

# EDU 免疫荧光法检测整合素连接激酶(ILK)高表达对新生大鼠心肌细胞 DNA 合成的影响\*

王丙剑<sup>1</sup> 白 剑<sup>2</sup> 孙静娴<sup>1</sup> 张 娜<sup>2</sup> 徐 标<sup>1△</sup>

(1 南京医科大学附属鼓楼临床医学院心脏科 江苏 南京 210008 2 南京大学医学院附属鼓楼医院心脏科 江苏 南京 210008)

**摘要** 目的 通过 EDU 免疫荧光法观察整合素连接激酶(Integrin-Linked Kinase ,ILK)在新生大鼠心肌细胞内高表达后对心肌细胞 DNA 合成的影响。方法 取新生(1-3 天内)大鼠原代心肌细胞 培养 72 小时后随机分为正常对照组、ILK 转染组。对照组转染重组腺病毒载体(adeno-GFP) ,ILK 组转染重组腺病毒载体 +ILK 基因(adeno-ILK)。转染成功后 48 小时将两组心肌细胞分别通过 5-乙基 -2'-脱氧尿嘧啶核苷(EDU)免疫荧光法测定心肌细胞 DNA 合成。结果 :ILK 转染组心肌细胞内 DNA 合成较对照组明显增加(P<0.05)。结论 :ILK 高表达具有促进新生大鼠心肌细胞的 DNA 合成的能力。

**关键词** 整合素连接激酶 心肌细胞 增殖 ;DNA 合成 ;EDU

中图分类号 :Q95-3 R54 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1858-03

## Detection of Over-Expressed Integrin-Linked Kinase in DNA Synthesis of Cardiomyocytes in Newborn Rats by EDU Immunofluorescence Assay\*

WANG Bing-jian<sup>1</sup>, BAI Jian<sup>2</sup>, SUN Jing-xian<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>2</sup>, XU Biao<sup>1</sup>

(1 Department of Cardiology, Drum Tower Clinical Medical College, Nanjing Medical University, 210008, Jiangsu, China;

2 Department of Cardiology ,Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, 210008,Jiangsu,China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of over-expressed integrin-linked kinase on rat neonatal DNA synthesis of cardiomyocytes by EDU immunofluorescence assay. **Methods:** Primary neonatal rat (1-3 days old) cardiomyocytes were cultured in vitro and randomly divided into two groups 72 h after isolation: infected by either adeno-GFP (control group) or adeno-GFP containing adeno-ILK (ILK group). 48h after infection, DNA synthesis of cardiomyocytes in two groups were determined by 5-ethynyl-2-deoxyuridine(EdU) immunofluorescence assay. **Results:** Compared with the control groups, DNA synthesis of cardiomyocytes increased dramatically in ILK groups (P <0.05). **Conclusion:** The over-expression of ILK could promote Rat Neonatal DNA synthesis of cardiomyocytes.

**Key words:** Integrin-linked kinase ,Cardiomyocyte proliferation ;DNA synthesis ;EDU

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R54 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)10-1858-03

### 前言

心脏病是世界范围内引起死亡的主要病因之一<sup>[1]</sup>,其原因是心脏疾病能够导致心肌细胞的丢失。而目前,心脏疾病的常规治疗方法的效果非常有限,未能有效纠正疾病发生时心肌细胞的丢失。一系列的研究表明,在体内诱导导出心肌细胞的增殖能够促进心肌的再生与修复<sup>[2-4]</sup>。因此,实现促进新的心肌细胞产生将有可能突破目前的常规治疗方法的局限性,提高心脏疾病的治愈率。

ILK 是一种进化过程中高度保守的 Ser/Thr 蛋白激酶,ILK 与整合素的 β1 亚单位的胞浆区相连接,广泛存在于多种细胞胞浆中,在骨骼肌和心肌等组织中都有高度表达<sup>[5]</sup>,是一个与心肌收缩力、心肌细胞的存活和修复密切相关的调节因子<sup>[6]</sup>。研究证明,ILK 在非心脏组织中,具有促进血管新生、细胞生长、增

殖、分化及抗细胞凋亡的作用<sup>[7,8]</sup>。本课题组前期研究表明:ILK 高表达具有改善心肌梗死后的大鼠心脏收缩功能和左室重构的作用<sup>[9]</sup>,提示 ILK 可能具有直接促进心肌细胞增殖的作用。

细胞增殖首先就是细胞内 DNA 合成的增加,本实验旨在通过 EDU 免疫荧光法检测 ILK 高表达对新生大鼠心肌细胞的 DNA 合成的影响,研究 ILK 高表达是否对新生大鼠心肌细胞的增殖有促进作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

SD 清洁级大鼠,由南京医科大学动物实验中心提供。

#### 1.2 材料

胎牛血清(Gibco);高糖 DMEM 培养基(Gibco);胰蛋白酶(1:250)(Gibco);胶原蛋白酶 (Gibco);5- 溴脱氧尿嘧啶核苷

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070195)

作者简介:王丙剑(1979-),男,硕士研究生,主治医师,主要从事冠心病及心衰的基因治疗方面研究,

E-mail:wangbingjian@medmail.com.cn

△通讯作者:徐标,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:动脉粥样硬化及糖尿病血管并发症,冠心病及心衰的基因治疗,E-mail:xubiao@medmail.com

(收稿日期:2011-03-07 接受日期:2011-03-30)

(BrdU)(Sigma) 光学显微镜(BX51 型)(Olympus) 荧光显微镜(Imager A1 型)(Zeiss) EdU 免疫荧光试剂盒(Invitrogen) 重组腺病毒载体(+ILK 基因)的构建(Invitrogen)。

### 1.3 实验方法和步骤

1.3.1 新生大鼠心肌细胞分离、纯化及培养 参照 Goldenberg I<sup>[10]</sup> 和 Chen J<sup>[11]</sup> 等方法略加改进。取新生 1~3d SD 大鼠, 在 75%酒精中浸泡 8 秒后取出固定, 依次剪开皮肤、肌肉组织及肋骨, 取下心脏, 去除心房、残留大血管及心外膜结缔组织, 剪开心室, 预冷的 PBS 冲洗后将心室肌剪成约 1mm<sup>3</sup> 小组织块, 再予 PBS 冲洗 2-3 遍, 加入 0.08% 胰蛋白酶 +0.1% 胶原酶 I 在 37℃ 恒温振荡条件下消化 10 min×4-5 次, 第一次的上清液弃去, 收集剩余各次消化的上清液, 予含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基以终止消化后过滤, 再以 4℃、1000 rpm 条件离心 5min, 吸弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基冲悬细胞, 将细胞悬液接种到 90 mm 培养皿中, 置入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h(用差速贴壁法去除非心肌细胞), 随后轻轻吸出细胞悬液。将吸出的细胞悬液调整好细胞浓度接种到六孔板(浓度 5×10<sup>5</sup> cells/ml)(板中预铺多聚赖氨酸包被过的玻片), 每 24 小时换液一次。48 小时后改为含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

1.3.2 实验分组 原代心肌细胞生长 72 小时后, 选择生长良好的心肌细胞, 随机分为 2 组, 每孔按测定好的感染复数(MOI) 100:1 加入腺病毒溶液: ①正常对照组 转染 Ad-GFP; ②ILK 转染组 转染 Ad-ILK。2 小时后 弃去培养基, PBS 冲洗 2 次, 更换新的含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 继续培养。

1.3.3 心肌细胞 DNA 合成检测 参照试剂盒 Click-iT®EdU Imaging Kit 采用 EDU 免疫荧光分析法检测心肌细胞 DNA 合成情况。转染成功后心肌细胞于六孔板中继续培养 48 小时, 换用 50μM EdU 培养基孵育 48 小时, 4% 多聚甲醛固定 15 分钟, 0.2% 甘氨酸孵育 10 分钟, PBS 冲洗两次, 0.5% Triton X-100 透化细胞, PBS 冲洗, Apollo 染色反应液避光孵育 30 分钟, 再次 PBS 冲洗, Hoechst 避光孵育 10 分钟, 0.5% Triton X-100 冲洗 3 次, 随后在荧光显微镜下成像。

1.3.4 统计学处理 所有数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS17.0 统计学软件, 采用两样本均数间 t 检验的方法  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心肌细胞鉴定

使用  $\alpha$ -sarcomeric actin 抗体进行免疫组化染色对心肌细胞进行鉴定。经染色, 心肌细胞可见胞浆呈棕黄色染色, 非心肌细胞染色呈阴性, 其结果显示 >95% 的细胞呈现阳性(图 1)。

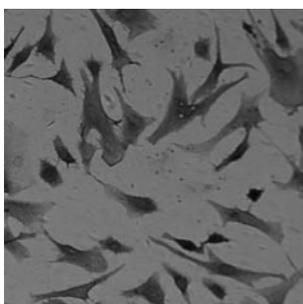


图 1 心肌细胞鉴定

Fig.1 Identified cardiomyocyte by immunohistochemistry

### 2.2 腺病毒转染效率鉴定

通过荧光显微镜检测表达 GFP 的细胞数来鉴定转染效率, 结果显示转染 24 h 后几乎所有细胞均有 GFP 表达, 转染效率达到 85% 以上(图 2)。

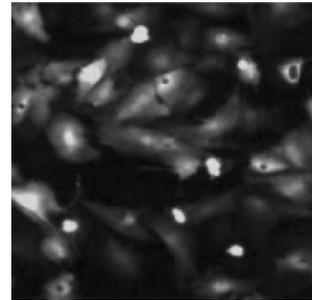
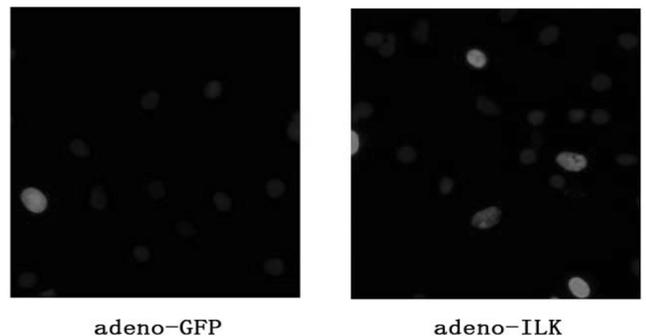


图 2 荧光显微镜下观察心肌细胞 GFP 表达水平鉴定腺病毒转染效率  
Fig.2 The efficiency of adenoviral delivery identified through observing the expression of GFP of cardiomyocytes by fluorescence microscope

### 2.3 EDU 免疫荧光分析

荧光显微镜下可见对照组(Adeno-GFP)与 ILK 转染组(Adeno-ILK)EDU 阳性的细胞呈红色, 阴性的细胞呈蓝色(图 3)。对照组阳性细胞数为 8.45±2.09/100 个细胞, ILK 转染组阳性细胞数为 30.21±4.02/100 个细胞, 与对照组相比, ILK 转染组的 EDU 阳性细胞数明显增加( $P < 0.05$ )。



Adeno-GFP

Adeno-ILK

图 3 EDU 免疫荧光法检测心肌细胞 DNA 合成

Fig.3 EDU immunofluorescence for DNA synthesis of cardiomyocytes

## 3 讨论

完整的细胞周期是指细胞从第一次分裂结束产生新细胞到第二次分裂结束所经历的全过程, 是一个连续变化过程, 这个过程也是细胞一分为二实现增殖的过程, 分为间期与分裂期两个阶段。间期是细胞合成 DNA、RNA、蛋白质和各种酶的时期, 是为细胞分裂准备物质基础的主要阶段。随后细胞进入分裂期, 经过有丝分裂, 由一个母细胞分裂成为两个子细胞。细胞要完成分裂增殖, 首先必须正确复制 DNA 和达到一定的体积, 在获得足够物质支持分裂以前, 细胞不可能进行分裂, DNA 合成增加是细胞分裂增殖的必要基础。因此, DNA 合成增加是细胞增殖的重要标志, 也就是说细胞增殖首先表现为 DNA 合成的增加, 观察细胞增殖可以首先检测细胞的 DNA 合成的情况。

1981 年 Gratzner HG 等利用和细胞一起孵育的 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)在细胞周期的 S 期, 能与胸腺嘧啶核苷竞争

性掺入到细胞新合成 DNA 分子中的这一特点,开创了 BrdU 免疫荧光法测定细胞 DNA 合成的方法<sup>[12]</sup>。但 BrdU 需要变性 DNA 后才能与抗体结合,但这就破坏了 DNA 双链结构,并进一步影响其他染料的结合染色,从而容易导致染色弥散,准确性降低等问题。在操作中如何协调 DNA 的充分变性和留有足够的 DNA 双链结构显然是一个棘手的问题<sup>[13]</sup>。2007 年 Salic A 等提出了新的检测细胞 DNA 合成的方法,即通过 5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EDU)检测细胞 DNA 合成<sup>[14]</sup>。EdU 也是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在细胞增殖时能够掺入正在复制的 DNA 分子中。与传统的 BrdU 检测方法相比,EdU 不需要严格的样品变性(酸解、热解、酶解)处理,有效地避免了样品损伤,并且 EdU 抗体只有 BrdU 抗体大小的 1/500,在细胞内更容易扩散,具有更高的灵敏度和更快的检测速度。本实验采用 EDU 法检测心肌细胞的 DNA 合成情况,可以将 BrdU 抗体无法结合的新复制的 DNA 也能够检测出来,提高对细胞内新复制 DNA 检出效率,对于是否有新合成的 DNA 及其合成情况的判断也就更加准确。

按照细胞的增殖能力可将细胞分为三类:增殖细胞群,不再增殖细胞群,暂不增殖细胞群(在通常情况下处于 G0 期,故又称 G0 期细胞)。传统的观点认为,心肌细胞是高度分化的细胞,属于不再增殖细胞群,它们丧失了分裂能力,又称终末细胞。当心脏疾病致使心肌细胞丢失进而引起心脏疾病不断进展的时候,传统观点指导下形成的治疗方法仅限于针对残存的心肌细胞,忽视了如何促进新的心肌细胞产生,自然难以实现对心脏疾病的治愈。而 2009 年发表于 Science 的研究表明,即使在成年人类,正常心肌细胞仍然存在增殖与更新,只是心肌细胞的增殖与更新能力非常低下,正常人一生也只有不到 50% 的心肌细胞被更新<sup>[15]</sup>。并且在体内诱导出心肌细胞的增殖能够促进心肌的再生与修复<sup>[2-4]</sup>。这就说明,心脏疾病治愈率低、预后较差的重要原因就是心肌细胞的增殖远远无法弥补其丢失,促进心肌细胞增殖能力的提高将成为心脏疾病预后改善的重要途径。

在非心脏组织中,ILK 通过与多种胞外因子相互作用,具有促进血管新生、细胞生长、增殖、分化及抗细胞凋亡的作用<sup>[7,8]</sup>,而在心肌组织中 ILK 同样有高度表达同样可能对心肌细胞的增殖具有促进作用<sup>[5]</sup>。细胞增殖首先表现为 DNA 合成的增加,DNA 合成增加是细胞分裂增殖的物质基础和前期准备,也就是说将要发生分裂增殖的细胞内会有新复制的 DNA 产生。本实验选择体外培养心肌细胞的方法,排除体内试验的其他干扰因素,直接观察心肌细胞高表达 ILK 后 DNA 合成的变化情况,可以反映细胞增殖能力的变化。结果显示,ILK 转染组 DNA 合成增加的心肌细胞数显著多于对照组,这就表明 ILK 转染组有更多的心肌细胞进入了细胞周期,进而可能重新发生分裂与增殖,提示 ILK 能够直接促进心肌细胞的增殖。由于 ILK 还具有促进血管新生及抗细胞凋亡的作用<sup>[7,8]</sup>,本实验也说明 ILK 有可能成为心脏疾病基因治疗的重要靶点。

本实验证实高表达 ILK 能够促进心肌细胞内的 DNA 合成增加,但尚需通过其他方法进一步观察是否有新生心肌细胞

数量的增加,并对 ILK 与心肌细胞增殖关系的相关分子机制进行深入探讨。

#### 参考文献(References)

- [1] Thom T, Haase N, Rosamond W, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. *Circulation*, 2006, 113(6):85-151
- [2] Bersell K, Arab S, Haring B, et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury[J]. *Cell*, 2009, 23;138(2):257-270
- [3] Kühn 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] Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, et al. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(42):15546-15551
- [5] Hannigan GE, Leung HC, Fitz GL, 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
- [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): 2361-2372
- [7] Hannigan G, Troussard A, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 51-63
- [8] Dedhar S, Williams B, Hannigan G. Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signaling [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9(8):319-323
- [9] Ding L, Dong L, Chen X, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2009, 120(9):764-773
- [10] Goldenberg I, Shainberg A, Jacobson KA, et al. Adenosine protects against angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiocyte cultures[J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 52(1-2):133-139
- [11] Chen J, Larsson L, Haugen E, et al. Effects of autoantibodies removed by immunoadsorption from patients with dilated cardiomyopathy on neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8(5): 460-467
- [12] Gratzner HG, Leif RC. An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1981, 1(6):385-393
- [13] Diermeier DS, Clarke ST, Hill D, et al. Cell Type Specific Applicability of 5-Ethynyl-20-deoxyuridine (EdU) for Dynamic Proliferation Assessment in Flow Cytometry[J]. *Cytometry A*, 2009, 75(6):535-546
- [14] Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7):2415-2420
- [15] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans[J]. *Science*, 2009, 324(5923):98-102