

[文章编号] 1007-3949(2002)10-05-0375-04

• 实验研究 •

钙化心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量的变化

齐永芬^{1,2}, 牛大地², 王述姮², 卜定方¹, 石彦荣¹, 高霖², 蒋宏峰², 庞永正¹, 唐朝枢^{1,2}

(北京大学 1. 第一医院心血管所, 北京市 100034; 2. 医学部生理系, 北京市 100083)

[关键词] 心肌细胞, 钙化; 肾上腺髓质素; 受体活性修饰蛋白 2; mRNA

[摘要] 为探讨离体钙化处理的新生大鼠心肌细胞肾上腺髓质素及受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量的改变及意义。采用 β 磷酸甘油制备钙化的心肌细胞; 放射免疫分析方法测定心肌细胞中肾上腺髓质素含量; 竞争性定量逆转录-多聚酶链反应测定心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 水平。结果显示, 钙化心肌细胞钙含量较非钙化心肌细胞高 3 倍 ($P < 0.01$), 肾上腺髓质素含量较非钙化心肌细胞高 136.9% ($P < 0.01$), 钙化心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量分别增加 24% ($P < 0.05$) 和 25% ($P < 0.05$)。而且钙化心肌细胞受体活性修饰蛋白 2 和肾上腺髓质素基因表达上调的程度相平行。钙化心肌细胞肾上腺髓质素生成增加, 肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 表达亦明显上调, 提示肾上腺髓质素/受体活性修饰蛋白 2 信号途径在心肌细胞钙化发展中可能具有一定的调节作用。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

Changes of Amount of Adrenomedullin mRNA and Receptor Activity Modifying Protein 2 mRNA in Calcified Myocardial Cells

QI Yong-Fen¹, NIU Da-Di², WANG Shu-Heng², BU Ding-Fang¹, SHI Yan-Rong¹, GAO Lin², JIANG Hong-Feng², PANG Yong-Zheng¹, and TANG Chao-Shu^{1,2}

(1. Institute of Cardiovascular Research, the First Hospital, Peking University, Beijing 100034; 2. Department of Physiology of Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

[MeSH] Myocardial Cells, Calcified; Adrenomedullin; Receptor Activity Modifying Protein 2; mRNA

[ABSTRACT] **Aim** To explore the changes and significance of adrenomedullin (ADM) mRNA and receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) mRNA in calcified myocardial cells. **Methods** Calcified myocardial cells was prepared with β -glycerophosphate. Content of ADM in VSMC was measured by radioimmunoassay (RIA). The amount of ADM mRNA and RAMP2 mRNA was determined by competitive RT-PCR. **Results** The content of calcium and ADM in calcified myocardial cells was increased by 138% and 136.9% (all $P < 0.01$), respectively, compared with control. The amount of ADM mRNA and RAMP2 mRNA in calcified myocardial cells was elevated by 24% and 25% (all $P < 0.05$), respectively, compared with control. The elevated level of RAMP2 mRNA was parallel to that of ADM mRNA in calcified myocardial cells. **Conclusions** Content of ADM was increased, and gene expression of ADM and RAMP2 was up regulated in calcified myocardial cells, which suggested that ADM/RAMP2 may have important regulator role in process of calcification of myocardial cells.

近年研究发现, 心血管组织钙化是钙磷沉积于心肌和血管平滑肌细胞使心血管细胞向成骨样细胞表型转化的主动过程, 受到体内许多因素的调控^[1,2]。肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)以旁/自分泌方式发挥舒张血管、降低血压和抑制细胞增殖等广泛的生物学效应, 是维持心血管功能稳态的重要活性肽^[3]。心血管组织高表达 ADM 及其受体, 目前克隆出至少 2 种 ADM 受体基因(L-1 孤立受体

和 RDC-1 受体)。最近发现的一种与 G 蛋白偶联的孤儿受体——降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor, CRLR)在心血管组织中广泛分布。当细胞膜上存在有特殊的受体活性修饰蛋白 2(receptor activity modifying protein RAMP2)时 CRLR 以 ADM 为特异配体, 介导 ADM 细胞效应^[4]。本工作在离体培养的新生大鼠心肌细胞上观察钙化处理的心肌细胞 ADM 及 ADM mRNA 和 RAMP2 mRNA 的变化。

[收稿日期] 2002-02-24 [修回日期] 2002-09-10

[基金项目] 国家重大基础研究发展规划项目(G2000056905)资助。

[作者简介] 齐永芬, 女, 1964 年出生, 医学博士, 主要从事心血管疾病发病机制和心血管活性肽的研究。唐朝枢, 男, 教授, 博士生导师, “973”首席科学家, 长期从事心血管疾病发病和防治的基础研究及心血管活性肽的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 Wistar 大鼠由北京大学实验动物部提供。ADM 放射免疫药盒购于美国 Phoenix Pharmaceuticals

INC。β-磷酸甘油购于 Sigma 公司。Trizol 购自 GIBCO 公司, dNTP 购自 Clontech 公司, MMLV 逆转录酶、Taq 酶、RNasin 和 Oligo(dT)₁₅ Primer 为 Promega 公司产品。9 个聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由赛百盛公司合成。

ADM-S 5'-CTCGACACITCTCTCGCAGTT-3'

ADM-A 5'-GCTGGAGCTGAGTGTGTCTG-3'

ADM-T 5'-AGTGTGTCTCGCCTTGAGGGCTGATCITGT-3'

RAMP-S 5'-TGAGGACAGCCTTCTGTCAA-3'

RAMP-A 5'-CATCGCCGTCITTACTCCTG-3'

RAMP-T 5'-CGTCTTACTCGATCATGGCCAGAAGCACAT-3'

β-actin 引物 S: 5'-ATCTGGCACCACCTTG-3'

A: 5'-AGCCAGGTCCAGACGCA-3'

T: 5'-GGTCCAGCAGACAATGCCAGTGGTACGG-3'

1.2 心肌细胞培养和钙化

按 Mcdonagh 等^[5] 方法培养新生大鼠心肌细胞。

1. 25 g/L 胰酶分步消化分离大鼠心室肌细胞, 差速贴壁富集心肌细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM, 于 37℃、5% CO₂-95% 空气培养。在培养的第 2 天, 加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (0.1 mmol/L), 以抑制非心肌细胞的生长。实验用培养第 5~6 天的心肌细胞。

参照文献[6] 方法取融合状态的心肌细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基加入 10 mmol/L β-磷酸甘油和 10 mmol/L 丙酮酸钠连续培养 10 天, 每 2 天换液一次以制备钙化的心肌细胞。

1.3 心肌细胞 Ca²⁺ 含量测定^[6]

收集细胞, 用冷 PBS 洗 5 次, 硝酸消化干燥后用去离子水 (27 mmol/L KCl 和 25 μmol/L NaCl₃) 复溶, 用原子吸收分光光度计测定 422.7 nm 吸收值。

1.4 心肌细胞肾上腺髓质素的放射免疫测定

收集细胞, 加入 1 mol/L 醋酸, 沸水浴 10 min, 匀浆, 离心, 取上清。细胞提取物过 Sep-Pak C18 柱, 乙氰和三氟乙酸洗脱后用 100 μL 放射免疫缓冲液复溶。按 ADM 放射免疫药盒说明书操作测定 ADM 含量。其 IC₅₀ 为 13~47 pg/tube, 与大鼠 ADM 交叉反应性为 100%, 与大鼠肾上腺髓质素 N 端 20 肽 (PAMP)、Amylin 和 endothelin 的交叉反应性均为 0。

1.5 心肌细胞总 RNA 的提取

用 Trizol 试剂提取心肌细胞总 RNA, 紫外分光光度计 (SDU-68 型) 定量。

1.6 竞争性内标准制备

提取正常大鼠肾上腺总 RNA, 逆转录合成 cDNA 作为模板, 先用 ADM-S 及 ADM-A 引物作 PCR, 放大一段 446 bp 的 ADM cDNA。先用 ADM-T 及 ADM-A 然后用 ADM-S 及 ADM-A 作为引物, 2 次 PCR 得到

376 bp DNA 片段, 它的序列和上述 446 bp 片段的序列相同, 但在 ADM-S 引物序列的下游缺失 70 bp, 方法见文献[7]。此即为用于 ADM mRNA 逆转录 PCR 定量的竞争性内标准。为便于保存和定量, 将这 2 个片段的 DNA 分别克隆至 p Bluescript (SK+) 的 EcoR V 位点中, 质粒经扩增、纯化、BamH I 酶切线性化和紫外分光光度法定量后备用。

以 RAMP2-S、RAMP2-A 和 RAMP2-T 引物按上述制备 ADM 竞争性内标准的方法制备 RAMP2 竞争性内标准。其内标准长度为 304 bp DNA 片段, 样本 PCR 产物长度为 371 bp DNA 片段。为便于保存和定量, 将这 2 个片段的 DNA 分别克隆至 pBluescript (SK+) 的 EcoR V 位点中, 质粒经扩增、纯化、BamH I 酶切线性化和紫外分光光度法定量后备用。

1.7 肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 的定量^[7]

取 1 μg 心肌细胞总 RNA 用 M-MuLV 逆转录酶及 Oligo(dT)₁₅ primer 逆转录成单链 cDNA。PCR 反应体积 25 μL: cDNA 3 μL, 0.76 fmol/L 竞争性内标准质粒 1 μL, 5 ADM-S 及 ADM-A 引物 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 含 15 mmol/L MgCl₂ 的 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1.25 u。反应条件: 95℃变性 5 min, 然后以 94℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环 30 次。取 6 μL PCR 产物以 1.5% 琼脂糖电泳分离和溴乙锭染色后, 用凝胶成像及定量扫描仪测得 446 bp 和 376 bp 2 条带的光密度之比。参照文献[10] 以系列稀释 446 bp ADM cDNA 质粒代替上述 PCR 体系中 cDNA, 其它 PCR 及定量条件均不变, 绘出标准曲线。从标准曲线中求得 mRNA 的含量。取 2 μL PCR 产物, 以 β-actin 引物作 PCR, 20 个热循环后, PCR 产物经琼脂糖电泳、凝胶成像及定量扫描仪定量, 由 β-actin 定量标准曲线中求得标本中 β-actin 相对含量, 以校正定量 PCR 时的加样误差。ADM PCR 产物经纯化后用 Bgl II 酶切。酶切反应体系为: Bgl II 0.5 μL, PCR 产物 20 μL, 37℃ 消化过夜。

RAMP2 mRNA PCR 反应体积 25 μL: cDNA 3 μL, 0.35 fmol/L 竞争性内标准质粒 1 μL, 5 μL RAMP-S 及 RAMP-A 引物 1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 含 15 mmol/L MgCl₂ 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1.25 u。反应条件 95℃变性 5 min 后, 以 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 30 次。取 6 μL PCR 产物 1.5% 琼脂糖电泳分离和溴乙锭染色后, 用凝胶成像及定量扫描仪测得 371 bp 和 304 bp 2 条带光密度之比。按上述方法绘制标准曲线并求得 RAMP2 mRNA 含量。RAMP2 PCR 产物经醋酸钠

和酚氯仿纯化后用 RAMP2-S 引物进行测序鉴定。

1.8 统计学分析

3 次独立实验, 每次作平行管。实验结果均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Student's t test 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 心肌细胞钙含量及培养基肾上腺髓质素含量

与非钙化心肌细胞相比, 钙化心肌细胞钙含量增加 3 倍 (165.4 ± 18.6 比 $39.6 \pm 5.1 \mu\text{mol/g}$ 蛋白, $P < 0.01$)。钙化心肌细胞培养上清中 ADM 含量较非钙化心肌细胞高 136.9% (13.43 ± 2.34 比 $5.67 \pm 0.89 \text{ pmol/L}$, $P < 0.01$)。

2.2 心肌细胞肾上腺髓质素 mRNA 和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 的含量

用限制性内切酶 Bgl I 对部分 ADM PCR 产物 (446 bp) 酶切, 得到 156 bp 和 290 bp 2 条片段, 证明所得 PCR 产物正确无误。结果显示, 钙化心肌细胞 ADM mRNA 含量较非钙化心肌细胞高 24% ($P < 0.05$), 结果如图 1 (Figure 1) 所示。

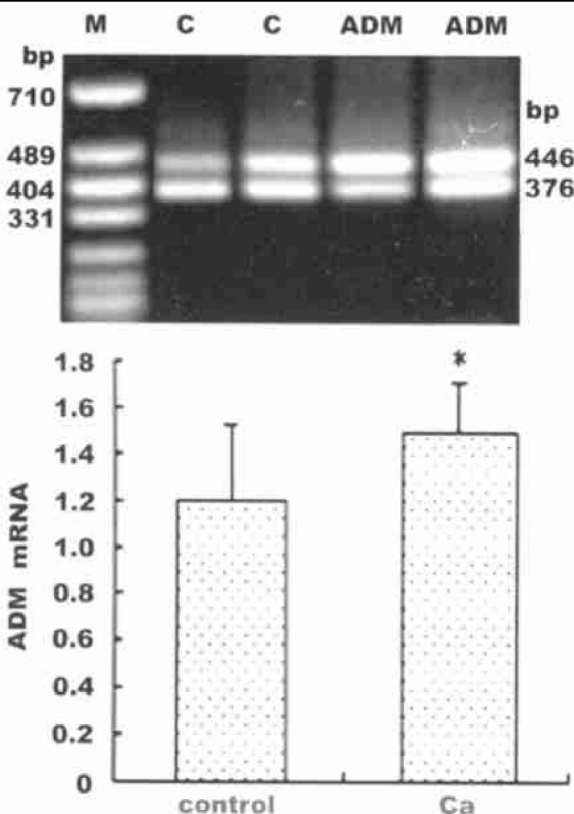


图 1. 钙化心肌细胞 ADM mRNA 的相对含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)。

Figure 1. The relative amount of ADM mRNA in calcified myocardial cells. * : $P < 0.05$, compared with control. M: marker; C: control; ADM: adrenomedullin.

聚合酶链反应产物经测序鉴定证明所得 PCR 产物正确无误。结果显示, 钙化心肌细胞 RAMP2 mRNA 水平较非钙化心肌细胞增加 25% ($P < 0.05$), 而且钙化心肌细胞 RAMP2 mRNA 升高的程度与 ADM mRNA 升高的程度呈相平行。结果如图 2 (Figure 2) 所示。

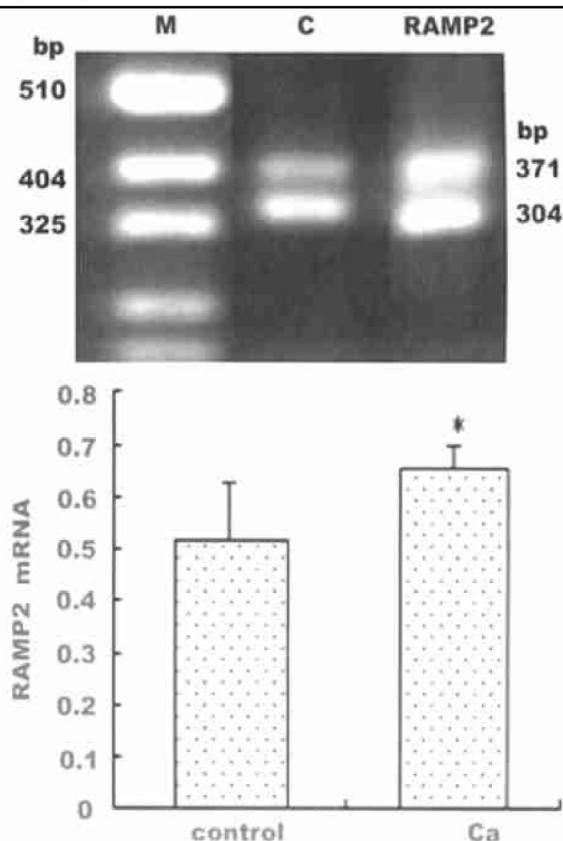


图 2. 钙化心肌细胞 RAMP2 mRNA 的相对含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)。

Figure 2. The relative amount of RAMP2 mRNA in calcified myocardial cells. * : $P < 0.05$, compared with control. M: marker; C: control; RAMP2: receptor activity modifying protein 2.

3 讨论

心血管组织的钙化是高血压、动脉粥样硬化和肾性心血管病的重要危险因素。近年发现钙化不仅局限于心血管组织局部, 非粥样硬化斑块部位和非瓣膜部位亦存在广泛的 Ca^{2+} 沉积和钙超载^[8,9]。但是引起钙超载的机制目前尚不清楚。目前认为许多致病因素作用于心血管组织细胞使 Ca^{2+} 沉积于细胞, 细胞表型向成骨样细胞表型转变, 心血管组织的钙化是一个主动的可调节的过程。调节 Ca^{2+} 代谢的激素、细胞因子、细胞凋亡和脂质过氧化产物——氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 都是重要的组织细胞钙化的调节因子, 促进心血管组织和细胞的钙化。心血管组织的钙化导致细胞收缩和舒张功能改变,

内皮舒张功能下降,组织细胞的旁/自分泌功能改变,对疾病的发生发展和预后具有重要影响^[1,2,10]。肾上腺髓质素对心肾系统具有重要的保护作用,但是ADM在钙化心血管组织中的作用目前尚不清楚。受体活性修饰蛋白1(RAMP1)是1998年Mclatchie等^[11]发现的,其分子量为17 kDa;随后又相继发现了RAMP2和RAMP3。心衰和高血压时RAMP2基因表达明显上调,但RAMP2在钙化心血管组织中的作用亦不清楚。

β -磷酸甘油是体内有机磷供体,提供富含钙磷的微环境,诱导细胞聚集并形成多细胞结节,促进钙磷沉积于细胞内和组织间^[6]。本实验用 β -磷酸甘油诱导离体培养的新生大鼠心肌细胞钙含量明显增加,与维生素D3和尼古丁诱导的整体大鼠钙化模型心肌细胞钙含量增加结果相一致^[10]。本实验还发现钙化心肌细胞中ADM含量较正常非钙化的心肌细胞明显增高,钙化新生大鼠心肌细胞ADM mRNA水平亦明显增加。提示钙化心肌细胞中ADM基因表达的上调可能是细胞中蛋白增加的主要原因。编码ADM的基因定位在第11位染色体上,人ADM基因含有4个外显子和3个内含子,在5'端区含有TATA、CAAT和GC box。具有几个AP-2和cAMP调节的增强子元件的结合位点,而且还发现在ADM基因启动子部位含有核因子- κ B(NF- κ B)位点。提示ADM的表达受蛋白激酶C和蛋白激酶A等多种信号途径的调节。体内的生长因子如成纤维细胞生长因子和血小板源性生长因子通过激活AP-2进而激活磷脂酶C和蛋白激酶C,上调ADM基因表达^[3]。心肌细胞钙化时肾上腺髓质素基因表达的上调是否亦通过AP-2和蛋白激酶C的激活介导还有待进一步的研究。本实验还观察到钙化处理的新生大鼠心肌细胞RAMP2 mRNA水平亦较正常非钙化的新生大鼠心肌细胞明显增加。其RAMP2基因表达上调,mRNA水平增加与相应ADM基因表达上调相平行。迄今为止RAMP家族基因表达调控的机理尚不清楚。新生大鼠心肌细胞钙化时ADM高表达的因素是否参与了RAMP基因的表达调节值得进一步研究。

心肌缺血性心衰、休克和高血压时血浆ADM水平升高,心血管组织ADM mRNA和RAMP2 mRNA水平升高,且ADM mRNA和RAMP2 mRNA升高的水平相平行,而且外源导入ADM基因可以明显降低高血压的发生^[12~14]。本工作发现钙化的新生大鼠心肌细胞ADM、ADM mRNA和RAMP2 mRNA表达明显增加,而且ADM和RAMP2的基因表达上调相平行,提示钙化处理的心肌细胞ADM/RAMP2基因表达明显上调,ADM作为内源性保护物质在心血管系统钙化中的作用还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, et al. Vascular and valvar calcification: recent advances. *Heart*, 2001, **85**: 13-17
- [2] Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation*, 1998, **98**: 1302-306
- [3] Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocrine Review*, 2000, **21**: 138-167
- [4] 齐永芬,唐朝枢. 降钙素基因相关肽家族的受体活性修饰蛋白. *生理科学进展*, 2001, **32**(3): 251-253
- [5] McDonagh JC, Cebtra EK, Nathan RD. Highly enriched preparation of cultured myocardial cells for biochemical and physiological analysis. *J Mol Cell Cardiol*, 1987, **19**: 785-793
- [6] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, et al. β -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 2003-009
- [7] Tsai SJ, Wiltbank MC. *Gene cloning and analysis by RT-PCR* (Edited by Paul and James). Standard curve quantitative competitive RT-PCR (SC-QC-RT-PCR): a simple method to quantify absolute concentration of mRNA from limited amounts of sample. *Biotechniques Books*, Natick, MA, 1998: 91~101
- [8] Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, et al. Calcification of the aortic arch: risk factor and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*, 2000, **88**: 26-33
- [9] Christian RC, Fitzpatrick LA. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1999, **8**(4): 443-448
- [10] 齐永芬,董林旺,薛琳,等. 维生素D3诱导的钙超载大鼠心肌肌浆网功能变化. *中国病理生理杂志*, 2001, **17**(2): 289-292
- [11] Mclatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. PAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin receptor-like receptor. *Nature*, 1998, **393**: 333-339
- [12] Qie E, Vinge LE, Yndestad A, et al. Induction of a myocardial adrenomedullin signaling system during ischemic heart failure in rats. *Circulation*, 2000, **101**: 415-422
- [13] Nakazawa I, Nakajima T, Harada H, et al. Human calcitonin receptor-like receptor for adrenomedullin: genomic structure, eight single nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis. *Hum Genet*, 2001, **46**(3): 132-136
- [14] Dobrzynski E, Wang C, Chao J, et al. Adrenomedullin gene delivery attenuates hypertension, cardiac remodeling, and renal injury in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension*, 2000, **36**(6): 995-1001

(此文编辑 朱雯霞)