AMPK对心肌细胞 FOXO3a 转录因子活性以及泛素连接酶 MAFbx 表达的影响

陈保林[1,2]，蒙荣森[1]，马跃东[1]，熊肇军[3]，张成喜[3]，陈广琴[1]，刘 晨[1]，董吁钢[1*]
(1. 中山大学附属第一医院心血管医学部，广东 广州 510080；2. 贵州省人民医院心内科，贵州 贵阳 550002；
3. 中山大学附属第三医院心内科，广东 广州 510630)

摘 要：【目的】研究 5-氨基-4 甲酰胺咪唑核糖核苷酸(AICAR)对心肌细胞转录因子 FOXO3a 的活性以及泛素连接酶 MAFbx 蛋白表达的影响，探讨 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK)在心肌细胞蛋白质降解中所起的作用。【方法】用不同浓度 AICAR 干预培养的新生大鼠心肌细胞 6 h，观察 AICAR 对心肌细胞 AMPK 的激活作用。再将培养的心肌细胞分成 3 组：对照组，AICAR 组，AICAR + Compound C 组。用 Western blot 检测 AMPK 激活对心肌细胞 FOXO3a 转录因子活性，以及 MAFbx 蛋白表达的影响。【结果】① 与对照组比较，0.25 mmol/L 与 0.5 mmol/L AICAR 处理 6 h 后心肌细胞 AMPK 活性升高($P < 0.05$)，而 1.0 mmol/L 与 2.0 mmol/L AICAR 组 AMPK 活性增加更明显($P < 0.01$)。② 与对照组比较，AICAR 激活 AMPK 后显著增加 FOXO3a 转录活性($P < 0.01$)，促进 MAFbx 蛋白表达($P < 0.01$)，而特异性的 AMPK 抑制剂 Compound C 则明显抑制了该作用。【结论】AMPK 可能通过激活心肌细胞 FOXO3a 的转录活性，上调 MAFbx 蛋白表达，参与心肌细胞蛋白质降解的调控。

关键词：心肌；蛋白水解；AMPK；FOXO3a；MAFbx
中图分类号：R329.2+5；Q591.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2010)02-0190-05

Effects of AMPK on Transcriptional Activity of FOXO3a and Expression of Ubiquitin Ligase MAFbx in Cardiomyocytes

CHEN Bao-lin[1,2], MENG Rong-sen[1], MA Yue-dong[1], XIONG Zhao-jun[3], ZHANG Cheng-xi[3], CHEN Guang-qin[1], LIU Chen[1], DONG Yu-gang[1*]
(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Department of Cardiology, The People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China;
3. Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract：【Objective】This study was designed to investigate the effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) on activity of transcription factor Forkhead O 3a (FOXO3a) and expression of ubiquitin ligase muscle atrophy F-box (MAFbx), and to explore the role of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) on proteolysis pathways in cardiomyocytes.【Methods】The effect of AICAR on activation of AMPK was observed. Cultured neonatal rat cardiomyocytes was treated with AICAR in different concentration. Cultured cardiomyocytes were then divided into three groups: control group, AICAR group, AICAR + Compound C group. Effects of AMPK activation on phosphorylation of FOXO3a and expression of MAFbx in cardiomyocytes were detected using Western blot. 【Results】① Compared with control group, activity of AMPK in cultured cardiomyocytes was increased after treatment with 0.25 mmol/L or 0.5 mmol/L AICAR for 6 h ($P < 0.05$), and the activity of AMPK was further enhanced after treatment with 1.0 mmol/L or 2.0 mmol/L AICAR for 6 h ($P < 0.01$). ② Activation of AMPK by AICAR significantly increased the transcriptional activity of FOXO3a ($P < 0.01$), and enhanced MAFbx protein expression in

收稿日期：2009-07-29
基金项目：国家自然科学基金(30770898)；广东省自然科学基金重点项目(8251008901000013)
作者简介：陈保林，在读博士生，副主任医师，E-mail：chenbl104@126.com；* 通信作者：董吁钢，博士生导师，教授，E-mail：yg.dong@yahoo.com

cardiomyocytes when comparing with control group ($P < 0.01$), however, specific AMPK antagonist Compound C markedly reversed these effects induced by AICAR.【Conclusion】AMPK may regulate cardiomyocytes proteolysis by activation of FOXO3a transcription factor, and up-regulation of MAFbx protein expression.

Key words: myocardium; proteolysis; AMPK; FOXO3a; MAFbx

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(2):190-194]

AMP激活的蛋白激酶（AMP-activated protein kinase,AMPK)是真核生物细胞中一个重要的蛋白激酶,是由α亚基、β亚基和γ亚基形成的异源三聚体[1]。在运动、缺血、缺氧等情况下,细胞内AMP/ATP比值显著升高时,AMPKα亚基Thr172磷酸化后被激活。AMPK的下游靶蛋白主要与能量代谢调节有关，通过调控代谢相关酶起作用。AMPK激活后增加脂肪酸摄取和氧化，加速葡萄糖摄取,刺激糖酵解,增加ATP生成。同时为了保存细胞内ATP,一些耗能代谢活动减弱:抑制蛋白质以及脂质合成。以上这些对能量的调节反应使得心肌细胞得以保持ATP的水平，有助于维持心肌细胞的功能。因此,AMPK被看做能量的调节器,调节整个机体和细胞内能量的利用[2]。骨骼肌的研究表明,AMPK对蛋白质代谢的调控不仅仅限于抑制其合成,还参与蛋白质降解[3-4]。然而,AMPK在心肌细胞代谢调控中的作用与其在骨骼肌中的作用并不完全相同[1],AMPK是否参与心肌细胞蛋白质降解的调控并不清楚。泛素蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system,UPS)通过快速的蛋白水解调控细胞体积和肌节质量。在心肌细胞,大约80%的细胞内蛋白质由泛素蛋白酶体通路降解[5]。在UPS参与的蛋白水解反应中,泛素连接酶起了重要的酶促作用，决定了蛋白酶体降解蛋白质的特异性[6]。本研究通过观察AMPK激动剂5-氨基-4甲酰胺咪唑核糖核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide-4-ribofuranoside，AICAR)对培养心肌细胞FOXO3a转录因子活性以及泛素连接酶MAFbx表达的影响，旨在探讨AMPK在调控心肌细胞蛋白质水解代谢中的作用及其可能机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

出生1~3 d的SD大鼠,清洁级,由中山大学实验动物中心提供。

1.2　主要试剂和仪器

DMEM/F12培养基（Hyclone），Ⅰ型胶原酶(Gibco)，胰蛋白酶(Gibco)，胎牛血清(Hyclone)，Brdu (Sigma)，AICAR (cell sinaling)，Compound C (Merk),AMPK-α抗体(CST),p-AMPK-α(Thr172)抗体(CST),FOXO3a抗体(CST),p-FOXO3a抗体(CST),MAFbx抗体(Santa Cruz),GADPH（上海康成公司),羊抗小鼠和羊抗兔IgG-HRP(武汉博士德公司),显微成像分析系统(OLYMPUS),电泳系统(BIO-RAD)。

1.3　原代心肌细胞培养及实验分组

无菌条件下开胸取出完整心脏,浸于D-Hank's液中,冲去血污。在超净台内,去除心底结缔组织和心房,剪开心室,将心室心肌组织剪碎成1 mm^3大小，以0.5 g/L Ⅰ型胶原酶消化,37 ℃恒温槽轻轻振荡2 h，之后以5倍于组织碎块体积的1.25 g/L胰酶消化2~3次,每次5 min,直至不见细胞团块。收集细胞悬液至含100 mL/L胎牛血清的培养基中,以200目筛网过滤后接种至培养瓶,置于37 ℃，体积分数5% CO_2培养箱内60 min,差时贴壁法去除成纤维细胞。心肌细胞以5×10^5/mL的密度接种于6孔板，加0.1 mmol/L BrdU以抑制成纤维细胞生长,加入青霉素及链霉素各100 U/mL防止细菌污染。培养48 h后细胞生长融合成片,并出现同步收缩,换成无血清的培养基,饥饿24 h后进行分组干预。

培养细胞实验分组：AICAR分为5个剂量组干预：0，0.25，0.5，1.0，2.0 mmol/L，6 h后终止培养，提取蛋白，用Western blot测定心肌细胞AMPK-α和p-AMPK-α水平。得到AICAR的最佳作用浓度后,为观察AICAR对FOXO3a转录活性以及MAFbx表达的影响，心肌细胞分为对照组、AICAR组、AICAR + Compound C组进行干预,并于相应时间点检测FOXO3a、p-FOXO3a以及MAFbx蛋白水平。

1.4　心肌细胞总蛋白质提取及浓度测定

处理后的心肌细胞，每孔加100 μL 2% SDS上样缓冲液,冰上静置10 min,刮取细胞裂解产物至1.5 mL离心管中,沸水中煮5 min变性,-20 ℃保存备用。

总蛋白浓度检测采用 Bradford 法。先配制蛋白质标准液和考马斯亮兰 G250 蛋白染色液,应用生物分光光度计(Biophotometer 6131),在 595 nm 波长下"0"管调零,测定各标准液的吸光值,各管吸光值为横坐标,以蛋白质浓度为纵坐标,绘制标准曲线。然后根据待测样品吸光度值计算出样品浓度(μg/μL)。

1.5 Western bot 分析

50 μg 样品蛋白在 8% SDS-PAGE 凝胶上电泳,电泳结束后蛋白转移到甲醇浸泡过的 PVDF 膜上(80 V,120 min),50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入相应一抗。p-AMPK-α 兔抗大鼠(1∶1 000),AMPK-α 兔抗大鼠(1∶1 000),FOXO3a 兔抗大鼠(1∶800),p-FOXO3a 兔抗大鼠(1∶1 000),MAFbx 兔抗大鼠(1∶600),GADPH 小鼠抗大鼠(1∶20 000),4 ℃ 孵育过夜。次日 TBST 洗膜,PVDF 膜再分别与 HRP 标记的羊抗兔或羊抗小鼠二抗室温下孵育 1 h。免疫印迹用 ECL 显影、曝光、洗片,采用 IPP 6.0 图像分析软件检测。测定蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 作为内参,以灰度比值表示所检测蛋白质的相对含量,每个实验重复 4 次($n = 4$)。

1.6 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组之间的差异用 One-way ANOVA 分析,各组两两比较用 Newnam Keul's 检验。以上数据均采用采用 SPSS15.0 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 心肌细胞的鉴定及纯度

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。α-actinin 免疫细胞化学染色显示,阳性率 > 99%,培养 48 h 后的心肌细胞已达到实验要求。

2.2 AICAR 对心肌细胞 AMPK 活性的影响

AICAR 干预细胞 6 h 后各组 p-AMPK/AMPK 的灰度比值分别为:对照组 0.36 ± 0.05,0.25 mmol/L 剂量组 0.51 ± 0.07,0.5 mmol/L 剂量组 0.54 ± 0.08,1.0 mmol/L 剂量组 0.72 ± 0.10,2.0 mmol/L 剂量组 0.80 ± 0.05 ($F = 23.0$, $P < 0.001$,图 1)。Western blot 结果显示对照组心肌细胞 p-AMPK 处在较低水平,各剂量 AICAR 组 p-AMPK/AMPK 灰度比值均增高,提示 AICAR 激活心肌细胞 AMPK。而 1.0 mmol/L 组与 2.0 mmol/L 组相比较,p-AMPK/AMPK 比值相近($P > 0.05$),提示 AICAR 在 1.0 mmol/L 浓度时达到激活作用平台。

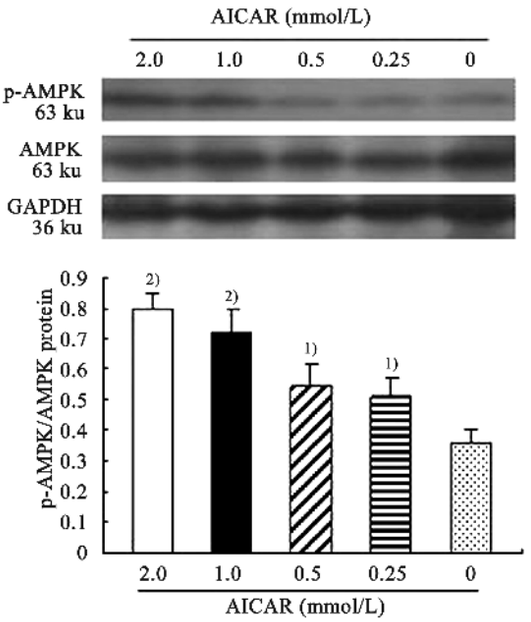


图 1 AICAR 对 AMPK 磷酸化激活的影响

Fig.1 Effect of AICAR on phosphorylation of AMPK

1) Compared with control (0 mmol/L) group, $P < 0.05$; 2) Compared with control group, $P < 0.01$ ($n = 4$)

2.3 AICAR 对心肌细胞 MAFbx 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(图 2),对照组 MAFbx/GAPDH 灰度比值为 0.34 ± 0.06,AICAR 干预 24 h 后 MAFbx 蛋白表达明显增加(0.86 ± 0.11, $P < 0.01$);而与 AICAR 组比较,Compound C 抑制了 AICAR 诱导的 MAFbx 蛋白表达(0.54 ± 0.07, $P < 0.01$)。

2.4 AICAR 对心肌细胞 FOXO3a 转录因子蛋白表达以及活性的影响

AICAR 干预 6 h 后各组 FOXO3a/GAPDH 灰度比值分别为 0.76 ± 0.10,0.85 ± 0.09,0.83 ± 0.09,AICAR 对心肌细胞总 FOXO3a 蛋白表达没有影响($F = 0.997$, $P = 0.41$,图 3)。各组 p-FOXO3a/FOXO3a 灰度比值分别为:0.89 ± 0.09,0.35 ± 0.06,0.69 ± 0.10 ($F = 40.8$, $P < 0.001$)。与对照组比较,AICAR 明显抑制 FOXO3a 的磷酸化($P < 0.01$),而 AICAR + Compound C 组 p-FOXO3a 水平较 AICAR 组明显增加($P < 0.01$)。该结果提示 AMPK 不影响

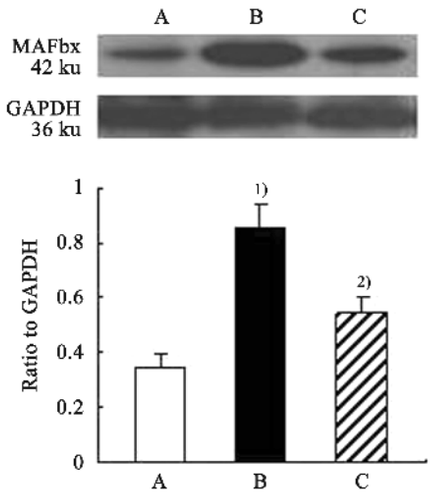


图 2　AICAR 对 MAFbx 蛋白表达的影响

Fig.2　Effect of AICAR on expression of MAFbx protein

A: control group; B: AICAR group; C: AICAR + Compound C group; 1) Compared with group A, $P < 0.01$; 2) Compared with group B, $P < 0.01$ ($n = 4$)

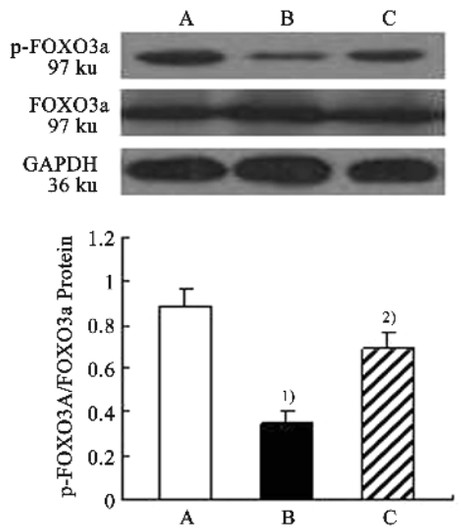


图 3　AICAR 对 FOXO3a 表达和磷酸化修饰的影响

Fig.3　Effect of AICAR on expression of total FOXO3a and p-FOXO3a

A: control group; B: AICAR group; C: AICAR + Compound C group; 1) Compared with group A, $P < 0.01$; 2) Compared with group B, $P < 0.01$ ($n = 4$)

FOXO3a 转录因子的表达,但能抑制 FOXO3a 的磷酸化,增加 FOXO3a 的转录活性。

3　讨　论

AMPK 在大多数哺乳动物组织中表达,对调控细胞生长,增殖和能量代谢有重要作用[7]。近年来的研究发现,AMPK 不仅是“细胞能量调节器”,AMPK 激活还有减轻心肌缺血损伤,减少心肌细胞的凋亡以及抗动脉粥样硬化作用[1]。AICAR 是目前实验研究中最常用的 AMPK 激动剂,通过磷酸化 172 位苏氨酸激活 AMPK。本研究发现,AICAR 能够激活心肌细胞 AMPK,并通过激活转录因子 FOXO3a,上调泛素连接酶 MAFbx 的表达。

泛素蛋白酶体通路是心肌细胞蛋白质水解的主要途径,该通路包括 3 个步骤,3 个特异性的酶催化这一连续过程:泛素活化酶(E1)通过酯硫键与泛素结合;泛素结合酶(E2)把泛素从 E1 转移至自身;泛素连接酶(E3)识别特异性靶蛋白,并把泛素从 E2 转移到靶蛋白,随后蛋白被蛋白酶体逐步水解[8]。目前,已知有一种 E1 酶,十二种不同的 E2 酶,以及数百种 E3 连接酶。由于 E3 对底物识别有特异性,E3 酶复合体的数量反应了 UPS 可以调节蛋白多样性。研究表明,泛素连接酶 MAFbx 在肌肉萎缩过程中起了重要作用[6],肌肉萎缩时 MAFbx 表达增加,促进蛋白通过泛素蛋白酶体途径降解,是蛋白降解的关键调节子,被认为是经典的蛋白降解标志[9]。过度表达 MAFbx 可以引起肌肉萎缩,而 MAFbx 基因敲除鼠则有抗萎缩作用[6,9-10]。在心肌细胞,MAFbx 的表达受到 FOXO 转录因子的调控。FOXO 是转录调控机体应激、细胞周期、蛋白质水解以及凋亡等反应的一个转录因子家族[11],包括 FOXO1,FOXO3a,FOXO4 和 FOXO6 等。FOXO3a 能够上调泛素连接酶 MAFbx,促进蛋白降解[12-13],抑制心肌蛋白质合成[14-15]。FOXO3 还通过诱导 MAFbx 及蛋白降解引起肌肉萎缩[12,16],是调控 MAFbx 的主要转录因子。FOXO3a 的转录活性受磷酸化修饰影响,FOXO3a 磷酸化后从胞核进入胞浆,失去转录活性。本实验中,AICAR 能明显抑制 FOXO3a 磷酸化,促进 MAFbx 蛋白表达,而该作用被 AMPK 抑制剂 Compound C 所抑制,提示 AMPK 可能通过抑制 FOXO3a 转录因子磷酸化,增加其转录活性,诱导 MAFbx 蛋白的表达。

总之,本研究结果表明,AMPK 激活后不仅抑制心肌细胞蛋白质合成,还通过激活 FOXO3a 转录因子,上调心肌细胞泛素连接酶 MAFbx 的表达,参与心肌细胞蛋白质降解机制的调控,进一步增加了我们对 AMPK 调控心肌细胞能量物质代谢

核心作用的认识。

参考文献：

[1] Arad M, Seidman CE, Seidman JG. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease[J]. Circ Res, 2007, 100(4): 474-488.

[2] Kahn BB, Alquier T, Carling D, et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism[J]. Cell Metab, 2005, 1(1): 15-25.

[3] Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(7): 1650-1656.

[4] Tong JF, Yan X, Zhu MJ, et al. AMP-activated protein kinase enhances the expression of muscle-specific ubiquitin ligases despite its activation of IGF-1/Akt signaling in C2C12 myotubes[J]. J Cell Biochem, 2009, 108(2): 458-468.

[5] Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting: The role of the ubiquitin-proteasome pathway [J]. N Engl J Med, 1996, 335(25): 1897-1905.

[6] Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14440-14445.

[7] Weekes J, Ball KL, Caudwell FB, et al. Specificity determinants for the AMP-activated protein kinase and its plant homologue analysed using synthetic peptides [J]. FEBS Lett, 1993, 334(3): 335-339.

[8] Willis MS, Patterson C. Into the heart: The emerging role of the ubiquitin proteasome system[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(4): 567-579.

[9] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy [J]. Science, 2001, 294(5547): 1704-1708.

[10] Li HH, Willis MS, Lockyer P, et al. Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins [J]. J Clin Invest, 2007, 117(11): 3211-3223.

[11] Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117(4): 421-426.

[12] Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy[J]. Cell, 2004, 117(3):399-412.

[13] Léger B, Senese R, Al-Khodairy AW, et al. Atrogin-1, MuRF1, and FoXO, as well as phosphorylated GSK-3beta and 4E-BP1 are reduced in skeletal muscle of chronic spinal cord-injured patients [J]. Muscle Nerve, 2009, 40(1): 69-78.

[14] Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, et al. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20814-20823.

[15] Ni YG, Berenji K, Wang N, et al. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling[J]. Circulation, 2006, 114(11): 1159-1168.

[16] Lee SW, Dai G, Hu Z, et al. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6): 1537-1545.

(编辑 孙慧兰)

(上接第189页 from page 189)

1994, 72(1): 35-41.

[7] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[8] Liu FS, Jan YJ, Lai CR, et al. Expression analysis of apoptosis-related markers TP53, BCL-2, BAX and c-MYC in female genital tract sarcomas [J]. J Chin Med Assoc, 2008, 71(12): 628-634.

[9] Manna S, Chakraborty T, Ghosh B, et al. Dietary fish oil associated with increased apoptosis and modulated expression of Bax and Bcl-2 during 7,12-dimethylbenz (alpha)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008, 79(1-2): 5-14.

[10] Vairaktaris E, Kalokerinos G, Goutzanis L, et al. Diabetes enhances cell proliferation but not Bax/Bcl-2-mediated apoptosis during oral oncogenesis [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008, 37(1):60-65.

(编辑 张恩健)