

## 血管紧张素 II 对乳大鼠心肌细胞时钟基因表达的影响

黄新艳<sup>1</sup>, 魏立<sup>1</sup>, 李晓林<sup>1</sup>, 朱东亚<sup>2</sup>, 李庆平<sup>1\*</sup>

(南京医科大学 1. 心血管药理学研究室, 2. 药学院药理学教研室, 江苏 南京 210029)

**摘要:** 目的 为研究血管紧张素 II (Ang II) 致左心室肥厚是否与时钟机制有关。方法 分离纯化培养的 7 d 龄乳大鼠心肌细胞, 分别加入 Ang II 和(或)替米沙坦(Tel)处理, 然后提取总 RNA, 用 RT-PCR 检测评价心肌细胞时钟基因 (*Bmal1*, *mPer2*, *Dbp*) 的转录水平。结果 与对照组心肌细胞相比,  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 处理 72 h 使心肌细胞时钟基因转录水平显著上调;  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tel 能拮抗  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 对心肌细胞时钟基因转录上调的作用。结论 在正常培养乳大鼠心肌细胞中, 时钟基因以日周期节律方式振荡表达, Ang II 诱导其表达增强, Tel 从受体水平拮抗 Ang II 的诱导作用。

**关键词:** 血管紧张素 II; 心肌; 生物钟; 时钟基因; 替米沙坦

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)03-0194-05

昼夜生物节律是广泛存在的生命现象, 是由体内的生物钟决定的。中枢生物钟位于下丘脑视交叉上核, 而外周组织甚至体外培养的细胞亦拥有生物钟。生物钟主要的分子基础是时钟基因, 包括 *mPer*, *mCry*, *Clock*, *Bmal1* 和时钟输出基因 *Dbp*, *Hlf*, *Tef*; 时钟基因及其蛋白质产物构成的自主调节的转录和翻译反馈循环, 是生物钟运转的分子基础<sup>[1,2]</sup>。

哺乳动物心血管活动(血压、心率、心输出量、血管张力)表现出明显的日周期节律现象。病理状况

下, 几乎所有的急性心血管事件都表现出明显的日周期节律, 例如急性心肌梗死、室性心律失常、心性猝死、血栓栓塞等事件在清晨时分发生率较高<sup>[3]</sup>。

心血管参数及心血管事件的日周期节律性, 暗示心血管功能和生物钟时钟基因之间可能存在密切联系<sup>[4]</sup>。生物钟的紊乱, 很可能促进心血管疾病的发生和发展; 反之, 心血管疾病也可能造成生物钟时钟基因表达改变, 继而影响其他生理活动。研究时钟机制可能为治疗心血管疾病开辟新的途径。

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是心血管系统的重要调节因子, 促进细胞蛋白质合成增加导致心肌肥厚。为探讨 Ang II 致心肌肥厚的钟控机制, 本实验用 Ang II 诱导培养的乳大鼠心肌细胞肥大, 并分析肥大心肌细胞时钟基因 *mPer2*, *Bmal1* 及 *Dbp* 表达的改变, 为阐明心肌肥厚发生的分子机制及寻找有效的防治措施提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物、试剂与仪器

新生 7 d 清洁级 SD 大鼠购自南京医科大学实验动物中心; 5-溴脱氧尿苷、Ang II、替米沙坦(telmisartan, Tel) 购于美国 Sigma 公司, Trizol 购于美国 Gibco 公司; M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶购于美国 Promega 公司; RNA 酶抑制剂(RNasin) 购于上海华美公司; PCR 引物由上海生工公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。江苏捷达凝胶图像分析仪。

#### 1.2 乳大鼠心肌细胞体外培养

取出生后 7 d 的 SD 乳大鼠, 无菌条件下开胸剪取心尖部分, D-Hanks 液清洗去除残血, 将其剪成  $1 \sim 3 \text{ mm}^3$  组织块,  $0.1\%$  胰蛋白酶  $37^\circ\text{C}$  反复消化直至获得足量的细胞。每次消化 5 min, 弃去第一次消化的上清, 收集以后消化的上清, 转移到含有血清的 DMEM 培养基中以终止胰酶作用。  $300 \times g$  离心 7 min, 弃上清取细胞沉淀加入含  $15\%$  新生牛血清(NBS)的 DMEM 培养基制备成细胞悬液, 在  $37^\circ\text{C}$ ,

收稿日期: 2004-12-20, 接受日期 2005-02-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271506)

作者简介: 黄新艳(1978-), 女, 硕士研究生。E-mail: hxy-78@sohu.com; 李庆平, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为心血管药理学。

\* 联系作者 E-mail: qpli2883@yahoo.com.cn Tel: (025)86862883

5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 90 min, 以差速贴壁法纯化心肌细胞, 以  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$  的细胞密度接种至 25 mL 培养瓶继续培养 72 h 开始实验。培养的前 72 h 加入  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-溴脱氧尿苷。

### 1.3 实验分组

在原代培养 72 h 后, 将细胞分为 3 组: 对照组, 以 DMEM (含 10% NBS) 培养基培养细胞; Ang II 组, DMEM (含 10% NBS) 培养基中加入 Ang II, 终浓度为  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Tel 组, DMEM (含 10% NBS) 培养基中加入 Tel 和 Ang II, 其终浓度均为  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞培养 72 h 以后开始在每日固定时间 (每日下午 6 时整) 换液给药, 并以此时间作为生理节律时间 0 (circadian time 0, CT 0)。CT 0 指每一日周期的起始点, CT 4 指起始后 4 h, 依此类推。通常将换液给药时间点作为起始点。每 24 h 按上述方案连续换液 3 次后, d 7 的 CT 0 时, 换不含血清、Ang II 及 Tel 的 DMEM 培养基, 并开始每隔 4 h 收取细胞提取总 RNA。

### 1.4 心肌细胞肥大鉴定

#### 1.4.1 心肌细胞表面积测定

心肌细胞经 Ang II  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导 72 h 后加换无血清培养液, 24 h 后将贴壁生长的心肌细胞消化脱落, 收集细胞。用激光共聚焦显微镜扫描, LSM 510 软件测定细胞表面积, 每次测 10 个视野, 每视野测 10 个细胞。

#### 1.4.2 心肌细胞蛋白质含量测定

参照南京建成生物工程公司考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒说明测定心肌细胞蛋白质含量, 蛋白含量 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) =  $(A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} / \text{标准管浓度} / \text{稀释倍数}$ 。根据细胞计数结果, 将蛋白含量单位 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 换算为蛋白含量单位 ( $\text{g} / 10^9 \text{ cells}$ )。

### 1.5 心肌细胞时钟基因表达检测

应用 RT-PCR 法对心肌细胞 *mPer2*, *Bmal1*, *Dbp* mRNA 进行半定量。在 7 个时间点 (CT 0, CT 4, CT 8, CT 12, CT 16, CT 20, CT 24) 按 Trizol 说明书步骤提取每瓶心肌细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计测  $A_{260}$  和  $A_{280}$ , 确定 RNA 的浓度和纯度, 重复测定 3 次, 计算样品总 RNA 浓度,  $A_{260} : A_{280}$  比值为 1.8 ~ 2.0。

逆转录: 以 Oligo (dt) 为随机引物,  $10 \mu\text{L}$  RNA +  $0.15 \mu\text{g}$  Oligo (dt) 在  $0.2 \text{ mL}$  PCR 管内混匀,  $70^\circ\text{C}$  孵育 5 min, 打开 RNA 二级结构, 立即冰水浴。然后加入  $5 \times \text{M-MLV}$  缓冲液  $6 \mu\text{L}$ , 无核酸酶水  $6.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP  $2 \mu\text{L}$ ,  $40 \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  RNasin  $0.5 \mu\text{L}$ ,  $0.2 \text{ mU} \cdot$

$\text{L}^{-1}$  M-MLV  $2 \mu\text{L}$ , 反应条件为  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h,  $95^\circ\text{C}$  孵育 10 min,  $4^\circ\text{C}$  保温,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

PCR 反应: 以上述 cDNA 产物为模板进行 PCR。*mPer2* 其扩增引物: 上游 5' GCA GCC TTT CGA TTA TTC TTC 3'; 下游 3' G AAG TAG TTG GGC ACC TCG 5'; 片段长度 95 bp。*Bmal1* 扩增引物: 上游 5' AGG ATG TGA CCG AGG GAA GA 3'; 下游 3' GAA GCG GAG GTG GAC AAG T 5'; 片段长度 325 bp。*Dbp* 其扩增引物: 上游 5' TGG CAC TTC AGG AGA ACA AA 3'; 下游 3' AGG GAC AGT ACG GAT GGA A 5'; 片段长度 352 bp。退火温度分别为  $57^\circ\text{C}$ ,  $57^\circ\text{C}$ ,  $58^\circ\text{C}$ 。总循环数为 30 次。内参照为  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin)。PCR 详细反应条件见文献<sup>[5]</sup>。

1.5% 琼脂糖凝胶电泳: 取 RT-PCR 产物  $5 \mu\text{L}$  加  $1 \mu\text{L}$  上样缓冲液, 在含  $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,  $100 \text{ V}$ , 20 min, 用凝胶成像系统拍摄打印实验结果, 条带用计算机图像分析系统扫描定量。所有实验均重复 3 次。

### 1.6 统计学方法

每一基因的 mRNA 半定量分析, 每个时间点 3 个样品, 扩增后的条带灰度校正后以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验。

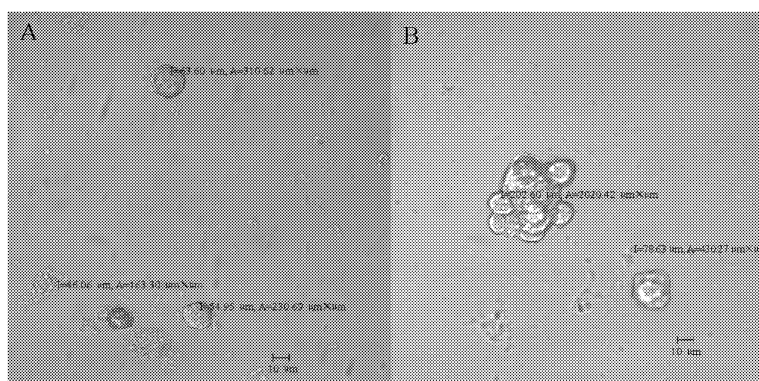
## 2 结果

### 2.1 建立肥大心肌细胞

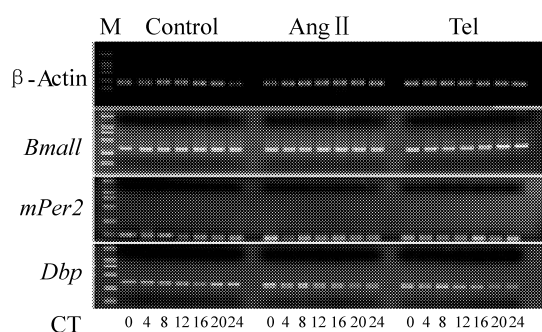
心肌细胞生长 72 h 长成单层, 同步搏动。经 72 h Ang II  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导, 组间心肌细胞数量无明显差异, 说明 Ang II 不引起细胞增殖, 而心肌细胞表面积对照组为  $(220 \pm 30) \mu\text{m}^2$ , Ang II 组为  $(370 \pm 70) \mu\text{m}^2$ , 表明 Ang II 具有诱导心肌细胞体积肥大的作用 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), 细胞肥厚模型建立 (图 1)。与对照组细胞总蛋白含量 [ $(1.83 \pm 0.26) \text{ g} / 10^9 \text{ cells}$ ] 相比, Ang II 组细胞总蛋白含量 [ $(2.8 \pm 0.3) \text{ g} / 10^9 \text{ cells}$ ] 明显增高, 进一步表明细胞肥厚模型建立成功。

### 2.2 Ang II 对培养大鼠心肌细胞时钟基因表达的影响

将对照组、Ang II 组和 Tel 组各时间点 (CT 0, CT 4, CT 8, CT 12, CT 16, CT 20, CT 24) 提取的时钟基因 RT-PCR 扩增产物电泳, 可见各时间点的待测时钟基因 mRNA 均有表达 (图 2)。将其与同时间点  $\beta$ -肌动蛋白扩增产物带的灰度进行比值分析, 发现正常心肌细胞时钟基因表达呈现明显的 24 h 日周



**Fig 1. Cell surface of cultured neonatal rat cardiomyocytes.** (A) Control neonatal rat cardiomyocytes. (B) Rat cardiomyocytes treated with  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  angiotensin II (Ang II) for 72 h.



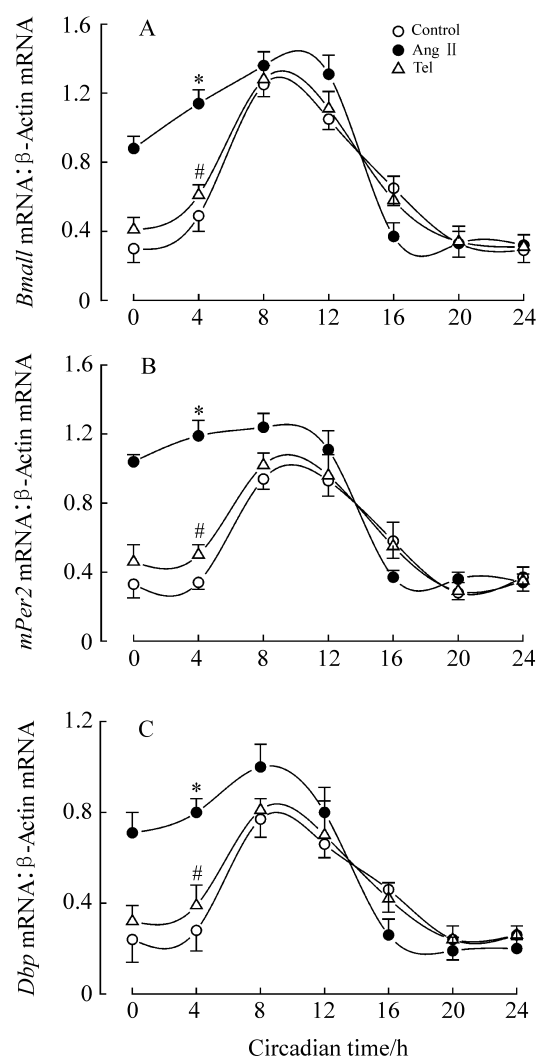
**Fig 2. Electrophoresis of RT-PCR products on 1.5% agarose.** See Fig 1 for treatment of control group and Ang II group. The cells of telmisartan(Tel) group were treated with  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tel for 72 h accompanying with Ang II. CT 0 represents the commencement of circadian time – usually the time of refreshing the culture medium. CT 4 represents the moment of 4 h after CT 0. The others are analogous.

期节律性,而 CT 8, CT 12 时间点时钟基因的表达值达到高峰,在 CT 0 和 CT 24 时间点为谷值;与对照组相比,Ang II 组时钟基因表达有增高趋势,在 CT 0, CT 4, CT 8 及 CT 12 时间点的表达水平显著高于对照组,在 CT 16, CT 20 及 CT 24 时间点表达水平却衰减下降。Tel 组时钟基因的表达水平较 Ang II 组急剧下降(图 3)。

### 3 讨论

在本实验中,作者证实存在心肌细胞中分子时钟振荡,血管紧张素 II 可以诱导心肌细胞中时钟基因的节律性表达。

本研究在培养乳大鼠心肌细胞中检测出时钟基



**Fig 3. Relative gene expression of clock genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes determined by RT-PCR analysis.**  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , compared with control; #  $P < 0.05$ , compared with Ang II.

因的表达,并以看家基因  $\beta$ -肌动蛋白作内标进行相对定量,发现时钟基因在正常培养的乳大鼠心肌细胞中其表达呈日周期节律性(图 3),这与文献报道认为体外培养的细胞也拥有生物钟相一致<sup>[1]</sup>。

Ang II 刺激组的乳大鼠心肌细胞时钟基因与对照组正常培养心肌细胞时钟基因表达有所不同。为排除假阳性可能,本实验中 Ang II 刺激组和对照组采用同一批培养的乳大鼠心肌细胞,所有可能影响到时钟基因表达的培养条件均保证一致(同一批 DMEM 培养液、同浓度血清),保证心肌细胞活力状态一致,使 Ang II 刺激组和对照组的实验结果可靠并具有可比性。在 Ang II 刺激下,时钟基因的表达先明显升高继而显著下降接近正常水平,这暗示 Ang II 对乳大鼠心肌细胞的刺激作用,Ang II 可诱导核内时钟基因表达增强,但消除培养液中的 Ang II 后其诱导作用亦逐渐减弱消失直至正常表达水平。

在 Nonaka 等<sup>[6]</sup>的实验中,采用 Ang II 瞬时(2 h)刺激培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞,时钟基因表达启动初期,其表达量存在一个瞬时的高峰,其后时钟基因表达降低但呈节律性表达持续了至少 3 个日周期。本实验与 Nonaka 等实验均认为,Ang II 可诱导增强时钟基因的表达,但表达振幅和相位不完全相同。其影响因素可能有三:①Ang II 作用的对象不同,本实验作用对象是出生 7 d 的乳大鼠心肌细胞,而不是大鼠的血管平滑肌细胞(文献未报道大鼠为成年鼠或是新生鼠),细胞类型不同而且新生鼠和成年鼠细胞的生长特点完全不同;②Ang II 刺激持续的时间不同,本实验刺激持续 72 h,而不是 2 h;③虽然文献<sup>[7]</sup>报道明暗周期对培养大鼠 1 型成纤维细胞时钟基因的日周期表达没有影响,因此培养细胞操作均在人工照明条件下完成,但是给药刺激的时间点及取材时间点均设定在 CT 0,可能对节律性表达的相位有影响,本实验认为这一点可能也是导致两实验时钟基因表达周期相位不一致的原因。

在 Young 等<sup>[8]</sup>实验中,在整体心肌肥厚的大鼠模型中,时钟基因(*Dbp*)的表达有所改变,暗示时钟基因的表达与心肌肥厚有相关关系。本实验 Ang II 持续 3 d 作用于心肌细胞,使乳大鼠心肌细胞蛋白合成以及细胞表面积的增加,成功诱导心肌肥厚模型。然而在肥大的心肌细胞中,时钟基因的表达随着 Ang II 的消失逐渐减低。这似乎暗示在心肌细胞肥大与时钟基因表达量的改变两者之间没有密切关系。两实验结果的差别可能原因有二:①新生期与

成年期心肌细胞的生长性质明显不同;②本实验 Ang II 刺激时间较短,基于以上两点原因所建立的体外心肌细胞肥大模型,与体内心肌肥大模型不完全一致。鉴于整体实验的优越性,有必要在动物整体水平研究 Ang II 对心肌肥厚及时钟基因表达的调控作用。利用 Ang II 渗透微泵技术制作的心肌肥厚模型和大鼠主动脉缩窄致心肌肥厚模型有助于解决这一问题。总之,体外实验的结果仍然需要整体实验来证实。

本实验结果表明, Tel 拮抗了 Ang II 诱导的时钟基因表达增加,这说明 Ang II 对乳大鼠心肌细胞的刺激作用是通过 ATI 受体实现的。正常培养的乳大鼠心肌细胞的 *mPer2*, *Bmal1* 和 *Dbp* 的 mRNA 表达水平呈日周期节律性振荡。Ang II 诱导培养乳大鼠心肌细胞表达 *mPer2*, *Bmal1*, *Dbp* mRNA 增强。Tel 从受体水平拮抗 Ang II 的诱导作用。

#### 4 参考文献:

- [1] Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals[J]. *Cell Tissue Res*, 2002, **309**(1):47-56. Epub 2002 Jun 11.
- [2] Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues[J]. *Cell Tissue Res*, 2002, **309**(1):193-199. Epub 2002 May 18.
- [3] Guo YF, Stein PK. Circadian rhythm in the cardiovascular system: chronocardiology[J]. *Am Heart J*, 2003, **145**(5):779-786.
- [4] Young ME. Circadian rhythms in cardiac gene expression[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2003, **5**(6):445-453.
- [5] Wei L, Li XL, Huang XY, Li QP. Establishment of RT-PCR for detecting clock genes in cultured rattus cardiac myocytes[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2004, **9**(6):633-636.
- [6] Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Rohman MS, Raharjo SB, et al. Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2001, **104**(15):1746-1748.
- [7] Naito Y, Tsujino T, Kawasaki D, Okumura T, Morimoto S, Masai M, et al. Circadian gene expression of clock genes and plasminogen activator inhibitor-1 in heart and aorta of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats[J]. *J Hypertens*, 2003, **21**(6):1107-1115.
- [8] Young ME, Razeghi P, Taegtmeier H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2001, **88**(11):1142-1150.

## Effect of angiotensin II on clock gene expression in cultured cardiomyocytes of neonatal rat

HUANG Xin-Yan<sup>1</sup>, WEI Li<sup>1</sup>, LI Xiao-Lin<sup>1</sup>, ZHU Dong-Ya<sup>2</sup>, LI Qing-Ping<sup>1\*</sup>

(1. Department of Cardiovascular Pharmacology, 2. Department of Pharmacology of Pharmacy Institute, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate whether angiotensin II (Ang II) induced left ventricle hypertrophy is related to clock genes expression. **METHODS** We cultured cardiomyocytes of neonatal rat, which were treated by angiotensin II and/or telmisartan (Tel), and extracted RNA by Trizol at the special circadian time points. The expression of clock genes (*mPer2*, *Bmal1*, *Dbp*) was detected by RT-PCR. **RESULTS** The transcription level of clock genes in cardiomyocytes, which were treated with  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II for 72 h, was up-regulated. The effect of Ang II on cardiomyocytes could be blocked by  $0.1 \mu\text{mol} \cdot$

$\text{L}^{-1}$  Tel. **CONCLUSION** In the cardiomyocytes, clock genes are expressed with circadian rhythm. Ang II induces the expression of clock genes in cultured cardiomyocytes. Tel can block the effect of Ang II at the level of receptor.

**Key words:** angiotensin II; myocardium; biological clocks; clock gene; telmisartan

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30271506)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

## 2005 年国家食品药品监督管理局信息中心中国药学文摘编辑部图书征订启事

《中国非处方药用药指南》该书是反映我国非处方药基本情况,指导合理用药、方便药品购销的工具书。系统地介绍了国家食品药品监督管理局公布的国家非处方药的名称(包括通用名称和商品名称)、药物组成、适应证、性状、作用类别、药理作用、用法用量、禁忌证、注意事项、不良反应、药物相互作用、贮藏条件、规格、有效期、包装、生产企业等基本情况。分西药和中药两部分,其中西药部分有 25 类 598 个品种,中药部分有 58 类 1902 个品种,共计 2500 个品种。为方便使用,特设药品名称索引和生产单位名称索引等多种查阅方式。该书为精装国标大十六开版本。2004 年 3 月出版,360 元/册。

《全国医药系统电话簿》是全国医药系统通讯类工具书。收录范围为:● 全国县级以上药品监督管理部门;● 全国县级以上药品检验单位;● 各医药科研、教育、信息机构;● 各大药品、生物生化制品、制药中间体、药用辅料及卫生材料生产厂家;● 医疗器械、制药机械、药品包装厂家;● 县级以上医药公司及连锁机构、药房、药品批发市场、大型药店;● 国外医药机构驻华办事机构;● 县级以上医院及部队团级以上医院药、械供应等。内容包括:单位名称、邮编、地址、联系电话、传真、网址、经营范围及主要产品等信息。该号簿 2003 版,2003 年 8 出版,提供信息 4 万多条,大 16 开,1200 页,每册 186 元。该号簿 2005 版,预计 2005 年 2 月出版,大 16 开,收录内容比 2003 版有所增加,每册 286 元。

订阅者可直接与国家食品药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部联系。

编辑部:北京市海淀区文慧园南路甲 2 号(邮编:100088)

电话:(010)62214715, 62214665, 68313344-3803

传真:(010)68313344-3803, 62214866

联系人:郭媛媛 刘琪