

# 泛素蛋白酶体抑制剂抑制钙调神经磷酸酶依赖的心肌细胞肥大

黄为<sup>1</sup>, 李声娜<sup>1</sup>, 黄苏<sup>2</sup>, 徐标<sup>1</sup>

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院心内科, 江苏省南京市 210008; 2. 淮安市第一人民医院心胸外科, 江苏省淮安市 223300)

[关键词] 细胞肥大; 心肌细胞; 钙调神经磷酸酶; 蛋白酶体抑制剂

[摘要] **目的** 研究泛素蛋白酶体抑制剂 MG262 对钙调神经磷酸酶信号通路的影响, 探讨其抑制心肌细胞肥大的机制。**方法** 在去甲肾上腺素诱导培养的乳鼠肥大心肌细胞中加入 MG262, 通过 Phalloidin 染色观察细胞的形态, RNA Dot Blot 检测胚胎蛋白基因表达, Western blot 检测细胞中钙调神经磷酸酶蛋白含量, 免疫荧光标记观察活化 T 细胞核因子 c4 (NFATc4) 蛋白在细胞内分布。**结果** 去甲肾上腺素使细胞面积增大近 1.1 倍, 胚胎基因心房利钠因子 (ANF)、脑钠肽 (BNP)、 $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$ -MHC) 的 mRNA 表达上调, 细胞核内 NFATc4 蛋白表达水平增加。MG262 明显抑制去甲肾上腺素诱导的细胞肥大 ( $P < 0.05$ ) 和 ANF、BNP、 $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达上调 ( $P < 0.05$ ), 细胞面积下降了 33%; 同时 MG262 使去甲肾上腺素诱导的细胞钙调神经磷酸酶蛋白表达水平下降, 抑制 NFATc4 核内转位。**结论** MG262 可能通过抑制钙调神经磷酸酶信号通路, 减轻心肌细胞肥大。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Inhibitor of Ubiquitin Proteasome System Suppress Calcineurin-Dependent Cardiomyocyte Hypertrophy

HUANG Wei<sup>1</sup>, LI Sheng-Na<sup>1</sup>, HUANG Su<sup>2</sup>, and XU Biao<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Huaian First Hospital, Huaian, Jiangsu 223300, China)

[KEY WORDS] Cell Hypertrophy; Cardiomyocyte; Calcineurin; Proteasome Inhibitors

[ABSTRACT] **Aim** To demonstrate the mechanisms of proteasome inhibition on norepinephrine (NE)-induced hypertrophic growth of neonatal rat cardiomyocytes (NRC) via studying the alteration of calcineurin (CaN) signaling pathway.

**Methods** Proteasome inhibitor MG262 was cotreated with NE in NRC. Cell size was observed by phalloidin-stained technique. The expression of fetal genes and CaN was detected by using RNA dot blot analysis and Western blot analysis respectively. The fixed cells were immunofluorescence labeled with nuclear factor of activated T cell c4 (NFATc4) and visualized by fluorescence microscopy.

**Results** Fetal genes of atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP) and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) mRNA as well as expression of CaN were upregulated and NFATc4 was predominantly expressed in nucleus on NE induced NRC. However, more than 2.1 fold NE-induced increase in cardiomyocytes was markedly suppressed by cotreatment with MG262 ( $P < 0.05$ ). NE-induced upregulation of CaN and fetal gene expression was significantly relieved by MG262 ( $P < 0.05$ ). NFATc4 was relocated from nucleus to cytoplasm.

**Conclusion** MG262 attenuates agonist induced cardiomyocyte hypertrophy, at least in part, via inhibiting CaN signaling pathway.

心肌肥厚是心血管疾病死亡率的独立预测因子。多种病理应激如高血压病和心脏瓣膜病可导致心肌肥厚。钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 信号通路在不同刺激介导的心肌肥大中起枢纽作用。

钙调神经磷酸酶转基因小鼠显示腺粒体功能受损、心肌肥厚和心力衰竭; 在醛固酮诱导的肥大心肌细胞中钙调神经磷酸酶活性及其 mRNA 表达均增高, 应用血管紧张素受体拮抗剂或钙调神经磷酸酶抑

[收稿日期] 2014-01-14

[基金项目] 南京市医学科技发展资金资助项目 (YKK10078)

[作者简介] 黄为, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病和心力衰竭的临床和基础研究, E-mail 为 huangweisd@126.com。通讯作者徐标, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心肌梗死和心力衰竭的基础和临床研究, E-mail 为 bi-ao.xu@medmail.com。李声娜, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 1346573313@qq.com。

制剂环孢素可部分阻止醛固酮诱导的心脏肥大及纤维变性,防止盐皮质激素性高血压<sup>[1,2]</sup>。泛素蛋白酶系统(ubiquitin proteasome system, UPS)是体内降解细胞内泛素化蛋白质主要途径。小鼠肥厚的心肌组织蛋白酶体活性增加,使用蛋白酶体抑制剂可逆转左心室的肥厚<sup>[3,4]</sup>。但蛋白酶体抑制剂逆转心肌肥厚的具体机制仍然不清楚。由于钙调神经磷酸酶和其信号通路下游活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)为泛素化蛋白<sup>[5,6]</sup>,因此我们设想蛋白酶体抑制剂可以调控钙调神经磷酸酶信号通路,阻断心肌细胞的肥大。本研究拟在去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)诱导的肥大心肌细胞上加入蛋白酶体抑制剂 MG262,观察其对钙调神经磷酸酶信号通路的影响,探讨 MG262 减轻心肌细胞肥大的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品和试剂

MG262 购自 Biomol 公司;NE 购自 Sigma 公司;Alexa Fluor 586 conjugated Phalloidin 和 Alexa Fluor 488 荧光标记二抗购自 Molecular Probes 公司;荧光肽底物 III (Suc-LLVY-aminomethylcoumarin, AMC) 购自 Calbiochem 公司;ECL 化学发光试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;兔抗 NFATc4 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司;Tri Reagent 购自 Molecular Research Center Inc 公司;鼠抗钙调神经磷酸酶单克隆抗体购自 BD Biosciences 公司。

### 1.2 大鼠心肌细胞培养

按照 Simpson 改良法分离培养新生大鼠心肌细胞(neonatal rat cardiomyocytes, NRC)。将出生 1 至 2 天龄 SD 大鼠心室切成 1 至 2 mm<sup>3</sup> 大小,0.25% 胰蛋白酶消化分离心肌细胞,用差速贴壁法使心肌成纤维细胞分离。将细胞混悬于含 5-溴脱氧尿嘧啶和 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。实验前用无血清培养液培养 24 h,然后加入含 10 μmol/L 去甲肾上腺素和/或 0.1 μmol/L MG262 无血清培养液再培养 24 h 或 48 h,0.1% 二甲基亚砜为溶剂控制。将 NRC 随机分成四组:细胞中加入二甲基亚砜为对照组、MG262 组、NE 组以及加入 NE 和 MG262 为 NE + MG262 组。代表性的数据来自同一组实验,细胞培养重复 3 次。

### 1.3 糜蛋白酶样蛋白酶体活性检测<sup>[7]</sup>

25 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5) 提取细胞蛋白,

BAC 法行蛋白定量。取 30 μg 细胞蛋白,加入 AMC,底物终浓度为 25 μmol/L,反应物体积达 200 μL,37℃ 孵育 90 min,加入 300 μL 乙醇终止反应,发光光谱仪(Perkin-Elmer)测定荧光强度,激发和发射波长分别为 350 nm 和 440 nm。将对照组糜蛋白酶样蛋白酶体活性设为 100%。

### 1.4 心肌细胞面积测量<sup>[7]</sup>

NRC 加入去甲肾上腺素和/或 MG262 48 h 后,4% 多聚甲醛固定细胞,Alexa Fluor 586 Conjugated Phalloidin 染色。用 SCION IMAGE 软件(Scion Corporation)计算细胞的表面积,每组检测 5 个视野,每个视野用单盲法检测 20 个细胞,取其平均值。将对照组表面积设置为一任意单位(arbitrary unit, AU)。

### 1.5 RNA Dot blot 分析<sup>[8]</sup>

细胞中加入去甲肾上腺素和 MG262 24 h 后按说明书用 Tri Reagent 提取心肌细胞中的总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 样品浓度。将 4 μg 变性 RNA 点样于尼龙膜,在真空条件下 80℃ 烤膜;用 P<sup>32</sup>-dCTP 标记寡核苷酸探针;将膜用 20 × SSC 浸湿,再加入预杂交液,68℃ 恒温水浴摇床中振荡水浴 8 h,然后倾出预杂交液,加入杂交液和标记探针 68℃ 杂交过夜,第二天洗膜,凉干后,将其置于 X 射线胶片增感屏暗盒中进行放射自显影曝光处理,Typhoon 扫描,Quantity-One 软件分析条带光密度,以 GAPDH 为内参照。核苷酸探针序列:ANF 为 5'-AAT GCG ACC AAG CTG TGT GAC ACA CCG CAA GGG CTT GGG ATC TTT TGC GAT CTG CTC GAG-3',BNP 为 5'-CAG CTT GAA CTA TGT GCC ATC TTG GAA TTT CGA AGT CTC TCC TGG ATC CGG AAG GCG CTG-3',β-MHC 为 5'-AAG GCT CCA GGT CTC AGG GCT TCA CAG GCA TCC TTA GGG TTG GGT AGC ACA AGA TCT A-3',GAPDH 为 5'-GGA ACA TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CAA TGA AG-3'。

### 1.6 Western blot 分析

NRC 加入去甲肾上腺素和/或 MG262 24 h 后,用 RIPA 提取细胞蛋白,BAC 法行蛋白定量。取 30 μg 蛋白,行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移转膜 2 h,将膜蛋白转移到 PVDF 膜置含 5% 脱脂牛奶和 3% BSA 的 PBST 封闭液 1 h,再先后加入鼠抗钙调神经磷酸酶单克隆抗体(1:250)、鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:1000)和结合辣根过氧化物酶的二抗,反复洗膜,加入 ECL 发光底物,VersaDox 成像系统显像,用 Quantity-One 软件分析条带光密度,以 GAPDH 为内参照。

## 1.7 心肌细胞的免疫标记

PBS 漂洗 NRC, 4% 甲醛 PBS 固定, 分别孵育在含 0.1 mol/L 甘氨酸 PBS 和 0.5% Triton X-100 PBS 中 1 h, 用 1% BSA-PBS 封闭 1 h, 先后加入兔抗 NFATc4 多克隆抗体 (1:50)、Alexa Fluor 488 荧光标记二抗和 Alexa Fluor 586 Conjugated Phalloidin, PBS 漂洗, 封片, 荧光显微镜下观察。免疫荧光结果判读依据为未发生核转位的细胞 NFATc4 荧光标记主要分布于胞质区, 核区很少, 发生核转位的细胞 NFATc4 荧光标记浓集于核区, 胞质区减少。连续计数 150 个细胞, 计算发生核转位的细胞百分数。

## 1.8 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 One-way ANOVA, 两两比较采用  $q$  检验。  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 MG262 对糜蛋白酶样蛋白酶体活性的影响

糜蛋白酶样蛋白酶体活性在对照组、NE 组、NE + MG262 组和 MG262 组分别为  $(100.0 \pm 5.1)\%$ 、 $(104.9 \pm 4.5)\%$ 、 $(39.9 \pm 2.8)\%$  和  $(38.0 \pm 2.6)\%$ 。与对照组相比, NE + MG262 组和 MG262 组糜蛋白酶样蛋白酶体活性分别下降了约 60% 和 62% ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 MG262 对心肌细胞形态的影响

细胞表面积在对照组、NE 组、NE + MG262 组和 MG262 组分别为  $(1.0 \pm 0.21)$  AU、 $(2.09 \pm 0.36)$  AU、

$(1.41 \pm 0.24)$  AU 和  $(1.23 \pm 0.27)$  AU。与对照组比较, NE 组细胞表面积增加了 1.1 倍, 而 NE + MG262 组细胞表面积较 NE 组相比下降了约 33% ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

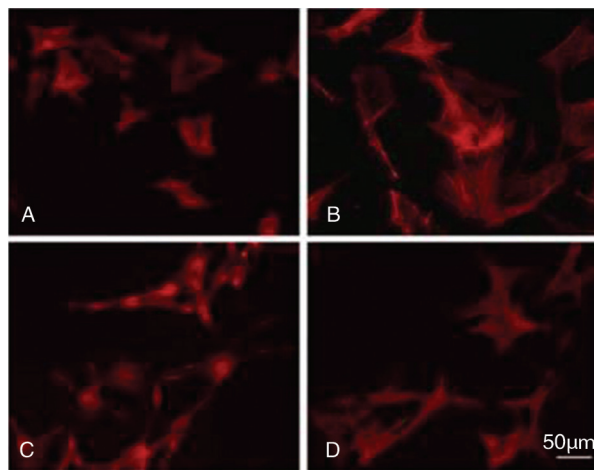


图 1. MG262 对乳鼠心肌细胞表面积的影响 A 为对照组, B 为 NE 组, C 为 MG262 组, D 为 NE + MG262 组。

Figure 1. Morphometric analysis of neonatal rat cardiomyocytes treated with MG262

### 2.3 MG262 对胚胎基因表达的影响

与对照组和 MG262 组相比较, NE 组 ANF、BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), 而 NE + MG262 组 ANF、BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达较 NE 组显著下降 ( $P < 0.05$ ), 但 BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达仍比对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

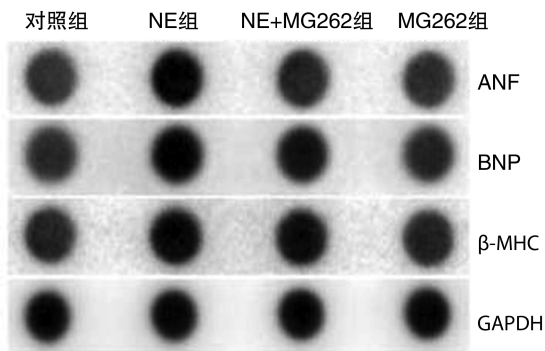
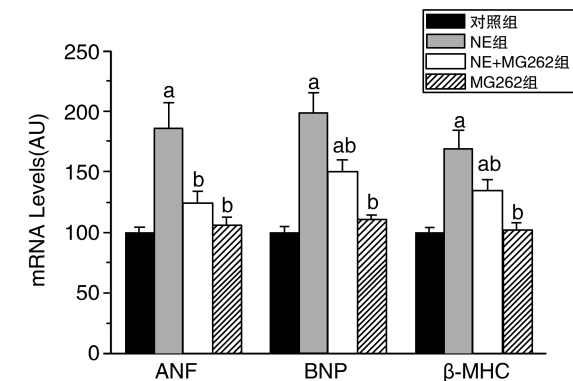


图 2. MG262 对心肌细胞胚胎基因表达的影响 a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 NE 组比较。

Figure 2. Effect of MG262 on expression of fetal genes in neonatal rat cardiomyocytes

### 2.4 MG262 对钙调神经磷酸酶信号通路的影响

去甲肾上腺素使细胞钙调神经磷酸酶蛋白表达水平增加, 而同时加入 MG262 后钙调神经磷酸酶蛋白表达水平明显下降, 但仍较对照组和 MG262 组



升高 ( $P < 0.05$ ); 对照组、NE 组和 NE + MG262 组的 NFATc4 在胞核比例分别为 7.6%、45.4% 和 28.3%。对照组 NFATc4 主要分布在胞浆和核周, 而 NE 组和 NE + MG262 组 NFATc4 主要分布在胞



浆和细胞核,但 NE + MG262 组 NFATc4 核内分布明显较 NE 组减少( $P < 0.05$ ;图 3)。

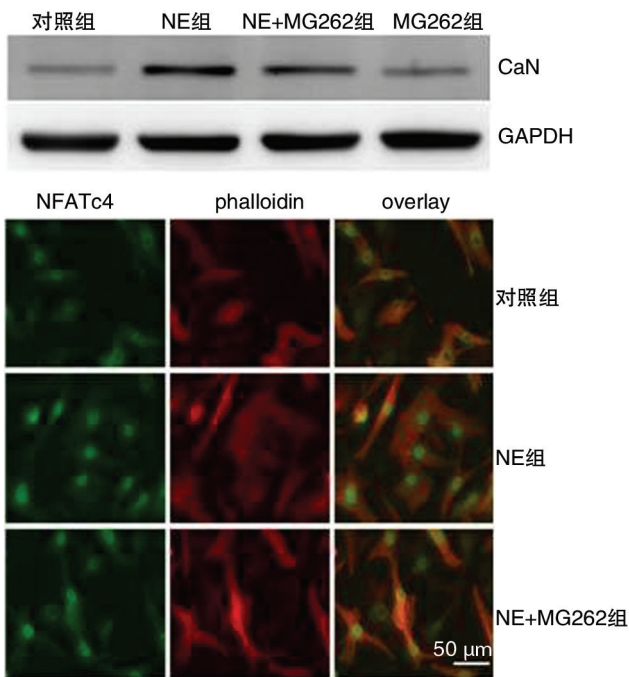


图 3. MG262 对心肌细胞的钙调神经磷酸酶信号通路的影响 上图为 CaN 蛋白表达,下图为 NFATc4 免疫标记。

Figure 3. Effect of MG262 on CaN signaling pathway in neonatal rat cardiomyocytes

### 3 讨论

心肌肥厚是心脏为适应各种刺激而产生的心肌细胞体积增大,重量增加。心肌肥厚与信号转导通路、转录因子、兴奋收缩耦合、收缩蛋白和能量代谢等因素有关,而蛋白质周转即蛋白质的合成和降解是关键因素之一。UPS 是蛋白质降解的主要途径,与心肌肥厚密切相关<sup>[9,10]</sup>。UPS 的 20S 核心颗粒中含有 3 个活性位点  $\beta 1$ 、 $\beta 2$  和  $\beta 5$ ,对应负责肽基谷氨酰肽水解酶样、胰蛋白酶样和糜蛋白酶样的蛋白酶体活性,对维持细胞周期、增殖、生存等细胞生物学行为的正常具有极其重要的作用。在主动脉缩窄所致压力负荷型和自发性高血压大鼠肥厚的心肌组织中可见蛋白酶体亚基表达增加和蛋白酶活性增高,应用蛋白酶体抑制剂能够部分或完全逆转心肌肥厚<sup>[11]</sup>。考虑到 MG262 对心肌细胞的毒性作用,本研究选择不同浓度 MG262 做预实验,发现 0.1  $\mu\text{mol/L}$  MG262 就足以使心肌细胞糜蛋白酶样蛋白酶体活性下降约 60%,明显抑制去甲肾上腺素刺激引起的心肌细胞表面积增大和胚胎基因 ANF、

BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达上调,而对心肌细胞的活性没有显著影响(部分资料未列出)。

钙调神经磷酸酶是目前所知的唯一依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素的磷蛋白磷酸酶,心肌细胞内钙离子浓度增高,激活钙调神经磷酸酶,使 NFAT 去磷酸化。去磷酸化的 NFAT 通过暴露其上的核定位信号,转位入细胞核,再与心肌细胞核内的转录因子相互作用,启动心肌细胞肥大基因表达,导致心肌细胞蛋白核酸合成增加,心肌细胞体积增大,形成心肌肥大<sup>[12,13]</sup>。已有研究显示 UPS 对钙调神经磷酸酶信号通路起着重要的调控作用<sup>[14]</sup>。E3 泛素连接酶 Atrogin-1 可通过泛素化降解钙调神经磷酸酶,抑制其活性,而用 RNA 干扰技术下调 Atrogin-1 的表达水平,可增加外界刺激引起的钙调神经磷酸酶水平并促进心肌肥大,且 Atrogin-1 能提高 Forkhead 转录因子 Foxo1 和 Foxo3a 的活性,抑制由苏氨酸激酶导致的心肌肥大<sup>[5]</sup>。体内实验表明行主动脉缩窄术的 Atrogin-1 转基因小鼠,心肌组织钙调神经磷酸酶蛋白表达水平下降,心肌肥厚被抑制<sup>[15]</sup>。同样对于钙调神经磷酸酶的下游因子 NFAT,研究表明糖原合成酶 3 $\beta$  可增强 NFATc4 与赖氨酸 48 连接形成的多聚泛素链而泛素化,从而降低 NFATc4 蛋白的表达和转录活性,抑制心肌特异性基因表达<sup>[6]</sup>,而巨噬细胞集落刺激因子通过 Src 激酶依赖的方式诱导 NFATc1 蛋白的泛素化途径降解来调节破骨细胞的分化和功能<sup>[16]</sup>。本研究结果显示去甲肾上腺素使心肌细胞蛋白提取物中钙调神经磷酸酶蛋白表达和 NFATc4 细胞核内转移增加,而加入 MG262 则明显抑制去甲肾上腺素诱导的细胞钙调神经磷酸酶蛋白表达水平和 NFATc4 核内转位,提示 MG262 通过调控 CaN-NFATc4 信号通路,部分阻断心肌细胞肥大。

本实验证实了 MG262 能改善激动剂诱导的心肌细胞肥厚,为心肌肥厚的治疗提供了一种新的思路和方法。由于 UPS 调节体内许多心肌肥大的信号转导通路,因此 MG262 抑制心肌细胞肥大,可能是作用于不同心肌肥大的信号通路结果,但至少本研究初步阐明了蛋白酶体抑制剂阻断心肌细胞的肥大是通过调控 CaN-NFATc4 信号通路来实现。

#### [参考文献]

- [1] Berry JM, Le V, Rotter D, et al. Reversibility of adverse, calcineurin-dependent cardiac remodeling [J]. Circ Res, 2011, 109(4): 407-417.
- [2] 熊龙根,黎德恩,董 颀. 球囊扩张术后大鼠腹主动脉

- 钙调神经磷酸酶、血浆 MCP-1 的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 231-234.
- [3] Pagan J, Seto T, Pagano M, et al. Role of the ubiquitin proteasome system in the heart[J]. *Circ Res*, 2013, 112(7): 1 046-058.
- [4] 陈章荣, 吴新华, 罗开良, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 改善大鼠心肌梗死后心肌肥厚[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(11): 1 326-331.
- [5] Li HH, Kedar V, Zhang C, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(8): 1 058-071.
- [6] Fan Y, Xie P, Zhang T, et al. Regulation of the stability and transcriptional activity of NFATc4 by ubiquitination [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(29): 4 008-014.
- [7] Kumarapeli AR, Su H, Huang W, et al. Alpha B-crystallin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2008, 103(12): 1 473-482.
- [8] Li J, Horak KM, Su H, et al. Enhancement of proteasomal function protects against cardiac proteinopathy and ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3 689-700.
- [9] Ma Y, Chen Y, Yang Y, et al. Proteasome inhibition attenuates heart failure during the late stages of pressure overload through alterations in collagen expression[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(2): 223-233.
- [10] Day SM. The ubiquitin proteasome system in human cardiomyopathies and heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(10): H1 283-293.
- [11] Depre C, Wang Q, Yan L, et al. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy[J]. *Circulation*, 2006, 114(17): 1 821-828.
- [12] Wang Y, Tandan S, Hill JA. Calcineurin-dependent ion channel regulation in heart[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(1): 14-22.
- [13] 吕昕瞳, 杨丹莉, 邓江, 等. 人参总皂苷对血管紧张素 II 所致乳大鼠心肌细胞肥大的抑制作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(4): 641-645.
- [14] Portbury AL, Ronnebaum SM, Zungu M, et al. Back to your heart: ubiquitin proteasome system-regulated signal transduction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3): 526-573.
- [15] Li HH, Willis MS, Lockyer P, et al. Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3 211-223.
- [16] Kim JH, Kim K, Jin HM, et al. Negative feedback control of osteoclast formation through ubiquitin-mediated down-regulation of NFATc1 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5 224-231.

(此文编辑 许雪梅)