DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.010
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
1152 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)13-1152-03

大鼠心室肌 α_1-肾上腺素能受体介导的 *c-fos*、*c-myc* 表达

刘晓红,魏振宇,高 原 (遵义医学院生理学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 探讨去甲肾上腺素(NE)诱导心肌细胞原癌基因的超常表达与适应性心肌肥大的关系及其受体介导和跨膜信号转导的作用。方法 以 10^{-6} mol/L NE 灌流大鼠离体心脏 1 h,采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法,测定不同实验条件下左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 表达水平。结果 10^{-6} mol/L NE 灌流心脏后 *c-fos* 和 *c-myc* 表达均显著增强;用 5×10^{-6} mol/L的哌唑嗪预先灌流可完全阻断NE诱导的 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增强的效应;分别用 50 mmol/L 的新霉素和 10 μmol/L的钌红预先灌流心脏,可显著抑制 NE 诱导的 *c-fos* 和 *c-myc* 表达。结论 NE 经 α_1-受体介导,可诱导心肌 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增强;磷酸肌醇-钙信号系统和二酰基甘油-蛋白激酶 C 信号系统可能与 NE 诱导心肌 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增强有关。

关键词:去甲肾上腺素;α_1-受体;*c-fos*;*c-myc*;大鼠
中图法分类号:R322.11;R394.2;R971.93 文献标识码:A

Expressions of *c-fos* and *c-myc* mediated by α_1-adrenergic receptor in rat ventricular muscles

LIU Xiao-hong, WEI Zhen-yu, GAO Yuan (Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To study the signal transduction pathway of norepinephrine (NE)-induced expressions of oncogenes *c-fos* and *c-myc* in the rat heart. Methods mRNA levels of *c-fos* and *c-myc* in the left ventricle of the Langendorff-perfused rat heart was quantitated by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Results NE increased the expressions of *c-fos* and *c-myc* while the effects of NE on the expressions of *c-fos* and *c-myc* were blocked by α_1-adrenergic blocker prazosin (5×10^{-6} mol/L) completely. Neomycin (5 mmol/L) and ruthenium red (10 μmol/L) decreased the NE-induced *c-fos* and *c-myc* mRNA levels. Conclusion NE can induce the expressions of oncogenes *c-fos* and *c-myc* in the ventricle mediated by α_1-adrenergic receptor. The signal transduction pathway of NE-induced *c-fos* and *c-myc* expressions may be associated with inositol phosphates-Ca^{2+} system and diacylglycerol-protein kinase C system.

Key words: norepinephrine; α_1-adrenergic receptor; *c-fos*; *c-myc*; signal transduction; rat

儿茶酚胺不仅有重要的血流动力学作用,而且还能直接作用于心肌,引起心肌 *c-fos*、*c-myc* 等原癌基因表达,继而引起 RNA、蛋白质合成增加和细胞体积增大[1~3]。在心血管系统压力负荷持续性增加时,心交感节后纤维大量释放去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),继之往往又出现代偿性心肌肥大。因此,NE 对 *c-fos*、*c-myc* 等原癌基因表达的作用机制自然引起人们的关注。从现有文献看,在整体水平和细胞培养水平,NE 均能引起 *c-fos* 和 *c-myc* 等原癌基因表达和细胞肥大,且用 α_1-受体拮抗剂可以阻断 NE 诱导的原癌基因表达和心肌肥大,而β-受体拮抗剂则无效[1,3,4]。这些结果说明 NE 经 α_1-受体介导可诱发心肌原癌基因表达。

关于 α_1-受体介导的信号转导途经,比较经典的是"磷酸肌醇—钙"和"二酰基甘油—蛋白激酶 C"信号系统。值得探讨的问题是,心肌的 α_1-受体究竟如何通过上述两个信号转导系统将细胞外 NE 的化学信息进行传递、放大而产生原癌基因表达增强的生物学效应的。为此,本实验以 NE 对离体的大鼠心脏进行灌流。针对磷酸肌醇—钙信号系统和二酰基甘油—蛋白激酶 C 信号系统中的一些重要环节,观察肾上腺素能受体、磷脂酶 C(PLC)、胞浆内 Ca^{2+} 等因素在 NE 诱导心肌 *c-fos* 和 *c-myc* 表达中的作用,以探讨上述问题。

基金项目:贵州省教育厅资助项目(C-126)
Supported by the Educational Ministry of Guizhou Province (C-126)
作者简介:刘晓红(1971—),女,贵州省兴仁县人,硕士研究生,主要从事心血管生理学方面的研究。电话:(0852)8647218
收稿日期:2003-09-02;修回日期:2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料和试剂

实验用 Wistar 大鼠(雌雄不拘), 共 96 只, 体质量 150～200 g, 由遵义医学院实验动物中心提供。去甲肾上腺素购自上海禾丰制药有限公司; 新霉素购自上海生工生物公司; 哌唑嗪系南京药科大学赠; 钌红系中山医科大学赠; 溴化乙锭(E. B)、dNTP、Rnasin、Mops、Tris 、Tag DNA 聚合酶购自上海化美公司; AMV 反转录酶购自 Promega; Oligo(dT)15 Primer 购自 Amresco 公司 。本实验所需其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2　离体心脏灌流

用戊巴比妥钠腹腔麻醉(40～50 mg/kg), 开胸取出心脏后, 通过主动脉将心脏悬挂于 Langendoff 心脏灌流装置上。用 95%O_2 和 5%CO_2 混合气饱和的 37 ℃的 Krebs-Henseleit 溶液灌流心脏, 灌流压为 8 kPa。在灌流液中加入药物前至少平衡灌流 15 min, 或先用拮抗剂灌流 10 min 后再加入 NE 灌流 1 h, 灌流毕取左心室置于液氮中备用。

1.3　心脏总 RNA 的提取和引物合成

RNA 提取用异硫氰酸胍一步法[5]。引物参照 Oliver Stepien 等提供的序列, 根据电脑基因库核苷酸顺序资料, 由上海生工生物公司合成。引物序列为:

c-fos[6]:　sense: 5′-AGCTGACAGATACGCTCCAA-3′
　　antisense: 5′-TAGGTGAAGACAAAGGAAGACG-3′

c-myc[6]:　sense: 5′-CCACAAGGAAGGACTATCCAGC-3′
　　antisense: 5′-TTGTGCTCATCTGCTTGAACGG-3′

1.4　cDNA 合成和 PCR 扩增体积制备

5 μgRNA, 5 μl 寡核苷酸 dT 引物, 5 μl dNTP, Ransin 20 U, AMV 反转录酶 10 U, 加灭菌三蒸水至总体积 20 μl, 42 ℃, 1 h。选定扩增循环数为 30。取逆转录 cDNA 4 μl, 10× 扩增缓冲液 5 μl, $MgCl_2$ 3 μl, dNTP 4 μl, 上、下游引物 25 Pmol, *Taq* DNA 聚合酶 1 μl, 加灭菌三蒸水至总体积 50 μl。在 PCR 仪上扩增, 反应条件: 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min。扩增 30 循环。全部周期结束后于 72 ℃延伸 5 min。

1.5　PCR 产物分析

取 15 μl 扩增产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 100 V, 1 h。溴乙锭(E. B)染色, 紫外灯下观察并照相记录结果。用 Mias 99-B 图像分析系统对底片的灰度进行分析。

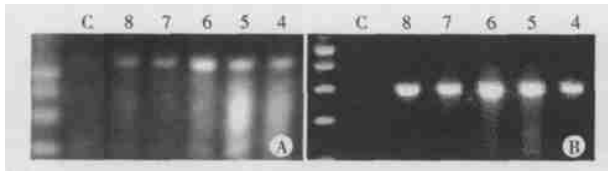
1.6　统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验。

2　结果

2.1　NE 诱导左心室 *c-fos*、*c-myc* 基因表达

2.1.1　NE 作用的量效关系　　用含不同浓度 NE(10^{-8}～10^{-4} mol/L)的 K-H 液灌流心脏 1 h, 观察不同浓度的 NE 对 *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 含量的影响。随着灌流液中 NE 浓度的升高, *c-fos*、*c-myc* 基因表达逐渐增强。在 NE 浓度为 10^{-6} mol/L 时, *c-fos*、*c-myc* 基因表达达峰值, 分别为对照组的 2.5 倍和 3.9 倍(P 值均小于 0.01)(图 1)。



A: *c-fos*; B: *c-myc*

图 1　*c-fos* 、*c-myc* RT-PCR 产物电泳图

Fig 1　Electrophoretic picture of *c-fos* and *c-myc* RT-PCR production

2.1.2　NE 作用的时间过程　　在同一批实验中, 用 10^{-6} mol/L NE 分别灌流心脏 15、30、60、90、120 min, 分别测定 *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 水平。灌流 15 min 时, *c-fos* 基因表达增强, 60 min 达峰值。而 *c-myc* 在灌流 30 min 时表达, 90 min 才达峰值, 随后逐渐下降。

2.2　哌唑嗪对 NE 诱导左心室 *c-fos*、*c-myc* 基因表达的影响

用 10^{-6} mol/L NE 灌流心脏 1 h, *c-fos*、*c-myc* 的表达比对照组明显增高($P<0.01$)。预先加入哌唑嗪(5×10^{-6} mol/L)灌流 10min, 然后再加入 NE(10^{-6} mol/L)灌流 1 h, 测得的 *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 水平明显低于单独用 NE 灌流组($P<0.01$), 与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)(表 1)。预先加入β-受体阻断剂心得安(10^{-6} mol/L)灌流, 再加 NE(10^{-6} mol/L)灌流, 测得的 *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 水平与单独用 NE(10^{-6} mol/L)灌流组相比无显著性差异($P>0.05$)(图表上未显示)。

2.3　新霉素对 NE 诱导左心室 *c-fos*、*c-myc* 基因表达的影响

预先用新霉素(5 mmol/L)灌流, 然后加 NE(10^{-6} mol/L)灌流心脏, 测得 *c-fos*、*c-myc* 基因表达水平与单独用 NE(10^{-6} mol/L)灌流组相比, *c-fos*、*c-myc* 表达明显降低(P 值均小于 0.01), *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 比单独用 NE(10^{-6}mol/L)灌流组分别下降(52±7.0)%和(30.5±6.6)%(表 1)。

表 1　NE、哌唑嗪、新霉素和钌红对心室肌 *c-fos* 和 *c-myc* 表达的影响($n=6$)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of NE, prazosin, neomycin, and ruthenium red on *c-fos* and *c-myc* gene expressions in the left ventricle ($n=6$)($\bar{x}\pm s$)

Group	*c-fos*	*c-myc*
K-H	8.11±4.30	11.13±5.52
NE(10^{-6} mol/L)	20.65±2.21 ##	43.35±4.48 ##
Prazosin+NE(5×10^{-6} mol/L)	7.28±2.64 **	9.34±2.55 **
Neomycin+NE (50 mmol/L)	9.89±1.32 **	30.10±6.51 **
Ruthenium red+NE (10 μmol/L)	11.87±5.31 **	22.51±8.65 **

##: $P<0.01$, *vs* K-H; **: $P<0.01$, *vs* NE

2.4　钌红对 NE 诱导的 *c-fos*、*c-myc* 基因表达的影响

预先用肌质网 Ca^{2+} 释放抑制物钌红(10 μmol/L)灌流 10 min, 然后加 NE(10^{-6} mol/L)灌流, 测得左心室 *c-fos*、*c-myc* 基因表达水平与单独用 NE(10^{-6} mol/L)灌流组相比, *c-fos*、*c-myc* 表达明显降低(P 值均小于 0.01), *c-fos* mRNA、*c-myc* mRNA 水平分别下降(42.5±15.5)%和(48±16.3)%(表 1)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

根据文献报道，给大鼠静脉输注NE[1~3]，或在心肌细胞培养液中加入NE[4]，都能诱导心肌原癌基因 *c-fos* 和/或 *c-myc* 超常表达。在本实验中以 10^{-6} mol/L的NE灌流离体的大鼠心脏1 h，也得到左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达显著增强的结果。在不同的实验性心肌肥大反应中，首先有 *c-fos*、*c-myc* 等原癌基因表达增强，然后才有RNA、蛋白质合成增加和细胞体积增大[1~3,7]。这一事实表明NE诱导心肌细胞 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达可能与心肌肥大有着密切的关系。

NE诱导心肌细胞原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增强的效应看来是通过 α_1-受体介导的。因为 α_1-受体拮抗剂—哌唑嗪能阻断NE诱导的在体的心肌[1,3]和离体培养的心肌细胞[4] *c-fos*、*c-myc* 基因表达及心肌肥大反应，而β-受体阻断剂则无效。本实验也证实 α_1-受体拮抗剂-哌唑嗪可有效抑制NE诱导左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达增强的效应，而β-受体阻断剂-心得安对NE的这一效应无影响。这一结果再次肯定了心肌细胞的 α_1-受体在NE诱导心肌原癌基因表达增强效应中的作用。

在激动 α_1-受体后的诸多信号系统[8]中，以“磷酸肌醇-钙信号系统”和“二酰基甘油-蛋白激酶C信号系统”最受关注。本实验针对以上两个信号系统中的一些重要环节进行了初步的探讨。结果显示，磷脂酶C抑制剂-新霉素能显著削弱NE诱导左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达增强的效应。磷脂酶C激活是磷酸肌醇-钙信号系统和二酰基甘油—蛋白激酶C信号系统激活的前提，此结果提示NE诱导左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 表达可能与这两个信号系统有关。Ca^{2+} 是细胞内最普遍而重要的信号转导成分，在诱导原癌基因表达和心肌肥大中起着重要作用。钙通道阻断剂verpamil和nifedipine可阻断心肌细胞蛋白质合成[9]。本实验观察到，预先用肌质网 Ca^{2+} 释放抑制剂-钌红灌流大鼠离体心脏，NE诱导左心室 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达增强的效应显著削弱。由此可知，在NE诱导左心室原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增强的信号转导过程中，肌质网 Ca^{2+} 释放起着重要的作用。

参考文献：

[1] Zimmer H G. Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression[J]. J Mol Med, 1997, 75(11—12): 849—859.

[2] Hannan R D, West A K. Adrenergic agents, but not triiodo-L-thyronine induce *c-fos* and *c-myc* expression in the rat heart[J]. Basic Res Cardiol, 1991, 86(2): 154—164.

[3] Zimmer H G, Kolbeck R C, Zimmer W. Cardiac hypertrophy induced by α and β-adrenergic receptor stimulation[J]. Cardioscience, 1995, 6(1): 47—57.

[4] Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells in an alpha 1 adrenergic response[J]. J Clin Invest, 1983, 72(2): 732—738.

[5] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156—159.

[6] Oliver S, Jean G, Ding L Z, *et al*. Amlodipine inhibition of serum, thrombin, or fibroblast growth factor-induced vascular smooth-muscle cell proliferation[J]. J Cordiovasc Pharmacol, 1998, 31(5): 768—793.

[7] Hannan R D, Stennard F A, West A K. Expression of *c-fos* and related genes in the rat heart in response to norepinephrine[J]. J Mol Cell Cardiol, 1993, 25(10): 1137—1148.

[8] 李和旺，韩启德. α_1-肾上腺受体的信号转导[J]. 生理科学进展, 1998, 29(1): 17—23.

[9] Calderone A, Thaik C M, Takahashi N, *et al*. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promtoing of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts[J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 812—818.

（编辑 张 宁）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日14时30分。表示年份要写全称，1995年不能写成95年或’95年；1953—1958年不能写成1953—58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用“:”分隔的形式。如：13时45分8秒可以写成13:45:08。

2 计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号 4位和4位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如2 431改为2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net