

## 高血压与心脏病

DOI: 10.11699/cyx20131208

## 成年小鼠实验性心肌梗死后胚胎基因 Tbx18 的表达情况

汪 浩, 李晓群, 翁敏杰, 高凌志, 杜建霖, 余 强

(重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 重庆 400010)

**【摘要】目的:**检测实验性心肌梗死后成年小鼠胚胎基因 Tbx18 的表达情况, 了解成年小鼠心肌损伤后胚胎基因 Tbx18 的时空表达特点。**方法:**90 只 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组(sham 组)及心梗组, 用右侧卧位结扎冠状动脉左前降支的方法建立成年小鼠心肌梗死模型, 分别用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测小鼠心肌梗死后 1、3、5、7 d 心脏梗死和周边区 Tbx18 mRNA 及蛋白表达情况, 并与假手术组相比较。**结果:**手术组梗死及周边区心肌组织 Tbx18 mRNA 在心梗后 3 d 及 5 d 较假手术组有明显升高( $F$  值分别为 2 778.88、462.36,  $P$  值均=0.000); 心梗后小鼠心肌组织 Tbx18 蛋白表达水平在心梗后 3 d 及 5 d 明显升高(与心梗后 1 d 相比,  $t$  值分别为 7.982、9.307,  $P$  值均=0.000), 同 PCR 结果相符; 心梗后 3 d 及 5 d 免疫荧光结果提示表达部位主要位于梗死区及其周边区域。**结论:**成年小鼠心肌梗死后胚胎基因 Tbx18 有一过性激活, 心梗后 3 d 及 5 d 表达明显, 其表达部位主要在梗死及周边区域。

**【关键词】**心肌梗死; Tbx18; 胚胎基因**【中国图书分类法分类号】**R542.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-09-20

## Expressions of embryo gene Tbx18 in adult mice after experimental myocardial infarction

WANG Hao, LI Xiaoqun, WENG Minjie, GAO Lingzhi, DU Jianlin, SHE Qiang

(Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To examine expressions of embryo gene Tbx18 in adult mice after experimental myocardial infarction (MI) and to study the spatiotemporal characteristics of embryo gene Tbx18 from adult mice with injured myocardium. **Methods:** Totally 90 C57BL/6 mice were divided into sham group and MI group randomly. MI model of adult mice was induced by ligating the left anterior descending coronary artery on right lateral position. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were respectively used to measure the mRNA and protein expressions of Tbx18 in infarction and adjacent area of MI group on 1, 3, 5, 7 d after operation, and comparison was made between MI group and sham group. **Results:** PCR results indicated a remarkable increase of Tbx18 mRNA in infarction and its adjacent tissues of MI group on 3, 5 d after operation compared with those in sham group ( $F=2\,778.88$ ,  $P=0.000$ ;  $F=462.36$ ,  $P=0.000$ ). Results of Western blot showed that expressions of Tbx18 protein in mice infarction tissues reached the peak on 3, 5 d after operation (compared those on 1 d after operation,  $t=7.982$ ,  $P=0.000$ ;  $t=9.307$ ,  $P=0.000$ ), which was consistent with PCR results. Immunofluorescence results on 3, 5 d after operation revealed that the expression area mainly located at infarction and its adjacent area. **Conclusions:** A transient activation of embryo gene Tbx18 exists at infarction and its peripheral area in the adult mice with MI, especially on 3, 5 d after operation.

**【Key words】**myocardial infarction; Tbx18; embryo gene

心肌梗死严重威胁着人类健康, 其原因在于无法使损伤的心脏有效修复及再生。现研究表明胚胎心外膜基因的激活可能与心脏损伤后血管及心肌细胞的修复与再生有关<sup>[1-3]</sup>。Tbx18 作为一种胚胎心

外膜基因, 参与心脏发育过程中窦房结、室间隔、心室壁及冠状动脉的形成<sup>[4-5]</sup>, 其可能参与心脏损伤后心肌及血管的再生与修复。关于斑马鱼的研究表明, 斑马鱼心脏损伤后胚胎基因 Tbx18 表达明显增高, 且这可能与心脏损伤后完全性修复及再生能力有关<sup>[6-7]</sup>。现有研究提到小鼠心肌梗死后有 Wt1 及 Tbx18 表达增高<sup>[8]</sup>, 但心梗后 Tbx18 的时空表达情况尚不清楚。本文采用成年小鼠建立心肌梗死模型, 在模型成功的基础上观察心梗后不同时间点胚胎基因 Tbx18 的表达情况及其表达的部位, 旨在揭示

作者介绍: 汪 浩, Email: wanghaojanefall@163.com,

研究方向: 心脏发育与再生。

通信作者: 余 强, Email: qshe98@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: NSFC. 30971213);

重庆市卫生局重点资助项目(编号: 2009-1-13); 重庆医

科大学校级重点项目(编号: XBZD.201010)。

哺乳动物心肌梗死后胚胎基因 Tbx18 的时空表达特点,为探索其与心脏损伤后再生及修复的关系打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

肌钙蛋白检测试剂盒(上海化学试剂公司), Trizol、RNase-free (TakaRa 公司), PCR 试剂盒、全蛋白提取试剂盒及聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(Sigma 公司), 山羊抗小鼠 Tbx18 多克隆抗体(Santa Cruz 生物技术公司), 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗及 Cy3-标记驴抗山羊 IgG 二抗(碧云天生物技术研究所), 山羊血清、OCT、TritonX-100(北京鼎国公司), 多聚甲醛、蔗糖、NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  等(上海化学试剂公司), 6-0 及 8-0 带线缝合针、三角缝合针及皮肤缝线(重庆医药公司)。

### 1.2 动物模型的建立及分组

90 只重 25~30 g 野生型清洁级 C57BL/6 小鼠, 雌雄不分, 购自重庆医科大学实验动物中心, 随机分为假手术组(sham 组)30 只、心梗组 60 只。心梗组小鼠称质量, 腹腔注射 10%水合氯醛(40 mg/kg), 并肌注 2 万 U 青霉素, 麻醉后固定四肢, 备皮消毒, 气管插管接呼吸机(调整好呼吸频率、呼吸比、潮气量), 取右侧卧位于胸骨左缘第 3、4 肋间打开胸腔, 剪开心包, 8-0 带线缝合针结扎左冠状动脉前降支中 1/3 段, 结扎后 1~2 min 观察左心室前壁颜色变化来初步确定模型是否成功, 6-0 带线缝合针关胸, 待小鼠自主呼吸恢复后拔除气管插管, 行气管缝合。术后立即做小鼠心电图, 且术后 6~24 h 经小鼠眼部内眦静脉取血约 0.5 ml, 立刻用肌钙蛋白检测试剂盒检测 cTnT。术后 3 d 每天均需肌注青霉素 2 万 U 2、3 次, 并对皮肤切口消毒擦洗。假手术组为左冠状动脉前降支只穿线, 不结扎, 余处理同心梗组。

### 1.3 荧光定量 PCR

引物合成由上海生工生物工程有限公司完成, 以 GAPDH 为内参, GAPDH 上游引物: AAATGCTGAAGGTCG-GTGTGAAC, 下游引物: CAACAATCTCCACTTTGCCACTG; TBX18 上游引物: ATCCCTGGAATCCCAAAGCAA, 下游引物: ATCCAGACAACAGGTGAGGATGTG。无菌无酶操作下分别取假手术组及心梗组术后不同天数小鼠梗死及周边区域心肌组织, 剪碎, 用 Trizol 法提取总 RNA(具体步骤参见试剂说明书)。取 5  $\mu\text{l}$  总 RNA 逆转录成 20  $\mu\text{l}$  cDNA(反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s), -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。以 cDNA 作为 PCR 反应模板, 进行 Tbx18 基因扩增(扩增条件: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 退火 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 终末延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 共 36 个循环)。按照 ShineSYBR real-time PCR fermentas 试剂盒说明书进行荧光定量扩增, 根据 Ct 值读出起始模板量, 所有样品均为 3 个平行, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法分析基因的相对表达水平。

### 1.4 Western blot 检测

取心梗组不同天数小鼠梗死区及周边区域心肌组织约 100 g, 提取蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳并将蛋白转至 PVDF

膜上, 5%脱脂奶粉封闭, 室温孵育 2 h 后弃去封闭液, 加入山羊抗小鼠 Tbx18 多克隆抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 弃去二抗, 用 TBST 洗涤。将膜与显影剂混合, 在凝胶显影仪中显影。用凝胶成像分析系统中的 Quantity One 软件分别测得 Tbx18 和 GAPDH 的吸光度, 计算 Tbx18 和 GAPDH 条带的光密度比值, 作为 Tbx18 蛋白的相对含量。

### 1.5 组织免疫荧光染色

取假手术组 1 d 及心梗组术后 3 d 和 5 d 小鼠心脏于 4%多聚甲醛中 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜, 蔗糖脱水后 OCT 包埋, 冰冻切片(10  $\mu\text{m}$ ), -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。实验前取出切片, 空气中干燥 15 min, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 5 min 后, 0.5%TritonX-100 破膜, PBS 洗涤后, 5%BSA 封闭, 按 1:50 比例孵育一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 洗 3  $\times$  5 min, Cy3-标记驴抗山羊 IgG 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBS 洗 2  $\times$  5 min 后 50%甘油封片, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光分布情况。

### 1.6 统计学处理

应用 SAS 8.0 统计软件进行统计分析。计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, Tbx18 mRNA 表达量数据比较采用析因设计的方差分析, Tbx18 蛋白表达量数据比较采用完全随机设计的方差分析, 其中两两比较采用 SNK- $q$  法。以  $P \leq 0.05$  时认为差异有统计学意义。

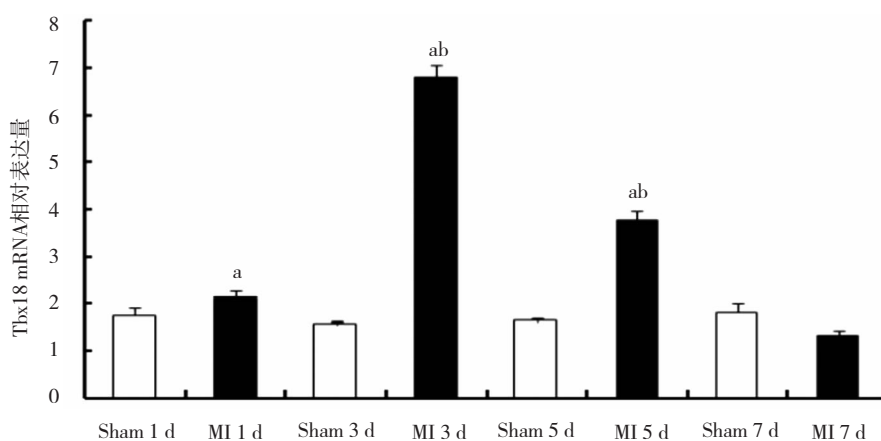
## 2 结果

### 2.1 小鼠心肌梗死模型建立情况

采用上述右侧卧位开胸结扎冠状动脉前降支的方法建立小鼠心肌梗死模型, 心梗组小鼠术中在结扎冠状动脉后约 1~2 min 可见左心室前壁局部变苍白, 而假手术组小鼠在术中未观察到左心室前壁颜色有明显变化。建模成功的心梗组小鼠术后心电图表现为一过性 ST 段弓背向上抬高, 且术后 6~24 h 内肌钙蛋白检测试剂盒检测结果为阳性。剔除中途死亡的小鼠, 最终完成实验的为: 假手术组 26 只, 心梗组 44 只。

### 2.2 各组不同时间点 Tbx18 mRNA 的表达

分别于假手术组及心梗组术后 1、3、5、7 d 各处死 5 只小鼠, 共分为 8 个小组, 取梗死及周边区域心肌组织行 real-time PCR 检测, 其 Tbx18 mRNA 表达情况如下(图 1、表 1): 假手术组各天数均仅有极少量 Tbx18 mRNA 的表达, 各时间点间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 心梗组术后各时间点间比较, Tbx18 mRNA 表达量有明显差异( $F=1182.03$ ,  $P=0.000$ )。心梗后 1 d Tbx18 mRNA 表达量开始增高(与假手术组 1 d 比较,  $F=15.60$ ,  $P=0.000$ ); 心梗后 3 d Tbx18 mRNA 表达量达高峰(与假手术组 3 d 比较,  $F=2778.88$ ,  $P=0.000$ ; 与心梗后 1 d 比较,  $F=2196.51$ ,  $P=0.000$ ); 心梗后 5 d Tbx18 mRNA 表达量开始下降(与心梗后 3 d 比较,  $F=935.72$ ,  $P=0.000$ ), 但仍明显高于假手术组及心梗后 1 d 组(与假手术组 5 d 比较,  $F=462.36$ ,  $P=0.000$ ; 与心梗后 1 d 比较,  $F=264.96$ ,  $P=0.000$ ); 心梗后 7 d, Tbx18 mRNA 表达量下降至低于假手术组水平( $F=24.79$ ,  $P=0.000$ )。



a:  $P < 0.01$ , 与同时点假手术组相比; b:  $P < 0.01$ , 与心梗后 1 d 相比; MI: 心梗组; Sham: 假手术组

图 1 假手术组及心梗组术后 1、3、5、7 d Tbx18 mRNA 相对表达水平

Fig.1 Relative expression levels of Tbx18 mRNA in the cardiac muscles of sham group and MI group on 1, 3, 5 d after the operation

表 1 各组不同时间点小鼠心肌组织 Tbx18 mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

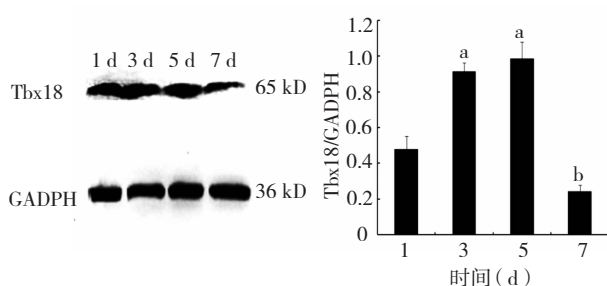
Tab.1 Relative expressions of Tbx18 mRNA in mouse myocardial tissues in different groups at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 只数 (n) | 1 d                   | 3 d                   | 5 d                   | 7 d                   |
|------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 假手术组 | 20     | 1.748 9 $\pm$ 0.169 6 | 1.560 2 $\pm$ 0.057 8 | 1.622 1 $\pm$ 0.081 4 | 1.823 5 $\pm$ 0.193 0 |
| 心梗组  | 20     | 2.141 5 $\pm$ 0.127 2 | 6.800 4 $\pm$ 0.246 9 | 3.759 6 $\pm$ 0.191 7 | 1.328 5 $\pm$ 0.088 1 |

注: 假手术组各时间点比较,  $P > 0.05$ ; 心梗组各时间点比较,  $P < 0.01$ ; 各时间点心梗组与假手术组比较,  $P < 0.01$

### 2.3 心梗后不同天数 Tbx18 蛋白的表达

为进一步从蛋白水平了解心梗后 Tbx18 的表达情况, 取心梗组术后 1、3、5、7 d 各 3 只小鼠梗死及梗死周边区域心肌组织提取蛋白行 Western blot 检测, 并对条带进行光密度分析, 结果见图 2。成年小鼠心梗后有 Tbx18 蛋白表达, 且随着天数的递增, Tbx18 蛋白条带呈先增强后减弱的趋势, 其中心梗后 3 d (蛋白相对表达量为  $0.913 3 \pm 0.049 7$ ) 及 5 d (相对表达量为  $0.985 4 \pm 0.094 5$ ) Tbx18 蛋白表达量达高峰, 较心梗后 1 d (相对表达量为  $0.478 7 \pm 0.072 1$ ) 有明显增高 (采用 SNK 法,  $q$  值分别为 7.981 5, 9.306 7,  $P$  值均 = 0.000), 至心梗后 7 d Tbx18 蛋白表达量明显降低 (相对表达量为  $0.242 8 \pm 0.035 3$ , 与心梗后 3 d 及 5 d 比较,  $q$  值分别为 12.315 0, 13.640 2,  $P$  值均  $< 0.0001$ ), 与 real-time PCR 结果相符。



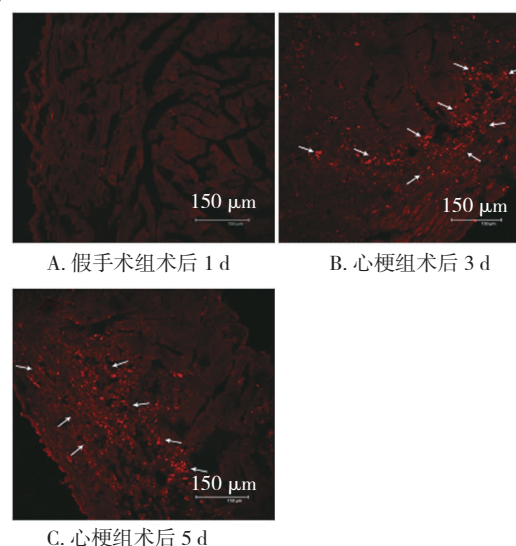
a:  $P < 0.01$ , 与心梗后 1 d 相比; b:  $P < 0.01$ , 与心梗后 3 d 及 5 d 相比

图 2 心梗组术后 1、3、5、7 d 心脏 Tbx18 蛋白的表达

Fig.2 Expressions of Tbx18 protein in mouse myocardial tissues on 1, 3, 5 d after the operation of myocardial infarction

### 2.4 心梗后 Tbx18 蛋白表达的定位

为了解心梗后 Tbx18 蛋白表达主要部位, 取心梗组术后 3 d 及 5 d 心脏组织切片行组织免疫荧光染色, 观察 Tbx18 蛋白表达情况, 并与假手术组术后 1 d 小鼠心脏比较 (图 3): 假手术组未见明显 Tbx18 的表达, 心梗组术后 3 d 及 5 d 均有明显 Tbx18 蛋白表达, 表达部位主要位于梗死区及梗死周边区。



箭头所示区域为 Tbx18 主要表达部位

图 3 假手术组及心梗组术后 3、5 d 小鼠心脏免疫荧光染色

Fig.3 Location of Tbx18 protein in mouse cardiac muscles of sham group on 3, 5 d after the operation of myocardial infarction by indirect immunofluorescence staining

### 3 讨 论

T-box 基因是一类可编码调节多种动物发育阶段信号转导的转录因子家族,其中 Tbx2、Tbx3、Tbx5、Tbx18、Tbx20 等亚型对心脏的发育形成起重要作用<sup>[4-5,9-13]</sup>。Tbx18 是 T-box 基因家族成员,由于其主要在胚胎期心外膜表达,同 Wt1、Tcf21 等一样,为心外膜标志物之一。除心外膜外,Tbx18 在小鼠胚胎期体节、四肢也有表达,而在成年期小鼠心脏中几乎无表达<sup>[14]</sup>。研究表明 Tbx18 对脊椎动物心脏窦房结形成及分化起重要作用<sup>[4,15]</sup>,且 Tbx18<sup>+</sup>细胞参与窦房结、心房肌、室间隔、心室肌、冠状动脉等的形成<sup>[5,16]</sup>。

心脏在各种应激因素诸如心肌梗死、心力衰竭等情况下常出现胚胎基因的重新激活<sup>[17]</sup>,现有观点认为心脏损伤后胚胎心外膜基因的再激活与损伤后血管及心肌的再生及修复密切相关<sup>[1-3,18]</sup>。近年研究表明,成年斑马鱼心肌损伤后再生能力与 Tbx18 的再表达及表达细胞迁移到损伤部位并形成心肌细胞有关<sup>[6-7]</sup>。哺乳动物心脏损伤后,国外有人报道过有胚胎心外膜基因 Tbx18 及 Wt1 的再表达,且 Wt1 在哺乳动物心梗后表达部位及情况已有相关研究<sup>[8,19-20]</sup>,但关于 Tbx18 在哺乳动物心脏损伤后的时空表达情况尚不清楚。

本实验研究中,采用右侧卧位横切口结扎冠状动脉左前降支的方法高效成功地建立成年小鼠心肌梗死模型,在模型成功的基础上,从 mRNA 及蛋白水平检测心梗后不同时间点 Tbx18 的表达情况,结果提示心梗后有一过性 Tbx18 表达增高,以心梗后 3 d 及 5 d 最明显;组织免疫荧光结果提示心梗后 Tbx18 蛋白表达部位主要位于梗死及周边区域。在哺乳动物中,研究表明胸腺肽- $\beta 4$  可以通过激活 Wt1<sup>+</sup>细胞促进心脏再生及修复<sup>[8,21]</sup>。结合 Tbx18 对心脏发育的重要作用及其与斑马鱼心脏再生的关系,推测小鼠心肌梗死后 Tbx18 的激活有可能为损伤后保护性胚胎心外膜基因激活,但可能由于表达量不够或者持续时间不够等原因,不足以使损伤的心脏再生。

近年有许多关于心血管再生治疗的研究,其中心脏谱系胚胎干细胞治疗及内源性再生机制的激活颇受关注<sup>[22]</sup>。Tbx18 阳性心外膜祖细胞参与窦房结、心房肌、室间隔、心室肌、冠状动脉、瓣膜等的形成,且有研究表明其可体外诱导分化为平滑肌细胞及心肌细胞<sup>[5,16]</sup>,故进一步研究心脏损伤后胚胎基因

Tbx18 激活的机制及其与心脏再生及修复的关系很可能对探讨 Tbx18 阳性心外膜祖细胞治疗心脏损伤意义重大。本实验研究了成年小鼠心肌梗死后病理状态下胚胎基因 Tbx18 的表达情况,证实了心梗后其有一过性激活,并研究了其时空表达特点,为探索其与心脏损伤后再生及修复的关系作了基础性的工作,但心梗后胚胎基因 Tbx18 激活的机制及其激活与心脏再生的确切联系尚需进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Gittenberger-de Groot A C, Winter E M, Poelmann R E. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(5): 1056-1060.
- [2] Russell J L, Goetsch S C, Gaiano N R, et al. A dynamic Notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis-repair[J]. *Circ Res*, 2011, 108(1): 51-59.
- [3] Smart N, Riley P R. The epicardium as a candidate for heart regeneration[J]. *Future Cardiol*, 2012, 8(1): 53-69.
- [4] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3[J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 388-397.
- [5] Cai C L, Martin J C, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 104-108.
- [6] Lepilina A, Coon A N, Kikuchi K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration[J]. *Cell*, 2006, 127(3): 607-619.
- [7] Wills A A, Holdway J E, Major R J, et al. Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish[J]. *Development*, 2008, 135(1): 183-192.
- [8] Smart N, Bollini S, Dubé K N, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury[J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 640-644.
- [9] Liu J, Stainier D Y. Tbx5 and Bmp signaling are essential for proepicardium specification in zebrafish[J]. *Circ Res*, 2010, 106(12): 1818-1828.
- [10] Bakker M L, Boukens B J, Mommersteeg M T, et al. Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system[J]. *Circ Res*, 2008, 102(11): 1340-1349.
- [11] Christoffels V M, Grieskamp T, Norden J, et al. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors[J]. *Nature*, 2009, 458(7240): E8-E9.
- [12] Plageman T F Jr, Yutzey K E. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 19026-19034.
- [13] Christoffels V M, Hoogaars W M, Tessari A, et al. T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers[J]. *Dev Dyn*, 2004, 229(4): 763-770.
- [14] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18[J]. *Mech Dev*, 2001, 100(1): 83-86.