文章编号:1000-5404(2005)10-0975-03

论著

PTEN 负性调控血管紧张素Ⅱ刺激所致心肌细胞肥大

于林君,祝善俊,周裔忠,王 江,田 颖 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要: 目的 研究 PTEN 对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)所致心肌细胞肥大的影响。**方法** 构建携带 PTEN 基因的腺病毒载体,感染原代培养的乳鼠心肌细胞,用 AngⅡ作为肥大刺激因素,测定 ANF、β-MHC 与心肌细胞大小。**结果** 对照组与仅携带 GFP 的腺病毒感染的心肌细胞在 AngⅡ作用下,ANF、β-MHC 表达与细胞直径显著增高,而 PTEN 过度表达则对上述改变具有抑制作用。**结论** PTEN 能够负性调控 AngⅡ所致的心肌细胞肥大。

关键词: PTEN;血管紧张素Ⅱ;心肌细胞肥大;腺病毒
中图法分类号: R322.11; R345.61; R977.6 **文献标识码**: A

PTEN negatively regulates angiotensin-Ⅱ induced hypertrophic response of cardiomyocytes

YU Lin-jun, ZHU Shan-jun, ZHOU Yi-zhong, WANG Jiang, TIAN Ying (Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effects of PTEN on angiotensin-Ⅱ (Ang-Ⅱ) induced cadiomyocytic hypertrophy. **Methods** Wild type PTEN gene was transferred into the primary generation of cardiomyocytes from neonatal rats through the recombinant adenovirus containing PTEN gene. Then the cardiomyocytes were irritated with Ang-Ⅱ. ANF, MHC and the size of the cardiomyocytes, which served as the index of hypertrophic response, were determined. **Results** After Ang-Ⅱ stimulation, the level of ANF and MHC and the cardiomyocytic size were significantly increased in the cardiomyecytes with normal expression of PTEN but the hypertrophic response was markedly suppressed in those with high expression of PTEN. **Conclusion** PTEN can down-regulate the hypertrophic response of cardiomyocytes induced with Ang-Ⅱ.

Key words: PTEN; angiotension-Ⅱ; myocardial hypertrophy; adenovirus

心肌细胞肥大是多种信号通路相互协调、相互制约、共同参与的病理生理过程,是病变心肌从代偿向失代偿发展的关键环节。其中既包括促进心肌肥大的如 Ca/CaN、PI3K/Akt 等信号通路外,还有心肌内源性的负性调控因子或通路参与其中[1]。有报道表明[2],染色体 10 上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是 1997 年发现的肿瘤抑制物。作为一种具有双特异性磷酸酶活性(蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶活性)的内源性信号分子,PTEN 对心肌细胞肥大可能具有负性调控作用[3,4]。目前 PTEN 是否能够抑制血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)所致的心肌细胞肥大少有报道,本研究将通过同源重组技术构建携带野生型 PTEN 基因的腺病毒载体用来感染原代培养的乳鼠心肌细胞,建立过度表达 PTEN 基因的细胞模型,并用 AngⅡ作为心肌细胞肥大的刺激因素,对前述问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 携带 PTEN 全程片段(1 212 bp)的 pcDNA 3 质粒,由 North Carolina 大学 Young E Whang 博士惠赠;pAdTrack-CMV(含有 GFP 基因);BJAD 菌株(内含有 pAdEasy-1 腺病毒骨架的 BJ5183);DH5α 大肠杆菌。

1.1.2 试剂 LB 培养基;DMEM/F12 1∶1 培养基(HyClone);内切酶和连接酶(NEB);质粒提取试剂盒与胶回收试剂盒(Omiga);Tripure(Roche);RT-PCR 试剂盒(宝生物);兔抗鼠 PTEN 一抗和 HRP-标记抗兔二抗(CST);羊抗鼠 GAPDH 一抗和 HRP-标记抗羊二抗(上海康成);PVDF 膜(Pall);鼠抗人 α 横纹肌 actin 克隆抗体(北京中山);DAB 显色试剂盒与 SABC-Cy3 免疫荧光试剂盒(博士德);血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)(Sigma)。

1.1.3 仪器设备 37 ℃摇床;37 ℃孵箱;低温高速离心机;PCR 仪;凝胶成像仪;紫外光分光光度计,Leica Qwin 病理图像分析系统等。

1.1.4 PCR 所需引物及反应条件 见表 1。建立 25 μl 反应体系,30 个循环。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370584)
Supported by the National Nature Science Foundation of China(30370584)
作者简介:于林君(1975-),男,河南省新乡市人,博士研究生,主要从事心力衰竭与心肌重构方面的研究。电话:(023)65230732
通讯作者:祝善俊,电话:(023)68755701,E-mail:19321224@mail.tmmu.edu.cn
收稿日期:2005-03-15;**修回日期**:2005-04-02

表1 引物序列、产物长度与退火温度

Tab 1 Primer sequences, length of products and anneal temperature

Gene		Primer sequences	Length(bp)	Anneal temperature(℃)
PTEN	Sense	5′-AGAACTTATCAAACCCTT-3′	186	45
	Antisense	5′-GTCCTTACTTCCCCAT-3′		
ANF	Sense	5′-GGCTCCTTCTCCATCACC-3′	412	53
	Antisense	5′-CTCCAATCCTGTCAATCCTAC-3′		
β-MHC	Sense	5′-AGGAAGAACCTACTGCGACTG-3′	264	53
	Antisense	5′-CATCCTTAGGGTTGGGTAGCAC-3′		
GAPDH	Sense	5′-TGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3′	289	53
	Antisense	5′-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3′		

1.2 方法

1.2.1 构建携带PTEN基因的腺病毒载体 根据He等[5]报道的方法构建携带PTEN基因的腺病毒载体(Ad-PTEN)以及仅含有GFP的空腺病毒载体(Ad-GFP),通过反复感染扩增病毒。

1.2.2 乳鼠心肌细胞培养 取1~3 d龄新生Wistar大鼠,摘下心脏,通过分步消化和差速贴壁的方法分离纯化心肌细胞,用含20%胎牛血清的DMEN/F12培养基培养;用抗横纹肌actin抗体通过免疫荧光染色鉴定。

1.2.3 病毒感染心肌细胞 培养48 h后,用适当感染倍数的病毒液感染4 h,补加完全培养基培养20 h后换液,继续培养24 h加入AngⅡ或对照培养基,24 h后收集细胞。

1.2.4 RT-PCR 根据Tripure试剂说明书采用一步法提取心肌细胞总RNA,RNA纯度用D_{260}/D_{280}鉴定,取1 μg RNA进行逆转录合成cDNA,取1 μl产物进行PCR,扩增产物5 μl在1.2%琼脂糖凝胶上电泳,结果在凝胶成像仪上观察并分析,计算目的片段和内参照条带的灰度比值。

1.2.5 Western blot检测 用RIPA匀浆缓冲液提取细胞总蛋白,电泳-转膜-PTEN和GAPDH一抗孵育-二抗-DAB显色。

1.2.6 心肌细胞大小测定 将经过处理的心肌细胞用胰酶充分消化,分离重悬,在倒置相差显微镜下观察并照相,用Leica Qwin病理图像分析软件测定细胞直径,每组计数50个细胞。

1.3 实验分组及处理方法

见表2,AngⅡ终浓度为10^{-7} mol/L。

表2 实验分组和心肌细胞处理

Tab 2 The grouping and the processing of cardiomyocytes

Group	Infection	Stimulation
Control(C)	Medium	Medium
Control + AngⅡ Stimulation(C + AngⅡ)	Medium	AngⅡ *
Ad-GFP Infection(GFP)	Ad-GFP	Medium
Ad-GFP Infection + AngⅡ Stimulation(GFP + AngⅡ)	Ad-GFP	AngⅡ *
Ad-PTEN Infection(PTEN)	Ad-PTEN	Medium
Ad-PTEN Infection + AngⅡ Stimulation (PTEN + AngⅡ)	Ad-PTEN	AngⅡ *

*: The final concentration of AngⅡ was 10^{-7} mol/L

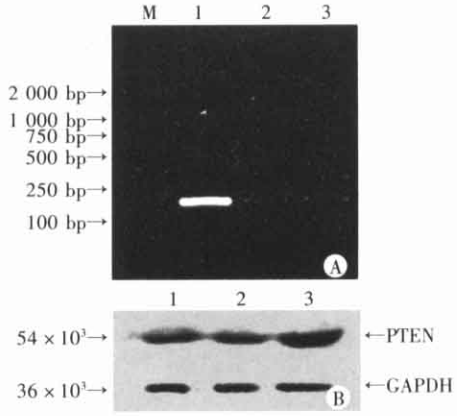
1.4 统计学方法

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 建立过度表达PTEN的心肌细胞原代培养体系

心肌细胞经病毒感染48 h后,在倒置荧光显微镜下观察,可见80%细胞胞浆内表达绿色荧光蛋白,呈现绿色荧光,提示病毒成功进入细胞内并且开始表达;分别用PTEN引物和PTEN抗体做RT-PCR和Western blotting结果显示,PTEN在受Ad-PTEN感染细胞中表达明显高于非感染细胞和Ad-GFP感染细胞(图1)。



A: PTEN mRNA expression M: DL2000 marker; 1: Ad-PTEN infection; 2: Ad-GFP infection; 3: Control cells;

B: PTEN protein expression 1: Control cells; 2: Ad-GFP infection; 3: Ad-PTEN infection. GAPDH as control

图1 Ad-PTEN和Ad-GFP感染后心肌细胞内PTEN mRNA与蛋白表达

Fig 1 PTEN mRNA and protein expression in cardiomyocytes infected by Ad-PTEN or Ad-GFP

2.2 肥大标志基因ANF和β-MHC的表达

结果显示,在C组、GFP组和PTEN组之间,ANF与β-MHC表达无显著差异,提示Ad-GFP与Ad-PTEN病毒感染本身不会对心肌细胞胚心基因的表达产生影响;C + AngⅡ组、GFP + AngⅡ组较对照显著增高($P < 0.05$),PTEN基因的过度表达对AngⅡ所致肥大标志基因表达具有抑制作用(表3)。

2.3 心肌细胞大小的变化

C组、GFP组和PTEN组之间,心肌细胞直径无显著差异;AngⅡ刺激后,心肌细胞直径较未受刺激各组显著增高($P < 0.05$),而PTEN过度表达的细胞直径明显低于PTEN表达正常的AngⅡ作用细胞,提示PTEN对AngⅡ刺激诱导的细胞肥大具有抑制作用(表3)。

表3 不同组间ANF、β-MHC基因表达和心肌细胞直径(μm)变化

Tab 3 Difference of ANF, β-MHC mRNA and diameter of cardiomyocytes between groups

Group	ANF($n = 3$)	β-MHC($n = 3$)	Diameter($n = 50$)
C	1.46 ± 0.09	0.70 ± 0.06	19.78 ± 3.46
C + AngⅡ	2.22 ± 0.11*	1.21 ± 0.24*	24.80 ± 2.55*
GFP	1.33 ± 0.04	0.61 ± 0.10	19.14 ± 2.54
GFP + AngⅡ	2.15 ± 0.05*	0.98 ± 0.13*	25.13 ± 3.49*
PTEN	1.41 ± 0.06	0.61 ± 0.07	20.89 ± 3.50
PTEN + AngⅡ	1.39 ± 0.06#	0.57 ± 0.09#	21.45 ± 1.60#

*: $P < 0.05$, *vs* C, GFP, PTEN group; #: $P < 0.05$, *vs* C + AngⅡ, GFP + AngⅡ group

3 讨论

本研究主要涉及了两方面的内容:①通过同源重

组来构建携带野生型 PTEN 基因的腺病毒载体，感染原代培养的心肌细胞，建立过度表达 PTEN 的心肌细胞模型；②检测心肌细胞肥大标志基因 ANF 与 β-MHC 的表达和心肌细胞形态改变，来了解 PTEN 对 AngⅡ所致心肌细胞肥大反应的影响。通过上述研究，得出如下结论：①尽管心肌细胞为终末分化细胞，但是携带 PTEN 基因的腺病毒可以高效率的将目的基因导入细胞内，受染细胞中 PTEN mRNA 与蛋白表达都明显高于对照细胞，此方法可以作为研究 PTEN 在心肌细胞内功能与机制的有效手段；②PTEN 可以显著抑制 AngⅡ刺激所致的心肌细胞胚胎型标志基因的表达与心肌细胞肥大。尽管在无 AngⅡ刺激的心肌细胞内，PTEN 过度表达对 ANF、β-MHC 表达和心肌细胞形态无明显影响（与对照组和 Ad-GFP 感染组相比），但是 PTEN 过度表达的心肌细胞在受到 AngⅡ刺激后，肥大程度显著低于 PTEN 表达正常细胞，提示 PTEN 对 AngⅡ所致心肌肥大具有负性调控作用。PTEN 最初是以一种肿瘤抑制因子被发现，目前越来越多的证据表明，PTEN 在心血管及其相关疾病的发生发展中也具有重要作用。研究显示[3]，心肌细胞在受到异丙肾上腺素刺激条件下，PTEN 表达增高。结合本研究结果，提示细胞外刺激因素在引起心肌肥大的同时，也激活了细胞内的内源性负性调控因子，而正负调控因素或通路之间的平衡，决定了心肌细胞生物学特征乃至心脏结构与功能的改变。

目前对 PTEN 抑制 AngⅡ所致心肌细胞肥大的机制还不明了，可能与以下因素有关：首先 PTEN 对 PI3K/Akt 信号通路具有抑制作用，通过减少细胞内 PIP3 水平降低 PI3K 激活引起的 Akt 磷酸化，从而阻断 PI3K/Akt 信号通路介导的细胞生长[6]；其次，PTEN 抑制心肌肥大的作用可能也与 Ca/CaN/NFAT3 通路有关，有报道显示，敲除 PTEN 的心肌细胞表现为 L-钙通道介导的钙内流显著增加[7]，提示 PTEN 可能对心肌细胞内钙增高具有抑制作用；并且 PTEN 可通过降低 GSK3β 磷酸化程度，间接促进 NFAT3 出核运动，抑制心肌肥大。上述观点还需要进一步的研究证实。

参考文献：

[1] Hardt S E, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(3): 500 - 509.

[2] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943 - 1947.

[3] Schwartzbauer G, Robbins J. The tumor suppressor gene PTEN can regulate cardiac hypertrophy and survival[J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35786 - 35793.

[4] Crackower M A, Oudit G Y, Kozieradzki I, *et al*. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways[J]. Cell, 2002, 110(6): 737 - 749.

[5] He T C, Zhou S, DaCosta L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

[6] Oudit G Y, Sun H, Kerfant B G, *et al*. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(2): 449 - 471.

[7] Sun H, Trivieri M G, Oudit G Y, *et al*. Modulation of L-type Ca^{2+} current by PI3Ka-PTEN signaling pathway[J]. Can J Cardiol, 2003, 19(Suppl A): A105.

（编辑　汪勤俭）

（上接 974 页）

下降、心率加快等症状；另一类是心包填塞的表现，主要由于血液积于心包内导致心包内压力增高所致，表现主要为 Beck 三联征，即低血压、颈静脉怒张、心音遥远。两类临床表现有不同的致伤机制，正确鉴别两种临床表现，有助于正确指导治疗。受伤因素明确、临床表现明显的病人，诊断难度较小。诊断困难的病人主要有：①神志不清，受伤原因不明；②临床症状不明显，但有严重恶化趋势；③合并其它脏器损伤，可能因为其它脏器损伤较重而掩盖心脏的损伤。对于诊断困难的病人，可使用一些辅助检查进行确诊，心包穿刺、X 线检查等可有助于诊断，但在病情危重的情况下，过多的检查会加重病情，导致不可挽回的后果，因此，应尽量根据临床表现来诊断。

快速、合理的急救方法是心脏开放性外伤治疗成功的关键。及时放置胸腔闭式引流管，建立有效的静脉通道及采取自体血液回输。手术切口的选择要考虑伤口的位置以及胸部其它脏器的损伤，但也不能忽略心脏手术的特殊性。常采用左前或右前外侧切口，一般均能满足手术显露的要求。如显露不满意，可切断上、下肋骨或横断胸骨，直至显露满意为止。在手术过程中，要注意：①看清心包伤口位置，以此指导心脏伤口的查找；②心内有异物存在时，要争取一期处理，不可留待日后择期处理，以免造成不良后果；③尽量避免用手指直接探查心内损伤，以免造成无法控制的大出血；④不能只满足于已经找到的伤口，注意心脏其他部位是否存在未被发现的损伤；⑤插入心脏的锐器不可在开胸前拔除；⑥注意邻近脏器伤及合并伤的处理。心脏自身的手术可采用两种方法进行，单纯心壁的伤口可以直接缝合。房间隔、室间隔以及乳头肌的损伤，一般直接缝合可有满意的效果。

关键词：穿通性心脏伤；急救

中图法分类号：R654.2　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 徐旭光，杨　伟，段明科，等. 心脏外伤的救治体会[J]. 中国急救医学，2004，24(3)：216 - 217.

[2] 邓治璋，刘献武. 18 例心脏穿通伤的诊治[J]. 中原医刊，2004，31(15)：22 - 23.

[3] 王志维，高尚志，林道明，等. 开放性心脏创伤 14 例临床分析[J]. 中国胸心血管临床杂志，1999，6(1)：40 - 41.

（编辑　周　芳）