

整合素连接激酶在大鼠心脏生长发育过程中的表达及意义

花颖¹, 白剑², 张娜², 徐标¹

(1. 南京医科大学鼓楼临床医学院, 江苏省南京市 210008; 2. 南京大学医学院, 江苏省南京市 210093)

[关键词] 心肌细胞增殖; 整合素连接激酶; 细胞周期蛋白 D1

[摘要] **目的** 观察整合素连接激酶在大鼠心脏不同生长发育阶段的表达变化, 探讨整合素连接激酶与正常心肌细胞增殖能力的关系。**方法** 取胚胎期(孕 16 天)、出生后 1 天、3 天、7 天、2 月、1 年、1.5 年 7 个时间点的大鼠心脏, 采用实时定量 PCR 和 Western blot 方法检测心肌组织内整合素连接激酶及反映心肌细胞增殖能力的细胞周期蛋白 D1 的表达。**结果** 整合素连接激酶在大鼠心脏生长发育的不同阶段均有表达, 表现为在胚胎期心肌组织内的表达水平最高, 出生后迅速下降并随鼠龄的增加呈递减趋势, 至出生后 2 月趋于稳定。细胞周期蛋白 D1 的表达变化与整合素连接激酶的表达变化呈相似趋势, 相关分析提示整合素连接激酶与细胞周期蛋白 D1 的表达水平呈正相关。**结论** 在大鼠心脏生长发育过程中伴随有整合素连接激酶的表达下降, 这与哺乳动物心肌细胞增殖能力的变化规律相一致。并且整合素连接激酶与细胞周期蛋白 D1 的表达水平呈正相关, 提示整合素连接激酶可能与心肌细胞增殖能力有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Integrin-linked Kinase During Normal Cardiac Development of Rats

HUA Ying¹, BAI Jian², ZHANG Na², and XU Biao¹

(1. Drum Tower Clinical School of Nanjing Medical University, Jiangsu, Nanjing 210008, China; 2. Medical School of Nanjing University, Jiangsu, Nanjing 210093, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocyte Proliferation; Integrin-linked Kinase; Cyclin D1

[ABSTRACT] **Aim** In order to investigate the relationship between integrin-linked kinase (ILK) and proliferative capacity of cardiac myocytes, we observed the expression of ILK and cyclin D1 in cardiomyocytes of Sprague-Dawley (SD) rats at different development stages (embryonic, newborn, adult and old). **Methods** Hearts of SD rats at different development stages (fetal day 16, postnatal day 1, 3, 7, postnatal month 2, postnatal year 1, 1.5) were used to study. Real time polymerase chain reaction (real time PCR) and Western blot analysis were used to assess ILK and cyclin D1 expression. **Results** The expression of ILK in myocardial tissue decreased progressively with aging in SD rats. Expression of ILK was the highest in the fetal life (16 days gestation), and the level of ILK tended to be stable at 2 month after birth. Expression of cyclin D1 was positively correlated with ILK content. **Conclusions** The altered ILK and cyclin D1 parallel normal cardiac development, and expression of cyclin D1 is positively correlated with ILK content. ILK may be correlated with proliferative capacity of cardiac myocytes.

心脏疾病是世界范围内引起死亡的主要病因, 其病理特征主要表现为有功能的心肌细胞减少^[1]。目前, 心脏病的常规治疗方法旨在挽救残存的心肌细胞, 而无法逆转心肌细胞的丢失。近来研究发现神经调节素 1^[2] (neuregulin 1, NRG1) 和骨膜蛋白^[3] (periostin) 可诱导心肌细胞的增殖来促进心脏的损

伤修复。因此, 如何促进心肌细胞增殖的相关研究很可能为心脏疾病的治疗带来突破。

整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[4], 在哺乳动物的心脏中有较高的表达。ILK 是心脏机械牵张感受器的重要组成部分, 有研究表明在急性心肌梗死后, ILK

[收稿日期] 2012-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81070195)

[作者简介] 花颖, 硕士, 研究方向为心力衰竭的发病机制, E-mail 为 huaying3@163.com。白剑, 博士, 研究方向为心力衰竭的发病机制, E-mail 为 baijian100@126.com。通讯作者徐标, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭的发病机制, E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。

参与了心肌对机械应力的适应性反应^[5]。近年来研究发现 ILK 与心脏的生长和修复密切相关^[6,7]。在非心肌组织中, ILK 表达上调可诱导肿瘤的发生^[8],相反, ILK 失活可抑制人肠上皮细胞、软骨细胞的增殖生长^[9,10]。这些研究表明 ILK 与多种细胞的增殖有关。但是 ILK 是否与心肌细胞的增殖相关,目前尚无文章报道。本实验通过观察不同生长发育阶段大鼠心肌细胞中 ILK 的表达情况,探讨 ILK 与心肌细胞增殖能力的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF (specific pathogen free) 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,由鼓楼医院动物实验中心提供。将大鼠按照生长发育的不同时间点(胚胎期 16 天、出生后 1 天、3 天、7 天、2 月、1 年、1.5 年)分为 7 组,每组 6 只(雌、雄不限)。

1.2 标本采集

取出各个时间点的大鼠心脏,置于 1 mL EP 管中, -70℃ 存放备用。

1.3 Western blot 检测心肌组织 ILK、Cyclin D1 的蛋白水平

取 40 mg 心肌组织剪碎匀浆离心后,加入细胞裂解液[10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 150 mmol/L NaCl, 0.1% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 1% Triton X-100, 1% 去氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, DOC), 5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 1 mmol/L Na₃VO₄, 50 mmol/L NaF, 0.2 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 和蛋白酶抑制剂混合物 (protease inhibitor cocktail, 不含 EDTA, Roche 公司)], 冰上震荡 40 min, 4℃、12 000 g 离心力离心 15 min, 取上清蛋白溶液。BCA 蛋白测试试剂盒 (Pierce 公司) 测蛋白浓度。取 40 μg 变性蛋白样品上样, 经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 湿转法 2 h 将蛋白转至二氟化树脂 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Millipore 公司) 上, 5% 牛奶封闭 2 h, 一抗 [小鼠抗 ILK 单克隆抗体 1:3 000, BD 公司; 兔抗细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 单克隆抗体 1:500, Bioworld 公司; 羊抗 β-肌动蛋白 (β-actin) 单克隆抗体 1:1 000, Santa Cruz 公司] 37℃ 孵育 4 h, TBST (tris-buffered saline and tween 20) 洗膜, 二抗 [分别为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 1:2 000, 羊抗兔 IgG 1:1 000, 兔抗羊

IgG 1:2 000, 均为联科生物技术有限公司产品] 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 于暗室中进行增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) (Millipore 公司) 显影并于柯达胶片上曝光。目标条带采用 Quantity One 图象分析软件 (Bio-Rad 公司) 分析其光密度, 将待测蛋白条带与同一泳道 β-actin 条带的光密度比值作为结果。

1.4 实时定量 PCR 检测心肌组织 ILK、Cyclin D1 mRNA 表达

取大鼠心肌组织 100 mg, 加入 Trizol (Invitroge 公司) 试剂提取总 RNA。用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa 公司) 逆转录生成 cDNA 用于 ILK、Cyclin D1 及 β-actin 基因的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增。用 PrimeScript™ 试剂盒 (TaKaRa 公司) 配制实时定量 PCR (real time PCR) 反应液, 采用 ABI PRISM 7500 Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司) 进行 real time PCR 反应。记录 CT 值, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 ILK mRNA 和 Cyclin D1 mRNA 的相对表达量。引物序列: ILK 上游 5'-CAACCCTCATCACACACTGG-3', 下游 5'-GCCATGTCCAAAGCAAACCTT-3'; Cyclin D1 上游 5'-GCGTACCCTGACACCAATCT-3', 下游 5'-GCTCCAGAGACAAGAAACGG-3'; β-actin 上游 5'-GTACCACTGGCATCGTGATGGACT-3', 下游 5'-CCGCTCATTGCCAATGGTGAT-3'。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, ILK 与 Cyclin D1 的蛋白水平及基因水平分别进行相关分析。所有统计学分析由 SPSS 18.0 软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同生长发育阶段大鼠心脏中 ILK 的表达情况

实时定量 PCR 结果显示: ILK 的 mRNA 水平在胚胎期 (孕 16 天) 心肌组织中最高, 出生后 1 天开始迅速下降并随着鼠龄的增加逐渐减少, 从出生后第 7 天开始趋于稳定, 其中胚胎期 (孕 16 天) ILK mRNA 水平是成年期 (2 月) 的 18 倍 (图 1)。Western blot 检测结果与 PCR 结果相似, 即 ILK 在大鼠胚胎期 (孕 16 天) 的心脏中表达水平最高, 出生后迅速降低, 至成年期 (2 月) 开始趋于稳定, 其中胚胎期 (孕 16 天) ILK 的蛋白水平是成年期 (2 月) 的 3.3 倍 (图 2)。这些结果提示在大鼠心脏生长发育过程中伴随有 ILK 表达的下降。

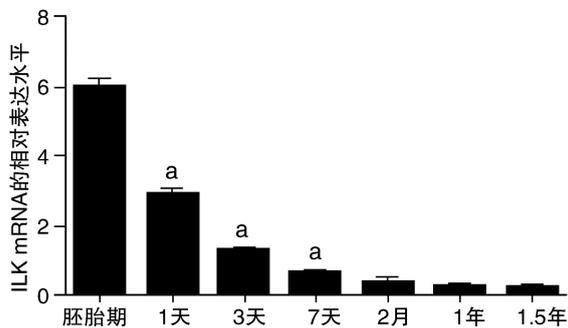


图 1. 实时定量 PCR 检测大鼠心脏生长发育过程中 ILK mRNA 表达变化 (n = 6) a 为 P < 0.05, 与前一时间点比较。

Figure 1. Real time PCR showing ILK mRNA expression of rat hearts at different development stages (n = 6)

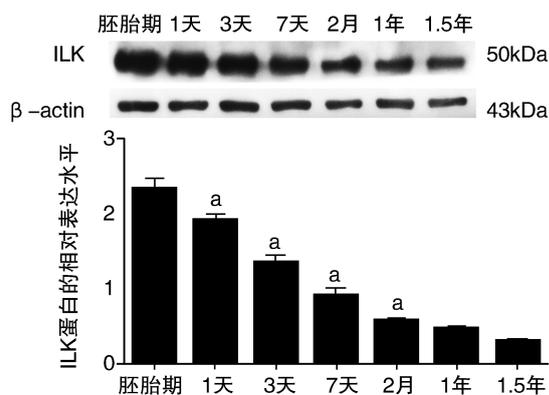


图 2. Western blot 检测大鼠心脏生长发育过程中 ILK 蛋白表达变化 (n = 6) a 为 P < 0.05, 与前一时间点比较。

Figure 2. Western blot showing ILK protein expression of rat hearts at different development stages (n = 6)

2.2 不同生长发育阶段大鼠心脏中 Cyclin D1 表达情况

实时定量 PCR 结果显示: Cyclin D1 的 mRNA 水平在胚胎期(孕 16 天)心肌组织中最高, 出生后 1 天没有明显变化, 但从出生后 3 天开始迅速下降, 至出生后 2 月趋于稳定, 其中胚胎期 Cyclin D1 的 mRNA 水平是成年期(2 月)的 7.7 倍(图 3)。蛋白检测结果与 PCR 检测结果相似, 即 Cyclin D1 在大鼠胚胎期(孕 16 天)的心脏中表达最高, 从出生后 1 天开始迅速下降, 至出生后 7 天趋于稳定, 其中胚胎期 Cyclin D1 的蛋白水平是成年期(2 月)的 11 倍(图 4)。提示在大鼠不同生长发育阶段, Cyclin D1 的表达变化与 ILK 呈相似趋势。

2.3 不同生长发育阶段大鼠心脏中 ILK 与 Cyclin D1 表达水平的相关性分析

将 ILK 与 Cyclin D1 的 mRNA 表达量(图 5A)和蛋白表达量(图 5B)分别进行相关分析, 结果为 r

= 0.828, r = 0.934, 均 P < 0.01, 提示 ILK 与 Cyclin D1 的表达水平呈正相关。

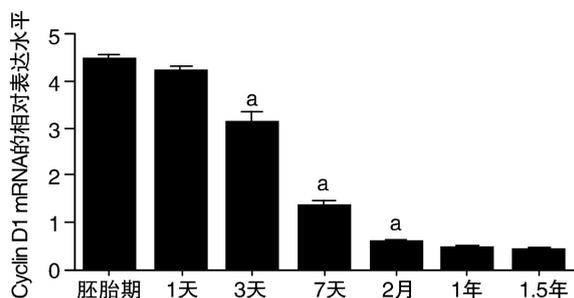


图 3. 实时定量 PCR 检测大鼠心脏生长发育过程中 Cyclin D1 mRNA 表达变化 (n = 6) a 为 P < 0.05, 与前一时间点比较。

Figure 3. Real time PCR showing cyclin D1 mRNA expression of rat hearts at different development stages (n = 6)

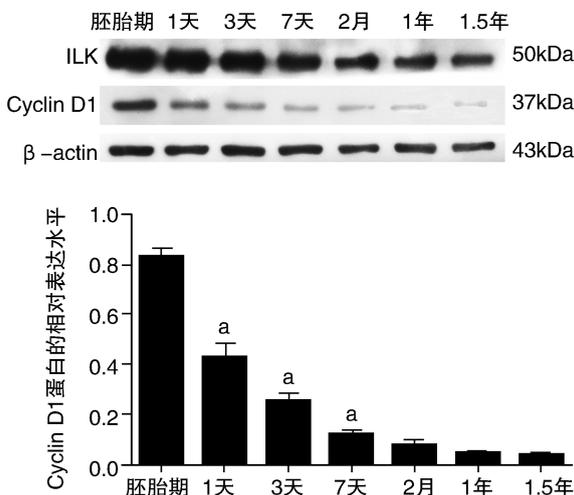


图 4. Western blot 检测大鼠心脏生长发育过程中 Cyclin D1 蛋白表达变化 (n = 6) a 为 P < 0.05, 与前一时间点比较。

Figure 4. Western blot showing cyclin D1 protein expression of rat hearts at different development stages (n = 6)

3 讨论

在低等脊椎动物(如蝾螈、斑马鱼)心脏中, 心肌始终保持着较强的增殖能力, 一旦心脏遭受损伤, 损伤周围区的心肌细胞就会迅速增殖, 修复损伤[1]。而哺乳动物心肌细胞的增殖能力在出生后却大不相同。Porrello 等[11]对出生后 1 天的乳鼠行左室心尖部切除术, 结果发现术后 3 周其缺损部分可完全由新生的心肌细胞代替, 8 周后心肌收缩功能可恢复正常。但出生 7 天的乳鼠在行相同手术后却无法再生心肌组织, 并且心肌收缩功能也无法得到恢复。这提示哺乳动物心肌细胞增殖能力在出

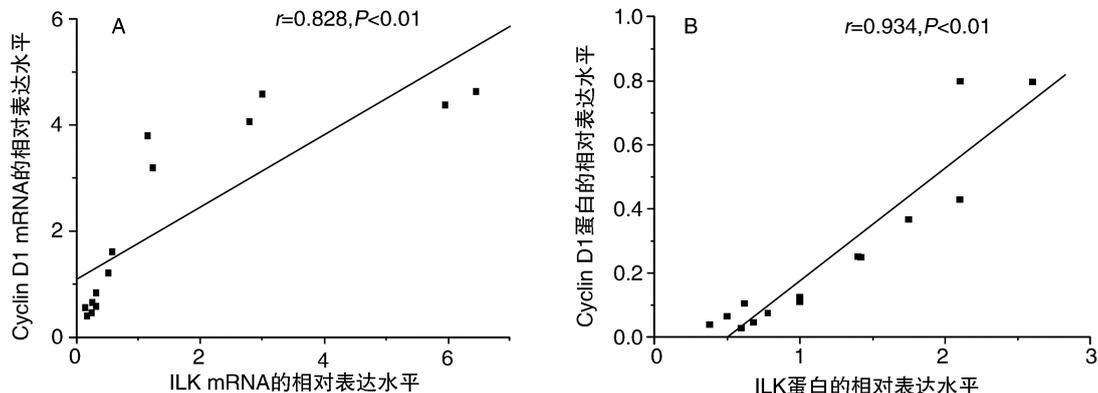


图5. ILK与Cyclin D1的mRNA水平(A图)及蛋白水平(B图)均呈正相关
Figure 5. Cyclin D1 expression was significantly correlated with ILK content

生后不久迅速丧失。一般认为^[1,12]哺乳动物的心肌细胞在胚胎期处于大量增殖阶段,出生后不久(鼠类为7天,人类约为1个月)其增殖能力显著下降,到成年期主要表现为生理性肥大。故根据这一规律我们将SD大鼠按胎鼠期(孕16天)、新生期(出生后1、3、7天)、成年期(2月)及老年期(1、1.5年)4个生长时期分为7组,取出心肌组织,应用Western blotting和实时定量PCR两种方法检测了不同生长发育阶段大鼠心脏中ILK的表达水平,结果发现在大鼠心脏生长发育过程中伴随有ILK的表达下调,这与心肌细胞增殖能力的变化趋势相同。

细胞周期蛋白D1是细胞周期最关键的调节因子之一^[13],它通过磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma pocket protein, pRB)来促进细胞周期由G1期向S期转化,从而启动细胞增殖。Soonpa等^[14]观察了Cyclin D1在大鼠心脏生长过程中的蛋白表达情况,结果发现Cyclin D1的蛋白水平在胚胎期最高,出生后1天下降,至成年期已非常低,这与心肌细胞增殖能力的变化趋势相一致。Brook等^[15]认为心肌细胞在出生后不久即退出细胞周期可能与Cyclin D1-3等蛋白的表达下降有关。此外有研究发现高表达Cyclin D1可促进心肌细胞DNA合成和细胞核分裂^[14]。这些结果表明Cyclin D1与心肌细胞的增殖能力有关。在本实验中我们发现在大鼠心脏的生长发育过程中伴随有Cyclin D1的表达下降,而这与ILK的表达变化具有相似的趋势。因此为明确ILK与Cyclin D1的关系,我们对两者的实时定量PCR结果和Western blot结果分别进行了相关分析,结果发现ILK与Cyclin D1的表达水平呈正相关,提示ILK与心肌细胞增殖能力相关。

有研究发现^[9]ILK基因敲除可下调Cyclin D1的水平,从而抑制人肠上皮细胞的增殖、生长;另一

项研究表明ILK失活可抑制Cyclin D1的表达,最终导致软骨细胞增殖能力下降,软骨发育不良^[10]。此外,Liu等^[16]发现在3T3细胞中,ILK对血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导的Cyclin D1表达和DNA合成是必须的。这提示ILK对Cyclin D1具有一定的调节作用,并且ILK-Cyclin D1通路与细胞的增殖有关。在本实验中我们发现大鼠心脏中的ILK表达水平在出生后迅速降低,并且ILK与Cyclin D1的表达水平呈正相关,由此我们推测出生后心肌细胞增殖能力的迅速下降可能与ILK-Cyclin D1通路的下调有关。

本实验中我们发现在大鼠心脏生长发育过程中伴随有ILK的表达下降,这与哺乳动物心肌细胞增殖能力的变化规律相一致。并且ILK与Cyclin D1的表达水平呈正相关,提示ILK可能与心肌细胞增殖能力有关。那么是否高表达ILK能够促进心肌细胞增殖,这需要进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration [J]. Nature, 2011, 473(7347): 326-335.
- [2] Bersell K, Arab S, Haring B, et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury [J]. Cell, 2009, 138(2): 257-270.
- [3] Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair [J]. Nat Med, 2007, 13(8): 962-969.
- [4] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase [J]. Nature, 1996, 379(6560): 91-96.
- [5] 戴庆, 白剑, 徐标. 大鼠急性心肌梗死后心肌组织整合素连接激酶表达的变化 [J]. 中国动脉硬化杂志,

- 2010, 18(5): 367-370.
- [6] Bendig G, Grimm M, Huttner IG, et al. Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(17): 2361-372.
- [7] 高见书, 林承曦, 毛庆, 等. 高表达整合素连接激酶对大鼠骨髓间充质干细胞旁分泌功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(5): 380-384.
- [8] Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(1): 51-63.
- [9] Gagne D, Groulx JF, Benoit YD, et al. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(2): 387-400.
- [10] Terpstra L, Prudhomme J, Arabian A, et al. Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(1): 139-148.
- [11] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-080.
- [12] Leu M, Ehler E, Perriard JC. Characterisation of postnatal growth of the murine heart [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 2001, 204(3): 217-224.
- [13] Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G, et al. Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(4): 706-721.
- [14] Soonpa MH, Koh GY, Pajak L, et al. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(11): 2644-654.
- [15] Brook G, Poolman RA, McGill CJ, et al. Expression and activities of cyclins and cyclin-dependent kinases in developing rat ventricular myocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(8): 2261-271.
- [16] Liu P, Lu J, Cardoso WV, et al. The SPARC-related factor SMOC-2 promotes growth factor-induced cyclin D1 expression and DNA synthesis via integrin-linked kinase [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(1): 248-261.

(此文编辑 曾学清)