论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1534-04

BAPTA对去甲肾上腺素刺激的大鼠心肌细胞蛋白合成及c-fos和β-MHC表达的影响

张 恒[1],王培勇[1],刘 健[2],严 竣[1] (第三军医大学:[1]高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038,[2]新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)刺激导致的心肌细胞肥大中,钙信号通路和心肌细胞蛋白合成以及c-fos和β-MHC表达之间的关系。**方法** 去甲肾上腺素(10^{-5} mol/L)刺激原代培养的心肌细胞,细胞内钙离子络合剂BAPTA(20 μmol/L)阻断钙信号通路,通过^{3}H-leucine掺入测定蛋白质合成,RT-PCR测定c-fos及β-MHC mRNA的表达。**结果** NE刺激组的心肌细胞^{3}H-leucine摄入量、c-fos及β-MHC的表达均显著高于正常对照组($P<0.01$),BAPTA阻断后明显降低($P<0.01$),单纯BAPTA阻断组的^{3}H-leucine摄入量和β-MHC的表达低于正常对照组($P<0.01$),在正常对照组及单纯BAPTA阻断组未见c-fos明显表达。**结论** Ca^{2+}信号通路不但参与NE刺激引起的心肌细胞蛋白合成增加、c-fos及β-MHC的过度表达,且在正常心肌细胞蛋白质合成及β-MHC表达中也起重要作用。

关键词: 去甲肾上腺素;钙信号;心肌细胞;肥大

中图法分类号: R322.11; R329.25; R977.11 **文献标识码:** A

Effect of Ca^{2+} chelator BAPTA on protein synthesis and expression of c-fos and β-MHC in rat myocardial cells stimulated by norepinephrine

ZHANG Heng[1], WANG Pei-yong[1], LIU Jian[2], YAN Jun[1] ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the Ca^{2+} signal transduction and protein synthesis, c-fos and β-MHC expression in rat hypertrophic myocardial cells stimulated by norepinephrine (NE). **Methods** Neonatal Wistar rats of 1 – 2 d were used to culture the myocardial cells and the cells were stimulated by NE and blocked the Ca^{2+} signal transduction by BAPTA (intracellular Ca^{2+} chelator), then applied to detect and compare the protein synthesis by ^{3}H-leucine incorporation and the expression of c-fos and β-MHC mRNA with RT-PCR. **Results** The ^{3}H-leucine incorporation rate, c-fos and β-MHC expression of myocardial cells stimulated by NE were obviously higher than the control and could be blocked by BAPTA ($P<0.01$). The ^{3}H-leucine incorporation rate and β-MHC expression in the cells that were treated only with BAPTA was lower than the normal myocardial cells ($P<0.01$). No obvious expression of c-fos was found in the cells treated only by BAPTA and the normal myocardial cells. **Conclusion** Ca^{2+} signal not only plays a role in protein synthesis, c-fos and β-MHC overexpression in hypertrophic myocardial cells stimulated by NE, but also is necessary in protein synthesis and β-MHC expression in normal cells.

Key words: norepinephrine; Ca^{2+} signal; cardiac cells; hypertrophy

心肌重塑(myocardial remodeling)是多种心脏疾病共同的病理过程,指在各种内外刺激因素的作用下引起的心肌肥大、排列紊乱并伴有实质、间质和血管结构的重排。其发生机制涉及各种损伤因素导致Ca^{2+}稳态失衡和以Ca^{2+}信号通路为核心的多种信号转导通路激活,并常有一系列基因如c-fos、c-myc、β-MHC等表达重调,相应蛋白合成改变[1]。但心肌重塑中Ca^{2+}稳态失衡和Ca^{2+}信号通路与心肌重塑相关基因表达的关系及具体机制尚未阐明。本实验通过体外心肌细胞原代培养,施以刺激心肌细胞肥大因素NE,观察钙离子络合剂阻断Ca^{2+}信号后,对心肌细胞蛋白质

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200108)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200108)

作者简介: 张 恒(1976-),男,贵州省瓮安县人,硕士研究生,医师,主要从事心血管病理生理学方面的研究。电话:(023)68753416

通讯作者: 刘 健,电话:(023)68774667,E-mail:jiana686@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-10-13;**修回日期:** 2005-03-14

合成、c-fos 及 β-MHC mRNA 的表达的影响，探讨心肌细胞肥大过程中，Ca^{2+} 信号转导通路与心肌细胞肥大相关基因表达之间的关系。

1　材料与方法

1.1　试剂

BAPTA-AM 和 Pluronic 购自 Sigma 公司，NE 为上海试剂厂产品，^{3}H-leucine 购自北京原子能科学研究所，RT-PCR 试剂和引物合成为上海生物工程公司，琼脂糖、DMEM/F-12 培养基、小牛血清购自 Hyclone 公司，胰蛋白酶购自 Sigma 公司。其它试剂均为分析纯，所用溶液均以超纯水配置。

1.2　大鼠心肌细胞的培养

取出生 1～2 d 的 Wistar 乳鼠（由第三军医大学实验动物中心提供）心室肌组织，0.125% 的胰蛋白酶反复消化，离心收集细胞，在含有 5% 小牛血清的 DMEM/F-12 培养基中于 37 ℃、5% CO_2 中孵育 1.5 h，差速贴壁法去除非心肌细胞，将未贴壁的心肌细胞配成 1×10^5/ml，接种至培养板，并加入阿糖胞苷（1 μmol/L）抑制非心肌细胞生长。

1.3　实验分组

心肌细胞培养 4 d 后，细胞生长良好，可见自发搏动，更换无血清的培养基培养 24 h 后，完全随机分成 4 组：①正常对照组；②刺激肥大组；③刺激肥大 + Ca^{2+} 信号阻断组；④正常 + Ca^{2+} 信号阻断组。刺激肥大选用 NE（10^{-5} mol/L）、Ca^{2+} 信号阻断选用 BAPTA 钙离子络合剂（20 μmol/L，并加入同样浓度的 pluronic 有利于 BAPTA 进入细胞均匀分布）阻断，加药后继续培养一定时间（RT-PCR 检测 c-fos mRNA 时相为 2 h 外，其余均选用 12 h），^{3}H-leucine 掺入法测定蛋白质合成，RT-PCR 测定 c-fos 及 β-MHC mRNA 的表达。

1.4　^{3}H-leucine 掺入测定蛋白质合成

加入 ^{3}H-leucine（7.4×10^4 Bq/ml），继续培养 12 h，0.25% 的胰蛋白酶消化收集细胞，用负压吸引器将细胞转移至硝酸纤维素膜，生理盐水冲洗掉游离的 ^{3}H-leucine，10% 的三氯乙酸破碎细胞并固定于膜上，烘干滤膜，置于脂溶性闪烁液中，LPS-6500 型液闪计数仪（德国 Beckman 公司）测量 cpm 值，通过计数效率（60%）和 ^{3}H-leucine 的放射活性（529×10^{10} Bq/mmol）计算 ^{3}H-leucine 掺入量，以 ^{3}H-leucine 掺入量（fmol）反映心肌细胞中蛋白质的合成速率，每次作 3 组，重复实验 3 次。

1.5　RT-PCR 检测 β-MHC 及 c-fos mRNA 的表达

用 Tripure 提取 RNA，然后进行 cDNA 逆转录，PCR 扩增，产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳，用 Quantity One 4.4 软件对电泳图像进行分析，用目的片段的积分光密度（IOD）与外参照比值来反映 mRNA 表达量的相对高低。

引物序列及循环条件为 c-fos 正义链：5′-AGTCACCGTGCTCCTACCCAG-3′，反义链：5′-ATCTGTCTCCGCTTGGAGcGTAT-3′（558 bp），循环条件：95 ℃ 60 s→65 ℃ 60 s→72 ℃ 60 s，40 个循环；β-MHC 正义链：5′-CTTACCAACTTTGCTCTTTGCC-3′，反义链：5′-TGACTGCCTCTGTCACCACA-3′（557 bp），循环条件：94 ℃ 45 s→60 ℃ 30 s→72 ℃ 90 s，35 个循环；β-actin 正义链：5′-ATGAGGATCCTCACCGAGCGAGCGCGGCTACAGC-3′，反义链：5′-ACACCACTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3′（322 bp），循环条件：94 ℃ 2 min→94 ℃ 30 s→60 ℃ 20 s→72 ℃ 30 s，30 个循环。

1.6　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行随机区组间方差分析。

2　结果

2.1　^{3}H-leucine 掺入测定蛋白质的表达

NE 刺激组的 ^{3}H-leucine 摄入量比正常对照组高 39%（$P<0.01$），BAPTA 可明显阻断 NE 刺激引起心肌细胞对 ^{3}H-leucine 的摄取，降低 76%（$P<0.01$）。单纯 BAPTA 阻断组的 ^{3}H-leucine 摄入量比正常对照组低 72%（$P<0.01$），BAPTA 和 NE + BAPTA 组间无显著差别（$P>0.05$），见表 1。

表 1　NE 刺激和 BAPTA 阻断各组 ^{3}H-leucine 掺入量液闪计数（fmol/10^5 细胞）

Tab 1　The ^{3}H-leucine incorporation of myocardial cells stimulated by NE and blocked by BAPTA (fmol/10^5 cells)

Group	^{3}H-leucine
Normal	6.905 3 ± 1.498 2
BAPTA	1.935 0 ± 0.397 2 *
NE	9.606 7 ± 1.094 6 *▲
NE + BAPTA	2.380 3 ± 0.589 1

*：$P<0.01$，*vs* normal；▲：$P<0.01$，*vs* NE + BAPTA

2.2　NE 刺激肥大和 BAPTA 阻断对心肌细胞 β-MHC 和 c-fos mRNA 表达的影响

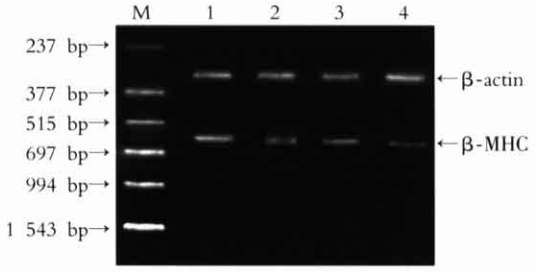
RT-PCR 产物和外参照在 1.8% 的琼脂糖凝胶中电泳，相应实验组中可见 β-MHC（557 bp）、c-fos（558 bp）和各自外参照 β-actin（322 bp）的扩增带，见图 1、2。经半定量图像分析。可见 β-MHC 在 NE 刺激肥大组比正常组表达升高 38%（$P<0.01$），BAPTA 阻断的 NE 刺激组比 NE 刺激组低 43%（$P<0.01$），单纯 BAPTA 阻断组明显低于正常组 66%（$P<0.01$）和 NE + BAPTA 组 56%（$P<0.01$）；c-fos 在正常组及单纯 BAPTA 阻断组未见明显表达，NE 刺激肥大组可见 c-fos 表达，BAPTA 阻断 Ca^{2+} 信号通路后表达明显降低，为 NE 刺激组的 12%（$P<0.01$），见表 2。

表 2　NE 刺激和 BAPTA 阻断各组间 β-MHC 和 c-fos mRNA 相对表达量（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　The expression of β-MHC and c-fos mRNA in myocardial cells stimulated by NE and/or blocked by BAPTA ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	β-MHC/β-actin	c-fos/β-actin
Normal	0.576 7 ± 0.015 9	No obvious expression
BAPTA	0.197 0 ± 0.015 2 *▲	No obvious expression
NE	0.794 3 ± 0.052 4 *▲	0.207 2 ± 0.013 1▲
NE + BAPTA	0.451 2 ± 0.076 3	0.024 9 ± 0.003 5

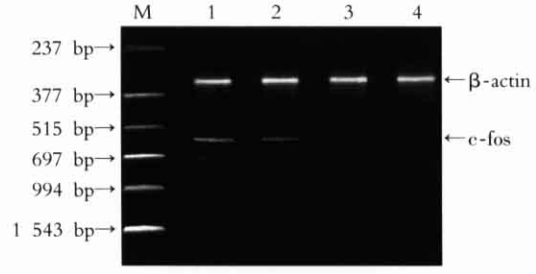
*：$P<0.01$，*vs* normal；▲：$P<0.01$，*vs* NE + BAPTA



M: Marker; 1: NE; 2: NE + BAPTA; 3: Normal; 4: BAPTA

图1 β-MHC 扩增结果

Fig 1 Electrophoretic result of β-MHC RT-PCR product



M: Marker; 1: NE; 2: NE + BAPTA; 3: Normal; 4: BAPTA

图2 c-fos 扩增结果

Fig 2 Electrophoretic result of c-fos RT-PCR product

3 讨论

在多种心血管疾病中，因为血流动力学异常、物理损伤和神经体液因素的持续作用，心脏自稳态失衡，心肌细胞肥大，实质、间质和血管结构重排而产生心肌重塑。其过程涉及多种信号转导通路激活并形成交互转导(cross-talk)。Ca^{2+}信号是其中最重要的信号通路之一。心肌细胞在受到 NE、Ang Ⅱ、IP 等内外刺激因素后，启动胞外 Ca^{2+}跨膜的内流及胞内 Ca^{2+}库释放，导致胞浆 Ca^{2+}浓度升高，而且在细胞核内也存在受 Ca^{2+}-ATPase 调节的相对独立的 Ca^{2+}转运系统，也是胞内 Ca^{2+}库之一并起着信号调节的作用[2]。研究表明心肌重塑中普遍存在 c-fos、c-myc、β-MHC 和 c-jun 等基因的表达重调，相应蛋白合成改变等变化[3]，但心肌重塑中 Ca^{2+}稳态失衡和 Ca^{2+}信号通路与重塑相关基因表达的关系尚未完全阐明。本实验通过在体外培养心肌细胞上观察 NE 刺激下 Ca^{2+}信号通路和重塑相关基因 c-fos 和 β-MHC 表达和蛋白合成的关系。

在缺氧、心脏负荷过重等刺激因素的作用下，体内交感神经兴奋，分泌的 NE 增多，持续作用于心肌细胞，通过多种信号途径导致心肌肥大[4]。目前认为，NE 刺激心肌肥大主要是通过 α_1受体介导，但 β 受体也参与发挥重要作用[5]。受体激活后使细胞内 Ca^{2+}通道开放，Ca^{2+}浓度升高[6]，通过 PKC 信号转导途径激活一系列转录因子而导致心肌细胞肥大。本实验中可见以 10^{-5} mol/L 的 NE 刺激心肌细胞，其 ^{3}H-leucine 掺入量增加，表明其蛋白的合成速率高于正常；c-fos 明显表达(正常对照无表达)β-MHC mRNA 的表达丰度增高，表明采用这一浓度的，NE 可以有效地促进培养的心肌细胞肥大。

c-fos 是对细胞的生长分化有重要意义的核内原癌基因[7]，可作为心肌肥大的初始反映标志之一。c-fos 的高表达在心肌重塑的发生中起着重要作用[8,9]，其表达产物 Fos 是心肌重塑过程中肥大基因表达和蛋白合成的重要调节因子[10]。在正常情况下，c-fos 除造血组织外只有很低水平的表达，在外部刺激因素如血管紧张素、儿茶酚胺等的作用下，通过激活磷脂酶 C，产生三磷酸肌醇和二酯酰甘油，再通过胞内 Ca^{2+}信号和 PKC 途径，MAPK 激活，引起 c-myc 和 c-fos 等转录因子磷酸化，表达增加[11]。心肌肌球蛋白是心肌细胞中含量最高的收缩蛋白，两种肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)基因均存在于哺乳动物的基因组中，分为 α-MHC 和 β-MHC 基因。在 NE 和 AngⅡ等刺激较长时间作用下引起的心肌重塑中，β-MHC 基因表达增加，β-MHC 是重要的引起心肌重塑的次组应答基因[12,13]。

BAPTA 是一种细胞内的快速钙离子络合剂，从而干扰正常 Ca^{2+}离子的释放和重摄取，阻断 Ca^{2+}信号转导通路[14]。本实验结果显示，NE 刺激后心肌细胞的 ^{3}H-leucine 掺入量比正常对照组显著升高，c-fos 和 β-MHC mRNA 的表达丰度也显著升高，表明 NE 刺激心肌细胞蛋白合成增加，细胞核反应过程增强；而用 BAPTA 阻断 Ca^{2+}信号转导通路后，心肌细胞的 ^{3}H-leucine 掺入量，c-fos 和 β-MHC 表达显著降低，说明 Ca^{2+}释放形成的 Ca^{2+}信号在 NE 刺激引起心肌细胞肥大中起着重要作用，促进了 c-fos 及 β-MHC 的过度表达和蛋白合成。而单纯 BAPTA 阻断组的 ^{3}H-leucine 摄入量比正常对照组低，β-MHC 的表达低于正常组，提示 Ca^{2+}信号不仅在 NE 刺激下被激活，而在正常细胞中也随时发挥信号转导作用，参与调节相关基因心肌的表达和蛋白合成。

上述实验结果显示，Ca^{2+}信号通路在 NE 刺激导致心肌细胞肥大反应过程中起着至关重要的作用。其过程中通过以 Ca^{2+}信号为中心的各种信号转导通路将信息传向细胞核，并进一步的作用于各种反应元件，启动基因 c-fos 和 β-MHC 等的表达，蛋白合成的增加，从而最终导致心肌重塑。

参考文献：

[1] Kawai M, Kawashima S, Sakoda T, *et al*. Ral GDP dissociation stimu-

lator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy[J]. Hypertension, 2003, 41(4): 956-962.
[2] 王培勇, 汤 健, 庞永政, 等. 心肌细胞核 Ca^{2+}-ATP 酶活性特征的研究[J]. 北京医科大学学报, 1997, 29(4): 329-332.
[3] Yamazaki T, Yazaki Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy[J]. Z Kardiol, 2000, 89(1): 1-6.
[4] Dash R, Schmidt A, Pathak A, *et al*. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine-induced hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(3): 704-714.
[5] Leicht M, Greipel N, Zimmer H. Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture[J]. Cardiovasc Res, 2000, 48(2): 274-284.
[6] Kudoh A, Kudoh E, Katagai H, *et al*. Norepinephrine-induced inositol 1, 4, 5-trisphosphate formation in atrial myocytes is regulated by extracellular calcium, protein kinase C, and calmodulin[J]. Jpn Heart J, 2003, 44(4): 547-556.
[7] Mikula M, Gotzmann J, Fischer A N, *et al*. The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis[J]. Oncogene, 2003, 22(43): 6725-6738.
[8] Deindl E, Kolar F, Neubauer E, *et al*. Effect of intermittent high altitude hypoxia on gene expression in rat heart and lung[J]. Physiol Res, 2003, 52(2): 147-157.
[9] Aoki H, Richmond M, Izumo S, *et al*. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin Ⅱ-induced cardiac hypertrophy *in vitro*[J]. Biochem J, 2000, 347(Pt 1): 275-284.
[10] Larsen T, Skar R, Frotjold E K, *et al*. Regional activation of the immediate-early response gene c-fos in infarcted rat hearts[J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79(3): 163-172.
[11] Muscella A, Greco S, Elia M G, *et al*. PKC-zeta is required for angiotensin Ⅱ-induced activation of ERK and synthesis of C-FOS in MCF-7 cells[J]. J Cell Physiol, 2003, 197(1): 61-68.
[12] Ishibashi Y, Takahashi M, Isomatsu Y, *et al*. Role of microtubules versus myosin heavy chain isoforms in contractile dysfunction of hypertrophied murine cardiocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(3): H1270-H1285.
[13] Morkin E. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart[J]. Circulation, 1993, 87(5): 1451-1460.
[14] 高本波, 雷蓓蕾, 韩启德. 激动 α_{1B}-肾上腺受体对 DDT1 MF-2 细胞生长的刺激作用及其途径[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 30-33.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2005)15-1537-01

个案与短篇

输卵管开窗术后同侧宫角妊娠足月分娩1例

A case report of term delivery of cornual pregnancy after homolateral oviduct fenestration

刘 强,李 力,胡 珊,吕小利 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042)

患者33岁,G3P0(孕3产0),因"停经39^{+4}周,阴道流液30 min"于2004年6月25日入院。平时月经规则,人工流产1次。2001年因异位妊娠行右输卵管开窗术,术后避孕半年。末次月经2003年9月21日,预产期2004年6月28日,停经32 d出现阴道少许流血,B超提示:"宫内妊娠,宫角妊娠(右)"。行保胎治疗(黄体酮20 mg肌肉注射1次/d)2周。停经40^{+} d出现轻微早孕反应,孕3个月自然消失。孕期无异常,产前检查正常。入院前30 min出现阴道流液,量约200 ml,色清亮,伴不规律下腹胀痛。入院检查:体温36.8 ℃,脉搏84次/min,呼吸20次/min,血压110/70 mmHg,宫高33 cm,腹围110 cm,胎方位LOA,胎心142次/min,扪及不规律宫缩,估计胎儿体质量3 400 g。肛查:先露头,高浮,宫口未开,胎膜已破,羊水清亮。B超:双顶径9.2 cm,羊水指数11.7 cm,FL 7.7 cm,胎盘Ⅱ级,胎儿颈部见一"W"型压迹。于6月25日13:00行子宫下段剖宫产术,术中见右侧输卵管较迂曲、与子宫下段前壁、膀胱粘连,分离粘连13:20手取一活男婴,胎方位LOA(枕左前),新生儿体质量3 400 g,身长52 cm,Apgar评分1 min及5 min均为10分。胎盘滞留,行人工剥离,发现胎盘附着于右侧宫角,胎盘完整、球拍状、质量400 g,体积14 cm×15 cm×3.5 cm,胎膜粘连,脐带长约60 cm,绕颈2周,左侧卵巢及输卵管未见异常。胎盘剥出见右侧宫角突起直径约7 cm包块,壁薄,质软,收缩差,探及包块与宫腔相通,圆韧带位于包块的外侧。行清宫术,刮出少许胎盘胎膜组织。右侧宫角注射10 U缩宫素。为防止产后出血及宫腔积血,征求家属意见后行子宫动脉上行支结扎术。常规缝合子宫切口及关腹。术中出血450 ml。术后予抗炎、缩宫治疗。恢复良好,宫缩佳,恶露量正常,术后第5天出院。术后诊断:孕39^{+4}周G3P0LOA已产,宫角妊娠(右),胎膜早破,珍贵儿,脐带绕颈2周,球拍状胎盘

讨论

宫角妊娠是指受精卵种植在子宫的角部,胚胎向宫腔内发育生长而不是向间质部发育。临床较为罕见,Jausen提出的诊

(下转1540页)

作者简介:刘 强(1975-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事围产医学方面的研究。电话:(023)68757249

收稿日期:2005-01-01;修回日期:2005-04-21