

蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β 信号途径 在左心室肥厚大鼠心肌组织中的变化

张 妍, 曾定尹

(中国医科大学附属第一医院循环内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌肥厚; 压力负荷过重; 主动脉结扎; 蛋白激酶 B/Akt; 糖原合成酶激酶; 负反馈

[摘要] 目的 建立左心室肥厚大鼠模型, 研究蛋白激酶 B(Akt)/糖原合成酶激酶 3 β 在肥厚心肌组织中的变化。方法 将 Wistar 大鼠随机分为主动脉结扎组和假手术组, 结扎大鼠胸主动脉成功建立左心室肥厚模型。用 Western Blot 方法检测左心室心肌蛋白激酶 B、磷酸化蛋白激酶 B、糖原合成酶激酶 3 β 和磷酸化糖原合成酶激酶 3 β 的表达。结果 主动脉结扎组与假手术组比较, 室间隔厚度 (1.60 ± 0.10 mm 比 0.90 ± 0.10 mm) 和左心室后壁厚度 (1.60 ± 0.07 mm 比 1.00 ± 0.07 mm) 升高 ($P < 0.01$); 左心室短轴缩短率升高 ($56.9\% \pm 3.4\%$ 比 $47.8\% \pm 2.1\%$, $P < 0.05$); 左心室压力最大上升速率则显著降低 ($3\,508 \pm 310$ mmHg/s 比 $4\,675 \pm 322$ mmHg/s, $P < 0.05$); 心肌组织蛋白激酶 B 磷酸化明显增加 (1.2 ± 0.3 比 0.9 ± 0.3 , $P < 0.05$), 而磷酸化糖原合成酶激酶 3 β 降低 (0.7 ± 0.2 比 0.9 ± 0.2 , $P < 0.05$)。结论 蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β 这一信号转导途径参与压力负荷所致心肌肥厚的病理生理过程, 肥厚心肌糖原合成酶激酶 3 β 表达下调, 提示糖原合成酶激酶 3 β 对心肌肥厚可能有抑制性作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Changes of Protein Kinase B/Glycogen Synthase Kinase-3 β in Myocardial Hypertrophy of Rats

ZHANG Yan, ZENG Ding-Yin

(Department of Cardiology, First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Hypertrophy; Pressure Overload; Aortic Banding; Protein Kinase B/Akt; Glycogen Synthase Kinase-3 β ; Negative Feedback

[ABSTRACT] **Aim** To study the changes of protein kinase B/Akt/ glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signal transduction pathway in hypertrophic myocardial tissue of rats induced by pressure overload. **Methods** Wistar rats, male, were divided into aortic banding group (AOB group) ($n = 19$) and sham group ($n = 20$) at random. After 4 weeks, the left ventricular hypertrophy models were built successfully, measured the hemodynamic datas and left ventricular weight index, then detected the protein expression of Akt, phosphoAkt, GSK3 β and phosphoGSK3 β in myocardial tissue by Western Blot. **Results** Compared with controls, inter ventricular septum (1.60 ± 0.10 mm vs 0.9 ± 0.10 mm), left ventricle posterior wall (1.60 ± 0.07 mm vs 1.00 ± 0.07 mm) were significantly increased ($P < 0.01$); left ventricular fractional shortening was also significantly increased ($56.9\% \pm 3.4\%$ vs $47.8\% \pm 2.1\%$, $P < 0.05$); dp/dtmax was decreased significantly ($3\,508 \pm 310$ mmHg/s vs $4\,675 \pm 322$ mmHg/s, $P < 0.05$); the expression of phosphoAkt in hypertrophic myocardial tissue was increased significantly (1.2 ± 0.3 vs 0.9 ± 0.3 , $P < 0.05$); the expression of phosphoGSK3 β was decreased significantly (0.7 ± 0.2 vs 0.9 ± 0.2 , $P < 0.05$). **Conclusions** Akt/GSK3 β signal transduction pathway took part in the pathophysiological process of myocardial hypertrophy which caused by pressure overload. Particularly, the Akt expression had a positive change in the myocardial hypertrophy, and GSK3 β had a negative change, we hypothesized that GSK3 β maybe has a inhibition function to myocardial hypertrophy.

左心室的肥厚性重构^[1]是目前研究的热点, 其主要特征是心肌细胞在形态上的扩展和蛋白合成的增加。在分子生物学领域, 长期以来人们致力于研

究正性介导心肌肥厚的信号转导途径^[2], 如 MAPK、CaMK/Calcineurin 和 Pol II 途径^[3]。对负性调节机制的研究还很不充分, 越来越多的证据表明负性调节心肌肥厚的信号途径同样应该引起重视, 蛋白激酶 B(Akt)/糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β) 途径即具有负性调节心肌肥厚的作用^[4,5]。本研究旨在通过对压力负荷过重所致心肌肥厚大鼠中 Akt/ GSK-3 β 基因表达的研究, 探讨负性调节基因在肥厚心肌中的表达, 从而对今后临床治

[收稿日期] 2005-09-26

[修回日期] 2006-06-26

[作者简介] 张妍, 博士研究生, 副主任医师, 副教授, 主要从事冠心病、高血压及心力衰竭研究, 现在大连医科大学附属第一医院心内科工作, 联系电话为 0411-83635963-2147, E-mail 为 zhangyanmed@yahoo.com.cn。通讯作者曾定尹, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病、高血压研究及介入诊断治疗, 联系电话为 024-23256666-6226, E-mail 为 zenghetao@hotmail.com。

疗方向提供一些有益的帮助。

1 材料与方法

1.1 对象及分组

雄性 Wistar 大鼠, 4 周龄, 体重 80~100 g, 随机分为主动脉结扎组和假手术组, 各 20 只。胸主动脉结扎模型按 Pagel 等^[6]方法建立。主动脉结扎组大鼠用水合氯醛(400 mg/kg)腹腔麻醉, 呼吸机辅助呼吸, 开胸, 剥离升主动脉, 钼制夹(内径 0.51 mm; Ethicon company, USA)放置于主动脉瓣上 0.5~1.0 cm 升主动脉处, 关胸, 待大鼠恢复自主呼吸后, 拔掉气管插管, 正常饮食笼装饲养。假手术组大鼠处理方法与主动脉结扎组相同, 但不放置钼制夹。4 周后心肌肥厚模型建立, 两组大鼠活动饮食未见明显异常, 纪录体重和心脏重量。

1.2 超声心动图测量

于手术后 4 周处死前行超声心动图测量, 麻醉大鼠, 用 15 MHz 探头(Acuson Sequoia, Germany)于二维短轴和长轴切面观测左心室, 测量室间隔(interventricular septum, IVS)、左心室后壁(left ventricle posterior wall, LVPW)厚度以及左心室舒张末期内径(left ventricle end-diastolic diameter, LVEDD)和收缩末期内径(left ventricle end-systolic diameter, LVESD), 计算左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LV-FS)和射血分数(ejection fraction, EF)。于右侧颈动脉用 PE50 导管向近心端缓慢插入, 通过压力转换器测定左心室收缩压(systolic blood pressure, SBP)、左心室舒张末压(left ventricle end-diastolic pressure, LVEDP)和左心室压力变化最大上升速率(maximum rate of left ventricular pressure rise, dp/dtmax)。以 10% 氯化钾 2~3 mL 股静脉注射处死各观察终点大鼠, 分离心脏, 分离左心室并立即于液氮中速冻, 储存于-80℃。围手术期的主动脉结扎组大鼠死亡 1 只。

1.3 蛋白提取和免疫印迹杂交(Western Blot)

心肌组织于冷冻的提取缓冲液(1:3wt/vol)(10 mmol/L Tris HCl, pH7.5, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 25% Glycerol, 0.5% SDS, 0.5% Nonident P-40, 0.1 mmol/L PMSF, 100 μg/L Protease inhibitor cocktail)中行均质化处理(30 s, 2 000 r/min), 离心(40℃, 10 min, 14 000 r/min), Bio-Rad 蛋白分析仪(Bio-Rad company, USA)测量上清液蛋白浓度, 液氮速冻保存于-80℃。10% SDS-PAGE 分离 10~20 μg 蛋白于硝酸纤维素膜行蛋白印迹杂交。Phosphor-

ser473-AKT 和 AKT 抗体(New England Biolabs)、GSK3β(BD Biosciences)和 Phosphor-S9-GSK3β(Acris Antibodies)抗体按文献[7]方法检测。应用二抗特异性 HRP-conjugated 抗体, 其信号用 ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)显示, AlphaEaseFC Software 处理并量化统计。为标准化不同的蛋白含量, 利用剥脱液(stripping buffer: 1.87 g glycine/L, 100 mL 10% SDS/L, pH=2)剥脱原始抗体复合物并用 GAPDH(primary antibody: Chemicon, MAB-374, 1:5 000; secondary antibody: Donkey anti-mouse, Dianova, 1:50 000)再杂交。

1.4 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均值比较采用 *t* 检验, 统计学计算采用 Excel、Sigma Plot 和 SPSS 软件。*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般情况和血液动力学特征

主动脉结扎组与假手术组比较, 心脏和左心室重量增加非常显著(*P* < 0.01); 左心室肥厚指数(心脏重量/体重)显著增加(*P* < 0.05), 接近假手术组的 2 倍。SBP 增高显著(*P* < 0.05); LVEDP 明显升高(*P* < 0.01); dp/dtmax 明显降低(*P* < 0.05)(表 1)。

表 1. 各组大鼠血流动力学测定结果的比较($\bar{x} \pm s$)

指 标	假手术组	主动脉结扎组
<i>n</i>	20	19
SBP (mmHg)	93.5 ± 3.9	112.7 ± 3.6 ^b
LVEDP (mmHg)	3.5 ± 1.84	10.3 ± 2.0 ^a
dp/dtmax (mmHg/s)	4 675 ± 322	3 508 ± 310 ^b
体重 (g)	287 ± 6	263 ± 8
心脏重量 (mg)	892 ± 20	1 318 ± 57 ^a
左心室重量 (mg)	422 ± 15	675 ± 35 ^a
心脏重量/体重	3.11 ± 0.60	5.09 ± 0.25 ^b

a 为 *P* < 0.01, b 为 *P* < 0.05, 与假手术组比较。

2.2 各组超声心动图结果比较

主动脉结扎组与假手术组比较, IVS 和 LVPW 明显增厚约 60%(*P* < 0.01); LV-FS 也明显增加(*P* < 0.05); LV-EF 虽然有所增加, 但无统计学差异; LVEDD 和 LVESD 在两组间差异无显著性(表 2)。

2.3 各组 pAkt/Akt 和 pGSK3β/GSK3β 表达的比较

以 GAPDH 作为标准化对照, 主动脉结扎组磷酸化 Akt 的比率明显升高(*P* < 0.05), 磷酸化 GSK3β

的比率明显降低 ($P < 0.05$) (表 3, 图 1)。

表 2. 各组超声心动图结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	假手术组	主动脉结扎组
<i>n</i>	20	19
IVS (mm)	1.60 \pm 0.10 ^a	0.90 \pm 0.10
LVPW (mm)	1.60 \pm 0.07 ^a	1.00 \pm 0.07
LVEDD (mm)	7.1 \pm 0.2	7.4 \pm 0.2
LVESD (mm)	3.1 \pm 0.3	3.9 \pm 0.2
LV-FS	56.9% \pm 3.4% ^b	47.8% \pm 2.1%
LV-EF	88.8% \pm 2.3%	83.2% \pm 1.7%

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较。

表 3. 各组 pAkt/Akt 和 pGSK3 β /GSK3 β 表达的比 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	pAkt/Akt	pGSK3 β /GSK3 β
假手术组	20	0.9 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2
主动脉结扎组	19	1.2 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.2 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较

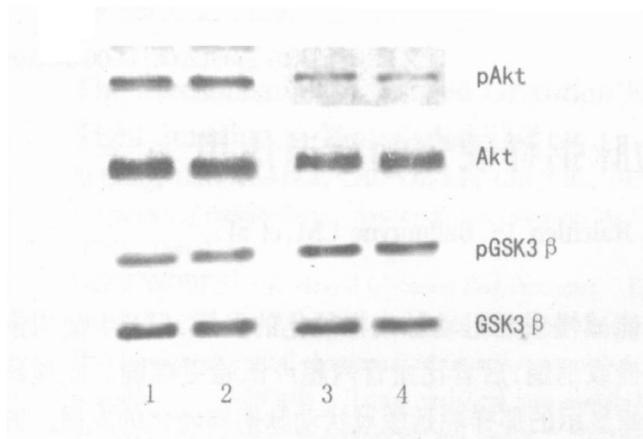


图 1. Western blotting 检测各组 pAkt/Akt 和 pGSK3 β /GSK3 β 表达的比较 1 和 2 为主动脉结扎组, 3 和 4 为假手术组。

3 讨论

长期以来心肌肥厚被认为是心肌对血流动力学变化的适应性反应, 室壁肥厚是为了恢复正常的室壁应力^[7]。但是, 许多流行病学研究显示, 肥厚的延长会导致心血管事件死亡率的增加^[8], 这一临床证据显示, 肥厚过程并非完全有利, 所以对其发生机制进行全面深入的研究势在必行。

Akt/GSK3 β 途径的分子生物学研究起源于其对肿瘤细胞的增殖作用, 此后研究领域逐渐扩展至糖原、脂质代谢、蛋白合成、细胞生存与凋亡等多个方面, 近年其对心肌肥厚的影响也渐渐引起人们重视^[9, 10]。蛋白激酶 B/Akt 是酪氨酸受体介导的细胞信号转导途径中对细胞大小及生存起决定作用的关

键酶之一^[11], 是脂质信号分子磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 介导的心脏生长反应的关键下游效应器^[12, 13]。心脏内有活性的 PI3K α (P110 α) 可以明显升高磷酸化 Akt, 从而引起心脏显著肥厚但收缩力正常^[14]。本研究结果发现, 主动脉结扎组磷酸化 Akt 明显上调 ($P < 0.05$), 两组间左心室射血分数差异无显著性, 与文献报道一致; 但左心室短轴缩短率主动脉结扎组明显升高, 仍提示心脏负荷增大后存在心肌收缩力改变, 且与磷酸化 Akt 变化相一致。另外, Akt 的活性可以通过磷酸化 Akt 的表达来衡量, 本试验磷酸化 Akt 表达增强, 也提示压力负荷介导下的心肌肥厚促进 Akt 活化。

糖原合成酶激酶 3 β 是 Akt 的下游效应器之一, 作为心肌肥厚的负调节基因, 它是唯一在未受刺激的心肌细胞中呈活化状态的丝/苏氨酸激酶, 其活性由磷酸化状态的丝氨酸 9 调节并在此位点磷酸化使 GSK3 β 失活^[15]。许多研究认为 Akt 通过磷酸化并失活 GSK3 β 促进糖原合成, 从而导致心肌肥厚^[13, 16]。Haq 等认为主动脉结扎通过在心肌细胞内磷酸化 GSK3 β 也可以抑制 GSK3 β 的活性^[17]。本试验采用主动脉结扎方法模拟压力负荷增加条件下心肌肥厚的病理过程, 检测心肌组织细胞内的磷酸化和非磷酸化 GSK3 β 蛋白表达, 结果发现, 磷酸化 GSK3 β 显著下降 ($P < 0.05$), 推测 GSK3 β 是肥厚的抑制因素, 其抗肥厚作用值得进一步研究, 这一结果也与多数国外研究报道相一致^[1]。

目前这一途径对心肌肥厚的作用争论很多, 许多研究认为 GSK3 β 是多个致心肌肥厚信号途径的关键酶^[18], 但还有研究提示, 活化 Akt 和抑制 GSK3 β 见于进展性心力衰竭患者而于心肌肥厚阶段无变化^[19], GSK3 β 的增多抑或降低是否有益是其中的焦点^[2]。本研究正是选择了这一问题进行探讨, 但还需要对两者的表达作进一步量化分析。此外, 所选大鼠均为雄性, 是否该基因表达存在性别差异也有待于进一步研究。

综上所述, 心肌肥厚的信号转导途径 Akt/GSK3 β 在压力负荷增高所致的心肌肥厚中有显著表达, 故推测该信号途径参与压力负荷增加所致心肌肥厚的病理生理过程, 蛋白激酶 B/Akt 在肥厚心肌中的表达上调提示其可能对肥厚具有促进作用, 而 GSK3 β 表达下调, 则提示其可能对肥厚有抑制作用。

[参考文献]

- [1] Tarone G, Lembo G. Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy[J]. *Trends Molecular Medicine*, 2003, 9: 376-382

- [2] Hardt SE, Sadoshima J. Negative regulators of cardiac hypertrophy[J]. *Cardiovascular Research*, 2004, **63**: 500-509
- [3] Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease[J]. *Genes Development*, 2003, **17**: 1 937-956
- [4] Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, et al. Activated glycogen synthase-3 β suppresses cardiac hypertrophy in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 907-912
- [5] Morisco C, Zebroski D, Condorelli G, Tsichlis P, Vatner SF, Sadoshima J. The Akt-glycogen synthase kinase 3 β pathway regulates transcription atrial natriuretic factor induced by β -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 14 466-475
- [6] Pagel I, Langenickel T, Hoehnel K, Philipp S, Nuessler AK, Blum WF, et al. Cardiac and renal effects of growth hormone in volume overload-induced heart failure: role of NO[J]. *Hypertension*, 2002, **39**: 57-62
- [7] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly[J]. *Ann Rev Physiol*, 2003, **65**: 45-79
- [8] Casale PN, Devereux RB, Milner M, Zullo G, Harshfield GA, Pickering TG, et al. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men[J]. *Ann Intern Med*, 1986, **105** (2): 173-178
- [9] Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, et al. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload[J]. *Nat Med*, 2003, **9**: 68-75
- [10] Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB[J]. *Biochem J*, 2000, **346**: 561-576
- [11] Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, et al. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice[J]. *PNAS*, 2002, **99**: 12 333-338
- [12] Shioi T, McMullen JR, Kang MP, Douglas PS, Obata T, Franke TF, et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice[J]. *Molecular Cell Biol*, 2002, **22** (8): 2 799-809
- [13] Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival[J]. *Cell Cycle*, 2003, **2** (3): 220-223
- [14] Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballel CM, Lawitts J, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice[J]. *EMBO J*, 2000, **19**: 2 537-548
- [15] Badorff C, Ruetten H, Mueller S, Stahmer M, Gehring D, Jung F, et al. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload[J]. *J Clin Invest*, 2002, **109**: 373-381
- [16] Sugden PH, Clerk A. Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease[J]. *Circulation Research*, 2001, **88**: 975-977
- [17] Haq S, Choukroun G, Shaw KL, Tymitz KM, Monte F del, Gwathmey J, et al. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure[J]. *Circulation*, 2001, **103**: 670-677
- [18] Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ramu H, Takashi M, Rosenzweig A, et al. Glycogen synthase kinase-3 β is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy[J]. *J Cell Biol*, 2000, **151**: 117-130
- [19] Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence[J]. *Cardiovascular Research*, 2004, **63**: 373-380