

hhlim 对心肌肥大的影响及其作用机制探讨*

郑 斌¹⁾ 温进坤^{1)**} 韩 梅¹⁾ 周爱儒²⁾

(¹⁾河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017;

²⁾北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 hhlim 是从胎儿心脏中新近分离和克隆得到的与心脏发生相关的基因, 其表达产物作为转录因子参与多种基因的转录调控和细胞的发育与分化过程. 用细胞转染方法将外源性 hhlim 基因导入原代心肌细胞, 发现该基因强制性表达可使心肌细胞体积明显增大. RT-PCR 和蛋白质印迹结果表明, hhlim 促心肌细胞肥大与诱导 α -肌动蛋白 (α -actin) 过表达及重新启动胚胎期表达基因脑钠肽 (BNP) 表达有关. 用可表达 hhlim 反义 RNA 的真核表达载体转染心肌细胞后, 致心肌细胞肥大因子 ET-1 对 BNP 和 α -actin 表达的诱导受到显著抑制. 这些结果表明, ET-1 促进 BNP 和 α -actin 表达及引发心肌肥大的效应可能由 hhlim 所介导, 提示 hhlim 表达与心肌细胞肥大的启动有关. 单独或共转染转录因子 hhlim、Nkx2.5、GATA-4 表达质粒和 BNP 转录调控区指导的报告基因结果显示, hhlim 强制性表达不仅能直接激活 BNP 基因表达, 而且与 Nkx2.5 具有协同作用. 结果表明, hhlim 可以通过直接或与 Nkx2.5 协同作用激活 BNP 基因的表达.

关键词 hhlim 基因, 心肌细胞, α -肌动蛋白, 脑钠肽

学科分类号 Q78

hhlim 最初是从胎儿心脏中分离和克隆的与心脏发生相关的基因, 因其编码产物与 LIM 蛋白家族高度同源且氨基酸序列中含有典型的 LIM 结构域, 故将其定名为 hhlim^[1]. hhlim 仅在心脏高表达, 除骨骼肌轻度表达外, 其他组织器官均无表达. 最近的研究发现, 在自发性高血压大鼠和心肌肥厚大鼠的心肌细胞中 hhlim 基因表达活性增强, 致心肌肥大刺激因子, 如 ET-1 和 bFGF 等可诱导 hhlim 基因在心肌细胞中进行表达^[2]. 这些研究结果提示, hhlim 基因可能参与心肌肥厚的发生发展过程. 然而, 关于 hhlim 是否能直接引起心肌细胞肥大及其引起心肌细胞肥大的作用机制还不十分清楚. 本研究用携带 hhlim 全长 cDNA 的真核表达载体转染心肌细胞后, 观察其强制性表达对心肌肥大的影响, 并通过检测心肌细胞肥大发生过程中细胞肥大相关基因表达的变化, 探讨 hhlim 致心肌肥大的作用机制.

1 材料和方法

1.1 原代心肌细胞的培养

原代心肌细胞的培养按文献 [3] 报道的方法进行. 取新生胎鼠心室肌, 剪碎后, 用 0.01% II 型胶原酶和 0.1% 胰酶联合消化, 200 g 离心收集细胞, 采用差速贴壁法纯化心肌细胞.

1.2 RNA 提取和 RT-PCR

乳鼠心肌细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养 3~4 天, 撤血清饥饿培养 12 h 后, 换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 并加入 ET-1 至终浓度为 1×10^{-7} mol/L, 继续培养 24 h 和 48 h 后, 提取细胞 RNA. 按照 Taqman Gold RT-PCR 试剂盒说明进行反转录后, 用根据 hhlim cDNA 序列设计的引物 (上、下游引物分别为 5'-GCTGTCTCAG-CACAGACA-3' 和 5'-CACAGATGGCACAGCGGA-3') 和脑钠肽 (BNP) cDNA 引物 (上、下游引物序列分别为 5'-GCTGCTGGAGCTGATAAG-3' 和 5'-TTTGAGGTCTCTGCTGGA-3') 进行荧光定量 PCR, 每组实验平行做三管, 用 GeneAmp 5700 SDS 软件进行数据分析.

1.3 细胞形态观察

用脂质体介导法, 将携带 hhlim 全长 cDNA 的真核表达质粒 pcD2-hhlim 转染心肌细胞. 继续培养 48 h 后, 用 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 随机选择 5 个视野荧光显微镜观察细胞形态并计算表面积. 提取细胞 RNA, 用 RT-PCR 方法检测脑钠肽 (BNP) mRNA 水平.

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000056905-Z) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0311-6265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-25, 接受日期: 2002-12-30

1.4 hhlim 反义 RNA 表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切从 hhlim cDNA 中切出长 293 bp (+ 1 bp~ + 293 bp) 的片段, 将其反向插入 pEGFPN1 质粒, 构建可合成 hhlim 反义 RNA 的表达载体, 经酶切鉴定后, 重组体命名为 p1. 将 p1 转染心肌细胞并加入 1×10^{-7} mol/L ET-1 刺激 48 h 后, 分别提取细胞总蛋白和 RNA, 采用蛋白质印迹检测骨骼肌 α -actin 的含量, RT-PCR 检测 BNP mRNA 水平.

1.5 蛋白质印迹 (Western blot)

用 RIPA 细胞裂解液 (1% NP40, 1% SDS, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10% 甘油, 1 mmol/L 钒酸钠, 1 mmol/L PMSF) 裂解心肌细胞, 提取细胞总蛋白. 用改良酚法测定蛋白质含量后, 取 50 μ g 蛋白质样品经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、转膜和脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后, 依次加入兔抗鼠 α -actin 一抗和羊抗兔二抗室温反应 2h, 四氯-1-萘酚显色.

1.6 报告基因分析

用脂质体介导法将 BNP 转录调控区指导的荧光素酶报告基因 pGL-BNP (- 1 595 bp, Gardner 馈赠) 和不同转录因子表达质粒, 按下述组合方式转染心肌细胞. a. 对照组: 单独转染 pGL-BNP; b. hhlim 组: 0.4 μ g hhlim 表达质粒 pcD2-hhlim+ 0.5 μ g pGL-BNP; c. GATA-4 组: 0.4 μ g GATA-4 表达质粒 pssR α GATA-4 (Akazawa 馈赠) + 0.5 μ g pGL-BNP; d. Nkx2.5 组: 0.4 μ g Nkx2.5 表达质粒 pcDNA3-NKx2.5 (Lee 馈赠) + 0.5 μ g pGL-BNP; e. hhlim+ Nkx2.5 组: 0.4 μ g pcD2-hhlim + 0.4 μ g pcDNA3-NKx2.5 + 0.5 μ g pGL-BNP; f. hhlim+ GATA-4 组: 0.4 μ g pcD2-hhlim + 0.4 μ g pssR α GATA-4 + 0.5 μ g pGL-BNP. 每瓶细胞转染 DNA 总量均为 1.5 μ g, 质粒量不足 1.5 μ g 者用 CMV 载体补齐. 每组平行转染 4 瓶细胞, 以 β -半乳糖苷酶表达质粒 pCMV β -gal 为内参照. 荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性的测定按 Promega 试剂盒说明书进行, 用 SPSS 软件进行配对 *t* 检验.

2 结 果

2.1 ET-1 促进 hhlim 和 BNP 在心肌细胞表达

如图 1 所示, 在原代心肌细胞中 hhlim 基因表达活性较低, ET-1 作用 48 h 后, 其表达被显著诱导, 表达活性达对照细胞的 2.12 倍. BNP mRNA 在原代培养的细胞中不能被检出, ET-1 作用于细

胞 48 h 或转染 pcD2-hhlim 48 h 后, BNP 表达活性显著升高 (图 2).

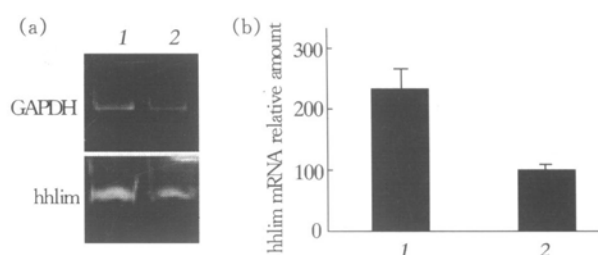


Fig 1 hhlim mRNA expression in cardiac myocytes

(a) RT-PCR products. (b) densitometric scanning. 1: cardiac myocytes treated by ET-1; 2: cardiac myocytes.

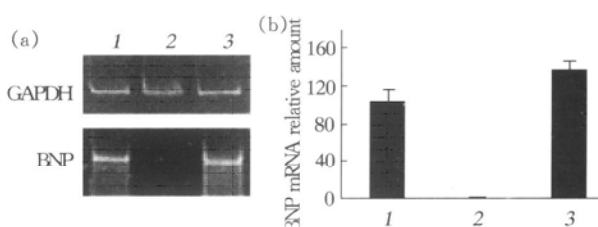


Fig 2 BNP mRNA expression in cardiac myocytes

(a) RT-PCR products. (b) densitometric scanning. 1: pcD2-hhlim infected cardiac myocytes; 2: pcD2 infected cardiac myocytes; 3: cardiac myocytes treated by ET-1.

2.2 反义 hhlim 抑制心肌肥大相关基因表达

为了探讨 ET-1 对心肌肥大相关基因表达的诱导是否由 hhlim 所介导, 用 p1 转染心肌细胞后, 观察 ET-1 对 BNP 和骨骼肌 α -actin 表达的影响. RT-PCR 结果表明, 心肌细胞被可表达 hhlim 反义 RNA 的 p1 转染后, BNP 的表达明显下调, 其表达活性比相应对照细胞降低了 71% (图 3). 蛋白质印迹结果显示, hhlim 强制性表达, 可使心肌细胞 α -actin 水平比转染空载体的细胞升高 146.05%, 转染 p1 后, α -actin 含量比相应对照细

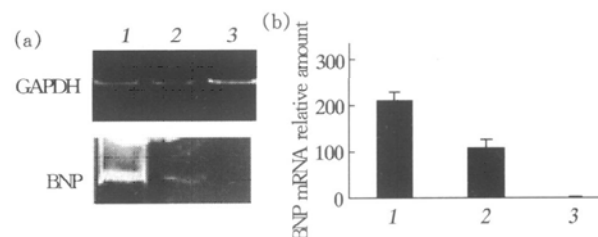


Fig 3 Effect of hhlim antisense RNA on BNP gene expression

(a) RT-PCR product. (b) densitometric scanning. 1: pcD2 infected cardiac myocytes treated by ET-1; 2: p1 infected cardiac myocytes treated by ET-1; 3: pcD2 infected cardiac myocytes.

胞下降 61.97% (图 4), 提示 hhlim 可能介导 ET-1 对 BNP 和 α -actin 表达的诱导作用。

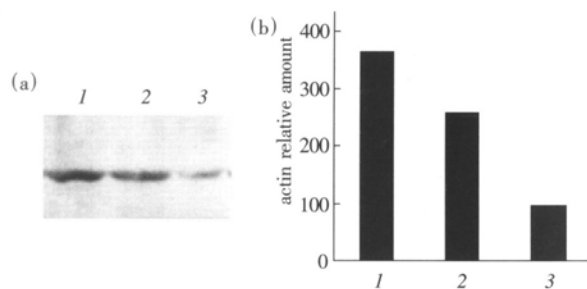


Fig. 4 Western blot analysis for skeletal α -actin expression in cardiac myocytes

(a) Western blot analysis. (b) densitometric scanning. 1: pcD2-hhlim infected cardiac myocytes; 2: pcD2 infected cardiac myocytes; 3: p1 infected cardiac myocytes.

2.3 hhlim 可引起心肌细胞肥大

如图 5 所示, hhlim 在原代心肌细胞中的强制性表达可使细胞体积比转染空载体的对照细胞明显增大, 过度表达 hhlim 48 h, 可使心肌细胞长度和宽度分别较对照增加 2.16 和 1.15 倍 (表面积约增加 2.49 倍), 随细胞被 pcD2-hhlim 转染的时间延长, 心肌细胞体积进一步增大。

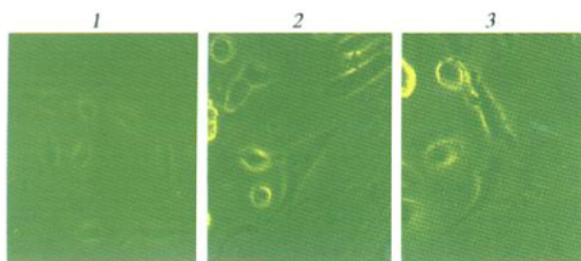


Fig. 5 pcD2-hhlim infected cardiac myocytes

1: pcD2 infected cardiac myocytes for 48 h; 2: pcD2-hhlim infected cardiac myocytes for 48 h; 3: pcD2-hhlim infected cardiac myocytes for 72 h.

2.4 转录因子对报告基因表达的影响

从图 6 可以看出, 转录因子 hhlim、Nkx2.5 和 GATA-4 在心肌细胞强制性表达可以显著增强 BNP 转录调控区驱动荧光素酶表达的活性, 分别较对照组活性升高 3.67、5.22 和 7.19 倍 ($P < 0.05$)。共转染 hhlim 和 Nkx2.5 表达质粒, 对 BNP 转录调控区驱动荧光素酶表达的活性小于两者单独作用之和, 但有轻度的协同作用。共转染 pssR α GATA-4 和 pcD2-hhlim 对荧光素酶的表达无协同激活作用。

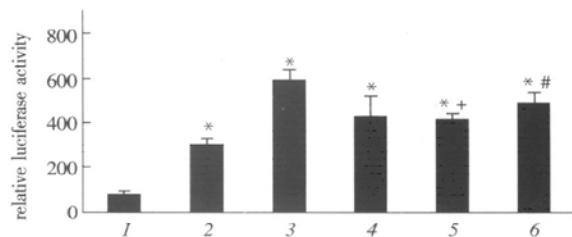


Fig. 6 Luciferase activities in cardiac myocytes

* $P < 0.05$ compared with BNP group; # $P < 0.05$ compared with hhlim + BNP group; + $P < 0.05$ compared with GATA-4 + BNP group. 1: BNP; 2: hhlim + BNP; 3: GATA-4 + BNP; 4: Nkx2.5 + BNP; 5: hhlim + GATA-4 + BNP; 6: hhlim + Nkx2.5 + BNP.

3 讨 论

心肌细胞肥大是多种心血管疾病, 如高血压病、心肌梗塞、心脏瓣膜病等所共有的病理生理学变化, 主要生化和形态学特征为心肌细胞体积增大, 蛋白质蓄积, 胚胎期表达基因, 如 ANF 和 BNP 重新表达和收缩蛋白基因, 如骨骼肌 α -actin 过表达^[4]。

已经证明, 心肌细胞肥大的发生与心肌细胞局部释放的肽类生长因子 (如 FGF、IGF-1 等) 和血管活性肽 (如 ET-1、Ang-II 等) 有关, 但目前对这些致心肌肥大因子引起心肌肥大的过程尚不清楚。我们曾报道, 在小鼠成肌细胞 C2C12 分化过程中, hhlim 基因表达产物先定位于细胞核一个短暂的时间, 而后移入胞质, 以与 α -actin 相缔合的方式存在, 并证实所导入的外源性 hhlim 在 C2C12 细胞中的强制性表达可诱发 C2C12 细胞肥大^[5]。然而, 外源性 hhlim 基因是否也直接引起心肌细胞肥大尚未见报道。本实验以迄今认为最重要的致心肌肥大因子 ET-1 作为心肌细胞肥大刺激因子, 证实其在诱导胚胎基因 BNP 再表达、收缩蛋白 α -actin 过表达及引发心肌细胞体积增大的同时, 也显著促进 hhlim 的表达。将可表达 hhlim 反义 RNA 的真核表达质粒导入心肌细胞后, 再用 ET-1 刺激细胞, 发现在 BNP 和 α -actin 表达受到显著抑制的同时, 心肌细胞体积不发生明显变化 (结果未显示)。外源性 hhlim 基因在心肌细胞中的强制性表达在诱导 BNP 和 α -actin 表达的同时可使心肌细胞体积增加 2.49 倍。这些结果表明, ET-1 诱导对心肌细胞肥大基因 BNP 和 α -actin 表达及引发心肌肥大的效应可能由 hhlim 所介导, 提示 hhlim 和

BNP 表达可能与心肌细胞肥大的启动有关. 为了进一步研究 hhlmi 表达与 BNP 基因重新激活之间是否存在依存关系, 我们将已知的 BNP 基因转录因子 GATA-4 和 Nkx2.5 表达质粒单独或与 hhlmi 表达质粒共转染心肌细胞, 观察 3 种转录因子不同组合对 BNP 基因的激活作用. 实验结果显示, hhlmi 单独作用能增强 BNP 转录调控区驱动荧光素酶表达的活性, 说明 hhlmi 对 BNP 基因转录有直接激活作用. hhlmi 和 Nkx2.5 联合作用较 Nkx2.5 单独作用对 BNP 转录调控区驱动荧光素酶表达有增强作用, 说明这两种转录因子对 BNP 基因的激活起协同作用. 共转染 pssR α -GATA-4 和 pcD2-hhlmi 对荧光素酶的表达无协同激活作用. 我们推测这可能是不同转录因子之间的相互作用干扰了它们与 BNP 转录调控区相应顺式元件的作用. 然而有关 hhlmi 致心肌肥大的详细作用机制还有待于进一步深入地研究.

参 考 文 献

- 1 陈光慧, 周子振, 张继峰, 等. 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (3): 295~300
Chen G H, Zhou Z Z, Zhang J F, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16 (3): 295~300
- 2 郑 斌, 温进坤, 韩 梅, 等. hhlmi 基因转录调控区域的鉴定及表达调控的初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (6): 910~914
Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, 29 (6): 910~914
- 3 Gupta M, Kogut P, Davis F J, *et al.* Physical interaction between the MADS box of serum response factor and the TEA/ATTS DNA-binding domain of transcription enhancer factor-1. J Biol Chem, 2001, 276 (13): 10413~10422
- 4 Liang Q G, Wind L J, Witt S A, *et al.* The transcript factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. J Biol Chem, 2001, 276 (32): 30245~30253
- 5 郑 斌, 温进坤, 韩 梅, 等. hhlmi 基因表达产物的亚细胞定位及其在细胞肥大中的意义. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30 (1): 67~71
Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, 30 (1): 67~71

hhlmi Regulate Cardiac Hypertrophy *In vitro**

ZHENG Bin¹⁾, WEN Jin-Kun^{1)**}, HAN Mei¹⁾, ZHOU Ai-Ru²⁾

¹⁾ Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract hhlmi is a new heart-related gene cloned from human embryonic heart whose product participates in transcriptional regulation and cell development as a kind of transcriptional factor. Over expression of hhlmi gene using a recombinant plasmid was sufficient to induce a greater than 2.49 fold increase in cardiac myocyte area compared with that untransfected with hhlmi. RT-PCR and Western blot testified that transfection of hhlmi into the cardiac myocyte could induce skeletal α -actin over expression and trigger the expression of embryonic related gene-BNP, which is related to the cardiac hypertrophy. Antisense hhlmi expression plasmid was constructed for analyze of hypertrophy in cultured neonatal cardiomyocytes. Endothelin-1 can induce cardiomyocyte hypertrophy. Cardiac myocyte treated by ET-1 was transfected with antisense hhlmi plasmid. Western blot and RT-PCR analysis demonstrated that antisense hhlmi restrained the increased cell surface area induced by ET-1, or increases expression of α -actin and BNP. Individual expression vectors for hhlmi, Nkx2.5 and GATA-4 could enhance BNP reporter gene expression in cardiac myocytes. Cotransfection of hhlmi and Nkx2.5 produced additive luciferase expression. The results demonstrate that hhlmi protein is capable of initiating the hypertrophic response in cultured cardiac myocyte by activating BNP gene expression directly and indirectly.

Key words hhlmi gene, cardiac hypertrophy, skeletal α -actin, BNP

* This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000056905-Z).

** Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, E-mail: wjk@hebm.u.edu.cn

Received: November 25, 2002 Accepted: December 30, 2002