

血管紧张素 II 介导的心肌细胞肥大反应中磷酸化 MAPK 的作用

刘培庆, 鲁伟, 王庭槐, 潘敬运

(中山医科大学生理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】本研究主要是从丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激活及失活角度研究该信号途径在血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 介导的心肌细胞肥大反应中作用。【方法】实验分别以: ① 心肌细胞蛋白合成速率作为心肌肥大反应指标; ② 磷酸化 MAPK 蛋白(p44MAPK、p42MAPK)表达反映 MAPK 活性状态。【结果】① Ang II (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 处理心肌细胞 48 h, 可使³H-亮氨酸掺入明显增加, 该作用可被 CV11974 明显抑制(抑制 85%), 而 PD098059 可部分抑制该反应(抑制 32.5%); ② Ang II (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 处理心肌细胞 5 min, 磷酸化 MAPK 蛋白表达即开始增加, 30 min 左右达到高峰, 2 h 基本恢复正常, 血管紧张素 II 的 I 型受体(AT₁)拮抗剂 CV11974(0.1 mmol/L)或 MAPK 激酶(MEK)特异性抑制剂 PD098059(50 $\mu\text{mol/L}$)可明显抑制 Ang II 介导的磷酸化 MAPK 蛋白表达(30 min 时分别下降 89% 及 81%)。【结论】Ang II 主要通过 AT₁ 受体激活 MAPK 及介导心肌肥大反应, 抑制 MAPK 的激活可减轻 Ang II 介导的心肌肥大反应。MAPK 通路激活是 Ang II 介导的心肌肥大反应重要机制。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 心肌细胞; 肥大反应; 血管紧张素 II; 磷酸化

中图分类号: R331.36 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0013-04

The Regulation of MKP-1 in Cardiomyocyte Hypertrophic Response Induced by Angiotensin II

LIU Pei-qing, LU Wei, WANG Ting-huai, PAN Jing-yun

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

Abstract: 【Objective】 The study was to examine the MAPK activity and protein expression in the cardiomyocyte hypertrophic response induced by angiotensin II (Ang II). 【Method】 (1) Neonatal rat cardiomyocyte hypertrophic response was assayed by protein synthesis rate. (2) Protein expression of Phosphorlated MAPK and MKP-1 were detected by Western blotting. 【Result】 (1) Ang II induced promotion of ³H-leucine incorporation in dose-dependent manner. Pretreatment with CV11974, a selective AT₁ receptor antagonist, or PD098059, a specific MEK inhibitor, cardiomyocyte hypertrophic response induced by Ang II could be inhibited by 85% and 32.5%, respectively. (2) Pretreatment of cardiomyocyte with Ang II for 5 min, p44MAPK and p42MAPK protein expression began to increase, the peak effect was at 30 min and last for 2 h; while pretreatment with CV11974(0.1 mmol/L) or PD098059 (50 $\mu\text{mol/L}$), Ang II-induced increase in (p44+ p42)MAPK were inhibited by 89% and 81%, respectively. 【Conclusion】 The results suggest that activation of MAPK may play an important role in Ang II-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiomyocyte, and other signal pathway may also participated in Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophic response.

Key words: mitogen-activated protein kinase; cardiomyocyte; hypertrophic response; angiotensin II; phosphorylation

收稿日期: 2000-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870888)

作者简介: 刘培庆(1964-), 男, 山东泰安人, 博士, 副教授

许多研究证明在压力超负荷等病理因素所导致的心肌肥大反应中,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是重要的刺激因子,而血管紧张素转化酶抑制剂及血管紧张素 II 型受体(AT₁)受体拮抗剂是目前治疗高血压心肌肥厚的重要药物^{1,2}。但 Ang II 导致心肌肥大反应的细胞内信号调控机制尚未完全阐明。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是目前发现的一个重要的生长信号调节蛋白,广泛分布在胞浆内,其成员细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK),主要是 p44 MAPK 和 p42 MAPK 两个同型体与细胞生长、分化和增殖的调控关系尤为密切³。本研究主要利用培养的新生大鼠心肌细胞,通过探讨血管紧张素 II 激活 MAPK 与介导心肌肥大反应的受体途径及相互关系,分析 MAPK 信号途径在血管紧张素 II 导致心肌肥大反应中的作用,为深入研究心肌肥大的发生和逆转机制提供新思路 and 线索。

1 材料与方法

1.1 心肌细胞培养

按 Simpson 等描述的方法培养新生大鼠心肌细胞。以 6 g/L 胰蛋白酶分离 1~3 d 龄的 Sprague-Dawley 大鼠心室肌细胞,采用差速贴壁法纯化心肌细胞。在培养的前 48 h,在心肌细胞培养液中加入 0.1 mmol/L 5'-溴脱氧尿苷,以抑制非心肌细胞增殖。然后换无血清培养液,72 h 开始用于药物实验。

1.2 心肌细胞³H-亮氨酸掺入测定

调细胞数密度 $0.3 \times 10^9/L$,接种于 24 孔培养板上,每孔 1 mL。培养 48 h 后换为无血清培养基,培养 24 h 后加入 0.037 MBq ³H-亮氨酸及各种处理因子,继续培养 48 h。收集细胞于玻璃纤维素膜上,以三氯乙酸固定,洗去游离的同位素标记物。滤膜烘干后置于含 5 mL 闪烁液的闪烁瓶中,以 LS3801 液体闪烁仪(Beckman)测定放射强度。

1.3 免疫印迹法测定磷酸化 MAPK 蛋白表达⁴

各种干预因素处理不同时间后,去除心肌细胞培养瓶中液体,加入 0.15 mL 提取液,其组成为 (mmol/L): β -磷酸甘油 20, benzanidine 10, 焦磷酸钠 50, NaF 50, NaCl 50, EDTA 5, EGTA 5, Na₃VO₄ 0.2, HEPES 10 (pH7.4), PMSF 0.5, aprotinin

0.1, leupeptin 0.02, $\varphi = 0.1\%$ Triton X-100, $\varphi = 0.3\%$ β -巯基乙醇。收集细胞提取物,以低温高速离心机(Eppendorf 5417R 型)4 °C 离心 (13 000 r/min, $r = 9.2$ cm),取上清液,按 Bradford 法测量蛋白浓度,调蛋白质量浓度至 200 mg/L,进行 SDS-PAGE 电泳,电印迹转移法转至硝酸纤维素膜上,以含 10 g/L 牛血清白蛋白(BSA)的 TBST 溶液室温封闭 1 h,分别和一抗(小鼠来源抗磷酸化 MAPK 单克隆抗体,1:10 000 稀释度)和二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG)室温各孵育 1 h,与 ECL 试剂反应 1 min, X 线胶片压片曝光 1 min,用 IBAS 图像处理系统对胶片扫描测定感光区带的感光密度,并进行积分处理。

1.4 试剂

小鼠来源磷酸化 MAPK 单克隆抗体(可与大鼠、人等种系动物发生免疫反应, Sigma 目录号: M8159)、leupeptin、apoptin、PMSF、蛋白激酶抑制肽(其氨基酸序列为: TTYADFIASGRRANAIHD)、Ang II 均购自 Sigma 公司,化学发光增强剂(ECL)购自基因公司,其中含辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, ³H-亮氨酸购自北京原子能研究所, CV11974 由日本爱媛大学小野知原教授惠赠, PD098059、胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.5 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。进行秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Ang II 对蛋白质合成速率

在无血清培养液中, Ang II (0.01~1.00 μ mol/L) 剂量依赖性增加新生大鼠心肌细胞³H-亮氨酸掺入。以 0.1 μ mol/L 作为 Ang II 的标准实验浓度。Ang II (0.1 μ mol/L) 处理心肌细胞 48 h, 可使³H-亮氨酸掺入明显增加, 该作用可被 AT₁ 受体阻断剂 (CV11974, 为 TCV-116 活性代谢产物, 终浓度 1 μ mol/L) 明显抑制 (抑制 85%), 而 MAPK 激酶 (MEK) 特异性抑制剂 PD098059 (50 μ mol/L) 可部分抑制该反应 (抑制 32.5%)。以上结果表明 Ang II 主要通过 AT₁ 受体介导心肌肥大反应, 抑制 MAPK 的激活可减轻但不能完全取消 Ang II 介导的心肌肥大反应 (图 1, 2)。

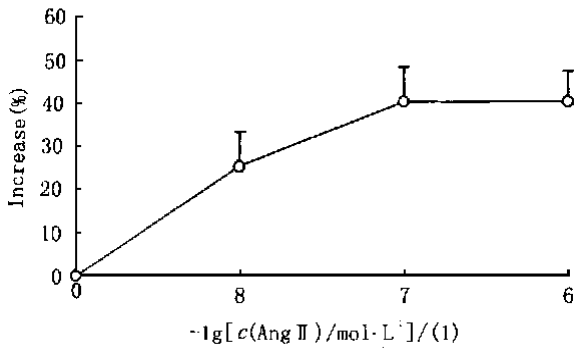


图 1 不同浓度 Ang II 对培养的新生大鼠心肌细胞³H-亮氨酸掺入的影响

Fig. 1 Effects of angiotensin II on the surface area ³H leucine incorporation and protein content in the cultured neonatal rat cardio myocyte

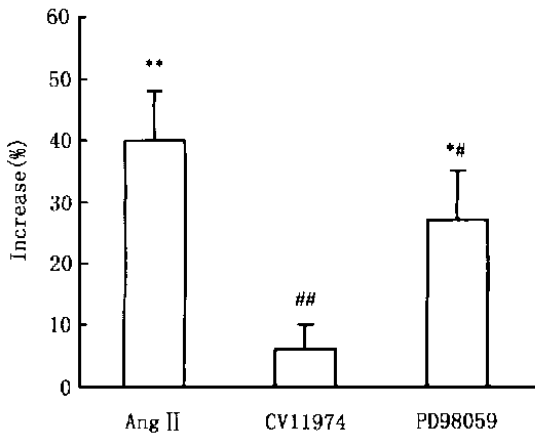


图 2 CV11974 及 PD098059 对 Ang II 促进培养新生大鼠心肌细胞³H-亮氨酸掺入的影响

Fig. 2 Effects of CV11974 and PD098059 on promotion of ³H-leucine incorporation in cultured neonatal rat cardio myocyte induced by angiotensin II (0.1 μmol/L)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with Ang II

2.2 Ang II 诱导磷酸化 MAPK 蛋白表达的受体途径及时相关关系

以针对磷酸化 p44MAPK 和 p42MAPK 两个同型体的 MAPK 单克隆抗体对 SDS-PAGE 电泳结果进行免疫分析, 结果显示新生大鼠心肌细胞中 MAPK 这两个同型体皆有表达。Ang II 处理心肌细胞 5 min 磷酸化 MAPK 蛋白 (p44MAPK 及 p42MAPK) 表达即开始增加, 30 min 左右达到高峰, 提示 MAPK 磷酸化激活, 2 h 磷酸化 MAPK 蛋白表达基本恢复正常。AT₁ 拮抗剂 CV11974 (0.1 mmol/L) 或 MAPK 激酶 (MEK) 特异性抑制剂 PD098059 (50 μmol/L) 可明显抑制 Ang II 介导的磷

酸化 MAPK 蛋白表达 (30 min 时分别下降 89% 及 81%), 提示同介导心肌细胞肥大反应相似, Ang II 激活 MAPK 亦主要通过 AT₁ 受体, 抑制 MAPK 上游激酶 MEK 可明显抑制磷酸化 MAPK 蛋白表达 (图 3, 4)。

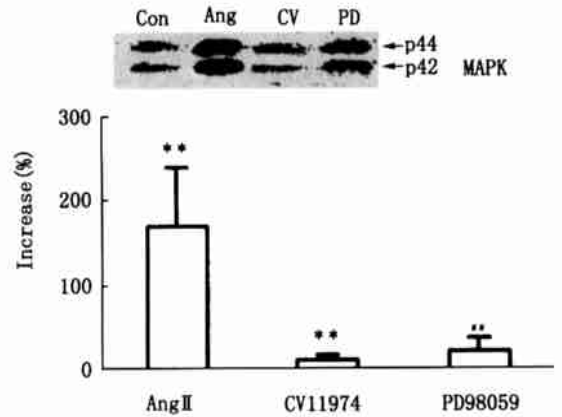


图 3 CV11974 及 PD098059 对 Ang II 激活 MAPK 的影响

Fig. 3 Effects of CV11974 and PD098059 on mitogen-activated protein kinase activity stimulated by angiotensin II (0.1 μmol/L)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with Ang II

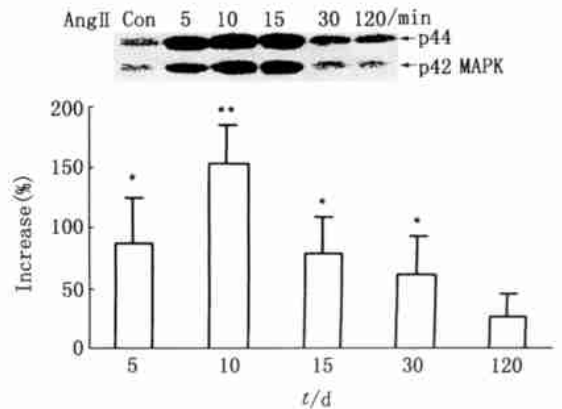


图 4 Ang II 诱导磷酸化 MAPK 蛋白表达的时相关关系

Fig. 4 Time course of phosphorylated mitogen-activated protein kinase protein expression induced by angiotensin II

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control

3 讨论

本研究表明, Ang II 可剂量依赖性的诱导培养的新生大鼠心肌细胞的肥大反应及 MAPK 激活, 这种作用主要通过 AT₁ 受体介导。抑制 MAPK 的激活可减轻但不能完全取消 Ang II 介导的心肌肥大反应, 提示 MAPK 通路是 Ang II 介导的心肌肥

大反应信号途径之一。

近年,人们对 Ang II 作用的细胞内信号机制进行了广泛的研究;特别是蛋白激酶作为细胞内信号传递的重要组成部分,在 Ang II 介导的心肌肥大中的作用更受到人们广泛关注。MAPK 是 20 世纪 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^[5,9]: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、 β -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-蛋白耦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^[7,8]。Ang II 作为一种重要的致心肌肥大因子,对 MAPK 信号途径的逐级激活可能是其导致心肌肥大的重要机制^[9]。但是激活的 MAPK 很快被细胞内的磷酸酶去磷酸化而失活,因此,MAPK 的激活可能只作为心肌肥大反应的启动信号。有多种可能导致 MAPK 磷酸化位点去磷酸化的磷酸酶,其中较为重要的包括 MKP-1 和钙调蛋白磷酸酶(calcineurin),我们的相关研究提示在心肌细胞, MKP-1 是失活 MAPK 的主要磷酸酶,即 MAPK 活性受其上游 MAPK 激酶及其下游 MAPK 磷酸酶的双重调控。本研究发现抑制 MAPK 的激活可减轻但不能完全取消 Ang II 介导的心肌肥大反应,提示除 MAPK 信号途径外,尚可能存在其它介导 Ang II 致心肌肥大反应的信号通路。我们既往研究观察到 Ang II 介导的心肌肥大反应时可导致细胞内钙浓度增加,钙-钙调蛋白信号通路可能也与 Ang II 介导的心肌肥大反应有关^[9,10]。

本实验结果证明 MAPK 激活是 Ang II 介导心肌肥大反应的重要环节,但 MAPK 信号通路可能不是 Ang II 介导的心肌肥大反应唯一信号途径,深入探讨心肌肥大的细胞内信号机制,将为研究心肌肥大的发生和逆转机制提供重要的思路和线索。

参考文献:

- [1] Watson P A. Mechanical activation of signaling pathways in the cardiovascular system [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 1996, 6(1): 73.
- [2] 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(13): 3072.
- [3] Post R P, Goldstein D, Thuerauf D J, *et al*. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocyte [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(14): 8452.
- [4] Anita M P, Rim C S, Yao H, *et al*. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 270(24): 8452.
- [5] 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 myocytes [J]. *Biochem J*, 1997, 323(Pt 2): 313.
- [6] Cook S J, Beltman J, Cadwallader K A, *et al*. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca^{2+} -dependent signal pathways in Rat-1 cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(20): 13309.
- [7] Kusari A B, Byon J, Bandyopadhyay D, *et al*. Insulin-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) attenuates insulin-stimulated MAP kinase activity: a mechanism for the feedback inhibition of insulin signaling [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(10): 1532.
- [8] Cho M J. Reciprocal regulation of mammalian nitric oxide synthase and calcineurin by plant calmodulin isoforms [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(45): 15593.
- [9] Martin A. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 2873.
- [10] Quadroni M. Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(18): 6523.

(编辑 张敏瑞)