

# MAPK 及 MKP-1 在肾性高血压大鼠 心肌肥大过程中的变化

鲁伟, 刘培庆, 陈健文, 潘敬运

(中山医科大学生理学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】研究肾性高血压大鼠(renal hypertensive rats, RHR)心肌肥大发生发展过程中心肌组织丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性、蛋白表达及丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶(MKP-1)蛋白表达的变化以及血管紧张素II(Ang II)1型受体(AT<sub>1</sub>)拮抗剂TCV116作用。【方法】①制作两肾一夹肾性高血压大鼠模型;②以左心室质量与体质量比值作为心肌肥大的指标;③以胶内MBP原位磷酸化法测定MAPK活性,以免疫印迹法检测MKP-1蛋白表达。【结果】①大鼠肾动脉狭窄术后8周心肌肥大已发生,12周至16周心肌肥大进一步加重;②术后8周、12周、16周大鼠心肌组织MAPK活性逐渐增加,各周龄组MKP-1蛋白表达虽然均高于同周龄对照组,但随肾动脉狭窄时间延长呈下降趋势,心肌MAPK活性与心肌肥大程度呈显著正相关,而与MKP-1蛋白表达呈显著负相关。③TCV116可有效抑制心肌肥大及MAPK活性、MKP-1蛋白表达的变化。【结论】Ang II是介导两肾一夹肾性高血压大鼠心肌肥大的重要因子;Ang II主要通过AT<sub>1</sub>受体介导心肌肥大反应及MAPK激活;MAPK是心肌肥大的重要信号通路,随肾动脉狭窄时间的延长,MKP-1表达逐渐下降可能是导致MAPK持续激活并导致心肌肥大加剧的重要原因。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1; 心肌病, 肥大性; 肾性高血压; 大鼠

中图分类号: R541.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)02-0087-05

## The Change of MKP-1 and MAPK in Myocardium of Renovascular Hypertensive Rats

LU Wei, LIU Pei-qing, CHEN Jian-wen, PAN Jing-yun

(Department of Physiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the relationship between MKP-1 and MAPK and the effect of TCV 116, an AT<sub>1</sub> receptor antagonist, on the changes of MAPK and MKP-1 in myocardial hypertrophy of renovascular hypertensive rats (RHR). 【Methods】①Two-kidney and one-clip renal hypertensive model was established in Sprague-Dawley rats by chronic partial occlusion of left renal artery; ②Left ventricular mass to body mass ratio was measured to assay the degree of myocardial hypertrophy; ③MAPK activity was examined using an in-gel kinase assay, MKP-1 protein expression was detected by western blotting. 【Results】①Blood pressure, left ventricular mass to body mass ratio, MAPK activity in myocardium of RHR were increased gradually, but the increment of MKP-1 protein expression tended to dropping from 8th to 16th week after renovascular constriction. ②There was a significantly positive correlation between MAPK activity and myocardial hypertrophy, but a significantly negative correlation between MAPK activity and MKP-1 protein expression. ③TCV116 effectively inhibited myocardial hypertrophy and prevented changes of MAPK activity and MKP-1 protein expression in RHR. 【Conclusion】Angiotensin II is an important factor in myocardial hypertrophy in RHR, which mediates the hypertrophic responses and activation of MAPK mainly through AT<sub>1</sub> receptor. The MAPK pathway is

收稿日期: 1999-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870888)

作者简介: 鲁伟(1971-),女,安徽安庆人,心血管生理学专业博士生;潘敬运,教授,导师,主要研究方向为高血压心肌肥厚发生发展的机制。

important for the development and intensification of myocardial hypertrophy by the long-term activation of MAPK, and the regulation of MKP-1 on MAPK may play an important role in the development of myocardial hypertrophy in RHR.

**Key words:** mitogen-activated protein kinase (MAPK); mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1); cardiomyopath, hypertrophic; hypertension, renal; rats

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是目前发现的最主要的一个生长信号调节蛋白,广泛分布在细胞浆内,其成员细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK),主要为 p44 MAPK 和 p42 MAPK,与细胞生长、分化和增殖的调控关系最为密切<sup>[1]</sup>。目前研究显示 MAPK 在多种致肥大因子介导的心肌肥大反应中起关键作用,高血压大鼠心肌组织中亦可见 MAPK 活性及蛋白表达增加<sup>[2,3]</sup>。活化的 MAPK(即 MAPK 中的酪氨酸和苏氨酸残基磷酸化)主要被其磷酸酶去磷酸化而失活,其中丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)最为重要<sup>[4,5]</sup>。我们主要通过研究两肾一夹肾性高血压大鼠心肌肥大形成不同时期及药物逆转过程中心肌组织 MAPK 活性及与 MKP-1 蛋白表达的关系,从 MAPK 失活角度研究 MAPK 信号途径在心肌肥大发生发展及药物逆转中的作用,为深入研究心肌肥大的发生发展和逆转机制提供新思路 and 依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和试剂

MBP 购自 Gibco 公司;兔抗鼠 MAPK 单克隆抗体、琼脂糖结合的兔抗鼠 MAPK 抗体,兔抗鼠 MKP-1 单克隆抗体、leupeptin、apoprotin、PMSF、蛋白激酶抑制肽(其氨基酸序列为:TT YADFIASGR-RANAIHD)均购自 Sigma 公司;化学发光增强剂(ECL)购自基因公司, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司;TCV 116 由日本爱媛大学小野知原教授惠赠;其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 两肾一夹肾性高血压大鼠模型制作

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量 150 ~ 200 g,购自中山医科大学实验动物中心,动物合格证号:检证字 98A017。实验分为 10 组,每组 6 只。1~3 组为同周龄假手术组,4~10 组以戊巴比妥钠腹腔麻醉后按 Kuwajima 法制备两肾一夹 Goldblatt

肾性高血压模型<sup>[6]</sup>。其中第 5 组、第 7 组、第 9 组于手术后第 5 周起分别每天灌胃给予血管紧张素 II (Ang II) 1 型受体(AT<sub>1</sub>)拮抗剂—TCV 116 1.0 mg/kg,第 10 组给予 TCV 116 0.2 mg/kg 至实验结束。其余 6 组每天给予等容积生理盐水作为同周龄正常或高血压对照。分别于术后 8 周(第 1、4、7 组)、12 周(第 2、5、8 组)、16 周(第 3、第 6、9、10 组)以戊巴比妥钠腹腔麻醉后进行左侧颈总动脉插管,以 RM-6000 多导生理记录仪测量动脉血压。然后开胸取心脏,以预冷的生理盐水洗脱去血液,滤纸吸干水分,电子天平准确称量左心室(包括室间隔)质量,计算左心室质量与体质量比值 [w (LVW/BW) / (mg/g)]。

### 1.3 MAPK 活性测定<sup>[7]</sup>

左心室称量后迅速置低温冰箱冻存,称取约 0.2 g 组织在冰浴下研碎后加入 1.0 mL 蛋白提取液,其组成为(mol/L):  $\beta$ -磷酸甘油 20, 苯甲酰胺(benzamidine)10, 焦磷酸钠 50, 氟化钠(NaF)50, 氯化钠(NaCl)50, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)5, 乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)5, 钒酸钠(Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)0.2, N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)10 (pH 7.4),  $\phi$  = 0.1% Triton X-100, 苯甲基磺酰氟(PMSF)0.5, 抑肽酶(aprotinin)0.1, 亮肽素(leupeptin)0.02,  $\phi$  = 0.03%  $\beta$ -巯基乙醇。组织匀浆后 4 °C 离心(13 000 r/min, Eppendorf 5417R 型离心机。离心半径 9.2 cm)10 min, 取上清液,按 Bradford 法测量蛋白质量浓度<sup>[8]</sup>,使蛋白质量浓度调至 200 mg/L,以琼脂糖结合的兔抗 MAPK 抗体(1:20)4 °C 共同振荡孵育 2 h,以蛋白提取液充分洗脱沉淀(12 000 r/min 离心 4 次,每次 10 s)(Eppendorf 5417R 型离心机,离心半径 9.2 cm),取 50  $\mu$ L 加入等体积载样缓冲液,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),凝胶内含有 0.5 g/L MBP,电泳后凝胶经过异丙醇溶液洗脱、盐酸胍溶液变性、 $\beta$ -巯基乙醇和 Tween-40 溶液复性后在室温下分别与孵育缓冲液 A 及 B(其组成参见文献,孵育缓冲液 B 中含 0.185 MBq 的

[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP)各孵育 1 h,以三氯乙酸洗脱凝胶,进行放射自显影,以 IBAS 图像处理系统对胶片进行扫描,测定感光区带的感光密度,并进行积分处理。

#### 1.4 免疫印迹法检测 MKP-1 蛋白表达

将以上免疫提取液进行 SDS-PAGE 电泳,电印迹转移法转至硝酸纤维素膜上,以含用 10 g/L 小牛血清白蛋白(BSA)TBST 溶液(小牛血清蛋白)室温封闭 1.5 h,再分别与一抗(兔抗大鼠 MKP-1 单克隆抗体为一抗,其稀释度为 1:5 000)4 °C 孵育过夜和二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体)室温孵育 1 h,与 ECL 试剂反应 1 min, X 线压片曝光 10 s ~1 min,以 IBAS 图像处理系统对胶片进行扫描测定感光区带的感光密度,并进行积分处理。

#### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间及组内比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 肾动脉狭窄术后不同时期大鼠血压及左心质量/体质量变化及 TCV116 效应研究

肾动脉狭窄手术后 8 周、12 周、16 周组大鼠血压均较同周龄对照组明显升高,分加 44.4%、61.4%、54.9%,其中 12 周组与 16 周组大鼠血压增高幅度差异无显著性,提示肾动脉狭窄术后 12 周后血压升高趋向稳定;各肾动脉狭窄组大鼠左心质量/体质量比值也较同周龄对照组大鼠显著增加,分别增加 19.1%、30.0%及 46.0%,与狭窄时间呈显著正相关( $r=0.992, P<0.05$ ),说明大

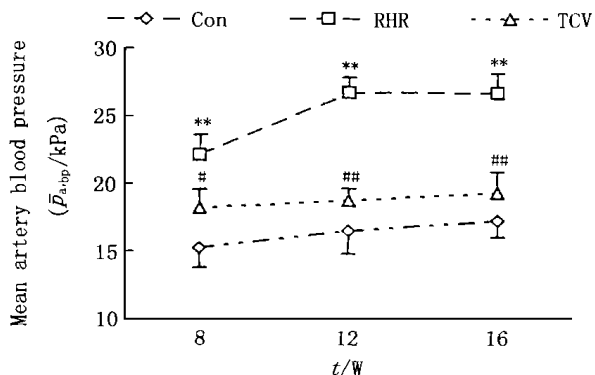


图 1 TCV116 对 2K1C 肾性高血压不同时期大鼠血压变化的影响

Fig. 1 Effect of TCV116 on changes of mean artery blood pressure in renovascular hypertensive rats

Mean artery blood pressure were measured at 8th, 12th, and 16th week after renovascular constriction. (\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$  vs control; #  $P<0.05$ ; ##  $P<0.01$  vs RHR).

鼠心肌肥大程度随着肾动脉狭窄时间延长而加剧,TCV116 给药组皆具有良好的降压及抑制心肌肥大的作用(图 1, 2)

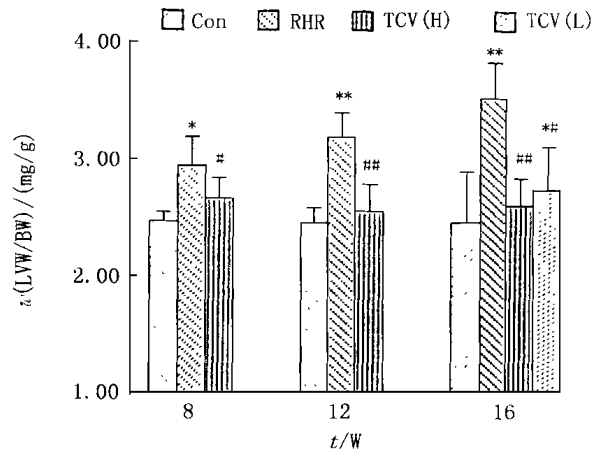


图 2 TCV116 对肾性高血压大鼠左室肥厚的影响

Fig. 2 Effect of TCV116 on changes of ratio of left ventricular mass (weight) with body mass (weight) in renovascular hypertensive rats

Ratio of left ventricular mass with body mass were measured at 8th, 12th, and 16th week after renovascular constriction. (\*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$  vs control; #  $P<0.05$ ; ##  $P<0.01$  vs RHR)

### 2.2 MAPK 活性变化

肾动脉狭窄手术后不同周龄组大鼠 MAPK 活性及蛋白表达均较对照组明显增加,免疫印迹法显示与同周龄对照组相比,肾动脉狭窄手术后 8 周 p44MAPK 及 p42MAPK 活性分别增加 53% 及 29%, 12 周分别增加 72% 及 79%, 16 周分别增加 171% 及 129%。提示在 p44MAPK 及 p42MAPK 两个 MAPK 同型体皆与心肌肥大有关。MAPK 活性及蛋白表达增加幅度随肾动脉狭窄时间延长而加重,其中 (P42+P44)MAPK 活性与心肌肥大程度呈显著正相关( $r=0.995, P<0.05$ ),而 TCV116 给药组 MAPK 活性与对照组相比差异无显著性意义(图 3)。

### 2.3 MKP-1 蛋白表达变化

肾动脉狭窄手术后不同周龄组大鼠 MKP-1 蛋白表达均高于同鼠龄对照组,但 MKP-1 蛋白表达并未随着肾动脉狭窄时间延长而加重,术后 8 周、12 周、16 周分别较对照组分别增加 110%、78.6%、44.4%,增加幅度呈逐渐下降趋势。8 周至 16 周 MKP-1 蛋白表达与 MAPK 活性及心肌肥大程度呈显著负相关( $r=-0.99$  及  $-0.996, P$  皆

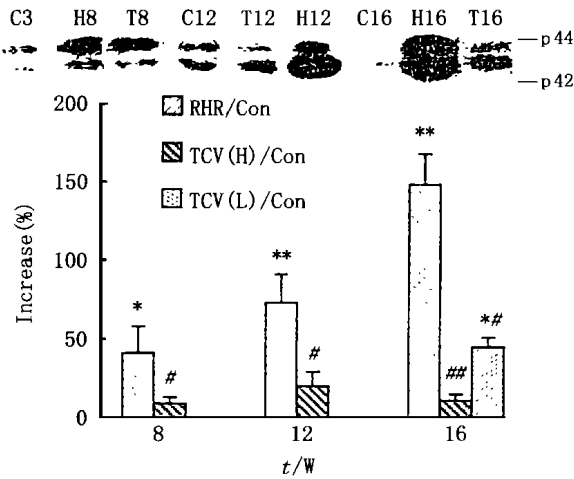


图3 TCV116对肾性高血压大鼠心肌组织MAPK活性的影响

Fig. 3 Effect of TCV116 on changes of MAPK activity in renovascular hypertensive rats

MAPK activity was analyzed by in-gel kinase measurement method using myelin basic protein(upper panel) at 8th, 12th, and 16th week after renovascular constriction.

(C control; H hyretrophy; T TCV116; n weeks after operation)

<0.05), 提示肾动脉狭窄手术后心肌组织MAPK活性持续增高可能与MKP-1表达逐渐下降而导致对MAPK的失活作用减弱有关,而TCV116各给药组MKP-1蛋白表达与同周龄正常对照组相比差异无显著性意义(图4)。

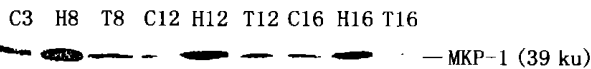


图4 TCV116对肾性高血压大鼠心肌组织MKP-1蛋白表达影响

Fig. 4 Effect of TCV116 on changes of MKP-1 protein expression in renovascular hypertensive rats

MKP-1 protein expression was analyzed by Western blotting with anti-MKP-1 antibody (upper panel) at 8th, 12th, and 16th week after renovascular constriction

(C control; H hyretrophy; T TCV116; n weeks after operation)

### 3 讨论

高血压时由于血压长期升高的机械刺激及神经体液因素可介导产生心肌肥大,肥厚心脏发生一系列结构及功能变化。但心肌肥大发生的细胞内信号机制目前尚未阐明。蛋白激酶作为细胞内信号传递的重要组成部分,其与心肌肥大发生发展的关系近年来受到人们广泛关注。MAPK是90年代以来发现的最重要的生长信号调节蛋白,其在细胞信号传导方面有两个重要特征<sup>[9]</sup>:①活化的MAPK通过转位方式进入细胞核,激活其下游底物,主要是一些编码核转录因子的早期反应基因(如原癌基因*c-fos*、*c-myc*、*c-jun*和*Erg-1*等)表达,调控细胞生长反应,导致次级反应基因(如ANF基因、 $\beta$ -MHC基因、MLC-2基因等)的异常表达,影响细胞的功能;②MAPK可将多个不同受体系统(如G-蛋白偶联受体和蛋白酪氨酸激酶受体)介导的信号加以整合,起着多种信号的交汇点或共同通路的作用。蛋白质的可逆磷酸化是细胞生命活动的重要过程,MAPK可被其上游激酶逐级激活,而激活的MAPK主要被其下游MAPK磷酸酶失活。在心肌细胞,MKP-1是重要的MAPK磷酸酶<sup>[10]</sup>,MKP-1对MAPK去磷酸化有较高的特异性,因而对MAPK的活性调节具有重要意义<sup>[10]</sup>。Ang II是调控心血管反应的重要活性多肽,近年来发现Ang II尚具有生长因子特性,促进心肌细胞生长反应。本文研究发现在两肾一夹肾性高血压大鼠心肌肥大发生早期,心肌组织MAPK活性及MKP-1蛋白表达皆升高,但随着心肌肥大的加重,MAPK活性继续增加,但MKP-1蛋白表达呈下降趋势。AT<sub>1</sub>受体拮抗剂TCV116可有效心肌肥大及其所伴随的MAPK活性及MKP-1蛋白表达的异常变化,说明Ang II是介导两肾一夹肾性高血压大鼠心肌肥大的重要因子,Ang II主要通过AT<sub>1</sub>受体介导心肌肥大反应及MAPK激活。目前对MAPK激活的上游信号通路已有了比较深入的了解,但其下游磷酸酶MKP-1在心肌肥大中的作用及调控机制,目前尚不完全清楚。心肌肥大发展过程中心肌组织MAPK活性的逐渐增高与MKP-1表达相对下降呈显著负相关,提示MKP-1表达相对下降可能是导致MAPK活性的逐渐增高,进而引起心肌肥大的重要原因。是否可通过诱导MKP-1表达来

抑制心肌肥大的发展,值得深入探讨。

#### 参考文献:

- [1] Watson P A M. Mechanical activation of signalling pathways in the cardiovascular system [ J ]. Trends Cardiovasc Med, 1996, 6(1): 73.
- [2] 曾春雨, 刘光耀, 王旭开, 等. 丝裂原活化蛋白激酶在心肌细胞肥大中的作用 [ J ]. 第三军医大学学报, 1998, 20(4): 311.
- [3] 何昆仑, 郑秋甫, 牟善初, 等. 自发性高血压大鼠心肌细胞肥大与心肌 MAPK 及 Ang II 的实验研究 [ J ]. 解放军医学杂志, 1998, 23(2): 119.
- [4] Menard J, Campbell D J, Azizi M, *et al.* Synergistic effects of ACE inhibition and Ang II antagonism on blood pressure, cardiac weight, and renin in spontaneously hypertensive rats [ J ]. Circulation, 1997, 96(9): 3072.
- [5] Duff J L, Monia B P, Berk B C. Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells [ J ]. J Biol Chem, 1995, 270(13): 7161.
- [6] Kuwajima I, Kardon M B, Pegram B L, *et al.* Regression of left ventricular hypertrophy in two kidney one dip goldblatt hypertension [ J ]. Hypertension, 1982, 4(suppl): 11s.
- [7] Post R P, Goldstein D, Thuerlauf D J, *et al.* Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular cardiomyocyte [ J ]. J Biol Chem, 1996, 271(14): 8452.
- [8] Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [ J ]. Circ Res, 1994, 75(5): 932.
- [9] Serger R, Krebs E G. The MAPK signalling cascade [ J ]. FASEB J, 1995, 9(9): 726.
- [10] Fuller S J, Davies E L, Gillespie B J, *et al.* Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac cardiomyocytes [ J ]. Biochem J, 1997, 323(Pt 2): 313.

(编辑 张敏瑞)

#### ·简讯·

## 中山医达安基因诊断中心 乙型肝炎病毒 PCR 荧光检测试剂盒首获新药证书

标志着现代医学临床检验技术分子时代到来的 PCR 技术在我国经历了一段曲折的发展之后,最近终于有了质的飞跃。中山医科大学达安基因诊断中心研制开发的“乙肝病毒 PCR 荧光检测试剂盒”于 1999 年岁末获得了国家药品监督管理局颁发的二类新药证书和试生产批文。这是我国 PCR 诊断试剂盒新的审评办法颁布后第一个正式批准的 PCR 诊断试剂产品。

从 1996 年开始,该中心追踪国际前沿技术,成功开发出代表国际基因诊断技术发展新趋势的“荧光基因探针 PCR 技术”,能快速准确地对样品进行基因定量分析,解决了一系列困扰 PCR 技术临床应用的关键问题。这一技术不仅在感染性疾病诊断中具有独特优势,而且在肿瘤和遗传病的诊断方面有着广阔的应用前景。达安基因诊断中心的这项研究被国家科委列入“九五”重点攻关项目,同时又被国家计委列入国家重点科技研究项目和经贸委列为 1998 年国家技术创新项目,近期又被列入广州市重大科技项目、广东省 1999 年度火炬计划。

为了保证荧光基因探针 PCR 这一生物高新技术项目能够顺利开展,1999 年 5 月,中心在广州市政府及中山医科大学的支持下,改制成立了由中山医科大学、广州市政府所属经济实体广州生物工程中心及企业内部职工持股会三方合资的有限公司。中心将利用政府、学校、企业技术队伍三股力量系统全面地进行荧光基因探针 PCR 技术研究和产品开发,为临床检验提供高质量的试剂产品。中山医科大学达安基因诊断中心在获得“乙型肝炎病毒 PCR 荧光检测试剂盒”新药证书及生产批文的同时,还有 4 个项目已通过国家检定,并有结核杆菌、丙型肝炎、沙眼衣原体 3 个项目通过国家新药评审。

中山医科大学达安基因诊断中心研制的“乙型肝炎病毒 PCR 荧光检测试剂盒”作为 PCR 诊断试剂盒新的审评办法颁布后首个批准临床应用的 PCR 诊断试剂产品不仅使我国 PCR 技术在临床检验中应用跨出了可喜一步,也为我国的临床 PCR 检验规范化管理提供了可行性,同时也标志着我国基因诊断高科技产品在国际上的领先地位。

(冯世容)