

# 磷酸弗林酸性簇分选蛋白 2 对血管紧张素 II 诱导的心肌肥大的影响及其机制

杨福情<sup>1</sup> 敖翔<sup>1</sup> 肖丹丹<sup>1</sup> 刘丙岩<sup>2</sup> 王建勋<sup>1</sup> 宋林<sup>1</sup>

(1 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 山东 青岛 266021; 2 山东大学环境研究院)

**【摘要】** 目的 探究磷酸弗林酸性簇分选蛋白 2(PACS-2)对血管紧张素 II(Ang II)诱导的心肌肥大的影响及其机制。方法 剪取并消化出生 1~2 d 的 SD 大鼠乳鼠的心脏组织,采用差速贴壁法获取乳鼠心肌细胞(NRCMs),原代培养 24 h。以浓度为 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 处理 NRCMs 0、3、6、12、24 h,采用 Western blot 方法检测细胞中 FUN14 域蛋白 1(FUNDC1)、PACS-2、三磷酸肌醇受体蛋白(IP3R)的表达水平,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测细胞中心钠肽(ANP)、脑钠肽(BNP)、 $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -MHC)mRNA 的表达水平。将 NRCMs 分为 A~C 组,A 组使用无血清培养基培养,B、C 组分别转染 si-NC 和 si-PACS-2,采用 Western blot 方法检测各组细胞中 PACS-2 蛋白的表达水平。将 NRCMs 分为 D~G 组,D 组使用无血清培养基培养,E 组以浓度 0.15  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 培养,F、G 组分别转染 si-NC、si-PACS-2 后再以浓度 0.15  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 培养,采用 TRITC-鬼笔环肽染色技术检测各组心肌细胞表面积,RT-qPCR 检测各组细胞 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平,以 Fluo-4、AM 探针检测各组细胞胞质  $\text{Ca}^{2+}$  的水平。将 NRCMs 分为 H~K 组,H 组使用无血清培养基培养,I、J 组分别转染 si-NC、si-PACS-2,K 组转染 si-PACS-2 并且以浓度 1  $\mu\text{mol/L}$  的钙调蛋白(CaM)拮抗剂处理后,采用 RT-qPCR 方法检测各组细胞 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平。结果 以浓度 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 处理 NRCMs 0、3、6、12、24 h,NRCMs 中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平呈时间依赖性上调( $F=25.73\sim 58.30, P<0.05$ ),并且处理第 24 小时时相较于第 0 小时时均显著上调( $t=5.35\sim 37.50, P<0.05$ )。以浓度 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 处理 NRCMs 0、3、6、12、24 h,NRCMs 中 IP3R、PACS-2 以及 FUNDC1 蛋白的表达水平均呈时间依赖性下调( $F=5.37\sim 9.07, P<0.05$ ),并且处理第 24 小时时相较于第 0 小时时显著下调( $t=6.55\sim 7.42, P<0.05$ )。与 B 组相比,C 组 NRCMs 中 PACS-2 蛋白的表达水平显著下调( $t=5.92, P<0.05$ )。与 F 组相比,G 组 NRCMs 中心肌细胞表面积增大,ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平及胞质  $\text{Ca}^{2+}$  水平均上调( $t=3.50\sim 26.60, P<0.05$ )。与 J 组相比,K 组 NRCMs 中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 表达水平均显著下调( $t=3.27\sim 5.13, P<0.05$ )。结论 敲低 PACS-2 可增加 NRCMs 中胞质  $\text{Ca}^{2+}$  水平,并且可能以  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 依赖的方式加重 Ang II 诱导的心肌肥大的发生。

**【关键词】** 磷酸弗林酸性簇分选蛋白 2;心脏扩大;内质网;线粒体膜;钙;血管紧张素 II

**【中图分类号】** R541

**【文献标志码】** A

## EFFECT OF PHOSPHOFURIN ACIDIC CLUSTER SORTING PROTEIN 2 ON ANGIOTENSIN II-INDUCED CARDIAC HYPERTROPHY AND ITS MECHANISM

YANG Fuqing, AO Xiang, XIAO Dandan, LIU Bingyan, WANG Jianxun, SONG Lin  
(Department of Biochemistry and Molecular Biology Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266021, China)

**【ABSTRACT】** **Objective** To investigate the effect of phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) on angiotensin II (Ang II)-induced cardiac hypertrophy and its mechanism. **Methods** The heart tissue of neonatal *Sprague-Dawley* rats aged 1–2 d was clipped and digested, and the differential adhesion method was used to obtain neonatal rat cardiomyocytes (NRCMs), which were primary cultured for 24 h. After NRCMs were treated with 1.5  $\mu\text{mol/L}$  Ang II for 0, 3, 6, 12, and 24 h, Western blot was used to measure the protein expression levels of FUN14 domain-containing protein 1 (FUNDC1), PACS-2, and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) in cells, and RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) in cells. NRCMs were divided into groups A–C, group A was cultured with serum-free medium, and groups B and C were transfected with si-NC and si-PACS-2, respectively, Western blot was used to measure the protein expression level of PACS-2 in each group. NRCMs were divided into groups D–G, group D was cultured with serum-free medium, group E was cultured with 0.15  $\mu\text{mol/L}$  Ang II, and groups F and G were transfected with si-NC and si-PACS-2, respectively, and were then cultured with 0.15  $\mu\text{mol/L}$  Ang II, TRITC-phalloidin staining was

used to measure the surface area of cardiomyocytes in each group, RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC in each group, and Fluo-4, AM probe was used to measure the level of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in each group. NRCMs

**【收稿日期】** 2023-03-09; **【修订日期】** 2023-05-18

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目(81970253);山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2019ZD28)

**【通讯作者】** 王建勋, Email: wangjx@qdu.edu.cn; 宋林, Email: lsmelon@163.com

were divided into groups H-K, group H was cultured with serum-free medium, groups I and J were transfected with si-NC and si-PACS-2, respectively, and group K was transfected with si-PACS-2 and cultured by 1  $\mu\text{mol/L}$  CaM inhibitor; RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC in each group. **Results** After treatment of NRCMs with Ang II at a concentration of 1.5  $\mu\text{mol/L}$  for 0, 3, 6, 12, and 24 h, the mRNA expression levels of ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC in NRCMs gradually increased over time ( $F=25.73-58.30, P<0.05$ ), and the levels at 24 hours of treatment were significantly up-regulated compared with those at 0 hour ( $t=5.35-37.50, P<0.05$ ). After treatment of NRCMs with Ang II at a concentration of 1.5  $\mu\text{mol/L}$  for 0, 3, 6, 12, and 24 h, the protein expression levels of IP3R, PACS-2, and FUNDC1 in NRCMs gradually decreased over time ( $F=5.37-9.07, P<0.05$ ), and the levels at 24 h of treatment were significantly downregulated compared with those at 0 h ( $t=6.55-7.42, P<0.05$ ). Compared with group B, group C had a significant reduction in the protein expression level of PACS-2 in NRCMs ( $t=5.92, P<0.05$ ). Compared with group F, group G had significant increases in the surface area of cardiomyocytes, the mRNA expression levels of ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC, and the level of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in NRCMs ( $t=3.50-26.60, P<0.05$ ). Compared with group J, group K had significant reductions in the mRNA expression levels of ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC in NRCMs ( $t=3.27-5.13, P<0.05$ ). **Conclusion** Knockdown of PACS-2 can increase the level of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in NRCMs and aggravate Ang II-induced cardiac hypertrophy in a  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-dependent manner.

**[KEY WORDS]** Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2; Cardiomegaly; Endoplasmic reticulum; Mitochondrial membranes; Calcium; Angiotensin II

病理性心肌肥大是由各种损伤刺激因子和持续压力负荷引起的代偿性心脏扩张<sup>[1]</sup>。长期病理性心肌肥大是心肌梗死、心律失常、心力衰竭甚至猝死的重要原因<sup>[2]</sup>。病理性心肌肥大的发病机制之一是心肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$  动态紊乱,而胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  超载能激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖相关肥大信号通路<sup>[3-4]</sup>。线粒体相关内质网膜(MAMs)是内质网(ER)和线粒体之间的动态膜结构<sup>[5]</sup>,与细胞内钙稳态及线粒体稳态等密切相关<sup>[6-7]</sup>。大量研究表明 MAMs 异常与多种心血管疾病有关<sup>[8]</sup>。磷酸弗林酸性簇分选蛋白 2(PACS-2)作为 MAMs 上的结构蛋白,通过影响线粒体分裂调节 MAMs 的形成<sup>[9]</sup>。然而,PACS-2 在心肌肥大中的作用机制尚不是很清楚。本研究旨在探讨敲低大鼠心肌细胞(NRCMs)中的 PACS-2 对 Ang II 诱导的心肌肥大的影响,为预防和治疗心肌肥大甚至心力衰竭提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和材料

SD 大鼠乳鼠购自青岛大任富城畜牧公司;胞质钙离子探针(Fluo-4, AM)购自上海翌圣生物科技有限公司;血管紧张素 II (Ang II)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;TRITC 标记鬼笔环肽染料购自北京索莱宝科技有限公司;FUNDC1 域蛋白 1 (FUNDC1)、PACS-2、三磷酸肌醇受体蛋白(IP3R)兔单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;钙调蛋白(CaM)拮抗剂购自美国 MCE 公司;PACS-2 小干扰 RNA 购自上海吉玛制药技术有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞提取和培养** 将 30 只出生 1~2 d 的

SD 大鼠乳鼠置于无菌玻璃皿当中,使用体积分数 0.75 的乙醇清洗 2 次,无菌条件下解剖分离大鼠心脏,PBS 缓冲液(pH 7.4)清洗;切碎并置于 1.2 g/L 胰液素和 0.14 g/L II 型胶原酶配制的消化液中;消化后的细胞悬液在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h,上清液即为 NRCMs。将稀释至  $1 \times 10^9$  个/L 的 NRCMs 接种于含有 DMEM-F12 培养基的孔板(含体积分数 0.05 FBS, 10 g/L 的青霉素混合液)中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养 24 h,用于后续实验。

**1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测细胞中心钠肽(ANP)、脑钠肽(BNP)、 $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -MHC) mRNA 的表达水平** 将经过分离的 NRCMs 接种于 6 孔板内培养 24 h,待细胞汇合度约达 70%时,再经无血清培养基饥饿培养 12 h 后,于培养基中加入浓度 1.5  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II,分别培养 0、3、6、12、24 h 后,采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, NanoDrop 分光光度计测定 RNA 的浓度与纯度。按照反转录试剂盒说明书步骤将 1  $\mu\text{g}$  RNA 反转录为 cDNA,继而以此为模板进行 RT-qPCR。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法来计算目的基因的相对表达量。ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 以 GAPDH 为内参照,引物名称及其序列见表 1。

**1.2.3 Western blot 方法检测细胞中 IP3R、PACS-2、FUNDC1 蛋白表达水平** 按 1.2.2 中的方法将 NRCMs 培养 0、3、6、12、24 h 后,每孔中加入 RIPA 裂解液,冰上静置 10 min,提取细胞总蛋白。蛋白样品以含 150 g/L 的分离胶以及 50 g/L 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转膜 1.5 h,并使用含体积分数 0.05 的脱脂牛奶封闭 1 h。封闭结束后,

一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后二抗室温孵育 1 h,使用超敏 ECL 发光液显影。使用 Image J 软件分析相关蛋白的灰度值,以  $\beta$ -Actin 为内参照,目的蛋白的相对表达水平以目的蛋白灰度值/内参照蛋白灰度值计算,作为 NRCMs 中 IP3R、PACS-2、FUNDCl 蛋白的相对表达水平。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
ANP	F:5'-GAGGATGGAGGTGCTCG-3'	17
	R:5'-GGATCTTTTGCATCTGCTC-3'	20
BNP	F:5'-GACTCCGGCTTCTGACTCTG-3'	20
	R:5'-CACTGTGGCAAGTTTGGCT-3'	19
$\beta$ -MHC	F:5'-AGCCTCCAGAGTTTGTGAA-3'	20
	R:5'-TTGATGAGGCTGGGGTTCTG-3'	21
GAPDH	F:5'-ATGCCGCTGGAGAAACC-3'	18
	R:5'-GCATCAAAGGTGGAAGAATGG-3'	21

**1.2.4** Western blot 方法检测 A~C 组转染后的 NRCMs 细胞中 PACS-2 蛋白的表达水平 将分离的 NRCMs 接种于 6 孔板培养 24 h,汇合度约 70% 时,经无血清培养基饥饿培养 12 h 后,分为 A~C 组。A 组使用无血清培养基培养 24 h,B、C 组分别用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 si-NC(B 组)和 si-PACS-2(C 组)转染 NRCMs,6 h 后换液,继续培养 18 h 后提取细胞总蛋白,采用 Western blot 方法检测 A~C 组 NRCMs 细胞中 PACS-2 蛋白的表达水平。

**1.2.5** TRITC-鬼笔环肽染色检测 D~G 组细胞骨架大小 将分离的 NRCMs 接种于 24 孔板内培养 24 h,汇合度约达 50% 时,经无血清培养基饥饿培养 12 h 后,分为 D~G 组。D 组使用无血清培养基培养 48 h;E 组培养基中加入浓度 0.15  $\mu$ mol/L 的 Ang II 培养 24 h;F、G 组分别转染 NRCMs si-NC、si-PACS-2 并培养 24 h 后,于培养基中均加入浓度 0.15  $\mu$ mol/L 的 Ang II 培养 24 h。培养结束后各组去除原培养基,PBS 洗涤 3 次后,按 TRITC-鬼笔环肽染色试剂盒说明书要求,加入 TRITC-鬼笔环肽 (100 nmol/L)工作液,37 °C 下避光孵育 30 min,并用双光子共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)观察细胞骨架。用 Image J 软件测量 F-肌动蛋白染色细胞的表面积。

**1.2.6** RT-qPCR 方法检测 D~G 组细胞中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平 取 6 孔板中培养 48 h 的 D~G 组 NRCMs,RT-qPCR 方法检测 D~G 组细胞中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平,3 种基因均以 GAPDH 作为内参照。

**1.2.7** Fluo-4,AM 检测 D~G 组细胞胞质中  $Ca^{2+}$  的水平 取 6 孔板当中培养 48 h 以后的 D~G 组 NRCMs,按照 Fluo-4 钙离子检测试剂盒说明书要求,去除原培养基,PBS 洗涤 3 次后,加入 Fluo-4,AM(2  $\mu$ mol/L)工作液,37 °C 下避光孵育 30 min,并通过倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司)观察。用 Image J 软件分析细胞内钙离子的荧光强度,以此代表细胞胞质中  $Ca^{2+}$  的水平。

**1.2.8** RT-qPCR 方法检测 H~K 组细胞中 ANP、BNP 以及  $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平 将分离后的 NRCMs 接种于 6 孔板内培养 24 h,汇合度约达 70% 时,经无血清培养基饥饿培养 12 h 以后,分为 H~K 组。H 组使用无血清培养基培养 48 h;I、J 组分别转染 NRCMs si-NC、si-PACS-2 并且培养 24 h;K 组培养基中加入浓度 1  $\mu$ mol/L 的 CaM 拮抗剂,培养 24 h 后转染 si-PACS-2 后再培养 24 h。培养结束以后,采用 RT-qPCR 方法检测 H~K 组细胞中的 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 表达水平,3 种基因均是以 GAPDH 为内参照。

**1.3 统计学处理**

使用 Graph Pad Prism 8.01 软件进行统计分析。所有实验均重复 3 次,结果取均值。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 Ang II 对 NRCMs 相关基因和蛋白表达影响**

以浓度为 1.5  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 NRCMs 0、3、6、12 及 24 h 以后,NRCMs 中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平比较差异具有显著统计学意义( $F = 25.73 \sim 58.30, P < 0.05$ )。其中在加入 1.5  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 NRCMs 第 6、12、24 小时时相较于处理第 0 小时时,上述 3 种肥大基因表达水平差异有显著性( $t = 4.46 \sim 37.50, P < 0.05$ )。见表 2。选择以上肥大基因在 Ang II 处理 NRCMs 第 24 小时时差异最显著( $P$  值最小)时间点进行后续实验。

以浓度为 1.5  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 NRCMs 0、3、6、12、24 h 后,NRCMs 中 IP3R、PACS-2 以及 FUNDCl 蛋白的表达水平比较差异均具有显著性( $F = 5.37 \sim 9.07, P < 0.05$ );其中加入 1.5  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 NRCMs 第 24 小时时相较于处理第 0 小时时,上述 3 个指标进行比较,差异均具有显著

性( $t=6.55\sim 7.42, P<0.05$ )。见表 2。

### 2.2 A~C 组 NRCMs 中 PACS-2 蛋白相对表达量比较

Western blot 检测结果显示, A~C 组 NRCMs 当中 PACS-2 蛋白的表达水平分别为  $1.00\pm 0.00$ 、 $0.94\pm 0.06$  和  $0.57\pm 0.12$ , 各组比较差异有显著性( $F=24.40, P<0.05$ ); 与 B 组相比, C 组中 PACS-2 蛋白的表达水平显著降低( $t=5.92, P<0.05$ )。

### 2.3 D~G 组 NRCMs 的细胞表面积以及 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平比较

经 Ang II 和转染 si-PACS-2 处理后, D~G 组 NRCMs 的细胞表面积比较差异均具有显著性( $F=$

$679.4, P<0.05$ ), 其中与 E、F 组进行比较, D、G 组 NRCMs 的细胞表面积差异具有显著性( $t=11.92\sim 26.52, P<0.05$ )。见图 1。

D~G 组 NRCMs 中 ANP、BNP 以及  $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平比较差异均具有显著意义( $F=12.55\sim 42.96, P<0.05$ )。与 D 组相比较, E、F 组 NRCMs 中上述 3 种肥大基因的表达水平差异无显著性( $P>0.05$ ); 与 E 组相比, F 组 NRCMs 中上述 3 种肥大基因的表达水平差异无显著性( $P>0.05$ ); 与 E、F 组相比, G 组 NRCMs 中上述 3 种肥大基因的表达水平差异具有显著性( $t=2.74\sim 15.18, P<0.05$ )。见表 3。

表 2 Ang II 对 NRCMs 相关基因和蛋白表达的影响( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

处理时间	ANP mRNA	BNP mRNA	$\beta$ -MHC mRNA	IP3R 蛋白	PACS-2 蛋白	FUNDC1 蛋白
0 h	$1.00\pm 0.07$	$1.00\pm 0.18$	$1.00\pm 0.10$	$1.00\pm 0.00$	$1.00\pm 0.00$	$1.00\pm 0.00$
3 h	$1.26\pm 0.14$	$1.39\pm 0.10$	$1.06\pm 0.07$	$0.75\pm 0.20$	$0.59\pm 0.11$	$0.94\pm 0.18$
6 h	$1.54\pm 0.15$	$1.58\pm 0.16$	$1.56\pm 0.11$	$0.64\pm 0.12$	$0.52\pm 0.18$	$0.86\pm 0.16$
12 h	$1.98\pm 0.32$	$2.55\pm 0.46$	$1.82\pm 0.08$	$0.63\pm 0.11$	$0.49\pm 0.16$	$0.81\pm 0.16$
24 h	$2.26\pm 0.08$	$3.71\pm 0.18$	$2.01\pm 0.25$	$0.52\pm 0.11$	$0.35\pm 0.17$	$0.51\pm 0.13$

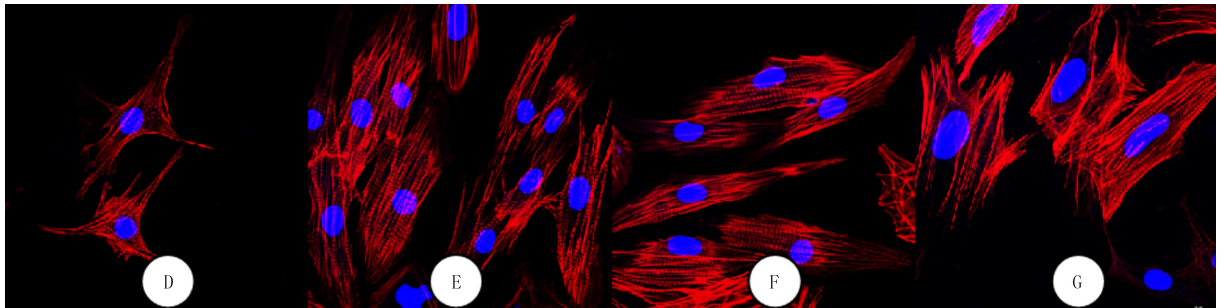


图 1 D~G 组大鼠乳鼠心肌细胞的细胞表面积比较(400 倍)

表 3 D~G 组心肌肥大基因的表达水平和细胞表面积比较( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

分组	ANP mRNA	BNP mRNA	$\beta$ -MHC mRNA	细胞表面积( $\bar{x}/\%$ )
D 组	$1.00\pm 0.21$	$1.00\pm 0.26$	$1.00\pm 0.16$	$100.00\pm 21.77$
E 组	$1.37\pm 0.11$	$1.27\pm 0.13$	$1.24\pm 0.08$	$127.01\pm 22.07$
F 组	$1.30\pm 0.11$	$1.35\pm 0.12$	$1.26\pm 0.06$	$124.91\pm 27.24$
G 组	$2.33\pm 0.50$	$2.14\pm 0.36$	$2.02\pm 0.14$	$205.72\pm 44.88$

### 2.4 D~G 组 NRCMs 中胞质 $Ca^{2+}$ 水平比较

Fluo-4, AM 检测结果显示, D~G 组 NRCMs 中  $Ca^{2+}$  相对表达水平分别为  $1.00\pm 0.07$ 、 $1.91\pm 0.24$ 、 $1.98\pm 0.23$  和  $2.61\pm 0.25$ , 各组 NRCMs 中胞质  $Ca^{2+}$  水平比较差异显著( $F=29.51, P<0.05$ )。与 E、F 组相比, D、G 组 NRCMs 中胞质  $Ca^{2+}$  水平差异具有显著性( $t=5.35\sim 8.25, P<0.05$ ); 与 E 组相比, F 组 NRCMs 中胞质  $Ca^{2+}$  水平差异无显著性( $P>0.05$ )。

### 2.5 H~K 组 NRCMs 中的 ANP、BNP 以及 $\beta$ -MHC mRNA 表达水平比较

经过转染 si-PACS-2 以及以 CaM 蛋白抑制剂( $1\ \mu\text{mol/L}$ )处理 NRCMs 后, H~K 组 NRCMs 中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 的表达水平比较差异均有显著性( $F=14.69\sim 18.69, P<0.05$ ); 与 J 组相比, H、I、K 组 NRCMs 中上述 3 种肥大基因的表达水平差异具有显著性( $t=3.27\sim 8.31, P<0.05$ ); 与 H 组进行比较, I 组 NRCMs 中上述 3 种肥大基因的表达水平比较差异均无显著意义( $P>0.05$ )。见表 4。

## 3 讨 论

心肌肥大是心肌由于各种因素引起的机械负荷增加而产生的代偿性反应, 其可逐渐发展为失代偿性, 导致不可逆转的心力衰竭甚至猝死<sup>[10-11]</sup>。因此

表 4 H~K 组心肌肥大基因的相对表达水平的比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

分组	ANP mRNA	BNP mRNA	$\beta$ -MHC mRNA
H 组	1.00 $\pm$ 0.30	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.14
I 组	0.96 $\pm$ 0.15	0.91 $\pm$ 0.14	1.20 $\pm$ 0.23
J 组	2.44 $\pm$ 0.39	1.92 $\pm$ 0.21	2.27 $\pm$ 0.44
K 组	1.16 $\pm$ 0.38	1.30 $\pm$ 0.25	0.91 $\pm$ 0.11

预防和逆转心肌肥大对于心血管疾病的治疗具有重要意义。

MAMs 作为内质网和线粒体的关键接触位点,对细胞生理功能的调节发挥着重要作用。研究发现 MAMs 异常与缺血再灌注、心力衰竭等多种心血管疾病有关<sup>[12-13]</sup>。MAMs 富集多种连接和功能蛋白,如 FUNDC1、PACS-2 及 IP3R 等<sup>[14-15]</sup>。FUNDC1 与 IP3R 蛋白结合形成连接 ER 和线粒体的桥梁,参与 MAMs 的形成<sup>[16]</sup>。此外,PACS-2 作为一种新的分选蛋白,参与 ER 和线粒体之间的结合<sup>[7]</sup>。本研究将 NRCMs 经浓度 1.5  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 0、3、6、12、24 h,RT-qPCR 和 Western blot 方法检测结果显示,心肌肥大基因 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 的表达水平均呈时间依赖性上调,其中各肥大基因在 Ang II 处理 NRCMs 第 24 小时时相比处理第 0 小时时差异最显著。同时,IP3R、FUNDC1、PACS-2 蛋白的表达水平均呈现了时间依赖性下调,其中 PACS-2 蛋白的表达水平在 Ang II 处理 24 h 后下调最为明显。以上的结果均表明,Ang II 处理能抑制 NRCMs 中 MAM 相关蛋白的表达,诱导心肌肥大。真核细胞内存在多种蛋白降解的途径,包括泛素化降解、细胞自噬以及非编码 RNA 靶向导致的降解等,探究 PACS-2 蛋白在心肌肥大中下降的机制及其具体的调控机制,对于心肌肥大发病机制及其新的治疗方案的研究至关重要。PACS-2 作为 MAMs 的关键结构蛋白之一,其缺失会破坏 MAMs 结构和功能完整性<sup>[17-18]</sup>。本研究中以高浓度(1.5  $\mu$ mol/L)的 Ang II 处理 NRCMs 以后,心肌肥大基因 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 的表达水平均呈时间依赖性上调,并且细胞质中 PACS-2 蛋白呈现时间依赖性下调,提示 PACS-2 蛋白是心肌肥大的负调节剂。为了进一步探究 PACS-2 的功能,本研究通过转染 si-PACS-2 以敲低 NRCMs 中 PACS-2 基因的表达,并采用低浓度(0.15  $\mu$ mol/L)Ang II 处理 NRCMs,以说明敲低 PACS-2 对 NRCMs 发生心肌肥大的敏感性的影响。NRCMs 经转染 si-PACS-2 24 h 后,给予低浓度 0.15  $\mu$ mol/L 的 Ang II 处理 24 h 以后,分别进行

TRITC-鬼笔环肽染色以及 RT-qPCR 检测,结果显示,低浓度的 Ang II 就可以促进 NRCMs 细胞表面积增大,但是敲低 PACS-2 能够促进 Ang II 诱导的 NRCMs 细胞表面积明显增大;同时,低浓度 Ang II 对 NRCMs 中 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 基因表达无显著影响,而敲低 PACS-2 能促进 Ang II 诱导这 3 种心肌肥大基因的表达明显上调。以上结果说明,敲低 PACS-2 可提高 NRCMs 对 Ang II 诱导的心肌肥大的敏感性。

病理性心肌肥大的发病机制极其复杂,在病理性肥大的心脏中常常出现线粒体功能障碍、纤维化增加以及  $Ca^{2+}$  稳态失调<sup>[1,19]</sup>。研究发现,内质网和线粒体之间的  $Ca^{2+}$  转移需要 PACS-2 进行介导,而 PACS-2 的下降能导致内质网向胞浆释放  $Ca^{2+}$  增加<sup>[7,18]</sup>。因此,敲低 PACS-2 提高 NRCMs 对 Ang II 诱导的心肌肥大的敏感性的具体机制可能涉及细胞中的  $Ca^{2+}$  稳态失调。本研究针对 NRCMs 转染 si-PACS-2 再培养 24 h 后,给予低浓度 Ang II 处理 24 h,行 Fluo-4,AM 染色,结果显示,低浓度 Ang II 能促进 NRCMs 胞质  $Ca^{2+}$  水平显著增加,而敲低 PACS-2 使得这种现象更为明显。该结果说明了敲低 PACS-2 提高了 NRCMs 对于 Ang II 诱导的胞质  $Ca^{2+}$  增加的敏感性。在心肌肥大早期,PACS-2 的下降能诱导半胱氨酸蛋白酶 8 水解 B 细胞受体相关蛋白 31 产生 p20 亚基,而后者引起  $Ca^{2+}$  从内质网释放到线粒体中<sup>[20]</sup>。本研究通过敲低 NRCMs 中 PACS-2 的表达,检测到的 NRCMs 胞质  $Ca^{2+}$  水平显著增加,这种现象可能发生于心肌肥大晚期。因此,检测心肌肥大不同时期时细胞内  $Ca^{2+}$  水平,可以揭示在心肌肥大整个的发病过程中,PACS-2 对细胞内  $Ca^{2+}$  调节的具体机制。研究表明 PACS-2 参与内质网与线粒体之间  $Ca^{2+}$  的运输,可能与其介导的载货蛋白的膜运输有关<sup>[21]</sup>。因此,后续应该进一步研究在内质网与线粒体之间 PACS-2 介导的  $Ca^{2+}$  转运的具体过程,从而了解 PACS-2 在心肌肥大中的调控机制。

胞质  $Ca^{2+}$  是参与心肌肥大的重要信号分子,主要通过两种信号转导通路机制诱导核内肥大基因转录,包括钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II-组蛋白去乙酰化酶通路、钙调神经磷酸酶-活化 T 细胞核因子(NFAT)通路等<sup>[22-23]</sup>。有研究报道,G 蛋白偶联受体激酶 5 能以  $Ca^{2+}$ -CaM 依赖的方式激活 NFAT,促进肥大基因的转录<sup>[24-25]</sup>。因此推测敲低 PACS-2 也以同样的方式参与了心肌肥大的发生。本研究针

对 NRCMs 给予 CaM 拮抗剂处理 24 h 后, Ang II (0.15  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h, RT-qPCR 检测结果显示, 敲低 PACS-2 能促进 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 心肌肥大基因的上调, 而 CaM 拮抗剂抑制了这种现象。以上结果说明, 敲低 PACS-2 可以  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 依赖的方式介导心肌肥大的发生。

综上所述, 敲低 PACS-2 能增加 NRCMs 中胞质  $\text{Ca}^{2+}$  水平, 并且是以  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 依赖的方式加重 Ang II 诱导的心肌肥大的发生。但是 PACS-2 如何通过调节胞质  $\text{Ca}^{2+}$  发挥心脏保护作用还需要进一步探究。本研究为心肌肥大及持续性心肌肥大导致的心血管疾病预防和治疗提供了有效实验数据。

**作者声明:** 杨福情、敖翔、肖丹丹、刘丙岩参与了研究设计; 杨福情、王建勋、宋林参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文, 且声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- [1] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7):387-407.
- [2] AUBDOOL A A, THAKORE P, ARGUNHAN F, et al. A novel  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide analogue protects against end-organ damage in experimental hypertension, cardiac hypertrophy, and heart failure[J]. *Circulation*, 2017, 136(4):367-383.
- [3] ZOU Y Z, LIANG Y Y, GONG H, et al. Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*, 2011, 58(6):1099-1110.
- [4] ZHAO G J, ZHAO C L, OUYANG S, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOX5 (NADPH oxidase 5) exaggerates cardiac hypertrophy through reactive oxygen species production[J]. *Hypertension*, 2020, 76(3):827-838.
- [5] CSORDÁS G, RENKEN C, VÁRNAI P, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria[J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7):915-921.
- [6] PERRONE M, CAROCCIA N, GENOVESE I, et al. The role of mitochondria-associated membranes in cellular homeostasis and diseases[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2020, 350:119-196.
- [7] YANG M. Mitochondria-associated membranes (MAMs): A novel therapeutic target for treating metabolic syndrome[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(7):1347-1362.
- [8] GAO P, YAN Z C, ZHU Z M. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in cardiovascular diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:604240.
- [9] SIMMEN T, ASLAN J E, BLAGOVESHCHENSKAYA A D, et al. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis[J]. *EMBO J*, 2005, 24(4):717-729.
- [10] OKA T, AKAZAWA H, NAITO A T, et al. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: Maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure[J]. *Circ Res*, 2014, 114(3):565-571.
- [11] GUO J, MIHIC A, WU J, et al. Canopy 2 attenuates the transition from compensatory hypertrophy to dilated heart failure in hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(37):2530-2540.
- [12] PAILLARD M, TUBBS E, THIEBAUT P A, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury[J]. *Circulation*, 2013, 128(14):1555-1565.
- [13] WALTERS A M, PORTER G A Jr, BROOKES P S. Mitochondria as a drug target in ischemic heart disease and cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2012, 111(9):1222-1236.
- [14] HAYASHI T, RIZZUTO R, HAJNOCZKY G, et al. MAM: More than just a housekeeper[J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2):81-88.
- [15] HERNÁNDEZ-ALVAREZ M I, SEBASTIÁN D, VIVES S, et al. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease[J]. *Cell*, 2019, 177(4):881-895.
- [16] WU S N, LU Q L, WANG Q L, et al. Binding of FUN14 domain containing 1 with inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes maintains mitochondrial dynamics and function in hearts *in vivo*[J]. *Circulation*, 2017, 136(23):2248-2266.
- [17] ARRUDA A P, PERS B M, PARLAKGÜL G, et al. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity[J]. *Nat Med*, 2014, 20(12):1427-1435.
- [18] YU S J, ZHANG L P, LIU C, et al. PACS<sub>2</sub> is required for oxLDL-induced endothelial cell apoptosis by regulating mitochondria-associated ER membrane formation and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  elevation[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 379(2):191-202.
- [19] VAN BERLO J H, MAILLET M, MOKKENTIN J D. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1):37-45.
- [20] BRECKENRIDGE D G, STOJANOVIC M, MARCELLUS R C, et al. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol[J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(7):1115-1127.
- [21] LI C R, LI L, YANG M, et al. PACS-2: A key regulator of mitochondria-associated membranes (MAMs)[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160:105080.
- [22] KUMAR S, WANG G, LIU W J, et al. Hypoxia-induced mitogenic factor promotes cardiac hypertrophy via calcium-dependent and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mechanisms[J]. *Hypertension*, 2018, 72(2):331-342.

**伦理批准和动物权利声明:**本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL-27294)。所有实验过程均遵照动物实验的“3R”原则及《关于善待实验动物的指导性意见》的条例进行。

**作者声明:**夏斐斐、宋冰雪、宋雨晴、辛辉、梁惠参与了研究设计;夏斐斐、宋冰雪、田嘉伟、闫慧、黄玉晓参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] BELTRÁN ROMERO L M, VALLEJO-VAZ A J, MUÑIZ GRIJALVO O. Cerebrovascular disease and statins[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021,8:778740.
- [2] PRICE J C, TIEN P C. Editorial: Statins and liver disease: Is it time to recommend statins to prevent liver disease progression? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017,112(10):1506-1507.
- [3] 朱纪斌. 阿托伐他汀所致不良反应及临床合理用药分析[J]. *中国医药科学*, 2019,9(9):71-73.
- [4] YU M L, LIU M X, LUO J, et al. Liver injury induced by statins combined with anti-tuberculosis drugs in rats[J]. *Pcar*, 2019,19(2):98-110.
- [5] LICATA A, GIAMMANCO A, MINISSALE M G, et al. Liver and statins: A critical appraisal of the evidence[J]. *Curr Med Chem*, 2018,25(42):5835-5846.
- [6] 付侯萧,黄旭,吕童,等. 阿托伐他汀在致死型约氏疟原虫感染的肝脏病理损伤中的作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019,35(9):1042-1046.
- [7] 王可欣. 阿托伐他汀对阿霉素致大鼠肝脏损伤的保护作用及其机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2018.
- [8] 苏萍,陈影,张广平,等. 阿托伐他汀的肝毒性机制研究[J]. *药物评价研究*, 2019,42(11):2174-2179.
- [9] 于红红,高晓燕. 护肝片对药物性肝损伤的防治作用[J]. *中国现代应用药学*, 2019,36(18):2271-2274.
- [10] 喻明丽,陈洁,陈永刚,等. 他汀类药物致肝损伤的生化特征[J]. *昆明医科大学学报*, 2018,39(8):13-17.
- [11] 宋佳,王春霞,张育才. 肝损伤新型生物学标记物的研究进展[J]. *中国小儿急救医学*, 2019,26(7):523-526.
- [12] FARAG M M, MOHAMED M B, YOUSSEF E A. Assessment of hepatic function, oxidant/antioxidant status, and histopathological changes in rats treated with atorvastatin: Effect of dose and acute intoxication with acetaminophen[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015,34(8):828-837.
- [13] MOTAWI T K, TELEB Z A, EL-BOGHADADY N A, et al. Effect of simvastatin and naringenin coadministration on rat liver DNA fragmentation and cytochrome P450 activity: An *in vivo* and *in vitro* study[J]. *J Physiol Biochem*, 2014,70(1):225-237.

- [14] KARAHALIL B, HARE E, KOÇXE; G, et al. Hepatotoxicity associated with statins[J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2017,68(4):254-260.
- [15] WANG J Q, LI L L, HU A, et al. Inhibition of ASGR1 decreases lipid levels by promoting cholesterol excretion[J]. *Nature*, 2022,608(7922):413-420.
- [16] 吴军. 他汀类药物临床多效性研究进展[J]. *药品评价*, 2020,17(1):24-25,53.
- [17] SAHA A, GARG A. Severe liver injury associated with high-dose atorvastatin therapy[J]. *J Investig Med High Impact Case Rep*, 2021,9:23247096211014050.
- [18] 陈步宽. 他汀类药物致肝损伤临床特点及影响因素分析[J]. *肝脏*, 2017,22(10):885-887,903.
- [19] TRAUNER M, FUCHS C D, HALILBASIC E, et al. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis[J]. *Hepatology*, 2017,65(4):1393-1404.
- [20] KIM K H, CHOI J M, LI F, et al. Xenobiotic nuclear receptor signaling determines molecular pathogenesis of progressive familial intrahepatic cholestasis[J]. *Endocrinology*, 2018,159(6):2435-2446.
- [21] WANG Y Q, AOKI H, YANG J, et al. The role of S1PR2 in bile acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice: Bile acids, S1PR2 and cholestasis[J]. *Hepatology*, 2017,65(6):2005-2018.
- [22] NICOLI E R, HUEBECKER M, SMITH D, et al. Differential response of the liver to bile acid treatment in a mouse model of Niemann-Pick disease type C[J]. *Wellcome Open Res*, 2017,2:76.
- [23] MELO A C, SANTOS VALENÇA S, GITIRANA L B, et al. Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013,17(1):57-64.
- [24] 康雷,林孝威,王国栋,等. 药物性肝损伤药理学实践探索[J]. *中国药师*, 2017,20(11):2025-2029.
- [25] 叶晓莉,王凌,蒋学华. 茵三疏对利福平致药物性肝损伤的保护作用及机制[J]. *华西药学杂志*, 2018,33(5):501-503.
- [26] 李晓玲,孙凤霞,王琮,等. 多药耐药相关蛋白 2 及其与胆汁淤积的关系研究[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2018,45(1):48-50.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 382 页)

- [23] LV L F, LI T Y, LI X L, et al. The lncRNA Plscr4 controls cardiac hypertrophy by regulating miR-214[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018,10:387-397.
- [24] HULLMANN J E, GRISANTI L A, MAKAREWICH C A, et al. GRK5-mediated exacerbation of pathological cardiac hypertrophy involves facilitation of nuclear NFAT activity[J].

*Circ Res*, 2014,115(12):976-985.

- [25] COLEMAN R C, EGUCHI A, LIEU M, et al. A peptide of the N terminus of GRK5 attenuates pressure-overload hypertrophy and heart failure [J]. *Sci Signal*, 2021,14(676):eabb5968.

(本文编辑 耿波 厉建强)