



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.003

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201402124.pdf>

大鼠压力负荷增加心肌肥厚模型中核仁素的表达

严思敏¹, 吴双¹, 孙丽², 蒋碧梅², 涂自智², 肖献忠²

(中南大学湘雅医学院 1. 2008级临床医学系; 2. 病理生理学系, 长沙 410078)

[摘要]目的: 探讨腹主动脉缩窄致压力负荷增加大鼠心肌肥厚模型中核仁素的表达情况。**方法:** 采用体质量180~220 g SD大鼠40只, 随机分为假手术组和腹主动脉缩窄模型组, 利用腹主动脉缩窄法制备压力负荷增加心肌肥厚模型, 分别于术后2周、4周观察心脏质量指数、左心室质量指数; 采用RT-PCR检测心肌组织中 β -MHC mRNA的表达; 采用Western印迹检测心肌、脑、肾组织中核仁素的表达情况。**结果:** 腹主动脉缩窄模型组4周以后心脏质量指数、左心室质量指数较假手术组显著增加($P<0.01$); 4周以后心肌组织中 β -MHC mRNA的表达较假手术组显著升高($P<0.05$); 2周以后心肌组织中核仁素蛋白的表达较假手术组显著升高($P<0.05$), 而在脑、肾组织中无明显升高。**结论:** 核仁素蛋白在大鼠压力负荷增加心肌肥厚模型中的表达上调, 表明核仁素可能参与了压力负荷增加心肌肥厚的发生发展。

[关键词] 核仁素; 心肌肥厚; 大鼠; 压力负荷增加

Expression of nucleolin in pressure overload-induced cardiac hypertrophy rats

YAN Simin¹, WU Shuang¹, SUN Li², JIANG Bimei², TU Zizhi², XIAO Xianzhong²

(1. Clinical Medical Major, Grade 2008; 2. Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT

Objective: To detect the expression of nucleolin in cardiac hypertrophy rats induced by pressure overload.

Methods: A total of 40 SD rats with body weight 180 g and 220 g were recruited and randomly divided into 2 groups: a transverse aortic constriction (TAC) group and a sham surgery group. Cardiac hypertrophy model was employed by transverse aortic constriction surgery. Then 2 weeks and 4 weeks after the experiment, the heart mass index (HMI), left ventricle mass index (LVMI) were measured. β -MHC mRNA in the heart tissue was detected with RT-PCR. Nucleolin in the heart, brain and kidney was respectively detected with Western blot.

收稿日期(Date of reception): 2013-04-02

作者简介(Biography): 严思敏, 主要从事心肌的内源性保护的研究, 现为湘雅二医院心胸外科硕士研究生。

通信作者(Corresponding author): 蒋碧梅, Email: jiangbimei@163.com

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(81170113); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-12-0545)。This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (81170113) and Education Ministry's New Century Excellent Talents Supporting Plan, P.R. China (NECT-12-0545).

Results: Compared with the sham surgery group, HMI, LVMI in the TAC group increased significantly ($P<0.01$) 4 weeks after the surgery; the expression of β -MHC mRNA in the heart tissue increased ($P<0.05$) in the TAC group 4 weeks after the surgery; and the expression of nucleolin protein in the heart tissue of the TAC group was remarkably upregulated ($P<0.05$) 2 weeks after the surgery, with no change in the brain and kidney tissue between the 2 groups.

Conclusion: Expression of nucleolin protein has been upregulated in response to pressure overload, which may suggest that nucleolin plays a role in cardiac hypertrophy induced by pressure overload.

KEY WORDS

nucleolin; cardiac hypertrophy; rat; pressure overload

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^[1]。临床研究^[2-5]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。核仁素为一种重要的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、胚胎发生等过程。近年来的研究^[1]发现核仁素是一个心肌保护蛋白, 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。本研究探讨核仁素蛋白在大鼠压力负荷增加心肌肥厚模型中的表达, 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

RIPA中性裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、牛血清白蛋白(BSA)、兔抗核仁素单克隆抗体购于美国Sigma-Aldrich公司, 辣根过氧化物抗兔IgG, DAB显色试剂盒为武汉博士德生物技术公司产品。

1.2 动物及分组

清洁级雄性SD大鼠40只, 体重180~220 g, 由中南大学实验动物中心提供, 随机分为假手术组和腹主动脉缩窄模型组(模型组)。腹主动脉缩窄模型组大鼠麻醉后(水合氯醛0.8~1.0 mL腹腔注射)沿腹中线打开腹腔, 将肠管轻轻推开, 暴露后腹膜, 于右肾动脉上方分离长约3 mm的腹主动脉, 穿单线, 放置1根7号针管, 结扎腹主动脉, 拔出针管, 制备腹主动脉缩窄模型。假手术组除了结

扎以外, 其余操作均同模型组。

1.3 心脏质量指数(HWI)、左心室质量指数(LVMI)测定

末次给药后禁食24 h, 称量体质量, 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质量, 计算HWI=全心质量(HW)/体质量(BW), 然后去除左右心房、右心室游离壁, 将左心室加室间隔准确称重作为左心室质量, 计算LHWI=左心室质量/体质量, 来判断心肌肥厚程度。

1.4 β -MHC的mRNA检测

用TRIzol方法抽提心肌组织中总RNA^[6]。以GAPDH为内参, 通过RT-PCR方法进行检测^[6]。GAPDH上游引物为: 5'-GCTGAGTATGTCTCGTGGAGT-3', 下游: 5'-TCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'; β -MHC上游引物为: 5'-CTGGCACCCGTGGACTACAAC-3', 下游: 5'-CGCACAAAGTGAGGATAGGGT-3', 扩增产物约270 bp, 均由上海生物工程公司合成。

1.5 免疫印迹分析

称取组织质量, 按每100 mg组织加1 mL的比例加入RIPA中性裂解液和PMSF(按每1 g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 r/min离心30 min, 取上清液收集组织总蛋白。分装后置于-80 $^{\circ}$ C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, pH7.5)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。

1.6 统计学处理

采用SPSS13.0 统计软件分析, 所有数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用t检验。检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠尾动脉压、HWI及LVMI比较

与假手术组相比, 模型组2周以后大鼠尾动脉压、心脏质量指数及左心室质量指数有所升高, 4周以后明显升高($P<0.01$, 表1)。

表1 各组大鼠2周及4周尾动脉压、HWI及LVMI的改变($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of tail artery blood pressure (TaBP), heart mass index (HMI) and left ventricular mass index (LVMI) in the rats at 2 and 4 weeks ($\bar{x} \pm s$)

组别	TaBP/kPa	HMI	LVMI
假手术组 2周	13.39 ± 2.15	3.04 ± 0.17	1.87 ± 0.12
假手术组 4周	14.14 ± 2.56	2.94 ± 0.21	1.93 ± 0.11
模型组 2周	17.84 ± 2.39	3.39 ± 0.22	2.24 ± 0.16
模型组 4周	20.59 ± 3.04 ^{**}	3.96 ± 0.25 ^{**}	2.87 ± 0.15 ^{**}

与假手术组比较, ^{**} $P<0.01$

2.2 心肌组织中 β -MHC mRNA的表达

与假手术组相比, 模型组2周时心肌组织中 β -MHC mRNA的表达无明显增加, 4周时心肌组织中 β -MHC mRNA的表达明显升高(图1)。

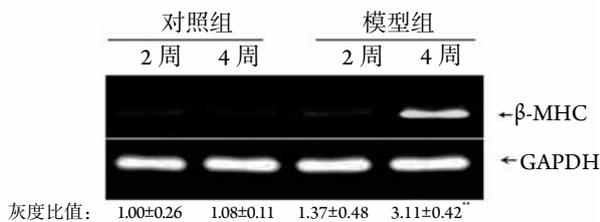


图1 RT-PCR检测心肌组织中 β -MHC mRNA的表达

Figure 1 RT-PCR analysis shows the expression of β -MHC mRNA in cardiac muscles

^{**} $P<0.01$ vs the sham group

2.3 心肌组织、大脑、肾脏中核仁素的表达

收集各组的左心室心肌组织, 提取总蛋白, 采用Western印迹检测, 与假手术组相比, 模型组2周、4周左心室心肌组织中核仁素的表达均明显上调(图2)。

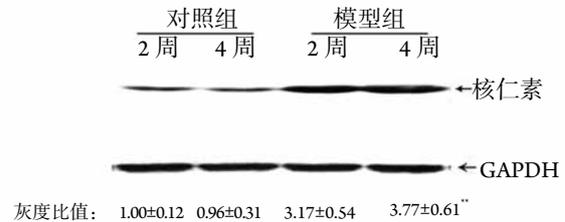


图2 Western印迹检测心肌组织中核仁素蛋白质的表达

Figure 2 Western blot analysis shows the expression of nucleolin protein in cardiac muscles

^{**} $P<0.01$ vs the sham group

同时, 收集各组的大脑及肾组织, 提取总蛋白, 采用Western印迹检测, 与假手术组相比, 模型组2周、4周大脑及肾组织中核仁素的表达均无明显上调(图3, 4)。

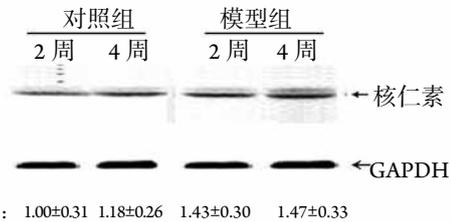


图3 Western印迹检测大脑组织中核仁素蛋白质的表达

Figure 3 Western blot analysis shows the expression of nucleolin protein in brain tissues

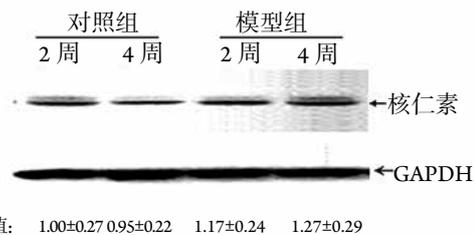


图4 Western印迹检测肾组织中核仁素蛋白质的表达

Figure 4 Western blot analysis shows the expression of nucleolin protein in kidney tissues

3 讨论

本研究采用腹主动脉狭窄, 增加心脏压力负荷, 制备大鼠心肌肥厚模型, 发现腹主动脉狭窄增加压力负荷4周后, 大鼠心脏指数、左心室指数明显增加, 心肌组织中 β -MHC mRNA的表达明显上调, 说明压力增加大鼠心肌肥厚模型制备成功。

心肌肥厚是临床上多种疾病伴有的病理改变, 逆转心肌肥厚能明显改善患者的预后^[7-8]。因此, 探讨心肌肥厚发生、发展的病理生理学机制, 对临床诊断与治疗有重要意义。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^[7-10], 其中一个重要的因素是压力负荷的增加。压力负荷增加可促进cAMP增加, 磷脂酶C激活、心肌细胞钙离子通道打开等机制促进基因的表达、蛋白质的合成增加及肌球蛋白重链改建而导致心肌肥厚的发生。然而心肌肥厚的发生机制复杂, 是否有其他基因在心肌肥厚发生、发展中起作用, 还有待于进一步研究。

本研究采用Western印迹检测了压力负荷增加大鼠心肌肥厚模型中心肌核仁素的表达情况, 结果发现, 与假手术组相比, 模型组2周、4周时左心室心肌组织中核仁素的表达明显上调, 此外, 还发现脑组织、肾组织中核仁素的表达无明显增加。研究^[3]发现核仁素在细胞增殖、生长方面发挥重要的功能。在健康的成年哺乳动物的心肌组织中, 大部分的心肌细胞是不能够分裂的, 所以压力负荷增加所致的心肌肥厚主要通过心肌细胞肥大来实现, 这种适应性的变化则牵涉到细胞体积的增大, 蛋白质合成的增加, 某些基因(c-fos, c-jun, Egr-1, jun-B, Nur-7)表达的上调以及胚胎期基因的重新表达^[11]。核仁素是一种RNA结合蛋白, 可通过与多种基因的mRNA结合, 从而调控mRNA的稳定性。在抑制氧化应激所致H9C2心肌细胞的凋亡中被证实可与Bcl-2, Bax, Bak, p53, HSP70, HSP25, HSP90, p21, XIAP, SURVIN, HOX1等多个凋亡相关基因的mRNA结合^[6]; 并通过与上述凋亡相关基因的mRNA相结合而发挥其抑制细胞凋亡的作用。由于核仁素具有促进细胞增殖、信号转导^[12]、调控mRNA的稳定性^[13-15]、参与细胞应激反应^[11,16]等作用, 而本研究发现核仁素只在肥大的心肌细胞中表达增高, 在其余的组织中表达水平无明显改变, 心肌组织中表达上调的核仁素必然会引起下游反应; 提示核仁素可能在心肌肥厚发生早期发挥重要的作用, 但核仁素在心肌肥厚中起什么作用及如何发挥作用, 尚有待进一步深入研究。

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): 326-341.
2. Ginisty H, Sicard H, Roger B, et al. Structure and functions of nucleolin[J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 6): 761-772.
3. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights[J]. *FASEB J*, 1999, 13(14): 1911-1922.
4. 王慷慨, 蒋磊, 鄂顺梅, 等. 核仁素表达下调对C2C12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. WANG Kangkai, JIANG Lei, E Shunmei, et al. Effect of nucleolin down-regulation on the proliferation and apoptosis in C2C12 cells[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2005, 30 (2): 125-129.
5. 邹江, 王慷慨, 刘可, 等. 核仁素反义寡核苷酸对RAW264.7细胞增殖与凋亡的影响[J]. *医学临床研究*, 2005, 22(12): 1641-1644. ZOU Jiang, WANG Kangkai, LIU Ke, et al. Effect of nucleolin antisense oligonucleotides on proliferation and apoptosis in RAW264.7 cells[J]. *Journal of Clinical Research*, 2005, 22(12): 1641-1644.
6. 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. ZHANG Bin. Expression of nucleolin in rat heart subjected to ischemia-reperfusion injury and its anti-apoptotic role in cardiomyocytes[D]. Changsha: Central South University, 2009.
7. 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.
8. Matthew J, Sleight P, Lonn E, et al. Heart Outcomes Prevention E-evaluation (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.
9. 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.
10. 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): 1196-203.
11. Katrina B, Gavin B, Pete K, et al. Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(3): 817-822.
12. Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, et al. PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(7): 979-984.
13. Otake Y, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, et al. Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and

- destabilization of Bcl-2 mRNA[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(1): 319-326.
14. Singh K, Laughlin J, Kosinski PA, et al. Nucleolin is a second component of the CD154 mRNA stability complex that regulates mRNA turnover in activated T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(2): 976-985.
15. Zheng X, Zhang Y, Chen YQ, et al. Inhibition of NF-kappaB stabilizes gadd45alpha mRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1): 95-99.
16. Kim K, Dimitrova DD, Carta KM, et al. Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(6): 2463-2474.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 严思敏, 吴双, 孙丽, 蒋碧梅, 涂自智, 肖献忠. 大鼠压力负荷增加心肌肥厚模型中核仁素的表达[J]. 中南大学学报:医学版, 2014, 39(2): 124-128. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.003

Cite this article as: YAN Simin, WU Shuang, SUN Li, JIANG Bimei, TU Zizhi, XIAO Xianzhong. Expression of nucleolin in pressure overload-induced cardiac hypertrophy rats[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2014, 39(2): 124-128. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.003

本刊常用词汇英文缩写表

从2012年第1期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	纤连蛋白	FN
Toll样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心电图	ECG
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	心脏监护病房	CCU
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC法	血管紧张素 II	Ang II
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管内皮生长因子	VEGF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC法	血管性血友病因子	vWF
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血红蛋白	Hb
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP法	绿色荧光蛋白	GFP	血肌酐	SCr
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血尿素氮	BUN
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血小板	PLT
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血压	BP
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素/脂多糖	LPS	血氧饱和度	SO ₂
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	严重急性呼吸综合征	SARS
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮	NO
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	一氧化氮合酶	NOS
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙酰胆碱	ACh
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒	HBV
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	异硫氰酸荧光素	FLTC
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	原位末端标记法	TUNEL
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	杂合性缺失	LOH
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	增强化学发光法	ECL
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	肿瘤坏死因子	TNF
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	重症监护病房	ICU
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	转化生长因子	TGF
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	自然杀伤细胞	NK 细胞
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	Tbil
计算机 X 线断层照相技术	CT				