论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0630-03

心肌肥厚大鼠心肌细胞核体外转录活性和RNA核孔转出的变化

刘 健[1],肖颖彬[1],刘晓莉[1],何作云[2],王培勇[3] (第三军医大学:[1]新桥医院心血管外科,[2]心血管内科,重庆 400037,[3]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)

提 要:目的 研究大鼠心肌细胞核体外转录活性、RNA核孔转出和核外Ca^{2+}浓度([Ca^{2+}])对其的影响,以探讨心肌重塑时核Ca^{2+}在其中的作用和意义。**方法** 制备腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚模型、差速离心和密度梯度离心提纯心肌细胞核,同位素掺入法分析心肌细胞核体外转录活性和RNA核孔转出。**结果** 腹主动脉缩窄术后4周大鼠心肌显著肥大,伴有明显的血流动力学异常。与正常对照组比较,腹主动脉缩窄心肌肥厚组细胞核体外转录活性和RNA核孔转出明显增加。在核外[Ca^{2+}]大于10^{-4} mol/L时,转录活性和RNA核孔转出发生显著变化($P<0.05$)。**结论** 压力超负荷心肌肥厚发生时,细胞核体外转录活性上调,RNA核转出量增加,可能在介导基因表达异常中起重要作用。

关键词: 心肌肥厚;细胞核;体外转录活性,RNA核孔转出

中图法分类号: R322.11; R394.2; R542.202 **文献标识码:** A

Changes of transcription activity and RNA export of myocardial nuclei *in vitro* in pressure overload-induced rat hypertrophic heart

LIU Jian[1], XIAO Ying-bin[1], LIU Xiao-li[1], HE Zuo-yun[2], WANG Pei-yong[3] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, [2]Department of Cardiology, Chongqing 400037, [3]Department of Pathophysiology, Institute of High Altitude Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the transcription activity and RNA export of myocardial nuclei and the effect of Ca^{2+} on them *in vitro* in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. **Methods** The rat model of cardiac hypertrophy was established by abdominal aortic constriction. Differential centrifugation and isopyknic gradient centrifugation were employed to fractionate rat cardiac nuclei. The activity of nuclear transcription and the RNA export out of nuclei were measured by [^{3}H]-UTP incorporation assay. **Results** Both transcription (RNA synthesis) and RNA export from nuclei *in vitro* increased in overload-induced cardiac hypertrophy as compared with those in control ($P<0.05$). The [Ca^{2+}]-response curves showed that transcription activity of myocardial nuclei *in vitro* kept at a plateau in the range of $0-10^{-4}$ mol/L extra nuclear [Ca^{2+}], but were inhibited in more than 10^{-4}mol/L extra nuclear [Ca^{2+}]. Absolute exports of RNA were not significantly dependent on calcium concentration in both groups ($P>0.05$), but relative exports of RNA were increased in more than 10^{-4}mol/L extra nuclear [Ca^{2+}]. **Conclusion** The transcription activity of nuclei and relative exports of RNA were regulated by extra nuclear calcium concentration (more than 10^{-4} mol/L). The up-regulation of transcription activity and RNA export of nuclei might play an important role in development of overload-induced cardiac hypertrophy.

Key words: myocardial hypertrophy; cell nuclei; transcription activity; RNA export

心肌肥厚是心肌细胞和心肌间质细胞对多种刺激的适应性反应,是细胞内一系列基因异常表达和细胞表型改变的结果[1,2]。目前已知心肌肥厚时存在核功能异常和Ca^{2+}信号紊乱,令人感兴趣的是新近的研究表明Ca^{2+}也是细胞核内的重要信号,参与核功能的调节,如细胞增殖分化、DNA修复、DNA复制、基因表达、核蛋白磷酸化以及细胞凋亡等[3]。因此,本研究在腹主动脉缩窄大鼠动物模型上,采用分离的细胞核,研究Ca^{2+}信号对心肌细胞核体外转录活性、RNA经核孔转出的影响,探讨核钙信号与核反应在心肌肥厚发生过程中的病理生理意义,以进一步阐明心肌肥厚形成的机制。

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: 刘 健(1968-),女,山东省日照市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事心肌重塑方面的研究。电话:(023)68774667, E-mail: jiana686@yahoo.com.cn

通讯作者: 王培勇,电话:(023)68752340-8207, E-mail: pywang@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-03-11;**修回日期:** 2005-06-30

1　材料与方法

1.1　实验动物和主要试剂

健康雄性 Wistar 大鼠 100 只,体质量 150 ~ 250 g,购自第三军医大学实验动物中心。^{3}H-UTP(40.7 × 10^{10} Bq/mmol)购自北京中国原子能研究院同位素所,苯甲基磺酰氟(PMSF),三磷腺苷(ATP),三磷酸尿苷(UTP)均系美国 Sigma 公司产品。spermidine,三磷酸鸟苷(GTP),三磷酸胞苷(CTP)系瑞典 Fluka AG 公司产品。

1.2　腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚模型制备和分组

随机分为腹主动脉缩窄心肌肥厚组和对照组(假手术组),每组 50 只。分离腹主动脉,在右肾动脉上沿腹主动脉用丝线将 0.8 mm 的注射针头扎紧后迅速将针头移去,缝合关腹,缩窄饲养 4 周。假手术组不做丝线接扎,其他处理相同。用生理多道仪记录血流动力学指标,心肌肥大程度以左室重量指数表示。

1.3　心肌细胞核的提纯

所有操作在 0 ~ 4 ℃下进行。大鼠麻醉后开胸迅速取出心肌,用 50 ml 冰冷 TKM 液(mmol/L:Tris-HCl 50、KCl 25、$MgCl_2$ 5; pH 7.5)洗去红细胞,剪碎后加入 5 倍体积等渗匀浆液(mmol/L:蔗糖 250、EGTA 1.0、DTT 1.0、PMSF 1.0,和 leupeptin、aprotinin、pepstatin A 各 1 μg/ml 的 TKM 液)中,用内切式匀浆器低速匀浆 2.5 min (30 s × 5 次),200 目尼龙布过滤,离心(1 400 × g,10 min)2 次,弃上清,将沉淀加入 1 倍体积的含 1.0 mol/L蔗糖-TKM 液中,充分混匀加入 3 倍体积的 2.5 mol/L 蔗糖-TKM,混匀后超速离心(120 000 × g,60 min),沉淀即为纯化的心肌细胞核。

1.4　核体外转录活性与核外钙的关系探讨[4]

在 100 μl 的反应液(含有 Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8.0, β 巯基乙醇 2.5 mmol/L, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, KCl 120 mmol/L, ATP, GTP 及 CTP 各 0.5 mmol/L, UTP 0.05 mmol/L, ^{3}H-UTP 11.1 × 10^4 Bq, spermidine 0.75 mmol/L)中,加入 20 μg DNA 的细胞核,和不同浓度的自由钙 0 ~ 10^{-2} mol/L,所需要的 EGTA 和总[Ca^{2+}]的计算根据 Chris Patton 的软件 WinMAXC (http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html)的多元缓冲对确定,于 30 ℃水浴中反应 15 min 后,加入 2 ml 冰冷的反应终止液(5% TCA-$Na_4P_2O_7$ 10 mmol/L)以终止反应。经 0.2 μm 的微孔滤膜抽滤后,分别用反应终止液及 5% TCA 各洗 2 次,每次约 10 ml,滤膜烘干后,浸入甲苯闪烁液中计数。

1.5　RNA 从细胞核内向核外转运与核外钙的关系

正常细胞核转录体系于 30 ℃反应 15 min 后,加入 0.5 ml 冰冷的反应终止液(甘油 12.5%, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L,二巯基乙醇 2.5 mmol/L, EDTA 0.05 mmol/L, $Na_4P_2O_7$ 0.5%, Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8.0),混匀后用 1.2 μm 孔径的微孔滤膜过滤以除去已转运出核外的 RNA,并用反应终止液及 5% TCA - 0.5% $Na_4P_2O_7$ 各洗 2 次。滤膜烘干后,浸入闪烁液中计数,由此可算出核内 RNA 中^{3}H-UTP 的掺入量。总 RNA 中^{3}H-UTP 的掺入量测定条件同上,但抽滤时用 0.2 μm 孔径的微孔滤膜。将总 RNA 中的^{3}H-UTP 的掺入量减去核内 RNA 中的^{3}H-UTP 的掺入量,即为向核外转运的 RNA 中的^{3}H-UMP 掺入量。

1.6　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 Weltch t 检验,多组间比较采用方差分析组间 q 检验。

2　结果

2.1　腹主动脉缩窄大鼠心肌形态学和血液动力学指标

HE 染色观察到,腹主动脉缩窄大鼠左室壁显著增厚,心肌纤维增粗,排列紊乱。腹主动脉缩窄大鼠左室重量指数较对照增加 52.6%,平均颈总动脉压较对照组高 42.5%,颈总动脉收缩压增加 44.7%,颈总动脉舒张压增加 44.8%,左室收缩末压增加 26.1%,左室舒张末压减少 58.8%,左室发展压分别下降 22.1% 和 27.3% (P < 0.01)。

2.2　核外[Ca^{2+}]对细胞核体外转录活性的影响

在核外[Ca^{2+}]为 0 ~ 10^{-4} mol/L 范围时,心肌细胞核的体外转录活性,不随核外[Ca^{2+}]的增加而变化(P > 0.05),在[Ca^{2+}]大于 10^{-4} mol/L 时,则随核外[Ca^{2+}]的增加而显著下降(P < 0.05)。与正常对照组相比较,腹主动脉缩窄心肌肥厚组心肌细胞核体外转录活性增加,在[Ca^{2+}]为 10^{-6} ~ 10^{-4} mol/L 时增加显著(P < 0.05,表 1)。

2.3　核外[Ca^{2+}]对 RNA 经核孔向核外转出的影响

腹主动脉缩窄心肌肥厚组心肌细胞核的 RNA 核孔转出量较正常组明显增加,其中[Ca^{2+}]为 10^{-7} 和 10^{-4} mol/L 时显著增加(P < 0.05),但两组的 RNA 核孔转出量不随核外[Ca^{2+}]的增加而变化(P > 0.05,表 1)。

2.4　核外[Ca^{2+}]对 RNA 经核孔向核外转出相对量的影响

在核外[Ca^{2+}]为 0 ~ 10^{-4} mol/L 范围时,心肌细胞核的 RNA 转出相对量(RNA 核转出占总转录的百分比),与核外[Ca^{2+}]的变化无明显关系(P > 0.05),但在核外[Ca^{2+}]高于 10^{-4} mol/L 时,细胞核 RNA 核孔转出相对量显著增加(P < 0.05,表 1)。

表 1　核外[Ca^{2+}]对核体外转录活性、RNA 核孔转出绝对量和相对量的影响 (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

项目	组别	[Ca^{2+}] (mol/L)						
		0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
转录活性	对照组	280.0 ± 34.4	295.4 ± 29.8	259.1 ± 19.2	247.3 ± 23.5	256.3 ± 15.5	181.8 ± 12.5	127.2 ± 31.6
(pmol · h^{-1} · mg^{-1})	心肌肥厚组	314.5 ± 31.1	341.6 ± 38.1	308.5 ± 14.3[a]	302.2 ± 4.6[a]	317.2 ± 15.0[b]	203.6 ± 15.6	141.8 ± 11.7
RNA 核孔转出	对照组	82.8 ± 28.6	98.7 ± 31.3	80.5 ± 12.7	79.0 ± 10.0	90.0 ± 16.7	88.8 ± 14.5	95.0 ± 28.9
(mol · h^{-1} · mg^{-1})	心肌肥厚组	100.0 ± 16.8	140.0 ± 31.7[a]	117.9 ± 12.4	96.7 ± 30.8	120.4 ± 4.1[a]	104.5 ± 39.8	108.2 ± 27.6
RNA 核孔转出	对照组	29.0 ± 10.4	33.4 ± 9.2	31.5 ± 5.3	30.8 ± 4.3	35.2 ± 6.9	49.1 ± 9.8	74.2 ± 11.1
(%)	心肌肥厚组	31.6 ± 5.4	40.9 ± 7.3	38.4 ± 5.9	31.9 ± 9.6	40.7 ± 0.6	52.0 ± 22.6	75.7 ± 14.9

a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与对照组比较

3 讨论

心肌结构功能的异常是心肌特异基因表达改变的结果，心肌重塑时不仅编码转录因子的早期反应基因表达迅速增加，胚胎型基因如β-肌球重链（β-MHC）、α-骨骼肌型 actin、心房利钠因子（ANF）、β-型利钠肽（BNP）和肌球轻链 2（MLC2）也通过转录调节机制使其表达上调[5]。游离钙离子是细胞内重要的第二信使，细胞质游离[Ca^{2+}]c 与细胞核[Ca^{2+}]n 之间存在明显的钙梯度，并存在相对独立的 Ca^{2+} 调节系统[6]，我们以往的实验也证实心肌肥厚时，心肌细胞核钙转运系统（Ca^{2+}-ATPase、ryanodine 受体和 IP_3 受体）发生严重紊乱，推测心肌肥厚过程中始于细胞膜的肥大信号到心肌细胞核基因表达重排的分子机制可能也与细胞核钙调节有关。

本实验显示，在核外[Ca^{2+}]低于 10^{-4} mol/L 时，其对心肌细胞核体外转录活性无明显影响，在核外[Ca^{2+}]大于 10^{-4} mol/L 时，则随核外[Ca^{2+}]浓度的增加而显著下降。说明核被膜的钙屏障作用可能使细胞核的转录活性保持相对稳定，核钙超载时则抑制核的体外转录活性。真核生物 RNA 合成后还必须从细胞核转运到胞浆才能执行其生物功能，本实验显示 RNA 核孔转出绝对量不受核外钙浓度的影响。RNA 经核孔转出的相对量在核外[Ca^{2+}]大于 10^{-4} mol/L 时，则随核外[Ca^{2+}]的增加而显著增加。说明核外[Ca^{2+}]大于 10^{-4} mol/L，不论对细胞核体外转录反应还是对 RNA 核孔转出，均是关键的钙调节转折点。最近的研究表明，核被膜不仅对 Ca^{2+} 不能自由通透，核孔还存在关闭和开放的两种状态，并受核 Ca^{2+} 可逆调节，Stoffler 等[7]用原子力显微镜观察到非洲蟾蜍卵母细胞核孔复合体，在核外[Ca^{2+}]为 10^{-4} mol/L 时核孔开放，去除 Ca^{2+} 后引起核孔关闭，重新加入 Ca^{2+} 至 10^{-4} mol/L 时则使核孔重新开放，由此提示，由于核孔开放，可能显著影响细胞核的体外转录活性和 RNA 核孔转出。

细胞核体外转录反应是研究真核基因表达转录水平调控的重要手段。本实验显示腹主动脉缩窄心肌肥厚组心肌细胞核体外转录活性和 RNA 核孔转出绝对量较正常对照组明显增加，提示心肌肥厚时基因转录调节、RNA 转运和蛋白合成功能可能明显增强。但核外钙浓度对核体外转录活性和 RNA 经核孔转出无明显影响，提示压力超负荷心肌肥厚的发生，可能不是由核外钙直接作用介导的结果。心肌细胞是可兴奋细胞，细胞内的游离钙随心脏的收缩周期呈大幅度的周期性变化。由于核被膜的屏障作用及核孔的核 Ca^{2+} 调节作用，从而保证在心肌细胞质 Ca^{2+} 大幅度周期变化时核功能的精密调节和核功能的相对稳态。有研究表明核[Ca^{2+}]升高，通过激活转录因子 CREB 和 Elk-1 介导基因转录[8,9]，心肌细胞核 IP3 受体介导的核内 Ca^{2+} 升高直接控制基因的表达，而向细胞质内释放的 Ca^{2+} 则仅参与调节细胞收缩等过程[10]，因此核 Ca^{2+} 对转录的精密调节，将对细胞功能的维持具有至关重要的意义。我们以往的实验显示，心肌肥厚组核内游离[Ca^{2+}]随核外[Ca^{2+}]的升高而增加约 3.3 倍，且心肌肥厚组核内[Ca^{2+}]明显高于对照组，是正常对照组的 1.8～5.9 倍[11]。由此提示，心肌肥厚时心肌细胞核体外转录活性和 RNA 核孔转出增加可能是核内 Ca^{2+} 升高介导的结果，核内 Ca^{2+} 可能通过激活多种核内功能蛋白如 Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶、磷酸酶、蛋白酶等，在介导激活心肌肥厚相关基因的转录反应中起关键作用[12]。

参考文献：

[1] DORN G W, 2nd., HAHN H S. Genetic factors in cardiac hypertrophy [J]. Ann NY Acad Sci, 2004, 1015: 225－237.

[2] TARONE G, LEMBO G. Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy [J]. Trends Mol Med, 2003, 9(9): 376－382.

[3] DOLMETSCH R. Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus [J]. Sci STKE, 2003, 2003(166): PE4.

[4] HICKEY R J, BOSHAR M F, CRAIN W R, Jr.. Transcription of three actin genes and a repeated sequence in isolated nuclei of sea urchin embryos [J]. Dev Biol, 1987, 124(1): 215－227.

[5] SAITO T, FUKUZAWA J, OSAKI J, *et al*. Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ in pressure overload-induced cardiac hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(9): 1153－1160.

[6] LEITE M F, THROWER E C, ECHEVARRIA W, *et al*. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2975－2980.

[7] STOFFLER D, GOLDIE K N, FEJA B, *et al*. Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy [J]. J Mol Biol, 1999, 287(4): 741－752.

[8] QUESADA I, ROVIRA J M, MARTIN F, *et al*. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca^{2+} transients that modulate nuclear function [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(14): 9544－9549.

[9] PUSL T, WU J J, ZIMMERMAN T L, *et al*. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium [J]. J Biol Chem, 2002, 277(30): 27517－27527.

[10] GARCIA K D, SHAH T, GARCIA J. Immunolocalization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in cardiac myocytes from newborn mice [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(4): C1048－C1057.

[11] 刘 健，何作云，王培勇. 压力超负荷性心肌肥厚大鼠心肌细胞核钙转运的改变 [J]. 生物物理学报, 2002, 18(1): 33－38.

[12] ZHANG T, MIYAMOTO S, BROWN J H. Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ: friends or foes? [J]. Recent Prog Horm Res, 2004, 59: 141－168.

（编辑 周 芳）