

· 论 著 ·

PI₃K/Akt-NO 信号通路在 Ang IV 诱导大鼠心肌肥大中的作用*彭晓凤¹, 陈加飞², 王全华³, 周龙洋¹, 王 佳¹, 蒋青松^{1△}

(1. 重庆医科大学药理学教研室 400016; 2. 重庆市巴南区人民医院药剂科 401320;

3. 重庆市綦江县人民医院药剂科 401420)

摘要:目的 研究 PI₃K/Akt-NO 信号通路在血管紧张素 IV (Ang IV) 诱导大鼠心肌细胞肥大中的作用。方法 用乳鼠心肌细胞培养, 以细胞表面积和心房利钠因子 mRNA 表达为心肌肥大指标, 观察不同浓度 Ang IV 对心肌细胞的作用, 并观察 PI₃K 阻断剂 LY294002 和 NO 合成酶(NOS)抑制剂 L-NAME 对 Ang IV 作用的影响; 利用 Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 mRNA 及蛋白水平的表达; 硝酸还原法和 ELISA 法分别检测 NO 和内皮型 NOS(eNOS)含量。结果 Ang IV 浓度依赖地(0.01、0.1 及 1 nmol/L)诱导心肌细胞肥大; 使 Akt mRNA 和蛋白表达明显降低, eNOS mRNA 表达以及细胞培养液中 eNOS 的含量减少, NO 的释放下降($P < 0.05$); LY294002 和 L-NAME 均使 Ang IV 的作用加强($P < 0.05$)。结论 Ang IV 诱导的心肌肥大作用至少部分地与 PI₃K/Akt-NO 信号通路被抑制有关。

关键词:血管紧张素 IV; PI₃K/Akt 信号通路; 心肌肥大

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1055-03

Effect of PI₃K/Akt-NO signal pathway on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin IV in rats*Peng Xiaofeng¹, Chen Jiafei², Wang Quanhua³, Zhou Longyang¹, Wang Jia¹, Jiang Qingsong^{1△}

(1. Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Pharmacy, Chongqing Banan District People's Hospital, Chongqing 401320, China;

3. Department of Pharmacy, Chongqing Qijiang County People's Hospital, Chongqing 401420, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of PI₃K/Akt-NO signal transduction pathway on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin IV (Ang IV). **Methods** The cardiomyocyte hypertrophy responses were assayed by measuring the cell surface area and atrial natriuretic factor mRNA expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. NO concentration and endothelial NO synthase (eNOS) activity were determined by using the nitrate reduction and ELISA methods, respectively. The mRNA and protein expressions were detected by real-time PCR and western blotting, respectively. In cultured cardiomyocytes, LY294002, a selective PI₃K antagonist, and L-NAME, a selective NOS antagonist, were used to investigate the mechanisms of Ang IV. **Results** In cultured cardiomyocytes, Ang IV (0.01, 0.1, 1 nmol/L) induced cardiomyocyte hypertrophy in a concentration-dependent way. Meanwhile, the expressions of Akt mRNA and protein decreased, and the expression of eNOS mRNA and the concentrations of eNOS and NO reduced ($P < 0.05$). LY294002 and L-NAME enhanced these effects of Ang IV ($P < 0.05$). **Conclusion** PI₃K/Akt-NO signal transduction pathway involves in cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang IV, at least partly.

Key words: angiotensin IV; PI₃K/Akt; signal pathway; cardiomyocyte hypertrophy

大量研究已经证明, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 在糖尿病等代谢综合征的发生发展过程有重要作用, 但大多数研究集中于血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 及其受体。血管紧张素 IV (angiotensin IV, Ang IV) 是 Ang II C 末端的六肽片段, 与能量代谢、细胞增殖、炎症反应等密切相关^[1-2]。其特异性受体 AT4 是一种胰岛素调节的氨基肽酶 (insulin-regulated aminopeptidase, IRAP)^[3-4], 与葡萄糖转运子 GLUT4 联合位于细胞内膜的囊泡中。当胰岛素水平发生变化时, IRAP 和 GLUT4 一起移动至胞浆膜上, 调节葡萄糖的摄取^[5-6]。在 IRAP 敲除的小鼠, GLUT4 表达降低, 同时心脏尺寸增大^[7]。本研究亦发现, Ang IV 是一个致心肌肥厚的因子, 但对其相关信号通路研究较少^[8]。已有资料证明^[9], Ang II 可损伤磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-

kinase, PI₃K) 依赖途径激活的蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt), 使内皮型一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 磷酸化, 从而损伤胰岛素信号通路, 在胰岛素抵抗中有重要病理生理意义。AT4 受体本身就是受胰岛素调节的氨基肽酶——那么, Ang IV 的作用是否也与胰岛素信号通路受损有关? 胰岛素/Akt 通路在 Ang IV 诱导心肌肥大的病理生理过程中有什么作用? 这是值得探讨的问题。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂 清洁级 SD 乳鼠, 1~3 d 龄, 第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 动物许可证: SCXK(渝)2007-0005。Ang IV、胰蛋白酶、5'-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷 (5'-BrdU) 均购自 Sigma 公司; LY294002、L-硝基-精氨酸甲酯 (NG-nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME)、RIPA 裂解液、

表 1 实时荧光定量 PCR 基因扩增引物序列

基因	序列	基因库序号
β-actin	Forward: 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3'	RA015375
	Reverse: 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'	
ANF	Forward: 5'-TGA CAG GAT TGG AGC CCA GAG-3'	NM012612
	Reverse: 5'-TCG AGC AGA TTT GCT GTT ATC TT-3'	
Akt	Forward: 5'-TGA GGT TGC CCA CAC GCT TA-3'	RA044723
	Reverse: 5'-GGC GTA CTC CAT GAC AAA GCA G-3'	
eNOS	Forward: 5'-AGC TGG ATG AAG CCG GTG AC-3'	NM021838
	Reverse: 5'-CCT CGT GGT AGC GTT GCT GA-3'	

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、总 NO 检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 等均购自江苏碧云天公司;大鼠 eNOS ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司;Trizol、逆转录试剂盒均购自大连宝生物公司。其余均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞培养与分组 胰蛋白酶消化法培养乳鼠心室肌细胞^[10]。细胞分为(1)正常对照组:加入等体积无血清的 DMEM 培养基;(2)不同浓度 Ang IV 组:Ang IV (0.01、0.1 及 1 nmol/L);(3)Ang IV (1 nmol/L)+LY294002(0.02 mmol/L)组;(4)Ang IV (1 nmol/L)+L-NAME(0.1 mmol/L)组。

1.2.2 心肌细胞表面积测量 将心肌细胞接种于加有盖玻片的 6 孔板中,常规 HE 染色后用 Leica Qwin V3 医学图像分析系统(德国 Leica 公司)测量单个细胞表面积,每张玻片测 5 个视野,每个视野测 10~15 个细胞,取其平均值,每组重复 3 次。

1.2.3 Real-time PCR 法检测心房利钠因子(atrial natriuretic factor, ANF)、Akt 及 eNOS mRNA 的表达 用 Trizol 提取心肌细胞总 RNA,按照说明书要求进行逆转录-聚合酶链反应,利用 SYBR 绿色荧光技术在 Icyler System 荧光定量 PCR 仪完成 mRNA 表达的检测。引物由大连宝生物公司合成,序列见表 1。以 β-actin 为内参,荧光强度到达阈值时的循环数 Ct 值为统计参数,相对定量法进行结果的分析处理,每组重复 3 次。

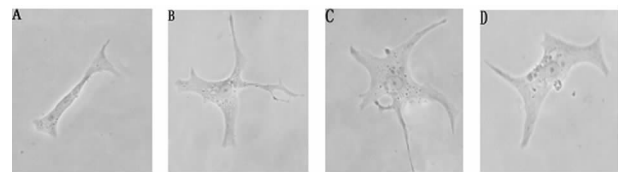
1.2.4 Western blot 法检测 Akt 蛋白表达 取蛋白 100 μg,聚丙烯酰胺变性凝胶分离,电转膜法转移到 PVDF 膜上,5% 蛋白干粉封闭 90 min,加一抗(Akt:1:400 稀释;β-actin:1:1000 稀释)。4℃ 过夜,辣根过氧化物酶标记二抗(1:1000 稀释)孵育 60 min。洗膜,用发光剂(ECL)显色,凝胶成像仪与 Quantity one 软件显影。以 β-actin 为内参,计算各组 Akt 表达的相对量。每组重复 3 次。

1.3 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行多组间方差分析和 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

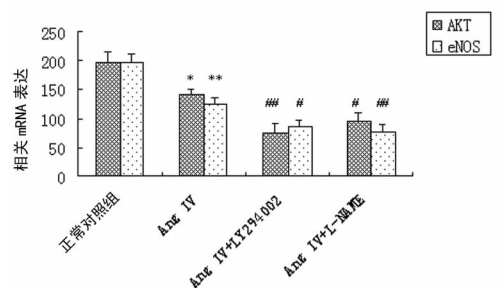
2.1 Ang IV 诱导心肌细胞肥大 与正常组比较,Ang IV 0.01、0.1 和 1 nmol/L 使心肌细胞表面积浓度依赖性增加,ANF mRNA 亦明显增加($P < 0.05$,图 1A、B,表 2)。PI₃K 抑制剂 LY294002(0.02 mmol/L)和 NOS 抑制剂 L-NAME(0.1 mmol/L)均可使 Ang IV 1 nmol/L 在细胞表面积和 ANF mRNA 表达增加的作用增强(图 1C、D,表 2)。

2.2 Ang IV 对大鼠心肌细胞 Akt 及 eNOS mRNA 表达和 Akt 蛋白的影响 正常大鼠心肌细胞 Akt 及 eNOS mRNA 的表达均较高,Ang IV 1 nmol/L 使其表达分别降低为原来的 71.4% 和 63.7% ($P < 0.01$)。LY294002 和 L-NAME 均明显增加 Ang IV 的作用,使其表达进一步降低($P < 0.05$),见图 2。Ang IV 对 Akt 蛋白表达的影响与对 mRNA 的作用一致,使其下调,LY294002 和 L-NAME 则加强 Ang IV 的作用($P < 0.05$),见图 3。



A: 正常对照组; B: Ang IV (1 nmol/L); C: Ang IV (1 nmol/L) + LY294002 (0.02 mmol/L); D: Ang IV (1 nmol/L) + L-NAME (0.1 mmol/L)。

图 1 大鼠心肌细胞 HE 染色(×400)



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, 与 Ang IV 1 nmol/L 组比较。

图 2 Ang IV 对大鼠心肌细胞 Akt 和 eNOS mRNA 表达的影响

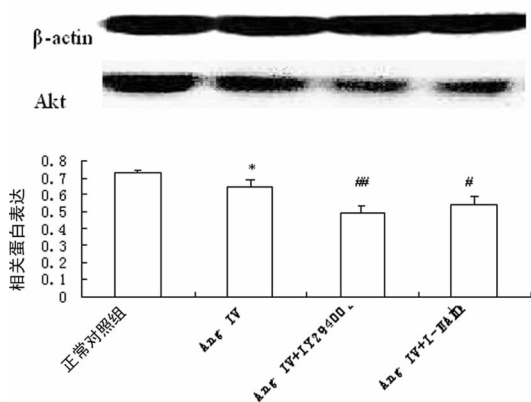
表 2 Ang IV 诱导大鼠心肌细胞肥大($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞表面积 ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	ANF mRNA
正常对照组	630.1±38.7	51.1±11.9
Ang IV 0.01 nmol/L	854.1±98.0*	—
Ang IV 0.1 nmol/L	947.8±107.9*	—
Ang IV 1 nmol/L	1064.3±98.6**	88.3±13.6*

续表 2 Ang IV 诱导大鼠心肌细胞肥大 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞表面积 ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	ANF mRNA
Ang IV 1 nmol/L+ LY294002 0.02 mmol/L	1 389.7 \pm 121.4 [#]	130.3 \pm 15.9 [#]
Ang IV 1 nmol/L+ L-NAME 0.1 mmol/L	1 360.0 \pm 136.6 [#]	149.7 \pm 18.2 [#]

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, 与 Ang IV 1 nmol/L 组比较; -: 表示无数据。



*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, 与 Ang IV 1 nmol/L 组比较。

图 3 Ang IV 对大鼠心肌细胞 Akt 蛋白表达的影响

2.3 Ang IV 对大鼠心肌细胞培养液中 eNOS 和 NO 浓度的影响 正常心肌细胞 eNOS 和 NO 含量均较高, Ang IV 0.01、0.1、1 nmol/L 使二者浓度依赖地降低 ($P < 0.05$)。LY294002 和 L-NAME 均使 Ang IV 的作用加强 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 Ang IV 对大鼠心肌细胞培养液中 eNOS 和 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	eNOS(pg/ml)	NO($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	2 187 \pm 283	6.3 \pm 1.0
Ang IV 0.01 nmol/L	1 877 \pm 173*	5.6 \pm 0.9
Ang IV 0.1 nmol/L	1 866 \pm 92*	5.3 \pm 1.0*
Ang IV 1 nmol/L	1 847 \pm 133*	5.0 \pm 1.1**
Ang IV 1 nmol/L+ LY294002 0.02 mmol/L	1 661 \pm 150 [#]	4.2 \pm 0.6 [#]
Ang IV 1 nmol/L+ L-NAME 0.1 mmol/L	1 648 \pm 119 [#]	4.1 \pm 0.7 [#]

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 Ang IV 1 nmol/L 组比较。

3 讨 论

心肌肥厚是临床最常见的心血管疾病之一。虽然已经进行了广泛的研究, 但其病理生理机制及参与因子并不完全清楚。目前普遍公认 RAS 在心肌肥厚发生发展中具有重要作用。Ang II 是 RAS 的主要效应激素, 可通过多条信号通路诱导心肌肥厚^[11]。Ang IV 是 Ang II 的降解片断, 目前对其在心血管系统方面的作用研究较少。纳摩尔水平的 Ang IV 激活其特异性 AT4 受体, 竞争性抑制 IRAP 的催化特性, 产生相应生物学效应^[12]。本研究结果显示, Ang IV 在 0.01、0.1、1 nmol/L

可浓度依赖地增加心肌细胞的表面积, 同时使心肌肥厚特异性因子 ANF mRNA 表达增加, 提示低浓度的 Ang IV 有类似于 Ang II 的作用, 也是一个致心肌肥大的活性因子。

最近的研究证实胰岛素信号通路参与心肌细胞的正常生长和蛋白质合成, 对于维持心血管的正常功能有重要作用。如果该通路异常, 在胰岛素抵抗状态下, 将会导致心血管功能的紊乱, 出现心血管系统疾病, 诱导心肌肥厚发生^[13]。胰岛素的大多数生物学效应是通过 PI₃K/Akt 信号途径介导的, NO 是其重要的“终末效应子”^[14]。PI₃K/Akt-eNOS 依赖信号机制及其代谢产物的调节, 对于心血管系统的保护作用具有重要的临床意义。有研究显示, Ang II 可引起 PI₃K/Akt-eNOS 信号通路损伤, 导致心肌肥厚^[9]。Ang IV 的致肥大作用是否也与该通路的受损有关? 目前国内外未见相关报道。

本研究结果显示, 在 Ang IV 诱导的心肌细胞肥大中, Akt 和 eNOS mRNA 表达均明显被抑制, Akt 的蛋白表达下调, 细胞培养液中 eNOS 的含量减少, NO 的释放亦下降。这些结果提示 PI₃K/Akt-eNOS 信号途径受损在 Ang IV 诱导心肌肥大过程中有重要意义。为进一步确证该实验结果, 作者还利用 PI₃K 抑制剂 LY294002 和 NOS 抑制剂 L-NAME 进行了相应研究。结果显示, 无论是心肌细胞表面积和 ANF mRNA 的表达, 还是 Akt mRNA 和蛋白水平的表达, 以及 eNOS 和 NO 的含量, LY294002 和 L-NAME 均使 Ang IV 的作用加强, 再次提示 Ang IV 诱导的心肌肥大作用与 PI₃K/Akt-eNOS-NO 信号通路被抑制有紧密联系。在上述指标的改变中, LY294002 的作用明显强于 L-NAME, 同时也说明 NO 不是该通路的惟一下游因子, Ang IV 的致肥大作用还有其他因素参与。作者另外的研究结果提示^[8], PPAR α 信号通路在 Ang IV 的致心肌细胞肥大中有重要作用, 说明 Ang IV 的作用也是一个多因素共同参与的结果。

综上所述, Ang IV 致心肌细胞肥大作用与其对 PI₃K/Akt 信号通路的抑制密切相关, 但 Ang IV 对该通路下游的信号转导因子的影响需要更深入地研究。

参考文献:

- [1] Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor- κ B pathway by angiotensin IV extends the role of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases [J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(1): 19-25.
- [2] Ribeiro-Oliveira AJr, Nogueira AI, Pereira RM, et al. The renin-angiotensin system and diabetes: an update [J]. Vasc Health Risk Manag, 2008, 4(4): 787-803.
- [3] Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries and clinical targets [J]. Prog Neurobiol, 2008, 84(2): 157-181.
- [4] Stragier B, De Bundel D, Sarre S, et al. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review [J]. Heart Fail Rev, 2008, 13(3): 321-337.
- [5] Albiston AL, Peck GR, Yeatman HR, (下转第 1061 页)

- [5] 程建保,杨和平,阮志华,等. 肺癌患者血浆游离性 DNA 的研究[J]. 重庆医学,2003,32(3):265-267.
- [6] Jian G, Songwen Z, Ling Z, et al. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(9):1341-1347.
- [7] Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(17):1834-1836.
- [8] Hirsch FR. K-ras mutations in lung cancer: the "mysterious mutation"[J]. Clin Lung Cancer, 2006, 8(1):30-38.
- [9] Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, et al. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(31):4769-4777.
- [10] Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(18):5731-5734.
- [11] Husgafvel-Pursiainen K, Hackman P, Ridanp M, et al. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos[J]. Int J Cancer, 1993, 53(2):250-256.
- [12] Mao C, Qiu LX, Liao RY, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies[J]. Lung Cancer, 2010, 69(3):272-278.
- [13] Taylor A, Tabrah S, Wang D, et al. Multiplex ARMS analysis to detect 13 common mutations in familial hypercholesterolaemia [J]. Clin Genet, 2007, 71(6):561-568.
- [14] Wang Y, Rollin JA, Zhang YH. Enhancing allele-specific PCR for specifically detecting short deletion and insertion DNA mutations [J]. Mol Cell Probes, 2010, 24(1):15-19.
- [15] Saif MW, Shah M. K-ras mutations in colorectal cancer: a practice changing discovery [J]. Clin Ad Hematol Oncol, 2009, 7(1):45-53, 64.
- [16] Milbury CA, Li JG, Makrigiorgos M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations[J]. Clin Chem, 2009, 55(4):632-640.
- [17] Bai H, Mao L, Wang HS, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages III B to IV non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(16):2653-2659.
- [18] Oldenburg RP, Liu MS, Kolodney MS. Selective amplification of rare mutations using locked nucleic acid oligonucleotides that competitively inhibit primer binding to wild-type DNA[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(2):398-402.
- [19] Dominguez PL, Kolodney MS. Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens [J]. Oncogene, 2005, 24(45):6830-6834.
- [20] Dufort S, Richard MJ, de Fraipont F. Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues [J]. Anal Biochem, 2009, 391(2):166-168.

(收稿日期:2011-11-30 修回日期:2011-12-27)

(上接第 1057 页)

- et al. Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: heads and tails[J]. Pharmacol Ther, 2007, 116(3):417.
- [6] Vanderheyden PM. From angiotensin IV binding site to AT4 receptor[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 302(2):159-166.
- [7] Keller SR. Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(6):761-764.
- [8] 陈加飞,王全华,吴芹,等. PPAR- α 参与血管紧张素 IV 诱导的心肌细胞肥大[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(10):1094-1096.
- [9] Wen Y, Zhang XJ, Ma YX, et al. Erythropoietin attenuates hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes induced by angiotensin- II in vitro[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2009, 69(4):518-525.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [11] Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2008, 17(2):168-173.
- [12] Chai SY, Fernando R, Peck G, et al. The angiotensin IV/AT4 receptor[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(21):2728-2737.
- [13] Yu W, Chen C, Fu Y, et al. Insulin signaling: a possible pathogenesis of cardiac hypertrophy[J]. Cardiovasc Ther, 2010, 28(2):101-105.
- [14] Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(3):516-524.

(收稿日期:2011-11-23 修回日期:2011-12-26)