

沉默 MR-1 对血管紧张素 II 诱导小鼠 心肌肥厚基因表达谱的影响 *

戴文建^{1, 2)} 张 曼²⁾ 陈金晶¹⁾ 王以光¹⁾ 孔维佳^{1)**} 王 真^{1)**}

(¹⁾ 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所以, 北京 100050; ²⁾ 湖南环境生物职业技术学院, 衡阳 421005)

摘要 肌纤维基因调节因子(myofibrillogenesis regulator1, MR1) 是首次从人体骨骼肌 cDNA 文库中分离得到的基因。以前的研究证明 MR1 能够介导血管紧张素 II (Ang II) 诱导的体内外心肌肥厚效应, 但相关分子机制有待进一步阐明。利用腺病毒载体在小鼠中沉默 MR1 表达, 利用基因芯片对比检查了小鼠心肌基因表达谱的变化。结果发现, 在 Ang II 诱导心肌肥厚的小鼠, 沉默 MR1 前后出现明显的信号通路方面的变化和基因表达差异, 其中沉默 MR1 后表达降低 90% 以上的基因有 39 个, 而表达升高 10 倍以上的基因有 5 个。在这些基因中, 对与心肌肥厚密切相关的基因进行了定量 RT-PCR 检测, 以进一步验证基因芯片的结果, 发现沉默 MR1 后 HSP72 和硫氧还蛋白 1 (Trx1) 均表达升高, 而钙调神经磷酸酶 β (CnA β) 和 β 肌球蛋白 (β -myosin) 的基因表达则受抑制。这些信号通路和基因均与 Ang II 诱导的心肌肥厚有一定的关系, 为揭示 MR1 在 Ang II 所致心肌肥厚中的作用和分子机制提供了新的证据。

关键词 肌纤维基因调节因子, 血管紧张素 II, 心肌肥厚, 基因芯片, 基因表达谱

学科分类号 310.11

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00687

肌纤维基因调节因子(myofibrillogenesis regulator1, MR1) 是我们首次从人体骨骼肌 cDNA 文库中分离获得的一个 755 bp 的 cDNA 片段^[1]。该基因具有如下特点: a. 在人的很多组织中均有表达, 但在骨骼肌和心肌中的表达最高; b. 在 21~24 岁年轻人的骨骼肌转录水平是 66~77 岁老年人的约 50 倍; c. 酵母双杂交系统发现, 它与肌肉收缩相关的一些结构功能相关蛋白, 如肌球蛋白重链(myomisin1)、辅肌动蛋白(actinin)、肌球蛋白调节轻链(MRLC2)、 β -烯醇化酶(enolase), 具有相互作用, 提示 MR1 可能在细胞中起到结构和调控蛋白质的双重作用, 其功能可能与细胞增殖和肌肉收缩密切相关。随后体内外研究发现, 在血管紧张素 II (Ang II) 引起心肌肥厚的同时, 伴随 MR1 表达增加, 而敲除心肌中的 MR1 基因能够抑制 Ang II 导致心肌肥厚的效应^[2]。进一步研究发现 MR1 通过活化心肌核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路促进心肌肥厚的发生和发展^[3]。此外, 我们利用腺病毒载体在小鼠中转染

MR1-siRNA, 以沉默 MR1 表达, 发现 MR1-siRNA 能够抑制 Ang II 诱导的心肌肥厚^[4]。

本研究中, 为了寻找和 MR1 相关而同时又参与了 Ang II 所致心肌肥厚的相关信号通路和基因变化, 我们利用基因芯片对比检查了沉默 MR1 前后小鼠心肌基因表达谱的变化, 然后用定量 RT-PCR 进一步检测数个与心肌肥厚密切相关基因的表达, 为进一步探索 Ang II 通过 MR1 诱导心肌肥厚的分子机制奠定基础。

* 国家高技术研究发展计划(2006AA02A307), “十一五”国家新药创制重大专项综合性新药研发大平台及创新微生物药物高效筛选与发现技术平台(2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004)资助项目。

** 通讯联系人。

孔维佳. Tel: 010-63167255, Fax: 010-63017302

E-mail: wjkong894@sohu.com

王 真. Tel/Fax: 010-63165289, E-mail: trulywang110@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-28, 接受日期: 2011-04-18

1 材 料

1.1 试剂

血管紧张素 II (Ang II)、三溴乙醇购自 Sigma 公司; 2002 型微型泵购自 Alza 公司; Trizol, SYBR GreenER qRT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司. Adxsi 载体 (SinoGenoMax Research Center)、AdsiR-MR1 和 siRNA-control vector 由中国医学科学院医药生物技术研究所构建.

1.2 动物

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所. 基因芯片杂交及分析工作由上海康成生物工程有限公司完成.

1.3 引物

引物由赛百盛公司合成. MR1: 5' AATTCA-TGGCGGCGGTGGTAGC 3', 5' AGCTTTCAGGTC-TGTACTCCAGA 3'; CnA β : 5' AGGCTATTGAG-GCTGAAA 3', 5' CGGATCTCAGAAAGCAC 3'; Trx1: 5' GGTGTGGACCTTGCAAAATGATC 3', 5' GGCTTCAAGCTTTTCCTT 3'; β -myosin: 5' AT-GTGCCGGACCTTGGA 3', 5' CCTCGGGTTAGC-TGAGAGATCA 3'; HSP72: 5' AACCTAAATGA-AGAGGGAGGG 3', 5' GTCTTCGCTTGTCTCTGG-ATG 3'; GAPDH: 5' TTCTTGTGCAGTGCCAGC-CTCGTC 3', 5' TAGGAACAGGGAAGG-CCATGC-CAG 3'.

2 方 法

2.1 动物模型的建立

雄性 C57BL/6J 小鼠(20 ± 2) g, 饲养于空调房中, 每笼 4 只小鼠, 进行实验前 7 天的环境适应性饲养和检疫, 随后小鼠任意分成 6 组(每组 8 只动物): a. 非手术治疗+非处理作为对照组; b. siRNA-MR1+Ang II (由植入皮下微型泵 2 周, $2.5 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$, 溶解在含 0.01 mol/L 醋酸的 PBS 中); c. siRNA-control+Ang II (由植入皮下微型泵 2 周, $2.5 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$, 溶解在含 0.01 mol/L 醋酸的 PBS 中); d. siRNA-MR1+PBS (由植入皮下微型泵 2 周, 含 0.01 mol/L 醋酸); e. siRNA-control+PBS (由植入皮下微型泵 2 周, 含 0.01 mol/L 醋酸); f. 单纯 Ang II 注射组(由植入皮下微型泵 2 周, $2.5 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$, 溶解在含 0.01 mol/L 醋酸的 PBS 中). 小鼠称重, 在 24 只 model 2002 (Alza, Mountain View, CA) 微型泵中按说明注满 Ang II

($2.5 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$). 在另外的 16 只 model 2002 微型泵中注满 PBS. 除第一组外, 其余小鼠均经腹腔注射 2.5% 三溴乙醇($14 \mu\text{l/g}$ 体重腹腔注射)进行麻醉, 麻醉后将小鼠背部靠近颈部的地方把毛剔除, 75% 乙醇消毒后戴无菌手套, 用无菌眼科剪沿小鼠前后方向剪开无毛皮肤约 0.5 cm 切口, 眼科分离钳向颈部方向分离少许将充满 Ang II 或 PBS 的微型泵沿切口向颈部方向植入皮下, 缝合皮肤, 消毒伤口, 标记好后放回笼中. 第二天手术小鼠情况良好后再次同上麻醉, 进行颈静脉注射^[9]. Ang II 的剂量选择及微型泵植入皮下的部位和方式均参考以前的报告^[6-7]. 第一次手术 2 周后处死动物, 心脏被分离, 每组 4 只抽提 RNA, 另 4 只置于 -80°C 冰箱冻存.

2.2 RNA 提取、探针标记及芯片杂交方法

2.2.1 RNA 提取. 取新鲜心脏组织碾碎后置 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml Trizol 充分匀浆后室温静置 5 min. 加入 0.2 ml 氯仿, 振荡 15 s, 静置 2 min 后, 4°C 12 000 g 离心 15 min, 取上清液, 加入 0.5 ml 异丙醇. 将管中液体轻轻混匀, 室温静置 10 min, 4°C 12 000 g 离心 10 min, 弃上清液; 加入 1 ml 75% 乙醇, 轻轻洗涤沉淀. 4°C 7 500 g 离心 5 min, 弃上清液, 晾干, 加入适量的 DEPC, H_2O 溶解并定量.

2.2.2 探针标记. 加 1 μg 总 RNA 至 1.5 ml 微型离心管中, 加 1.2 μl 的 T7 启动子引物, 用 H_2O 将体积补充到 11.5 μl , 65°C 循环水浴 10 min 后, 冰浴 5 min. 冰浴同时加入下列混合物 1, 离心, 然后加入混合物 2, 混匀后置 40 $^\circ\text{C}$ 循环水浴中 2 h, 再于 65°C 循环水浴 15 min, 然后冰浴 5 min. 混合物 1 总体积为 8.5 μl , 其中 5 $\times$ 第一链缓冲液 4 μl , 0.1 mol/L DTT 2 μl , 10 mmol/L dNTP mix 1 μl , MMLV-RT 1 μl , Rnase 抑制剂 0.5 μl . 混合物 2 总体积 60 μl , 其中无核酸酶水 15.3 μl , 4 $\times$ 转录缓冲液 20 μl , 0.1 mol/L DTT 6 μl , NTP mix 8 μl , 50% PEG 6.4 μl , Rnase 抑制剂 0.5 μl , 无机焦磷酸酶 0.6 μl , T7 RNA Polymerase 0.8 μl , 靛蓝素 -3-CTP 2.4 μl .

2.2.3 杂交和洗片. 将基因芯片和杂交探针分别在 95°C 水浴中变性 5 min, 将探针加在基因芯片上, 用盖玻片封片, 置于 60°C 杂交 15~20 h. 然后分别用 2 $\times$ 柠檬酸盐标准+0.2% SDS、0.1%柠檬酸盐标准+0.2% SDS、0.1%柠檬酸盐标准洗涤 10 min, 室温晾干.

2.2.4 检测与分析. 利用上海康成生物工程有限公司的扫描仪 Agilent Microarray Scanner(Agilent p/n G2565BA)进行芯片扫描, 采用 Agilent Feature Extraction 软件分析 Cy3 荧光强度. 各组间标准化后的 Cy3 荧光信号强度比值 > 2 或 < 0.5 的基因表达视为显著差异.

2.3 定量 RT-PCR 分析

根据基因芯片的结果, 选择了几个与心肌肥厚及其信号通路密切相关的基因进一步进行了定量 RT-PCR 分析. 反应条件如下: cDNA 合成, 50°C 30 min; 预变性, 94°C 2 min; 变性, 94°C 30 s; 退火, 55°C 30 s; 延伸, 72°C 1 min, 进行 40 个循环后继续在 72°C 延伸 5 min. 在 RT-PCR 反应体系中, 同一模板中同时加入目的基因引物和内标基因 β -actin 引物, 比较两者扩增产物浓度. 扩增产物经 15% 琼脂糖凝胶电泳分离, 通过 Alpha Imager 2200 凝胶成像仪灰度扫描后, 使用 AlphaEaseFC3.1.2 软件分析结果.

2.4 统计学分析

数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 组间差异用单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异.

3 结 果

3.1 各组处理后 MR1 mRNA RT-PCR 结果

为了确定 MR1 在 Ang II 作用和 MR1 沉默后的变化, 我们从各组小鼠心肌中抽提 mRNA 进行定量 RT-PCR 检测, 结果见图 1.

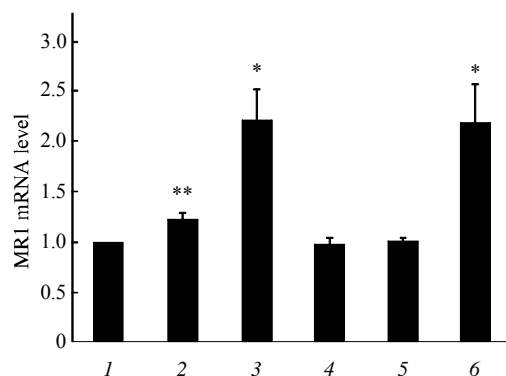


Fig. 1 MR1 mRNA expression in each group of the animal study

MR1 mRNA was induced upon Ang II treatment ($*P < 0.01$, group 3 or 6 vs group 1), while the elevated MR1 mRNA expression was markedly inhibited after injection of siRNA-MR1 through jugular vein ($**P < 0.01$, group 2 vs 6). Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$).

3.2 沉默 MR1 后不同组别主要信号通路基因表达谱的变化

因为第 3 组与 6 组心脏组织未检测到 2 倍以上差异的基因表达, 所以我们分别比较了第 6 组和 1 组、6 组与 2 组之间信号通路相关基因的变化, 分析结果见图 2. 由图 2 中可以看出, 沉默 MR1 可逆转 Ang II 引起的与心肌肥厚、胰岛素信号、mTOR 信号、化学因子信号、PPAR 信号、卵母细胞减数分裂、T 细胞受体信号以及血管平滑肌收缩等信号通路相关的变化, 这进一步证明了 MR1 在 Ang II 所致心肌肥厚相关分子信号通路的调控作用.

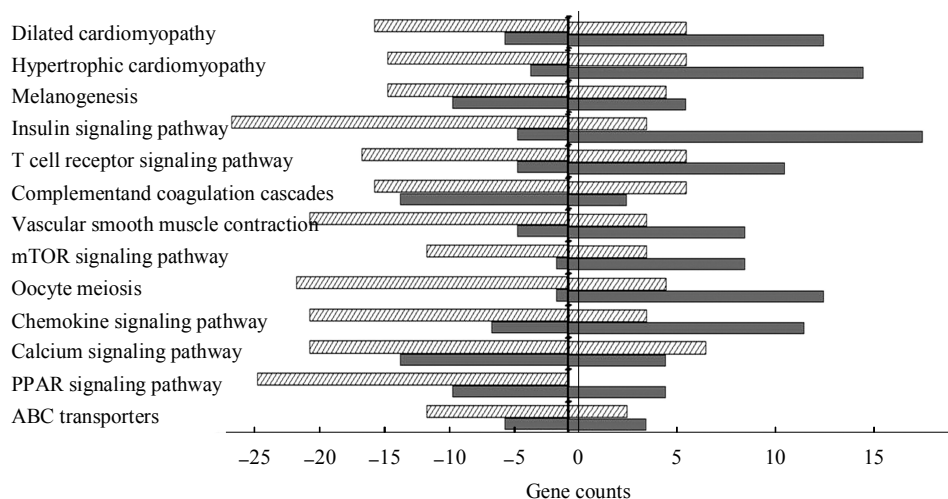


Fig. 2 Alterations of genes expression in some major signaling pathways between two groups as indicated

Numbers of inhibited genes in each signaling pathway is shown in the left, while numbers of induced genes is shown in the right of the axis. Those genes involved in each signaling pathway and significantly changed by at least two folds were calculated. ▨: Ang II vs control; ■: siRNA-MR1 vs Ang II.

3.3 Ang II 组沉默 MR1 后基因表达变化散点分布图

图 3 为第 2 组与 6 组相比基因表达差异散点图。在该散点图上, x 轴、 y 轴分别代表生物素标记信号强度, 每一个点代表一个基因, 大部分集中在一个几乎为 45° 的对角线周围点, 则代表信号差

异在 0.5~2.0 倍区间, 基本属非差异表达基因, 而一些分布在 45° 对角线周围以外的点, 则代表信号差异大于 2 倍, 越远离对角线的点差异倍数越显著。对角线下的为低表达基因(蓝色), 对角线上的为高表达基因(橘色)。

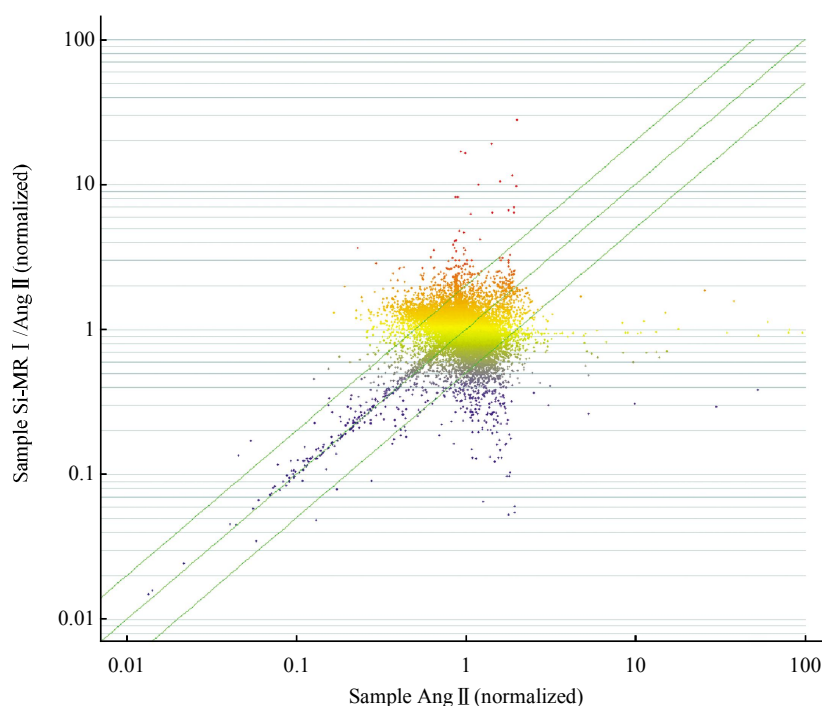


Fig. 3 The scatter plot of genes expression profile in group 2 when compared with group 6

3.4 沉默 Ang II 灌注组 MR1 后心脏组织表达出现显著差异的部分基因

经过基因芯片的检测, 4 组与 1 组相比未检测到 2 倍以上差异的基因表达, 6 组与 4 组相比结果跟 6 组与 1 组相比结果相似; 而 2 组相对 6 组小鼠心脏组织表达降低 50% 以上的基因有 1 081 个, 降低 90% 以上的基因有 39 个, 表达升高 2 倍以上的基因 1 457 个, 10 倍以上的基因有 5 个。2 组相

对 6 组具有 10 倍以上表达差异的全部基因归纳于表 1。沉默 MR1 主要是抑制与心肌肥厚标志基因相关的肌球蛋白、肿瘤凋亡因子受体超家族、G 蛋白偶联受体家族、钙离子活化核苷酸等基因的表达。表达升高 2 倍以上的主要包括硫氧还蛋白结构域包含蛋白等。升高 10 倍以上的基因主要包括热休克蛋白 72 等。

Table 1 The list of the genes whose expression was changed over 10 folds upon MR1 silencing along with Ang II treatment

	GenBank	Chromosome	Genes name
Down-regulated over 90%	NM_183137	11	RIKEN cDNA 2410002I01 gene
	NM_007576	1	Complement component 4 binding protein
	NM_022879	11	Myosin, light polypeptide 7, regulatory
	NM_011314	7	Serum amyloid A 2
	XM_129769	1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1

			Continued
	GenBank	Chromosome	Genes name
	NM_025540	9	Sarcolipin
	NM_011610	4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
	NM_011990	3	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system)
	AK050812	16	Mus musculus 9 days embryo whole body cDNA
	XM_142008	20	G protein-coupled receptor 15-like, PGR15L
	AK005439	20	DNA segment, Chr X, Baylor 18
	NM_032541	7	Hepcidin antimicrobial peptide 1
	AK013007	4	RIKEN cDNA 1810030N24 gene
	NM_010168	2	Coagulation factor II
	AK086046	10	Predicted gene, ENSMUSG00000065996
	AK035018	5	NIPA-like domain containing 1
	NM_028317	2	RIKEN cDNA 2810030E01 gene
	NM_175534	7	MAS-related GPR, member E
	NM_181849	3	Fibrinogen, B beta polypeptide
	AK082413	20	Mus musculus 0 day neonate cerebellum cDNA
	NM_009117	7	Serum amyloid A 1
	NM_017371	7	Hemopexin
	NM_175392	2	RIKEN cDNA 5730472N09 gene
	NM_009654	5	Albumin 1
	NM_019578	4	Exostoses (multiple)-like 1
	NM_027052	15	Solute carrier family 38, member 4
	AK041279	5	G protein-coupled receptor 133
	NM_183190	19	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 5
	NM_011458	12	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor
	NM_029502	11	Calcium activated nucleotidase 1
	NM_007954	8	Esterase 1
	NM_133862	3	Fibrinogen, gamma polypeptide
	AK044114	4	RIKEN cDNA B230208B08 gene
	AK006756	1	RIKEN cDNA 1700020N18 gene
	NM_145942	13	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1
	AK015140	16	RIKEN cDNA 4930414N08 gene
	NM_175564	1	Transmembrane protein 169
	BC062654	2	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus
	AA623690	12	Transcribed locus, strongly similar to XP_001098801.1, similar to ubiquitin-like 5 isoform 1
Up-regulated over 90%	NM_010479	17	Heat shock protein 1A (HSP72)
	NM_009992	9	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
	AK080564	7	Deformed epidermal autoregulatory factor 1
	AK037343	9	RIKEN cDNA A1300008004 gene
	NM_011126	2	Palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated

3.5 RT-PCR 检测基因表达水平

在经过基因芯片检测过的基因中，抽提剩余 4 只小鼠的心肌总 RNA，选择部分与心肌肥厚相关的基因，如心肌肥厚标志基因之一的 β- 肌球蛋白

(β-myosin)、体内心肌肥厚核心调节因子的钙调神经磷酸酶 β(CnAβ)和负性调节心肌肥厚的蛋白抗氧化剂硫氧还蛋白 1 (Trx1)以及热休克蛋白 Hsp72，进行了定量 RT-PCR 检测，结果见图 4、5、6 和 7。

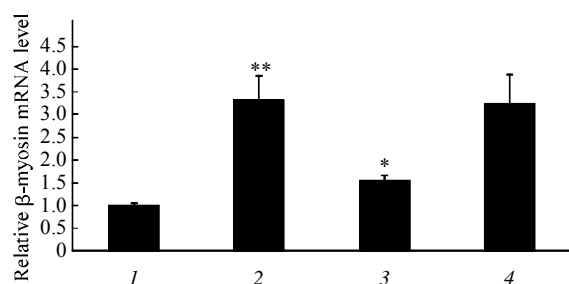


Fig. 4 Quantitative RT-PCR result of β -myosin

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). ** $P < 0.01$ vs PBS control. * $P \leq 0.01$ vs Ang II only. 1: PBS; 2: Ang II; 3: Ang II -siRNA-MR1; 4: Ang II -siRNA-control.

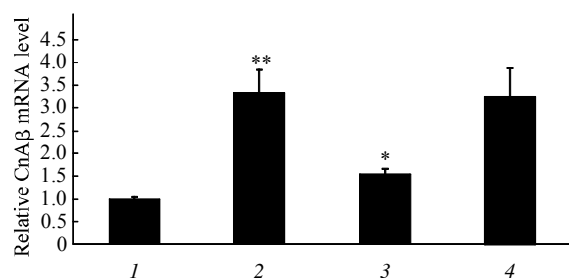


Fig. 5 Quantitative RT-PCR result of CnAβ

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). ** $P < 0.01$ vs PBS control. * $P \leq 0.01$ vs Ang II only. 1: PBS; 2: Ang II; 3: Ang II -siRNA-MR1; 4: Ang II -siRNA-control.

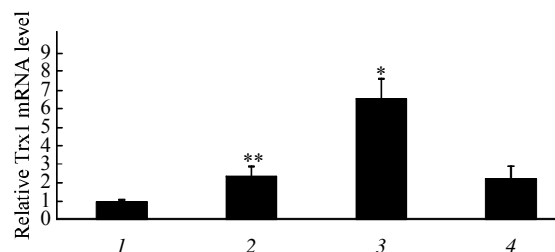


Fig. 6 Quantitative RT-PCR result of Trx1

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). ** $P < 0.05$ vs PBS control. * $P \leq 0.01$ vs Ang II only. 1: PBS; 2: Ang II; 3: Ang II -siRNA-MR1; 4: Ang II -siRNA-control.

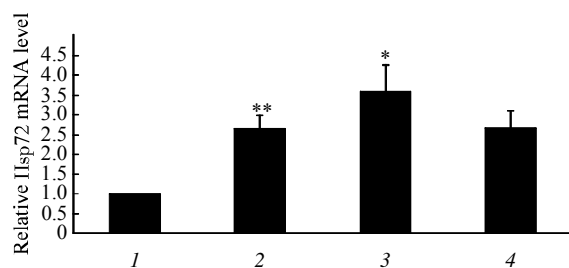


Fig. 7 Quantitative RT-PCR result of Hsp72

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=4$). ** $P < 0.05$ vs PBS control. * $P \leq 0.05$ vs Ang II only. 1: PBS; 2: Ang II; 3: Ang II -siRNA-MR1; 4: Ang II -siRNA-control.

由图 4 和图 5 可以看出, β -myosin 和 CnA β 的 mRNA 表达水平在 Ang II 作用下与 PBS 灌注组相比均出现显著升高($P < 0.01$), 但是在沉默 MR1 后二者 mRNA 表达水平都出现显著下降($P \leq 0.01$ vs 单纯 Ang II 灌注组), 而 siRNA-control 注射组并没有明显地影响 Ang II 作用后 β -myosin 或 CnA β 的表达。

由图 6 可看出, Trx1 在 Ang II 作用下与 PBS 灌注组相比出现反应性升高($P < 0.05$), 但是在沉默 MR1 后 Trx1 的 mRNA 表达水平出现更显著升高($P \leq 0.01$ vs 单纯 Ang II 灌注组), 而 siRNA-control 注射组未显著影响 Ang II 作用后 Trx1 的表达。Hsp72 的表达也观察到类似趋势(图 7)。Hsp72 在 Ang II 作用下出现反应性升高, 但是在沉默 MR1 后 Hsp72 的 mRNA 表达水平也出现较显著升高($P < 0.05$ vs 单纯 Ang II 灌注组)。同样, siRNA-control 注射组并没有明显影响 Ang II 作用后 Hsp72 的表达。

4 讨 论

心血管疾病仍然是西方世界的主要死亡原因, 而心肌肥厚是导致心血管疾病死亡的一个危险因素。在过去的十多年, 人们对心肌肥厚的信号通路进行了深入的研究^[8-9], 但令人遗憾的是, 传统的靶向肥厚前通路的药物, 如血管紧张素转换酶抑制剂和 β -肾上腺素受体阻滞剂, 虽能够抑制心肌肥厚, 但是并不完全^[10]。因此探索心肌肥厚的分子机制并寻找治疗心肌肥厚的新靶点仍具必要性。我们以前的系列工作以及本研究证明, MR1 可能是抑制 Ang II 所致心肌肥厚的一个新型治疗靶点。

Ang II 作为肾素-血管紧张素系统的重要成分, 在心肌肥厚及其重塑中起非常重要的作用。Ang II 被认为是一种潜在的血管细胞和心肌细胞生长因子, 诱导组织肥厚和间质纤维化^[11-12]。尽管降低血压对心肌肥厚本身是有益的, 但是临床实验分析指出血管紧张素转换酶抑制剂比其他抗高血压药减少心肌肥厚更加有效^[10], 这暗示逆转心肌肥厚相对于降低血压而言与 Ang II 变化关系更大。我们先前的实验也证实, MR1 促进 Ang II 诱导的心肌肥厚与血压无明显的关系^[3]。在本研究中, 我们成功地用 Ang II 在雄性小鼠 C57BL/6J 诱导了心肌肥厚模型, 与我们先前培养的心肌细胞报告一致^[2], Ang II 泵入显著地提高了 MR1 在心肌中的表达。

本研究最有意义的发现是沉默 MR1 能有效改

变或逆转 Ang II 诱导心肌肥厚相关基因谱的表达, 为研究 Ang II 诱导心肌肥厚的分子机制提供了新的线索. 结果表明, 沉默 MR1 可逆转 Ang II 引起的与心肌肥厚本身、PPAR 信号、T 细胞受体信号以及血管平滑肌收缩等信号通路密切相关的变化, 进一步证明了 MR1 在 Ang II 所致心肌肥厚相关信号通路的关键调节作用. 值得注意的是, 与能量代谢密切相关的 PPAR 信号分子在 Ang II 组发生的变化与其他文献报道完全一致^[13]. 另外受 MR1 低表达影响而显著下调的基因包括肌球蛋白、肿瘤凋亡因子受体超家族, 以及心肌肥厚标志分子 ANP 等, 间接证明了 MR1 对这些基因的正调节作用, 而这些基因也广泛参与了心肌肥厚的发生和发展^[14-15]. MR-1 对热休克蛋白 72 及硫氧还蛋白结构域包含蛋白等表达的影响, 提示, 其可能与应激和细胞氧化还原反应有关. 另外, 本研究首次报道了 MR1 与胰岛素代谢和 mTOR 相关信号之间的关系, 提示 MR1 可能还参与调节糖代谢或其他营养因子相关的代谢通路, 为后续研究提供了新的思路.

钙调神经磷酸酶是与心肌肥厚及神经退行性疾病变密切相关的调节因子^[16-18]. 钙调神经磷酸酶为一个催化亚单位(CnA)和一个调节亚单位(CnB)组成的异源二聚体, 在心血管系统的正常生理结构与功能的维持以及病理生理过程中均发挥着重要作用. CnA 有 3 种主要同工酶: CnA α , CnA β 和 CnA γ , 其中 CnA γ 是睾丸中特有的, CnA α 和 CnA β 可存在于其他大部分器官和组织中. 而 CnA β (calcineurin A beta, CnA β) 为 CnA 3 个亚型中唯一一致心肌肥厚的信号通路途径^[16]. CnA β -活化 T 细胞核因子途径广泛存在于心肌、骨骼肌、血管平滑肌细胞等, 参与心肌和骨骼肌肥大、成纤维细胞增殖的发生^[16-17]. 其调控靶基因包括多种心肌肥厚的相关基因, 如心房利钠素(ANF)、脑啡肽(BNP)、肌球蛋白重链(β -MHC)等^[19]. 本研究证明降低 MR1 的表达伴随着钙调神经磷酸酶 β (CnA β)表达的降低, 因此推测 MR-1 可能通过活化钙调神经磷酸酶而导致 Ang II 诱导的心肌肥厚.

硫氧还蛋白 1 是细胞内主要的抗氧化剂, 它保护细胞的内环境处于还原状态, 在机体处于应激的情况下而升高表达. 硫氧还蛋白 1 可能通过抑制 Ras-MAPK 通路抑制心肌肥厚^[20-21]. 然而硫氧还蛋白 1 抑制心肌肥厚应该不是单一的机制, 因为硫氧还蛋白 1 介导多种蛋白质的相互作用和细胞信号通路^[22-23]. 此外, 硫氧还蛋白还原酶能够减少硫氧还

蛋白的表达^[24]. 而硫氧还蛋白还原酶对钙离子极度敏感^[25]. 所以硫氧还蛋白与钙调神经磷酸酶活性是关联的, 在本研究中进一步得到了证实. HSP 是细胞在应激环境下所生成的一组蛋白质, 可提高细胞的应激能力, 并且促进细胞内糖原异生和糖原生成的作用, 使细胞内糖原贮量增多, 从而提高应激能力. 在外周血管疾病所致的心肌肥厚中发现 Hsp72 降低^[26], 而 Tanonaka 等^[27]发现, Hsp72 能抑制急性心肌梗死后向心力衰竭的发展和心脏收缩功能障碍, 事实上 Hsp72 能抑制血管紧张素 II 诱导心肌纤维化而抑制心肌肥厚的发生^[28].

因为 Ang II 几乎能在所有的细胞类型刺激氧化应激^[29], 并且活性氧参与介导 Ang II 激活 NF- κ B 通路^[30], 而我们先前的工作证明 MR1 可通过活化 NF- κ B 而促进 Ang II 所致的心肌肥厚, 提示 MR1 也可能参与调节其中的应激及氧化反应. 本文结果发现抑制 MR1 后可诱导对心肌具有保护作用的硫氧还蛋白 1 和 HSP72 的表达, 进一步证实了这种 MR1 与应激及氧化还原反应之间的关系.

总之, 我们的结果证明 MR1 是体内一个预防和抑制血管紧张素 II 所致心肌肥厚的新型分子靶点. 后续工作有必要继续深入研究在 Ang II 所致的心肌肥厚通信网络中 MR1 和其他信号通路因子的相互关系.

参 考 文 献

- [1] Li T B, Liu X H, Feng S, *et al.* Characterization of MR-1, a novel myofibrillogenesis regulator in human muscle. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, **36**(6): 412-418
- [2] Liu X, Li T, Sun S, *et al.* Role of myofibrillogenesis regulator-1 in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**(1): H279-H285
- [3] Li H L, She Z G, Li T B, *et al.* Overexpression of myofibrillogenesis regulator-1 aggravates cardiac hypertrophy induced by angiotensin II in mice. *Hypertension*, 2007, **49**(6): 1399-1408
- [4] Dai W J, He W Q, Shang G D, *et al.* Gene silencing of myofibrillogenesis regulator-1 by adenovirus-delivered small interfering RNA suppresses cardiac hypertrophy induced by angiotensin II in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, **299**(5): H1468-1475
- [5] Clemente C F, Tornatore T F, Theizen T H, *et al.* Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res*, 2007, **101**(12): 1339-1348
- [6] Friddle C J, Koga T, Rubin E M, *et al.* Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (12): 6745-6750

- [7] Collins A R, Schnee J, Wang W, *et al.* Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **43**(9): 1698–1705
- [8] Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**(1): 551–571
- [9] Molkenin J D, Dorn G W 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 2001, **63**(1): 391–426
- [10] Dahlöf B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A meta analysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens*, 1992, **5**(2): 95–110
- [11] Dahlöf B, Herlitz H, Aurell M, *et al.* Reversal of cardiovascular structural changes when treating essential hypertension. The importance of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Hypertens*, 1992, **5**(12 Pt 1): 900–911
- [12] Nagano M, Higaki J, Mikami H, *et al.* Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue in angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1991, **9**(7): 595–599
- [13] Larkin J E, Frank B C, Gaspard R M, *et al.* Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiol Genomics*, 2004, **18**(2): 152–166
- [14] Asakura M, Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J*, 2009, **73**(9): 1568–1576
- [15] Strøm C C, Kruhøffer M, Knudsen S, *et al.* Identification of a core set of genes that signifies pathways underlying cardiac hypertrophy. *Comp Funct Genomics*, 2004, **5**(6–7): 459–470
- [16] Bueno O F, Wilkins B J, Tymitz K M, *et al.* Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(7): 4586–4591
- [17] Finckenberg P, Mervaala E. Novel regulators and drug targets of cardiac hypertrophy. *J Hypertens*, 2010, **28**(Suppl 1): S33–38
- [18] 涂玲辉, 刘海朋, 骆 静. 钙调神经磷酸酶调节因子 RCANs 的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(1): 22–28
Tu L H, Liu H P, Luo J. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(1): 22–28
- [19] Obata K, Nagata K, Iwase M, *et al.* Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**(2): 1299–1305
- [20] Yamamoto M, Yang G, Hong C, *et al.* Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 2003, **112**(9): 1395–1406
- [21] Kuster G M, Pimentel D R, Adachi T, *et al.* Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated *via* thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras. *Circulation*, 2005, **111**(9): 1192–1198
- [22] Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin. Overview. *Methods Enzymol*, 2002, **347**(1): 279–286
- [23] Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, 1997, **15**(1): 351–369
- [24] Ago T, Sadoshima J. Thioredoxin and ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, **41**(5): 762–773
- [25] Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system-from science to clinic. *Med Res Rev*, 2004, **24**(1): 40–89
- [26] Kawada S, Ishii N. Peripheral venous occlusion causing cardiac hypertrophy and changes in biological parameters in rats. *Eur J Appl Physiol*, 2009, **105**(6): 909–917
- [27] Tanonaka K, Toga W, Takahashi M, *et al.* Induction of heat shock protein 72 in the failing heart is attenuated after an exposure to heat shock. *Mol Cell Biochem*, 2004, **259**(1–2): 211–215
- [28] Wakisaka O, Takahashi N, Shinohara T, *et al.* Hyperthermia treatment prevents angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation *via* induction of heat-shock protein 72. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, **43**(5): 616–626
- [29] Griendling K K, Minieri C A, Ollerenshaw J D, *et al.* Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1994, **74**(6): 1141–1148
- [30] Pueyo M E, Gonzalez W, Nicoletti A, *et al.* Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 *via* nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(3): 645–651

Gene Expression Profiling Study of Angiotensin II -induced Cardiac Hypertrophy in Response to Silencing MR-1*

DAI Wen-Jian^{1,2)}, ZHANG Man¹⁾, CHEN Jin-Jing¹⁾, WANG Yi-Guang¹⁾, KONG Wei-Jia^{1)**}, WANG Zhen^{1)**}

⁽¹⁾ Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China;

²⁾ Hunan Environment-Biological Polytechnic College, Hengyang 421005, China)

Abstract Myofibrillogenesis regulator1 (MR1) was first identified from a human skeletal muscle cDNA library in the laboratory, and the previous studies have proved the role of MR1 in Angiotensin II (Ang II) -induced cardiac hypertrophy both *in vivo* and *in vitro*. However, relevant underlying molecular mechanisms of MR1 in Ang II induced cardiac hypertrophy remain to be elucidated. Gene silencing of MR1 by adenovirus-delivered siRNA approach in mice was used, and microarray analysis of myocardial gene expressions was compared before and after MR1 silencing along with Ang II treatment. Significant changes of genes expression in several pathways, such as pathways involved in cardiac hypertrophy and mTOR signaling etc., were observed between the two groups. Furthermore, genes that were changed by 10 folds after MR1 silencing were totally listed, with 39 genes being down-regulated and 5 up-regulated. To further verify the microarray results, some of genes that are suggested to be closely related to cardiac hypertrophy were detected by quantitative RT-PCR. As a result, HSP72 and thioredoxin 1 (Trx1) expression were increased, while the calcineurin Phosphatase β (CnA β) and β -myosin (β -myosin) expression were suppressed upon MR1 silencing. These signaling pathways and genes are closely correlated with cardiac hypertrophy induced by Ang II. The alterations of relevant pathways and genes may help understand the molecular role of MR1 in Ang II -induced cardiac hypertrophy.

Key words myofibrillogenesis regulator1, angiotensin II, cardiac hypertrophy, gene chip, gene expression profile

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00687

*This work was supported by grants from the Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A307) and Drug Screening and Discovery Program of National Key Technology R&D Program in the 11th Five-year Plan of China (2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004).

**Corresponding author.

KONG Wei-Jia. Tel: 86-10-63167255, Fax: 86-10-63017302, E-mail: wjkong894@sohu.com

WANG Zhen. Tel/Fax: 86-10-63165289, E-mail: trulywang110@yahoo.com.cn

Received: December 28, 2010 Accepted: April 18, 2011