

转基因小鼠中糜酶在心脏血管紧张素形成中的作用

李鹏 陈兰英*

(中国医学科学院、中国协和医科大学心血管病研究所, 阜外心血管病医院, 北京 100037. * 联系人, Email: lychen@mail.sparkice.com.cn)

摘要 为研究人心糜酶(hChymase)在心脏血管紧张素(angiotensin, Ang)形成中的作用及在心肌重塑过程中的意义,建立了 MLC₂-人心糜酶转基因小鼠.用 RT-PCR 方法分析了糜酶基因的组织特异性表达和心脏中 I 型胶原基因的转录表达,并用放射免疫法检测了心脏糜酶及血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活力以及心脏和血浆的 Ang 含量,用明胶酶谱法检测了心脏基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活力;并对糜酶转基因小鼠的心脏肥大表型用生理学和形态学方法进行了初步观察.和非转基因小鼠(对照组)比较,结果表明:(1)糜酶转基因可在小鼠心脏中特异表达;(2)糜酶转基因小鼠心脏糜酶活力较对照((0.27 ± 0.07) U/mg vs (0.15 ± 0.02) U/mg, $P < 0.05$)显著升高,而 ACE 活力不变((0.17 ± 0.03) U/mg vs (0.18 ± 0.02) U/mg);(3)糜酶转基因小鼠心脏 Ang 含量升高,约为对照的 3 倍((1984 ± 184) pg/g vs (568 ± 88) pg/g, $P < 0.05$),而血浆 Ang 含量不变((218 ± 106) pg/mL vs (234 ± 66) pg/mL);(4)糜酶转基因小鼠心脏基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活力及 I 型胶原 mRNA 水平也显著升高($P < 0.05$),而 II 型胶原 mRNA 水平及 I/II 型胶原的 mRNA 比值变化不明显;(5)糜酶转基因小鼠的血压、心率、心重/体重比及心肌细胞直径也无明显变化.提示人心糜酶基因在转基因小鼠心脏中过度表达,催化 Ang 的形成,并通过活化 MMP-9 影响心脏间质胶原代谢,从而参与心肌重塑过程.

关键词 糜酶 糜酶转基因小鼠 血管紧张素 心肌重塑 胶原

心脏组织存在的局部肾素血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)与心肌重塑密切相关^[1].已有资料说明体内血管紧张素(angiotensin, Ang)形成主要是经血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)途径,但 Ang 的形成仍具有多种途径^[2],其中 1990 年从人心脏克隆的糜酶(chymase)是一种丝氨酸蛋白酶,它被认为是人心脏中主要的 Ang 形成

酶,可能在心肌重塑中起重要作用,由此提出了心脏 Ang II 形成的双途径假说^[3]. 由于该结论主要来自体外实验,有许多观察还提示在心功能紊乱(包括心脏肥厚、心肌梗塞和心衰)时 chymase 并未发生变化^[4~6],总之,对人心脏 Ang II 的形成是否存在糜酶途径及糜酶在心脏疾病中的生物学作用意见不一. 为此,作者实验室构建了心肌细胞特异高水平表达的大鼠肌球蛋白轻链 2 启动子(myosin light chain-2, MLC₂)-人心糜酶融合基因,成功地建立了携带人心脏糜酶基因的转基因小鼠模型^[7],本文报道了转基因小鼠中糜酶在心脏 Ang II 形成和心肌重塑中作用的研究结果.

1 材料与方法

(i) 转基因小鼠. 本实验室已建立了稳定传代的 MLC₂-人心糜酶转基因小鼠的纯合鼠系,实验用 6~9 代 20 周龄的雄性转基因阳性鼠,以鼠龄匹配的非转基因鼠为对照,常规饲养.

(ii) 试剂. TRIzol 试剂及 dNTP, Oligo(dT)₁₅, M-MLV 逆转录酶及重组 RNase 抑制剂为 Gibco 公司产品; Tag DNA 聚合酶为华美公司产品; 所用引物均在北京柏威公司及上海生工公司合成. 血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I), Ang II 及 aprotinin 为 Sigma 公司产品; lisinopril 由英国捷立康公司惠赠; Ang I 及 Ang II 放射免疫分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 其余试剂均为国产或进口分析纯.

(iii) mRNA 表达检测. 按照 Promega 公司提供的说明书用 TRIzol 试剂提取小鼠心脏总 RNA. 以 2 μg 总 RNA 为模板进行反转录. 取 2 μL 反转录后的反应溶液进行 PCR 扩增, 50 μL 体系中含引物各 0.5 μmol/L, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 U TaqE, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.001% 明胶, 0.05% Triton X-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 94℃ 变性 3 min 后进入循环, 94℃, 50 s, 61℃, 30 s, 72℃, 1 min, 30 个循环后继续 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Bio-Rad Gel Doc 1000 计算机成像系统分析. 结果以糜酶、I 型胶原和 III 型胶原的 mRNA 分别与 GAPDH 的 mRNA 间的比值表示. 所用引物分别为: 人心糜酶 5'GACAC-TCCCCTTCCCATC3', 5'ATCCAAGGGCCGTAATG3'; GAPDH 内参照 5'TCACTGCCACCC-AGAAGAC3', 5'CTGTTGAAGTCGCAGGAGAC3'; I 型胶原 α 链 5'CTGCATACACAATGG-CCTAAG3', 5'GGTCCCTCGACTCCTACATC3'; III 型胶原 α 链 5'TGTTCTTCCAGGAGAC-AACG3', 5'TCACCTGAAGGACCTCGTG3'.

(iv) 糜酶及 ACE 活力测定. 约 0.24 g 小鼠心脏用冷生理盐水洗净和剪碎后放入预冷的 2 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液中, 匀浆, 利用不能抑制糜酶活力的蛋白酶抑制剂 aprotinin 和 lisinopril 抑制样品中能水解 Ang I 的其他蛋白酶活力, 剩余活力则为糜酶样活力(主要包括糜酶活力, 还含有少量与糜酶性质相似的其他一些蛋白酶活力). 酶反应体系为 500 μL, 分为 4 组: (1) 含 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 6 ng Ang I 及酶样品; (2) 同一组另加 lisinopril 至 50 μmol/L^[3]; (3) 同二组并另加 aprotinin 至 20 μmol/L^[3]; (4) 不含酶样品的上述体系分别为各组的对照. 加入酶样品启动反应, 于 37℃ 水浴 15 min, 加入 2.5 倍体积预冷乙醇终止反应. 15 000 × g 离心 30 min, 取上清液冰冻干燥后加入 400 μL 放射免疫试剂盒提供的缓冲液溶解, 用放射免疫分析试剂盒测定各样品中 Ang I 的量. 根据反应前后 Ang I 的减少量计算酶活力: 被 lisinopril 抑制的 Ang I 降解活力为样品中 ACE 活力, 被 lisinopril, aprotinin

抑制后的剩余活力为样品中糜酶样活力. 每分钟降解 1 ng Ang I 所需酶量定义为 1 酶活力单位(U).

(v) 心脏及血浆 Ang II 测定. 约 0.24 g 小鼠心脏用冷生理盐水洗净和剪碎后, 置于 3 mL 0.1 mol/L HCl 中, 沸水浴 10 min, 匀浆, 15 000 × g 离心 30 min, 分离上清液, 加入 2.5 倍体积冷乙醇, 置 4℃ 保温 30 min 后于 15 000 × g 离心 30 min, 上清液冰冻干燥后再溶于 400 μL 由放射免疫试剂盒提供的缓冲液, 用 Ang II 放射免疫分析试剂盒测定心脏和血浆的 Ang II 含量.

(vi) 心脏基质金属蛋白酶-9 活力测定. 约 0.24 g 小鼠心脏用冷盐水洗净后于 2 mL 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液匀浆, 12 000 × g 离心 20 min, 分离上清液, 内含基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)活力, 将 20 μL 酶样品在含 0.2%(w/v)明胶的 8% 聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分子量标准蛋白在另一不含明胶的同样凝胶中同时电泳, 以判定相应于酶活力的各条带的分子量. 电泳完毕将凝胶在反应液(0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 mol/L NaCl, 0.5% CaCl₂, 0.2% Brij-35)中室温洗脱 2 h 除去胶中的 SDS. 更换反应液, 37℃ 反应 12 h, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后在蓝色背景中含基质金属蛋白酶处呈现白色条带. 利用计算机成像系统对各条带进行分析, 以条带亮度及面积反映 MMP-9 活力高低. 酶活力以条带的光透率与蛋白浓度比值(分别以 A · mg⁻¹)表示.

(vii) 蛋白浓度测定. 用 Lowry 法^[8]测定蛋白浓度.

(viii) 心肌细胞直径测定. 按常规方法做小鼠心脏组织切片, 苏木精染色, 每张切片中选择 100 ~ 200 个横切的心肌细胞, 用 BHEC 显微-微机彩色图像处理系统(北京惠中公司)测量心肌细胞直径.

(ix) 血压及心率测定. 小鼠于 37℃ 温箱安静 30 min 后, 用 RICK PS-100 程控鼠尾血压计测量鼠尾收缩压及心率.

(X) 统计学分析. 所有数据均用平均值 ± 标准差表示, 显著性分析采用 t 检验(P < 0.05, 说明有显著差异).

2 结果

2.1 糜酶基因的组织特异性表达

用 RT-PCR 方法检测了糜酶基因在转基因小鼠各组织中的表达情况(图 1). 可看出, MLC₂-人心糜酶融合基因在转基因小鼠的心脏中以高水平表达, 在骨骼肌和肾脏中表达水平依次减低, 而在肝、肺等脏器中未检测到. 可见 MLC₂ 启动子改变了糜酶表达的组织特异性, 使融合基因在心脏中特异表达.

2.2 心脏糜酶和 ACE 活力及心脏和血浆 Ang II 水平

从表 1 中可看出糜酶转基因小鼠心脏中糜酶活力较对照显著升高, 而 ACE 活力不变; 糜酶转基因小鼠心脏 Ang II 含量较对照升高约 3 倍而血浆 Ang II 含量不变, 说明人心糜酶可催化心脏 Ang II 的生成.

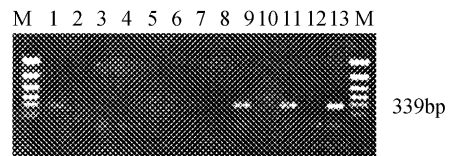


图 1 糜酶转基因在小鼠中组织特异性表达 1,3,5,7,9,11 分别示转基因小鼠骨骼肌、肺、肝、肾、心房及心室; 2,4,6,8,10,12 示相应组织的阴性对照; 13 示阳性对照

表1 糜酶转基因小鼠糜酶, ACE, MMP-9 活力及 Ang II 水平的变化

动物	血浆		心脏		
	Ang II 水平/ pg · mL ⁻¹	Ang II 水平/ pg · mL ⁻¹	糜酶活力/ U · mg ⁻¹	ACE 活力/ U · mg ⁻¹	MMP-9 活力/ A · mg ⁻¹
转基因小鼠	218 ± 106 [#]	1984 ± 184 [*]	0.274 ± 0.071 [*]	0.172 ± 0.029 [#]	0.237 ± 0.019 [*]
对照	234 ± 66	568 ± 88	0.152 ± 0.021	0.177 ± 0.019	0.182 ± 0.023

* 示 P<0.05 vs 对照, # 示 P>0.05 vs 对照; 除 MMP-9 活力测定时对照组 n = 3, 其余 n = 4

2.3 心脏 MMP-9 活力

图2为F₆转基因小鼠的MMP活力的凝胶酶谱,可检测到≈90ku的MMP-9活力,以OD·mg⁻¹代表MMP-9的相对活力.糜酶转基因小鼠心脏中MMP-9活力较对照显著升高(表1).

2.4 I, III型胶原基因在心脏中的转录表达

在糜酶转基因小鼠中,心脏I型胶原的mRNA水平较对照显著升高(P<0.05, n = 5); III型胶原mRNA无明显改变(n = 5);而转基因小鼠心脏I/III型胶原的mRNA比值升高也不显著(n = 5)(图3).

2.5 转基因对小鼠血压、心率及心脏大小的影响

实验结果表明,糜酶转基因小鼠的心重/体重比(5.18 ± 0.45, n = 25)及心肌细胞直径((20.0 ± 1.8) μm, n = 10)与对照鼠(分别为5.09 ± 0.50, n = 20; (19.8 ± 1.9) μm, n = 8)间无显著差异,心脏光镜检查也未见两者间有显著差别.另外,转基因小鼠的心率((417 ± 39) 次·min⁻¹, n = 20)及血压((108.5 ± 17.4) mmHg, n = 20, 1 mmHg = 1.333 22 × 10² Pa)与对照(分别为(429 ± 53) 次·min⁻¹, n = 19; (111.2 ± 19.9) mmHg, n = 19)相比,也无显著差异.

3 讨论

人心脏糜酶发现并克隆至今已有10年,此间各国学者利用各种心肌肥厚模型对其在心肌重塑中的作用进行了研究,由于心肌重塑是多种因素共同作用的结果,难以对糜酶在心肌重塑中的功能进行客观评价.小鼠心脏中尽管也存在着糜酶,但它并不是Ang II的形成酶^[5].通过转基因技术使人心糜酶在小鼠心脏中高水平表达,观察其对小鼠心肌重塑的影响,是研究并证实糜酶基因在体内功能的重要技术.实验表明,糜酶基因从mRNA和蛋白水平都可在转基因小鼠心脏中特异表达,说明我们成功地建立了糜酶转基因小鼠,为研究人心糜酶在心肌重塑中的作用提供了良好的动物模型.

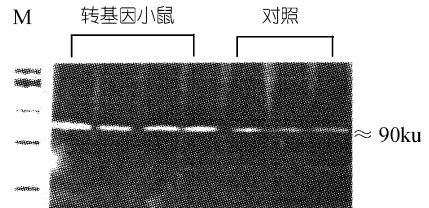


图2 基质金属蛋白酶-9 活力凝胶酶谱

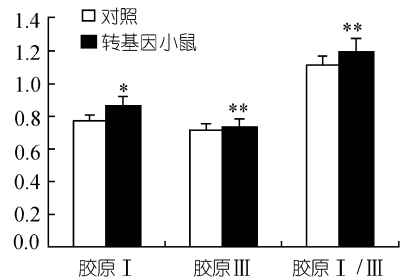
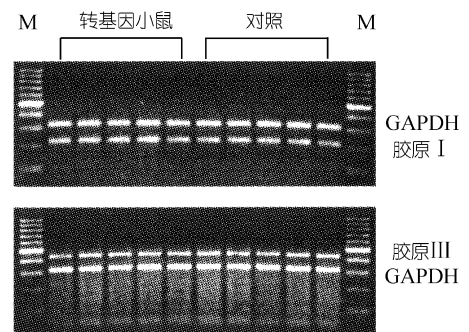


图3 I, III型胶原基因在转基因小鼠心脏中的表达

*示 P<0.05; **示 P>0.05. n = 5

由于转基因小鼠血压、心脏中 ACE 活力以及血浆 Ang II 水平等影响心脏 Ang II 水平的因素均无显著改变,因而转基因小鼠心脏 Ang II 水平的升高可能系心脏糜酶活力的升高,这从体内实验验证了人心脏 Ang II 形成的糜酶途径。

心肌重塑是心脏顺应于外界刺激而产生的一种重构行为,包括了心肌细胞的肥大及间质的重构。Ang II 可通过 MAPKs, JAK-STAT 及 SAPKS 等多种信号途径刺激心脏的心肌细胞的生长和非心肌细胞的增殖以及间质纤维化等导致心肌重塑。因此糜酶通过形成 Ang II 参与了心肌重塑。间质 I, III 型胶原的水平及二者的比值的升高是心脏间质重塑的标志,在 MLC₂-人 心糜酶转基因小鼠心脏中这三者较对照均有不同程度的升高,尽管心肌细胞直径较对照无明显改变,仍可推断糜酶转基因小鼠具有心肌肥厚的趋势。糜酶转基因小鼠未发生显著心肌肥厚可能的原因是:(1) 在 Ang II 形成的酶联反应中,由肾素催化的血管紧张素原向 Ang I 的转化是限速步骤,在肾素活力及 Ang I 水平无显著提高情况下,仅仅糜酶或 ACE 活力的升高并不能使心脏 Ang II 水平有大幅度升高,达到足以刺激心脏发生重塑的浓度;(2) 心肌重塑是一个复杂的病理生理过程,Ang II 在心肌重塑中所起作用有限。

本研究还发现, MMP-9 活力在糜酶转基因小鼠心脏中显著升高。已知 MMP-9 是心肌重塑中重要的蛋白水解酶,通过对基质成分的水解改变其结构与功能。MMP-9 活力的升高一方面可能是 Ang II 水平的升高刺激了 MMP-9 基因的表达;另一方面,金属蛋白酶常以前体形式存在,通过肽链的部分水解而活化,糜酶是一种丝氨酸蛋白酶,可能对基质金属蛋白酶有活化作用。由于糜酶是肥大细胞分泌的蛋白酶,广泛存在于心脏间质,因而糜酶通过对 MMP-9 的活化可能是其参与心脏间质重塑的另一重要途径。关于糜酶在心肌重塑发生发展中的作用还有待深入研究。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号:39570297)、中国医学科学院基金(批准号:1995-1997)及国家重点基础研究发展规划部分资助项目(批准号:G2000 056904)。

参 考 文 献

- 1 Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M. Cardiac angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation*, 1995, 92(9): 2690 ~ 2696
- 2 Dzau V J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypothesis. *J Hypertension*, 1989, 7(12): 933 ~ 936
- 3 Urata H, Kinoshita A, Misono K S, et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 1990, 265(36): 22348 ~ 22357
- 4 Su X, Wei C C, Machida N, et al. Differential expression of angiotensin-converting enzyme and chymase in dogs with chronic mitral regurgitation. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(5): 1033 ~ 1045
- 5 Fukami H, Okunishi H, Miyazaki M. Chymase: its pathophysiological roles and inhibitors. *Curr Pharm Des*, 1998, 4(6): 439 ~ 453
- 6 Shiota N, Okunishi H, Takai S, et al. Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation*, 1999, 99(8): 1084 ~ 1090
- 7 何 泉, 陈兰英, 戴蕴平, 等. MLC₂-糜酶融合基因克隆及转基因小鼠的产生. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14(2): 144 ~ 150
- 8 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265 ~ 275

(2000-07-01 收稿, 2000-09-20 收修改稿)