

血管紧张素 II 诱导的新生小鼠心肌细胞肥大模型

周 恒 唐其柱 邓 伟 卞洲艳 袁 园 倪 健

摘 要 **目的** 探索新生小鼠心肌细胞的原代培养方法,建立血管紧张素 II (Ang II) 诱导的小鼠心肌细胞肥大模型。**方法** 使用 0.03% 的胰酶 + 0.04% 的 2 型胶原酶多次消化分离心肌细胞,差时贴壁法纯化心肌细胞。1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 刺激心肌细胞肥大, α -actinin 染色进行心肌细胞纯度鉴定及面积检测,实时定量 RT-PCR 检测心肌细胞肥大标志物的表达,Western blot 法检测蛋白质磷酸化水平。**结果** 培养得到的小鼠心肌细胞具有较高纯度及存活力;Ang II 刺激后心肌细胞面积增大、蛋白合成增加, ANP、BNP、 β -MHC 等心肌细胞肥大标志物的 mRNA 表达水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$),而 α -MHC 表达则下降 ($P < 0.05$);此外,Ang II 刺激组 ERK、JNK 与 p38 的磷酸化水平较对照组明显上调 ($P < 0.05$)。**结论** 使用改良的新生小鼠心肌细胞原代培养方法,成功培养了具有较高纯度及存活力的新生小鼠心肌细胞,并建立了 Ang II 诱导的小鼠心肌细胞肥大模型。

关键词 心肌细胞 原代培养 血管紧张素 II 肥大 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.008

Angiotensin II Induced Hypertrophy of Neonatal Mouse Cardiomyocytes. Zhou Heng, Tang Qizhu, Deng Wei, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To explore the protocol of primary culture of neonatal mouse cardiomyocytes and establish angiotensin II - induced hypertrophic model. **Methods** The cardiomyocytes were isolated by 0.03% trypsin and 0.04% collagenase type II digestion, and purified by differential attachment technique. Cardiomyocyte hypertrophy was induced using 1mol/L angiotensin II, areas of cardiomyocytes were detected using α -actinin staining, expression of hypertrophic markers were measured by real-time quantitative RT-PCR, and protein phosphorylations were measured by Western blot. **Results** Cultured mouse cardiomyocytes exhibited high purity and viability. Angiotensin II induced increases in cell area, protein synthesis, and expression levels of ANP, BNP and β -MHC, and decrease in expression level of α -MHC compared with those in control group ($P < 0.05$). In addition, angiotensin II significantly increased the phosphorylation levels of ERK, JNK and p38 compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** We obtained neonatal mouse cardiomyocytes with high purity and viability by using the modified method of primary culture, and established angiotensin II - induced hypertrophic model of mouse cardiomyocytes.

Key words Cardiomyocyte; Primary culture; Angiotensin II; MAPKs

心肌肥厚是高血压、心肌梗死、瓣膜狭窄等多种心血管疾病向心力衰竭发展的共有病理生理过程,虽然其最初为心脏负荷增加或遭受损伤时的一种代偿性反应,早期能够减轻室壁压力并维持心排出量,然而长期持续性的心肌肥厚将发展为失代偿,最终导致心力衰竭^[1]。心肌细胞肥大是心肌肥厚最重要的病理改变,包括心肌细胞体积增大、胚胎基因激活、促生长信号通路的活化等^[2]。建立稳定的心肌细胞肥大

模型,对其进行分子机制的研究与治疗靶点的探索,对于阐明心肌肥厚的发生、发展机制、干预心肌肥厚与心力衰竭的进展具有重要意义。小鼠是最为应用最为广泛的实验动物,并且应用于小鼠的基因敲除、转基因技术较其他哺乳动物更为成熟,因此使用基因修饰后的小鼠或其细胞进行研究,对于阐明疾病的发生机制与靶基因的作用具有重要意义。但由于小鼠心肌细胞原代培养难度较大,限制了其在心血管疾病研究中的应用。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是 RAAS 系统的重要组成部分,与高血压、心肌肥厚、心力衰竭的发生、发展密切相关,能够直接作用于心肌细胞诱导其肥大^[3]。本研究拟使用改良的小鼠心肌细胞原代培养方法,建立 Ang II 诱导的小鼠心肌细胞肥大模型,为进一步研究心肌肥厚的分子机制、探索治疗靶点提供一定基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300070、81270303、81470516);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20130141130010)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所

通讯作者:唐其柱,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

材料与方法

1. 实验动物及材料: 1 ~ 2 天龄 C57BL/6 新生乳鼠, 由武汉大学心血管病研究所模式动物中心提供。主要仪器设备为全能台式高速低温离心机 (Thermo Scientific, Biofuge Stratos)、CO₂ 培养箱 (Heal Force, HF240)、正置荧光显微镜 (Olympus, BX51)、酶标仪 (Bio - tek, Synergy HT)、超微量分光光度计 (Thermo Scientific, NanoDrop 2000)、实时定量 PCR 仪 (Roche, Light Cycler 480)、超声波裂解仪 (Misonix, XL - 2000)、双通道荧光扫描仪 (Li - Cor, ODY - 2182) 等。主要试剂为 Ang II (Sigma, A9525)、2 型胶原酶 (Sigma, C6885 - 1G)、胰酶 (HyClone, SH300 42.01)、DMEM/F12 培养基 (HyClone, SH30023.01B)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; HyClone, SV30087.02)、 α - actinin 抗体 (Millipore, 05 - 384)、荧光标记的二抗 (免疫荧光用; Invitrogen, A11004)、Hoechst 33258 (Invitrogen, H3569)、TRIzol (Invitrogen, 15596 - 026)、反转录试剂盒 (Roche, 4896866001)、SYBR Green I Master (Roche, 4707516001)、荧光标记的二抗 (Western blot 法; LI - COR, 926 - 32211)、心钠肽 (ANP)、B 型利钠肽 (BNP)、 β 肌球蛋白重链 (β - MHC) 及 α 肌球蛋白重链 (α - MHC) 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; P - ERK、P - JNK、P - P38、T - ERK、T - JNK、T - P38 及 GAPDH 一抗购于 Cell Signaling Technology 公司。

2. 实验方法: (1) 原代心肌细胞的分离、培养及 Ang II 刺激: 使用 75% 乙醇将乳鼠全身消毒, 显微剪刀沿胸骨的左缘剪开胸壁, 轻挤压胸廓使心脏暴露, 显微镊迅速取下心脏, 放入盛有 DMEM/F12 培养基的玻璃平皿内。轻柔清洗心脏, 去除心房, 以显微剪将心脏剪成 1mm³ 左右的碎块。剪碎的心肌组织转入离心管, 加入约 10 倍体积的酶消化液 (2 型胶原酶 0.04%, 胰酶 0.03%)。于 37℃ 水浴中轻轻震荡, 消化 10min, 静止数秒钟后吸取上层清液, 弃去。重复消化操作 10min, 吸上清液转移至离心管, 加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基的离心管终止消化。余下的心肌组织补加消化液, 重复消化数次, 直至消化完全。将收集到的细胞悬液以水平离心机 400 × g 离心 5min, 去上清, 加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基轻轻吹打以重悬细胞, 合并各管细胞悬液, 轻柔混匀。以 40 μ m 细胞过滤网过滤细胞悬液, 将滤过的细胞接种于 100mm 的培养皿中, 差时贴壁 90min, 去除成纤维细胞。吸出上清液, 加入溴脱氧尿苷 (BrdU, 终浓度 0.1mmol/L), 种植于 0.1% 明胶包被的 6 孔板 (用于 α - actinin 染色的细胞预先于皿底放置盖玻片) 中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 48h 后洗涤 1 次, 更换培养基。进行实验前, 使用无血清培养基饥饿细胞 24h, 加入 Ang II 溶液 (终浓度为 1 μ mol/L) 刺激心肌细胞肥大, 对照组给予等体积 PBS。(2) α - actinin 染色进行心肌细胞纯度鉴定及面积检测: Ang II 刺激心肌细胞 48h 后, 弃去培养基, 以 37℃ 温浴后的 PBS 稍洗细胞爬片, 于培养箱中孵育 30min。弃去 PBS, 将 RCL2 固定液 1ml 滴于培养皿内, 室温固定 10min, PBS 漂洗。将 0.2% Triton X - 100 滴于培养皿内,

5min 后弃去, 漂洗。将 8% 羊血清 1ml 滴于培养皿内, 室温封闭 60min。将 α - actinin 抗体 (1% 羊血清 1:100 稀释) 100 μ l 滴于培养皿中, 4℃ 孵育过夜。取出细胞爬片, 漂洗后滴加荧光标记的二抗 (PBS 1:200 稀释, 避光), 37℃ 孵育 60min, 以含 DAPI 的封片剂封片。正置荧光显微镜下观察, 拍照, 使用 Image Pro - Plus 6.0 计算细胞面积。(3) 心肌细胞蛋白质/DNA 比值检测: Ang II 刺激心肌细胞 48h 后, 弃去培养基, 以 PBS 洗涤, 加入 1ml 0.2mol/L 高氯酸, 水平离心机 5000 × g 离心 10min。弃去上层清液, 向沉淀中加入 250 μ l 0.3mol/L KOH, 60℃ 孵育 20min, 高频超声波裂解细胞。取 10 μ l 细胞匀浆液, 加入 90 μ l Hoechst 33258 染液, 避光室温孵育 5min, 酶标仪读数 (激发 356nm, 发射 492nm), 以鲑精 DNA 为标准品, 计算细胞 DNA 浓度 (A)。取同管细胞匀浆液, 以 BCA 法测定其蛋白质浓度 (B), B/A 即为蛋白质/DNA 比值。(4) 实时定量 RT - PCR 检测心肌细胞肥大标志物的表达: 分别在 Ang II 刺激心肌细胞 12、24 及 48h 后, 收集细胞, 弃去培养基, 每孔细胞加入 1ml TRIzol, 室温放置 10min, 移液器吹吸混匀后转移至 1.5ml EP 管中, 加入 200 μ l 三氯甲烷抽提, 12000 × g、4℃ 离心 15min 后, 取上层清亮水相 RNA, 加入等体积异丙醇, 12000 × g、4℃ 离心 10min, 沉淀 RNA, 75% 乙醇漂洗、干燥, 加入 20 μ l DEPC 水溶解 RNA, 使用超微量分光光度计检测 RNA 纯度及浓度。取 2 μ g RNA, 加入反转录酶、RNA 酶抑制剂等, 20 μ l 反应体系进行反转录。将反转录得到的 cDNA 与 SYBR Green I Master、引物等混合, 以 GAPDH 为内参照, 实时定量 PCR 仪检测分析。(5) Western blot 法检测丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPKs) 信号分子磷酸化: Ang II 刺激心肌细胞 2h 后, 弃去培养基, PBS 洗涤, 每皿细胞加入 100 μ l 含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上振荡 10min, 细胞刮刮取细胞, 高频超声波进一步裂解细胞提取心肌细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。上样量为 20 μ g 的组织总蛋白经 SDS - PAGE 电泳分离, 电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 (TBS 稀释) 封闭 2h; 加入目的蛋白的一抗, 4℃ 孵育过夜, 荧光标记的二抗 37℃ 孵育 60min。使用双通道荧光扫描仪扫描, 以 GAPDH 为内参照, 计算机分析结果。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间差异比较采用两独立样本的 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠原代心肌细胞形态观察及纯度鉴定: 心肌细胞未贴壁悬浮于培养基中时形状为圆形, 24h 后大多数心肌细胞贴壁, 并开始长出伪足; 48h 后, 心肌细胞基本上完全贴壁, 伪足呈纤维条索状, 细胞形状多样化, 有梭形、三角形、菱形及多角形, 细胞开始聚集生长, 出现自发性搏动。95% 以上的细胞 α - actinin 染色呈阳性, 表明心肌细胞纯度较高 (图 1)。

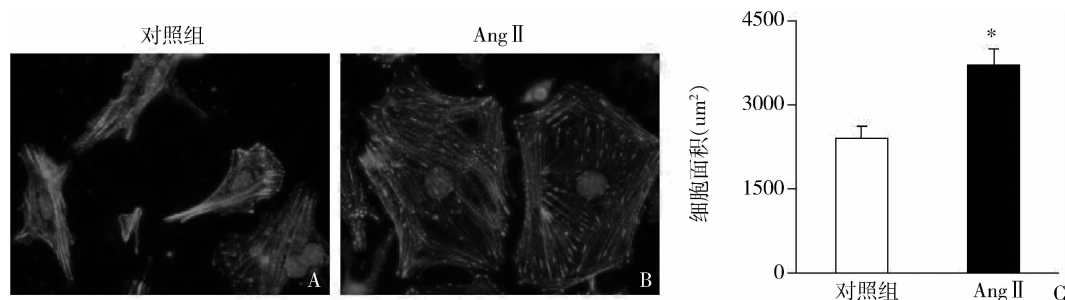


图1 Ang II刺激小鼠心肌细胞面积增大

A、B. α -actinin 免疫荧光染色 ($\times 400$); C. Image Pro-Plus 6.0 计算细胞面积后的统计结果。与对照组相比, * $P < 0.05$

2. Ang II刺激小鼠心肌细胞面积增大及蛋白合成增加: Ang II刺激48h后, Image Pro-Plus 6.0计算细胞面积显示, 与对照组相比, Ang II组细胞面积明显增大 ($P < 0.05$, 图1)。此外, Ang II组总蛋白质含量明显增加 ($P < 0.05$, 图2), 反映细胞数量的DNA

水平在两组细胞中无统计学差异 ($P > 0.05$), 并且Ang II组蛋白质/DNA比值明显高于对照组 ($P < 0.05$), 表明Ang II刺激后单个心肌细胞的蛋白质合成增加, 详见图2。

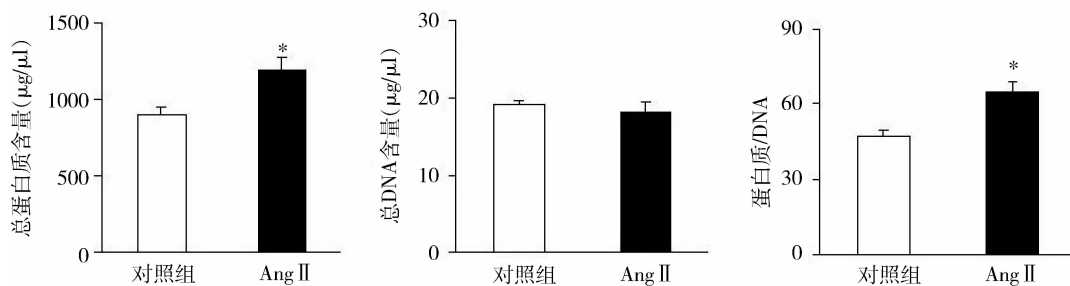


图2 Ang II刺激小鼠心肌细胞蛋白质合成增加

与对照组相比, * $P < 0.05$

3. Ang II刺激小鼠心肌细胞肥大标志物的表达上调: Ang II刺激心肌细胞12、24及48h后, ANP、BNP等心肌细胞肥大标志物的mRNA水平逐渐升高, 在24及48h与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Ang II刺激后, β -MHC的mRNA水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 而 α -MHC则出现下调 ($P < 0.05$), 表明心肌细胞基因表达由成熟型向胚胎型转化, 详见图3。

4. Ang II刺激小鼠心肌细胞MAPKs信号通路激活: Ang II刺激2h后, 通过Western blot法检测MAPKs信号通路的重要信号分子ERK、JNK及p38的磷酸化水平。结果显示Ang II组心肌细胞中细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK)、c-Jun氨基末端激酶 (c-Jun NH2-terminal kinases, JNK) 及P38的磷酸化水平较对照组明显上调 ($P < 0.05$, 图4) 提示MAPKs信号通路激活。

讨 论

小鼠是最为应用最为广泛的实验动物, 但由于小鼠心肌细胞原代培养难度较大, 限制了其在心血管疾病研究中的应用。Ang II是RAAS系统的重要组成部分, 与高血压、心肌肥厚、心力衰竭的发生、发展密切相关, 能够直接作用于心肌细胞诱导其肥大。本研究通过改良的小鼠心肌细胞原代培养方法, 成功的培养了具有较高纯度及存活力的小鼠心肌细胞, 并使用Ang II进行刺激, 诱导心肌细胞肥大、蛋白合成增加、标志物表达上调以及MAPKs信号通路激活, 建立了Ang II诱导的小鼠心肌细胞肥大模型。

小鼠心肌细胞培养效果的影响因素较多, 包括新生小鼠的鼠龄、消化酶的选择、心肌细胞的纯化等, 所培养心肌细胞的纯度、存活率、搏动状态等对后续实验结果的真实性及可复制性具有重要影响。小鼠心肌细胞随鼠龄增长, 其增殖分化能力逐渐减弱, 小鼠出生时间越短, 其心肌细胞分离存活率越高, 越易贴

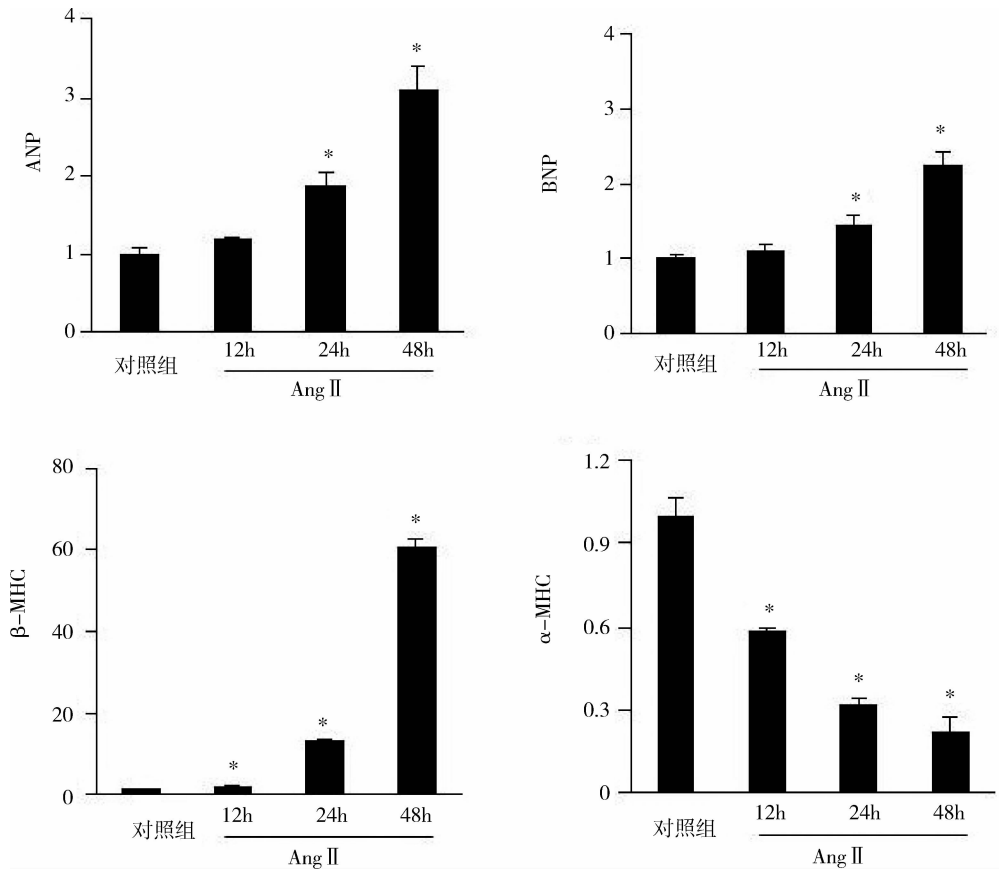


图 3 Ang II 刺激小鼠心肌细胞肥大标志物的表达上调
与对照组相比, * $P < 0.05$

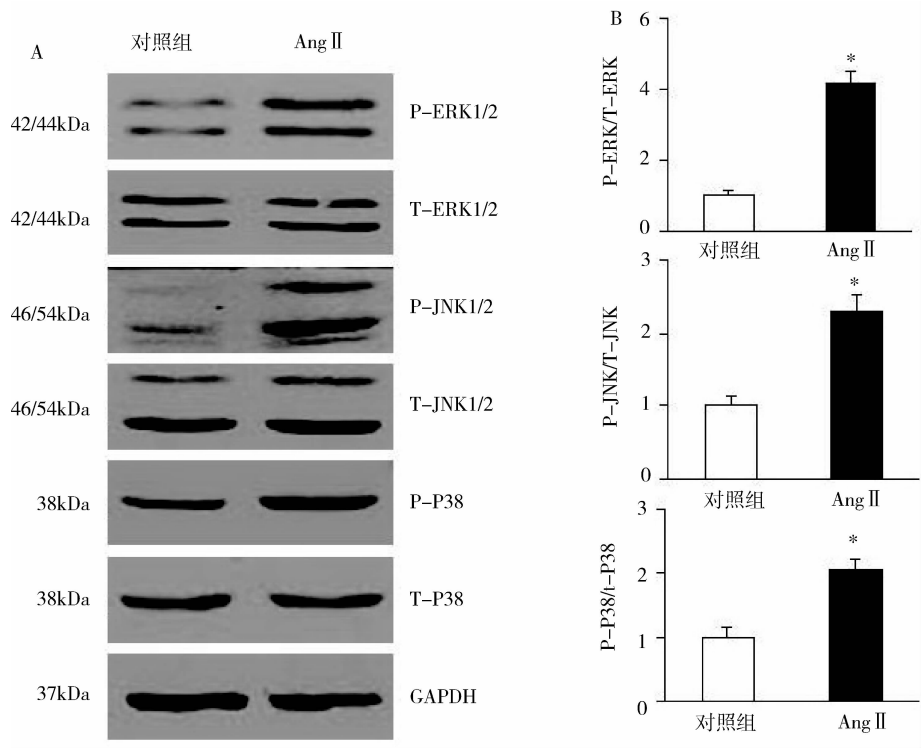


图 4 Ang II 刺激小鼠心肌细胞 MAPKs 信号通路激活
A. 代表性的 WB 条带; B. WB 条带灰度值的统计结果。与对照组相比, * $P < 0.05$

壁生长,一般选用1~3天龄的新生小鼠进行心肌细胞培养^[4]。本研究选用1~2天龄的新生小鼠,获得了较佳的培养效果。消化酶的选择及消化过程是影响心肌细胞存活率的关键因素。心肌细胞的消化多选用胰酶及胶原酶,胰酶消化作用较强,但易对心肌细胞造成损伤,胶原酶主要作用于细胞间质的胶原纤维,其细胞损伤也较小,但消化作用较弱^[5]。本研究通过反复摸索,选用0.03%的胰酶及0.04%的2型胶原酶配比进行多次消化,在消化效率较高的同时对心肌细胞损伤相对较小。此外,从心脏分离得到的细胞中除了约2/3的心肌细胞,还有成纤维细胞等,需要在培养过程中将其他细胞去除纯化。去除成纤维细胞有两种方法,一是利用成纤维细胞贴壁早的特点,采用差时贴壁的方法去除先贴壁的成纤维细胞,二是加入抑制细胞增殖的药物,如BrdU,抑制成纤维细胞的增殖^[6]。本研究通过90min差时贴壁去除大部分成纤维细胞,并在培养心肌细胞时加入BrdU抑制残余成纤维细胞的增殖,得到较高纯度的心肌细胞。

心肌细胞肥大是心肌肥厚最重要的病理改变,包括心肌细胞体积增大、蛋白合成增加,并涉及一系列基因表型的改变,如ANP、BNP等标志物的表达上调,收缩型的 α -MHC向胚胎型的 β -MHC转化等,还包括促生长信号通路如MAPKs的激活。MAPKs是一个三级信号级联放大的信号转导系统,通过磷酸化底物的苏氨酸/丝氨酸位点而激活下游分子,主要包括3个亚家族ERK、JNK与p38^[7]。多种心肌肥厚刺激信号(包括Ang II、ET-1、肾上腺素等GPCR的激动剂,机械牵拉刺激等)能够激活心肌细胞内的MAPKs,活化的ERK、JNK与p38能磷酸化细胞内多个靶分子,包括多种转录因子,导致心脏基因表达的重排^[7,8]。ERK是心肌肥厚的重要调节分子,持续激活的ERK能直接导致在体的心肌肥厚,而MEK-ERK的抑制剂U0126则能够抑制压力负荷诱导的心肌肥厚^[8-10]。在培养的心肌细胞中,激活JNK可引起肥大表型,包括胚胎基因的激活以及细胞的病理改变,而抑制JNK能够阻断压力负荷诱导的心肌肥厚^[11]。p38的活性在多种类型的心力衰竭状态下上调,特异性激活心肌细胞中的p38可导致伴有显著间质纤维化的限制性心肌病^[12]。作为RAAS系统的重要组成部分,Ang II是介导心肌肥厚的重要体液因子,能够直接作用于心肌细胞导致其肥大的发生。本

研究也进一步证实,Ang II能够刺激原代培养的小鼠心肌细胞发生体积增大、蛋白质合成增加、基因表达改变以及MAPKs信号通路激活。

综上所述,本研究通过使用改良的新生小鼠心肌细胞原代培养方法,建立了Ang II诱导的小鼠心肌细胞肥大模型,为进一步研究心肌肥厚的分子机制、探索治疗靶点提供了一定的实验基础。

参考文献

- 1 Zhou H, Bian ZY, Zong J, *et al.* Stem cell antigen 1 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis after pressure overload[J]. *Hypertension*, 2012, 60(3):802-809
- 2 Zhou H, Shen DF, Bian ZY, *et al.* Activating transcription factor 3 deficiency promotes cardiac hypertrophy, dysfunction, and fibrosis induced by pressure overload[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26744
- 3 Zhou H, Yuan Y, Liu Y, *et al.* Icaritin attenuates angiotensin II-induced hypertrophy and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species-dependent JNK and p38 pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(5):1116-1122
- 4 Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(3):288-298
- 5 Sreejit P, Kumar S, Verma RS. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, 44(3-4):45-50
- 6 Jiang DS, Liu Y, Zhou H, *et al.* Interferon regulatory factor 7 functions as a novel negative regulator of pathological cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*, 2014, 63(4):713-722
- 7 Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4):1507-1546
- 8 Kehat I, Molkentin JD. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2010, 1188:96-102
- 9 Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2000, 19(23):6341-6350
- 10 Li H, He C, Feng J, *et al.* Regulator of G protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31):13818-13823
- 11 Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases[J]. *Circulation*, 2007, 116(12):1413-1423
- 12 Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, *et al.* The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21):12283-12288

(收稿日期:2015-04-06)

(修回日期:2015-04-10)