

自噬在血管紧张素Ⅱ诱导心肌细胞肥大中的作用

汪海宁, 刘晨*, 李燕辉, 陈琮, 孙刚, 薛睿聪, 董吁钢

(中山大学附属第一医院 卫生部辅助循环重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨自噬在血管紧张素(Ang)Ⅱ诱导心肌细胞肥大中的作用。【方法】原代培养的乳鼠心肌细胞,采用AngⅡ干预建立心肌肥大的模型;在光学显微镜下观察心肌细胞的形态,采用Real time PCR技术检测心肌细胞肥大标志物心房利钠多肽(ANP)的表达、Western blot法检测LC3蛋白的表达。【结果】AngⅡ可抑制自噬相关基因LC3蛋白的表达。自噬阻断剂3-甲基腺嘌呤(3MA)会促进AngⅡ诱导的心肌细胞肥大。【结论】AngⅡ可能通过抑制自噬来诱导心肌细胞肥大。

关键词: 心肌细胞;心肌肥大;血管紧张素Ⅱ;自噬;相同基因;微管蛋白1轻链3

中图分类号: R363

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)04-0440-04

Role of Autophagy in Angiotensin Ⅱ Induced Cardiac Hypertrophy

WANG Hai-ning, LIU Chen*, LI Yan-hui, CHEN Cong, SUN Gang, XUE Rui-cong, DONG Yu-gang

(Cardiovascular Core Laboratory Assisted Circulation Laboratory of the Ministry of Health of the People's Republic of China, Department of Cardiovascular Disease, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the role of autophagy in cardiac hypertrophy induced by angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ). 【Methods】Cardiac hypertrophy was induced by Ang Ⅱ incultured neonatal rat cardiomyocytes. Morphology and expression of hypertrophy marker atrial natriuretic peptide (ANP) were detected by optical microscope and real time-PCR. Autophagic marker, LC3 level was tested by Western blotting.【Results】Ang Ⅱ increased volume of cardiomyocyte, and up regulated RNA expression of ANP. Ang Ⅱ inhibited autophagy related gene LC3 protein expression. Blocking autophagy by 3-MA could significantly enhance myocardial hypertrophy induced by Ang Ⅱ.【Conclusion】Ang Ⅱ may induce myocardial hypertrophy by inhibiting autophagy.

Key words: cardiomyocyte; hypertrophy; angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ); autophagy related gene; LC3 (Tiny tubes related proteins 1 light chain 3)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4): 440-443; 448]

心肌肥大是心血管疾病的独立危险因素。心肌肥大的本质是蛋白质的合成和降解失衡:持续的外界刺激使心肌蛋白质合成的信号通路过度表达,而与之对抗的代谢通路在一定程度上受到抑制,表现为心肌细胞体积增大、蛋白质合成增加及肌纤维增多,最终发生心肌重塑^[1];因而抑制心肌肥大阻断蛋白合成信号通路和上调蛋白分解信号通路两种途径。目前大多数的研究主要关注前者,后者研究相对较少;所以积极在分解信号通路中寻找可调控心肌肥大的因子,以之为治疗新靶点,具有极为重要的临床实践意义。心肌肥大的早

期可以通过去除引起肥大的因素,降低蛋白质合成代谢通路,或者促进蛋白质降解途径而得以逆转。机体分解代谢的途径主要有蛋白酶体和自噬两种。自噬(autophagy)是广泛存在于真核细胞中的生命现象,也是细胞清除废物、重建结构、生长发育的重要途径^[2]。微管相关蛋白1轻链3(LC3, Tiny tubes related proteins 1 light chain 3),是第一个自噬体形成相关的哺乳动物蛋白,也是自噬的特异性蛋白,分为胞质型LC3-I和膜型LC3-II。在生理情况下,自噬相关基因LC3主要在细胞质内以LC3-I的形式存在,基本处于静息状态;而

收稿时间:2012-03-16

基金项目:国家自然科学基金(81170226/H0212)

作者简介:汪海宁,博士,主治医师, E-mail: shadowcarol@126.com; *通信作者:刘晨, chenliu81@hotmail.com

当机体出现饥饿、缺血等应激情况时,胞质型 LC3-I 就迅速转化成为膜型 LC3-II,后者是 LC3 的活性形式,它立即与溶酶体结合并参与机体受损细胞器和蛋白质的清除。本研究即以自噬与心肌肥大的关系为切入点,探讨在 Ang II 诱导心肌细胞肥大的过程中自噬的变化,并通过自噬抑制剂阻断来明确自噬在此过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 乳鼠,出生 1~2 d,清洁级,中山大学实验动物中心提供。动物心脏的提取步骤依照实验动物管理规定进行。

1.2 主要试剂

DMEM-F12 培养基和胎牛血清(Hyclone),胰蛋白酶和 I 型胶原酶(Gibco),5-溴脱氧尿嘧啶核苷 BrdU (Sigma),血管紧张素Ⅱ Ang II (Anaspec),3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3MA,Sigma),微管相关蛋白 1 轻链 3 LC3 I/II 抗体 (Cell Signaling Technology),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)GADPH (Cell Signaling Technology),羊抗兔 IgG-HRP (PTG,proteintech group),免疫印迹发光试剂盒(Millipore),无核酶水,RNA 酶抑制剂,脱氧核糖核苷酸混合物,逆转录酶,随机引物(Takara)。

1.3 新生大鼠原代心肌细胞分离、培养

在无菌条件下开胸取出心脏,浸于 D-Hank's 溶液,洗去血污,去除心底结缔组织和心房组织,剪开心室,去除淤血。将心肌组织移入 15 mL 离心管,剪成 1 mm³ 大小,加入 0.5 g/L 的 I 型胶原酶,在 37℃ 恒温槽中轻轻振荡 2 h 以松解组织团块。再加入 0.125 g/L 胰酶消化 2~3 次,每次 5 min。消化所得细胞收集到含 100 mL/L 胎牛血清的培养基,接种到培养皿,置于体积分数 5% CO₂ 的培养箱 60 min,差速贴壁法去除成纤维细胞。心肌细胞以 1×10⁶ mL⁻¹ 密度接种于 6 孔板,加 BrdU 0.03 g/L 以抑制成纤维细胞生长、青霉素及链霉素各 0.1 g/L 以防止细菌污染后,置于 CO₂ 培养箱内培养。接种 24 h,细胞生长融合成片并出现同步收缩时,换为无血清培养基饥饿 24 h 后进行分组干预^[3]。

1.4 细胞实验分组

为观察 Ang II (10⁻⁷ g/L)诱导心肌细胞肥大时 LC3 的变化趋势,将心肌细胞分为 9 组进行药物干预:对照组 0、6、12、24、48 h 组和 AngII 处理 6、12、24、48 h 组;分别在相应干预时间点提取蛋白,以 Western blot 法测定 LC3 水平。

为进一步观察自噬对心肌肥大的影响,将心肌细胞分为:对照组、AngII 组、AngII+3MA(0.745 g/L)、3MA(0.745 g/L)组进行干预,于 48 h 检测心肌肥大的标记物 ANP 的 mRNA 表达水平。

1.5 Western blot 检测蛋白的表达

处理结束后,裂解心肌细胞,提取总蛋白。将总蛋白置于 120 mL/L SDS-PAGE 凝胶上电泳,电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上(80 V,120 min);50 g/L BSA 封闭 1 h 后,分别以 LC3B(1:1 000)、GADPH (1:20 000)4℃ 孵育过夜;次日以 TBST 洗膜后,将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的抗-兔(1:10 000)置于室温下孵育 1 h;免疫印迹以 ECL 显影、曝光。利用 Quantity One 图像分析软件检测蛋白条带的灰度值,以目的条带与 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平^[4]。

1.6 实时定量 PCR

常规 Trizol 裂解法提取 mRNA 并逆转录成 cDNA。根据所做标准曲线:①取一个对照组 cDNA 作为模板,以 0、1:10、1:50、1:100、1:1 000 稀释,依次稀释为 1:10 (A)、1:50 (B)、1:100 (C)、1:1 000 (D);②配体系:总体积为 10 μL,每个样本为 3 个孔 (cDNA 4 μL+ Primer F 0.3 μL+ Primer R 0.3 μL+ H₂O 0.4 μL SYBR GREEN 5 μL)×孔数;③离心:1 811 ×g × 4 min;④Real-time PCR 分析。

定量 PCR 体系同上,先把 cDNA 原液稀释成 50 倍,再加样(4 μL),余同前,每个样本 3 个复孔。放在 Roche PCR 分析仪器里,反应条件为:95℃ 预变性 5 min,然后 95℃ 10 s,60℃ 10 s,72℃ 20 s,共 45 循环。反应结束后,使用 PCR 仪配套软件进行分析^[4]。重复 3 次,数据进行统计学分析。

引物序列:ANP:上游引物:5'-TGAGCCGAGACAGCAAACATC-3',下游引物:5'-AGGCCAGGAA GAGGAAGAAGC-3'; GAPDH,上游引物:5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3',下游引物:5'-TTTGAGGGTGCAGCGAA CTT-3'。

1.7 心肌细胞面积

用 10⁻⁷ g/L Ang II 干预 48 h 的心肌细胞以 40

g/L 多聚甲醛固定,显微镜 400 倍拍照,每组取 50 个同样大小视野,利用图像分析软件 Image pro plus 6.0 计算细胞面积^[3]。

1.8 统计学处理

用 SPSS15.0 统计软件包进行统计学处理,各组数据结果以均数 $\pm$ 标准差表示。各组之间以及各时间点之间的差异采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ang II 诱导的心肌肥大中 LC3 蛋白的表达

为明确在 Ang II 诱导的心肌肥大中自噬的作用,我们用 Ang II 干预体外培养的心肌细胞,分别在 0、6、12、24、48 h 检测 LC3 蛋白的表达情况。因为 LC3 II 是 LC3 的活性形式,所以 LC3 I 和 LC3 II 表明自噬体的数量,LC3 II 的含量或 LC3 II/I 反映自噬的活性^[5]。结果显示:与相应对照组比较,Ang II 干预 6 h 后 LC3 II/LC3 I 比值下降,12 h 至最低值,24、48 h 较前有所回升但仍低于相应对照组(图 1A、B)。提示 Ang II 诱导心肌肥大的同时自噬被抑制。

2.2 自噬在 Ang II 诱导心肌肥大中的作用

我们从心肌细胞形态、细胞面积及心肌肥大标记物水平这三个方面,明确自噬在 Ang II 诱导心肌肥大中的作用。结果显示,与对照组比较,Ang II 刺激 48 h 后细胞面积增大(图 2A),心肌肥大标记物 ANP 的 mRNA 水平上调(图 2B);3-MA 阻断自噬后结合 Ang II 干预,细胞大小和面积增大更加明显(图 2A),ANP 的 mRNA 比值显著增加(图

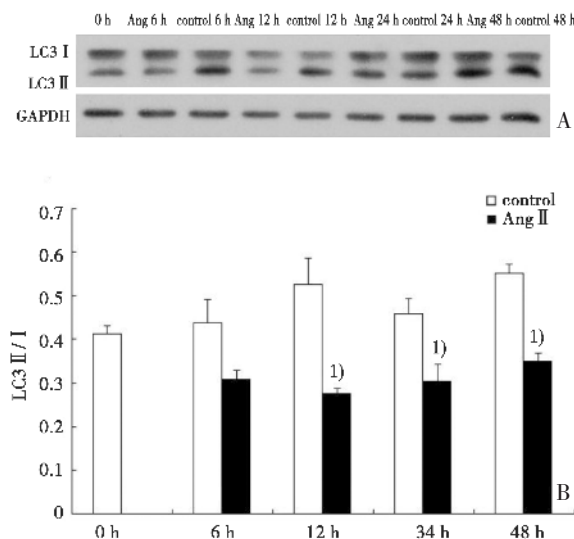


图 1 Ang II 诱导心肌肥大中 LC3 蛋白的表达

Fig.1 The expression of LC3 protein in neonatal cardiomyocytes hypertrophy induced by Ang II

The upper shows the representative Western blot at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h; the lower shows the average ratio of LC3 II / I from five independent experiment at corresponding time. 1) $P < 0.05$ vs control

2B); 而用 3-MA 单独阻断自噬后,细胞大小和形态无明显变化(图 2A),ANP 的 mRNA 比值增加不显著(图 2B)。提示 Ang II 可能通过抑制自噬来诱导心肌细胞肥大。

3 讨 论

既往研究认为基础水平的自噬通过蛋白质转换,清除衰老和受损的细胞器及胞质成分以保持

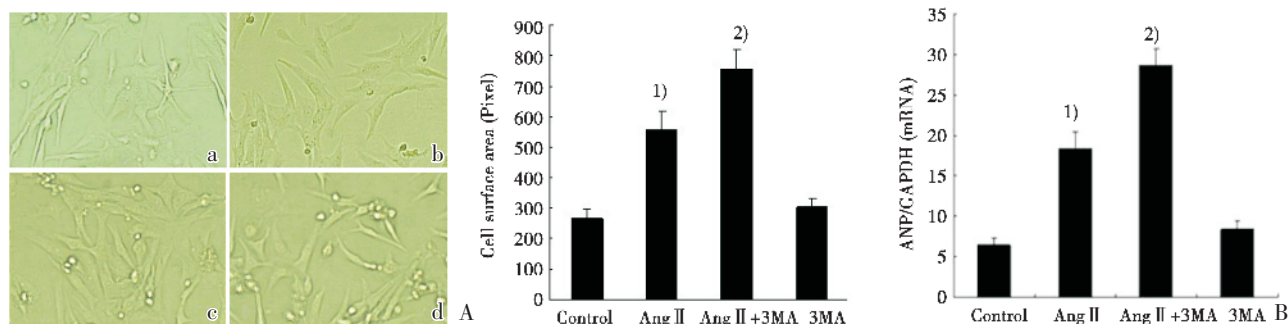


图 2 自噬在 Ang II 诱导心肌肥大中的作用

Fig.2 The effects of autophagy activation on cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang II

A: The upper shows the surface area of cardiomyocytes under microscope, and the below shows the average data from 50 random cardiomyocytes ($\times 400$). (a) control group; (b) Ang II group; (c) Ang II + 3-MA group; (d) 3-MA Group. B: The mRNA expression of hypertrophy marker atrial natriuretic peptide (ANP) from four independent experiment. 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$ vs control

内环境的稳定,例如选择性地清除受损的可释放促凋亡因子如细胞色素C的线粒体,从而发挥抗凋亡和保护细胞的作用^[6-7];而病理条件下,如心肌肥大或心力衰竭时,自噬表达水平的改变对心功能的影响尚不明确。本实验研究自噬在AngⅡ诱导心肌细胞肥大过程中的作用。实验发现,在AngⅡ诱导的心肌细胞肥大过程中自噬活性下降,其相关基因LC3蛋白的表达明显降低。通过阻断自噬,发现心肌细胞面积进一步增大,心肌肥大标记物ANP明显升高,提示AngⅡ可能通过抑制自噬诱导心肌细胞肥大。

人们在心肌肥大中发现,心肌细胞蛋白质合成增加和细胞肥大的同时,伴随着自噬水平的降低。例如Dammrich等发现在主动脉缩窄的模型上自噬减少^[8];Pfeifer等^[9]观察到异丙肾上腺素干预心肌细胞后引起自噬表达降低;然后Nakai等^[10]进行了更深入的研究,他们在横主动脉缩窄(TAC)诱导的心肌肥大模型中发现,术后第1周自噬水平明显低于假手术组,提示在无心衰的心肌肥大代偿期间,自噬活性明显下降;此外亦有文献报道自噬的激活剂雷帕霉素可以阻断由甲状腺激素^[11]、主动脉缩窄^[12]引起的心肌肥大,并且逆转已经存在的心肌肥大^[13]。而最近的研究发现,FoxO3可通过上调自噬水平,使心肌肥大的心脏体积缩小,但不改变细胞肥大的病理学特征^[14]。众所周知,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)在心肌肥大中起关键性作用,而血管紧张素(Ang)Ⅱ是RAAS系统中的一种主要的多功能活性肽,是引起高血压心肌肥大的一种重要刺激因子,本实验利用AngⅡ在体外构建心肌肥大模型,更接近临床上高血压心脏病的发生发展过程。在此模型中,观察到自噬水平明显下调,与上述文献报道一致。说明在AngⅡ诱导的心肌肥大中自噬表达是降低的,提示自噬对于AngⅡ诱导的心肌肥大发展可能起抑制作用。

目前关于阻断自噬后对心肌肥大或心力衰竭中心功能的影响未有定论,如Nakai等^[10]观察到敲除小鼠的Atg5基因或使大鼠的Atg7基因沉默均抑制自噬、导致典型的心肌肥大,而Atg5缺失的小鼠压力负荷1周后出现心功能不全和左室扩张,并伴随泛素化蛋白的堆积、内质网应激和凋亡的增加;Zhu等^[15]研究发现,自噬活性下调的Beclin-1杂合子(Beclin-1+/-)小鼠在严重压

力过负荷下,心室重构与心力衰竭均明显改善,他们认为自噬的上调可能促进了代偿性心肌肥大向心力衰竭的发展。本实验选择阻断剂3-MA抑制自噬表达,结果促进了AngⅡ诱导的心肌肥大,提示AngⅡ可能通过抑制自噬诱导心肌肥大。根据上述文献报道和我们的实验结果表明,在心肌肥大和心力衰竭中自噬对心功能的效应有所不同,前者着重于在体内模型上研究自噬对心肌肥大和心力衰竭的影响,本课题是在体外细胞水平上研究自噬在心肌肥大中的作用。众所周知,心肌肥大的发展趋势必然是心力衰竭,它们是一种疾病的不同病理阶段,所以目前认为:在心肌肥大的初期合成基因的表达高于分解基因,自噬被抑制的可能性较大;到了中后期,随着细胞合成的增加、代谢产物的不断堆积,自噬被激活,其相关蛋白表达明显增加,而过度激活会引起细胞物质大量破坏,并诱导细胞凋亡,最终导致心力衰竭^[15]。因此,自噬对心肌组织可能具有保护和损伤的双重效应:基础水平的自噬有利于维持心肌细胞的稳态;而完全缺乏或过度激活自噬均于稳定心功能无益。

总而言之,本实验在细胞水平上明确了心肌肥大中自噬受到抑制;而阻断自噬会促进心肌肥大的发展,提示自噬可能是AngⅡ诱导心肌肥大的一个作用环节,可以通过调控自噬水平影响心肌肥大的发生发展;其具体分子机制仍需进一步的研究和探索。

参考文献:

- [1] Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy[J]. J Mol Med, 1998, 76 (11): 725-746.
- [2] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. Science, 2004, 306: 990-995.
- [3] 陈广琴,刘晨,张成喜,等. HO-1在AMPK抑制心肌肥大中的作用[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2010, 31(5): 614-618.
- [4] 殷然,董吁钢,李红良,等. AMPK通过增强心肌脂肪酸氧化抑制大鼠心肌肥厚[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1258-1262.
- [5] Huang WP, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery [J]. Cell Struct Funct, 2002, 27(6): 409-420.
- [6] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of

(下转第448页 to page 448)