

慢性心力衰竭患者心肌热休克蛋白 47 的表达及其与纤维化的相关性研究

田倪妮¹, 魏玲¹, 李宏键², 陈韦强¹, 倪茂娥³, 阮光萍⁴, 杨晓华¹

(1. 成都军区昆明总医院地方干部病房, 云南省昆明市 650032; 2. 云南省第一人民医院骨科, 云南省昆明市 650034; 3. 云南省开远市人民医院儿科, 云南省开远市 661600; 4. 云南省干细胞工程试验室, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 热休克蛋白 47; 慢性心力衰竭; 实时荧光定量聚合酶链反应; 心肌纤维化; 心室重构

[摘要] **目的** 热休克蛋白 47(HSP47)是一种高度保守的分子蛋白,被认为是胶原的特异性分子伴侣,在胶原合成及纤维化中发挥着重要的作用。本文探讨心室重构在慢性心力衰竭患者中的分子机制。**方法** 手术病人取血清及组织标本各 60 例,分为 3 组:心功能 1 级组、心功能 2 级组、心功能 3 级组,每组 20 例。采用实时荧光定量(RT-PCR)方法检测 HSP47 的 mRNA 表达量,并且运用酶联免疫吸附法测定上述 60 例患者血清 HSP47、I 型前胶原羧基末端前肽(P I CP)浓度。**结果** (1)与心功能 1 级组比较,HSP47 mRNA 水平在心功能 2 级组、心功能 3 级组的心肌组织中表达明显增加($P < 0.05$),且在心功能 3 级组较心功能 2 级组明显增加($P < 0.05$)。(2)心肌组织中 HSP47 表达量与血清中 HSP47、P I CP 水平呈显著独立正相关($r = 0.704, P < 0.05; r = 0.811, P < 0.05$)。**结论** HSP47 mRNA 在慢性心力衰竭患者中表达增加,提示 HSP47 可能参与了心室重构。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study of the Expression of Heat Shock Protein 47 and Its Correlation to Myocardial Fibrosis in Atrial Tissues with Chronic Heart Failure

TIAN Ni-Ni¹, WEI Ling¹, LI Hong-Jian², CHEN Wei-Qiang¹, NI Mao-E³, RUAN Guang-Ping⁴, and YANG Xiao-Hua¹

(1. Wards for Civilian Cadres, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650034, China; 3. Department of Paediatrics, the People's Hospital of Kaiyuan City, Kaiyuan, Yunnan 661600, China; 4. Stem Cell Engineering Laboratory of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

[KEY WORDS] Heat Shock Protein 47; Chronic Heart Failure; RT-PCR; Myocardial Fibrosis; Ventricular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** Heat shock protein 47 (HSP47) is a highly conservative proteint. It is considered as the pro-collagen-specific chaperone protein and plays an important function in the process of collagen deposition and fibrosis. The thesis investigates the molecular mechanisms of structural ventricular remodeling in chronic heart failure (CHF).

Methods The serum and right atrial tissues samples were taken from 60 patients with cardiac surgery. They were divided into three groups: 20 samples were in NYHA I group, 20 samples were in NYHA II group, 20 samples were in NYHA III group. The mRNA amounts of HSP47 were studied by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) method, and the HSP47 and procollagen I carboxy terminal propeptide (P I CP) in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

Results (1) The HSP47 mRNA level significantly increased in both NYHA II group and NYHA III group compared with NYHA I group ($P < 0.05$). Also the mRNA level of HSP47 significantly increased in the NYHA III group compared with NYHA II group ($P < 0.05$). (2) There were conspicuous and independent direct correlation between the expression of HSP47 and the HSP47, P I CP levels in serum ($r = 0.704, P <$

[收稿日期] 2014-09-05

[修回日期] 2014-09-21

[基金项目] 云南省自然科学基金面上项目(2010ZC175)

[作者简介] 田倪妮, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心脑血管疾病的基础及临床研究, E-mail 为 70326943@qq.com。通讯作者魏玲, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心脑血管疾病的基础及临床研究 E-mail 为 weiling43@yahoo.com.cn。李宏键, 硕士, 副主任医师, 主要从事老年运动系统疾病研究, E-mail 为 samhongjian@126.com。

0.05; $r=0.811$, $P<0.05$). **Conclusion** The HSP47 mRNA level increased in CHF, and it indicates that HSP47 gene may be involved in the ventricular remodeling.

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是一种复杂的临床综合征,是各种病因所致心脏疾病的终末阶段,是21世纪心血管领域的两大挑战之一。慢性心力衰竭的病因众多,随着对心力衰竭病理生理机制的不断认识,从最初的泵衰竭,发展到神经体液因素,到目前的分子机制^[1,2]。热休克蛋白(heat shock protein 47, HSP47)是一种非核糖体结合性分子伴侣,其在热、冷等应激状态下表达量上调^[3],故又称为应激蛋白。HSP47属于小分子量HSP家族,其分子量为47 kDa。在热休克蛋白家族中HSP47是唯一的胶原特异性分子伴侣,HSP47在细胞内质网中参与前胶原的分泌、合成、加工、折叠,监控着胶原蛋白质量,避免了结构错误的前胶原的产生和分泌^[4,5]。目前国内外对热休克蛋白47在慢性心力衰竭患者心室重构的作用知之甚少。故本实验中我们采用实时荧光定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)两种方法检测不同心功能分级的患者心肌组织HSP47 mRNA的相对表达量及血清中HSP47、I型前胶原羧基末端前肽(procollagen I carboxy terminal propeptide, P I CP)的差异,探讨慢性心力衰竭患者心肌HSP47基因在病情进展中的作用。

1 材料及方法

1.1 实验材料及分组

实验样本采集于成都军区昆明总医院2012年7月至2013年7月心胸外科建立体外循环下心脏手术患者心肌脱落组织,共60例。分为3组:心功能1级组、心功能2级组、心功能3级组,每组20例。所有病例均排外心肌梗死、严重肝肾功能不全、严重肺部感染、大面积脑梗死等可能影响实验结果的疾病。

1.2 主要试剂和仪器

高纯度总RNA快速提取试剂盒(离心柱)型、逆转录试剂盒、4.2×SYBR real-time PCR premixture(北京百泰克生物技术有限公司);HSP47及P I CP ELISA试剂盒(美国ADL公司);Bio-RAD CFX96-C1000荧光定量PCR系统(美国Applied Biosystems公司);UVP凝胶成像系统及图像分析系统(美国

Biorad公司)。

1.3 心肌组织 mRNA 的提取

按照试剂盒说明书提取心肌组织mRNA。运用凝胶电泳方法(1%琼脂糖)及紫外分光光度仪检测、提取mRNA,将mRNA保存于-80℃冰箱中备用^[4]。

1.4 逆转录获得 cDNA

在200 μL薄壁PCR管中配制RT-PCR反应混合液(20 μL体系)。在PCR仪上按如下条件进行反转录反应:42℃ 50 min,70℃ 10 min,随即冰上冷却,得到的cDNA可以直接用于后续的PCR等反应,也可以-20℃冻存以备以后使用。

1.5 RT-PCR 扩增 HSP47

引物的设计与合成由上海生工生物工程技术公司完成。目的基因引物片段约115 bp,磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物片段约125 bp,引物的设计合成见表1。

表1. 目的基因及内参引物

Table 1. The primers of target gene and GAPDH

基 因	引物序列(5'→3')	退火温度	引物长度
HSP47	F5'-ATCCCAACCTCTCCCACT-3' R5'-ACGATGCTTCTTGACCGA-3'	61℃	115 bp
GAPDH	F5'-AAGGGTCATCATCATCTCTGCG-3' F5'-GAGGCTGTGTGCATACTTCAT-3'	57℃	125 bp

HSP47 mRNA 目的基因的扩增:RT-PCR反应(20 μL反应体系),对每个循环的系统荧光强度进行荧光检测,并通过分析荧光强度达到等量检测的目的;RT-PCR扩增条件:95℃ 2 min起始模板变性、95℃ 45 s模板变性(循环数1);61℃ 5 s退火、72℃ 1 min延伸(循环数35);72℃ 10 min延伸(循环数1)。

收集数据,测定各管的Ct值,设定无cDNA样品的空白管作为阴性对照管,将心功能1级组患者作为对照组。

1.6 ELISA 法检测血清中 HSP47、P I CP 含量

用ELISA方法检测血清中HSP47、P I CP含量:(1)于波长为450 nm的酶标仪上读出各孔的光密度(optical density, OD)值;(2)以吸收光OD值为纵坐标(Y),标准孔相应的HSP47、P I CP为横坐标(X),在对数坐标上绘制标准曲线;(3)样品的HSP47、P I CP含量由标准曲线换算出浓度。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 检验各组变量正态分布, 经自然对数转换后分析非正态分布的资料。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析。分析评价两变量之间的相关性采用 Pearson 分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织 mRNA 的提取

1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 心肌组织 mRNA 纯度高, 且无 DNA 污染条带及明显降解条带, 可见 5 S、18 S、28 S 三条带(图 1)。

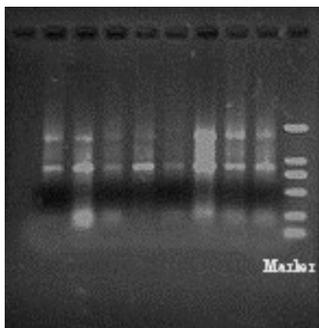


图 1. 提取的心肌组织 mRNA 电泳图

Figure 1. The gel electrophoresis of total RNA in the right atrial tissues

2.2 目的基因 PCR 产物的鉴定

半定量 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 BM 2000 DNA Marker 标记。目的基因 HSP47 及其内参 GAPDH 条带清晰, 无杂带。HSP47 目的基因条带为 115 bp, GAPDH 目的基因条带为 125 bp(图 2)。

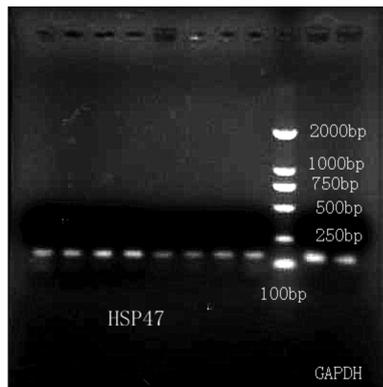


图 2. HSP47 扩增产物及 GAPDH 电泳图

Figure 2. The gel electrophoresis of HSP47 and GAPDH amplification products

2.3 RT-PCR 测定目的基因的相对表达量

溶解曲线: 每次 RT-PCR 反应结束以后, 可以得到样本和 GAPDH 的溶解曲线, 目的基因在各样本中只用一个峰, 即溶解峰, 全部样本的溶解峰非常接近, 对应的 GAPDH 产生一个溶解峰, 溶解峰所在的位子的温度为该 PCR 产物片段的溶解温度 (T_m 值), 表明 RT-PCR 只特异性产生一种扩增产物。HSP47 的溶解温度约为 84.0°C 左右, GAPDH 的溶解温度约为 78.0°C 左右(图 3)。

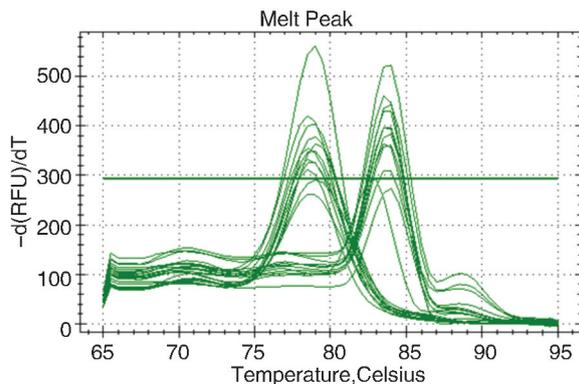


图 3. RT-PCR 后 HSP47、GAPDH 溶解曲线

Figure 3. The melting curve of HSP47 and GAPDH after RT-PCR

图 4 显示用 RT-PCR 检测的不同患者心肌组织的 HSP47 表达。可见不同心功能分级患者中 HSP47 mRNA 的相对表达量是不同的。

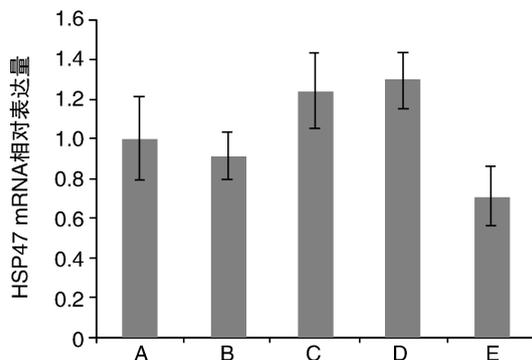


图 4. 不同患者心肌组织 HSP47 表达 A 为标准管, 赋值为 1.0; B、C、D、E 为 4 位不同心功能分级患者心肌 HSP47 mRNA 相对表达量。

Figure 4. The mRNA expression of HSP47 in different patient's right atrial tissues

2.4 各组心肌组织 HSP47 mRNA 的表达

总样本 60 例, 心功能 1 级组、心功能 2 级组、心功能 3 级组各 20 例, 用 RT-PCR 测定 HSP47 mRNA

在这3组样本中的相对表达量。经方差分析得出: HSP47 mRNA 相对表达量心功能1级组为 1.000 ± 0.005 , 心功能2级组为 1.523 ± 0.158 , 心功能3级组为 1.815 ± 0.239 。心肌中 HSP47 mRNA 表达量两两比较, 心功能3级组较心功能1级组、心功能2级组明显增加 ($P < 0.05$), 心功能2级组较心功能1级组明显增加 ($P < 0.05$) (图5)。

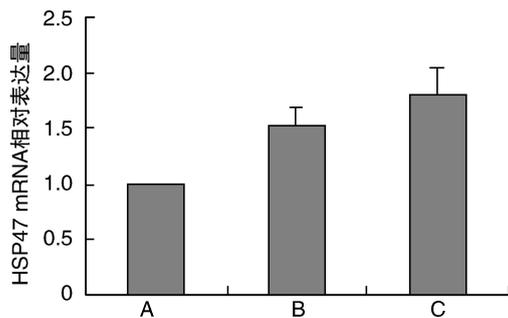


图5. 各组心肌组织 HSP47 mRNA 表达 A 为心功能1级组, B 为心功能2级组, C 为心功能3级组。

Figure 5. The expression of myocardial HSP47 mRNA

2.5 各组血清 HSP47、P I CP 水平

留取手术病人60例(心功能1级组、心功能2级组、心功能3级组各20例)静脉血, 高速离心后取血清, 以 ELISA 法测定患者血清中 HSP47、P I CP 水平(表2)。

表2. 各组血清 HSP47 和 P I CP 水平($\mu\text{g/L}$)

Table 2. The serum levels of HSP47 and P I CP in various groups ($\mu\text{g/L}$)

分组	HSP47	P I CP
心功能1级组	0.129 ± 0.081	0.324 ± 0.054
心功能2级组	0.367 ± 0.083^a	0.435 ± 0.041^a
心功能3级组	0.472 ± 0.127^{ab}	0.492 ± 0.077^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与心功能1级组比较; b 为 $P < 0.05$, 与心功能2级组比较。

2.6 相关性分析

心肌组织中 HSP47 mRNA 相对表达量与血清中 HSP47 水平均呈现正态分布, Pearson 相关分析结果显示, 心肌组织 HSP47 mRNA 与血清 HSP47 水平呈正相关 ($r = 0.704, P < 0.05$); 心肌组织中 HSP47 mRNA 相对表达量与血清 P I CP 水平亦呈正相关 ($r = 0.811, P < 0.05$)。

3 讨论

随着世界人口老龄化, 慢性心力衰竭也正在成为严重影响生命健康及生活质量的临床综合征。患者由于各种病因引起的心力衰竭常年反复发作, 心功能逐渐恶化, 直至心脏泵功能衰竭。

心室重构是由于心肌损伤或者负荷增加所致的心室大小、形状和结构改变的过程。左心室进行性扩大从而收缩能力降低, 最终导致心力衰竭。心室重构的机制是心肌细胞及其细胞外基质、胶原沉积等变化^[6]。目前已知的的心脏中胶原纤维主要有5种, 包括 I、III、IV、V、VI 型胶原, 其中以 I、III 型胶原为主, 占 90% 以上 (I 型占 80%, III 型占 12% 左右)^[7]。P I CP、P III CP N 基末端肽是胶原合成的生物学标志^[8]。本实验中不同心功能分级患者中均有 P I CP 表达, 且心功能3级患者表达的 P I CP 较心功能1、2级患者多。提示慢性心力衰竭患者随着心功能恶化, 血清中的 I 型胶原逐渐增多; I 型胶原参与了心室的重构, 是慢性心力衰竭患者心脏结构和功能改变的病理生理基础。心功能3级患者血清中 P I CP 的含量明显增多, 提示心功能3级患者心肌间胶原合成增多, 心肌硬度增大, 顺应性降低, 最终导致心室重构。

HSP47 作为胶原特异性的分子伴侣, 其特异性底物是胶原。在胶原蛋白分泌细胞的内质网中 HSP47 与胶原特异性结合, 参与胶原的装配、折叠、转运和修饰, HSP47 与合成胶原密切相关, 二者表达有空间和时间上的一致性^[9], 其表达在细胞培养^[10]、发育的胚胎组织^[11]和组织的纤维化中都一致得到证实。目前国内外的研究显示, HSP47 作为前胶原1的分子伴侣^[12,13], 在肾脏、肝脏、肺的纤维化疾病中扮演着重要的角色^[14]。本研究结果发现, 在心功能1级组、心功能2级组、心功能3级组中均有 HSP47 mRNA 表达。HSP47 mRNA 在生理情况下表达量较小, 随着心功能的逐渐恶化, 在心功能2级、3级组中相对表达量逐渐升高。随着患者心功能的恶化, 血清中的 HSP47 表达量也逐渐升高, 这与心肌内的表达量改变是一致的, 说明 HSP47 高表达与患者心力衰竭程度有关。血清 P I CP 测定结果显示, 心功能越差的患者其血清 P I CP 浓度越高。HSP47、P I CP 含量分析结果显示, 随着患者心肌组织中及血清中的 HSP47 含量增多, 沉积的 I 型胶原亦增多, 组织纤维化、心室间质胶原蛋白增多, 导致了心室重构的进一步加重。伴随 HSP47

mRNA 基因表达量的增加,使得心肌细胞内前胶原的装配、折叠、修饰、转运效率均增加。本实验中,心功能 3 级组 P I CP 分泌量明显高于心功能 1 级组及心功能 2 级组,心功能 2 级组亦高于心功能 1 级组;胶原过度沉积从而引起心肌纤维化,导致心室重构,加重了慢性心力衰竭的程度。

综上所述,HSP47 在慢性心力衰竭中起着重要作用,提示我们是否可以通过选择性抑制或阻断 HSP47 mRNA 的表达来控制慢性心力衰竭的病程进展,探索一种更为特异性和有效的方法来治疗并控制慢性心力衰竭进展,提高慢性心力衰竭患者的生活质量,减轻社会及家庭负担。

[参考文献]

- [1] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性收缩性心力衰竭治疗建议[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(1): 7-23.
- [2] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12): 1 076-095.
- [3] Rocnik EF, van de Veer E, Cao H, et al. Functional linkage between the endoplasmic reticulum protein HSP47 and procollagen expression in human vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(41): 38 571-578.
- [4] 苏瑶. 房颤患者心肌 HSP47 的表达及其与心肌纤维化的相关性研究[D]. 昆明:昆明医学院, 2010; 1-51.
- [5] Nagai N, Hosokawa M, Itohara S, et al. Embryonic lethality of molecular chaperone HSP47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis[J]. J Cell Biol, 2000, 150(6): 1 499-506.
- [6] Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, et al. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications [J]. Arq Bras Cardiol, 2009, 92 (2):

150-160.

- [7] Ono T, Miyazaki T, Ishida Y, et al. Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between HSP47 protein and collagen triple helix[J]. J Biol Chem, 2012, 287(9): 6 810-818.
- [8] Cerisano G, Pucci PD, Sulla A, et al. Relation between plasma brain natriuretic peptide, serum indexes of collagen type I turnover, and left ventricular remodeling after reper-fused acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2007, 99(5): 651-656.
- [9] Ishid AY, Nagata K. HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone [J]. Methods Enzymol, 2011, 499 (5) : 167-182.
- [10] Li M, Zheng C, Sato T, et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats [J]. Circulation, 2004, 109 (6) : 120-124.
- [11] Chrysostomakis SI, Karalis IK, Simantirakis EN, et al. Angiotensin II type 1 receptor inhibition is associated with reduced tachyarrhythmia-induced ventricular interstitial fibrosis in a goat atrial fibrillation model [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(5): 357-365.
- [12] Park SJ, Sohn HY, Park SI. Trail regulates collagen production through HSF1-dependent HSP47 expression in activated hepatic stellate cells [J]. Cell Signal, 2013, 25 (7) : 1 635-643.
- [13] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 283-286.
- [14] Xiao H, Liu R, Ling G, et al. HSP47 regulates ECM accumulation in renal proximal tubular cells induced by TGF- β 1 through ERK1/2 and JNK MAPK pathways [J]. Am J Physiol Renal, 2012, 303(5): F757-F765.

(此文编辑 曾学清)