

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.011

LOX-1 过表达诱发 H9C2 心肌细胞肥大*

刘 彬 张竞之 刘少军 邱怀娜 郭景新 刘慰华[△]

(广州医科大学附属第二医院 广州心血管疾病研究所 广东 广州 510260)

摘要 目的:构建携带过表达大鼠凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)基因的慢病毒载体,研究 LOX-1 与心肌细胞肥大的关系。**方法:**构建大鼠 LOX-1 基因 pHIV-LOX-1 过表达质粒,与包装质粒 psPAX2、pMD2G 共转染 293T 细胞,检测其感染效率。包装慢病毒并感染 H9C2 心肌细胞,72 h 后观察其感染效率。qPCR 法检测细胞 LOX-1 表达。检测过表达 LOX-1 后心肌细胞面积及其蛋白含量变化。**结果:**成功构建过表达 LOX-1 H9C2 心肌细胞。过表达 LOX-1 组(Lv.LOX-1+)心肌细胞面积($16691.890 \pm 1022.368 \mu\text{m}^2$)较对照组(Lv.NC)($3459.865 \pm 343.175 \mu\text{m}^2$)显著增加($P < 0.001$)。Lv.LOX-1+ 组心肌细胞蛋白含量($132.457 \pm 8.188 \text{ pg/cell}$)较 Lv.NC 组($45.095 \pm 1.655 \text{ pg/cell}$)显著增加($P < 0.001$)。**结论:**LOX-1 过表达能诱导 H9C2 心肌细胞肥大。

关键词:凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1;心肌细胞肥大;慢病毒载体

中图分类号:R541;R541.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5644-04

Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1 Overexpression Induced H9C2 Cardiomyocyte Hypertrophy*

LIU Bin, ZHANG Jing-zhi, LIU Shao-jun, QIU Huai-na, GUO Jing-xin, LIU Wei-hua[△]

(Guangzhou Institute of Cardiovascular Disease, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510260, China)

ABSTRACT Objective: To construct the lentiviral overexpression vector of Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) and investigate its correlation with cardiomyocyte hypertrophy in H9C2 Cells. **Methods:** The lentiviral vector was constructed by inserting the lentiviral vectors with the LOX-1 gene fragment. The recombination lentiviral particles were produced by the packaging 293T cell. The culture supernatant was harvested and the titration of them was calculated by the limiting dilution. H9C2 cells were infected with recombinant lentivirus overexpressing LOX-1 for 72 hours, then transduction efficiency was investigated and LOX-1 mRNA level in cells was examined by the qPCR. The cell size was measured by immunofluorescence. The cell protein content was examined by BCA kit. **Results:** Overexpressing LOX-1 H9C2 cardiomyocytes were constructed successfully. The cell size of LOX-1 overexpression group (Lv.LOX-1+)($16691.890 \pm 1022.368 \mu\text{m}^2$) was remarkably increased compared with control group (Lv.NC)($3459.865 \pm 343.175 \mu\text{m}^2$) ($P < 0.001$). The protein content was enhanced after LOX-1 overexpression ($132.457 \pm 8.188 \text{ pg/cell}$) compared with control group ($45.095 \pm 1.655 \text{ pg/cell}$)($P < 0.001$). **Conclusion:** LOX-1 overexpression can induce cardiomyocytes hypertrophy in H9C2 cells.

Key words: Lectin-like oxidized LDL receptor-1; Cardiomyocyte hypertrophy; Lentiviral vector

Chinese Library Classification: R541; R541.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5644-04

前言

心脏在受到损伤或者压力超负荷下会发生心室重构。心室重构时机体的分子信号网络被激活,胚胎基因及其蛋白再表达,主要表现为心肌细胞肥大、心肌细胞凋亡、成纤维细胞增殖以及胶原沉积等。心室重构进一步发展可导致心衰、猝死,是发生心源性死亡的重要危险因素之一^[1]。凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1(Lectin-like oxidized LDL receptor-1, LOX-1)作为内皮氧化低密度脂蛋白特异性受体被发现,属于 C 类型血凝素

家族^[2]。LOX-1 在内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞、血小板、心肌细胞等多种细胞中均有表达^[3-6]。LOX-1 4 个结构域中的凝集素样域是 LOX-1 保证自身结合活性所必需的^[7]。神经内分泌因子的激活是心肌梗死、高血压等疾病发生心肌肥大进展至心衰的重要机制^[8]。目前研究表明多种诱导心肌细胞肥大的神经内分泌因子如血管紧张素 II、内皮素、转化生长因子- β 等均与 LOX-1 激活关系密切^[9-12]。本研究将采用慢病毒表达载体 pHIV-H2BmRFP 感染 H9C2 心肌细胞,通过检测过表达 LOX-1 的心肌细胞的面积及其蛋白含量变化,对 LOX-1 在心肌细胞

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81302892);广东省自然科学基金项目(S2013040016226);

中国博士后基金(2013M530363);广州医学院博士、留学归国人员基金项目(2012C50)

作者简介:刘彬(1982-),男,博士,博士后,主要研究方向:中西医结合心血管病学研究,

电话:020-34153256, E-mail: xmhoolv@163.com

[△] 通讯作者:刘慰华, E-mail: liuweihua.96@163.com

(收稿日期:2014-04-10 接受日期:2014-05-05)

肥大过程中的作用进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

H9C2 细胞、293T 细胞、慢病毒表质粒 pHIV-H2BmRFP、psPAX2、pMD2G 质粒均由本实验室提供。限制性内切酶 *Xba*I、*Sam*I、T4 DNA 连接酶、qPCR 检测试剂盒购自大连宝生物公司;DH5 α 感受态细胞、质粒小提试剂盒、DNA 片段回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;RNA 提取试剂盒、质粒大提试剂盒购自 Axygen 公司;Gibco 胎牛血清、DMEM、Lipofectamine2000、Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司;2 $\times$ PFU PCR Mix 购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体构建 根据大鼠 LOX-1 mRNA 序列 (NM_133306.1) 设计引物,上游引物前插入 *Xba*I 酶切位点,下游引物前插入 GGG 形成 *Sam*I 酶切位点的平端。引物序列如下:上游引物:5'-GCT CTA GA A TGG CTT TTG ATG ACA A-GA TGA AGC -3', 下游引物:5'-GGG TCA CTG AGT TAG CAA TAA ATT TGC C -3'。以大鼠心肌细胞 cDNA 为模板扩增获得基因片段,PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 扩增 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。10 μ g pHIV-H2BmRFP 或 pHIV-LOX-1、psPAX2、pMD2G 按照 5:2:3 的比例共转染 293T 细胞。按 MOI=50 TU/Cell 将过表达 LOX-1 慢病毒或对照病毒侵染 H9C2 细胞,8 h 后换液,72 h 后观察感染效率。

1.2.2 qPCR 法检测 H9C2 细胞中 LOX-1 表达 按照试剂盒说明书抽提细胞总 RNA,分别进行反转录和实时荧光定量 PCR 反应。qPCR 引物分别为:LOX-1 上游:5'-GAA GCC TAA AGG GCT GCA TTT GCT -3';LOX-1 下游:5'-AGT TAA AGG GCC CAT GGA AGA GGT -3';GAPDH 上游:5'-ACT CCC ATT CTT CCA CCT TTG -3';GAPDH 下游:5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAT ATT -3'。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,共 40 个循环。每个实验重复 3 次取平均值。

1.2.3 免疫荧光检测 细胞室温下 4%多聚甲醛固定 15 min,TBST 洗 3 次,5 min/次。封闭液封闭 60 min,兔抗 Actin 抗体溶于 1% BSA-PBS 中(1:500),室温孵育 2 h,羊抗兔 IgG-FITC 加入(1:300),室温孵育 1 h 以特异性识别 Actin 抗体,TBST 洗涤 3 次,5 min/次,加入 0.5 μ g/ml DAPI 染液室温孵育 10 min,TBST 洗涤 3 次,5 min/次,荧光显微镜下观察拍照,细胞大小应用 Image-Pro Plus 6.0 分析。

1.2.4 蛋白含量测定 0.25%胰酶消化细胞,Millipore 细胞计数仪计数后,2000 rpm 离心细胞,弃上清,加入 200 μ L RIPA 裂解液,冰上裂解 5 min,12000 rpm 低温离心 10 min,弃沉淀。蛋白定量参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行。单位细胞蛋白含量 = 总蛋白含量 / 细胞数。

1.2.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计量数据以均值 $\pm$ 标准差表示,结果比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 LOX-1 慢病毒载体的构建及病毒包装

采用 *Xba*I、*Sam*I 双酶切 pHIV-LOX1 及 pHIV 空载体,阳性克隆质粒经过双酶切后进行凝胶电泳,形成一条 1100 bp 左右的 DNA 条带,阴性克隆在相同位置无条带。经测序确定插入序列正确(图 1B)。由于 pHIV-H2BmRFP 质粒带红色荧光标记(质粒图谱见图 1A),慢病毒载体转染 293T 细胞侵染 24 h 后,荧光显微镜下可观察到 H9C2 细胞发出红色荧光(图 1D),表明转染慢病毒质粒载体成功。采用孔稀释法测定慢病毒滴度,过表达 LOX-1 慢病毒(LV.LOX-1)及对照慢病毒(LV.NC)滴度分别为 5×10^6 TU/mL 和 2×10^7 TU/mL。LV.LOX-1 侵染 72 h 后感染效率约为 95%。感染 H9C2 细胞 72 h 后 LOX-1 mRNA 水平较阴性慢病毒感染组显著升高($P < 0.01$) (图 1C,E)。

2.2 过表达 LOX-1 对 H9C2 心肌细胞面积的影响

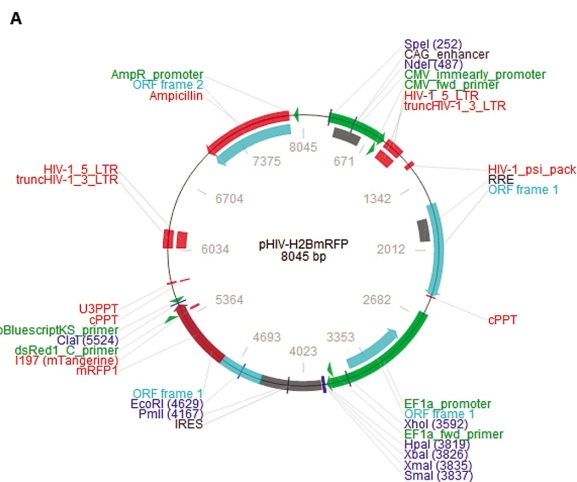
采用免疫荧光法检测心肌细胞面积。如图 2、表 1 所示,与转染对照病毒的 H9C2 细胞相比较,过表达 LOX-1 后 H9C2 心肌细胞的面积显著增加($P < 0.001$)。

2.3 过表达 LOX-1 对心肌细胞蛋白含量的影响

心肌细胞肥大时单位细胞蛋白含量增加。如表 2 所示,过表达 LOX-1 后 H9C2 心肌细胞的蛋白含量显著增加,与转染对照病毒的 H9C2 细胞比较具有统计学差异($P < 0.001$)。

3 讨论

早期心肌细胞肥大是心脏压力负荷持续增加时的主要代偿机制之一,代偿后伴随的心肌病理性重构可导致心力衰竭,研究心肌细胞肥大内在机制对于防治心室重构和心衰具有重要意义^[14]。本研究采用慢病毒载体过表达 LOX-1 基因,观察 LOX-1 在心肌细胞肥大中的作用。心肌面积增大以及单位细胞蛋白含量增多是心肌细胞肥大的主要特征,我们的结果显示:过表达 LOX-1 后 H9C2 心肌细胞的面积增大,单位细胞蛋白含量增多,提示过表达 LOX-1 能诱导心肌细胞肥大。既往研究发现血管紧张素可诱导 LOX-1 的表达,血管紧张素转化酶抑制剂以及 AT1 受体阻滞剂均可下调 LOX-1 的表达^[15]。还有研究发现 LOX-1 基因敲除大鼠在持续给予血管紧张素 II 刺激后发生心肌肥厚程度较野生型大鼠减轻,其机制可能与敲除 LOX-1 后抑制血管紧张素 II 诱导 NADPH 氧化酶活化、ROS 生成以及 p38 和 ERK1/2 信号通路激活有关^[16,17]。上述 LOX-1 的这些病理学作用被认为与其独特的凝集素样结构域有关。



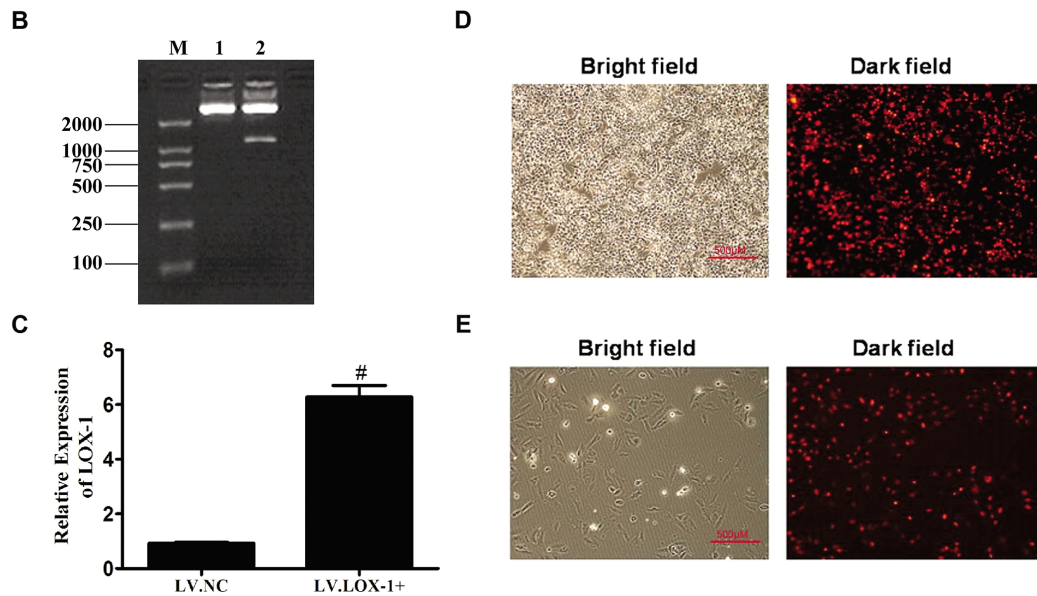


图 1 过表达 LOX-1 慢病毒载体的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of overexpression of LOX-1 lentiviral vector

A: pHIV-H2BmRFP 质粒图谱; B: pHIV-LOX1 慢病毒质粒酶切鉴定结果 (M: Marker; Lane 1: pHIV-H2BmRFP; Lane 2: pHIV-LOX1); C: qPCR 检测 H9C2 细胞中 LOX-1 mRNA 表达; D: 慢病毒质粒及包装质粒共转染 293T 细胞 24 h 后结果; E: 慢病毒感染 H9C2 细胞 72 h 后结果 (# 与 LV.NC 组比较 $P < 0.01$)

A: Plasmid map of pHIV-H2BmRFP; B: Agarose electrophoresis of the digestion of pHIV-LOX-1; C: LOX-1 mRNA level detected by qPCR in the H9C2 cells; D: Fluorescence microscopic images of 293T cells infected with pHIV-LOX-1 lentivirus at 24 h post transfection; E: Fluorescence microscopic images of H9C2 cells infected with pHIV-LOX-1 lentivirus at 72 h post infection (# Compared with LV.NC group $P < 0.01$)

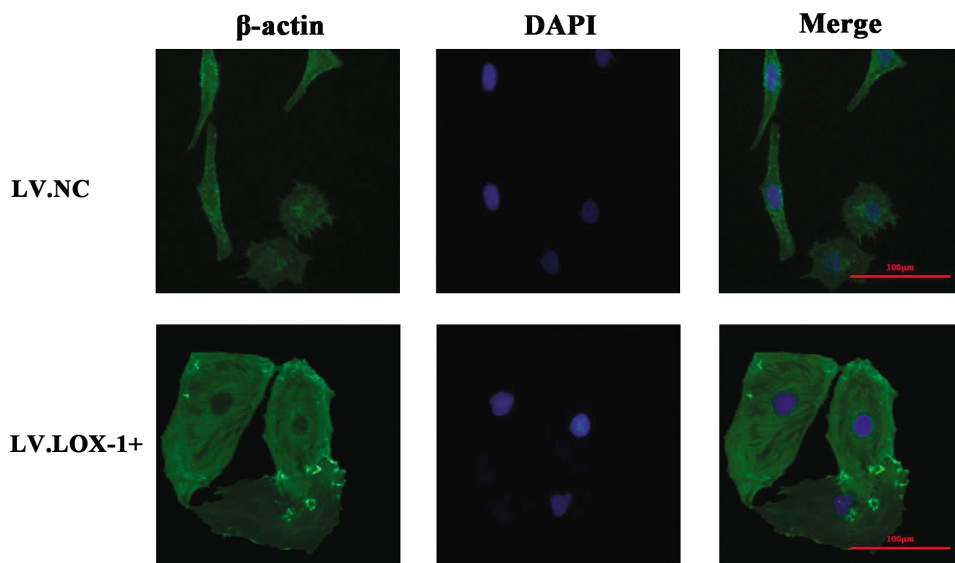


图 2 过表达 LOX-1 增加心肌细胞面积

Fig. 2 Overexpression of LOX-1 increased cardiomyocytes size

LOX-1 的凝集素样结合域能识别血管紧张素 II、转化生长因子-β、内皮素等多种神经内分泌因子进而诱导心肌细胞肥大^[10-12]。以往研究中多采用促肥大的细胞因子来诱导肥大,再抑制 LOX-1 的表达观察 LOX-1 在心肌细胞肥大中的作用。不同以往研究,本研究采用慢病毒技术直接过表达 LOX-1 观察 LOX-1 的促心肌肥大作用,为心肌细胞肥大机制的研究提供了另一可行可靠的细胞模型和实验手段。

慢病毒载体是进行基因表达的常用工具^[18],本课题组已经以慢病毒载体为媒介对多个基因在心肌细胞中的作用进行了研究^[13, 19, 20]。本研究采用慢病毒技术在心肌细胞中过表达 LOX-1,经测序鉴定,我们已成功构建了 pHIV-LOX-1 过表达质粒,并包装出具有过表达 LOX-1 作用的慢病毒。慢病毒感染大鼠 H9C2 心肌细胞 72 h 后显示较强红色荧光,感染效率约为 95%,LOX-1 mRNA 表达水平显著提高,符合实验要求。

表 1 心肌细胞面积检测结果($\bar{X} \pm SD$)Table 1 The results of cardiomyocytes size analysis($\bar{X} \pm SD$)

Group	Cell size(μm^2)
LV.NC	3459.865 $\pm$ 343.175
LV.LOX+	16691.890 $\pm$ 1022.368
t	-24.539
P	0.000

表 2 心肌细胞蛋白含量检测结果

Table 2 The results of myocardial cell protein content analysis

Group	Protein (pg/cell)
LV.NC	45.095 $\pm$ 1.655
LV.LOX+	132.457 $\pm$ 8.188
t	-20.915
P	0.000

简言之, 我们研究发现 LOX-1 过表达能诱导心肌细胞肥大, 表明 LOX-1 在心肌细胞肥大过程中发挥重要作用, 其具体机制值得进一步深入探讨。

参考文献(References)

- [1] 李文, 张鸿举, 丁少娟, 等. 急性心肌梗死患者早期血浆脑钠肽水平与左室重构及预后关系的评估 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(14): 2747-2749
Li Wen, Zhang Hong-ju, Ding Shao-juan, et al. Assessment of Relationship of Early Plasma Brain Natriuretic Peptide and Left Ventricular Remodeling and Prognosis in Patients with Acute Myocardial Infarction [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(14): 2747-2749
- [2] 刘彬, 黄佳城, 周迎春, 等. 慢病毒介导 LOX-1 基因 RNA 干扰抑制氧化应激诱导心肌细胞凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(02): 165-168
Liu Bin, Huang Jia-cheng, Zhou Ying-chun, et al. Lentivirus-mediated LOX-1 RNA interference attenuates oxidative stress-induced apoptosis in myocardial cells [J]. Journal of Southern Medical University, 2012, 32(02): 165-168
- [3] Xu S, Ogura S, Chen J, et al. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(16): 2859-2872
- [4] Wang X, Khaidakov M, Ding Z, et al. Cross-talk between inflammation and angiotensin II: studies based on direct transfection of cardiomyocytes with AT1R and AT2R cDNA [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(12): 1394-1401
- [5] Sakurai K, Cominacini L, Garbin U, et al. Induction of endothelin-1 production in endothelial cells via co-operative action between CD40 and lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 44(Suppl 1): S173-S180
- [6] Hu C, Dandapat A, Sun L, et al. Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2008, 283(16): 10226-10231
- [7] Birks E J. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure [J]. Circ Res, 2013, 113(6): 777-791
- [8] Mitra S, Goyal T, Mehta J L. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2011, 25(5): 419-429
- [9] Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy [J]. Am J Med Sci, 2011, 342(2): 135-142
- [10] Sawamura T, Kakino A, Fujita Y. LOX-1: a multiligand receptor at the crossroads of response to danger signals [J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(5): 439-445
- [11] Dai Y, Su W, Ding Z, et al. Regulation of MSR-1 and CD36 in macrophages by LOX-1 mediated through PPAR-gamma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 431(3): 496-500
- [12] Zhang Z, Zhang M, Li Y, et al. Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway [J]. Cell Signal, 2013, 25(1): 332-340
- [13] Zhu X, Li Z, Li C, et al. Ginkgo biloba extract and aspirin synergistically attenuate activated platelet-induced ROS production and LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells [J]. Phytomedicine, 2013, 20(2): 114-119
- [14] Dobrek L, Thor P. Neuroendocrine activation as a target of modern chronic heart failure pharmacotherapy [J]. Acta Pol Pharm, 2011, 68(3): 307-316
- [15] Nagase M, Hirose S, Sawamura T, et al. Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 237(3): 496-498
- [16] Kang B Y, Hu C, Prayaga S, et al. LOX-1 dependent overexpression of immunoglobulins in cardiomyocytes in response to angiotensin II [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(2): 395-399
- [17] Chen J, Liu Y, Liu H, et al. Molecular dissection of angiotensin II-activated human LOX-1 promoter [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1163-1168
- [18] 王艳丽, 张旭, 戴娟, 等. 慢病毒介导绿色荧光蛋白基因转染大鼠软骨细胞表达研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(10): 1840-1843
Wang Yan-li, Zhang Xu, Dai Juan, et al. Expression of Green Fluorescence Protein reporter Gene in Rat Chondrocytes Mediated by Lentiviral Vector [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(10): 1840-1843
- [19] 李杏, 刘彬, 周迎春, 等. 过表达 HSP20 的慢病毒载体对 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52(15): 1-4
Li Xing, Liu Bin, Zhou Ying-chun, et al. Effect of the lentiviral vector overexpressing HSP20 on the myocardial apoptosis induced by H₂O₂ [J]. Shandong Medical Journal, 2012, 52(15): 1-4
- [20] 臧书文, 刘彬, 周迎春, 等. 过表达 ODC 抑制氧化应激诱导大鼠心肌细胞凋亡的研究 [J]. 热带医学杂志, 2012, 12(5): 510-513
Zang Shu-wen, Liu Bin, Zhou Ying-chun, et al. Effect of the lentiviral vector overexpressing HSP20 on the myocardial apoptosis induced by H₂O₂ [J]. Journal of Tropical Medicine, 2012, 12(5): 510-513