

HO-1 在 AMPK 抑制心肌肥大中的作用

陈广琴, 刘 晨, 张成喜, 蒙荣森, 陈保林, 熊肇军, 董吁钢*

(中山大学附属第一医院心血管医学部, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 及血红素氧合酶 HO-1 激活对心肌肥大的影响, 以及 HO-1 在 AMPK 抑制心肌肥大中的作用。【方法】以培养的新生大鼠心肌细胞为研究对象, 采用蛋白免疫印迹杂交方法检测 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核苷酸 (AICAR) 对 AMPK 的磷酸化程度及对 HO-1 的影响, 并测定心肌细胞 [³H]-亮氨酸掺入率及心肌细胞表面积, 观察 AMPK 及 HO-1 心肌细胞肥大的影响。【结果】AICAR 对 AMPK 及 HO-1 均有激活作用, AICAR 能阻断 Ang II 引起的心肌肥大效应; 阻断 HO-1 的激活则能减弱 AICAR 的抑制作用。【结论】AMPK 具有抑制心肌肥大的作用, AMPK 能激活 HO-1, HO-1 在 AMPK 抗心肌肥大的机制中起重要作用。

关键词: AMPK; HO-1; 心肌肥大

中图分类号: R329.2+5; Q591.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)05-0614-05

AMPK Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy Via Induction of Heme Oxygenase-1

CHEN Guang-qin, LIU Chen, ZHANG Cheng-xi, MENG Rong-sen, CHEN Bao-lin,

XIONG Zhao-jun, DONG Yu-gang*

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of AMPK and HO-1 activation on hypertrophic cardiac myocyte, and the effect of HO-1 in the mechanism of AMPK inhibition of cardiomyocyte hypertrophy. 【Methods】Cultured rat neonatal cardiomyocytes were incubated with Ang II to induce cardiac hypertrophy. Cardiac myocyte surface area and [³H]leucine incorporation was measured to determine the effect of AMPK and HO-1 on cardiac hypertrophy. The effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) on adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) phosphorylation and HO-1 activation were detected by Western blot. 【Results】Compared with control group, activated AMPK significantly enhanced the transcriptive activity of AMPK, and increased HO-1 protein expression in cardiac myocyte. The increase of cell surface area by Ang II was significantly inhibited after treatment of AICAR. However, this inhibitory effect was attenuated by HO-1 inhibitor. 【Conclusion】AMPK can attenuate the cardiac hypertrophy induced by Ang II, AMPK can upregulate the HO-1 in cardiac hypertrophy induced by AngII. HO-1 play a significant role in the effect of the AMPK on inhibiting cardiac hypertrophy.

Key words: AMPK; HO-1; cardiac hypertrophy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(5):614-618]

单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种在真核细胞生物中广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要调节代谢和能量。AMPK 由 α , β 和 γ 亚单位组成, 其中 α 的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 亚型主要分布于心肌^[1-3], 心肌细胞中的 AMPK 的激活与心肌缺血、氧化应激及一些刺

激因素如儿茶酚胺及血管紧张素有关^[4-6], 最近有研究表明, AMPK 能通过抑制心肌细胞蛋白质的合成减轻心肌细胞肥大^[7]。HO-1 是血红素氧合酶 (HO) 的同工酶之一, 可被多种刺激因素如: 缺血再灌注、热休克、重金属和低氧等诱导表达升高。HO-1 作为一种新型的心肌保护因子, 通过其产物

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 国家自然科学基金(30770898); 广东省自然科学基金(8251008901000013)

作者简介: 陈广琴, 博士, 主治医师, 现工作单位为广西中医学院附属瑞康医院心内科, E-mail: doctorgrey@hotmail.com; * 通信作者: 董吁钢, 博士生导师, 教授, E-mail: yg.dong@yahoo.com

的抗炎、抗氧化、抗凋亡和抗心律失常等作用在心血管疾病中发挥着重要的保护作用^[8-11],近年来一些研究显示,HO-1 具有抑制心肌细胞肥大的作用^[12-13]。基于 AMPK 与 HO-1 在抑制心肌细胞肥大中均起着重要作用,两者均能被缺血、氧化应激及血管紧张素等诱发表达增高,且 AMPK 的一些下游因子如 p38MAPK,NO 等参与了 HO-1 的激活^[14-16]。这提示着两者间可能存在着某种关系。为验证上述假设,本研究通过观察 AMPK 激动剂 AICAR 对 AMPK 及 HO-1 的激活作用,以及 AMPK、HO-1 以及 HO-1 阻断剂锌原卟啉 IX (ZnPP IX) 对心肌肥大的影响,旨在证实心肌细胞中 HO-1 在 AMPK 抗心肌肥大的机制中起重要作用,力图从全新的角度探讨 AMPK 对心肌肥大的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

Ang II (Anaspec); AICAR (Cell signaling); Compound C (Merk), [³H]-Leucine (北京原子能研究所,放射性浓度为 3.7×10^7 Bq/mL);即用型免疫组织化学试剂盒(迈新公司),ZnPP IX (Sigma); DMEM F12 培养基及新生牛血清(Hyclone);HO-1 抗体(Abcam);Phospho-AMPK-alpha (Thr172) 抗体、AMPK-alpha 抗体(CST),GADPH (上海康成),羊抗小鼠和羊抗兔 IgG-HRP (武汉博士德),BCA-200 蛋白定量试剂盒(Pierce);PVDF 膜(Millipower);ECL(碧云天)。

1.2 新生大鼠心肌细胞原代培养

新生 1 ~ 2 d SD 大鼠心室肌组织剪碎(1 mm³ 大小)。以 0.5 g/L I 型胶原酶消化。置于 37 °C 恒温槽轻轻振荡 2 h,之后弃去悬液,加入 0.125 g/L 胰酶消化 5 min,收集心肌细胞至上述含培养基的离心管中中止胰酶反应。重复 2 ~ 3 次至细胞团块消失,8 000 r/min($r = 7$ cm)离心 10 min 并清洗,共 2 ~ 3 次。加入含新生牛血清 100 mL/L 的培养基 7 ~ 8 mL 中,充分吹散细胞;过滤去除杂质;置于 60 mm 培养皿中贴壁 60 ~ 90 min。以去除成纤维细胞。吸取未贴壁的心肌细胞,进行细胞计数后按浓度 1×10^6 /mL/孔的浓度接种于 6 孔板,加 BrdU 0.1 mmol/L 以抑制成纤维细胞生长。第 2 天换液,此后每隔 2 d 及实验干预前换液,取培养第 3 ~ 4 d 的细胞进行实验研究,处理前 24 h 换为无

血清培养基。用免疫细胞化学方法对培养的心肌细胞进行纯度鉴定。

加入 Ang II (10^{-7} mmol/L)、AICAR(1.0 mmol/L)、Compound C (10^{-7} mmol/L)等处理 24 h,分为正常对照组(control)、Ang II、Ang II + AICAR、Ang II + AICAR + Compound C、Ang II + Compound C 组。

1.3 Western Blot 分析

用 Western blot 法,内参照分别为 AMPK- α 和 GAPDH。抽提各组培养心肌细胞的蛋白并测定其浓度,取 100 μ g 蛋白样品进行电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,用封闭液室温封闭 2 h,加一抗(兔抗大鼠 phospho-AMPK- α 抗体,抗体稀释度为 1:2 000 或 HO-1 抗体,抗体稀释度为 1:2 000)室温孵育 2 h,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1:2 000 或 1:15 000)室温孵育 1 h,每次孵育完毕后用 TBST 漂洗 3×5 min,将膜与化学发光增强剂室温孵育 1 min 后用 X 线胶片曝光显影。此 PVDF 膜洗脱后再用 AMPK- α 抗体孵育,重复上述二抗孵育、漂洗和显影等步骤。对显影条带进行密度扫描定量,imageJ 图像分析系统测各条带平均吸光度(A)值和条带的面积,以 phospho-AMPK 与 AMPK 的光密度比值反映 AMPK 磷酸化的程度;以 HO-1 与 GAPDH 的光密度比值表示 HO-1 表达的程度。

1.4 [³H]-leucine 掺入法测定心肌细胞蛋白质合成

细胞种植于 24 孔板中,培养 2 ~ 4 d 后加入 Ang II、AICAR、ZnPP IX (10^{-6} mmol/L)等处理 24 h,分为 control、Ang II、Ang II + AICAR、Ang II + AICAR + ZnPP IX 组。并同时终浓度为 3.7×10^4 /mL 的 [³H]-leucine 加入 24 孔板(0.5 mL)中,37 °C 孵箱中继续培养 24 h 后弃上清,预冷 PBS 洗涤,晾干,每孔细胞加入 1 mL 50 mL/L 的三氯乙酸(trichloroacetic acid,TCA)清洗 2 ~ 3 遍,冰上放置 20 min,弃上清,每孔加 0.5 mL 0.5 mol/L NaOH 室温裂解 30 min,收集细胞裂解液并转移至闪烁瓶中,加 3 mL 水溶性闪烁液,混匀后于液体闪烁计数器测定样品的每分脉冲数 n (CPM)。结果以对照组细胞 [³H]-leucine 掺入作 100%,各组均以 [³H]-leucine 掺入百分率表示。

1.5 心肌细胞表面积的观察和测量

免疫化学染色:心肌细胞接种前,将无菌盖玻片放入 6 孔板,制作细胞爬片(心肌细胞接种数量为每孔 1×10^5 个心肌细胞)。按实验分组(分组同

1.4)加入 Ang II 等处理 24 h 后,取出细胞爬片以 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min;免疫组化用 SP 法,一抗为抗 α -肌原纤维辅肌动蛋白(anti-sarcomeric α -actinin antibody;1:200),二抗后 PBS 冲洗 3×5 min;DAB 显色;苏木素复染;中性树胶封片。心肌细胞免疫组化染色片于摄影显微镜下拍照($\times 400$),每个切片随机选取 40 ~ 50 个边界清晰可辨的心肌细胞,测量其表面积,取平均值。采用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (IPP6.0) 处理。

1.6 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。完全随机设计资料的多个样本均数比较采用单因素方差分析,所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌细胞纯度

倒置显微镜下观察,培养 48 h 的心肌细胞已展开,80% 融合成片,搏动呈同步性。用抗 α -actinin 对培养心肌细胞进行免疫细胞化学染色,95%以上的细胞为心肌细胞。

2.2 AICAR 对心肌细胞 AMPK 磷酸化的影响

AICAR 干预细胞 24 h,Western blot 结果显示(图 1),与正常对照组相比,Ang II + AICAR、Ang II 组 p-AMPK/AMPK 灰度比值均增高($P < 0.05$),Ang II + AICAR 组增高更为明显,而 Ang II + AICAR + Compound C、Ang II + Compound C 组 p-AMPK/AMPK 比值则明显低于 Ang II + AICAR 和 Ang II 组($P < 0.05$),与正常对照组相近。提示 AICAR 能明显诱导 AMPK 的磷酸化增加,而 Compound C 则抑制 AMPK 的磷酸化。

2.3 AICAR 对心肌细胞 HO-1 蛋白表达的激活

Western Blot 结果显示(图 2),AICAR 处理细胞 24 h 后,与正常对照组(HO-1/GAPDH 比值为 1.58 ± 0.17) 相比,Ang II 组、Ang II + AICAR 组 HO-1 表达均增加(HO-1/GAPDH 比值分别为 2.04 ± 0.22 、 1.79 ± 0.17 , $P < 0.05$),Ang II + AICAR 组 HO-1 表达最高,而 Compound C 抑制了 AICAR 对 HO-1 的激活作用(Ang II + AICAR + Compound C 组 HO-1/GAPDH 比值为 0.67 ± 0.16 ,与 Ang II + AICAR 相比 $P < 0.05$ 、Ang II + Compound C 组

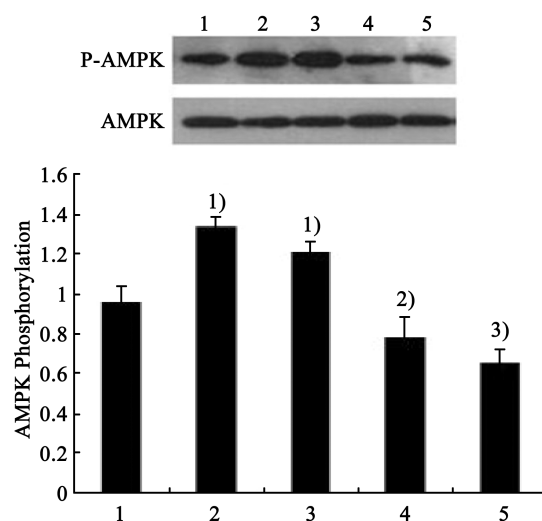


图 1 AICAR 对 AMPK 磷酸化的影响

Fig.1 Effect of AICAR on phosphorylation of AMPK, the upper shows the representative Western blot, the lower shows the average data from three independent experiment

1: control group; 2: Ang II + AICAR group; 3: Ang II group; 4: Ang II + AICAR + Compound C group; 5: Ang II + Compound C group; 1) $P < 0.05$ vs control; 2) $P < 0.05$ vs Ang II + AICAR group; 3) $P < 0.05$ vs Ang II group

HO-1/GAPDH 比值为 0.72 ± 0.15 ,与 Ang II 组相比 $P < 0.05$)。

2.3 AMPK 和 HO-1 对心肌细胞肥大的影响

结果如图 3、图 4 所示,Ang II 组能引起细胞 [3 H]-leucine 掺入率升高,心肌细胞表面积增大,而 AICAR 能明显减低其所引起的 [3 H]-leucine 掺入率升高,心肌细胞表面积缩小,在加入 HO-1 的阻断剂 ZnPP IX 后细胞表面积增大, [3 H]-leucine 掺入率表现为明显升高。

3 讨 论

心肌肥大是引起心血管疾病发生率和死亡率显著升高的独立的危险因素,是高血压、瓣膜病、急性心肌梗塞及先天性心脏病等临床常见疾病的一种并发症。其特征是心肌细胞体积增大、蛋白质合成增加及肌节增多^[17]。

AMPK 是一个重要的蛋白激酶,其组成成分主要有 3 个亚单位: α 、 β 和 γ ^[2-3]。以往的研究已证实,AMPK 的生物学效应主要是对能量的调节、调节糖脂代谢、抑制蛋白质合成,近年来的研究表

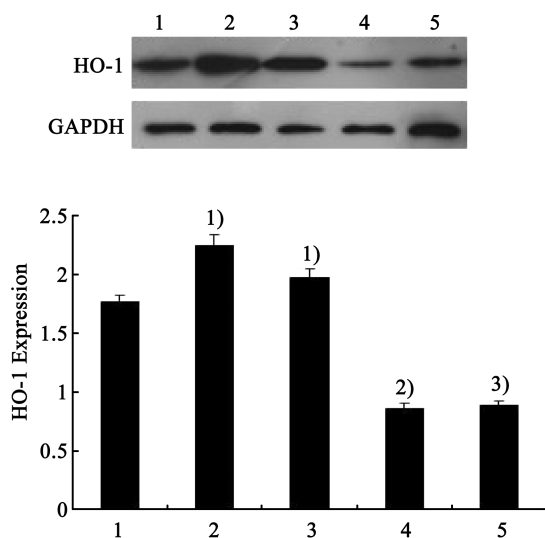
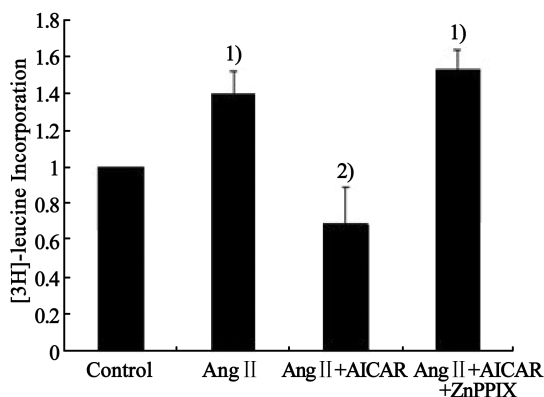


图2 AICAR 对 HO-1 蛋白表达的激活

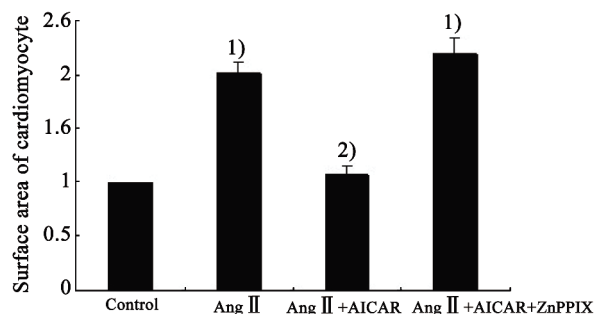
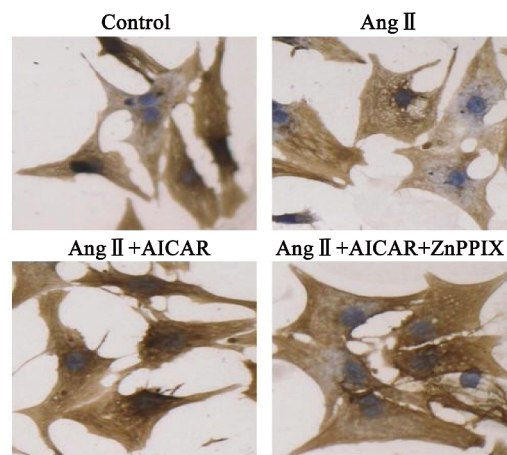
Fig.2 Effect of AICAR on protein synthesis of HO-1 in Ang II-induced hypertrophic cardiomyocytes

The upper shows the representative Western blot; the lower shows the average data from three independent experiment. 1: control group; 2: Ang II + AICAR group; 3: Ang II group; 4: Ang II + AICAR + Compound C group; 5: AngII + Compound C group; 1) $P < 0.05$ vs control; 2) $P < 0.05$ vs Ang II + AICAR group; 3) $P < 0.05$ vs Ang II group

图3 AICAR 及 HO-1 对心肌细胞 $[^3\text{H}]$ -leucine 掺入率的影响Fig.3 The effect of AMPK and HO-1 on $[^3\text{H}]$ -leucine incorporation of Ang II-induced hypertrophic cardiomyocytes

1) $P < 0.05$ vs control; 2) $P < 0.05$ vs Ang II group

明,AMPK 通过抑制蛋白质合成在抑制心肌细胞肥大中发挥重要作用^[7];HO-1 是血红素降解的限速酶,HO/CO 系统作为机体的一道细胞保护的防线,日益受到重视。其产物具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及血管舒张作用,因此在高血压、动脉粥样

图4 AICAR 及 HO-1 对心肌细胞表面积的影响($\times 400$)Fig.4 The effect of AMPK and HO-1 on surface area of cardiomyocytes($\times 400$)

The upper shows the surface area of cardiomyocytes under microscope, and the below shows the average data from 40-50 random cardiomyocytes. 1) $P < 0.05$ vs control; 2) $P < 0.05$ vs Ang II group

硬化及缺血再灌注等多种心血管疾病中起重要作用^[18-19]。现有一些研究指出,HO-1 也具有抑制心肌肥大的作用,能减轻内皮素及 Ang II 所致的心血管重构^[12-13]。AICAR 在很多实验中被用作 AMPK 的激动剂,本研究通过观察 AICAR 对培养心肌细胞 HO-1 活性的影响,旨在探讨 HO-1 在 AMPK 抑制心肌细胞肥大中的作用。

本研究观察了 AICAR 及心肌肥大的刺激因素 Ang II 对离体心肌细胞中 AMPK 表达的影响。结果与之前的一些研究相一致^[7],即 Ang II 能引起 AMPK 的磷酸化表达增加, AICAR 则能明显激活 AMPK 的磷酸化。而 Compound C 则能阻断 AMPK 的磷酸化;本实验还观察了 Ang II、AICAR、以及 AMPK 的阻断剂 Compound C 对 HO-1 的影响,结果表明, AICAR 能明显激活 HO-1 的表达,而 Compound C 则阻断 AICAR 对 HO-1 的激活, AICAR 已证实为 AMPK 的激动剂,而 Compound C 为 AMPK 特异性抑制剂,由此可证明 AMPK 对

HO-1 有一定的激活作用。

为了探讨 AMPK 和 HO-1 对心肌肥大的影响,我们在 Ang II 诱导离体心肌细胞肥大的模型上观察了 AICAR 对肥大心肌细胞的影响,结果表明 AICAR 能减轻 AngII 所引起的心肌细胞表面积增大和 $[^3\text{H}]$ -leucine 掺入率的增加,这就证实了 AMPK 在抑制心肌肥大中发挥了重要作用^[7],但在加入 HO-1 的阻断剂 ZnPP IX 后,AICAR 抑制心肌细胞肥大的作用消失,表现为心肌细胞表面积明显增大, $[^3\text{H}]$ -leucine 掺入率明显升高,与 Ang II 的诱导作用相似,这也间接证实了 HO-1 在 AMPK 抑制心肌肥大的机制中起重要作用^[13]。

综合上述研究结果,这也就提示着 HO-1 很有可能作为 AMPK 的下游产物,在 AMPK 抑制心肌肥大的作用中扮演重要角色。但 AMPK 通过何途径引起 HO-1 的激活尚不明确,因此有必要进一步研究 AMPK 激活 HO-1 的机制,从而为探讨 AMPK 抑制心肌肥大的作用提供更多依据。

参考文献:

- [1] Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, et al. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase [J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(1): 22-25.
- [2] Carling D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales [J]. Biochimie, 2005, 87(1): 87-91.
- [3] Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily [J]. J Biol Chem, 1996, 271(2): 611-614.
- [4] baron SJ, Li J, Russell RR, et al. Dual mechanisms regulating AMPK kinase action in the ischemic heart [J]. Circ Res, 2005, 96(3): 337-345.
- [5] Saberi B, Shinohara M, Ybanez MD, et al. Regulation of H_2O_2 -induced necrosis by PKC and AMP-activated kinase signaling in primary cultured hepatocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(1): C50-63.
- [6] MS G. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance[J]. J Biol Chem, 2008, 283 (24): 16514-16524.
- [7] Chan AY, Soltys CL, Young ME, et al. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte [J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32771-32779.
- [8] Foresti R, Goatly H, Green CJ, et al. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(5): H1976-1984.
- [9] Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme [J]. Circ Res, 1999, 85(8): 663-671.
- [10] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway [J]. Transplantation, 2002, 73(2): 287-292.
- [11] Turcanu V, Dhouib M, Poindron P. Nitric oxide synthase inhibition by haem oxygenase decreases macrophage nitric-oxide-dependent cytotoxicity: a negative feedback mechanism for the regulation of nitric oxide production [J]. Res Immunol, 1998, 149(8): 741-744.
- [12] Depre C, Wang L, Sui X, et al. H11 kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart [J]. Circ Res, 2006, 98(2): 280-288.
- [13] Hu CM, Chen YH, Chiang MT, et al. Heme oxygenase-1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro and in vivo [J]. Circulation, 2004, 110(3): 309-316.
- [14] Chen K, Maines MD. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38 [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000, 46(3): 609-617.
- [15] Krstic A, Ilic V, Mojsilovic S, et al. p38 MAPK signaling mediates IL-17-induced nitric oxide synthase expression in bone marrow cells [J]. Growth Factors, 2009, 27(2): 79-90.
- [16] Anwar AA, Li FY, Leake DS, et al. Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2 [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(2): 227-236.
- [17] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly [J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 45-79.
- [18] Hangaishi M, Ishizaka N, Aizawa T, et al. Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(2): 582-588.
- [19] Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, et al. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 278(2): H643-651.