

· 论 著 ·

AMPK 激活对大鼠心肌细胞蛋白降解的影响*

陈保林¹, 陈丹丹¹, 马跃东², 熊肇军³, 刘晨^{2,4}, 董吁钢^{2,4}

(1. 贵州省人民医院心内科, 贵州贵阳 550002; 2. 中山大学附属第一医院心血管医学部, 广东广州 510080; 3. 中山大学附属第三医院心内科, 广东广州 510630; 4. 卫生部辅助循环重点实验室, 广东广州 510080)

摘要:目的 探讨单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)对体外培养心肌细胞蛋白降解的影响。方法 分离培养新生 Sprague-Dawley 大鼠心肌细胞,用 AMPK 特异性激动剂 5-氨基咪唑-4-甲酰胺-1-β-D-呋喃核糖苷(AICAR)(2.0 mmol/L)、抑制剂 Compound C(0.5 mmol/L)干预,按干预方式分为:对照组、AICAR 组、Compound C 组及 AICAR+Compound C 组。Western blot 检测心肌细胞 AMPK、p-AMPK 蛋白的表达水平;高效液相色谱法检测细胞培养基中 3-甲基组氨酸(3-MH)的浓度。结果 各组心肌细胞总 AMPK 蛋白水平没有明显变化,AICAR 可上调心肌细胞 p-AMPK 蛋白水平,Compound C 下调心肌细胞 p-AMPK 蛋白水平,并抑制 AICAR 对 p-AMPK 蛋白的上调作用。AMPK 激活后心肌细胞 3-MH 释放增加,而 AMPK 活性受到抑制后,3-MH 释放减少。结论 AMPK 激活能促进心肌细胞的蛋白降解。

关键词:蛋白激酶类;心肌;细胞,培养的;酶激动剂类;蛋白激酶抑制剂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)02-0121-03

Effects of AMPK activation on protein degradation in cardiomyocytes in rats*

Chen Baolin¹, Chen Dandan¹, Ma Yuedong², Xiong Zhaojun³, Liu Chen^{2,4}, Dong Xugang^{2,4}

(1. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of cardiology Medicine, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-san University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-san University, Guangzhou, Guangdong 510630, China; 4. Key Laboratory of Assisted Circulation, Ministry of Health, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK) on protein degradation in cardiomyocytes *in vitro*. **Methods** Neonatal Sprague-Dawley rat cardiomyocytes were isolated and cultured, and then treated with specific AMPK activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside(AICAR)(2.0 mmol/L) and inhibitor Compound C(0.5 mmol/L). Cells were divided into Control, AMPK, Compound C and AMPK+Compound C group according to treatment manner. Western blot was employed to assay levels of AMPK and p-AMPK protein in cardiomyocytes, and high performance liquid chromatography was used to detect 3-methylhistidine(3-MH) concentration in culture medium. **Results** Levels of total AMPK protein of cardiomyocytes in each group showed no obvious changes. AICAR treatment up-regulated level of p-AMPK protein, whereas Compound C treatment down-regulated it and reversed the up-regulation effect of AICAR on p-AMPK protein. AMPK activation increased 3-MH releasing from cardiomyocytes, whereas AMPK suppression decreased it. **Conclusion** AMPK activation promotes protein degradation in cardiomyocytes.

Key words: protein kinases; myocardium; cells, cultured; enzyme activators; protein kinase inhibitors

单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是真核细胞生物中一个重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[1]。在运动、缺血、缺氧等情况下,细胞内 AMP/ATP 比值显著升高时,AMPK α 亚基的 Thr172 残基发生磷酸化修饰后激活而具有生物活性^[2]。AMPK 的下游靶蛋白主要与糖、脂以及蛋白质等能量代谢调节有关^[3-4]。有研究表明 AMPK 在平滑肌中参与了蛋白质降解的调控^[5],然而,AMPK 是否参与心肌细胞蛋白质降解的调控,国内、外尚无相关报道。

3-甲基组氨酸(3-methylhistidine, 3-MH)是存在于肌动蛋白和肌球蛋白中的一类转录后修饰的氨基酸^[6-7]。由于缺乏特

异性的 tRNA,肌肉蛋白质在分解代谢时释放的 3-MH 不能作为 tRNA 的底物参与新蛋白质的合成,因此,3-MH 被认为是肌细胞蛋白质降解的生物学标志^[8-9]。通过测定心肌细胞培养基中 3-MH 的浓度能够反应心肌细胞肌纤维蛋白的降解率。本研究通过观察 AMPK 激动剂 5-氨基咪唑-4-甲酰胺-1-β-D-呋喃核糖苷(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside, AICAR)对培养心肌细胞 3-MH 释放率的影响,旨在探讨 AMPK 在调控心肌细胞蛋白质分解代谢中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 1~3 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 清洁级, 由中山大学实验动物中心提供。本实验通过动物伦理委员会许可。

1.1.2 主要试剂及仪器 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 培养基、胎牛血清为美国 HyClone 公司产品, I 型胶原酶、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, AICAR、兔抗大鼠 p-AMPK- α (Thr172) 抗体、兔抗大鼠 AMPK- α 抗体购自美国 Cell Signaling (CST) 公司, AMPK 抑制剂 Compound C 为德国 Merck 公司产品, 小鼠抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自上海康成生物工程有限公司, 小鼠抗大鼠 α -actinin 抗体、羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 以及羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程有限公司, 免疫印迹发光试剂盒为美国 Millipore 公司产品, 3-MH 标准品购自美国 Sigma 公司, 色谱纯甲醇为美国 TEDIA 公司产品。主要仪器包括: 显微成像分析系统 (日本 OLYMPUS 公司)、电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司)、LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司)、C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 日本 GL Sciences 公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 原代心肌细胞培养 在超净工作台内, 无菌条件下取出乳鼠心脏, 洗净后将心室心肌组织剪碎成约 1 mm³ 大小, 先后用 0.05% I 型胶原酶和 0.125% 胰蛋白酶消化, 收集心肌细胞悬液至含 10% 胎牛血清的培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂ 的培养箱内培养 60 min, 差速贴壁法去除成纤维细胞, 重悬的心肌细胞以 5 \times 10⁵/mL 的密度接种于 6 孔板, 再放入 5% CO₂ 的培养箱内培养。待培养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^[10-11]。

1.2.2 心肌细胞的免疫化学染色鉴定 制作心肌细胞爬片, 用 4% 多聚甲醛固定; 再以 3% H₂O₂ 孵育 10 min; 滴加非免疫动物血清孵育 10 min; 再滴加 α -actinin 第一抗体 (1:200) 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日加生物素标记的第二抗体, 室温下孵育 20 min 后滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶, 10 min 后二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色, 镜下观察。

1.2.3 心肌细胞的分组及总蛋白质的提取 为观察 AMPK 特异性激动剂 AICAR 和 AMPK 抑制剂 Compound C 对 AMPK 蛋白表达以及磷酸化活性的影响, 将心肌细胞按处理方式分为: 对照组 (未进行特殊处理)、AICAR 组 (培养基含 AICAR 1 mmol/L)、Compound C 组 (培养基含 Compound C 1 μ mol/L) 及 AICAR + Compound C 组 (培养基含 AICAR 1 mmol/L 及 Compound C 1 μ mol/L)。干预 6 h 后提取总蛋白, 采用 Bradford 法计算出样品总蛋白浓度 (μ g/ μ L)。

1.2.4 Western blot 检测 各取 50 μ g 样品蛋白进行 8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电泳结束后蛋白转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上 (80 V, 120 min), 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入第一抗体工作液中, p-AMPK- α 兔抗大鼠 (1:1000)、AMPK- α 兔抗大鼠 (1:1000)、GAPDH 小鼠抗大鼠 (1:20000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日 PVDF 膜再分别与 HRP 标记的羊抗兔或羊抗小鼠第二抗体室温下孵育 1 h; 免疫印迹用增强化学发光法 (enhanced

chemiluminescence, ECL) 显影、曝光, 采用 IPP 6.0 图像分析软件检测。以 GAPDH 作为内参, 以灰度比值表示所检测蛋白质的相对含量, 实验重复 4 次。

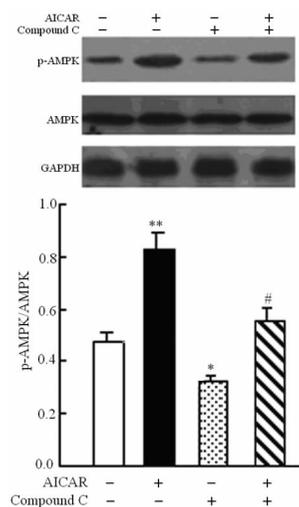
1.2.5 高效液相色谱仪检测心肌细胞 3-HT 释放量 参照课题组以前介绍的方法^[11], 取 0.5 mL 心肌细胞培养基加入 100 μ L 乙腈萃取。取 100 μ L 上清液加入 100 μ L 衍生化试剂和 1 mL 硼酸缓冲液中 (0.4 mol/L), 用 0.22 μ m 的针头过滤器过滤后立即进样 20 μ L 分析。用 3-MH 标准品准确配成一定浓度的标准液, 将 5 个梯度体积的标准液制作标准曲线。将样品中 3-MH 的峰面积带入, 计算出其含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 各组两两比较采用 Student Newman Keul's (SNK) 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞的鉴定及纯度 显微镜下观察, 体外培养的心肌细胞展开, 80% 以上融合成片, 呈同步收缩。 α -actinin 免疫细胞化学染色显示, 阳性率大于 99%, 培养 48 h 后的心肌细胞达到实验要求。

2.2 AICAR 对心肌细胞 AMPK 活性的影响 AICAR 干预细胞 6 h 后, 各组心肌细胞总 AMPK 的表达无明显差异, 对照组、AICAR 组、Compound C 组及 AICAR + Compound C 组心肌细胞 p-AMPK/AMPK 的灰度比值分别为: 0.47 \pm 0.034、0.83 \pm 0.07、0.32 \pm 0.03 及 0.62 \pm 0.05。Western blot 结果显示, 与对照组比较, AICAR 组心肌细胞 p-AMPK/AMPK 灰度比值增高 ($P < 0.05$), Compound C 组心肌细胞 p-AMPK/AMPK 灰度比值降低 ($P < 0.05$), 提示 AICAR 激活心肌细胞 AMPK, 而 Compound C 则抑制 AMPK 激活; 与 AICAR 组与比较, Compound C + AICAR 组 p-AMPK/AMPK 灰度比值降低 ($P < 0.05$), 提示 Compound C 逆转了 AICAR 对心肌细胞 AMPK 的激活作用。见图 1。

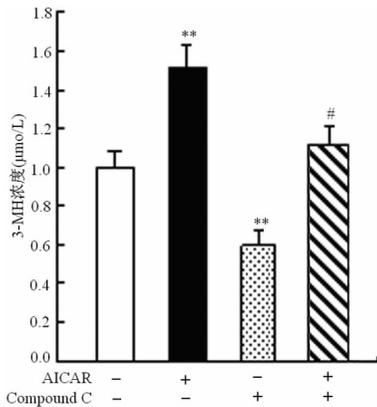


*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 AICAR 组比较。

图 1 AICAR 对 AMPK 磷酸化激活的影响

2.3 AMPK 活性对心肌细胞蛋白降解的影响 以 3-MH 的色谱峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 (X) 为横坐标, 利用不同浓度的 3-MH 标准品与各自对应的峰面积建立回归方程: $Y = 731241X + 896.86$, 相关系数 $r = 0.9998$, 在 1.6 μ mol/L 至

107 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内 3-MH 浓度与峰面积线性关系良好。本实验中所检测的培养基中, 3-MH 浓度在 4.8~68.3 $\mu\text{mol/L}$ 范围。研究结果显示, 与对照组比较, AICAR 明显促进细胞蛋白降解 ($P<0.01$), Compound C 能够抑制心肌细胞蛋白降解 ($P<0.01$); Compound C 还逆转了 AICAR 对蛋白降解的促进作用 ($P<0.01$)。见图 2。



* * : $P<0.01$, 与对照组比较; # : $P<0.05$, 与 AICAR 组比较。

图 2 AICAR 对心肌细胞 3-MH 释放量的影响

3 讨论

AMPK 是由一个相对分子质量为 63×10^3 的 α 亚基, 一个相对分子质量为 43×10^3 的 β 亚基以及一个相对分子质量为 38×10^3 的 γ 亚基组成的异源三聚体^[1], 是能量代谢的重要调节酶, 对调控细胞的生长, 增殖有重要作用^[12]。作为机体能量调节器, AMPK 能对心肌细胞内 AMP/ATP 比例变化反应迅速。在缺血、缺氧、葡萄糖缺乏、饥饿等情况下, 心肌组织能量缺乏, AMP/ATP 比例增加, 继而 AMPK 磷酸化激活。AMPK 激活后通过调控代谢相关酶发挥能量代谢的调控作用^[13-14], 如 AMPK 磷酸化激活乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 后增加脂肪酸的摄取和氧化; 促进葡萄糖转移酶 4 加速葡萄糖的摄取, 刺激糖酵解, 增加 ATP 生成; 同时为了保存细胞内 ATP 水平, 抑制蛋白质以及脂质合成, 使细胞耗能活动减弱。以上这些调节反应使心肌细胞得以保持 ATP 的水平, 有助于维持心肌细胞的功能。而蛋白质降解也是能量缺乏时机体反应的一部分, AMPK 是否参与心肌细胞蛋白质降解的调控尚不清楚。本研究中, 通过 AMPK 激动剂 AICAR 和抑制剂 Compound C 干预离体培养的心肌细胞, 并应用高效液相色谱法检测心肌细胞培养基中 3-MH 释放量, 发现 AMPK 激活后 3-MH 释放明显增加, 而抑制 AMPK 活性后 3-MH 释放显著减少, 以上结果提示 AMPK 能够促进 3-MH 释放, 参与心肌细胞蛋白质降解的调控。

与其他组织、器官一样, 心肌细胞的蛋白质合成与降解之间有序的动态平衡受到严密调控。蛋白转换同时存在于心肌细胞肥大和萎缩这两种不同的病理过程中, 只是合成与分解的相对比例不同^[15]。心肌肥大和萎缩的本质是细胞内肌纤维蛋白量增减, 因此, 对心肌细胞肌纤维蛋白降解的检测将有助于寻找有效逆转心肌肥大的药物以及客观评价逆转肥大药物的治疗效果。本研究结果发现, 作为心肌细胞能量代谢重要调节酶的 AMPK 不仅调控心肌细胞葡萄糖和脂肪代谢, 还参与蛋白降解的调控, 提示其可能是心肌细胞肥大的治疗靶点, 为今后 AMPK 激活逆转心肌细胞肥大的治疗提供理论依据。然

而, 这需要通过构建心肌细胞肥大模型来进一步论证。此外, AMPK 是一个蛋白激酶, 并没有水解功能, 其如何调控蛋白降解也需要进一步探讨。

参考文献:

- 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.
- Heidrich F, Schotola H, Popov AF, et al. AMPK-activated protein kinase and its role in energy metabolism of the heart[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2010, 6(4): 337-342.
- 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.
- Song P, Zou MH. Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9): 1607-1619.
- 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.
- Wassner SJ, Schlitzer JL, Li JB. A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1980, 104(2): 284-289.
- Houweling M, van der Drift SG, Jorritsma R, et al. Technical note: quantification of plasma 1- and 3-methylhistidine in dairy cows by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Dairy Sci*, 2012, 95(6): 3125-3130.
- Thompson MG, Thom A, Partridge K, et al. Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(3): 455-461.
- Aranibar N, Vassallo JD, Rathmacher J, et al. Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling[J]. *Anal Biochem*, 2011, 410(1): 84-91.
- Chen BL, Ma YD, Meng RS, et al. Activation of AMPK inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating of the FOXO1/MuRF1 signaling pathway in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(7): 798-804.
- 陈保林, 马跃东, 熊肇军, 等. 高效液相色谱法检测心肌细胞蛋白降解率[J]. *重庆医学*, 2011, 40(22): 2234-2235.
- Ahluwalia A, Tarnawski AS. Activation of the metabolic sensor-AMP activated protein kinase reverses impairment of angiogenesis in aging myocardial micro- (下转第 126 页)

胎上皮发育过程中, *IRF6* 基因是角质形成、细胞增殖与分化的关键因素, 与部分基因突变所致的表型有重叠现象^[13-15]。

研究还发现, 在胚胎腭融合过程中, 腭突中线边缘的 *IRF6* 基因均呈高水平表达^[3,7]。GD11~14 是腭突发育的关键期, 此阶段发生舌的下降、双侧腭板的上抬、粘连、融合等一系列复杂事件, 上述任一事件受到干扰, 如腭突生长缺陷、腭突上抬延迟或失败、腭突融合、腭中嵴上皮细胞死亡、间充质固化和分化过程失败等, 均会导致腭裂的发生^[8]。

本研究应用 C57BL/6J 近交系小鼠, 依次剪取 GD13.0、GD14.0、GD14.5 及 GD15.0 时的胚头, 经免疫组织化学检测后, 用网格测试法在高倍镜视野下计数腭突中全部间充质细胞的阳性细胞数。结果发现, GD13.0 时, 腭突上皮可见 *IRF6* 蛋白的表达; GD14.5 时, 腭突上皮中 *IRF6* 蛋白表达达到高峰; GD15.0 时, 腭突融合后, 仅在腭突的口腔面及鼻腔面的上皮细胞中可见 *IRF6* 蛋白表达。本研究证明了在小鼠次发腭融合期间, *IRF6* 蛋白在腭中嵴上皮细胞中持续表达。在腭突融合前的接触期, *IRF6* 蛋白表达水平达到高峰; 在腭突融合后, *IRF6* 蛋白表达水平下降。表明 *IRF6* 蛋白在两侧腭胚突的接触期及黏附融合期发挥调节作用, *IRF6* 蛋白在胚胎腭突中嵴上皮细胞的凋亡或腭中嵴上皮向间充质的转化过程中发挥作用。

研究通过在腭突融合过程中对 *IRF6* 蛋白表达情况的动态检测, 证明其在腭突融合过程中具有重要作用。证实了 *IRF6* 基因是一个重要的先天性唇腭裂候选基因, *IRF6* 基因突变可能会导致腭裂的发生, 为进一步了解并明确腭裂的发生机制提供理论依据, 以后 *IRF6* 基因或可作为孕前筛查的标志, 从而针对唇腭裂高危人群进行早期诊断和干预性预防, 具有重要意义。

参考文献:

- [1] Dai L, Zhu J, Mao M, et al. Time trends in oral clefts in Chinese newborns; dtoring Network[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010, 88(1): 41-47.
- [2] Schutte BC, Bjork BC, Coppage KB, et al. A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41[J]. Genome Res, 2000, 10(1): 81-94.
- [3] Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*) [J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1335-1340.
- [4] Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, et al. *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation Switch[J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1329-1334.
- [5] Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes[J]. Nat Genet, 2002, 32(2): 285-289.
- [6] Eroshkin A, Mushegian A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens[J]. J Mol Med, 1999, 77(5): 403-405.
- [7] Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, et al. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 769-780.
- [8] Luca S, Palmieri A, Martinelli M, et al. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(1): 180-183.
- [9] Blanton SH, Cortez A, Stal S, et al. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate[J]. Am J Med Genet, 2005, 137(3): 259-262.
- [10] Ghassibe M, Bayet B. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population[J]. Eur J Hum Genet, 2005, 13(11): 1239-1242.
- [11] Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, et al. Association between *IRF6* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations[J]. Genet Med, 2007, 9(4): 219-227.
- [12] Knight AS, Schutte BC, Jiang R, et al. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of *IRF6*; the gene mutated in Van der Woude syndrome[J]. Dev Dyn, 2006, 235(5): 1441-1447.
- [13] Moretti F, Marinari B, Lo Iacono N, et al. A regulatory feedback loop involving p63 and *IRF6* links the pathogenesis of 2 genetically different human ectodermal dysplasias[J]. J Clin Invest, 2010, 120(5): 1570-1577.
- [14] Thomason HA, Zhou H, Kouwenhoven EN, et al. Cooperation between the transcription factors p63 and *IRF6* is essential to prevent cleft palate in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(5): 1561-1569.
- [15] Rahimov F, Marazita ML, Visel A, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip[J]. Nat Genet, 2008, 40(11): 1341-1347.

(收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-11-25)

(上接第 123 页)

vascular endothelial cells. Implications for the aging heart [J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(5): 583-587.

- [13] Wang S, Song P, Zou MH. AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(12): 555-573.
- [14] Dailey MJ, Kim S. Inositol polyphosphate multikinase: an

emerging player for the central action of AMP-activated protein kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(1): 1-3.

- [15] Razeghi P, Taegtmeier H. Cardiac remodeling: UPS lost in transit [J]. Circ Res, 2005, 97(10): 964-966.

(收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-10-18)