

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0206-04

# 心肌肥厚大鼠细胞核内蛋白激酶和蛋白磷酸酶的活性

刘健<sup>1</sup>, 何作云<sup>1</sup>, 王培勇<sup>2</sup>

(第三军医大学 1. 新桥医院心内科, 重庆市 400037; 2. 病理生理学教研室, 重庆市 400038)

[关键词] 左心室肥厚; 细胞核; 蛋白激酶; 蛋白磷酸酶

[摘要] 探讨细胞核磷酸化和去磷酸化在心肌肥厚发生中的作用, 制备腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚模型、差速离心和密度梯度离心提纯心肌细胞核, 同位素<sup>32</sup>P 掺入法测激酶活性, 无机磷生成显色法测定蛋白磷酸酶活性。结果发现, 与对照组比较, 腹主动脉缩窄组心肌细胞核丝裂素活化蛋白激酶活性增加 82.03% ( $P < 0.05$ ), 膜丝裂素活化蛋白激酶活性无显著变化, 胞浆丝裂素活化蛋白激酶活性下降 53.69% ( $P < 0.01$ ); 蛋白激酶 A 活性均无明显变化。细胞核磷酸酶 2A 活性增加 44.95% ( $P < 0.05$ ), 膜磷酸酶 2A 增加 36.75% ( $P < 0.05$ ); 细胞核磷酸酶 2B 活性增加 43.57% ( $P < 0.05$ ), 胞浆磷酸酶活性均无显著增加。正常组心肌细胞核丝裂素活化蛋白激酶活性与胞浆无显著差异, 但腹主动脉缩窄组心肌丝裂素活化蛋白激酶活性为核 > 膜 > 胞浆, 蛋白激酶 A 活性分布无显著差异; 磷酸酶 2A、2B 和 2C 活性分布为核 < 膜 < 胞浆。结果提示, 压力超负荷时细胞核内蛋白磷酸化和去磷酸化水平增高, 可能在介导心肌肥厚的发生中起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Activities of Protein Kinases and Phosphoprotein Phosphatases in Pressure Overload-induced Hypertrophic Rat's Hearts

LIU Jian, HE Zu-Yun, and WANG Pei-Yong

(Department of Cardiology, the Third Military Medical University, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China)

[MeSH] Hypertrophy, Left Ventricular; Cell Nucleus; Protein Kinase; Phosphoprotein Phosphatase

[ABSTRACT] **Aim** To observe whether protein phosphorylation and dephosphorylation in nuclei play roles in the development of myocardial hypertrophy and distribution of protein kinases and phosphatases in cell fractions were determined. **Methods** The model of hypertensive rat was established by abdominal aortic constriction. Velocity and isopycnic gradient centrifugation was employed to fractionate rat myocardium to membrane, cytosole and nuclei. Enzymatic methods were employed to determine kinases and phosphatases. **Results** Compared with control group, the activity of mitogen activated protein kinase (MAPK) increased by 82.03% ( $P < 0.05$ ) in nuclear, changed without significance in membranous fraction, whereas declined by 53.69% ( $P < 0.01$ ) in cytosolic fraction; the activity of protein kinase A (PKA) in different fractions were close to those of control; the activity of PPase 2A increased by 44.95% ( $P < 0.05$ ) and 36.75% ( $P < 0.05$ ) respectively in nuclear and membranous fractions, changed without significance in cytosolic fraction; the activity of PPase 2B increase by 43.57% ( $P < 0.05$ ) in nuclear and changed without significance in membranous and cytosolic fractions; the activity of PPase 2C in different fractions were close to those of control. **Conclusions** Nuclear MAPK, PPase 2A and PPase 2B might be involved in developing overload-induced cardiac hypertrophy.

心肌肥厚是心脏对多种因素长期刺激所发生的适应性重塑, 目前研究提示, 多条信号通路参与心肌肥大的发生过程。磷酸化/去磷酸化是细胞内信号转导最普遍的分子调节机制, 细胞核内蛋白磷酸化/去磷酸化水平是胞浆的 30~40 倍, 说明对细胞核磷酸化/去磷酸化调节尤为重要。目前发现心肌肥大时胞浆激酶活性发生改变, 但是对心肌细胞核内磷

酸化/去磷酸化调节是否也发生异常还缺乏直接的证据。因此, 本研究在腹主动脉缩窄大鼠左心室肥厚动物模型上, 采用亚细胞器分离的方法, 研究蛋白激酶和蛋白磷酸酶在心肌细胞膜、细胞浆和细胞核的分布规律, 以进一步阐明心肌肥厚发生机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、苯唑啉啉、 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、髓磷脂碱性蛋白、氨茶碱及组蛋白 IIA 购自 Sigma; [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP (370 GBq/mol) 购自北京

[收稿日期] 2001-10-18 [修回日期] 2002-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 39870347 和 39870392)资助。

[作者简介] 刘健, 1968 年出生, 女, 山东省日照市人, 博士, 主要从事心血管重塑研究。王培勇, 1966 年出生, 山东省诸城市人, 博士, 主要从事心血管病理生理学研究。何作云, 1942 年出生, 辽宁省大连市人, 硕士, 主要从事心血管流变学研究。

亚辉生物医学工程公司; 丝/苏氨酸磷酸酶分析系统购自 Promega (USA); 亮肽素、抑肽酶、胃酶抑素 A 购自分子探针公司(Molecular Probes Inc. 美国)。其余试剂为国产分析纯。

## 1.2 心肌膜性成分、胞浆酶液和心肌细胞核的提纯

按以往的方法制备腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚模型, 测定血液动力学参数并计算心肌肥大程度<sup>[1]</sup>。大鼠活杀开胸迅速取出心脏, 用 50 mL 冰冷 TKM 液 (Tris-HCl 50 mmol/L、KCl 25 mmol/L 及 MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/L, pH 7.5) 洗去红细胞, 剪碎后加入 5 倍体积等渗匀浆液 (含蔗糖 250 mmol/L、EGTA 1.0 mmol/L、DTT 1.0 mmol/L、PMSF 1.0 mmol/L 及亮肽素、抑肽酶、胃酶抑素 A 各 1 mg/L 的 TKM 液) 中, 用内切式匀浆器低速匀浆 2.5 min, 200 目尼龙布过滤, 离心 (1 400 g, 10 min) 两次, 取上清超速离心 (100 000 g, 60 min), 沉淀为心肌膜性成分, 上清为胞浆成分, 分别用于测定心肌膜性和胞浆内酶活性。所有操作在 0~4 °C 下进行。将沉淀加入 1 倍体积的 1.0 mol/L 蔗糖-TKM 液中, 充分混匀加入 3 倍体积的 2.5 mol/L 蔗糖-TKM 液, 混匀后超速离心 (120 000 g, 60 min), 沉淀即为纯化的心肌细胞核。分离的细胞核纯度采用酶学方法鉴定, 其他细胞器标志酶均小于 5%。采用 Lowry 法行蛋白质定量。

## 1.4 丝裂素活化蛋白激酶、蛋白激酶 A 活性测定

采用酶学方法测定丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)<sup>[2]</sup> 及蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)<sup>[3]</sup> 的活性。实验各组取酶液 50 μL (100 μg), 分别加入 50 μL 以下液体: MAPK 缓冲液 (pH 7.2, HEPES 20.0 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 10.0 mmol/L, MnCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, DTT 2.0 mmol/L, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.5 mmol/L, EGTA 1.0 mmol/L, 小牛血清白蛋白 0.1 g/L, PKA 抑制剂 2.0 mmol/L, 亮肽素、抑肽酶、胃酶抑素 A 各 2 mg/L, ATP-Na<sub>2</sub> 50 μmol/L; [<sup>32</sup>P]ATP 37 kBq; 髓磷脂碱性蛋白 0.5 g/L), 于 30 °C 反应 15 min; ④PKA 缓冲液 (pH 7.4, Tris-HCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 10.0 mmol/L, DTT 2.0 mmol/L, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.2 mmol/L, NaF 2.0 mmol/L, 苯唑啉啉 10.0 mmol/L, 亮肽素、抑肽酶、胃酶抑素 A 各 2 μg/L, ATP-Na<sub>2</sub> 100 μmol/L; [<sup>32</sup>P]ATP 37 kBq, 氨茶碱 5.0 mmol/L, 底物组蛋白 IA 1.0 g/L), 于 30 °C 反应 10 min 后冰浴终止反应。取 80 μL 反应液点于 p81 磷酸纤维素滤纸上, 凉干后以 0.5% (体积分数) 磷酸液浸泡行离子交换 20 min, 之后抽滤冲洗 4 次, 再用丙酮浸泡 2 min, 烘干后置于闪烁瓶中, 加入闪烁液测定<sup>32</sup>P 放射活性, 同

时作空白对照检测, 以实验管与空白管的差值表示激酶活性, 以 cpm/100 μg·protein 表示。

## 1.5 蛋白磷酸酶活性测定

胞浆、膜性成分和核制备用葡聚糖凝胶 G-25 过柱除去内源性无机磷。取样本 20 μg, 加入 1.0 mmol/L 磷酸肽 5.0 μL, 去无机磷的超纯水 30 μL, 磷酸酶 2A 5×缓冲液 (pH 7.2, 咪唑 250 mmol/L, EGTA 1.0 mmol/L, 0.1% β-巯基乙醇, 小牛血清白蛋白 0.5 g/L) 10 μL, 或磷酸酶 2B 5×缓冲液 (pH 7.2, 咪唑 250 mmol/L, EGTA 1.0 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 50 mmol/L, NiCl<sub>2</sub> 5.0 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, 钙调素 250 μg/L, 0.1% β-巯基乙醇) 10 μL, 或磷酸酶 2C 5×缓冲液 (pH 7.2, 咪唑 250 mmol/L, EGTA 1.0 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 25 mmol/L, 0.1% β-巯基乙醇, 小牛血清白蛋白 0.5 g/L) 10 μL, 空白管不加样本, 30 °C 反应 30 min, 加入钼酸铵-孔雀石绿-磷酸混合液 50 μL 终止反应, 室温放置 30 min, 在酶标仪上测定 λ595 nm 的吸光度, 根据 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 标准曲线计算蛋白磷酸酶 (phosphoprotein phosphatase, PPase) 活性, 采用三复管测定, 以 nmol/(min·g) 为单位。

## 1.6 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组比较采用 Welch *t* 检验, 多组间比较采用方差分析 (One-way ANOVA), 组间差异显著性采用 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 形态学和血流动力学指标

实验组大鼠体重 (232 ± 4.8 g) 与对照组大鼠体重 (237 ± 0.4 g) 无显著性差异。HE 染色显示, 腹主动脉缩窄大鼠左室壁显著增厚, 心肌纤维增粗, 排列紊乱。与对照组相比, 腹主动脉缩窄大鼠左心室重量指数增加 52.6%, 平均颈总动脉压增高 43.1%, 颈总动脉收缩压增加 44.5%, 颈总动脉舒张压增加 44.4%, 左心室收缩末压增加 25.9%, 左心室舒张末压减少 59.38%,  $\pm dp/dt_{max}$  分别下降 22.1% 和 27.3% (表 1, Table 1)。

### 2.2 丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 A 活性变化

与对照组相比, 腹主动脉缩窄组心肌细胞核 MAPK 活性增加 82.0% ( $P < 0.05$ ), 细胞浆 MAPK 活性下降 53.7% ( $P < 0.01$ ), 细胞膜 MAPK 活性无明显变化, PKA 活性也无显著变化。对照组心肌细胞核 MAPK 活性与胞浆无显著差异, 但腹主动脉缩窄组心肌细胞核 MAPK 活性明显高于胞浆, 为胞浆的 4.1 倍 ( $P < 0.05$ ); 膜 MAPK 活性也明显高于胞浆,

为胞浆的 2.6 倍 ( $P < 0.05$ )。对照组和腹主动脉缩窄组心肌细胞核 PKA 活性高于胞浆, 但无显著性差异 (表 2, Table 2)。

表 1. 腹主动脉缩窄心肌肥厚大鼠血流动力学指标变化。

Table 1. Hemodynamic changes of hypertrophy rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ ).

Groups	Control	Coarctation
Ratio (mg/g)	2.30 ± 0.24	3.51 ± 0.44 <sup>a</sup>
SAP (kPa)	18.2 ± 1.5	26.3 ± 3.3 <sup>a</sup>
DAP (kPa)	11.7 ± 2.0	16.9 ± 1.8 <sup>a</sup>
MABP (kPa)	14.4 ± 1.7	20.6 ± 2.2 <sup>a</sup>
LVSP (kPa)	21.2 ± 2.0	26.7 ± 2.9 <sup>a</sup>
LVDEP (kPa)	2.7 ± 0.6	1.1 ± 0.7 <sup>a</sup>
+ dp/dt <sub>max</sub> (kPa/s)	1322 ± 150	1029 ± 189 <sup>a</sup>
- dp/dt <sub>max</sub> (kPa/s)	1128 ± 208	820 ± 289 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group. Ratio: the ratio of left ventricular weight to body weight; MABP: mean arterial blood pressure; LVSP: left ventricular systolic pressure; LVDEP: left ventricular diastolic end pressure; dp/dt: developing pressure.

表 3. 心肌蛋白磷酸酶 2A、2B 和 2C 活性在细胞核、细胞膜和细胞浆中的变化。

Table 3. Changes of phosphoprotein kinase 2A, 2B and 2C activity in nuclear, membrane and cytosolic fractions of myocardium ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fraction	PPase 2A		PPase 2B		PPase 2C	
	Control	Coarctation	Control	Coarctation	Control	Coarctation
Nuclear	974.2 ± 142.9	1412.1 ± 52.3 <sup>a</sup>	1352.4 ± 262.5	1941.7 ± 186.7 <sup>a</sup>	1197.2 ± 172.6	1586.8 ± 348.3
Membrane	1674.4 ± 381.1	2289.8 ± 124.2 <sup>a</sup>	2328.5 ± 524.9	2960.9 ± 313.8	2003.5 ± 248.0	2877.6 ± 625.5
Cytosolic	4148.8 ± 608.7 <sup>b</sup>	4259.3 ± 258.3 <sup>b</sup>	4549.4 ± 936.1 <sup>b</sup>	4980.6 ± 1047.0 <sup>b</sup>	5263.5 ± 363.2 <sup>b</sup>	5758.5 ± 710.4 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with control group; b:  $P < 0.05$ , compared with the value of nuclear and membrane in the same group.

### 3 讨论

近年来大量证据表明, 心肌肥厚的发生离不开信号转导和细胞核反应 (基因表达重排) 异常这两个基本环节。最近研究提示, 丝裂素活化蛋白激酶是胞浆多种信号传导通路的共同交汇点, 而细胞核是基因转录调节和生物信息细胞内传递的最终场所。本研究显示, 腹主动脉缩窄 4 周心肌肥厚时, 心肌细胞核丝裂素活化蛋白激酶活性显著增加, 细胞浆丝裂素活化蛋白激酶活性下降, 细胞核丝裂素活化蛋白激酶活性显著高于细胞膜和细胞浆, 说明丝裂素活化蛋白激酶信号转导途径可能参与心肌肥厚的发生, 细胞核丝裂素活化蛋白激酶活性显著增加, 可能

是实现心肌肥厚基因转录表达重排的前提。研究发现, 多种转录因子活性受激酶和磷酸酶的磷酸化/去磷酸化调节, 多种刺激激活转录通过丝裂素活化蛋白激酶途径<sup>[4]</sup>。丝裂素活化蛋白激酶 p38 介导激活转录因子 MEF2C<sup>[5]</sup>, 而受 AT<sup>⊖</sup>信号激活的 JNK 能直接刺激转录因子活化蛋白-1 的活性, 活化蛋白-1 则与心肌骨骼肌型  $\alpha$  肌动蛋白和心房利钠因子基因的激活有关<sup>[6]</sup>。锌指转录因子 GATA<sub>4</sub> 是心肌肥大反应的一种新的转录调节者, 也受胞内信号丝裂素活化蛋白激酶系列的激活<sup>[7]</sup>。另外, 丝裂素活化蛋白激酶还激活其他多种转录因子如 Elk1、 $\sigma$ -Jun、ATF-2 和  $\sigma$ -myc 等, 提示核内丝裂素活化蛋白激酶对转录因子的磷酸化修饰可能是信号转导引起细胞核反应

表 2. 心肌丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 A 活性在细胞核、细胞膜和细胞浆中的变化。

Table 2. Changes of MAPK and PKA activities in nuclear, membranous and cytosolic fractions of myocardium ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ).

Fraction	MAPK		PKA	
	Control	Coarctation	Control	Coarctation
Nuclear	1300 ± 246	2366 ± 793 <sup>a</sup>	1284 ± 534	1186 ± 459
Membrane	1404 ± 321	1495 ± 209 <sup>c</sup>	915 ± 289	943 ± 418
Cytosolic	1226 ± 266	568 ± 205 <sup>bd</sup>	783 ± 261	702 ± 196 <sup>e</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with control group. c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , compared with the value of nuclear; e:  $P < 0.05$ , compared with the value of membrane.

### 2.3 蛋白磷酸酶活性变化

由表 3 (Table 3) 可见, 对照组和腹主动脉缩窄组心肌细胞浆 PPase 2A、PPase 2B 和 PPase 2C 活性均明显高于细胞膜和细胞核 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 腹主动脉缩窄组心肌细胞核 PPase 2A 活性和 PPase 2B 分别增加 44.95% 和 43.57% ( $P < 0.05$ ), 细胞膜 PPase 2A 活性增加 36.75% ( $P < 0.05$ )。

异常的关键环节。

许多研究提示,肾上腺素能受体激活在心肌肥大的发生中起重要作用。在心肌细胞上的研究提示,蛋白激酶 A 激活 Raf-1 和丝裂素活化蛋白激酶通路,从而增加心肌细胞的蛋白质合成<sup>[8]</sup>。Osaki 等<sup>[9]</sup>采用大鼠 Langendorff 心脏灌流模型观察到,高血压负荷 2 min 即可显著增加大鼠心肌的 cAMP 水平,2 h 时蛋白质合成显著增多。但本研究发现,腹主动脉缩窄 4 周心肌肥厚时,心肌细胞核、细胞膜和细胞浆蛋白激酶 A 活性与对照组相比无显著变化,说明蛋白激酶 A 通路不参与心肌重塑后期(4 周)的发生过程。

细胞核是蛋白磷酸化和去磷酸化最活跃的场所,蛋白磷酸酶在细胞内生物信息传递中与蛋白激酶具有同等重要作用,然而这方面的研究远不如蛋白激酶那样清楚。细胞内磷酸酶 PPase 2A 和 PPase 2C 的底物特异性较低,许多蛋白都可作为其底物,参与 DNA 修复、转录、蛋白合成、有丝分裂和糖代谢。新近研究发现,磷酸酶 2B 是一种依赖  $Ca^{2+}$  / CaM 的蛋白磷酸酶,在胞内生物信息传递中发挥作用。Molkentin 等<sup>[10]</sup>报道高表达的小鼠发生严重心肌肥厚与心衰,引起心肌肥厚的多种刺激通过其受体引起细胞内  $Ca^{2+}$  增加,激活蛋白磷酸酶,引起胞浆内转录因子 NF-AT<sub>3</sub> 去磷酸化,去磷酸化的 NF-AT<sub>3</sub> 转位入核,与核内心脏锌指转录因子 GATA<sub>4</sub>、活化蛋白-1 及 C-MAF 协同激活心肌肥厚相关基因的转录,导致最终的心肌肥厚。本研究发现,心肌细胞核激酶活性高于细胞浆,而细胞浆磷酸酶活性明显

高于细胞核,腹主动脉缩窄心肌肥厚时,心肌细胞核 PPase 2A 和 PPase 2B 活性均显著增加,细胞浆中无明显变化,说明细胞浆是细胞内磷酸酶活性最高的部位,心肌肥厚时,核内磷酸酶活性增加,提示压力超负荷时,可能不仅细胞核内蛋白磷酸化功能加强,去磷酸化调节也增加,从而在介导心肌肥厚相关基因转录调控和基因表达激活中起重要作用。

#### [参考文献]

- [1] 刘健,何作云,王培勇,等. 心肌肥厚大鼠心肌细胞核三磷酸肌醇受体特性的研究. *生理学报*, 2001, **53** (4): 281-285
- [2] 李田昌,庞永政,唐朝枢,等. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定. *基础医学与临床*, 1996, **16** (2): 78-80
- [3] Benyo DF, Zeleznik AJ. Cyclic adenosine monophosphate signaling in the primate corpus luteum: maintenance of protein kinase A activity throughout the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology*, 1997, **138** (8): 3 452-458
- [4] Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, **8**: 205-215
- [5] Han J, Jiang Y, Li Z, et al. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature*, 1998, **386**: 296-299
- [6] Paradis P, MacLellan WR, Belaguli NS, et al. Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal  $\alpha$ -actin promoter in ventricular myocytes. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 10 827-833
- [7] Hasegawa K, Lee SJ, Jobe SM, et al. Cis-acting sequences that mediate induction of  $\beta$ -myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation*, 1997, **96**: 3 943-953
- [8] Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, et al. Protein kinase A and protein kinase C synergistically activate the Raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29** (9): 2 491-501
- [9] Osaki J, Haneda T, Kashiwagi Y, et al. Pressure-induced expression of heat shock protein 70 mRNA in adult rat heart is coupled both to protein kinase A-dependent and protein kinase C-dependent systems. *J Hypertens*, 1998, **16** (8): 1 193-200
- [10] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 1998, **93**: 215-228

(此文编辑 文玉珊)