

· 基础研究 ·

视黄酸对乳鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关因子表达的影响*

聂园园¹, 仇小强^{2△}

(桂林医学院:1. 附属医院心内科;2. 公共卫生学院, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨视黄酸对乳鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因、蛋白表达的影响。方法 原代培养 Balb/c 乳鼠心肌细胞, 并纯化获得心肌细胞。用不同浓度视黄酸(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$)进行处理, 24 h 后倒置显微镜下观察各组心肌细胞的形态、搏动情况; 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率; RT-PCR 检测凋亡相关基因——Fas, Fas1 mRNA 的表达。Western blot 测定乳鼠心肌细胞 Fas, Fas1 蛋白的表达。结果 不同浓度的视黄酸对心肌细胞的影响不同。与对照组相比, 低浓度组(0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$)对心肌细胞形态、搏动影响不明显, Fas, Fas1 mRNA 及蛋白表达增加, 差异无统计学意义($P>0.05$); 当视黄酸的浓度大于 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 心肌细胞损伤明显, 搏动力减弱、凋亡增加, Fas, Fas1 mRNA 及蛋白表达均明显增高($P<0.05$)。结论 高浓度视黄酸对心肌细胞有明显的抑制及促凋亡作用, 与 Fas, Fas1 介导的死亡受体信号转导途径密切相关。

关键词:细胞凋亡; 小鼠; 视黄酸; 基因; fas; 心肌细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.27.022

文献标识码: A

文章编号:1671-8348(2012)27-2849-03

Influence of retinoic acid on apoptosis and related genes expression in suckling rat myocardial cell*

Nie Yuanyuan¹, Qiu Xiaoqiang^{2△}

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital; 2. College of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of retinoic acid(RA) on apoptosis and related genes and apoptosis protein expression in suckling rat myocardial cell. **Methods** Balb/c suckling rat myocardial cells were performed the original generations cultivation, purified for obtaining myocardial cells and treated by different concentrations of retinoic acid(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$). After 24 h, the morphology and pulse status of myocardial cells in various groups were observed under phase contrast microscope. The apoptosis rate of myocardial cells was detected with flow cytometry. The apoptosis-related gene Fas, Fas1 mRNA expression were determined by RT-PCR. Western blot technique was adopted to detect expression of Fas, Fas1 protein in suckling rat myocardial cells apoptosis. **Results** Different concentrations of RA had different influence on myocardial cells. Compared with the control group, the low concentration group(0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$) had no obvious influence on the morphology and pulse of myocardial cells, the expression of Fas and Fas1 mRNA / protein was increased without statistical difference($P>0.05$). However, in the RA concentration $>2.0 \mu\text{mol/L}$, the damage of myocardial cells was obvious, pulse was weakened, apoptosis was increased and Fas, Fas1 mRNA and protein expression were significantly increased($P<0.05$). **Conclusion** High concentration of RA has obvious inhibiting effect on myocardial cells and promotes apoptosis, which is closely related with Fas, Fas1 mediated death receptor signal transduction pathways.

Key words: apoptosis; retinoic acid; myocardial cells; gene; fas; mice

先天性心脏病(先心病)的发病率约占全部活产婴儿的 0.6%~0.9%, 估计我国每年有 15 万左右的先心病患儿出生。先心病已严重影响我国婴幼儿的身心健康及人口生存质量。有关先心病的病因, 目前认为主要是遗传因素、环境因素、母体自身的因素或各危险因素综合作用所致。在怀孕早期母体受到某些病毒或药物的影响, 使心肌细胞的发育、增殖、凋亡过程受到影响, 都将有可能导致心脏发育的畸形^[1-2]。

视黄酸(retinoic acid, RA)是维生素 A 在体内一种重要的生物活性物质, 在胚胎和胎儿发育的关键时期发挥着重要作用^[3]。在心脏发育中, 视黄酸能影响早期心肌前体细胞区域化, 心脏前后轴建立、左右决定、心内膜垫的形成, 对心肌细胞和成纤维细胞具有抗生长活性, 过量或缺乏视黄酸均可导致心脏发育的畸形, 但其导致心脏畸形的确切机制目前尚不明确。本实验通过检测视黄酸对心肌细胞凋亡与凋亡相关蛋白、基因的影响, 探讨视黄酸对未成熟心肌细胞影响的机制, 为进一步

研究先心病的发病机制及预防途径提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:0~2 日龄的 Balb/c 小鼠乳鼠 30 只, 购自桂林医学院实验动物中心。采用胰蛋白酶+II 型胶原酶逐次消化获得乳鼠心肌细胞。(2)试剂与主要仪器:20%胎牛血清(FBS)、含各种氨基酸和葡萄糖的培养基(DMEM)、胰蛋白酶均购自 Gibco 公司, II 型胶原酶、5-溴脱氧尿苷(5-Br-du)、视黄酸购自 Sigma 公司, TRizol 购自大连宝生物公司, 逆转录试剂盒购自美国 Promiga 公司, Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司, 引物合成购自上海生工生物公司, PCR 扩增仪、凝胶成像仪购自北京天能公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天公司, 一抗兔抗小鼠 Fas, Fas1 购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 乳鼠心肌细胞的分离及纯化 无菌条件下取出 Balb/c 小鼠乳鼠心脏,剪成约 1.0 mm×1.0 mm×1.0 mm 的小块,加入 0.08% 胰蛋白酶+II 型胶原酶,37 °C 水浴 7~8 min,吸取上清液,加入适量培养基终止消化,重复消化约 5~6 次,至组织块成透明状为止。收集每次消化的细胞,1 000 r/min 离心 10 min。再加入含有 5-BrdU 的 20% FBS 的 DMEM 高糖培养液充分混悬,接种于培养皿中,置 5%CO₂ 培养箱中培养 1.5~2.0 h 后重新接种在 96 孔板中,采用差速贴壁法和化学药物抑制法去除成纤维细胞,纯化心肌细胞。将培养 72 h 的心肌细胞分组处理,用于实验。

1.2.2 实验分组 心肌细胞培养 72 h 后进行干预。将其分为 5 组,对照组,不同浓度视黄酸(0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L)干预组(即 0.5 干预组、1.0 干预组、2.0 干预组、4.0 干预组)。对照组用 20%FBS 的 DMEM 培养液培养,其他各组用含有不同浓度视黄酸的培养液培养,在用药干预 24 h 后观察细胞形态、检测相关因子。每组设 6 个复孔。

1.2.3 倒置显微镜下观察细胞形态 纯化后的心肌细胞呈圆形,细胞培养 6 h 左右开始贴壁生长,逐渐变成梭形、多边形、不规则形等不同的形状,约 12 h 可见细胞自发性搏动,搏动的频率和节律不规则。72 h 后细胞逐渐伸出伪足相互连接成细胞簇,似菊花状。心肌细胞搏动有力、同步,搏动频率为 60~110 次/min。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集药物干预 24 h 后不同用药浓度组的心肌细胞,制成单细胞悬液,离心弃上清液,PBS 洗涤 3 次,70%乙醇固定,4 °C 放置 1 h 后,离心收集固定细胞,PBS 洗去固定液,加入 20 μL Rnase A,37 °C 孵育 30 min,暗处加 PI 染液,冰浴 30 min,染色后以 300 目筛网过滤。调整细胞浓度为 1×10⁵/mL 后用流式细胞仪,在波长 488 nm 下用 Multicycle DNA 分析软件行凋亡率测定,实验重复 3 次。

1.2.5 RT-PCR 检测 Fas、FasL mRNA 基因的表达 培养 72 h 的心肌细胞,加入不同浓度的视黄酸(0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L),继续培养 24 h 后,收集各种细胞。用 TRizol 试剂提取高质量的 mRNA。按照反转录试剂盒说明合成 cDNA。鼠内参 β-actin 上游引物:5'-CCT TCT TGC AGC TCC TCC GTC-3',下游引物:5'-TCT CCA TAT CGT CCC AGT TGG TG-3'; Fas 上游引物:5'-ACA AAG TTC CAA TTA TAA GCT CC-3',下游引物:5'-GAG ACA TTC ATT GGC ACA C-3'; FasL 上游引物:5'-CAT GCC AGA AGA TAC CAG T-3',下游引物 5'-GTA TTG TTC AAT GAC GAC CTG-3';采用一步法 RT-PCR 系统做反转录聚合酶链反应,扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶(含 EB)电泳,溴化乙锭染色,用图像分析仪进行分析。

1.2.6 Western blot 检测 Fas、FasL 蛋白的表达 取出已用药 24 h 的心肌细胞,加入适量细胞裂解液,离心后取上清液,BCA 法测定蛋白质含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后行 Western blot。相应蛋白表达值为条带的灰度值除以 β-actin 内参校正。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,各组间比较采用多样本均数比较的方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置显微镜下观察细胞损伤情况 对照组心肌细胞交集成细胞簇,同步收缩,搏动。24 h 后显微镜下观察各组细胞损伤情况。0.5 干预组及 1.0 干预组的心肌细胞损伤不明显。细胞搏动稍减弱,细胞凋亡在 20% 以下。2.0 干预组和 4.0 干预组心肌细胞数量明显减少,凋亡率大于 30%;细胞变圆、团

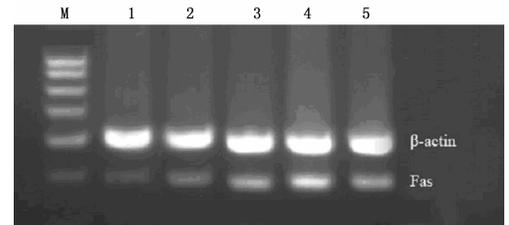
缩,细胞搏动力减弱,速率减慢。随着药物浓度的增加,细胞损伤更明显,凋亡率更高。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 用药 24 h 不同浓度视黄酸干预后心肌细胞细胞静止期(G₀)、DNA 合成前期(G₁)、DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G₂)及细胞分裂期(M)的凋亡率,见表 1。

表 1 各组心肌细胞在不同细胞周期的比例及细胞凋亡率的比较(%)

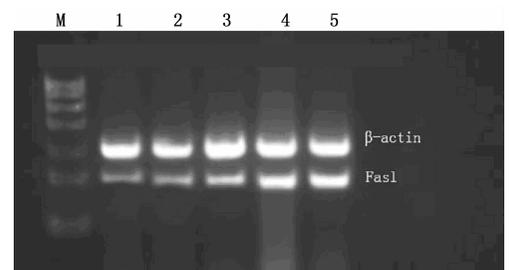
组别	G ₀ +G ₁	S	G ₂ +M	凋亡率
对照组	54.2±0.4	28.5±0.1	17.3±0.4	1.1±0.5
0.5 干预组	58.6±0.7	26.5±0.4	14.9±0.2	2.0±0.1
1.0 干预组	59.9±0.5	25.3±0.1	14.8±0.5	2.2±0.2
2.0 干预组	66.1±0.3	23.2±0.5	10.7±0.2	25.3±0.4
4.0 干预组	73.8±0.1	17.1±0.4	9.1±0.3	31.5±0.6

2.3 凋亡相关基因 Fas、FasL mRNA 表达 与对照组比较,2.0、4.0 干预组 Fas、FasL mRNA 表达水平均上升(P<0.05),且随着浓度的越高表达越强。0.5、1.0 干预组与对照组比较 Fas、FasL mRNA 表达有所增强,但差异无统计学意义(P>0.05),见图 1、2。



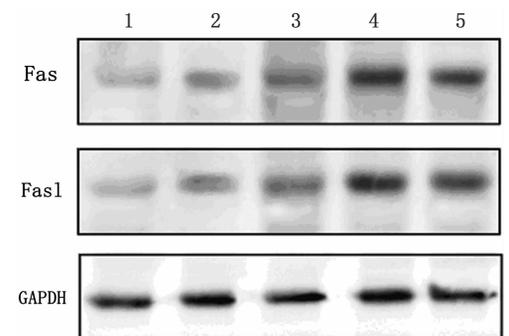
M: 标记物;1: 对照组;2: 0.5 干预组;3: 1.0 干预组;4: 2.0 干预组;5: 4.0 干预组。

图 1 用药 24 h 后各药物浓度组 Fas mRNA 表达水平



M: 标记物;1: 对照组;2: 0.5 干预组;3: 1.0 干预组;4: 2.0 干预组;5: 4.0 干预组。

图 2 用药 24 h 后各药物浓度组 FasL mRNA 表达水平



1: 对照组;2: 0.5 干预组;3: 1.0 干预组;4: 2.0 干预组;5: 4.0 干预组。

图 3 用药 24 h 后各药物浓度组 Fas、FasL 蛋白表达水平

2.4 Western blot 检测 Fas, FasL 蛋白的表达 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,与对照组比较,2.0、4.0 干预组 Fas、FasL 蛋白表达水平均增强($P < 0.05$),且随着浓度增高表达增强。0.5、1.0 干预组与对照组比较,Fas、FasL 蛋白水平表达有所增强,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

3 讨 论

视黄酸与脊椎动物从受孕至死亡的整个过程密切相关,参与调控细胞的分化、增殖和凋亡。视黄酸作为内源性信号分子,通过与细胞核内的视黄酸受体结合改变特异基因的转录,其在脊椎动物心脏发育的各阶段(包括心脏原基的出现、心管形成、左右不对称发育、心脏环化、腔室形成、内流系统形成、心壁形成及传导系统发生等阶段)发挥重要的调节功能^[4-6]。生理剂量视黄酸在细胞增殖、分化、凋亡及生殖、视觉、各种动物的胚胎模式形成等生物学事件中发挥重要作用,是胚胎发育过程中不可或缺的形态发生素^[7]。然而视黄酸也是一种致畸因子,胚胎发育过程中,过多摄入视黄酸或视黄酸缺乏均可导致哺乳动物神经管、心脏和颜面部等多种畸形的发生^[8-9]。

以视黄酸为致畸原的动物实验,即在小鼠不同孕期给予一定剂量的视黄酸,将导致唇腭裂、先心病、短肢畸形、颜面、脊椎骨畸形等出生缺陷的动物模型已经建立。然而以视黄酸为致畸原对细胞凋亡影响的研究发现,视黄酸对细胞的影响与细胞类型和视黄酸的浓度密切相关^[10]。Chang 等^[11]和 Zhang 等^[12]的研究均进一步验证了此观点。本实验通过采用不同药物浓度视黄酸作用于心肌细胞,在连续培养细胞时观察到视黄酸 0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 干预组在用药 24 h 后心肌细胞损伤不明显,细胞搏动稍减弱,细胞凋亡在 20% 以下;视黄酸 2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 干预组心肌细胞受损明显,细胞搏动力减弱,搏动频率降低;细胞凋亡明显增加,呈逐渐增强趋势;本研究与刘苗等^[13]研究采用不同浓度视黄酸干预小鼠心肌细胞使心肌细胞损伤结果相一致,但在导致细胞损伤的最佳药物浓度及作用时间上有差异,以及检测的凋亡信号因子也有所不同。Fas 及 FasL 在心肌细胞有丰富的表达,Fas 主要位于心肌细胞膜上,FasL 是 Fas 的天然配体,当表达 Fas 的心肌细胞和活性细胞的 FasL 交联后,激活 Fas/FasL 信号凋亡途径,最终导致靶细胞凋亡。本实验结果显示,Fas、FasL mRNA 基因与蛋白表达明显增加。实验提示一方面视黄酸通过上调细胞膜表面 Fas 蛋白的表达,直接启动细胞凋亡的信号传导系统,促使细胞凋亡的发生。这与文献^[14-15]研究相一致,即药物通过影响 Fas 受体表达,上调或下调 Fas 蛋白的表达,促进或抑制细胞凋亡的发生,提示该药可能对这种细胞有毒性或保护作用。另一方面视黄酸作用于心肌细胞后,Fas 表达增加,心肌细胞对 Fas/FasL 介导的凋亡更加敏感,使细胞凋亡不断发生。然而细胞凋亡是一个非常精密、复杂的调控系统,在其过程中又受到不同诱导因子的调节,虽然国内外学者对视黄酸致畸的机制进行了大量深入的研究,但其确切的作用机制尚不能确定。

综上所述,Fas/FasL 介导的死亡受体信号转导途径为细胞凋亡三大途径之一,在本实验中随着视黄酸药物浓度增加心肌细胞的凋亡率不断增加,而 Fas、FasL 的基因及蛋白表达均增加,提示视黄酸诱导心肌细胞的凋亡,其作用机制与 Fas/FasL 介导死亡受体途径导致细胞凋亡密切相关,是否与细胞凋亡其他途径相关及详细机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Lin SC, Dollé P, Ryckebusch L, et al. Endogenous retinoic

acid regulates cardiac progenitor differentiation[J]. PNAS, 2010, 10(7):9234-9239.

- [2] Sato H, Shiraiishi I, Takamatsu T, et al. Detection of TUNEL-positive cardiomyocytes and c-kit-positive progenitor cells in children with congenital heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(3):254-261.
- [3] González-Reyes S, Martínez L, Tovar JA. Effects of prenatal vitamins A, E, and C on the hypoplastic hearts of fetal rats with diaphragmatic hernia[J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(8):1269-1274.
- [4] Choi YH, Cowan DB, Moran AM, et al. Myocyte apoptosis occurs early during the development of pressure-overload hypertrophy in infant myocardium[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(6):1356-1362.
- [5] Guadix JA, Ruiz-Villalba A, Lettice L. Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2[J]. Development, 2011, 138(8):1093-1097.
- [6] Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart[J]. Vitam Horm, 2007, 75(2):257.
- [7] Brade T, Kumar S, Cunningham TJ. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2[J]. Development Jan, 2011, 138(6):139-148.
- [8] 韩静,肖颖,林久祥,等.全反式视黄酸致小鼠腮弓畸形的机制研究[J].癌变·畸变·突变,2006,18(3):194-197.
- [9] Zile MH. Vitamin a requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo: insights from the avian embryo[J]. Exp Biol Med, 2004, 229(7):598-606.
- [10] Armstrong JL, Redfern CP, Veal GJ. 13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology—is changing shape the key to success? [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(9):1299-2306.
- [11] Chang Q, Chen Z, You J, et al. All-trans-retinoic acid induces cell growth arrest in a human medulloblastoma cell line[J]. J Neurooncol, 2007, 84(3):263-267.
- [12] Zhang YL, Nie YH, Xu JN, et al. Effects of All-trans retinoic acid on the rat Miller cell in vitro[J]. Eye Sci, 2007, 23(3):163-167.
- [13] 刘苗,吴小燕,徐佳伟,等.外源性视黄酸调节小鼠心肌 TBX1 基因表达的研究[J].华中医杂志,2008,32(3):158-160.
- [14] Xie ZL, Koyama T, Abe K, et al. Effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the expression of Fas protein and on apoptosis in rat ventricles subjected to reperfusion after ischemia[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2005, 12(2):164-168.
- [15] Yamaoka M, Yamaguchi S, Suznki T, et al. Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(4):881-889.