

心脏特异表达肾素(原)受体转基因小鼠的建立

廉 虹, 马元武, 刘 宁, 全雄志, 张连峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立心脏特异表达(p)RR 的转基因小鼠, 研究(p)RR 在心脏病发病过程中的调节作用。**方法** 将(p)RR 基因插入到心脏特异表达启动子 α -MHC 下游, 构建转基因表达载体, 通过显微注射的方法建立(p)RR 转基因小鼠, PCR 法鉴定转基因小鼠的基因型; Western blot 和免疫组化的方法检测(p)RR 在心脏组织中的表达; 利用小动物超声仪检测转基因小鼠的心脏结构和功能; 双色免疫荧光共聚焦进行(p)RR 蛋白在转基因小鼠中的亚细胞定位, Western blot 方法检测了钙泵(ATP2A2)、钠-钙交换体 1(NCX 1)以及肌钙蛋白 T(cTnT)在转基因小鼠心脏组织中表达量的变化情况。**结果** 建立了心脏高表达(p)RR 的转基因小鼠品系; 内源性和转基因高表达的(p)RR 蛋白均定位在细胞内高尔基体和内质网上; 心脏特异高表达(p)RR 蛋白使小鼠心脏收缩功能增强, 主要表现在与同窝阴性对照小鼠相比, 转基因小鼠收缩期左室内径(LVID, systolic)降低 9% ($P < 0.05$, $n = 18$), 收缩期容积(LVESV, systolic)减少了 23% ($P < 0.05$, $n = 18$), 射血分数 EF(ejection fraction)升高 14% ($P < 0.01$, $n = 18$), 短轴缩短率 FS(fraction shortening)升高 20% ($P < 0.01$, $n = 18$); 和心脏收缩功能和钙离子相关的 ATP2A2 和 NCX 1 表达均下调, 而 cTnT 表达量上调。**结论** 在心脏中过表达(p)RR 能够引起心脏收缩功能明显增强, 同时直接或间接调节 ATP2A2、NCX 1 和 cTnT 表达。提示(p)RR 可能是调节心脏中的钙离子而参与影响心肌功能。

【关键词】 肾素(原)受体; 转基因; 小鼠; 心脏; 超声成像

【中图分类号】 R541; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0025-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.005.007

Establishment of Heart-specific Overexpression of (pro) Renin Receptor Transgenic Mice

LIAN Hong, MA Yuan-wu, LIU Ning, QUAN Xiong-zhi, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory
Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models,
State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish heart-specific (pro)renin receptor [(p)RR] transgenic mice and investigate its regulation effect on the process of cardiomyopathy. **Methods** The transgenic vector was constructed by inserting the human (p)RR cDNA sequence into the down-stream of α -MHC promoter. The transgenic mice were generated by the method of microinjection. The genotype of transgenic lines was identified by PCR, and the expression levels of the (p)RR gene were detected by Western Blot and immunohistochemistry. The cardiac geometry and function were detected by echocardiography. Subcellular localization of (p)RR was performed by double immunofluorescence confocal staining. At

[基金项目] 国家科技计划课题 神经和代谢疾病基因工程模型的建立 2012BA139B02。

[作者简介] 廉虹(1982 年-), 女, 博士生。E-mail: lian_hong1982@163.com。

[通讯作者] 张连峰。E-mail: zhanglf@cnilas.org。

last, we detected the expression level of ATP2A2, NCX1 and cTnT via Western Blot. **Results** The heart-specific (p)RR transgenic mice were established and one high-level expression line was identified. Endogenous and transgenic (p)RR were located in the Golgi body and endoplasmic reticulum. Overexpression (p)RR with heart-specific resulted in enhancing contractile properties. Compared with the wild type mice, transgenic mice left ventricular systolic diameter decreased by 9% ($P < 0.05$, $n = 18$), left ventricular end-systolic volume reduced by 23% ($P < 0.05$, $n = 18$), ejection fraction increased by 14% ($P < 0.01$, $n = 18$) and fraction shortening elevated by 20% ($P < 0.01$, $n = 18$). The expression level of the proteins involving in Ca^{2+} and contractile properties were altered, SRECA and NCX1 decreasing, while cTnT increasing. **Conclusion** Over-expression of (p)RR in the heart of the transgenic mice led to significantly enhanced cardiac contractile properties, and while regulated the expression of SRECA, NCX1 and cTnT, directly or indirectly. These results indicated (p)RR participated in influencing cardiac function via regulating the Ca^{2+} of the myocardium.

【Key words】 (pro)Rennin receptor; Transgene; Mice; Heart; Echocardiography

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 是控制血压和体内电解质平衡经典的调节系统。2002 年, Nguyen 等^[1]利用重组的带有放射性标记的人源肾素, 在人类肾脏 cDNA 库中筛选出了一个与以往发现的任何膜受体蛋白均无同源性的受体蛋白, 即肾素(原)受体 [(p)RR]。(p)RR 是一种小分子量蛋白, 含有 350 个氨基酸, 分子量 $35 \sim 39 \times 10^3$, 由大段的细胞外 (EC) 部分, 单次跨膜区 (TM) 和一个短的细胞内 (IC) 部分组成。由于肾素(原)受体最初发现是与 V-ATPase (囊泡 H⁺-ATPase) 偶联, 所以编码此蛋白的基因被命名为 ATP6ap2 (ATPase 6 accessory protein2)^[2,3]。

(p)RR 在人体内广泛表达: 其中在心脏、脑、胎盘中表达最多, 在肝、肾脏和胰腺中表达次之, 在肺和骨骼肌组织也有少量表达。序列比对分析显示, (p)RR 在各物种间的同源性非常高, 人的 (p)RR 与大鼠、小鼠、鸡、青蛙和斑马鱼等均具有较高同源性^[4], 推测这个基因在生命体中具有重要的功能。在人类此基因存在于 X 染色体上。至今, 已经发现了两种与 (p)RR 相关的疾病, 一种是该基因的 4 号外显子的剪切增强子发生 321 位 C>T 的沉默突变引起神经系统智力缺陷、癫痫和共济失调等病症^[5]; 第二种是 (p)RR 基因多态性的 (IVS) 5 + 169C>T (rs5918007) 基因型与人类高血压相关^[6,7]。

(p)RR 敲除会导致胚胎致死, 这很大程度的限制了研究者的研究进程。随后, Celine A 等^[8]构建了血管平滑肌细胞 (VSMC) 特异表达 (p)RR 的转基因大鼠, 发现 6 月龄的大鼠出现血压升高、心率加快的现象, 并且症状随年龄的增加更加严重。在糖尿病大鼠的心脏中, (p)RR 在蛋白和 mRNA 水平均增加三倍^[9]。这些结果说明 (p)RR 可能参与与高血压与糖尿病等病理过程。由于该基因在心肌中有广

泛表达, 我们推测它在心脏的生理功能中发挥一定的作用。因此, 本文构建了心脏特异表达 (p)RR 的转基因小鼠, 并初步探讨了该基因对心脏功能的影响。

1 材料和方法

1.1 (p)RR 基因的克隆和转基因小鼠的制备

从 OriGene 公司购买的带有 (p)RR cDNA 的质粒 (Sc111138), 通过 PCR 扩增获得带有 SalI 和 AflII 酶切位点的 (p)RR 基因 cDNA 目的片段, 引物序列如下 Ps (SalI): 5'-CCGGTCGACCACCATGGC TGTGTTTG-3'; Pa (AflII): 5'-CTCTACTTAAGCAT CACAGGCACACACAA-3' (由 invitrogen 公司合成)。反应条件: 94 °C 预变性 5min, 变性 94 °C 30s, 退火 62 °C 30s, 延伸 72 °C 2min, 共 30 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后克隆到 pMD18-T Vector, 经测序比对后, 正确无突变碱基序列连入 α -MHC (Genbank accession no. U_71441, clone 26) 启动子下游, 构建心脏特异表达 (p)RR 的转基因载体, 经 Not I 将表达载体线性化, Sephadex G50 柱纯化, 将 DNA 浓度调整至 5 ng/ μ L, 用显微注射法注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中 (C57BL/6J 康蓝公司 SCXK(京)2004001), 用 ICR 小鼠作假孕受体, 制备转基因小鼠 (TE2000-U 显微注射仪)。实验中涉及动物的操作程序已经得到医科院实验动物研究所动物福利和管理委员会的批准, 批准号: ILAS-GC-2010-033。

1.2 PCR 法鉴定 (p)RR 转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在出生 9 ~ 14 d 用剪趾法标记, 收集剪下的组织, 用碱裂解法提取基因组 DNA^[10], 用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。 α MHC-(p)RR 转基因小鼠 PCR 引物序列如下 Ps: 5'

CTTTCAGTCACATTGCGGCA -3', Pa:5'-TGCGTTCCC ACCATAGAGAC-3' (由 invitrogen 公司合成), 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 变性 94 °C 30 s, 退火 59 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 30 个循环。

1.3 Western blot

用小鼠脱颈椎法, 牺牲小鼠, 取 100 mg 心脏组织加入 1 mL 预冷的蛋白裂解液, 冰上充分研磨, 之后冰上静置 30 min, 再将组织匀浆于 4 °C, 12000 r/min 离心 30 min, 吸取上清即为心脏组织总蛋白。取 30 μ g 蛋白上样, 15% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移到 0.45 μ m 硝酸纤维素 NC 膜上 (Millipore, 美国)。5% 脱脂奶粉封闭液, 室温下置摇床上封闭 1 h, 再用 TBST 稀释的羊抗人源重组的 (p)RR 多克隆抗体 (AF5176, R&D, 美国) (1:250 稀释), 4 °C 摇床杂交过夜。次日, 待恢复室温后, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。置入 TBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊抗体 (Pierce, 美国) (1:15000), 室温杂交 1 h, 采用 HRP-GAPDH 作为内参, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。将膜置于化学发光液中, X-Ray 胶片曝光、显影及定影。

1.4 免疫组织化学

选用 3 月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠心脏固定在中性福尔马林中 24 h, 进行脱水、包埋、切片, 常规脱蜡入水, 枸橼酸钠抗原热修复, 待恢复室温后 3% H_2O_2 去内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 滴加 (p)RR 抗体 (AF5176, R&D, 美国) (1:50 稀释), 湿盒内 4 °C 过夜; PBS 洗 3 $\times$ 5 min 后加入兔抗山羊二抗 (具体用法详见二步法免疫组化试剂盒, PV-2003), PBS 洗 3 $\times$ 5 min, DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 脱水、透明、封片, 光镜下常规观察病理切片。

热修复和去除过氧化物酶的病理切片, 分别滴加识别高尔基体标志蛋白抗体: GM30 (ab1299, Abcam, 美国) (1:100)/识别肌浆网标志蛋白抗体: PDI (ab2792, Abcam, 美国) (1:100) 和 (p)RR 抗体 (ab64957, Abcam, 美国) (1:25 稀释) 湿盒内 4 °C 过夜, PBS 洗 3 $\times$ 5 min 后加入 DyLight-标记的抗小鼠 IgG (1:100, KPL) and Alexa 488-标记的羊抗兔 IgG (1:100, Invitrogen) 37 °C 孵 30 min, ProLong Gold 抗淬灭剂封片 (Invitrogen)。制备好的病理切片利用共聚焦显微镜观察分析 (Leica TCS SP2, Germany)。

1.6 心脏超声检查

选用 3 月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠, 用

三溴乙醇 (0.2 mL/10g 体重) 麻醉, 脱去心前区的被毛, 选用 30 Hz 的探头, 按 Zhou^[11] 报道的方法进行心脏超声影像分析 (Vevo770 小动物超声探测系统, 加拿大)。记录左室收缩末期内径 (left ventricular internal diameter at end-systole, LVID;s) 等参数, 左室收缩末期容积 (left ventricular end-systolic volume, LVESV), 射血分数 (percent ejection fraction, EF%), 短轴缩短率 (percent fractional shortening, FS%) 由计算得出。

1.7 统计学分析

数据 SPSS 统计软件处理。先进行数据的方差齐性检验, 组间比较采用独立性 *t* 检验。计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 (p)RR 转基因小鼠的建立

用 PCR 法从购买的质粒中扩增出人源 (p)RR 基因, 测序结果显示同已报道的 (p)RR 序列完全一致 (GenBank No. NM_005765.2), 将其连到 α -MHC 心脏特异表达的启动子下游, 构建 α -MHC-(p)RR 转基因表达载体 (彩插 3 图 1A)。小鼠出生 14 d 提取基因组 DNA, 用 PCR 扩增 (p)RR 基因 339 bp 目的片段, 鉴定 (p)RR 转基因小鼠的基因型 (彩插 3 图 1B), 共得到 4 只首建鼠, 且均可传代。分别提取 (p)RR 首建鼠的 F_1 代阳性转基因小鼠和同龄阴性对照小鼠心脏组织总蛋白, 用 (p)RR 抗体进行 Western blot 分析, 筛选出一个高表达明显的品系, Western blot 图谱显示有三条目的带, 分子量大小分别约为: 35×10^3 , 30×10^3 和 28×10^3 。 35×10^3 的蛋白带是全长的 (p)RR, 30×10^3 和 28×10^3 两条蛋白带为其截短形式 [s(p)RR], 从图中我们可以看出, 转基因小鼠心脏组织内全长的 (p)RR 蛋白表达量没有明显增加, 而两种截短的蛋白表达量却明显的高于同窝阴性小鼠 (彩插 3 图 1C)。取 1 月龄转基因小鼠和同窝阴性对照小鼠用 (p)RR 抗体进行心脏免疫组化分析, 结果显示转基因小鼠的心脏中 (p)RR 的表达明显高于同窝阴性对照小鼠 (彩插 3 图 1D)。

2.2 免疫荧光共聚焦方法进行 (p)RR 亚细胞结构的定位

取 3 月龄转基因小鼠和同窝阴性对照小鼠, 取出心脏制备成石蜡切片, 分别用识别高尔基体或内质网的标志分子的抗体与 (p)RR 抗体进行双色荧

光免疫组化分析,结果显示转基因小鼠和对照小鼠的(p)RR 蛋白与两种细胞器的标志分子能达到共定位,说明转基因表达的(p)RR 蛋白与内源(p)RR 蛋白均存在于高尔基体和内质网上,并且可以看出转基因小鼠心脏中(p)RR 蛋白的表达要明显高于同窝阴性对照小鼠心脏中的表达(彩插 4 图 2A,B)。

2.3 超声检查 (p)RR 转基因小鼠的心脏几何构型及心功能

将 3 月龄的 (p)RR 转基因小鼠和同窝阴性对照小鼠进行心脏超声影像分析(表 1),结果显示,与同窝阴性对照小鼠相比,(p)RR 转基因小鼠收缩期左室内径(LVID, systolic)降低 9% ($P < 0.05$, $n = 18$),收缩期容积(LVESV, systolic)减少了 23% ($P < 0.05$, $n = 18$),射血分数 EF (ejection fraction) 升高 14% ($P < 0.01$, $n = 18$),短轴缩短率 FS (fraction shortening) 升高 20% ($P < 0.01$, $n = 18$)。结果说明,(p)RR 基因的转入增强了心脏的收缩性能,使心功能有了明显的提高。

2.4 转基因表达 (p)RR 基因使转基因小鼠心脏中钙泵、钠-钙交换体 1 表达下调,肌钙蛋白 T 表达上调

提取 3 月龄的 (p)RR 转基因小鼠和同窝阴性对照小鼠心脏组织总蛋白,进行钙泵(ATP2A2)、钠-钙交换体 1(NCX 1)以及肌钙蛋白 T(cTnT)抗体的 Western blot 检测分析,结果发现 ATP2A2 和 NCX 1

表达均下调,其中钙泵表达量的降低十分显著;而肌钙蛋白 T 表达量上调(图 3)。

3 讨论

自 2002 年 Nguyen 等^[1]首次报道了人肾素(原)受体的存在之后,人们关于此受体的生物功能研究都集中在全长的(p)RR 形式。Cousin 等^[12]通过对小鼠胚胎干细胞(E14),大鼠平滑肌细胞(VSMC)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO)等多种细胞的培养基进行 Western blot 分析,发现一个 28×10^3 (p)RR 低分子量形式的存在,由于这种形式的蛋白是在培养基中发现的,所以被命名为 s(p)RR。进一步研究发现,s(p)RR 是由弗林蛋白酶剪切产生的,而且 s(p)RR 存在于血浆和尿液中。不久,Yoshikawa 等^[13]发现了一种由 ADAM19 剪切产生的游离在培养基中一种 s(p)RR 形式,这两种 s(p)RR 形式是否是(p)RR 的同一种剪切形式以及它们各自的功能,现在还有待进一步研究。本文构建的(p)RR 转基因小鼠,除了全长的(p)RR 外,两条截短的蛋白从分子量大小上看,应该就是以上两篇文献中的所发现的 s(p)RR,本文构建的转基因小鼠全长(p)RR 蛋白没有明显增多而两种 s(p)RR 蛋白明显高于同窝阴性对照小鼠,这一点还有待进一步解释。这两个独立的研究小组^[12,13]在体外培养的细胞中也进行了(p)RR 的亚细胞定位,结果表

表 1 三月龄(p)RR 转基因小鼠心脏结构和功能 M 超生分析($n = 18$)

Tab. 1 The cardiac structure and function analysis of 3-month transgenic mice by M-mode echocardiograph ($n = 18$)

参数 Parameters	左室收缩期内径 LVID;s(mm)	左室收缩期容积 LVESV;s(ul)	射血分数 EF(%)	短轴缩短率 FS(%)
野生型小鼠 Wild type	2.60 ± 0.24	25.20 ± 5.89	61.77 ± 5.50	32.85 ± 3.96
转基因小鼠 Transgenic mice	2.36 ± 0.20*	19.49 ± 4.24*	70.68 ± 3.75**	39.62 ± 3.06**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

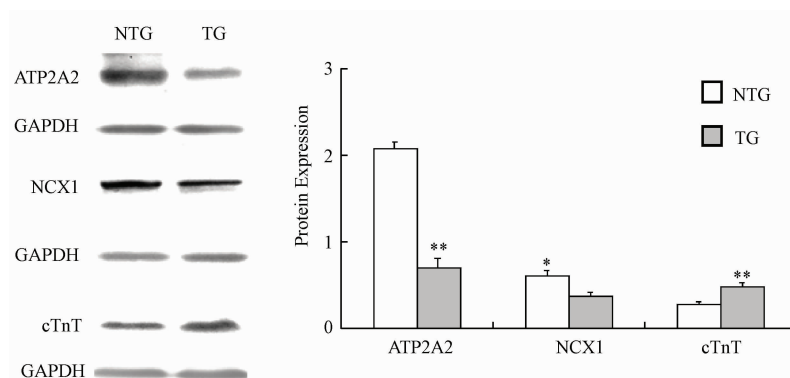


图 3 转基因表达(p)RR 引起 ATP2A2、NCX 1 和 cTnT 蛋白表达变化

Fig. 3 Transgenic (p)RR leading to alter the expression level of ATP2A2/NCX 1/cTnT

明(p)RR 主要存在于内质网、高尔基体、溶酶体等细胞器中。本研究在小鼠心脏组织中进行了(p)RR 蛋白的定位研究,证实了过表达的(p)RR 蛋白与内源性的(p)RR 蛋白在小鼠心脏组织中均定位在内质网和高尔基体上,并且转基因小鼠心脏中(p)RR 蛋白的表达明显高于对照小鼠心脏组织。心肌细胞中内质网结构非常发达,对钙的储存、释放和心脏的收缩、舒张起到重要的作用,(p)RR 定位在内质网上可能更有利于其参与心肌节律性收缩舒张活动过程中。高尔基体是将蛋白进行加工、分类和包装的主要场所,推测(p)RR 的两种 s(p)RR 形式在高尔基体上被剪切产生,并且驻留于此。

钙离子作为兴奋-收缩的偶联介质,在维持心肌正常收缩和舒张过程中起到重要的作用。心肌细胞的收缩和舒张与细胞内钙的释放与储存相偶联。钙循环主要包括内质网中储存的钙的释放、钙的回摄和钙的储存三个过程。位于细胞膜表面的 L 型钙通道受到刺激后会激活内质网膜上的 RyR 受体(ryanodine receptor)从而引起内网中钙的释放,此时游离的钙离子会结合肌钙蛋白引起肌丝的滑动,使心肌产生收缩运动,随着舒张过程的开始内质网膜上的 ATP2A2 逐步将细胞内游离的钙回收至内质网中,同时 NCX 1 也将少部分的钙转运至细胞膜外。可以看出在这一过程中 ATP2A2 和 NCX 1 主要起到将细胞中游离的钙转运回内质网中,并且在这一过程中 ATP2A2 起到关键的作用。本文中发现(p)RR 转基因小鼠心脏中 ATP2A2 和 NCX 1 表达量明显降低,这显然影响了游离钙离子向内质网中的回摄,细胞内钙离子浓度持续的维持在高浓度的状态下,类似于钙超载的状态,使肌钙蛋白等钙相关蛋白不得不继续工作,造成心肌收缩力增强。同时我们检测的肌钙蛋白 T 在(p)RR 转基因小鼠心脏中的表达确实也是升高的。心脏超声结果同时显示,(p)RR 转基因小鼠心脏心功能明显增强,这也是心肌收缩力增强的结果。

在心脏中过表达(p)RR 能够引起心脏收缩功能明显增强,同时我们发现 ATP2A2、NCX 1 和 cTnT 蛋白表达量出现了明显变化,转基因小鼠心功能增强。过表达的(p)RR 是如何调节这些钙离子相关蛋白的从而影响到心脏功能,这些都有待于我们进一步研究。不过本研究提示我们,(p)RR 可能是通过调节心脏中的钙离子从而影响心肌功能的。

在接下来的的研究中,我们将从分子机制出发,探求该转基因小鼠的表型的内在机制,更加深入的研究(p)RR 在心脏中的生物学活性。

(p)RR 的发现,为经典的肾素-血管紧张素系统增添了新的内容,使这一系统重新成为研究热点。目前人们已经发现(p)RR 在心血管方面的重要性,关于(p)RR 在心脏中发挥的生物活性还有待进一步研究,它可能成为治疗心血管疾病的重要靶点并且对其信号通路的研究有利于我们对一些心血管疾病发生发展的分子机制的深入了解。

参考文献:

- [1] Nguyen G, Delarue F, Burckle C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin [J]. J Clin Invest, 2002, 109 (11): 1417 - 1427.
- [2] Burckle C and Bader M. Prorenin and its ancient receptor [J]. Hypertension, 2006, 48 (4): 549 - 551.
- [3] L'Huillier N, Sharp, M. G. F., Dunbar, D. R. and Mullins, J. On the relationship between the renin receptor and the vacuolar proton ATPase membrane sector associated protein (M8-M9) [J]. Basic Science for the Cardiologist, 2006, 20: 17 - 34.
- [4] Wakeel A, Kuriakose JA and McBride JW. An Ehrlichia chaffeensis tandem repeat protein interacts with multiple host targets involved in cell signaling, transcriptional regulation, and vesicle trafficking [J]. Infect Immun, 2009, 77 (5): 1734 - 1745.
- [5] Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14 (8): 1019 - 1027.
- [6] Hirose T, Hashimoto M, Totsune K, et al. Association of (pro) renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Japanese men: the Ohasama study [J]. Am J Hypertens, 2009, 22 (3): 294 - 299.
- [7] Ott C, Schneider MP, Delles C, et al. Association of (pro) renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Caucasian men [J]. Pharmacogenet Genomics, 2011, 21 (6): 347 - 349.
- [8] Burckle CA, Jan Danser AH, Muller DN, et al. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats [J]. Hypertension, 2006, 47 (3): 552 - 556.
- [9] Connelly KA, Advani A, Kim S, et al. The cardiac (pro) renin receptor is primarily expressed in myocyte transverse tubules and is increased in experimental diabetic cardiomyopathy [J]. J Hypertens, 2011, 29 (6): 1175 - 1184.
- [10] Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. Biotechniques, 2000, 29 (1): 52, 54.
- [11] Zhou YQ, Foster FS, Nieman BJ, et al. Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound

- biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 18 (2) : 232 – 244.
- [12] Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, et al. Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma [J]. *Hypertension*, 2009, 53 (6) : 1077 – 1082.
- [13] Ayumu Yoshikawa YA, Ken-ichi Kusano, Fukuko Kishi, Teruo Susumu, Shinichiro Iida, Shoichi Ishiura, Shigeyuki Nishimura, Masayoshi Shichiri and Takaaki Senbonmatsu. The (pro) renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space [J]. *Hypertension Research* 2011, 34 : 599 – 605.

[修回日期] 2012-01-05