

维拉帕米对肉鸡腹水综合征患鸡心肌细胞 c-fos 和 c-jun 表达的影响

利 凯^{1,2}, 马利芹¹, 徐 彤^{1,2}, 王建琳², 王慧钰^{2*}, 乔 健²

(1. 河北北方学院动物科技学院, 张家口 075131; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘 要: 右心肥大衰竭是导致腹水综合征(ascites syndrome, AS)患鸡发病的重要因素。作者通过免疫组化和原位杂交技术初步探讨 c-fos 和 c-jun 在 AS 肉鸡右心肥大和衰竭过程中的变化及维拉帕米对其表达的影响。结果发现: 在 22、29、36、43 和 50 日龄时, 与对照组肉鸡相比, 低温组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos/c-jun 蛋白和 mRNA 的平均光密度值显著或极显著($P < 0.05$; $P < 0.01$)升高, 其 mRNA 的阳性面积百分比也极显著升高($P < 0.01$); 与低温组肉鸡相比, 维拉帕米组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos/c-jun 蛋白和 mRNA 的平均光密度值显著或极显著($P < 0.05$; $P < 0.01$)降低, 其 mRNA 的阳性面积百分比也极显著降低($P < 0.01$)。结果表明 c-fos 和 c-jun 癌基因在右心肥大和衰竭中起着重要作用。维拉帕米可有效抑制 c-fos 和 c-jun 癌基因的表达, 有利于防止右心肥大和功能性衰竭。

关键词: 肉鸡; 腹水综合征; 维拉帕米; 心肌细胞; 原癌基因

中图分类号: S852.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-1082-06

Effects of Verapamil on the Expression of c-fos and c-jun in Cardiac Myocytes of the Ascites Syndrome in Broilers

LI Kai^{1,2}, MA Li-qin¹, XU Tong^{1,2}, WANG Jian-lin², WANG Hui-yu², QIAO Jian^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Right ventricular hypertrophy and failure is an important factor in the development of ascites syndrome. In this study, the technology of immunohistochemistry and *in situ* hybridization were adopted to observe the changes of c-fos and c-jun in cardiac myocytes of broilers under low temperature and treated with verapamil. At the same time, the mechanism of c-fos and c-jun in right ventricular hypertrophy and failure was discussed. Compared with the controls, the broilers under low temperature showed that the average optical density of c-fos/c-jun protein and mRNA of right ventricular myocytes significantly increased on 22, 29, 36, 43 and 50 days of age, and the percentage of positive area about c-fos/c-jun mRNA expression also significantly increased. Compared with broilers under low temperature, the broilers given verapamil showed that the average optical density of c-fos/c-jun protein and mRNA of right ventricular myocytes significantly decreased on 22, 29, 36, 43 and 50 days of age, and the percentage of positive area about c-fos/c-jun mRNA expression also significantly decreased. These data demonstrated that c-fos and c-jun are important factors in right ventricular hypertrophy and failure. The verapamil can inhibit the expression of c-fos and c-jun, and prevent right ventricular hypertrophy and failure.

Key words: broiler; ascites syndrome; verapamil; cardiac myocyte; oncogene

收稿日期: 2008-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371063)

作者简介: 利 凯(1969-), 男, 副教授, 博士, 主要从事动物临床疾病和禽类病理生理研究, E-mail: likaiwet@163.com

* 通讯作者: 乔 健, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

右心肥大衰竭是肉鸡 AS 发生和发展的重要环节。原癌基因是一类编码关键性调控蛋白的正常细胞基因,它在生物进化中是高度保守的,可编码细胞核内多种信息分子,对细胞的增殖、分化都起重要作用^[1]。长期血流动力学超负荷可导致心肌代偿性肥大和重塑。Aikawa 等发现压力超负荷可增加鼠心肌细胞 c-fos、c-myc 和 c-Ha-ras 的表达水平,提示原癌基因参与心肌肥厚^[2-3]。目前研究认为压力超负荷以及各种多种生长因子作用于心肌细胞膜受体后,可通过信号传递系统导致一些早期反应基因异常表达,如 c-fos、c-myc 和 c-jun 等。这些早期反应基因在启动蛋白合成和细胞生长方面起着重要的信号调节作用,其核内蛋白质表达产物构成转录因子,后者可作用于次级反应基因,改变与心肌肥厚有关的蛋白质的表达,从而导致心肌组织中蛋白合成增加,蛋白表型向胚胎型转化等心肌肥厚特征性变化^[4]。临床研究表明心肌肥大不仅是心脏功能衰竭前的一种适应,也是心脏病发生和死亡的主要因素。因此有必要探讨心肌肥厚过程中原癌基因的表达规律及其作用机制。目前,关于 AS 肉鸡右心室肥大、衰竭过程中 c-fos 和 c-jun 的表达变化及其作用机制未见报道,作者旨在观察低温诱发 AS 发生过程中右心心肌细胞 c-fos 和 c-jun 基因表达变化以及钙拮抗剂维拉帕米对其表达的影响,从而初步探讨 c-fos 和 c-jun 在 AS 肉鸡右心肥大和功能衰竭过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

1日龄 AA 商品代肉公雏 300 只,常规育雏、免疫,15 日龄时随机平均分成 3 组,(1)对照组:在常温(22~23℃)条件下饲养;低温组:在低温(9~11℃)条件下饲养;(3)维拉帕米组:在低温(9~11℃)条件下饲养,按 100 mg·kg⁻¹维拉帕米饮水。3 组其它饲养条件相同,自由采食和饮水。在 22、29、36、43 和 50 日龄自各组鸡右心室取材,常规制备 5 μm 石蜡切片。

1.2 实验材料

c-fos 和 c-jun 癌基因蛋白免疫组化试剂盒,兔抗 c-fos 和 c-jun 多克隆抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品。浓缩型 DAB 显色试剂盒,PBS 粉剂为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。c-fos 和 c-jun 原位杂交检测试剂盒,原位杂交专用盖玻

片,多聚赖氨酸(POLY LYSINE),焦炭酸乙二酯(DEPC)为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.3 c-fos 和 c-jun 蛋白免疫组化染色

按照试剂盒说明进行操作。

1.4 c-fos 和 c-jun mRNA 原位杂交染色

按照试剂盒说明进行操作。

1.5 c-fos/c-jun 染色结果分析

用 OLYMPUS S-BH2 型显微镜-MOTIC3.0 病理图像处理系统分别对每张切片在 40 倍物镜下随机摄取图像,用 Image-pro plus 5.0 图像分析软件测量所采集心肌组织染色阳性面积百分比(the percentage of positive area)和/或平均光密度值(average optical density, AOD)。每组在不同时间段各取 5 个样品,每个样本测量 5 个视野,取其平均值。阳性面积百分比和/或平均光密度数值越大,表示 c-fos/c-jun 表达越强。

1.6 数据处理

SPSS11.0 软件进行单向方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。数据用平均数±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果

2.1 低温对肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响

经免疫组化染色后,心肌细胞 c-fos 和 c-jun 蛋白阳性部位表现为棕色颗粒,在胞质和胞核内均出现阳性颗粒。本试验中以心肌细胞内阳性颗粒平均光密度代表蛋白表达的相对量。对照组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 和 c-jun 蛋白的平均光密度值在 36 日龄时最高,后期呈下降趋势。与对照组相比,低温组肉鸡右心室心肌细胞在 22、29、36、43 和 50 日龄时 c-fos 和 c-jun 蛋白的平均光密度值极显著高于对照组($P < 0.01$),并在 36 日龄达到最高,后期也呈现下降趋势(见表 1,图 1、2)。

2.2 维拉帕米对肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响

采取维拉帕米处理后,维拉帕米组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 蛋白的平均光密度值在 22 和 50 日龄时,显著低于同期低温组肉鸡($P < 0.05$)。在 29、36 和 43 日龄时则极显著低于同期低温组肉鸡($P < 0.01$)。心肌细胞 c-jun 蛋白的平均光密度值在 22、29、36、43 和 50 日龄时则极显著低于同期低温组肉鸡($P < 0.01$)(见表 1,图 1、2)。

表 1 各组肉鸡心肌组织 c-fos 和 c-jun 蛋白表达的平均光密度的动态变化

Table 1 The mean optical density of c-fos and c-jun protein expression in right ventricular myocytes

日龄/d Age	22	29	36	43	50
	c-fos 蛋白				
对照组 Control group	0.215±0.014	0.210±0.019	0.222±0.015	0.225±0.014	0.210±0.014
低温组 Low temperature group	0.243±0.010**	0.265±0.010**	0.305±0.019**	0.268±0.015**	0.245±0.012**
维拉帕米组 Verapamil treated group	0.230±0.006 [△]	0.227±0.015 ^{△△}	0.250±0.014 ^{△△}	0.242±0.010 ^{△△}	0.232±0.004 [△]
	c-jun 蛋白				
对照组 Control group	0.222±0.008	0.223±0.008	0.230±0.006	0.222±0.013	0.217±0.012
低温组 Low temperature group	0.253±0.008**	0.270±0.009**	0.298±0.015**	0.260±0.011**	0.252±0.012**
维拉帕米组 Verapamil treated group	0.227±0.015 ^{△△}	0.237±0.008 ^{△△}	0.245±0.018 ^{△△}	0.237±0.008 ^{△△}	0.228±0.008 ^{△△}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与同日龄对照组比较。[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, 与同日龄低温组比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with that of the age-matched normal temperature group. [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, compared with that of the age-matched low temperature group.

2.3 低温对肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响

经原位杂交染色后, 心肌细胞 c-fos 和 c-jun mRNA 阳性部位表现为棕色颗粒, 在胞质内出现阳性颗粒。与对照组相比, 低温组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos mRNA 平均光密度值在 22、29、36、43 和 50 日龄时极显著高于对照组肉鸡 ($P < 0.01$), 阳性面积百分比也极显著高于对照组肉鸡 ($P < 0.01$), 并且 c-fos mRNA 平均光密度值和阳性面积百分比在 36 日龄时相对值最高。在 22 和 50 日龄时, 低温组肉鸡右心室心肌细胞 c-jun mRNA 平均光密度值显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在 29、36、43 日龄时则极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。c-jun mRNA 阳性面积百分比在 22、29、36、43 和 50 日龄时极显著高于对照组肉鸡 ($P < 0.01$), 并且 c-jun mRNA 平均光

密度值和阳性面积百分比在 36 日龄时相对值最高 (见表 2, 图 3、4)。

2.4 维拉帕米对肉鸡右心室心肌细胞 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的影响

维拉帕米组肉鸡右心室心肌细胞 c-fos mRNA 的平均光密度值在 29、43 和 50 日龄时显著低于低温组肉鸡 ($P < 0.05$)。在 22 和 36 日龄时则极显著低于低温组肉鸡 ($P < 0.01$)。并且 c-fos mRNA 阳性面积百分比在 22、29、36、43 和 50 日龄时极显著低于对照组肉鸡 ($P < 0.01$); 维拉帕米组肉鸡右心室心肌细胞 c-jun mRNA 的平均光密度值在 22、29 和 43 日龄时显著低于低温组肉鸡 ($P < 0.05$)。在 36 日龄时则极显著低于低温组肉鸡 ($P < 0.01$)。并且 c-jun mRNA 阳性面积百分比在 22、29、36、43 和 50 日龄时极显著低于对照组肉鸡 ($P < 0.01$) (见表 2、3, 图 3、4)。

表 2 各组肉鸡心肌组织 c-fos 和 c-jun mRNA 表达的平均光密度的动态变化

Table 2 The mean optical density of c-fos and c-jun mRNA expression in right ventricular myocytes

日龄/d Age	22	29	36	43	50
	c-fos mRNA				
对照组 Control group	0.220±0.013	0.223±0.012	0.230±0.006	0.220±0.015	0.213±0.010
低温组 Low temperature group	0.242±0.008**	0.248±0.012**	0.313±0.022**	0.265±0.024**	0.238±0.008**
维拉帕米组 Verapamil treated group	0.225±0.008 ^{△△}	0.227±0.018 [△]	0.253±0.016 ^{△△}	0.235±0.012 [△]	0.223±0.008 [△]
	c-jun mRNA				
对照组 Control group	0.225±0.008	0.227±0.008	0.235±0.005	0.233±0.008	0.222±0.012
低温组 Low temperature group	0.238±0.008*	0.245±0.010**	0.342±0.019**	0.250±0.009**	0.242±0.012*
维拉帕米组 Verapamil treated group	0.223±0.012 [△]	0.228±0.013 [△]	0.262±0.020 ^{△△}	0.235±0.008 [△]	0.230±0.009

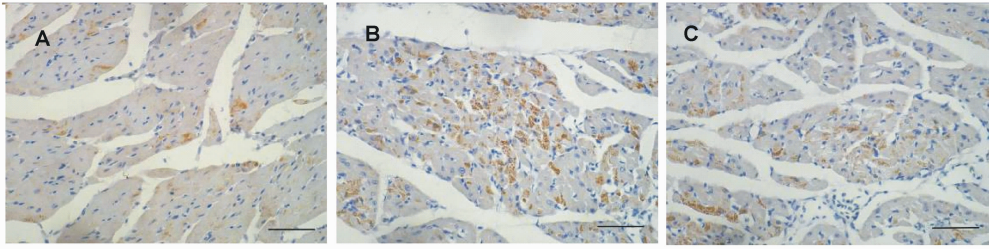


图 1 36 日龄时,与对照组(A)相比,低温组(B)肉鸡右心肌细胞 c-fos 蛋白表达明显增加,维拉帕米组(C)肉鸡右心肌细胞 c-fos 蛋白表达与低温组相比明显减少。免疫组化染色,Bar=50 μm

Fig. 1 On 36 day, compared with control group(A), the c-fos protein expression in right ventricular myocytes was increased in low temperature group(B). The c-fos protein expression in right ventricular myocytes was decreased in verapamil group(C) compared with low temperature group. Immunohistochemistry staining, Bar=50 μm

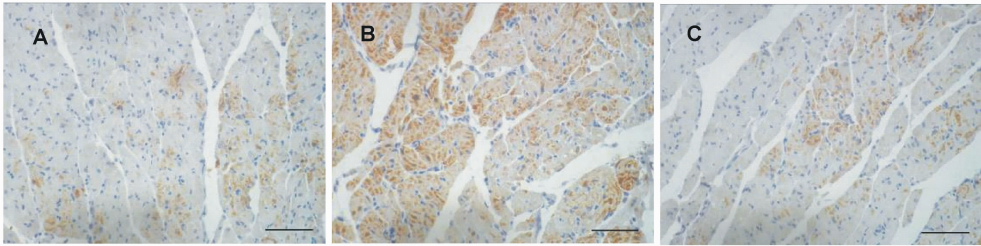


图 2 36 日龄时,与对照组(A)相比,低温组(B)肉鸡右心肌细胞 c-jun 蛋白表达明显增加,维拉帕米组(C)肉鸡右心肌细胞 c-jun 蛋白表达与低温组相比明显减少。免疫组化染色,Bar=50 μm

Fig. 2 On 36 day, compared with control group(A), the c-jun protein expression in right ventricular myocytes was increased in low temperature group(B). The c-jun protein expression in right ventricular myocytes was decreased in verapamil group(C) compared with low temperature group. Immunohistochemistry staining, Bar=50 μm

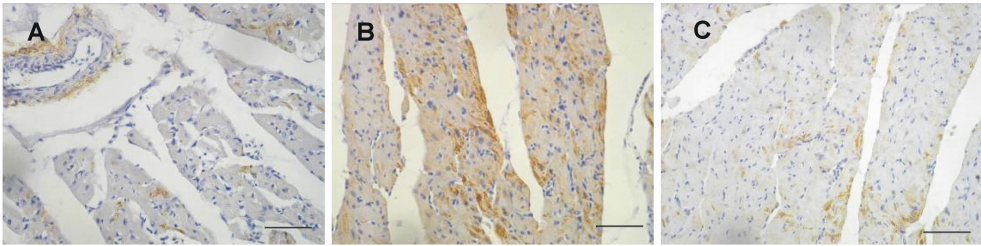


图 3 36 日龄时,与对照组(A)相比,低温组(B)肉鸡右心肌细胞 c-fos mRNA 表达明显增加,维拉帕米组(C)肉鸡右心肌细胞 c-fos mRNA 表达与低温组相比明显减少。原位杂交染色,Bar=50 μm

Fig. 3 On 36 day, compared with control group(A), the c-fos mRNA expression in right ventricular myocytes was increased in low temperature group(B). The c-fos mRNA expression in right ventricular myocytes was decreased in verapamil group(C) compared with low temperature group. *in situ* hybridization staining, Bar=50 μm

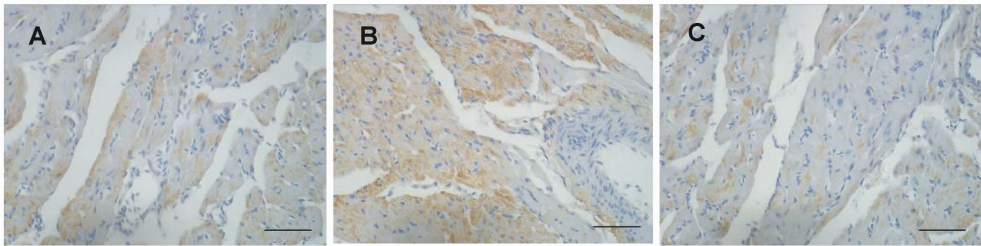


图 4 36 日龄时,与对照组(A)相比,低温组(B)肉鸡右心肌细胞 c-jun mRNA 表达明显增加,维拉帕米组(C)肉鸡右心肌细胞 c-jun mRNA 表达与低温组相比明显减少。原位杂交染色,Bar=50 μm

Fig. 4 On 36 day, compared with control group(A), the c-jun mRNA expression in right ventricular myocytes was increased in low temperature group(B). The c-jun mRNA expression in right ventricular myocytes was decreased in verapamil group(C) compared with low temperature group. *in situ* hybridization staining, Bar=50 μm

表 3 各组肉鸡心肌组织 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 表达的阳性面积百分比的动态变化

Table 3 The percentage of positive area of *c-fos* and *c-jun* mRNA expression in right ventricular myocytes %

日龄/d Age	对照组 Control group	低温组 Low temperature group	维拉帕米组 Verapamil treated group
c-fos mRNA			
22	3.37±0.00	3.87±0.00**	3.35±0.00△△
29	3.60±0.00	4.46±0.00**	3.97±0.00△△
36	3.74±0.00	5.63±0.00**	4.41±0.00△△
43	3.62±0.00	5.12±0.00**	4.52±0.00△△
50	3.16±0.00	4.56±0.00**	4.10±0.00△△
c-jun mRNA			
22	3.31±0.00	4.06±0.00**	3.73±0.00△△
29	3.78±0.00	4.77±0.00**	4.19±0.00△△
36	4.27±0.00	5.67±0.00**	4.91±0.00△△
43	4.25±0.00	5.25±0.00**	4.91±0.00△△
50	3.85±0.00	5.05±0.00**	4.43±0.00△△

3 讨论

3.1 低温导致肉鸡右心肥大和衰竭可能与 CMC 癌基因表达增多有关

CMC 肥大是心脏对压力负荷的一种适应性反应,其特征为蛋白合成、同功酶表达改变,细胞生长和重塑。近年来人们发现原癌基因在生理状态下可调控机体细胞的生长、分化和细胞内信息的传递。其中 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 在启动蛋白合成和细胞生长方面起着重要的信号调节作用^[5-6]。在心脏,多种刺激可导致 *c-fos* 和 *c-jun* mRNAs 蛋白的表达增高,如压力负荷、引力、血管紧张素 II、内皮素、甲状腺素以及 α 和 β 肾上腺素激动剂等。Schunkert 等研究发现老鼠收缩压升高可导致心肌 *c-fos* 和 *c-jun* 早期基因表达升高^[7]。另外也有研究表明结扎主动脉升部可导致心肌细胞 *c-fos*、*c-jun* 和 *c-myc* 原癌基因表达升高^[5,8]。

长期环境低温可导致肉鸡发生肺动脉高压和右心肥大、衰竭,而右心肥大、衰竭是 AS 患鸡死亡的主要原因。Han 等^[9]研究证实 AS 患鸡血浆中的血管紧张素 II 和内皮素-1 含量升高,其是否作用于肉鸡的心肌细胞导致细胞早期癌基因表达增多有待进一步研究。本研究中,对照组肉鸡右心室 *c-fos* 和

c-jun 癌基因蛋白和 mRNA 表达前期呈现增长趋势,特别是在 29 和 36 日龄之间,而在后期,即 36 日龄后则呈下降趋势,这可能与肉鸡的生长发育有一定的关系。与同期对照组肉鸡相比较,低温组肉鸡右心室 *c-fos* 和 *c-jun* 癌基因蛋白和 mRNA 表达明显升高,特别是在 36 日龄左右,这可能与肺动脉高压和各种刺激因素(如血管紧张素 II 和内皮素-1 等)有关。在 36 日龄后,低温组肉鸡右心室 *c-fos* 和 *c-jun* 癌基因蛋白和 mRNA 表达呈现下降趋势,这可能与心肌代偿性适应有关。

3.2 维拉帕米可有效抑制右心室 CMC 癌基因的表达,防止右心肥大和衰竭

研究表明,促心肌肥厚信号是通过蛋白激酶 C (PKC) 介导引起 *c-fos* 和 *c-jun* 表达增强,并认为 Ca^{2+} 可能参与了这一信号传导过程,即 $[Ca^{2+}]_i$ 作为重要的第二信使在原癌基因表达和心肌肥大中起着重要的作用。各种刺激包括动脉压升高、心肌牵拉、肾上腺素、细胞因子以及血管紧张素 II 等,它们作用的共同机制可能是通过引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高而实现的。Limas 等发现在心肌肥大模型中细胞内钙处于超负荷状态^[10]。Motz 用钙通道阻滞剂 (Nifedipine) 治疗心肌肥大,20 周后观察到心脏质量逆转^[11]。刘晓红等发现肌质网 Ca^{2+} 释放抑制剂红能显著降低去甲肾上腺素(NE)诱导的 *c-fos*、*c-myc* 表达^[12]。董世山研究发现 AS 患鸡心、肺总钙含量增加,同时胞内游离钙出现超载现象,从在体水平表明钙信号转导异常可能与 AS 的发生有关^[13]。维拉帕米(Verapamil)是人工合成的较早应用的钙拮抗剂,主要阻断 L 型电压依赖性钙通道。目前已证实维拉帕米可有效预防肉鸡腹水的发生和降低腹水心脏指数^[14]。本试验结果显示维拉帕米可显著抑制低温条件下肉鸡心肌细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白和 mRNA 的表达,从而有效地防止右心肥大,进一步表明钙离子参与了原癌基因的表达。

4 小结

长期环境低温可导致肉鸡右心室心肌细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白和 mRNA 表达升高,从而导致右心肥大和功能性衰竭。钙通道阻滞剂维拉帕米可有效抑制低温肉鸡右心室心肌细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白和 mRNA 表达,有利于防止右心肥大和功能性衰竭。

参考文献:

- [1] SIMPSON P C. Prolo-oncogenic and cardiac hypertrophy[J]. *Annu Rev Physiol*, 1989, 51:189.
- [2] AIKAWA R, KOMURO I, NANAI R. Cardiac gene therapy[J]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58(1):79-85.
- [3] KOMURO I, KURABAYESHI M. Expression of cellular oncogenes in myocardium during the developmental stage end pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart[J]. *Circ Res*, 1988, 62:1075-1079.
- [4] NADRUZ W JR, KOBARG C B, Constancio S S, et al. Load-induced transcriptional activation of rat myocardium c-jun regulation by myocyte enhancer factor 2[J]. *Circ Res*, 2003, 92:243-251.
- [5] SCHUNKERT H, JAHN J, IZUMO S, et al. Localization and regulation of c-fos and c-jun protooncogene induction by systolic wall stress in normal and hypertrophied rat hearts[J]. *proc Natl Acad Sci*, 1991, 88:11480-11484.
- [6] GIDH-JAIN M, HUANG B, JAIN P, et al. Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30:627-637.
- [7] SCHUNKERT H, WEINBERG E O, BRUCK-SCHLEGEL G, et al. Alteration of growth responses in established cardiac pressure overload hypertrophy in rats with aortic banding[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6): 2768-2774.
- [8] 魏 蕾, 欧阳静萍, 杨静薇, 等. 大鼠压力超负荷性心肌肥厚早期 c-fos mRNA 表达的变化[J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20(4):277-278.
- [9] Han B, Yoon S, Han H, et al. Effects of L-arginine on endothelium derived factors and cyclic nucleotides in broilers under low ambient temperature[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2004, 17(11):1570-1574.
- [10] Limas C J, Spier S S. Effect of antihypertensive therapy on calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum of SHR[s][J]. *Cardiovasc Res*, 1980, 14(12):692-699.
- [11] MOTZ W. left ventricular function and collagen content after regression of hypertensive hypertrophy[J]. *Hypertension*, 1989, 13:43-50.
- [12] 刘晓红, 魏振宇, 高原. 苕红、维拉帕米对去甲肾上腺素诱导的心肌 c-fos、c-myc 表达的影响[J]. 遵义医学院学报, 2004, 27(1):14-15.
- [13] DONG S S, LI K, WANG Y C, et al. The change of calcium in right ventricle of ascites syndrome broiler[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Science*, 2005, 36:1202-1205
- [14] 利 凯, 乔 健, 董世山, 等. 维拉帕米对低温诱发腹水综合征患鸡右心功能的影响[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(5):411-414.