

• 生物技术与方法 •

# 乙醛脱氢酶 1 家族成员 A2 过表达对心肌细胞肥大生长及增殖的影响

刘航<sup>1,2</sup>, 刘琪琪<sup>2,3</sup>, 李振华<sup>2</sup>, 杨晓<sup>1,2\*</sup>, 王剑<sup>2\*</sup>

1 安徽医科大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 合肥 230000

2 国家蛋白质科学中心(北京) 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850

3 河北大学 生命科学院, 河北 保定 071002

刘航, 刘琪琪, 李振华, 杨晓, 王剑. 乙醛脱氢酶 1 家族成员 A2 过表达对心肌细胞肥大生长及增殖的影响[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4660-4669.

LIU Hang, LIU Qiqi, LI Zhenhua, YANG Xiao, WANG Jian. Effect of overexpression of aldehyde dehydrogenase family member A2 on hypertrophic growth and proliferation of cardiomyocytes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4660-4669.

**摘要:** 维甲酸信号通路在调节脊椎动物发育、细胞分化和维持组织稳态平衡中发挥重要功能。作为催化视黄醛氧化成维甲酸的关键酶, 乙醛脱氢酶 1 家族成员 A2 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A2, Aldh1a2) 在调节心脏发育过程中具有重要功能, 而其在心脏疾病中发挥的功能尚不明晰。本研究通过构建和包装用于过表达 *Aldh1a2* 的腺病毒(Ad-Aldh1a2), 将其感染原代心肌细胞后分析 *Aldh1a2* 过表达对心肌细胞生物学功能的影响。结果显示心肌细胞感染 Ad-Aldh1a2 后能够成功实现 *Aldh1a2* 的过表达; 与感染 Ad-GFP 的对照组相比, 感染 Ad-Aldh1a2 的心肌细胞尺寸明显增加, 胚胎期基因心房利钠肽(atrial natriuretic factor, ANF)、脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP) 和  $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC)表达水平上调; 此外, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU) 掺入实验结果显示, *Aldh1a2* 过表达使 EdU 掺入阳性信号的心肌细胞比例升高, 检测增殖相关基因的表达发现细胞周期蛋白 D2 (cyclin D2, *Ccnd2*) 和苯并咪唑出芽抑制解除同源物蛋白-1 (budding uninhibited by benzimidazole 1, *Bub1*) 的表达水平也明显升高。以上结果表明 *Aldh1a2* 过表达可促进心肌细胞肥大生长和增殖。本研究为进一步了解 *Aldh1a2* 在心脏疾病中的功能、发展心脏疾病的治疗策略提供了有益的基础。

**关键词:** 乙醛脱氢酶 1 家族成员 A2; 腺病毒; 心肌肥厚; 心肌细胞增殖

资助项目: 国家自然科学基金(82270354, 82270355); 国家重点研发计划(2019YFA0801601)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82270354, 82270355) and the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0801601).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Jian, wangjian7773@126.com; YANG Xiao, yangx@bmi.ac.cn

Received: 2024-04-19; Accepted: 2024-11-19; Published online: 2024-11-20

# Effect of overexpression of aldehyde dehydrogenase family member A2 on hypertrophic growth and proliferation of cardiomyocytes

LIU Hang<sup>1,2</sup>, LIU Qiqi<sup>2,3</sup>, LI Zhenhua<sup>2</sup>, YANG Xiao<sup>1,2\*</sup>, WANG Jian<sup>2\*</sup>

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230000, Anhui, China

2 National Center for Protein Sciences (Beijing), Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

**Abstract:** Retinoic acid signaling pathway plays a role in regulating vertebrate development, cell differentiation, and homeostasis. As a key enzyme that catalyzes the oxidation of retinal to retinoic acid, aldehyde dehydrogenase 1 family member A2 (*Aldh1a2*) is involved in cardiac development, while whether it functions in heart diseases remains to be studied. In this study, we infected primary cardiomyocytes with adenovirus overexpressing *Aldh1a2* (Ad-*Aldh1a2*) to explore the effects of *Aldh1a2* overexpression on the biological function of cardiomyocytes. The results showed that the infection with Ad-*Aldh1a2* realized the overexpression of *Aldh1a2* in cardiomyocytes. Compared with the control group infected with Ad-GFP, the cardiomyocytes infected with Ad-*Aldh1a2* showcased significantly increased size and up-regulated expression levels of the atrial natriuretic factor gene (*ANF*), brain natriuretic peptide gene (*BNP*), and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -*MHC*). In addition, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation assay demonstrated that *Aldh1a2* overexpression increased the proportion of cardiomyocytes with positive EdU signals and upregulated the expression levels of proliferation-related genes cyclin D2 (*Ccnd2*) and budding uninhibited by benzimidazole 1 (*Bub1*). The above data indicated that overexpression of *Aldh1a2* induced hypertrophic growth and proliferation of cardiomyocytes. This study provides a basis for further understanding the function of *Aldh1a2* in heart diseases and developing therapies for heart diseases.

**Keywords:** *Aldh1a2*; adenovirus; cardiac hypertrophy; cardiomyocyte proliferation

近年来, 随着我国经济飞速发展, 人们的生活方式发生了很大改变, 人口老龄化及城镇化进程急剧加速, 心血管疾病患病率不断攀升。目前, 心血管病居城乡居民总死亡原因的首位, 给社会带来的负担日渐加重, 已成为重大的公共卫生问题。病理性心脏重塑是各类心脏疾病中最常见的病理变化, 也是导致心衰的主要原因。探索病理性心脏重塑发生的分子机制对于心衰的预防

和治疗具有重要的意义。

作为维生素 A 的活性衍生物, 维甲酸 (retinoic acid, RA) 协调信号转导途径调节胚胎发育和细胞分化<sup>[1]</sup>, 在组织稳态调节中发挥重要的功能。维生素 A 可以从饮食中以视黄酯或类胡萝卜素中以  $\beta$ -胡萝卜素的形式获得, 然后转化为视黄醇<sup>[2]</sup>。视黄醇需要通过视黄醇结合蛋白 (retinoic binding protein, RBPs) 递送, 再由

视黄醇-RBP 的细胞表面受体 STRA6 跨细胞膜转运, 通过短链脱氢酶/还原酶 RDH10 进行处理, 转化为视黄醛<sup>[3]</sup>。视黄醛脱氢酶(Aldh1a1-3)可将视黄醛氧化为 RA。维甲酸信号通路在心脏的发育过程中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>, 动物模型研究显示, 在部分发育阶段缺乏维甲酸会导致心脏和血管畸形<sup>[5]</sup>。作为催化视黄醛氧化成维甲酸的关键酶<sup>[6]</sup>, Aldh1a2 被证实是介导 RA 信号调节心脏发育过程的主要分子。此外, 在人类先天性心脏病的研究中也发现存在 Aldh1a2 基因的变异<sup>[7]</sup>。而目前关于 Aldh1a2 在成体心脏稳态维持中是否发挥功能还未见报道。

为探究 Aldh1a2 在心脏疾病中发挥的功能, 本研究构建携带 Aldh1a2 全长 cDNA 的重组腺病毒载体进行病毒包装, 并对其感染心肌细胞的有效性进行检测; 进一步检测了 Aldh1a2 过表达对心肌细胞肥大生长和增殖情况的影响, 以期为中心重塑机制的研究提供新的理论基础, 为心脏疾病的治疗提供潜在的靶标分子。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 乳大鼠购自维通利华公司; 293A 细胞由本实验室保存; DMEM、DMEM/F12 细胞培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶购自宝日生物有限公司; 质粒提取、胶回收试剂盒购自博迈德公司; 引物合成和测序由擎科生物科技有限公司完成。本研究中的动物实验按照军事科学院军事医学研究院实验动物福利伦理相关要求开展, 实验动物伦理审查审批号: NCPSB-20240222-17MBL。

抗体: 山羊抗兔 IgG 聚合物(中杉金桥, PV-6001); GAPDH (中杉金桥, TA-08)、 $\alpha$ -actinin (SIGAM, A7811)、Aldh1a2 (Abcam, ab75674)。

### 1.2 Aldh1a2 全长 cDNA 的扩增

设计用于扩增 Aldh1a2 全长 cDNA 的引物, 并分别在其上、下游引入 Kpn I 和 Xba I 内切酶的酶切位点。以 C57BL/6 小鼠心脏的 cDNA 为模板扩增 Aldh1a2 全长 cDNA。扩增条件为: 4 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

### 1.3 Ad-Aldh1a2 重组腺病毒载体的构建

将上述产物回收纯化, 与 pMD18-T 连接, 转化至感受态细菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选出阳性克隆后提取质粒, 对其进行测序。测序正确的质粒经 Kpn I 和 Xba I 酶切后连至 pAdTrack-CMV 质粒, 转化感受态细菌, 经卡那霉素筛选后, 对阳性克隆进行质粒提取和酶切鉴定, 正确的克隆命名为 pAdTrack-CMV-Aldh1a2。使用 Pme I 将该质粒线性化并转化至含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞, 进行同源重组。经卡那霉素初步筛选后提取单菌落质粒, 用 Pac I 酶切鉴定筛选出发生正确重组的质粒, 命名为 pAd-Aldh1a2<sup>[8]</sup>。

### 1.4 Ad-Aldh1a2 腺病毒的包装与扩增

选择生长状态良好的 293A 细胞接种至培养皿, 待细胞密度达 80% 左右时, 将 Pac I 酶切线性化后的 pAd-Aldh1a2 质粒用 LipofectAMINE 2000 脂质体转染。转染第 5-7 天待细胞病变达 80% 时, 将 60 mm 皿中的细胞收集到离心管中, 置 -80 °C 冰箱及 37 °C 水浴锅中反复冻融 3 次, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集上清即为初代腺病毒。按上述方法, 用 10 cm 细胞培养皿进行病毒扩增, 最后将病毒上清分装后 -80 °C 冰箱保存备用<sup>[8]</sup>。

### 1.5 原代心肌细胞的分离培养和腺病毒感染

准备出生 1-3 d 的 Wistar 乳大鼠, 将乳鼠依次放入 2 个盛有 75% 乙醇的小盒子内进行消毒麻醉, 用剪刀于右侧第三肋骨处剪开胸腔, 用手挤压使心脏暴露, 用镊子取出心脏, 置于预

冷过的 PBS 中, 另取一个镊子, 轻柔地挤压心脏, 将心脏残留的血液挤出后将心脏转移至另外一个皿中; 待全部乳鼠取材结束后, 另取一套剪刀、镊子, 修剪心脏, 将心耳及血管剪掉备用; 配制分离心肌细胞所需的酶液(酶 1 包含 Buffer X: 2 300  $\mu\text{L}$ ; Enzyme P: 62.5  $\mu\text{L}$ ; 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min; 酶 2 包含 Buffer Y: 25  $\mu\text{L}$ ; Enzyme A: 12.5  $\mu\text{L}$ ; Enzyme D: 100  $\mu\text{L}$ ), 将混匀的酶和心脏组织加入 C Tube 中, 将 C Tube 置于美天旋 gentle MACS 全自动组织解离器上, 运行程序 37C\_mr\_NHDK1; 程序运行结束后, 在细胞悬液中加入 2 倍体积的培养基以终止消化, 过筛、离心, 铺板; 差速贴壁 2 h 后取上清即为心肌细胞, 计数, 重新铺板; 48 h 后心肌细胞完全贴壁, 换无血清培养基, 饥饿处理 24 h; 分别感染 Ad-Aldh1a2 和 Ad-GFP 腺病毒(对照), 24 h 后观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达情况, 48 h 后收取细胞进行 RNA 提取, 60 h 后收取细胞进行蛋白质提取。

### 1.6 心肌细胞 RNA 的提取及反转录

弃去培养基, PBS 洗 1 次, 加入 1 mL Trizol, 反复吹打使心肌细胞脱落, 约 3–5 min 后将其收集到离心管中。每管加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷, 上下颠倒混匀, 室温静置 3 min 使其分层, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 离心后取上清加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇, 轻轻上下颠倒混匀, 室温静置 10 min 使 RNA 充分沉淀; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 由焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水配制的 75%乙醇, 轻轻上下颠倒混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 500 r/min 离心 5 min; 弃上清, 晾干, 加入 10  $\mu\text{L}$  DEPC 水充分溶解 RNA, 使用分光光度计测量浓度。根据浓度将 2  $\mu\text{g}$  RNA 反转录为 cDNA, 反应体系如下: 2  $\mu\text{g}$  RNA, 2  $\mu\text{L}$  5 $\times$ RT mix, DEPC 水补足 10  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min; 50  $^{\circ}\text{C}$

5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

### 1.7 实时荧光定量 PCR

以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, 反应体系共 10  $\mu\text{L}$ , 包含 1  $\mu\text{L}$  cDNA、上下游引物各 0.1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ )、5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ RT Mix、3.8  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O (引物序列见表 1)。

### 1.8 心肌细胞蛋白质的提取及蛋白质印迹杂交实验

弃去培养基, PBS 清洗 3 次后将细胞收集至离心管中, 加入适量含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液。通过 BCA 法测定蛋白浓度; 加入上样缓冲液后煮沸变性, 按照浓度定量并进行电泳, 利用湿转法将蛋白质转印至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF), 使用 5%脱脂牛奶于室温下摇床封闭 1.5 h, 含 0.05% 吐温 20 的磷酸缓冲液(phosphate buffered saline Tween 20, PBST)清洗 PVDF 膜, 室温下摇床 5 min, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下摇床孵育一抗过夜, PBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 于室温下摇床孵育二抗 1 h, PBST 清洗 PVDF 膜 3 次, 配置显影液并进行显影。

### 1.9 EdU 细胞增殖检测

原代心肌细胞感染腺病毒后继续培养 48 h, 加入 10  $\mu\text{mol/L}$  EdU, 继续培养 12 h 后进行显色。弃去培养基, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)室温下固定细胞 30 min, 弃去 PFA; 每孔加入 500  $\mu\text{L}$  的 2 mg/mL 甘氨酸, 摇床孵育 5 min; 弃去加入 PBS, 摇床清洗 5 min; 弃去 PBS 并加入透膜液(含 0.5% TritonX-100 的 PBS)摇床孵育 10 min, 弃去渗透剂, PBS 洗 5 min, 弃去 PBS; 加入 1 $\times$ Apollo 染色反应液, 在避光条件下于室温摇床孵育 30 min, 弃去染色反应液; 渗透剂清洗 3 次, 每次摇床 10 min; 甲醇清洗 1 次, 摇床 5 min; PBS 清洗 1 次, 摇床 5 min; 荧光显微镜下观察, 核型红色荧光为阳性信号; 山羊血清封闭液室温

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
GAPDH sense	AACTCCCATTCTCCACCTTTG
GAPDH antisense	CTGTAGCCATATTCATTGTCATACCAG
Aldh1a2 sense	ATGGGTGAGTTTGGCTTACG
Aldh1a2 antisense	GGTTCATTGGAAGGCAGAAA
ANF sense	ATCTGATGGATTTCAGAACC
ANF antisense	CTCTGAGACGGGTTGACTTC
BNP sense	GGAGCATTGAGTTGGCTCTC
BNP antisense	CCAGCTCTCCGAAGTGTTC
RaRb sense	GGTGCGGAGAGATCATGTTT
RaRb antisense	ACTCTGTGTCTCGATGGATTG
Rdh10 sense	AACACGCAGAGCAATGAGGA
Rdh10 antisense	CCGTTCCCAGCTTGCAGA
Crabp1 sense	CGCAAGTGCAGGAGTTTACC
Crabp1 antisense	AGCTCTCGGGTCCAGTAAGT
Cyp26a1 sense	AGCAGCGAAAGAAGGTGATT
Cyp26a1 antisense	AGCAGCGAAAGAAGGTGATT
$\beta$ -MHC sense	GTGAAGGGCATGAGGAAGAGT
$\beta$ -MHC antisense	AGGCCTTACCTTCAGCTGC

下封闭 30 min; 弃去血清封闭液, 加入  $\alpha$ -actinin 抗体, 4 °C 过夜; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 荧光二抗 37 °C 孵育 1.5 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核, 室温避光 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 封片剂封片。

### 1.10 小鼠心梗手术

小鼠心梗手术由世纪殊安(北京)生物技术有限公司完成。具体步骤如下: 术前对动物进行称重后备皮, 使用脱毛膏去除第二、三肋骨位置的毛发。使用异氟烷麻醉小鼠, 待出现角膜反射消失、肌力下降等麻醉反应后, 使其仰卧于小动物手术台, 利用 3M 胶带固定四肢。确认深度麻醉状态后, 安装好心电监护仪。消毒局部皮肤, 剪开肋间皮肤, 钝性分离肌肉、打开心包膜, 将心脏推出体外, 暴露左冠状动脉前降支, 用 6-0 无菌丝线快速结扎(打活结), 当心脏底部变白时, 迅速关闭胸腔, 同时进行挤压防止气胸, 最后逐层缝合肌肉皮

肤。假手术组仅进行开胸, 不进行冠状动脉结扎。术后当天给予镇痛果冻, 保温、观察。小鼠在术前和术后做心电图检测, 记录小鼠心电图改变情况。

### 1.11 心肌细胞表面积测量方法

将心肌细胞爬片置于荧光显微镜下拍照, 每张爬片随机选取 5 个视野拍照, 使用 Image-Pro Plus 软件统计心肌细胞面积, 每组至少统计 100 个细胞。

### 1.12 统计学分析

本研究数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用统计学软件 Graphpad 进行统计学分析。数据进行非配对  $t$  检验,  $n \geq 3$ ,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 心肌梗死模型小鼠心脏组织内 *Aldh1a2* 表达水平升高

收集利用左冠状动脉结扎术构建的心肌梗死和假手术组小鼠的心脏组织样品, 提取小鼠

的心脏的 RNA, 反转录成 cDNA 后, 利用实时荧光定量 PCR 检测反映心脏损伤的胚胎期基因 *ANF* (atrial natriuretic factor) 以及 *Aldh1a2* 的表达情况。与假手术组小鼠相比, 心梗小鼠心脏组织中这 2 个分子的表达水平分别升高 8.46 倍及 4.98 倍(图 1), 提示 *Aldh1a2* 可能在心脏疾病中发挥一定的功能。

## 2.2 过表达 *Aldh1a2* 腺病毒载体的构建及病毒的包装鉴定

为了得到可用来过表达 *Aldh1a2* 的腺病毒, 首先利用心脏 cDNA 为模板扩增预期片段大小为 1 556 bp 的 *Aldh1a2* 全长 cDNA (图 2A), 将 PCR 产物酶切回收后克隆至 pMD18-T 载体进行测序。使用 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切测序正

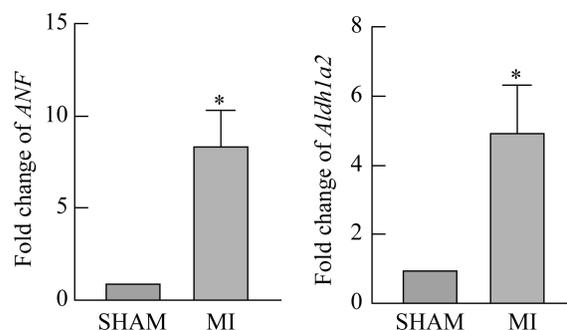


图 1 *Aldh1a2* 及 *ANF* mRNA 表达水平在心梗小鼠心脏组织中升高  $n=3$ , SHAM 为假手术组, MI 为心肌梗死组, \*  $P<0.05$

Figure 1 *Aldh1a2* and *ANF* were increased in hearts of mice with myocardial infarction.  $n=3$ , SHAM is the SHAM surgery group, MI is the myocardial infarction surgery group, \*  $P<0.05$ .

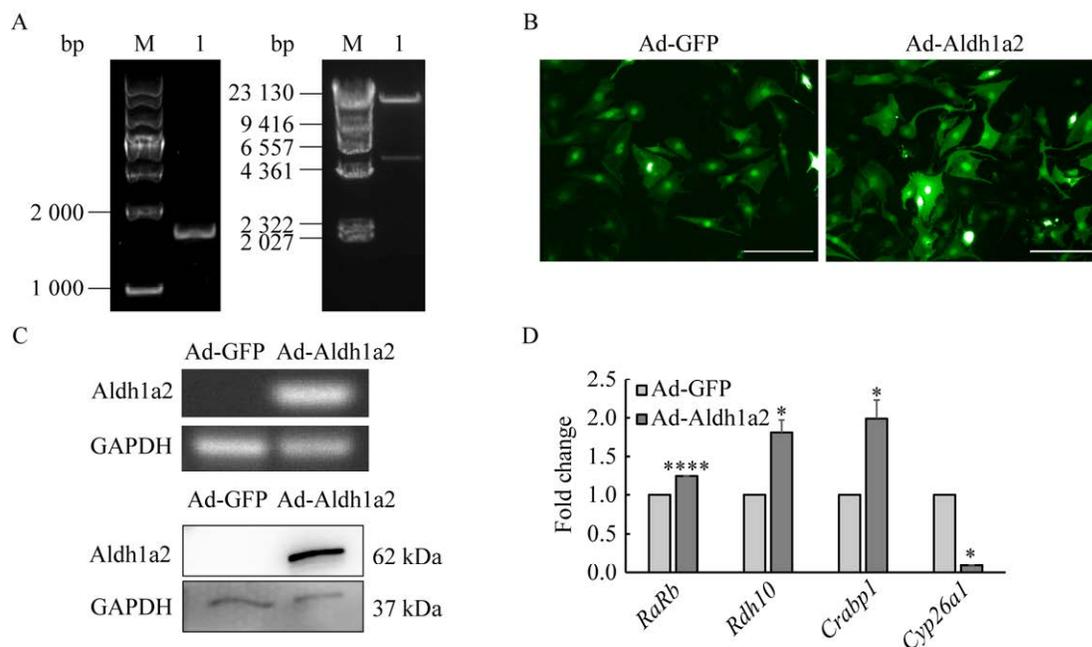


图 2 过表达 *Aldh1a2* 的腺病毒的包装和鉴定 A: *Aldh1a2* 全长 cDNA 的扩增和 Ad-Aldh1a2 腺病毒载体的酶切鉴定. B: 心肌细胞表达绿色荧光蛋白 GFP 情况的检测. 标尺=100  $\mu\text{m}$ . C: RT-PCR 和蛋白质印记杂交检测心肌细胞感染 Ad-Aldh1a2 后 *Aldh1a2* mRNA 和蛋白质的表达情况. D: 实时荧光定量 PCR 检测心肌细胞 *RARb*、*Rdh10*、*Crabp1* 和 *Cyp26a1* 表达情况  $n=3$ ; \*  $P<0.05$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$ .

Figure 2 Packaging and identification of adenovirus overexpressing *Aldh1a2* gene. A: Amplification of *Aldh1a2* full-length cDNA and enzyme digestion identification of Ad-Aldh1a2 adenovirus vector. B: Detection of green fluorescent protein (GFP) expression in cardiomyocytes infected with adenovirus. Scale bar=100  $\mu\text{m}$ . C: Detection of *Aldh1a2* mRNA and protein expression levels in cardiomyocytes by RT-PCR and western blotting. D: Real-time PCR analyses of *RARb*, *Rdh10*, *Crabp1* and *Cyp26a1* mRNA levels in cardiomyocytes.  $n=3$ ; \*  $P<0.05$ ; \*\*\*\*  $P<0.0001$ .

确的质粒, 酶切后连入经过相同酶切的 pAdTrack-CMV 质粒中, 得到带有 Aldh1a2 的质粒 pAdTrack- Aldh1a2。该质粒经 *Pme* I 进一步线性化后, 转化至含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的重组感受态细菌 BJ5183 中进行同源重组。利用 *Pac* I 酶切鉴定筛选发生正确重组的质粒, 当酶切后出现大小为 4.5 kb 的特异性重组条带, 表明 pAd-Aldh1a2 重组腺病毒载体构建成功(图 2A)。最终, 将鉴定成功发生重组的腺病毒载体酶切线性化后转染至 293A 细胞中进行病毒的包装与扩增。

利用重组腺病毒 Ad-Aldh1a2 感染乳大鼠原代心肌细胞, 24 h 后在荧光显微镜下观察, 发现感染病毒后的心肌细胞能成功表达绿色荧光蛋白(图 2B)。进一步提取感染腺病毒心肌细胞的 RNA 及蛋白质, 分别利用实时荧光定量 PCR 及蛋白质印记杂交对 *Aldh1a2* 的表达情况及维甲酸信号通路相关分子表达情况进行检测。与感染 Ad-GFP 的对照组相比, 感染 Ad-Aldh1a2 腺病毒的心肌细胞中 *Aldh1a2* 的 mRNA 及蛋白质表达水平均明显升高(图 2C)。进一步检测了维甲酸信号通路相关分子的表达, 发现与对照组相比, *Aldh1a2* 过表达能显著上调维甲酸信号通路的靶分子 *RARB* (1.24 倍)、*Rdh10* (1.81 倍)和 *Crabp1* (1.99 倍)的表达, 而下调用于降解 RA 的细胞色素 P450 超家族酶分子 *Cyp26a1* (下调 9%)的表达水平(图 2D)。以上结果表明, 实现过表达 Aldh1a2 的 Ad-Aldh1a2 重组腺病毒包装成功, 能够实现在原代心肌细胞内过表达 *Aldh1a2* 并激活维甲酸信号通路。

### 2.3 心肌细胞内过表达 *Aldh1a2* 与心肌细胞肥大生长相关

腺病毒感染心肌细胞 48 h 后, 利用心肌细胞特异性抗体  $\alpha$ -actinin 进行免疫荧光染色, 并针对染色结果进行了心肌细胞表面积的测定和

统计分析。结果显示, 与感染 Ad-GFP 的对照组  $[(103.36 \pm 5.21) \mu\text{m}^2]$  相比, 过表达 *Aldh1a2* 的心肌细胞尺寸明显增加  $[(204.51 \pm 8.12) \mu\text{m}^2]$  (图 3A、3B), 提示 *Aldh1a2* 过表达可能会促进心肌细胞肥大生长和心肌肥厚。病理性心肌肥厚的主要表现除了心肌细胞尺寸增大外, 还会伴随特定胚胎期基因的激活。因此, 提取了心肌细胞的 RNA, 利用实时荧光定量 PCR 对部分肥大标志基因如 *ANF*、*BNP* 及  $\beta$ -*MHC* 的表达水平进行检测(图 3B)。结果显示, 与感染 Ad-GFP 的细胞相比, 感染 Ad-Aldh1a2 的心肌细胞内 *ANF* 的表达水平升高 6.59 倍, *BNP* 升高 1.67 倍,  $\beta$ -*MHC* 升高 7.99 倍, 进一步证实了体外过表达 *Aldh1a2* 会促进心肌细胞肥大生长和病理性心肌肥厚。

### 2.4 心肌细胞内过表达 *Aldh1a2* 促进心肌细胞增殖

利用 Ad-Aldh1a2 腺病毒感染原代心肌细胞后进行 EdU 掺入实验, 发现与感染 Ad-GFP 的对照组心肌细胞相比, Ad-Aldh1a2 感染后的心肌细胞 EdU 掺入阳性信号的心肌细胞比例升高(图 4A、4B)。进一步对细胞周期相关分子 *Ccnd2* 和 *Bub1* 的 mRNA 表达水平进行检测, 发现这 2 个分子在 *Aldh1a2* 过表达的心肌细胞内表达水平分别升高 2.75 倍和 1.47 倍, 提示 *Aldh1a2* 过表达会促进心肌细胞增殖(图 4C、4D)。

## 3 讨论与结论

心肌肥厚是心脏在生理和病理负荷状态下为了维持心脏功能而发生的适应性反应<sup>[9]</sup>。心肌肥厚可分为生理性和病理性肥厚, 其共同特点是心肌细胞体积增大, 但每种类型的肥厚又都有不同的特征<sup>[9]</sup>。生理性肥厚其心脏功能保持正常或收缩功能增强, 无间质纤维化或细胞死亡, 不会发展为心力衰竭, 而病理性心肌肥

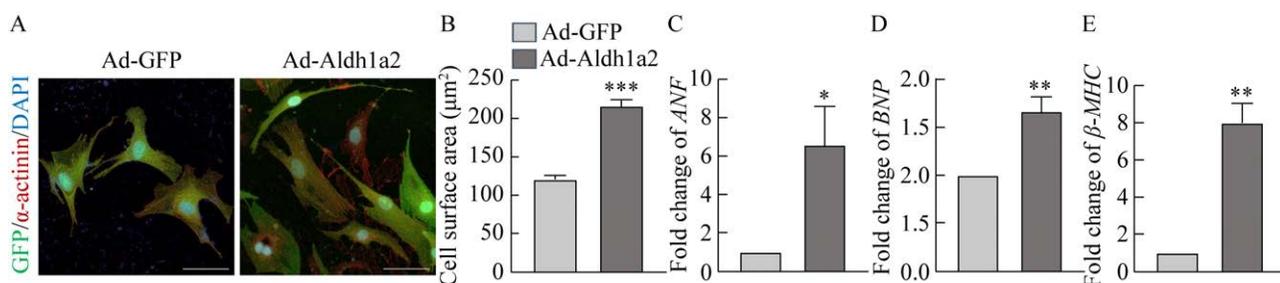


图3 心肌细胞内过表达 *Aldh1a2* 促进心肌细胞肥大生长 A: 免疫荧光检测心肌细胞特异性抗体  $\alpha$ -辅肌动蛋白的表达情况. 标尺=50  $\mu\text{m}$ . B: 心肌细胞分别感染 Ad-GFP 和 Ad-Aldh1a2 后心肌细胞表面面积的统计. C-E: 实时荧光定量 PCR 检测心肌细胞 *ANF*、*BNP* 和  $\beta$ -*MHC* 的表达情况

Figure 3 Overexpression of *Aldh1a2* in cardiomyocytes increased the hypertrophic growth of cardiomyocytes. A: Representative immunofluorescence images of cardiomyocytes stained for  $\alpha$ -actinin (red) and GFP (green). Scale bar=50  $\mu\text{m}$ . B: Quantification of cell surface areas of cardiomyocyte.  $n=4$ , \*\*\*  $P<0.001$ . C-E: Real-time PCR analyses of *ANF*, *BNP* and  $\beta$ -*MHC* mRNA levels in cardiomyocytes.  $n=4$ ; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

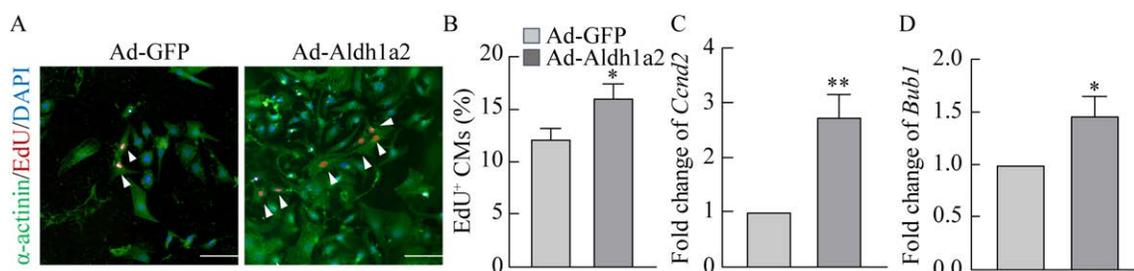


图4 心肌细胞内过表达 *Aldh1a2* 促进心肌细胞增殖 A: 免疫荧光检测心肌细胞特异性抗体  $\alpha$ -actinin 和 EdU 表达情况. 红色为 EdU 阳性信号, 绿色为  $\alpha$ -actinin 染色结果, 蓝色为细胞核染色结果, 标尺=100  $\mu\text{m}$ . B: EdU 阳性心肌细胞占总心肌细胞数比例的统计结果. \* $P<0.05$ . C-D: 实时荧光定量 PCR 检测心肌细胞 *Ccnd2* 和 *Bub1* 的表达情况. \*\*  $P<0.01$ ; \* $P<0.05$

Figure 4 Overexpression of *Aldh1a2* in cardiomyocytes induced proliferation of cardiomyocytes. A: Representative immunofluorescence images of cardiomyocytes stained for EdU (red) and  $\alpha$ -actinin (green). Scale bar=100  $\mu\text{m}$ . B: Quantification of proportion of EdU positive cardiomyocytes to total number of cardiomyocytes, \* $P<0.05$ ; C-D: Real-time PCR analyses of *Ccnd2* and *Bub1* mRNA levels in cardiomyocytes,  $n=3$ , \*\*  $P<0.01$ ; \*  $P<0.05$ .

厚会出现心脏收缩功能受损、明显的心肌纤维化以及重新表达一类胚胎期基因, 并最终逐渐演变为心衰<sup>[10]</sup>. 尽管目前对心肌肥厚发生的分子机制研究取得了一定的进展, 但对其发生的具体调节分子机制还不完全明晰. 介导 RA 信号通路的 *Aldh1a2* 在调节机体发育尤其在调节

心脏发育中发挥重要功能<sup>[11]</sup>. *Aldh1a2* 合成 RA 标志着中胚层模式的形成, 并诱导人类多能干细胞分化成心房心肌细胞<sup>[12]</sup>. 此外, *Aldh1a2* 参与调节心房、心室和心外膜的形成. 在调节心脏疾病方面, 近年来有研究显示 *Aldh1a2* 在不同心脏损伤小鼠模型的心肌细胞内表达水

平均升高<sup>[12-13]</sup>，但这种升高是否只是作为心肌损伤的标志物，还是在病理心脏重塑的发生发展中发挥作用，目前尚不清楚。本研究通过包装用于过表达 Aldh1a2 的腺病毒来感染原代心肌细胞，发现该腺病毒能够成功实现在心肌细胞内过表达 Aldh1a2 并激活维甲酸信号通路；进一步检测心肌细胞尺寸以及胚胎期基因的表达情况，发现过表达 Aldh1a2 不仅促进了心肌细胞尺寸的增加，还引起心肌细胞内部分胚胎期基因表达水平升高，表明 Aldh1a2 过表达能促进心肌细胞的肥大生长，可能在调节病理性心脏重塑发生过程中具有重要功能。

此外，研究中还发现 Aldh1a2 过表达会促进心肌细胞的增殖，这与在斑马鱼研究中发现的 Aldh1a2 合成视黄酸是斑马鱼心肌细胞增殖和心脏再生所必需的现象<sup>[14]</sup>相一致。以往的研究发现心脏损伤再生过程中，维甲酸对增殖的调节可能是通过调节细胞周期和/或心肌细胞的去分化作为增殖的先决条件，且 Aldh1a2 主要在心外膜和心内膜的细胞内表达升高<sup>[15]</sup>。本研究发现心肌细胞内 Aldh1a2 的表达也能促进细胞增殖，提示其对心脏损伤再生也有一定的贡献。然而，目前关于 Aldh1a2 过表达是通过影响哪个环节来促进心肌细胞增殖尚不清楚，有待于进一步研究。

综上所述，本研究首次利用体外研究揭示了 Aldh1a2 促进心肌细胞肥大生长和增殖的功能，为进一步了解 Aldh1a2 在心脏组织中的功能，探索心脏重塑相关疾病的发生机制奠定了良好的基础。值得注意的是，为了进一步分析 Aldh1a2 在心脏组织中的功能，今后还需要建立心肌细胞特异性 Aldh1a2 过表达转基因小鼠模型来完善对 Aldh1a2 体内功能研究。此外，还将进一步利用高通量筛选技术筛选和鉴定

Aldh1a2 过表达引起的差异表达分子，以明确 Aldh1a2 过表达促进心肌细胞肥大生长和增殖的分子机制。

## REFERENCES

- [1] LAVUDI K, NUGURI SM, OLVERSON Z, DHANABALAN AK, PATNAIK S, KOKKANTI RR. Targeting the retinoic acid signaling pathway as a modern precision therapy against cancers[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1254612.
- [2] PINOS I, CORONEL J, ALBAKRI A, BLANCO A, McQUEEN P, MOLINA D, SIM J, FISHER EA, AMENGUAL J.  $\beta$ -carotene accelerates the resolution of atherosclerosis in mice[J]. *eLife*, 2024, 12: RP87430.
- [3] CHEN YT, CLARKE OB, KIM J, STOWE S, KIM YK, ASSUR Z, CAVALIER M, GODOY-RUIZ R, von ALPEN DC, MANZINI C, BLANER WS, FRANK J, QUADRO L, WEBER DJ, SHAPIRO L, HENDRICKSON WA, MANCIA F. Structure of the STRA6 receptor for retinol uptake[J]. *Science*, 2016, 353(6302): aad8266.
- [4] STEFANOVIC S, ZAFFRAN S. Mechanisms of retinoic acid signaling during cardiogenesis[J]. *Mechanisms of Development*, 2017, 143: 9-19.
- [5] PAN J, BAKER KM. Retinoic acid and the heart[M]//*Vitamins & Hormones*. Amsterdam: Elsevier, 2007: 257-283.
- [6] BCHINI R, VASILIOU V, BRANLANT G, TALFOURNIER F, RAHUEL-CLERMONT S. Retinoic acid biosynthesis catalyzed by retinal dehydrogenases relies on a rate-limiting conformational transition associated with substrate recognition[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, 202(1/2/3): 78-84.
- [7] PAVAN M, RUIZ VF, SILVA FA, SOBREIRA TJ, CRAVO RM, VASCONCELOS M, MARQUES LP, MESQUITA SMF, KRIEGER JE, LOPES AAB, OLIVEIRA PS, PEREIRA AC, XAVIER-NETO J. ALDH1A2 (RALDH2) genetic variation in human congenital heart disease[J]. *BMC Medical Genetics*, 2009, 10: 113.

- [8] Wang T, Li Z, Yang X, Wang J. Overexpression of tyrosine kinase substrates regulated by hepatocyte growth factor promotes autophagy in cardiomyocytes[J]. *Biotechnology Communication*, 2017(6): 737-741.
- [9] SHIMIZU I, MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2016, 97: 245-262.
- [10] VIKSTROM KL, BOHLMAYER T, FACTOR SM, LEINWAND LA. Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis[J]. *Circulation Research*, 1998, 82(7): 773-778.
- [11] CUNNINGHAM TJ, DUESTER G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(2): 110-123.
- [12] BEECROFT SJ, AYALA M, MCGILLIVRAY G, NANDA V, AGOLINI E, NOVELLI A, DIGILIO MC, DOTTA A, CARROZZO R, CLAYTON J, GAFFNEY L, McLEAN CA, NG J, LAING NG, MATTESON P, MILLONIG J, RAVENSCROFT G. Biallelic hypomorphic variants in ALDH1A2 cause a novel lethal human multiple congenital anomaly syndrome encompassing diaphragmatic, pulmonary, and cardiovascular defects[J]. *Human Mutation*, 2021, 42(5): 506-519.
- [13] WITTY AD, MIHIC A, TAM RY, FISHER SA, MIKRYUKOV A, SHOICHET MS, LI RK, KATTMAN SJ, KELLER G. Generation of the epicardial lineage from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 1026-1035.
- [14] ITOU J, AKIYAMA R, PEHOSKI S, YU XD, KAWAKAMI H, KAWAKAMI Y. Regenerative responses after mild heart injuries for cardiomyocyte proliferation in zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*, 2014, 243(11): 1477-1486.
- [15] TONG L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013, 70(5): 863-891.

(本文责编 陈宏宇)