

[文章编号] 1000 - 4718(2007)07 - 1272 - 05

钙调神经磷酸酶信号通路参与 PGF_2 诱导的心肌细胞肥大*

蒋青松², 黄燮南¹, 周岐新², 杨贵忠¹, 戴支凯¹, 吴芹¹, 石京山¹
(¹遵义医学院药理教研室, 贵州 遵义 563003; ²重庆医科大学药理教研室, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 研究前列腺素 F_2 (PGF_2) 诱导心肌细胞肥大的作用及其细胞内信号转导通路。方法: 利用乳鼠心肌细胞培养, 以细胞直径、蛋白质含量和心房利钠因子 (ANF) mRNA 表达为心肌肥大反应指标, 观察 PGF_2 致心肌肥大效应。采用 Fura - 2/AM 为荧光指示剂测定心肌细胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$); RT - PCR 法半定量测定 mRNA 表达; Western blotting 方法检测蛋白表达。结果: 随着 PGF_2 浓度升高 (10^{-10} - 10^{-5} mol/L), 心肌细胞直径、蛋白含量和 $[Ca^{2+}]_i$ 均明显高于溶剂对照组 ($P < 0.01$); PGF_2 10^{-7} mol/L 使 ANF mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$); 钙调神经磷酸酶 (CaN) mRNA 及 CaN 信号通路 (含 CaN 及其下游因子 NFAT₃ 和 GATA₄) 蛋白的表达亦明显高于对照组 ($P < 0.05$)。加入 CsA (CaN 阻断剂) 后, PGF_2 诱导的心肌细胞肥大和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的作用明显降低 ($P < 0.01$), CaN mRNA 和 CaN 信号通路蛋白的表达亦明显减少 ($P < 0.05$)。结论: PGF_2 诱导的心肌细胞肥大至少部分与其升高 $[Ca^{2+}]_i$ 从而激活 CaN 信号转导通路有关。

[关键词] 前列腺素 F 类; 心肌肥大; 信号转导; 钙神经素

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Calcineurin signal transduction pathway involves in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F_2

J IANG Qing - song², HUANG Xie - nan¹, ZHOU Qi - xin², YANG Gui - zhong¹, DA I Zhi - kai¹, WU Q in¹, SH I Jing - shan¹

(¹ Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; ² Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China E - mail: huangxienan@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AM:** To study the role of prostaglandin F_2 (PGF_2) in cardiac hypertrophy and its relation with calcineurin (CaN) signal transduction pathway *in vitro*. **METHODS:** The cultured neonatal rat cardiomyocyte was used to observe the hypertrophic effect of PGF_2 , and the hypertrophic response was assayed by measuring the cell diameter, protein content and atrial natriuretic factor (ANF) mRNA expression. For mechanism studies, the intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in cultured cardiomyocytes was measured by using Fura - 2/AM as a fluorescent indicator. ANF and CaN mRNA expressions, and the expressions of CaN and its downstream effectors, NFAT₃ and GATA₄ proteins were assayed by RT - PCR and Western blotting, respectively. **RESULTS:** In cultured cardiomyocytes, PGF_2 induced profound hypertrophic morphology change and the significant increase in cell diameter, and protein content in a concentration - dependent manner compared with those in vehicle control ($P < 0.01$). The same result was found in measuring the $[Ca^{2+}]_i$ in cardiomyocytes ($P < 0.01$). PGF_2 at concentration of 10^{-7} mol/L significantly promoted ANF and CaN mRNA expressions and the protein expressions of CaN/NFAT₃/GATA₄ compared with those in the vehicle control ($P < 0.05$). Cyclosporin A, a CaN inhibitor, markedly inhibited the myocyte hypertrophy ($P < 0.01$), reduced the increased $[Ca^{2+}]_i$ ($P < 0.01$), and decreased the expressions of CaN mRNA and CaN/NFAT₃/GATA₄ proteins ($P < 0.05$) compared with those of only PGF_2 10^{-7} mol/L treatment. **CONCLUSION:** Cardiomyocyte hypertrophy induced by PGF_2 may be, at least in part, mediated by CaN signal transduction pathway activated by increasing $[Ca^{2+}]_i$.

[KEY WORDS] Prostaglandins F; Myocardial hypertrophy; Signal transduction; Calcineurin

[收稿日期] 2005 - 09 - 26 [修回日期] 2005 - 12 - 26

* [基金项目] 贵州省科技厅资助项目 [No. (2004) 3057]

通讯作者 Tel: 0852 - 8205416; E - mail: huangxienan@yahoo.com.cn



前列腺素 F_2 (prostaglandin F_2 , PGF_2) 是花生四烯酸环氧酶途径重要活性代谢产物之一, 体内分布广泛, 已知其生理作用主要集中在调节黄体溶解和复原及调节眼内压方面。一些研究提示^[1,2], PGF_2 可能参与心肌适应性代偿肥大过程。 PGF_2 的作用系通过其特异性受体前列腺素 F 受体 (FP 受体) 与 Gq 蛋白耦联产生, 但其致心肌肥大的作用与其它 Gq 蛋白耦联受体不完全一样, 该作用独立于蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、丝裂素活化蛋白激酶 p38 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 及细胞外信号调节激酶 (extracellular-regulated kinase, ERK) 途径^[3], 提示有其它信号转导通路参与 PGF_2 的致心肌肥大过程。 PGF_2 与其特异性受体 FP 结合后, 磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 激活, 除通过二酯酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 途径激活 PKC 及其下游因子外, 还通过肌醇 1, 4, 5 - 三磷酸 (inositol triphosphate, IP_3) 途径使细胞内 Ca^{2+} 升高^[4]。那么其心肌肥大作用与 Ca^{2+} 升高所激活的一条重要信号转导途径 - 钙调神经磷酸酶 (calci-neurin, CaN) 途径是否有关? 目前未见相关报道。为了阐明 PGF_2 诱导心肌肥大的细胞内信号转导通路具体环节, 分析 PGF_2 致心肌肥大作用与 CaN 信号通路的关系, 本实验利用乳鼠心肌细胞培养进行了相关研究。

材 料 和 方 法

1 动物与主要试剂

1 - 3 d SD 乳鼠由重庆第三军医大学野战外科研究所动物室提供 (许可证号: SCXK (渝) 20020003)。本实验使用的主要试剂及来源是: PGF_2 (Cayman Chemical); DMEM (Gibco); 胰蛋白酶 (上海佰奥生物科技有限公司); 小牛血清 (上海第二医科大学实验中心); Triton X - 100 (华美生物工程公司); RIPA 裂解液 (Upstate); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (江苏碧云天); RNA 提取试剂盒 (Qiagen Company); RT - PCR 一步法试剂盒 (Promega); 环孢素 A (cyclosporin A, CsA)、Fura - 2/AM、EGTA、5' - 溴脱氧尿苷 (5' - BrdU) 均购自 Sigma 公司; CaN、NFAT₃、GATA₄ 小鼠抗大鼠单克隆抗体均为 Santa Cruz 产品。其余试剂皆为国产分析纯。

D - Hanks 液的成分为 (mmol/L): NaCl 137.0, KCl 5.0, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.4, $NaHCO_3$ 3.0, glucose 5.6。pH 7.30 - 7.40。在 D - Hanks 液中加入

$CaCl_2$ 1.30 mmol/L 和 $MgCl_2$ 0.5 mmol/L 即为 Hanks 液。

2 心肌细胞培养与鉴定

用胰蛋白酶消化法将乳鼠心室肌消化成单细胞悬液, 经差速贴壁分离后, 将未贴壁心肌细胞用含 20% 小牛血清的 DMEM 悬浮, 调细胞密度至 $(1.5 - 3) \times 10^9$ cells/L, 分别接种于 25 mL 培养瓶内 (检测细胞内钙含量) 或调细胞密度至 $(0.5 - 1) \times 10^8$ cells/L 于 6 孔板 (检测细胞直径) 及 24 孔板 (测定细胞蛋白质含量), 置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。18 - 30 h 后见细胞培养贴壁生长, 48 h 可见细胞出现自发搏动。培养前 2 d 加入 0.1 mmol/L 5' - BrdU 抑制成纤维细胞生长。于细胞培养 48 h 后更换培养液, 72 h 换无血清培养液并加入试剂, 继续孵育 48 h 后用于检测。

用上述方法分离制备的心肌细胞, 经抗 - actin 抗体的免疫细胞化学染色, 纯度可达 95% 以上, 符合实验要求。

3 心肌细胞直径测量

取有心肌细胞生长的玻片, 冷 D - Hanks 液漂洗血清及杂质, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 晾干, 常规 HE 染色后用 B D2000 医学图像分析系统 (成都泰盟有限公司) 测量单个细胞直径, 每张玻片测 5 个视野, 每个视野测 10 - 15 个细胞, 取其平均值。每组重复 3 次。

4 心肌细胞蛋白含量检测

将 24 孔板内培养好的心肌细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化, 加入 RIPA 裂解缓冲液, 冰浴条件下超声破碎细胞, $12\ 000 \times g$ 离心 20 min, 取上清液根据蛋白检测试剂盒说明书操作进行蛋白定量, 并根据每孔细胞数计算单个心肌细胞的含量, 存于 - 70℃ 备用。

5 RT - PCR 法检测心房利钠因子 (atrial natriuretic factor, ANF) 和 CaN mRNA 的表达

按说明书操作提取纯化心肌细胞总 RNA, 用 RT - PCR 试剂盒检测心肌细胞 ANF 和 CaN mRNA 的表达情况。参照文献^[5,6]和 GenBank 中大鼠相应的基因序列, 各对引物序列如下: ANF, sense: 5' - GCC CTG AGC GAG CAG ACC GA - 3', antisense: 5' - CGG AAG CTG TTG CAG CCT A - 3'; CaN, sense: 5' - ACT GGC ATG CTC CCC AGC GGA - 3', antisense: 5' - GTG CCG TTA GTC TCT GAG GCG - 3'; - actin, sense: 5' - GAC TAC CTC ATG AAG ATC

CTG ACC - 3', antisense: 5' - TGA TCT TCA TGG TGC TAG GAG CC - 3'。扩增片段分别为 202 bp、244 bp 和 423 bp。引物由北京鼎国生物技术发展中心合成。

利用 RT-PCR 一步法试剂盒检测 ANP 和 CaN mRNA 的表达,反应条件如下: (1) 逆转录: 48 45 min, 94 2 min, 1 个循环。(2) 扩增: 94 30 s, 60 30 s, 72 1 min, 共 35 个循环。(3) 延伸: 72 7 min。产物用 B D2000 凝胶成像系统 (成都泰盟科技有限公司) 分析, 计算 ANP 或 CaN 与 β -actin 积分吸光度值 (A) 之比, 确定目的基因的表达水平。每组重复 3 次。

6 心肌细胞内游离钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 测定^[7]

将培养瓶内心肌细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 加入 5 μ mol/L 的 Fura-2/AM 负载, 然后用 Hanks 液悬浮, 调细胞密度至 1 $\times 10^9$ cells/L, 用荧光分光光度计 (日本岛津公司) 检测 (发射波长 500 nm, 激发发射光栅为 5 nm 和 10 nm, 激发波长 340 - 380 nm)。根据公式 $[Ca^{2+}]_i = Kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 计算 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度。

7 Western blotting 法检测 CaN 及其下游因子 NFAT₃ 和 GATA₄ 蛋白表达

取 30 μ g 总蛋白经聚丙烯酰胺变性凝胶分离, 电转膜法转移到 PVDF 膜上, 封闭、分别加抗 (CaN: 1 200 稀释; NFAT₃: 1 100 稀释; GATA₄: 1 100 稀释)、辣根过氧化物酶标记抗, 二氨基联苯胺显色,

凝胶成像系统分析。每组重复 3 次。

8 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.5 统计软件进行 ANOVA 分析或 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 PGF₂ 诱导的心肌细胞肥大及 CsA 的作用

HE 染色可见, 加入不同浓度 PGF₂ (10^{-10} - 10^{-5} mol/L) 后, 心肌细胞明显增大, 肿胀, 分界不清 (图 1A、B)。各处理组的细胞直径和蛋白质含量为表 1 所示。若以各测定值的平均值计算, 可见心肌细胞直径随 PGF₂ 浓度增加而逐渐增大, 10^{-10} - 10^{-5} mol/L (以 10 倍浓度递增) 分别增加了 1.8、2.3、2.8、3.2、3.8 和 4.5 倍 ($P < 0.01$), 具有明显量效关系。不同浓度 PGF₂ 亦使心肌细胞蛋白质含量呈浓度依赖性增加, 与细胞直径大小结果基本一致。参照细胞直径和蛋白含量, 我们选用 PGF₂ 10^{-7} mol/L 进行后面的实验。CsA 10^{-6} mol/L 明显抑制 PGF₂ 10^{-7} mol/L 诱导的细胞直径增加 (图 1C、表 2) 和蛋白质含量升高 (表 2), 其抑制率分别为 42% ($P < 0.01$) 和 23% ($P < 0.01$)。

正常心肌细胞 ANF mRNA 基础表达很低。PGF₂ 10^{-7} mol/L 诱导心肌细胞 ANF mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。CsA 明显抑制 PGF₂ 对 ANF 表达的影响 ($P < 0.01$) (表 2)。

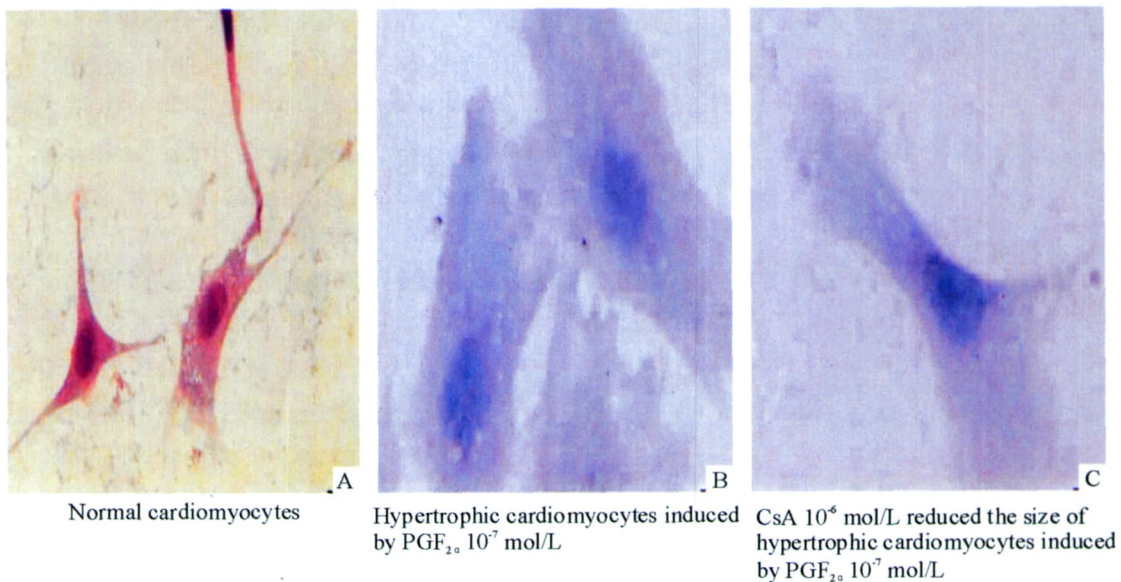


Fig 1 The HE staining of cardiomyocytes treated with (B) or without (A) PGF₂ 10^{-7} mol/L and treated with PGF₂ 10^{-7} mol/L plus CsA 10^{-6} mol/L (C).

图 1 心肌细胞 HE 染色

2 PGF₂ 对心肌细胞 [Ca²⁺]_i 的影响及 CsA 的抑制作用

本实验条件下,测得心肌细胞静息 [Ca²⁺]_i 为 (149.7 ± 26.2) nmol/L,当以 10 倍浓度递增地加入 PGF₂ (10⁻¹⁰ - 10⁻⁵ mol/L) 孵育 48 h,除 10⁻¹⁰ mol/L 组外,其余各组呈浓度依赖性地使 [Ca²⁺]_i 升高 (与静息 [Ca²⁺]_i 比较, *P* · 0.01)。加入 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 时 [Ca²⁺]_i 升高至 (274.3 ± 36.2) nmol/L, CsA 10⁻⁶ mol/L 明显抑制 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 的作用,使 [Ca²⁺]_i 降至 (161.9 ± 20.6) nmol/L (*P* · 0.01),见图 2。

表 1 PGF₂ 对心肌细胞直径和蛋白质含量的影响

Tab 1 Effects of PGF₂ (mol/L) on the diameters and protein levels of cardiomyocytes

Group	Cell diameter (μm) (n=3)	Protein level (pg/cell) (n=6)
Control	36 ± 11	419.2 ± 41.6
PGF ₂ 10 ⁻¹⁰	66 ± 15**	450.3 ± 62.7
PGF ₂ 10 ⁻⁹	83 ± 23**	487.3 ± 69.2
PGF ₂ 10 ⁻⁸	99 ± 27**	494.3 ± 28.0**
PGF ₂ 10 ⁻⁷	115 ± 23**	548.5 ± 59.2**
PGF ₂ 10 ⁻⁶	138 ± 31**	592.1 ± 87.6**
PGF ₂ 10 ⁻⁵	163 ± 42**	636.3 ± 62.9**

** *P* < 0.01 vs control

表 2 CsA 对 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 所增大 (高) 的心肌细胞直径、蛋白质含量和 ANF mRNA 表达的影响

Tab 2 Effects of cyclosporin A (CsA) on the elevated cell diameter, protein level and ANF mRNA expression of cardiomyocytes induced by PGF₂ at 10⁻⁷ mol/L

Group	Cell diameter (μm) (n=3)	Protein level (pg/cell) (n=6)	ANF mRNA (n=3)
Control	36 ± 11	419.2 ± 41.6	0.010 ± 0.004
PGF ₂ 10 ⁻⁷	115 ± 23**	548.5 ± 59.2**	0.026 ± 0.004**
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + CsA 10 ⁻⁶	67 ± 15###	420.5 ± 69.7###	0.019 ± 0.001###

ANF: atrial natriuretic factor ** *P* < 0.01 vs control; ### *P* < 0.01 vs PGF₂ 10⁻⁷ mol/L treatment

3 PGF₂ 对 CaN mRNA 表达的影响及 CsA 的抑制作用

正常心肌细胞 CaN mRNA 表达与内对照 β-actin 积分吸光值之比为 0.225 ± 0.023, PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 使心肌细胞 CaN mRNA 表达增高至 0.343 ± 0.030 (*P* · 0.01)。CsA 10⁻⁶ mol/L 明显抑制 PGF₂ 的作用,使 CaN mRNA 的表达降低至 0.252 ± 0.033 (*P* · 0.01)。

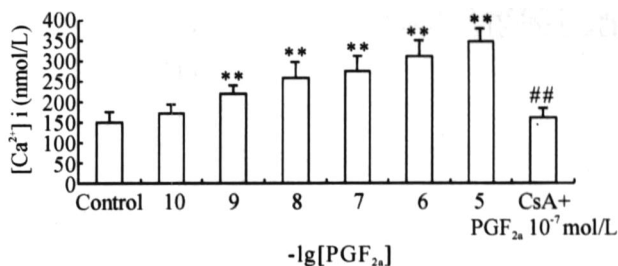


Fig 2 Effects of PGF₂ at different concentrations on the intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) of cardiac myocytes and the inhibition of CsA (10⁻⁶ mol/L) on the elevated [Ca²⁺]_i induced by PGF₂ 10⁻⁷ mol/L. ** *P* < 0.01 vs control; ## *P* · 0.01 vs PGF₂ 10⁻⁷ mol/L.

图 2 不同剂量 PGF₂ 对心肌细胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) 的影响及 CsA 的作用

4 PGF₂ 对 CaN/NFAT₃/GATA₄ 表达的影响及 CsA 的抑制作用

以空白对照组的蛋白表达量为 1,加入 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 后,心肌细胞 CaN/NFAT₃/GATA₄ 蛋白表达分别高至 1.49 ± 0.13、1.17 ± 0.01、1.28 ± 0.03 (*P* · 0.05)。CsA 10⁻⁶ mol/L 明显抑制 PGF₂ 诱导的 CaN 及其下游因子 NFAT₃ 和 GATA₄ 蛋白的表达,使该 3 种蛋白的表达分别低至 1.07 ± 0.04、1.09 ± 0.01、1.12 ± 0.02 (*P* · 0.05)。

讨 论

近年一些研究显示^[8,9], Ca²⁺/CaM 激活的 CaN 信号转导通路在心肌肥厚的发生发展中起重要作用。本实验显示, PGF₂ 刺激肥大的心肌细胞,细胞内游离钙明显增加,同时 CaN mRNA 和蛋白质表达及其重要下游因子 NFAT₃ 和 GATA₄ 的蛋白表达亦明显增加,提示 PGF₂ 诱导的心肌肥大与 Gq-蛋白激活 细胞内钙升高 CaN 信号通路激活可能有关。为进一步确定 CaN 信号转导通路在 PGF₂ 诱导的心肌肥大中的作用,我们同时还使用了该通路的特异性阻断剂 CsA 进行实验。结果表明, CsA 在抑制 PGF₂ 所致心肌肥大的同时,还抑制其诱导的细胞内游离钙增加,在 mRNA 水平和蛋白质水平上减少 CaN 的表达,并在蛋白质水平上降低 NFAT₃ 和 GATA₄ 的表达,提示 CsA 抗 PGF₂ 致心肌肥大的作用与其对细胞内钙的抑制作用和 CaN 及其下游因子表达的抑制密切相关,进一步证实 Ca²⁺-CaN 途径参与了 PGF₂ 的致心肌肥大作用。

心肌肥厚的发生是通过激活各种信号通路及其下游转录因子,最终调节基因和蛋白的表达而产生

的。虽然引起心肌肥厚的分子机制尚未完全明了,但心肌肥厚可能并不是单一信号通路作用的结果。大量研究表明,不同的刺激因子可通过多种信号途径引起心肌肥厚。例如,内皮素-1引起的心肌肥厚已发现有 PKC 途径,磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI₃K) 途径以及 MAPK 途径的 3 个主要亚家族等多条途径参与^[10-12]。值得注意的是,在本实验中,CSA 并不能完全阻断 PGF₂ 诱导的心肌细胞肥大,提示除 CaN 途径外,PGF₂ 的作用还可能与其它信号通路参与。实际上,已有研究表明,PGF₂ 的心肌肥厚作用可能与 MAPK 通路的 3 个亚家族成员之一的 JNK 途径有关^[13]。由于心肌肥大信号通路交互联系的复杂性,除 Ca²⁺ - CaN 途径和 JNK 途径外,PGF₂ 致心肌肥大作用是否还有其它信号通路参与,尚需进一步研究查明。

[参 考 文 献]

[1] Lai J, Jin H, Yang R, et al Prostaglandin F₂ induces cardiac myocyte hypertrophy *in vitro* and cardiac growth *in vivo* [J]. Am J Physiol, 1996, 271 (6 Pt 2): H2197 - H2208

[2] Adams JW, Migita DS, Yu MK, et al Prostaglandin F₂ alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (2): 1179 - 1186

[3] Adams JW, Sah VP, Henderson SA, et al Tyrosine kinase and c - jun NH₂ - terminal kinase mediate hypertrophic response to prostaglandin F₂ in cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. Circ Res, 1998, 83 (2): 167 - 178

[4] Fujino H, Srinivasan D, Pierce KL, et al Differential

regulation of prostaglandin F₂ receptor isoforms by protein kinase C [J]. Mol Pharmacol, 2000, 57 (2): 353 - 358

[5] Taigen T, DeW indtJJ, MolKentin JD. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist - induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (3): 1196 - 1201.

[6] Abassi Z, Brodsky S, Gealekman O, et al Intrarenal expression and distribution of cyclooxygenase isoforms in rats with experimental heart failure [J]. Am J Physiol, 2001, 280 (1): F43 - F53.

[7] 黄雯南, 吴 芹, 雷开键, 等. 异紫堇啡碱对培养乳鼠心肌内游离钙的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2002, 25 (2): 97 - 99.

[8] MolKentin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling [J]. Circ Res, 2000, 87 (9): 731 - 738

[9] MolKentin JD, Dom II GW 2nd Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy [J]. Annu Rev Physiol, 2001, 63 (1): 391 - 426

[10] Wang L, Gout I, Proud CG Cross - talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (35): 32670 - 32677.

[11] Yue TL, Gu JL, Wang C, et al Extracellular signal - regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin - 1 and phenylephrine - induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (48): 37895 - 37901.

[12] Sugden PH. Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocyte and their role in myocardial pathologies [J]. J Card Fail, 2002, 8 (6 Suppl): S359 - S369.