

Popdc2 表达下调通过 Akt 磷酸化促进新生大鼠心肌细胞增殖

魏飞宇¹, 吕丽², 马方方¹, 周蕾^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029; ²昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院生物治疗中心, 云南 昆明 650118)

[摘要] 目的:探讨 Popdc2 对新生大鼠心肌细胞增殖作用及其机制。方法:分离出生后第 0、7、14 天大鼠心脏组织, 荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测心脏组织中 Popdc2 mRNA 表达情况。分离出生后 0~2 d SD 大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞, qRT-PCR 检测 Popdc 家族 mRNA 在心肌细胞表达情况、Popdc2 mRNA 在心肌细胞和成纤维细胞表达情况; 大鼠原代心肌细胞分别转染阴性对照小干扰 RNA(NC 组)和 Popdc2 特异性小干扰 RNA(si-Popdc2 组), EdU 实验、Ki67 染色检测心肌细胞增殖, 免疫荧光检测心肌细胞特异性蛋白辅肌动蛋白(actinin)和心肌钙蛋白 2(TNNT2)表达, qRT-PCR 检测转染小干扰 RNA 后心肌细胞 Popdc2 及转录因子 TBX20、TBX5 mRNA 表达、增殖抗原蛋白 Ki67 mRNA 表达情况, Western blot 检测总 Akt 及磷酸化 Akt 蛋白表达水平。结果:① Popdc 家族中 Popdc2 mRNA 在心肌细胞表达最高($P < 0.01$), 且随着出生后天数增加 Popdc2 表达逐渐升高($P < 0.01$), Popdc2 mRNA 在心肌细胞表达高于成纤维细胞($P < 0.05$); ②与对照组相比, 沉默 Popdc2 可促进原代心肌细胞 DNA 合成($P < 0.05$), 并增加 Ki67 阳性心肌细胞数量($P < 0.05$); ③qRT-PCR 显示沉默 Popdc2 可上调转录因子 TBX20($P < 0.01$)、TBX5($P < 0.05$)的 mRNA 表达, 沉默 Popdc2 促进 Ki67 的 mRNA 表达($P < 0.05$), Western blot 结果显示沉默 Popdc2 可促进 Akt 蛋白磷酸化, Akt308($P < 0.05$), Akt473($P < 0.001$)。结论:Popdc2 表达下调可能通过调节转录因子表达及 Akt 蛋白磷酸化促进新生大鼠心肌细胞增殖, Popdc2 有可能成为心肌损伤后修复和再生治疗靶点。

[关键词] Popdc2; 心肌细胞; 增殖; Akt; 转录因子

[中图分类号] Q253

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-938-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150708

Proliferation of neonatal cardiomyocytes by knockdown of Popdc2 via Akt-phosphorylation

Wei Feiyu¹, Lv Li², Ma Fangfang¹, Zhou Lei^{1*}

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Biotherapy Center of Yunnan Provincial Tumor Hospital, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether and how the knockdown of Popdc2 with siRNA produced changes in the proliferative activity of neonatal rat cardiomyocytes. **Methods:** Postnatal of 0, 7, 14 day of Sprague Dawley rats cardiac tissue was prepared, qRT-PCR was performed to detect the Popdc2 relative mRNA expression level. Neonatal rat cardiomyocytes and fibroblast were prepared from the ventricles of Sprague Dawley rats aged 0~2 days, qRT-PCR was performed to detected Popdc family member mRNA expression level in cardiomyocytes and Popdc2 mRNA expression level in cardiomyocytes and fibroblast; negative control (NC) and Popdc2 small interference RNAs (si-Popdc2) were transferred into neonatal rat cardiomyocytes, EdU incorporation assay and Ki67 staining were used to detect cell proliferation, qRT-PCR was performed to detect the Popdc2, TBX20, TBX5, and Ki67 relative mRNA expression level, Western blot was used to test the total Akt and phosphorylation Akt protein expression level. **Results:** This study showed that Popdc2 mRNA expression level was the highest of Popdc family member in cardiomyocytes ($P < 0.01$). The expression was continually increased after postnatal ($P < 0.01$), Popdc2 mRNA expression level was higher in cardiomyocytes compared with fibroblast ($P < 0.05$); EdU incorporation assay showed that knockdown of Popdc2 promoted cardiomyocytes DNA synthesis ($P < 0.05$), immune staining showed knockdown of Popdc2 increased the Ki67 position cardiomyocytes number ($P < 0.05$), qRT-PCR showed that knockdown of Popdc2 upregulated transcription factor TBX20 ($P < 0.01$), TBX5 ($P < 0.05$), and proliferation protein Ki67 ($P < 0.05$) mRNA expression level, Western blot showed that knockdown of Popdc2 significantly increased phosphorylation of Akt protein level,

[基金项目] 国家自然科学基金(81370280)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhoulei@njmu.edu.cn

Akt308($P < 0.05$), Akt473($P < 0.001$). **Conclusion:** The present study demonstrated that knockdown of Popdc2 produced a significant increase in the proliferation of neonatal cardiomyocytes, and may *via* Akt phosphorylation and regulate cardiac transcription factor, suggesting that Popdc2 may become a therapeutic target for cardiac repair and heart regeneration.

[Key words] Popdc2; cardiomyocytes; proliferation; Akt; transcription factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07):938-944]

心脏疾病是目前引起人群死亡的主要原因之一,如心肌梗死、心衰。由于哺乳动物心肌细胞于出生后不久便退出细胞循环,细胞增殖、再生能力非常低^[1]。早期研究显示小鼠心肌细胞在出生后 7 d 就失去增殖能力^[2]。然而,新近研究发现哺乳动物出生后心肌细胞仍具有可塑性^[3],成熟的心肌细胞在特定的条件下仍可被诱导重新进入细胞周期,并以增生性生长为主的方式改善心脏功能^[4]。最新研究发现,心脏特异性转录因子 TBX20 可调节胚胎及胎儿心肌细胞增殖并有细胞特异性^[5],还可促进出生后心肌细胞增殖并使成年小鼠心脏具有胚胎心脏特征^[6]。TBX5 对胚胎心脏发育至关重要,且在多种先天性心脏病患者中发现 TBX5 基因突变^[7-8]。

Popdc 基因家族是编码膜蛋白、结构高度保守的心脏发育相关分子,由 Popdc1(又名 Pop1, BVES)、Popdc2(又名 Pop2)、Popdc3(又名 Pop3)3 个成员构成。研究发现,Popdc 基因家族在多种组织中表达,而在心脏和骨骼肌细胞表达最高^[9-11]。目前对 Popdc 家族的研究主要集中于 Popdc1, Popdc1 在小鼠骨骼肌损伤后修复、缺血耐受及心脏传导系统发育中发挥着至关重要的作用^[12-13]。Popdc1 在先天性室间隔缺损患者的间隔组织高表达,且基因筛选发现在非家族性法洛四联症患者中发现 Popdc1 突变^[14-15], Popdc 家族 3 个成员在心脏功能调节上部分重叠^[16]。且令人惊奇的是,Popdc 基因家族成员中,Popdc2 在心肌层表达最高并特异性最强,引起了人们的广泛关注。研究发现 Popdc2 是鸡胚胎心脏发育分化成熟标志基因^[17],沉默 Popdc2 表达会导致斑马鱼胚胎心脏和骨骼肌发育障碍^[18],沉默小鼠 Popdc2 基因表达可导致心脏传导系统在应激诱导下功能障碍^[12]。值得关注的是,关于 Popdc2 心脏特异性功能的研究目前尚未见报道。本研究采用 RNA 干扰方法敲低 Popdc2 在心肌细胞的表达,检测其对心肌细胞增殖作用及可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

EdU(c10338, Invitrogen 公司, 美国); Lipofectamine™ 2000(11668-019, Invitrogen 公司, 美国); 胰

酶(P1750, Sigma 公司, 美国), 胶原酶(LS004176, Worthington 公司, 美国), 原代心肌细胞纯化 Percoll 分层液(p1644, Sigma-Aldrich 公司, 美国); RNA 提取试剂盒(74134, QIAGEN 公司, 德国), 反转录试剂盒(A360, TaKaRa 公司, 大连), SYBR(4367659, ABI 公司, 美国), qRT-PCR 反应引物由南京金斯瑞公司合成; 兔抗 Ki67(ab66155, Abcam 公司, 英国), 兔抗心肌钙蛋白(cardiac troponin T, TNNT2 抗体 ab8295, Abcam 公司, 英国); 兔抗 Sarcomere-actinin(A7811, Sigma-Aldrich 公司, 美国), 鼠抗 GAPDH(1A6, Bioworld 公司, 美国); 兔抗总 Akt(4691, CST 公司, 美国), 兔抗磷酸化 Akt308(9275, CST 公司, 美国), 兔抗磷酸化 Akt473(9271, CST 公司, 美国); 免疫荧光二抗及蛋白印迹二抗(Jackson 公司, 美国); DMEM、RPMI-1640、胎牛血清、培养瓶及培养板等(Gibco 公司, 美国); Popdc2 小干扰 RNA 片段(Invitrogen 公司, 上海); 96 孔 PCR 反应板、盖膜(ABI 公司, 美国); SDS-PAGE 凝胶配胶试剂盒、蛋白上样缓冲液购自南通碧云天公司, 缓冲液自行配置。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠原代心肌细胞培养

0~2 d 的 SD 大鼠分离原代心肌细胞和成纤维细胞, 0、7、14 d 的 SD 大鼠分离心脏组织, 由南京医科大学实验动物中心提供, 研究经南京医科大学实验动物伦理委员会批准。原代心肌细胞分离纯化参照文献方法^[19], 将左心室剪成 1 mm³ 的小碎块, 用 0.06% 胰酶、0.04% 胶原酶 II 消化 30 min、按 1/6 倍胎牛血清中和细胞消化液, 离心收集细胞沉淀, 重复上述步骤直至全部消化完成, 制成细胞悬液, 接种于培养皿中, 置于 37℃ 5%CO₂ 的培养箱中差速贴壁 30 min 纯化心肌细胞。心肌细胞纯化参照 percoll 分层液说明书, 配制不同密度 percoll 分层液, 把细胞悬液加入分层液最上层, 3 000 r/min, 离心 30 min, 细胞分 3 层, 最上层是成纤维细胞、中间层是心肌细胞、最下层是血细胞及上皮细胞等, 吸取心肌细胞铺板后 36 h 更换培养基。

1.2.2 qRT-PCR 检测 mRNA 水平表达

取0、7、14 d SD大鼠心脏组织、0~2 d 原代心肌细胞和成纤维细胞、转染小干扰 RNA 后原代心肌细胞, RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 紫外/可见分光光度仪测 RNA 含量和纯度。500 μg 总 RNA 反转录成 cDNA(反应体系为 10 μL)。引物序见表 1。

表 1 定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers of real-time PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	目的片段长度(bp)
Popdc1	上游: CCATTGTTGCGGGACGATAAC 下游: TGATTGTCAGAAGGCTTGGCTAAC	139
Popdc2	上游: AGGCTGGTGGAGTCCTCA 下游: AGCTGTGTCCCCTGCTCA	189
Popdc3	上游: GATACATCTCCCCTGTTTTCTG 下游: ATGGGGTGATCTGGACAAGCTCTGG	190
Ki67	上游: TGGACGACCAGCTGTTTTGA 下游: TCGCAGTCAGTTTCCTTCC	160
TBX20	上游: CCTCCAGGCTCACTGACATC 下游: TCACAACGTGCTAAAGAAAGCAA	175
TBX5	上游: CAAGGCAGGGAGGCAGATGTT 下游: GCAGGCTCGGCTTTACCAGTT	175
GAPDH	上游: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG 下游: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	180

采用 SYBR 法在 real-time PCR 7900 仪上行定量 PCR 扩增, 反应体系: cDNA 1 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、SYBR 5 μL、水 3 μL, 反应条件: 95℃ 1 min→95℃ 15 s→60℃ 60 s→95℃ 15 s→60℃ 15 s→95℃ 15 s, 第 2~4 步 35~40 个循环, 以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法统计结果。

1.2.3 小干扰 RNA(siRNA)转染

细胞以 3.5×10⁵ 个/mL 的密度接种培养板中, 转染 6 h 前更换无血清培养基, 按照转染试剂说明书进行 siRNA 转染, siRNA 和 Lipofectamine 按 1:1.2 比例分别用无血清 opti-MEM 稀释, 柔和混匀后常温静置 20 min, 将混合液缓慢加入含有培养基的培养板中并混匀, 12 h 后更换无抗生素含 1% 胎牛血清培养基, 日本 Nikon 荧光倒置显微镜观察转染效率(Cy5 荧光标记), qRT-PCT 检测 Popdc2 mRNA 表达检测沉默效果。

1.2.4 免疫荧光染色

转染小干扰 RNA 后的原代心肌细胞用预冷 PBS 洗 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton X-100 破膜 20 min, 10% 山羊血清封闭 1 h, 根据需要加入一抗兔抗 Cardiac Troponin T、鼠抗 Sarcomere-actinin 标记心肌细胞特异性胞质骨架肌丝蛋白, 兔抗 Ki67 标志增殖抗原蛋白, 4℃ 孵育过夜, 次日 PBS 洗 3

遍, 根据一抗加相应二抗室温孵育 1 h、DAPI 染细胞核 10 min, 荧光倒置显微镜观察拍照。

1.2.5 EdU 实验分析细胞增殖

细胞转染 si-Popdc2 24 h 后加入 10 μmol EdU, 继续培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton 破膜 15 min, 10% 山羊血清封闭 1 h, 加入 100 μL Click-iT[®] 反应混合液 30 min, DAPI 染细胞核 10 min。每孔随机选取 20 个视野, 荧光倒置显微镜拍照。

1.2.6 Western blot 检测总 Akt 和磷酸化 Akt 蛋白水平

取 6 孔培养板中原代心肌细胞, 以预冷的 PBS 洗涤细胞, 每孔加入 80 μL 蛋白裂解液(蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、PMSF), 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度。取相同质量总蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 80 V 20~30 min, 120 V 约 90 min。300 mA 湿转印 120 min, 将蛋白转印到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入总 Akt、磷酸化 Akt 一抗, 4℃ 孵育过夜, 次日 TBST 洗膜 3 次, 根据一抗加入相应的二抗, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光液在 ChemiDoc[™] XRS+ System (BIO-RAD) 显影, 用 Image 软件曝光进行灰度值分析。

1.3 统计学方法

每个实验重复 3 次, 每次至少 3 个样本, 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析, 所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据分析用 Student *t* 检验或者卡方检验进行统计学显著性分析, *P* ≤ 0.05 则认为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 Popdc 家族在原代心肌细胞表达和 Popdc2 在出生后心肌组织表达变化

对 Popdc2 表达水平进行检测, 结果发现 Popdc 家族 3 个成员中, Popdc2 的 mRNA 在心肌细胞表达最高(图 1A), 且随着新生大鼠出生后天数增加, Popdc2 的 mRNA 表达逐渐升高, 第 0、7、14 天 mRNA 表达水平分别为 0.997 ± 0.149、2.340 ± 0.319、7.852 ± 0.943(*P* 均 < 0.01, 图 1B), 且 Popdc2 在原代心肌细胞表达明显高于成纤维细胞 (21.178 ± 10.870 vs 1.082 ± 0.209, *P* < 0.05, 图 1C)。

2.2 Popdc2 小干扰 RNA 转染对心肌细胞 Popdc2 表达的影响

为了确定 si-Popdc2 转染效率及干扰效应, 免疫荧光倒置显微镜观察转染小干扰 RNA 显示 85% 以上心肌细胞被荧光(CY5)标记(图 2A), qRT-PCR 结果显示 3 条小干扰链都能有效抑制 Popdc2 表达、和

阴性对照组(1.081 ± 0.210)相比,第 1 条链沉默率 35%(0.656 ± 0.067, $P < 0.01$)、第 2 条链沉默率达到 68%(0.322 ± 0.033, $P < 0.001$)、第 3 条链沉默率达到 80%(0.212 ± 0.109, $P < 0.001$, 图 2B), 选择第 2、3 条链进行后续实验。

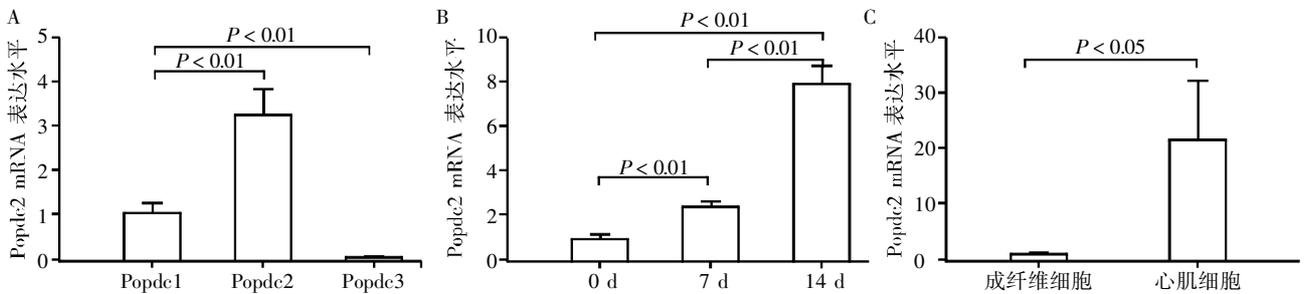
2.3 Popdc2 小干扰 RNA 转染对心肌细胞增殖的影响

用 EdU 染色检测细胞 DNA 合成和 Ki67 染色检测细胞有丝分裂来反映细胞增殖能力。EdU 结果显示,与对照组相比,沉默 Popdc2 可促进 DNA 合成(8.345% ± 1.120% vs 3.577% ± 0.302%, $P < 0.05$, 图 3A、C),并增加 Ki67 阳性心肌细胞数量(7.814% ± 1.301% vs 4.072% ± 0.204%, $P < 0.05$, 图 3B、D)。

2.4 Popdc2 小干扰 RNA 转染对心肌细胞转录因子

TBX20、TBX5 mRNA 表达及 Akt 蛋白表达的影响

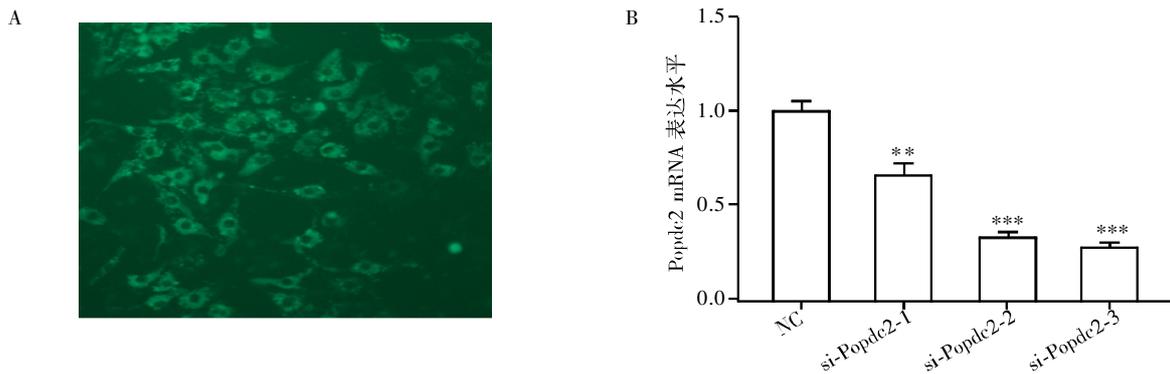
对调节出生后心肌细胞增殖的心脏转录因子进行检测,结果显示下调 Popdc2 表达可上调心脏转录因子 TBX20 及 TBX5 表达, TBX20(3.281 ± 0.951 vs 1.046 ± 0.176, $P < 0.01$)、TBX5 (2.768 ± 0.873 vs 0.831 ± 0.078, $P < 0.05$),促进增殖抗原 Ki67 mRNA 表达 (22.676 ± 8.072 vs 1.355 ± 0.414, $P < 0.05$)(图 4A)。为了进一步探讨其机制,推测 Popdc2 是可能通过经典的 Akt 信号通路影响心肌细胞增殖,Western blot 结果显示沉默 Popdc2 可促进 Akt 蛋白磷酸化, Akt308 (1.328 ± 0.070 vs 1.003 ± 0.058, $P < 0.05$), Akt473 (0.942 ± 0.033 vs 0.365 ± 0.045, $P < 0.001$, 图 4B)。



A: 新生大鼠原代心肌细胞 Popdc 家族 mRNA 表达; B: 出生后第 0、7、14 天大鼠心脏组织 Popdc2 的 mRNA 表达; C: 新生大鼠原代心肌细胞和成纤维细胞 Popdc2 的 mRNA 表达。

图 1 大鼠心脏组织 Popdc2 和 Popdc 家族 mRNA 表达

Figure 1 The mRNA expression level of Popdc2 cardiomyocytes and fibroblast in the postnatal rat cardiac tissue



A: 荧光倒置显微镜观察转染效率(CY5); B: 转染 Popdc2 小干扰 RNA 后心肌细胞 Popdc2 的 mRNA 表达水平,与阴性对照组(NC)比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

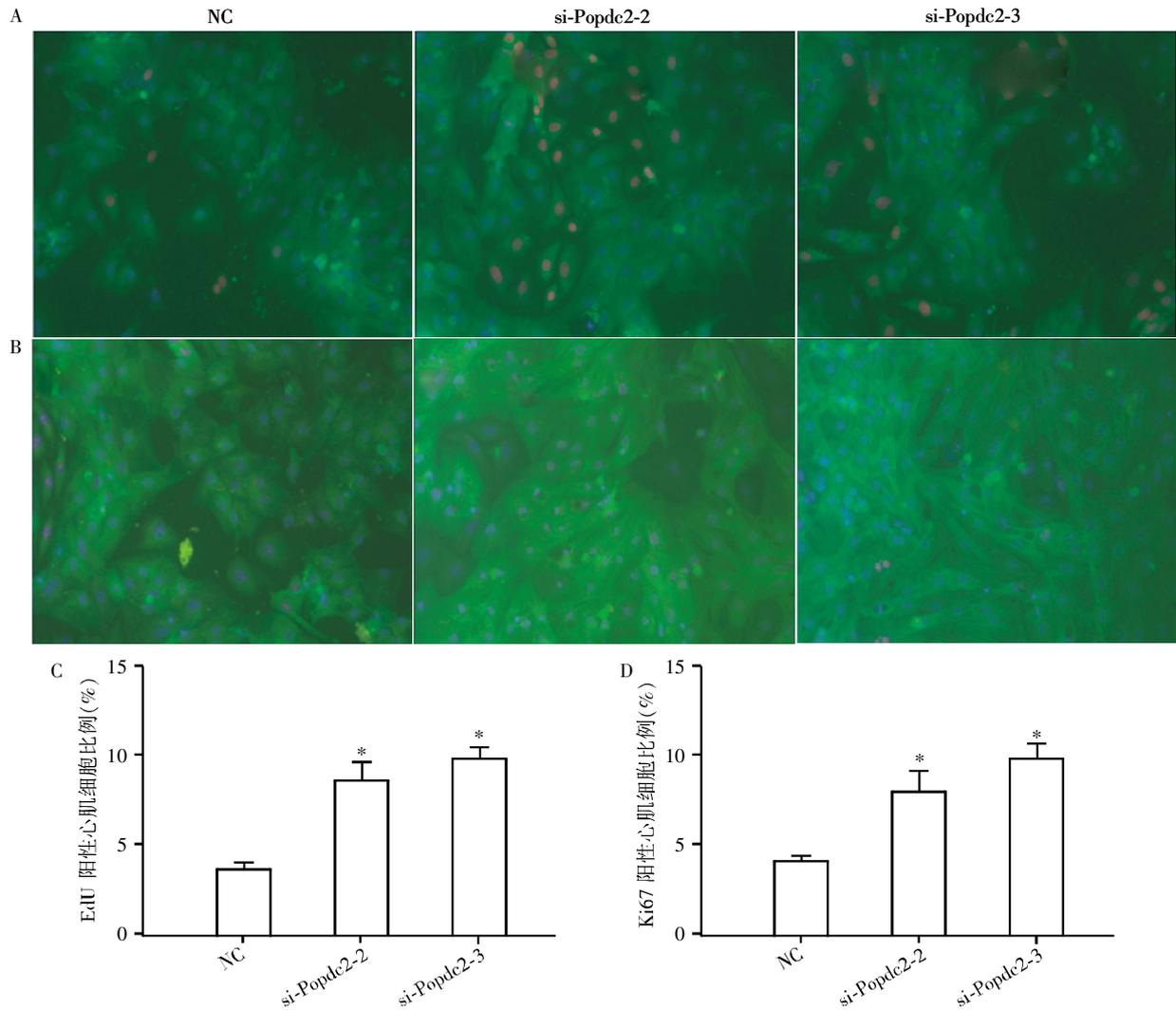
图 2 Popdc2 小干扰 RNA 转染心肌细胞效率和干扰效应

Figure 2 The transfection efficiency and knockdown effect of Popdc2 siRNA in cardiomyocytes

3 讨论

胚胎心肌细胞具有较强增殖能力,而与之不同的是,出生后 7 d 至成年心肌细胞增殖能力极低,导致心肌细胞损伤后修复能力极差。心脏疾病如心肌梗死、心衰等,主要因为心肌细胞缺乏更新能力,不

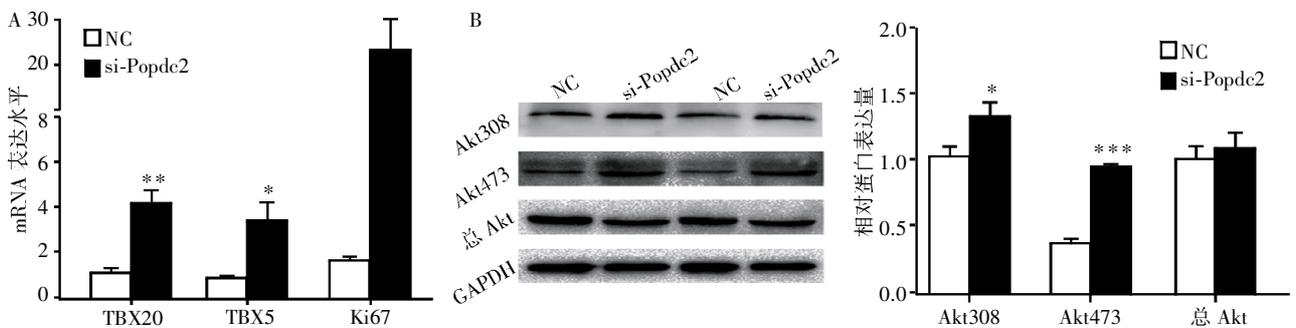
足以逆转心肌细胞丢失和心脏功能的恢复而导致死亡^[20-21]。为了克服这个困难,诱导心肌细胞重新进入细胞循环势在必行。而目前的研究主要采用诱导干细胞向心肌细胞分化^[22]、诱导成纤维细胞转分化为心肌细胞^[23]、诱导自身心肌细胞增殖^[24]3 种方式进行心肌再生逆转,而前两种得率非常低,因此诱



A: 转染 Popdc2 小干扰 RNA 心肌细胞 EdU 染色, DAPI 标记细胞核(蓝色), EdU 标记新生成细胞(红色)和 TNNT2 标记心肌细胞(绿色); B: 转染 Popdc2 小干扰 RNA 心肌细胞免疫荧光染色, DAPI 标记细胞核(蓝色), Ki67 标记新生成细胞(红色)和 Actinin 标记心肌细胞(绿色); C: Popdc2 小干扰 RNA 处理心肌细胞中 EdU⁺心肌细胞百分比; D: Popdc2 小干扰 RNA 处理心肌细胞中 Ki67⁺心肌细胞百分比; 与阴性对照组(NC)比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 EdU 实验和 Ki67 免疫荧光染色检测 Popdc2 小干扰 RNA 对心肌细胞增殖影响

Figure 3 The proliferation effect of si-Popdc2 on neonatal rat cardiomyocytes by EdU incorporation assay and Ki67 staining



转染 Popdc2 小干扰 RNA 原代心肌细胞。A: 转录因子 TBX20 和 TBX5 和增殖抗原 Ki67 mRNA 表达变化; B: 总 Akt 蛋白和磷酸化 Akt 蛋白表达变化; 与阴性对照组(NC)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 原代心肌细胞转染 Popdc2 小干扰 RNA 后转录因子 TBX20、TBX5、增殖蛋白 Ki67 和 Akt 蛋白表达影响

Figure 4 The cardiac transcription factor of Tbx20, Tbx5, proliferation protein Ki67 mRNA expression level and Akt protein expression level by the knockdown the Popdc2

导自身心肌细胞增殖引起本实验小组关注。令人感兴趣的是,相关文献报道心肌细胞出生后失去增殖能力与出生后基因表达变化有关,但确切机制仍然不清楚^[2]。本实验比较了出生后 0、7、14 d 差异表达的基因,发现 Popdc2 的表达随着出生天数的增加表达量逐渐升高。

多种基因、多条通路可参与出生后心肌细胞增殖的调节。过表达周期蛋白 cyclinD 家族,尤其 cyclinD2 可诱导成年心肌细胞周期激活,提高心脏损伤后功能修复^[25]。联合过表达 GATA4、TBX5、Mef2C、TBX20 等转录因子不仅可促进原有心肌细胞周期激活,还可诱导成纤维细胞转分化成心肌细胞^[24-27]。Popdc 家族在多种组织中表达,但在心脏和骨骼肌细胞表达最高,提示 Popdc 家族对心脏发育具有重要调节作用^[9-11]。本课题组前期研究发现,Popdc1 在先天性室间隔缺损患者的间隔组织高表达,且基因筛选发现在非家族性法洛四联症患者中发现 Popdc1 功能突变^[14-15]。Popdc 家族成员在心脏功能调节上部分重叠^[16],Popdc2 作为胚胎心脏发育分化成熟标志基因,在心肌细胞高表达且特异性最强^[17],沉默 Popdc2 表达会导致斑马鱼胚胎心脏和骨骼肌发育障碍^[18]。本研究结果显示,下调 Popdc2 表达可促进新生大鼠心肌细胞增殖,使其进入细胞循环,同时还可上调心脏转录因子 TBX20、TBX5 表达。此外,下调 Popdc2 还可激活 Akt 信号通路促进 Akt 蛋白磷酸化。

磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路是一条经典的信号途径,参与细胞生长、增殖、分化等多种细胞功能调节^[28-29],IGF1/PI3K/AKT 和 GSK3 β / β -catenin 通路可调节心肌细胞增殖并在心肌损伤后被激活^[5,30]。TBX20 是心脏发育关键转录因子,是 T 盒基因亚家族 TBX 家族成员之一^[5],TBX20 异常表达会导致先天性心脏疾病^[31],在人类先天性心脏病和扩张性心肌病都发现 TBX20 基因突变^[32-33]。TBX20 可通过 BMP2/pSmad1/5/8 和 PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin 信号通路促进新生和成年小鼠心肌细胞增殖^[5],TBX20 在 BMP10 转基因鼠中高表达并在 BMP10 调节心室壁发育中起重要作用,TBX20 直接通过 BMP10 促进心肌细胞增殖^[34]。TBX5 是心脏发育过程另外一个关键因子,可通过与转录因子相互作用共同调节心脏发育,TBX5 异常表达导致先天性室间隔缺损且在先天性心脏病患者中发现多个位点突变^[7-8,35]。

综上所述,Popdc 基因家族中 Popdc2 在心肌细

胞表达最高且随出生后天数的增加表达逐渐升高。Popdc2 表达下调可能通过调节转录因子 TBX20、TBX5 表达上调及 Akt 蛋白磷酸化促进新生大鼠心肌细胞增殖,Popdc2 有可能成为心肌损伤后修复和再生治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Sedmera D,Thompson RP. Myocyte proliferation in the developing heart[J]. Dev Dyn,2011,240(6):1322-1334
- [2] Porrello ER,Mahmoud AL,Simpson E,et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. Science,2011,331(6020):1078-1080
- [3] Zhang Y,Li TS, Lee ST,et al. Differentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes[J]. PLoS One,2010,5(9):e12559
- [4] Bersell K,Arab S,Haring B,et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury[J]. Cell,2009,138(2):257-227
- [5] Chakraborty S,Sengupta A,Yutzey KE. Tbx20 promotes cardiomyocyte proliferation and persistence of fetal characteristics in adult mouse hearts[J]. J Mol Cell Cardiol,2013,62:203-213
- [6] Chakraborty S,Yutzey KE. Tbx20 regulation of cardiac cell proliferation and lineage specialization during embryonic and fetal development *in vivo*[J]. Dev Biol,2012,363(1):234-246
- [7] Misra C,Chang SW,Basu M,et al. Disruption of myocardial Gata4 and Tbx5 results in defects in cardiomyocyte proliferation and atrioventricular septation[J]. Human Mol Genet,2014,23(19):5025-5035
- [8] Anwar B,Letizia P,Silvia P,et al. Holt - Oram syndrome with intermediate atrioventricular canal defect,and aortic coarctation: functional characterization[J]. Am J Med Genet A,2014,164A(6):1419-1424
- [9] Andrée B,Hillemann T,Kessler-Icekson G,et al. Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart[J]. Dev Biol,2000,223(2):371-382
- [10] Brand T. The popeye domain-containing gene family [J]. Cell Biochem Biophys,2005,43(1):95-104
- [11] Froese A,Brand T. Expression pattern of Popdc2 during mouse embryogenesis and in the adult[J]. Dev Dyn,2008,237(3):780-787
- [12] Yifat A,Edith H,Vitaly K,et al. Popeye domain containing 1 (Popdc1/Bves) is a caveolae-associated protein involved in ischemia tolerance [J]. PLoS One,2012,8(9):e71100
- [13] Froese A,Breher SS,Waldeyer C,et al. Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated mod-

- ulation of cardiac pacemaking in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3):1119-1130
- [14] Zhang H, Zhou L, Yang R, et al. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1):135-144
- [15] Wu M, Li Y, He X, et al. Mutational and functional analysis of the BVES gene coding region in Chinese patients with nonsyndromic tetralogy of Fallot [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4):899-903
- [16] Thomas B, Subreena LS, Kar LP, et al. The cAMP-binding Popdc proteins have a redundant function in the heart [J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(2):295-301
- [17] Breher SS, Mavridou E, Brenneis C, et al. Popeye domain containing gene 2 (Popdc2) is a myocyte-specific marker during chick heart [J]. *Dev Dyn*, 2004, 229(3):695-702
- [18] Kirchmaier BC, Poon KL, Schwerte T, et al. The Popeye domain containing 2 (popdc2) gene in zebrafish is required for heart and skeletal muscle development [J]. *Dev Biol*, 2012, 363(2):438-450
- [19] Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6):1137-1141
- [20] Aguirre A, Montserrat N, Zacchiqna S, et al. *In vivo* activation of a conserved microRNA program induces mammalian heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5):589-604
- [21] Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2):521-544
- [22] Van den Berg CW, Elliott DA, Braam SR, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes under defined conditions [J]. *Methods Mol Biol*, 2015 Jan 28, 22:1-5 [Epub ahead of print]
- [23] Wada R, Muraoka N, Inagawa K, et al. Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31):12667-12672
- [24] Chen JH, Zhan PH, Hee Y, et al. Mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts [J]. *Circ Res*, 2013, 112(12):1557-1566
- [25] Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice [J]. *Circ Res*, 2005, 96(1):110-118
- [26] Zhou L, Liu Y, Lu L, et al. Cardiac gene activation analysis in mammalian non-myoblastic cells by Nkx2-5, Tbx5, Gata4 and Myocd [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e48028
- [27] Misra C, Chang SW, Basu M, et al. Disruption of myocardial Gata4 and Tbx5 results in defects in cardiomyocyte proliferation and atrioventricular septation [J]. *Human Mol Gene*, 2014, 23(19):5025-5030
- [28] Xiao W, Jiang YL, Men Q, et al. Tetrandrine induces G1/S cell cycle arrest through the ROS/Akt pathway in EO-MA cells and inhibits angiogenesis *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1):360-368
- [29] Tyagi N, Bhardwaj A, Singh AP, et al. P-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT- and ERK-dependent activation of NF- κ B pathway [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18):8778-8789
- [30] Kerkela R, Kockeritz L, Macaulay K, et al. Deletion of GSK-3beta in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11):3609-3618
- [31] Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2):212-222
- [32] Liu C, Shen LS, Li X, et al. T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease [J]. *Eur J Med Genet*, 2012, 51(6):580-587
- [33] Kirk EP, Sunde M, Costa MW, et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(2):280-291
- [34] Sun L, Yu J, Qi S, et al. Bone Morphogenetic Protein-10 Induces Cardiomyocyte Proliferation and Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(11):1868-1876
- [35] Atik T, Dervisoglu H, Onay H, et al. A new mutation in the TBX5 gene in Holt-Oram syndrome: two cases in the same family and prenatal diagnosis [J]. *J Trop Pediatr*, 2014, 60(3):257-259

[收稿日期] 2015-01-29