

PI3K/Akt 通路介导 Apelin 后处理减轻离体大鼠心脏 缺血再灌注损伤

彭龙云¹, 王业松, 刘丽娟, 何旭瑜, 郭晓刚, 劳妙嫦, 马虹, 高修仁*
(中山大学附属第一医院心血管内科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨 Apelin 后处理对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响及其信号机制。【方法】32 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只: 缺血再灌注对照组、Apelin 后处理组、Apelin 后处理加渥曼青霉素(磷脂酰肌醇-3 激酶抑制剂)处理组、渥曼青霉素处理对照组, 观察 Apelin 后处理对大鼠离体缺血再灌注心脏左心室收缩压、心率、冠状动脉流量、肌酸磷酸激酶和乳酸脱氢酶释放以及左室心肌蛋白激酶 B(Akt)磷酸化的影响。【结果】与缺血再灌注对照组相比, Apelin 后处理组心脏左心室收缩压、心率和冠状动脉流量得到改善, 释放到冠状动脉循环流出液中的肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶量减少, 同时左室心肌磷酸化 Akt(Ser473)水平增高; 而渥曼青霉素抑制了 Apelin 后处理所致的 Akt 磷酸化, 并完全消除了 Apelin 后处理的保护作用。【结论】Apelin 后处理能够减轻离体大鼠心脏缺血再灌注损伤, PI3K/Akt 信号通路参与介导 Apelin 后处理的保护作用。

关键词: Apelin; 后处理; 心肌缺血再灌注损伤; 大鼠; PI3K/Akt

中图分类号: R541.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)04-0460-05

Apelin Postconditioning Attenuates Isolated Rat Heart Ischemia Reperfusion Injury through PI3K/Akt Signaling Pathway

PENG Long-yun, WANG Ye-song, LIU Li-juan, HE Xu-yu, GUO Xiao-gang, LAO Miao-chang,
MA Hong, GAO Xiu-ren*

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the effects of apelin postconditioning on isolated rat heart ischemia reperfusion injury and investigate the underlying signal mechanism. 【Methods】 Thirty-two rats were randomized to 4 groups: ischemia reperfusion (IR) control group, IR treated with apelin postconditioning group, IR treated with apelin postconditioning and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin group, and IR treated with wortmannin alone to evaluate the effects of apelin postconditioning on left ventricular systole pressure, coronary artery flow, creatine phosphokinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) release, and the level of myocardial phospho-protein kinase B/Akt (Ser473). 【Results】 Left ventricular systole pressure, heart rate, and coronary artery flow were improved significantly, and the release of CK and LDH was reduced significantly in apelin postconditioning group as compared to ischemia reperfusion control group. Moreover, the levels of phospho-protein kinase B/Akt (Ser473) was increased in apelin postconditioning group compared with ischemia reperfusion control group. Wortmannin inhibited the increase of phospho-protein kinase B/Akt (Ser473) induced by apelin postconditioning, and abolished the cardioprotection of apelin postconditioning. 【Conclusion】 Apelin postconditioning attenuates isolated rat heart ischemia reperfusion injury. The PI3K/Akt signal pathway is involved in the cardioprotection of apelin postconditioning.

Key words: Apelin; postconditioning; myocardial ischemia reperfusion injury; rats; PI3K/Akt

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4):460-464]

收稿日期: 2012-02-28

基金项目: 广东省自然科学基金(9451008901002328)

作者简介: 彭龙云, 博士, 主治医师, E-mail: penglongyun@hotmail.com; * 通信作者: 高修仁, 博士生导师, E-mail: xiurengao@163.com

缺血后处理 (ischemia postconditioning) 是近年提出的与缺血预处理 (ischemia preconditioning) 相对应的一种缺血损伤保护形式^[1-4]。与缺血预处理相似,缺血后处理也能够减轻心肌缺血再灌注损伤,其作用与蛋白激酶 B(Akt)等信号分子激活有关。依据缺血后处理的作用机制,近年来提出了药物后处理方法来减轻心肌缺血再灌注损伤。研究显示,多种药物后处理能够减轻心肌缺血再灌注损伤^[5-9]。Apelin 是 APJ 受体的天然配体,Apelin 及其受体 APJ 的组织分布基本一致,广泛存在于心血管系统^[10]。主要的 Apelin 多肽有 Apelin-13 和 Apelin-36, 它们有扩张血管、降低血压和改善内皮功能^[11-12], 同时有增加心肌收缩力^[13-14]的作用。Apelin 对于缺血及缺血-再灌注心肌也具有保护作用^[15-18]。Apelin 可使 Akt 磷酸化, 同时心肌细胞线粒体通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放延迟,从而减轻心肌缺血-再灌注损伤,减小心肌梗死面积,改善心脏功能。然而把缺血后处理作为一个新的概念,针对 Apelin 后处理是否也能减轻心脏缺血再灌注损伤,目前研究报道很少。尽管在一些有关 Apelin 减轻心肌缺血再灌注损伤的研究中^[15-16,18],Apelin 的应用方法实际上是类似于缺血后处理,但是这些研究的结果不尽一致。Simpkin 等^[16]研究显示,Apelin 通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 以及胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)44/42 信号通路减轻心肌缺血再灌注损伤。然而, Klein 等^[18]研究显示, Apelin 能够减轻心肌缺血再灌注损伤,但是不依赖 PI3K/Akt 和 P70S6 激酶信号通路。为此,我们研究探讨 Apelin 后处理对缺血再灌注心肌是否具有保护效应,并且探讨 PI3K/Akt 信号通路是否介导 Apelin 后处理的效应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SD 雄性大鼠, 年龄 8 周龄, 体质量 250~300 g, 购自中山大学实验动物中心。多肽 Apelin-13、渥曼青霉素 (磷脂酰肌醇-3-激酶抑制剂)、兔来源的 Actin 抗体购自 Sigma 公司 (St Louis, MI, USA)。多克隆兔抗 Akt 抗体、单克隆兔抗磷酸化

Akt (Ser473) 抗体均购于 Cell Signaling 公司 (Beverly, MA, USA)。辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司 (Santa Cruz, CA, USA)。

1.2 Langendorff 装置灌流离体大鼠心脏

SD 雄性大鼠 32 只, 随机分为 4 个组 ($n = 8$): ①缺血再灌注对照组 (Control), 整个灌流过程中不给药物; ②Apelin 后处理组 (Apelin), 再灌注时期内前 30 min 经灌流给予 Apelin-13, 终浓度为 10^{-6} mol/L; ③Apelin 后处理加渥曼青霉素处理组 (Apelinwort), 给予 Apelin-13 后处理, 并且在缺血再灌注前 20 min 的灌流内给予渥曼青霉素, 药物终浓度 10^{-7} mol/L; ④渥曼青霉素处理对照组 (Wort), 仅在缺血再灌注前 20 min 的灌流内给予渥曼青霉素, 药物终浓度同前。按我们以前报道的方法^[2-3,19-20], 通过使用 Langendorff 灌流装置, 对离体大鼠心脏进行非循环式主动脉逆行灌流, 体外模拟缺血再灌注损伤。心脏平衡灌流 20 min 后, 再经历 20 min 灌流以给予药物处理, 然后缺血灌流 30 min 后, 再灌流 30 min。

1.3 离体大鼠心脏心率、左室收缩压、冠状动脉流量和冠状动脉循环流出液中肌酸磷酸激酶和乳酸脱氢酶含量的测定

按照以前我们报道的方法^[2-3,19-20], 缺血前、再灌注后 30 min 测定离体大鼠心脏的心率、左室收缩压。并在平衡灌流 20 min 和再灌注 30 min 时收集 2 min 的冠状动脉循环流出液, 计算出冠状动脉流量, 并使用全自动生化分析仪测定其肌酸磷酸激酶和乳酸脱氢酶的含量。

1.4 心肌组织标本留取和 Western-blot 检测左室心肌 Akt 蛋白表达和磷酸化激活状态

心脏灌流结束后, 分离出各组离体大鼠心脏的左室心肌, 快速液氮冻存, 随后转移到 -80°C 冰箱保存, 等待行 Western-blot 检测左室心肌 Akt 的蛋白表达和磷酸化激活状态。按照以前我们报道的方法^[2-3,20-21], 提取离体大鼠心脏左室心肌蛋白, 上样蛋白均衡总量为 40 μg , 室温下行 SDS-PAGE 电泳, 4°C 冷库过夜电转到 PVDF 膜上, 然后常规洗膜封闭, 孵育相应的一抗 (多克隆兔抗 Akt 抗体、单克隆兔抗磷酸化 Akt (Ser473) 抗体、Actin 抗体分别 1:1 000、1:500、1:3 000 稀释) 和二抗 (1:2 000 稀释), 然后行化学发光、胶片曝光、显影、定影。每张 PVDF 膜先行磷酸化 Akt (Ser473)

蛋白检测,再洗脱 2 次分别行 Akt 蛋白和 Actin 蛋白的检测。用 ImageQuant 5.0 全自动图像分析系统(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)对蛋白印迹胶片作定量分析(以 Actin 作为内参照)。

1.5 统计学方法

所有计量数据资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件作方差分析,组间比较用 S-N-K 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 离体大鼠心脏缺血再灌注后心率、左室收缩压、冠状动脉流量的变化

表 1 缺血再灌注后离体大鼠心脏冠状动脉流量、心率、左室收缩压的变化以及肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶的释放

Table 1 Changes of coronary flow, heart rate, left ventricular systole pressure and release of creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase in isolated rat hearts after ischemia reperfusion ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Index	Baseline value				30 min after ischemia reperfusion			
	Control	Apelin	Apelinwort	Wort	Control	Apelin	Apelinwort	Wort
CF/(mL/min)	11.3 ± 0.9	11.1 ± 0.8	11.0 ± 1.0	10.9 ± 0.9	7.8 ± 0.7	10.4 ± 0.8 ¹⁾	8.0 ± 0.7	7.9 ± 0.6
HR/(beat/min)	256 ± 21	258 ± 20	253 ± 19	260 ± 22	233 ± 18	246 ± 19 ¹⁾	235 ± 17	235 ± 16
LVSP/(mmHg)	108 ± 10	106 ± 9	109 ± 9	107 ± 9	69 ± 10	86 ± 9 ¹⁾	70 ± 9	71 ± 10
CK/(U/L)	60 ± 8	58 ± 9	62 ± 9	62 ± 10	726 ± 42	360 ± 28 ¹⁾	710 ± 36	736 ± 40
LDH/(U/L)	20 ± 5	22 ± 6	21 ± 5	23 ± 7	226 ± 21	114 ± 19 ¹⁾	234 ± 20	230 ± 23

CF: coronary flow, HR: heart rate, LVSP: left ventricular systole pressure, CK: creatine phosphokinase, LDH: lactate dehydrogenase. 1) $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 缺血再灌注后离体大鼠心脏肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶的释放

缺血再灌注之前,各组离体大鼠心脏的冠状动脉循环流出液中肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶酶的含量没有差异 ($P > 0.05$)。缺血再灌注之后 30 min,缺血再灌注对照组离体大鼠心脏的心脏冠状动脉循环流出液中肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶酶的含量分别升高 11 倍和 10 倍左右,而缺血再灌注 Apelin-13 后处理组离体大鼠心脏的心脏冠状动脉循环流出液中肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶酶的含量仅分别升高 5 倍和 4 倍左右,两组之间有明显差异 ($P < 0.01$),渥曼青霉素能够完全消除 Apelin-13 后处理的这种保护效应(表 1)。

2.3 离体大鼠心脏左室心肌 Akt 的蛋白表达和磷酸化激活状态

经 30 min 缺血/30 min 再灌注后,各组离体大鼠心脏左室心肌组织中 Akt 的蛋白表达无显著差

缺血再灌注前各组离体大鼠心脏的冠状动脉流量、心率、左室收缩压无显著差异 ($P > 0.05$),缺血再灌注后 30 min 各组离体大鼠心脏的冠状动脉流量、心率和左室收缩压均有明显减低。与缺血再灌注对照组比较,Apelin-13 后处理组离体大鼠心脏的冠状动脉流量、心率和左室收缩压均有明显增高 ($P < 0.01$)。而在 Apelinwort 组,Apelin-13 后处理前的灌注过程中给予了渥曼青霉素,离体大鼠心脏的冠状动脉流量、心率和左室收缩压与缺血再灌注对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。缺血再灌注前的灌注过程中应用渥曼青霉素对离体缺血再灌注大鼠心脏的冠状动脉流量、心率和左室收缩压无显著影响(表 1)。

异 ($P > 0.05$)。但是,与缺血再灌注对照组相比,Apelin-13 后处理组的离体大鼠心脏左室心肌组织中磷酸化 Akt(Ser473)明显增加 ($P < 0.001$),渥曼青霉素能够抑制 Apelin-13 后处理所引起的 Akt 磷酸化激活。与缺血再灌注对照组相比,缺血再灌注渥曼青霉素处理对照组的离体大鼠心脏左室心肌组织中磷酸化 Akt(Ser473)的水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 1)。

3 讨 论

缺血后处理是近年来提出来的与缺血预处理相对应的一种内源性组织器官缺血再灌注保护形式^[1]。根据缺血后处理的作用机制,研究者又提出了药物缺血后处理的方法。目前,有多种药物后处理能够减轻心肌缺血再灌注损伤^[5-9]。我们的研究结果显示,在离体大鼠心脏缺血再灌注过程中,

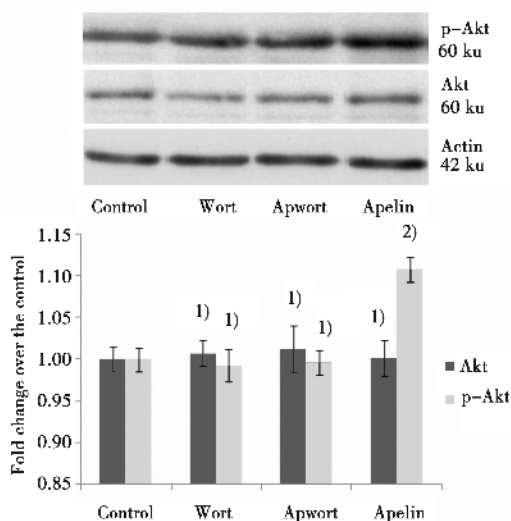


图1 离体缺血/再灌注大鼠心脏左室心肌 Akt、磷酸化 Akt(Ser473)的水平

Fig.1 Levels of left ventricular myocardium Akt and phospho-Akt (Ser473) in isolated ischemia/reperfusion rat hearts

Upper panel, Representative Western-blot pictures. Lower panel, Averaged relative density of phospho-Akt (Ser473) (Contrast with Actin). 1) $P>0.05$, Compared with control group, 2) $P<0.001$, Compared with Control group.

Apelin后处理可以减少心脏肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶的释放,促进心脏冠状动脉流量、心率和左室收缩功能的恢复。与此同时,Apelin后处理能够促进 Akt 磷酸化,而 Akt 的上游信号激酶磷脂酰肌醇-3 激酶抑制剂渥曼青霉素可以完全抑制 Apelin 后处理所引起的 Akt 磷酸化,并且能够完全消除 Apelin 后处理的心脏保护作用,而单独在缺血再灌注前应用渥曼青霉素对离体大鼠心脏的冠状动脉流量、心率、左室收缩功能以及 Akt 的磷酸化无影响。以上研究结果显示,Apelin 后处理能够减轻离体大鼠心脏缺血再灌注损伤,PI3K/Akt 信号通路参与介导了 Apelin 后处理的保护效应。我们的这一研究结果与 Simpkin 等^[16]的研究结果一致,尽管两者所采用的模型不同。我们采用的是离体大鼠心脏缺血再灌注损伤模型,而 Simpkin 等采用的是离体小鼠心脏缺血再灌注损伤模型。然而,与我们的研究结果不尽一致的是,Kleinz 等^[18]研究显示,尽管 Apelin 能够减轻心肌缺血再灌注损伤,但是不依赖 PI3K/Akt 信号通路的介导。研究结果不尽一致的原因可能是多方面的,包括

Apelin 应用的浓度不同、心肌缺血再灌注的时间长短不同,还有 Apelin 处理的时间点和时间长短以及 PI3K 抑制剂渥曼青霉素处理的时间点和时间长短均有差异。再者,我们检测了 Akt 的蛋白表达和磷酸化水平,而 Kleinz 等^[22]没有检测。这些研究方法上的差异可能都会影响研究的观察结果,最终导致研究结果的不完全一致。新近有研究显示,Apelin 只有在缺血后给予才能减少心肌梗死的面积以及促进心脏功能的恢复。这也进一步支持和证实,Apelin 后处理能够减轻心肌缺血再灌注损伤。

我们目前的研究有其局限性。由于动物使用数量的限制,我们没有对 Apelin 进行剂量反应关系研究。另外,我们也未能研究 Apelin 是通过何种途径促使 Akt 的磷酸化。Akt 磷酸化激活后是进一步促进心肌组织内微血管内皮源性一氧化氮合酶激活而使一氧化氮产生增多从而发挥心肌保护作用,还是进一步通过下游信号分子调节心肌细胞线粒体通透性转运孔(MPTP)的开放而减轻心肌缺血再灌注损伤?我们目前的研究未能对这些问题进行探讨。结合现有的文献资料^[13-17],我们推测 Apelin 可能是通过与其受体 APJ 结合,从而激活 PI3K 促使 Akt 的磷酸化,最终发挥心脏保护作用。这些推测以及上述问题都有待今后的研究证实或阐明。

总之,我们的研究显示,Apelin 后处理对离体大鼠缺血再灌注心脏具有保护作用,PI3K/Akt 信号通路参与介导了 Apelin 后处理的保护效应。我们目前的研究与以往的研究^[15-18]一起进一步证实了 Apelin 对于缺血及缺血-再灌注心肌的保护作用。另外,Apelin 有增加心肌收缩力^[13-14]的作用。因此,在心肌梗死的再灌注治疗过程中,以及对于心肌缺血、心肌梗死所引起的心力衰竭,Apelin 可能是一个非常具有前途的药物,具有重要的潜在的临床转化应用价值。

参考文献:

- [1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579-588.
- [2] 彭龙云,马虹,何建桂,等. 缺血预处理减轻肥厚心肌缺血再灌注损伤及其信号途径 [J]. *中华老年心脑血管*

- 血管病杂志, 2006, 8(5): 346-349.
- [3] 彭龙云, 马虹, 何建桂, 等. 缺血后处理减轻肥厚心肌缺血/再灌注损伤的观察 [J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(8): 685-689.
- [4] Liaoliao L, Longyun P, Zhiyi Z. Isoflurane preconditioning increases B₂-cell lymphoma-2 expression and reduces cytochrome c release from the mitochondria in the ischemic penumbra of rat brain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1-3): 106-113.
- [5] Tissier R, Waintraub X, Couvreur N, et al. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007; 42(1): 79-87.
- [6] Chen Z, Li T, Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts [J]. *J Surg Res*, 2008, 145(2): 287-294.
- [7] Lemoine S, Beauchef G, Zhu L, et al. Signaling pathways involved in desflurane-induced postconditioning in human atrial myocardium in vitro [J]. *Anesthesiology*, 2008, 109(6): 1036-1044.
- [8] Sicard P, Jacquet S, Kobayashi KS, et al. Pharmacological postconditioning effect of muramyl dipeptide is mediated through RIP2 and TAK1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 277-284.
- [9] Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(1): 73-85.
- [10] Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells [J]. *Regul Pept*, 2004, 118(3): 119-125.
- [11] Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide dependent mechanism [J]. *Regul Pept*, 2001, 99(8): 87-92.
- [12] Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin type 1 receptor in blood pressure in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(25): 26274-26279.
- [13] Szokodi I, Tavi P, Foldes G, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility [J]. *Circ Res*, 2002, 91(5): 434-440.
- [14] Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts [J]. *Circulation*, 2004, 110(11 Suppl 1): II 187-193.
- [15] Smith CC, Mocanu MM, Bowen J, et al. Temporal changes in myocardial salvage kinases during reperfusion following ischemia: studies involving the cardioprotective adipocytokine apelin [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2007, 21(6): 409-414.
- [16] Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, et al. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, 102(6): 518-528.
- [17] Zeng XJ, Zhang LK, Wang HX, et al. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat [J]. *Peptides*, 2009, 30(6): 1144-1152.
- [18] Kleinz MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase [J]. *Regul Pept*, 2008, 146(1-3): 271-277.
- [19] 彭龙云, 马虹, 何建桂, 等. 血管紧张素-(1-7)对心肌肥厚大鼠离体外心脏缺血再灌注损伤的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2007, 23(1): 62-64.
- [20] 何建桂, 彭龙云, 马虹, 等. 血管紧张素-(1-7)预处理减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(5): 515-518, 524.
- [21] 彭龙云, 王业松, 高修仁, 等. 老年小鼠心脏左室重塑和存活相关蛋白的表达变化 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2011, 32(5): 571-575.
- [22] Rastaldo R, Cappello S, Folino A, et al. Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6): H2308-2315.

(编辑 孙慧兰)