多胺代谢通路为靶点,调控细胞内多胺稳态,可能为临床许多疾病的治疗提供了新的思路。

实验中观察到 ISO 7 d 组大鼠心脏重量参数明显高于对照组,心脏增大,心肌肥厚,表明成功复制了异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚的动物模型。应用高效液相色谱、RT-PCR 和免疫印迹的方法,观察了 ISO 作用不同时间点心肌组织内多胺含量及多胺合成与分解代谢关键酶 ODC 和 SSAT 的表达。实验表明,在心肌肥厚发展过程中,大鼠左室心肌组织腐胺和精胺含量显著增加,精胺含量增加,总多胺池增加。大鼠左室心肌组织 ODC 和 SSAT 的表达在 ISO 作用初期增加,随着作用时间延长,增加显著。ODC 存在于胞浆内,可被快速诱导生成。生长刺激因素如激素、生长因子、有丝分裂促进剂、促癌剂等均可诱导 ODC 的转录和翻译,促进细胞的生长、分化。精胺/精胺乙酰基转移酶(SSAT)为多胺分解代谢的限速酶,催化精胺、精胺的分解代谢,将精胺、精胺乙酰化生成 N1-乙酰精胺、N1-乙酰精胺,二者被载体转运出细胞或在多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)的作用下逆转化为腐胺,同时生成有毒的代谢副产物 H_2O_2 和 3-乙酰氨基丙烷(3-AP)。本实验中 ISO 快速诱导了多胺合成代谢的关键酶 ODC 的转录和翻译,腐胺和精胺含量增加显著,SSAT 可在转录、翻译及蛋白质降解几个水平上受多胺的负反馈调节,腐胺的显著增加,可能也是由精胺、精胺逆转化而来,表明 ISO 诱导的心肌肥大可能与 ODC 和

SSAT 表达增强,多胺代谢紊乱密切相关。

研究结果提示,大鼠心肌组织多胺代谢限速酶的表达增强,多胺含量增加参与了 ISO 所致大鼠心肌肥大的发生,具体机制和信号转导途径有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Zheng M, Han DQ, Xiao RP. Distinct beta - adrenergic receptor sub - type signaling in the heart and their pathophysiological relevance[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2004, 56 (1): 1 - 15.
- [2] Hasegawa S, Nakano M, Hamana K, et al. Decrease myocardial polyamine concentration in rats with myocardial infarction[J]. *Life Sci*, 1997, 19(60): 1643 - 1650.
- [3] Carmen B, Jose MR, Ana BV, et al. Increase in ornithine decarboxylase activity in the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 422 (1 - 2): 101 - 107.
- [4] Borges JC, Silva JA Jr, Gome MA, et al. Tonin in rat heart with experimental hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284 (6): H2263 - H2268.
- [5] 赵雅君, 徐长庆, 李全凤, 等. 应用反向高效液相色谱分析离体心脏灌流大鼠心肌组织中的多胺[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(2): 412 - 413.
- [6] 李 弘, 徐长庆, 孙铁华, 等. 多巴胺受体蛋白在大鼠心肌肥厚时的表达变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(7): 1373 - 1377.
- [7] 孙铁华, 张 力, 徐长庆, 等. 不同鼠龄大鼠心肌组织中钙感受体的表达及与缺氧 - 再灌注损伤的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(8): 1506 - 1509.
- [8] Ocaranza MP, Diaz - Araya G, Chiong M, et al. Isoproterenol an angiotensin I - converting enzyme in lung, left ventricle and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40(2): 246 - 254.
- [9] Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, et al. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy - associated genes in rat heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1995, 269(2 pt2): H638 - H647.
- [10] Tantini B, Fiumana E, Cetrullo S, et al. Involvement of polyamines in apoptosis of cardiac myoblasts in a model of simulated ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40 (6): 775 - 782.
- [11] 赵雅君, 徐长庆, 时 颀, 等. 多胺对大鼠缺氧复氧心肌细胞内钙的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21 (10): 1938 - 1941.