

PLP2 在心肌重构中的动态表达变化

吴青青 唐其柱

摘要 目的 探讨 PLP2 蛋白在心肌重构心脏组织和心脏各类细胞中的表达改变。**方法** 用冠状动脉左前降支结扎术建立小鼠心肌梗死后的重建模型、异丙肾上腺素 (ISO) 皮下注射 2 周建立小鼠急性心脏损伤模型;胸主动脉结扎术 (aortic banding, AB) 建立小鼠心肌肥厚的模型。苯肾上腺素 (PE) 诱导心肌细胞肥大模型;转化生长因子 (TGF) β 刺激心肌成纤维细胞激活。采用 RT-PCR 检测上述各种心脏重建模型中 PLP2 转录水平的改变。**结果** PLP2 在小鼠心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 术后 2 周表达明显增高 ($P < 0.05$);在 ISO 诱导的急性心脏损伤后 2 周表达增高 ($P < 0.05$);在 AB 术后 1 周表达开始增高 ($P < 0.05$),在 AB 术后 2 周达到高峰 ($P < 0.05$),持续到 AB 术后 8 周 ($P < 0.05$)。PLP2 在 PE 诱导的心肌细胞肥大模型中表达增高;在 TGF β 刺激的成纤维细胞中表达明显增高。**结论** PLP2 的表达在不同模型的心脏重建中均发生明显改变,且呈现动态变化,提示其可能参与心脏重建的发生、发展。

关键词 蛋白脂质蛋白 2 心肌梗死 异丙肾上腺素 胸主动脉结扎术 心肌重建

中图分类号 R318

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.008

Expression Alteration of PLP2 in the Process of Cardiac Remodeling. Wu Qingqing, Tang Qizhu. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute, Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the expression of PLP2 protein in the process of cardiac remodeling. **Methods** Mice were subjected to left anterior descending coronary artery ligation to induce cardiac remodeling model. Mice were subjected to isoproterenol (ISO) subcutaneous injection for 2 weeks to establish acute cardiac injury model. Mice were subjected to aortic banding (AB) surgery to establish a myocardial hypertrophy model. Cardiac myocytes hypertrophy model was induced by phenylephrine (PE) stimulation. Transforming growth factor (TGF) β was used to stimulate cardiac fibroblasts. The PLP2 transcription level was detected by RT-PCR. **Results** PLP2 expression was significantly increased in 2 weeks after myocardial infarction ($P < 0.05$), as well as in acute cardiac injury induced by ISO injection ($P < 0.05$). After 1 week of AB surgery, the PLP2 expression began to increase ($P < 0.05$), peaked at 2 weeks post AB ($P < 0.05$), preserved to 8 weeks after AB ($P < 0.05$). The expression of PLP2 in PE stimulated cardiomyocytes was increased as well as TGF β stimulated fibroblast. **Conclusion** The expression of PLP2 were dynamically changed significantly in different cardiac remodeling model, suggesting that it may be involved in the occurrence and development of cardiac remodeling.

Key words Proteolipid protein 2; Cardiac remodeling; Myocardial infarction; Isoproterenol; Aortic banding

心肌重建是临床上高血压、缺血性心脏病、瓣膜病等多种心血管疾病发展为心力衰竭所共有的病理过程^[1]。心肌重建指由一系列复杂的分子机制导致的的心脏形态、结构和功能的改变,包括心脏重量增加、心肌间质细胞增殖、心肌细胞外基质改建、心肌细胞体积变大以及胚胎基因表达增加^[1-3]。据证实,心肌重建一旦发展成为心力衰竭,就难以用目前的治疗手段逆转恶化的心功能^[3,4]。近年来,尽管心肌肥厚的发生机制已取得重要进展,但是临床上尚无十分有效

的防治方法,心力衰竭的发生率和病死率仍居高不下。因此,深入研究心肌肥厚的关键靶分子和调控机制,探寻心肌肥厚和心力衰竭治疗的新策略迫在眉睫。

蛋白脂质蛋白 2 (PLP2) 是一个新发现的内质网膜蛋白,其表达和功能尚不明确^[5]。研究表明,PLP2 位于内质网膜,当细胞受到外界刺激时调节细胞内质网应激信号通路。PLP2 基因缺失可扰乱内质网的平衡,当细胞受到外界刺激时,PLP2 基因缺失的内质网更容易受到损伤诱导细胞凋亡^[6]。在成纤维细胞和神经元细胞中 PLP2 基因缺失增加内质网应激诱导的细胞凋亡。该研究提示 PLP2 可以缓解内质网应激诱导的细胞凋亡^[6]。然而 PLP2 是否在心脏中表达,其是否表达于心肌细胞和成纤维细胞,在心肌重

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81700353)

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、心血管病湖北省重点实验室

通讯作者:唐其柱,教授,博士生导师,电子邮箱:qztang@whu.edu.cn

构过程中 PLP2 是否发挥作用尚未报道。本研究通过检测 PLP2 在不同心肌重构模型中的表达,检测肥大心肌细胞和激活的成纤维细胞中 PLP2 的表达改变,探讨 PLP2 是否参与心肌重构的发展。

材料与方法

1. 实验动物:所有针对动物的操作都遵循武汉大学人民医院动物护理和使用委员会批准。各组手术过程和实验数据分析都采用单盲模式。本实验采用 C57 成年雄性小鼠($n=60$, 年龄为 8~10 周, 购自北京华富康生物科技有限公司)。小鼠的饲养在武汉大学心血管研究所。实验动物购回后, 适应实验环境至少 1 周, 随后被随机分为 4 组: 对照组($n=10$), 心肌梗死模型组($n=20$), ISO 皮下注射组($n=10$), AB 手术组($n=20$)。

2. 心肌梗死模型建立:采用冠状动脉左前降支结扎术建立心肌梗死模型。用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 在胸骨左缘纵行切开皮肤 1.5cm, 暴露心脏, 在左心耳下缘 2~3mm 处用 8-0 的聚丙烯缝线结扎冠状动脉, 假手术组以相同的方法挂线, 但是不结扎。迅速将心脏送回胸腔, 缝合胸壁。

3. ISO 诱导急性心肌损伤模型建立:小鼠给予 5mg/(kg·d) 的 ISO 皮下注射, 持续 14 天。

4. 主动脉缩窄(aortic banding, AB)诱导心肌肥厚模型建立:小鼠给予 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。小鼠经口气管插管仰卧于加热垫上, 使用啮齿动物呼吸机(Somnosuite 模型; Kent 科技有限公司, 美国, CT, 托灵顿)进行辅助呼吸。在小鼠胸部第 2、3 肋间做切口, 暴露主动脉弓分支。采用 26G/27G 注射器针头与血管平行放置结扎(Sham 组只挂线不结扎), 随后快速抽掉针管使血管缩窄, 逐层关闭胸腔。之后在切口周围皮下注射 0.1ml 0.5% 的布比卡因(美国 Sigma-Aldrich 公司)以减轻术后疼痛。

5. 原代大鼠心肌细胞和成纤维细胞的分离培养:取出出生后 1~3 天的大鼠乳鼠剪出心脏后加入到 10ml DMEM-F12;清洗后弃去培养基, 用剪刀将心脏剪成 1~2mm³ 的组织碎块;加入 0.125% 的胰酶消化 10min, 消化 5 次, 弃去第 1 次消化液, 收集后 4 次消化液;40 μ m 过滤网滤去细胞团块。将滤液种于两个 10cm 的培养皿中进行差时贴壁 90min, 成纤维细胞贴壁, 心肌细胞仍悬浮, 吸出含心肌细胞的培养基, 过滤后培养与 6 孔板内, 48h 后采用 PE 刺激 24h 诱导心肌细胞肥大。贴壁的成纤维细胞, 以第 2~3 代的成纤维细胞用于后续实验, 采用 TGF- β 刺激 24h

诱导成纤维细胞活化增殖。

6. RT-PCR:TRIzol(美国 Invitrogen 公司, 15596-026)提取心脏的总 RNA, 反转录试剂盒(瑞士 Roche 公司, 04896866001)将每组 2mg 的总 RNA 反转录为 cDNA。利用 LightCycler 480 SYBR Green 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。每个样品设 3 个复管。并用将其结果与 β -actin 基因的表达进行对比。

7. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析, 所有数据用均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SD$)表示, 两组之间的比较用非配对 t -检验;多组之间的比较用多因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PLP2 在各种模型诱导的心肌重构中表达明显增高:RT-PCR 结果显示:在 MI 术后 2 周, ISO 皮下注射 2 周和 AB 术后 1 周, PLP2 的转录水平均明显增高($P < 0.05$)。在 MI 模型组和 AB 模型组, PLP2 的转录水平明显高于 ISO 模型组($P > 0.05$, 图 1)。PLP2 在不同心肌重构模型中的表达变化与肥厚标志物 ANP, 纤维化标志物 I 型胶原蛋白(collagen I)的表达一致。

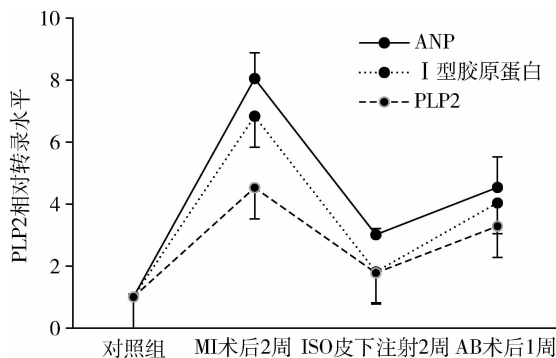


图 1 PLP2 在不同心肌重构模型中的表达

2. PLP2 在压力负荷诱导的心肌重构中表达呈动态改变:RT-PCR 结果显示:在 AB 术后 1 周, PLP2 的转录水平明显高于假手术组;而在 AB 术后 2 周 PLP2 的转录水平达到高峰;AB 术后 4 周和 8 周 PLP2 呈现持续高表达状态($P < 0.05$), 但总体低于 AB 术后 2 周水平($P < 0.05$, 图 2)。

3. PLP2 在心肌细胞肥大模型中的表达改变:RT-PCR 结果显示:在心肌细胞中, PLP2 的转录水平在 PE 刺激 12h 时明显高于对照组($P < 0.05$), PE 刺激 24h 时其转录达到高峰, 在 PE 刺激 48h 时开始下降, 但仍然高于对照组($P < 0.05$, 图 3)。

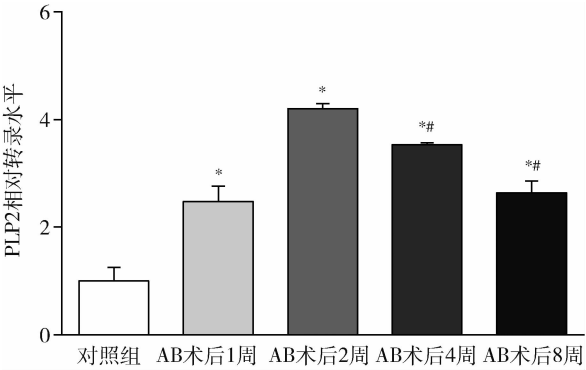


图 2 PLP2 在 AB 术后的动态表达改变
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 AB 术后 2 周比较, # $P < 0.05$

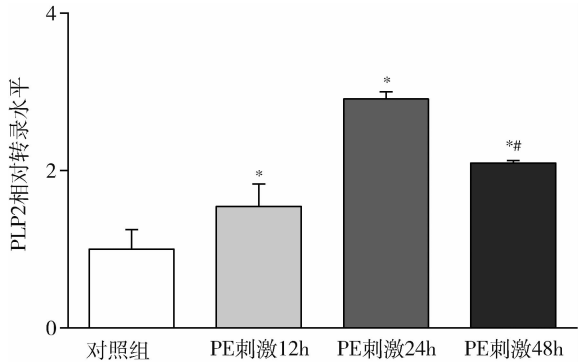


图 3 PLP2 在肥大心肌细胞中的动态表达
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PE 刺激 24h 比较, # $P < 0.05$

4. PLP2 在成纤维细胞活化中的表达改变: RT-PCR 结果显示, 在成纤维细胞中, PLP2 的转录水平在 TGF- β 刺激 12h 时明显低于对照组 ($P < 0.05$), 在 TGF- β 刺激 24~48h 其转录持续降低 ($P < 0.05$, 图 4)。

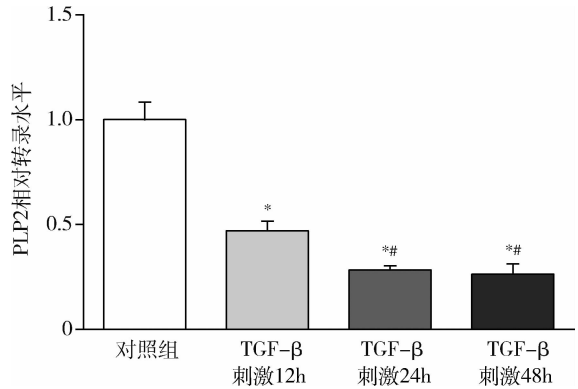


图 4 PLP2 在成纤维细胞中的动态表达
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 刺激 12h 比较, # $P < 0.05$

讨 论

内质网是一种多功能的细胞器, 参与蛋白质合

成、蛋白质折叠、蛋白质转运, 钙平衡和脂类的生物合成。当心脏发生病理性损伤(活性氧的产生, 缺血/再灌注, Ca^{2+} 稳态失衡, 炎性细胞因子)会导致错误折叠的蛋白质在内质网腔的积累, 这种情况称为内质网应激^[7]。在心肌重构代偿早期, 自噬和蛋白酶体降解系统都可以清除损伤的蛋白质。因此, 在此阶段的内质网应激可清楚错误折叠蛋白抑制细胞死亡^[8]。然而当损伤持续的状态下, 未折叠蛋白反应并不能高效地清除错误折叠蛋白, 此时过度激活的内质网应激可通过内源性和外源性途径诱导细胞凋亡^[9]。目前, 内质网应激与多种心血管疾病密切相关, 如心肌病、心脏发育、心肌肥厚、心脏缺血/再灌注损伤以及心力衰竭^[10-12]。

PLP2 是一类内质网膜蛋白, 其在内质网的稳态平衡中发挥重要作用。研究表明 PLP2 通过稳定内质网, 减少内质网应激诱导的细胞凋亡, 保护缺血/再灌注损伤的神经元细胞^[6]。此外, 研究报道 PLP2 还参与肿瘤的代谢和转移^[5, 13]。然而 PLP2 是否在心肌重构和心力衰竭中发挥作用, 尚不清楚。本研究显示, PLP2 在心肌梗死, ISO 注射和主动脉缩窄诱导的心肌重构模型中表达显著增高, 且 PLP2 的表达与心肌重构标志物的表达一致, 在心肌梗死和 AB 术诱导的重构心脏中表达高于 ISO 组, 提示 PLP2 的表达与心肌重构的程度可能存在相关性。PLP2 在 AB 术后的表达同样呈现动态改变, 在术后 1 周表达增高, 术后 2 周达到峰值, 随后出现下降趋势, 提示 PLP2 在心肌重构早期代偿期可能发挥一定保护作用, 而在心肌重构发展成为心力衰竭的过程中表达下降, 保护作用降低, 造成心功能恶化。PLP2 在心肌重构中的具体作用, 尚待探明。本研究进一步发现, PLP2 在心肌细胞和成纤维细胞中均表达, 且 PLP2 在心肌细胞中的表达与动物实验一致, 表现为早期升高, 随后降低的过程; 而 PLP2 在激活的成纤维细胞中的表达却持续下降, 提示 PLP2 在两种细胞中发挥的作用存在不一致。

综上所述, PLP2 在不同模型诱导的心肌重构中均发生表达改变, 且其表达在心肌重构中呈现动态变化, 提示 PLP2 参与心肌重构向心力衰竭的病理发展, 本研究为深入了解心肌重构和心力衰竭的发展机制提供了新的理论基础, 基于 PLP2 的分子靶点可能作为心肌重构和心力衰竭的治疗新方向。

参考文献

1 Schirone L, Forte M, Palmerio S, et al. A review of the molecular

- mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3920195
- 2 Riaz S, Zeidan A, Mraiche F. Myocardial proteases and cardiac remodeling[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3244 – 3250
- 3 Haque ZK. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(6): 983 – 1000
- 4 Spaich S, Backs J. Ongoing controversies surrounding cardiac remodeling: is it black and white – or rather fifty shades of gray? [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 202
- 5 Ding Z, Jian S, Peng X, *et al.* Loss of MiR – 664 Expression Enhances Cutaneous Malignant Melanoma Proliferation by Upregulating PLP2[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(33): e1327
- 6 Zhang L, Wang T, Valle D. Reduced PLP2 expression increases ER – stress – induced neuronal apoptosis and risk for adverse neurological outcomes after hypoxia ischemia injury[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(25): 7221 – 7226
- 7 Badreddin A, Attia H, Hafez M, *et al.* What role does the stress response have in congestive heart failure? [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2863 – 2870
- 8 Zhang C, Liu R, Yu J. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 29
- 9 Wang S, Fang Q, Wang Z, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 175(8): 1293 – 1304
- 10 Yao Y, Lu Q, Hu Z, *et al.* A non – canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress – induced apoptosis and heart failure[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 133
- 11 Zhang N, Wei WY, Yang Z, *et al.* Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Protects Against Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure – Overload via Inhibition of NADPH Oxidases and Endoplasmic Reticulum Stress[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1313 – 1325
- 12 Wang Z, Wang Y, Ye J, *et al.* bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischaemia/reperfusion via activation of PI₃K/Akt/ERK1/2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 595 – 607
- 13 Longo A, Librizzi M, Luparello C. Effect of transfection with PLP2 antisense oligonucleotides on gene expression of cadmium – treated MDA – MB231 breast cancer cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(6): 1893 – 1901

(收稿日期:2017 – 08 – 16)

(修回日期:2017 – 08 – 29)

联合使用聚合酶链式反应和培养法可以提高培养细胞支原体的检出率

卞晓翠 王晓婉 杨振丽 赵晓梅 李 姜 刘玉琴

摘 要 目的 分析国家实验细胞资源共享服务平台及其他实验室细胞支原体污染的情况,探讨聚合酶链式反应(PCR)和培养法在实验细胞支原体检测中的一致性。方法 通过 PCR 法对 245 例细胞培养上清进行了支原体检测,并检测了阳性样品支原体感染的种类;对其中 127 例新鲜上清同时进行了培养法检测,通过 McNemar 检验分析了二者的一致性。对二者检测不一致的细胞进行复检,同时使用生物发光法进行验证。结果 国内培养细胞支原体感染率在 19% ~ 66%;培养法和 PCR 法检测支原体只有假阴性,没有假阳性;延长取样前细胞在无抗生素培养基中的培养时间至 96h,可以提高低效价支原体感染样品的检出率。结论 PCR 法和培养法检测支原体具有较好的一致性,应联合使用两种方法对培养细胞进行定期检测,提高支原体的检出率。在细胞培养过程中使用合格制剂,严格无菌操作,预防为主。

关键词 细胞培养 质量控制 支原体污染 PCR 培养法

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.009

A PCR – based Assay Combined with Microbial Culture for Improving Mycoplasma Detection. *Bian Xiaocui, Wang Xiaowan, Yang Zhenli, et al. Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*

基金项目:国家科技基础条件平台项目(NSTI – CR17)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院病理学系

通讯作者:刘玉琴,电子邮箱:liuyuqin@pumc.edu.cn