

PI3K 阻断剂 LY294002 对 TNF- α 诱导心肌肥大的 Ca^{2+} -CaMK II 和 CaN 通路的影响

王桂君¹, 姚玉胜², 王洪新³

(1. 辽宁医学院附属第一医院; 2. 辽宁医学院附属第三医院; 3. 辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 心肌肥大; 肿瘤坏死因子- α ; Ca^{2+} ; PI3K; LY294002; CaMK II; CaN

[摘要] 目的 研究 PI3K 是否通过 Ca^{2+} -CaMK II 和 CaN 信号途径参与肿瘤坏死因子- α 诱导的心肌肥大。方法 应用激光共聚焦显微镜检测单个心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度变化。Lowry 法测心肌细胞蛋白含量。计算机图象分析测心肌细胞体积。应用 Western blot 法测定心肌细胞 CaMK II δB 和 CaN 蛋白表达。结果 ①PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 明显抑制 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 诱导的心肌细胞内钙离子浓度增高 ($P < 0.01$), 对正常心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度无明显影响。其抑制程度与 LY294002 + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 组相近 ($P > 0.05$), 小于 LY294002 + ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 ($P < 0.05$)。②LY294002 明显抑制 TNF- α 诱导的心肌细胞蛋白含量的增加及细胞体积的增大; 其程度与 LY294002 + 2-APB 无统计学差异, 但大于单用 2-APB 组, 小于 LY294002 + ryanodine 组 ($P < 0.05$)。PI3K 阻断剂 LY294002 明显抑制 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 和 CaN 表达增加 ($P < 0.01$), 其抑制程度与 LY294002 + 2-APB 组相近 ($P > 0.05$)。结论 PI3K 通过作用 IP3R 使心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 进而调节心肌细胞内 CaMK II δB 和 CaN 的表达, 从而参与 TNF- α 诱导的心肌肥大。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

The Role of LY294002 on Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Tumor Necrosis Factor- α Through Ca^{2+} -CaMK II and Calcineurin Pathways in Rats

WANG Gui-Jun¹, Yao Yu-Sheng², and WANG Hong-Xin³

(1. The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College; 2. The Third Affiliated Hospital, Liaoning Medical College; 3. Department of Pharmacology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocyte Hypertrophy; Tumor Necrosis Factor α ; Calcium; Phosphatidylinositol 3-kinase; LY294002; Calmodulin Dependent Kinase II; Calcineurin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of calcium-calmodulin dependent kinase II and calcineurin in tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced cardiomyocyte hypertrophy through Phosphatidylinositol 3-kinase pathways. **Methods** Intracellular free Ca^{2+} concentration was measured by laser confocal microscopy. The protein content was assayed with Lowry's method. The cardiomyocytes volumes were measured by computer photograph analysis system. The expression of CaMK II δB and CaN was determined by western blot. **Results** ①LY294002, a selective PI3K inhibitor, significantly suppress the elevation of intracellular free Ca^{2+} concentration induced by TNF- α in cultured ventricular myocytes from the neonatal rat. The effect was similar to that of LY294002 + 2-APB ($P > 0.05$), but lower than LY294002 + ryanodine ($P < 0.05$). ②LY294002 significantly reduced the enhancements in protein content and cell size induced by TNF- α . The effect was similar to that of 2-APB + LY294002, but higher than 2-APB and lower than ryanodine + LY294002. LY294002, a PI3K inhibitor, suppressed the expression of CaMK II δB and CaN induced by TNF- α in myocytes; which was similar to that of LY294002 + 2-APB. **Conclusion** TNF- α induced cardiac hypertrophy through activating PI3-kinase pathway in cultured ventricular myocytes from the neonatal rat, which was mediated partly by IP3R to mediate expression of

[收稿日期] 2015-04-16

[修回日期] 2015-06-24

[基金项目] 辽宁省科技厅计划项目资助(2013225305); 辽宁医学院校长基金资助(xzjj20130232)

[作者简介] 王桂君, 副主任医师, 博士, 硕士研究生导师, 从事重症肝病临床及心血管方面研究, E-mail 为 wgj-april@163.com。通讯作者姚玉胜, 博士, 教授, 主要从事组织工程研究, E-mail 为 yaoyusheng700714@sina.com。王洪新, 博士, 教授, 主要从事心血管药理学及天然药物研究, E-mail 为 jyhwxwang@163.com。

CaMKII and calcineurin through increasing the intercellular Ca^{2+} .

心肌肥大是心血管系统疾病的一种常见并发症。国内外对其研究非常重视,主要提出与心肌细胞内的基因转导异常有关。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一具有多种生物学效应的炎症性细胞因子,可由心肌细胞产生。研究证明 TNF- α 诱导心肌肥大性反应^[1]。胞内 Ca^{2+} 信号的改变是肥厚反应的首要刺激,在心脏肥厚和基因表达中发挥中心作用,通过激活下游的酶来发挥第二信使的功能^[2]。目前认为有两种钙介导的信号转导机制参与了心肌肥厚的发生与发展:一是钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 介导途径^[3];二是钙调素依赖性蛋白激酶 II (calmodulin dependent kinase II, CaMK II) 信号转导途径^[4]。我们之前的研究^[5]已经证实 TNF- α 通过作用 IP3R 和 RyR 而非打开 L 型 Ca^{2+} 通道引起胞内钙离子浓度增加,进而增加 CaMK II δB 和 CaN 表达,从而诱导心肌肥大。

资料表明 PI3K 是一种重要的细胞内信号转导分子,在调节心肌细胞生长、心肌细胞肥大及心力衰竭中起着重要作用^[6]。PI3Ks 是一族进化保守的蛋白激酶,是蛋白合成和细胞生长的一个重要的正性调节因子。心脏特异性表达 ca PI3K (constitutively active p110 α PI3K) 的转基因小鼠心脏会明显增大,而特异性表达 dn PI3K (dominant-negative p110 α PI3K) 的转基因小鼠心脏则明显缩小^[7]。有报道^[8]: PI3K-Akt/PKB 途径的激活在 TNF- α 诱导的心肌细胞蛋白合成增加中起到重要作用。我们的研究已经证实 TNF- α 诱导心肌肥大中激活的 PI3K 参与了 $[Ca^{2+}]_i$ 的调节。既然 TNF- α 通过增加 $[Ca^{2+}]_i$ 进而增加 CaMKII δB 和 CaN 表达,从而诱导心肌肥大。我们将进一步探讨 PI3K 是否通过 Ca^{2+} /CaMK/CaN 信号通路参与 TNF- α 诱导的心肌肥大。

1 材料与方法

1.1 动物

出生 1~3 d 的 SD 大鼠,雌雄兼用,由辽宁医学院实验动物中心提供。动物合格证号: scxK (辽) 2003-0007。

1.2 药品和试剂

低糖 DMEM: Gibco 公司;胰蛋白酶: Gibco 公司; 5-溴脱氧脲: Sigma 公司; VB12: Sigma 公司; 转铁蛋白: Sigma 公司; 胎牛血清: 杭州四季青生物材料有限

公司; ^[3H] 亮氨酸: 上海原子核研究所产品; TNF- α : R&D 公司; SDS: Sigma 公司; HEPES: 美国 Amersham LIFE SCIENCE); EGTA: Sigma 公司; TritonX-100: 中国医药集团上海化学试剂公司; 牛血清白蛋白: Sigma 公司; 2-氨基乙基二苯硼酸盐; 2-APB, Sigma 公司; ryanodine: 德国 merck; Fluo-3/AM: Sigma 公司; LY294002: Biosource 公司; CaMKII δB 一抗: Santa Cruz Biotchnology; calcineurin 一抗: Sigma 公司。

1.3 体外乳鼠心肌细胞原代培养

取出生 1~3d 的 SD 大鼠,无菌条件下开胸取出心脏。Hanks 液冲洗 3 次后剪成约 1mm³ 大小碎块。加入 0.08% 胰蛋白酶消化细胞。取消化完毕细胞,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 10 mL 重悬细胞,200 目滤网过滤细胞悬液,转移至培养瓶中,5% CO₂ 37°C 培养 1 h,除去贴壁的非心肌细胞。将细胞调至 1×10^9 /L (含 84% DMEM 培养基,15% 胎牛血清及 1% 双抗液,即 10^5 单位/L 青霉素,100 mg/L 链霉素),接种于 24 孔培养板,送入 5% CO₂ 二氧化碳孵箱中培养。最初 72 h 用 0.1 mmol/L Brdu (5-溴脱氧脲苷) 抑制非心肌细胞生长,进一步纯化心肌细胞。一般培养 2~3 天,换无血清 DMEM 培养基 (内含 5 mg/L 胰岛素,5 μ mol/L 维生素 B12,10 mg/L 转铁蛋白) 培养 24 h,进行以下实验。

1.4 分组及给药

心肌细胞培养分为 8 组:第 1 组为对照组;第 2 组为 TNF- α (100 μ g/L);第 3 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 4 组为 IP3R 阻断剂 2-APB (30 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 5 组为 RyR 阻断剂 ryanodine (50 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 6 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 μ mol/L) + IP3R 阻断剂 2-APB (30 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 7 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 μ mol/L) + RyR 阻断剂 ryanodine (50 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 8 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 μ mol/L) + IP3R 阻断剂 2-APB (30 μ mol/L) + RyR 阻断剂 ryanodine (50 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组。各阻断剂均在 TNF- α 加入前 30 min 加入。给药 72 h 后进行肥大指标包括心肌细胞蛋白含量和细胞体积的测定。

测定心肌细胞 CaMK II δB /CaN 蛋白表达:分为 4 组:第 1 组为对照组;第 2 组为 TNF- α (100 μ g/L);第 3 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 μ mol/L) + TNF- α (100 μ g/L) 组;第 4 组为 PI3K 阻断剂

LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + IP3R 阻断剂 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) + TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组。给药 48/72 h 后测定心肌细胞 CaMK II δB /CaN 蛋白表达。

共聚焦显微镜检测单个心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度: 共设 5 组, 第 1 组为对照组, 第 2 组为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组, 第 3 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$), 第 4 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + IP3R 阻断剂 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) + TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$); 第 5 组为 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + RyR 阻断剂 ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) + TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组。上述阻断剂预孵育 30 min 后上机测定。先记录一段基础值后, 再加入 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$), 观察记录 TNF- α 刺激前后心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的变化。

1.5 应用 Fluo-3/AM 荧光标记技术及共聚焦显微镜检测单个心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度^[9]

将消化好的心肌细胞按照 $1 \times 10^4/\text{L}$ 的密度接种于直径 35 mm 薄底平皿中, 含 10% 血清的 DMEM 培养液孵育 24 h, 待贴壁后换无血清 DMEM 培养液培养 24 h。弃培养液, 用 D-Hank's 液洗涤 3 次, 加入 Fluo-3/AM 使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温孵 30 min, 然后吸出染液, 再用 D-Hank's 液洗涤 3 次, 洗去细胞外液中残余的 Fluo-3/AM。每孔加入 Hank's 液 1 mL, 采用共聚焦显微镜测定单个心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度 (发射波长 526 nm, 激发波长 488 nm)。分组同测钙瞬变组。上述阻断剂预孵育 30 min 后上机测定。先记录一段基础值, 观察各阻断剂对正常心肌细胞内钙荧光强度 (FI) 有无影响; 再加入 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$), 动态观察 TNF- α 刺激后心肌细胞内钙荧光强度的变化。采用 LSM510 软件对数据、图形进行实时动态测量与分析, 根据给药前后单个细胞的 FI 值计算出细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。实验结果用 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高值表示, 每组设 2 个平皿, 并用不同次细胞重复 3 次。依据 Grynkiewicz's 公式, 计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 即: 胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i = kd \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高值 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) = 给药后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - 给药前 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。Kd: 为 Fluo-3 与 Ca^{2+} 结合的平衡解离常数, 室温为 320 nmol/L。F: 实际测得的 FI 值; F_{max} : 细胞内 Fluo-3 被 Ca^{2+} 完全饱和时的 FI 值, 为在胞外液有钙时加入 TritonX-100 (0.1%) 后测得; F_{min} : 细胞内 Fluo-3 完全游离 (胞内无 Ca^{2+}) 时的 FI 值, 通过加入 EGTA (10 $\mu\text{mol/L}$) 后测得。

1.6 培养心肌细胞蛋白质含量的测定

吸去培养板各孔中的培养液, 用 D-Hanks 液快

速冲洗 3 次后, 加入 1% SDS 0.5 mL 溶解细胞, Lowry 法测每孔细胞蛋白质含量。

1.7 培养心肌细胞体积的测定

收集消化下的细胞注入一细胞室内, 在放大 400 倍的倒置显微镜下观察细胞, 几乎均呈球形, 用计算机 CIAS 大恒细胞图象分析系统测量单个细胞的直径, 进而计算出细胞体积。每孔随机选择 4 个视野, 每个视野测 20 个细胞。

1.8 Western blot 法测定心肌细胞内 CaMK II δB 及 CaN 蛋白表达

细胞加药作用 48h/72 h 后, 用细胞刮刀刮下细胞, 用 PBS 冲洗下来, 90 $\times\text{g}$ 离心 15 min, 弃上清, 把细胞沉淀置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。测定指标时, 取出样品放入 RIPA 缓冲液, 并加入 1% PMSF, 超声裂解 4 $^{\circ}\text{C}$, 13000 $\times\text{g}$ 离心 25 min, 提取上清液。BCA 法进行蛋白浓度测定。分取 50 μg 加等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液并煮沸, 然后各取 10 μL 样品以及蛋白质标准品点样。Tris-SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 3~5 h, 转膜 8~12 h; 封闭, 洗膜, 然后以稀释后的羊抗大鼠 CaMK II δB 抗体/CaN 抗体 (1:1000) 室温反应 2h, 再与二抗 (1:1500) 各反应 1 h, Supel' Signal West Pico 试剂盒中反应 5min。显影条带经 1200Pro 型图像扫描仪扫描, CAMIAS008 图像分析系统处理。根据积分吸光度值对比分析条带的强弱。以 β -肌动蛋白为内参照, 显影条带经 1200Pro 型图像扫描仪扫描, CAMIAS008 图像分析系统进行半定量分析, 即以 CaMK II δB 或 CaN/ β -肌动蛋白的吸光度比值表示 CaMK II δB 或 CaN 的相对表达水平。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因设计的方差分析进行统计学检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞内钙离子浓度变化的影响

在基础状态下, 各组心肌细胞荧光强度变化无明显差异 ($P > 0.05$)。同一细胞 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激后, 细胞荧光强度变化明显增强 ($P < 0.01$)。LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组心肌细胞内钙离子荧光强度较单纯 TNF- α 组减弱 ($P < 0.01$)。IP3R 阻断剂 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 与 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 联合预处理组荧光强度与单纯 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组荧光强度接近

($P > 0.05$)。RyR 阻断剂 ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 与 PI3K 阻断剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 联合预处理组荧光强度较单纯 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组更弱 ($P < 0.05$)。上述结果说明 PI3K 可能通过作用 IP3R 而不是 RYR 促进 TNF- α 诱导心肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的(图 1-图 3)。

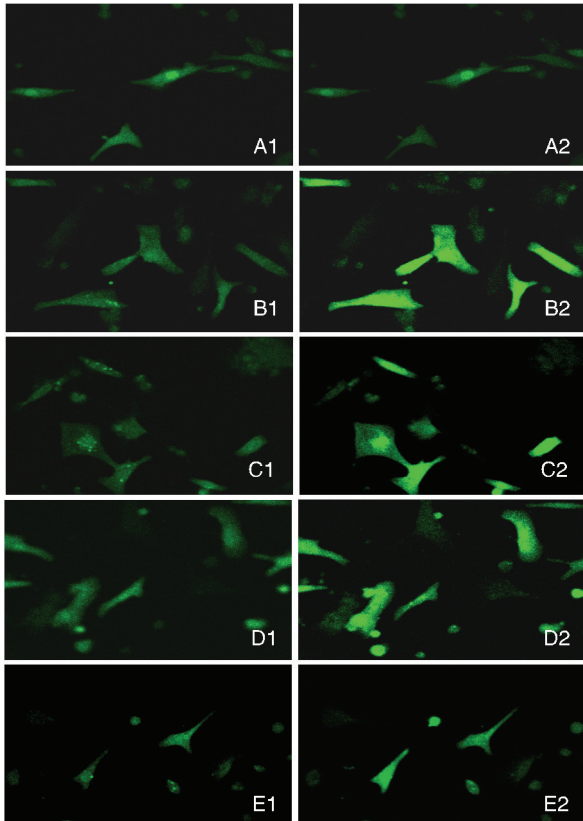


图 1. PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞内游离钙离子荧光强度变化的影响 A 为对照组, B 为 TNF- α 组, C 为 LY294002 + TNF- α 组, D 为 LY294002 + 2-APB + TNF- α 组, E 为 LY294002 + ryanodine + TNF- α 组; B₁ ~ E₁ 为 TNF- α 刺激前, B₂ ~ E₂ 为 TNF- α 刺激后。

Figure 1. Effects of PI3K on the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluorescence intensity in the cultured ventricular myocyte from the neonatal rat treated with TNF- α

2.2 LY294002、2-APB 和 ryanodine 对 TNF- α 诱导的心肌蛋白含量增加的影响

与对照组 (28.9 ± 2.1) 相比, TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组 (44.2 ± 1.6) 的心肌细胞蛋白含量增加了 52.94% ($P < 0.05$)。与 TNF- α 组相比, TNF- α + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 (34.01 ± 2.43)、TNF- α + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 组 (36.88 ± 1.34)、TNF- α + ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 (37.36 ± 1.23)、TNF- α + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 组 (33.86 ± 1.79)、TNF- α +

LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + Ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 (29.6 ± 2.3)、TNF- α + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) + ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 组 (29.34 ± 1.7) 的心肌细胞蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$), 分别降低了 35.26%、25.33%、23.67%、35.78%、50.5% 和 51.42%, 说明 TNF- α 通过作用 IP3R、RyR 及 PI3K 诱导心肌细胞蛋白含量增加。LY294002 对 TNF- α 诱导的心肌细胞蛋白含量增加的抑制程度 LY294002 + 2-APB 组接近 ($P > 0.05$), 但明显大于 2-APB 组 ($P < 0.05$); 提示 PI3K 通过作用 IP3R 参与 TNF- α 诱导心肌细胞蛋白含量增加, 但除此可能尚存在其他途径。LY294002 + ryanodine 组明显抑制 TNF- α 诱导心肌细胞蛋白含量的增加, 其抑制程度明显大于单用 LY294002 组 ($P < 0.05$), 说明 PI3K 不是通过作用 RyR 参与 TNF- α 诱导心肌细胞蛋白含量增加的(图 4)。

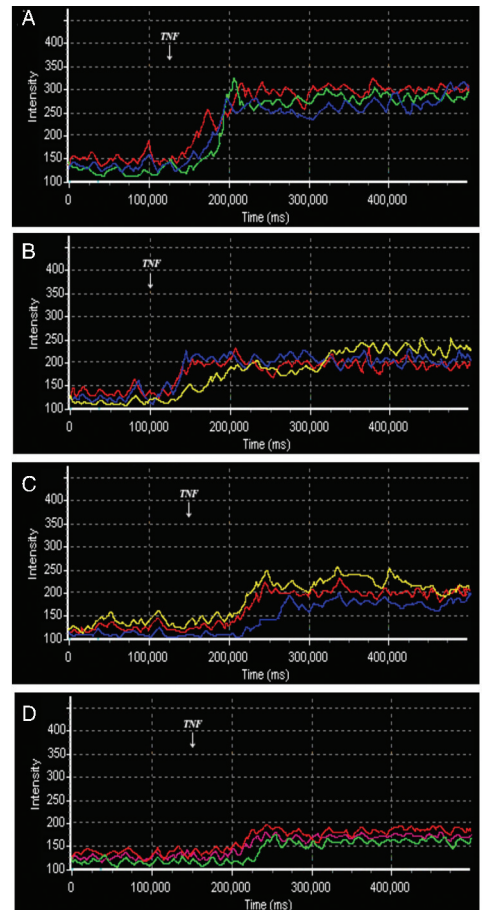


图 2. PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞内游离钙离子荧光强度变化的影响 A 为 TNF- α 组, B 为 LY294002 + TNF- α 组, C 为 LY294002 + 2-APB + TNF- α 组, D 为 LY294002 + ryanodine + TNF- α 组。

Figure 2. Effects of PI3K on the spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluorescence intensity in the cultured ventricular myocyte from the neonatal rat treated with TNF- α

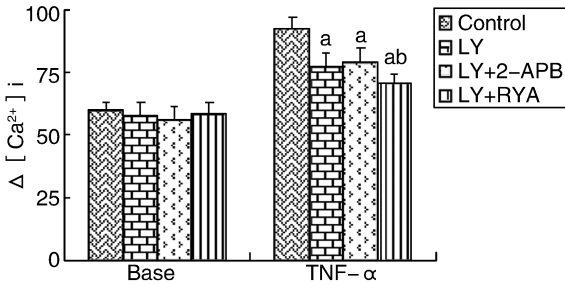


图 3. PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞内游离钙离子浓度变化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$) LY 为 LY294002, RYA 为 ryanodine。a 为 $P < 0.01$, 与 TNF- α 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 LY294002 组比较。

Figure 3. Effects of PI3K on the spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transient in the cultured ventricular myocyte from the neonatal rat treated with TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

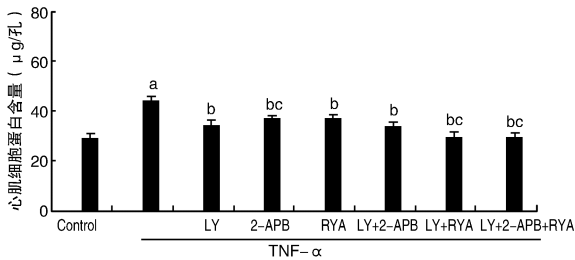


图 4. LY294002、2-APB 和 ryanodine 对 TNF- α 诱导的心肌细胞蛋白含量增加的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$) LY 为 LY294002, RYA 为 ryanodine。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α + LY 组比较。

Figure 4. Effects of LY294002, 2-APB and ryanodine on protein content of cultured ventricular myocytes from neonatal rats treated with TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

2.3 LY294002、2-APB 和 ryanodine 对 TNF- α 诱导的心肌细胞体积增大的影响

与对照组 (1147 ± 123) 相比, TNF- α ($100 \mu\text{g/L}$) 组 (1686 ± 151) 的心肌细胞体积增大了 46.99% ($P < 0.05$)。与 TNF- α 组相比, TNF- α + LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) 组 (1372 ± 108)、TNF- α + 2-APB ($30 \mu\text{mol/L}$) 组 (1567 ± 136)、TNF- α + ryanodine ($50 \mu\text{mol/L}$) 组 (1558 ± 122)、TNF- α + LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) + 2-APB ($30 \mu\text{mol/L}$) 组 (1354 ± 143)、TNF- α + LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) + ryanodine ($50 \mu\text{mol/L}$) 组 (1235 ± 117)、TNF- α + LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) + 2-APB ($30 \mu\text{mol/L}$) + ryanodine ($50 \mu\text{mol/L}$) 组 (1207 ± 148) 的心肌细胞体积明显减小 ($P < 0.01$), 分别减小了 27.38%、10.38%、11.16%、28.95%、39.32% 和 41.76%, 说明 TNF- α 通过作用 IP3R、RyR 及 PI3K 诱导心肌细胞体积增大。LY294002 对 TNF- α 诱导的心肌细胞体积增大的抑制程度与

LY294002 + 2-APB 组接近 ($P > 0.05$), 但明显大于 2-APB 组 ($P < 0.05$); 提示 PI3K 通过作用 IP3R 参与 TNF- α 诱导心肌细胞体积增大, 但除此可能尚存在其他途径。LY294002 + ryanodine 组及 LY294002 + 2-APB + ryanodine 组明显抑制 TNF- α 诱导心肌细胞体积增大, 两组间无差别 ($P > 0.05$), 但二者抑制程度明显大于单用 LY294002 组 ($P < 0.05$), 说明 PI3K 不是通过作用 RyR 参与 TNF- α 诱导心肌细胞体积增大的 (图 5)。

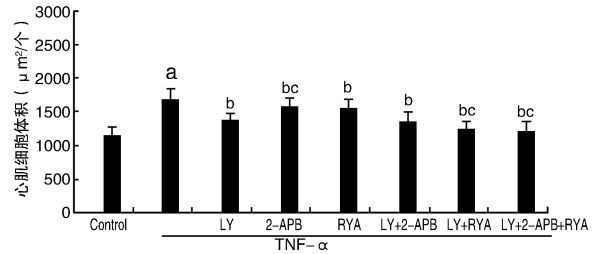


图 5. LY294002、2-APB 和 ryanodine 对 TNF- α 诱导的心肌细胞体积增加的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 80$) LY 为 LY294002, RYA 为 ryanodine。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α + LY 组比较。

Figure 5. Effects of LY294002, 2-APB and ryanodine on cell size of cultured ventricular myocytes from neonatal rats treated with TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n = 80$)

2.4 PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaN 表达的影响

与对照组 (0.69 ± 0.08) 相比, TNF- α ($100 \mu\text{g/L}$) 组 (0.90 ± 0.08) 的 CaN 表达明显增加 ($P < 0.01$), 增加了 30.43%。LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) 组 (0.74 ± 0.06) 明显抑制了 TNF- α 诱导的心肌 CaN 表达增加 ($P < 0.05$), 降低了 23.18%, 说明 PI3K 激活参与调节 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaN 表达增加。其抑制作用与 LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) + 2-APB ($30 \mu\text{mol/L}$) 组 (0.72 ± 0.09) 无明显差异 ($P > 0.05$), 说明 PI3K 通过作用 IP3R 参与调节 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaN 表达增加 (图 6)。

2.5 PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 表达的影响

与对照组 (0.72 ± 0.04) 相比, TNF- α ($100 \mu\text{g/L}$) 组 (0.87 ± 0.07) 的 CaMK II δB 表达明显增加 ($P < 0.01$), 增加了 20.83%。PI3K 阻断剂 LY294002 ($50 \mu\text{mol/L}$) 明显抑制 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 表达增加 (0.75 ± 0.05), 降低了 16.66% ($P < 0.05$); 提示 PI3K 激活参与调节 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 表达增加。

LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组与 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 合用组 (0.76 ± 0.06) 相比无显著差异 ($P > 0.05$), 说明 PI3K 通过作用 IP3R 参与调节 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 表达增加 (图 7)。

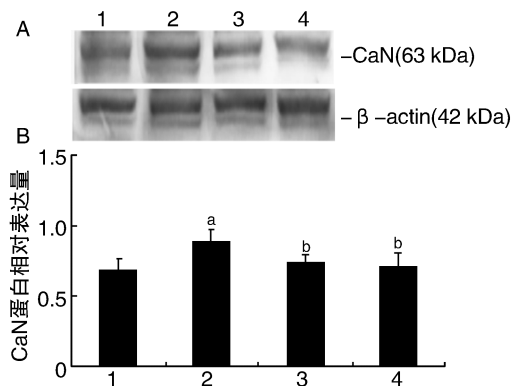


图 6. PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaN 表达的影响

A 为 Western Blot 图; B 为蛋白相对表达量分析。1 为对照组, 2 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组, 3 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组, 4 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Figure 6. The effects of PI3K on CaN expression in the cultured neonatal rat cardiomyocytes treated with TNF- α

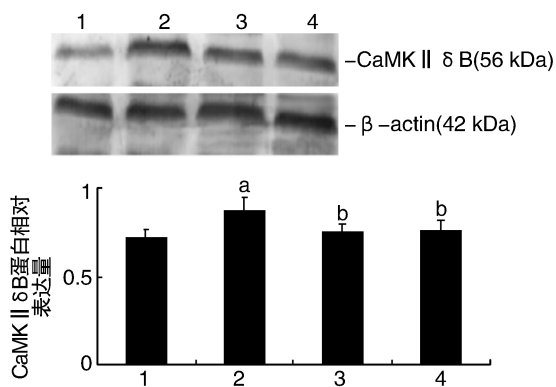


图 7. PI3K 对 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaMK II δB 表达的影响

1 为对照组, 2 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) 组, 3 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组, 4 为 TNF- α (100 $\mu\text{g/L}$) + LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 TNF- α 组比较。

Figure 7. The effects of PI3K on CaMKII δB expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes treated with TNF- α

3 讨论

目前, 心肌肥大已被公认为是猝死、心力衰竭等心血管事件强有力的独立危险因素, 是心血管病病死率和病残率增加的独立预测因子, 与预后不良

密切相关。因此, 探明心肌肥大的发生发展机制一直是心血管领域的重要课题。

我们先前的研究表明^[10], TNF- α 激活的 PI3K 可能是通过增加心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度而诱导心肌细胞肥大。但具体途径尚不清楚。在心脏, 细胞内 Ca^{2+} 的释放, 分别由 1,4,5-三磷酸肌醇受体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R) 系统和蓝尼定受体 (ryanodine receptor, RyR) 系统调控。我们应用激光共聚焦显微镜观察在 PI3K 阻断剂 LY294002 存在情况下加用 IP3R 阻断剂 2-APB (30 $\mu\text{mol/L}$) 或 RyR 阻断剂 ryanodine (50 $\mu\text{mol/L}$) 后对 TNF- α 诱导心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响。结果显示: PI3K 阻断剂 LY294002 明显抑制了 TNF- α 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 提示 PI3K 激活参与调节 TNF- α 诱导的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。LY294002 + 2-APB + TNF- α 组荧光强度变化与 LY294002 + TNF- α 组无显著差异, 提示 TNF- α 激活 PI3K 诱导的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高与 IP3R 有关。LY294002 + ryanodine + TNF- α 组荧光强度明显弱于 LY294002 组, 提示 TNF- α 激活 PI3K 诱导的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高与 RyR 无关。

我们进一步检测心肌细胞蛋白含量及细胞体积, 观察比较 LY294002、2-APB、ryanodine 对 TNF- α 诱导的心肌细胞肥大的影响。结果表明: PI3K 阻断剂 LY294002 显著抑制 TNF- α 诱导的心肌细胞蛋白含量及细胞体积的增加, 其抑制程度与 LY294002 + 2-APB 无显著差异, 但明显大于单用 2-APB 组; 故提示 TNF- α 激活的 PI3K 可能一部分是通过作用 IP3R 增加心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 从而诱导心肌肥大的, 除此之外可能尚存在其他途径。LY294002 + ryanodine 对 TNF- α 诱导心肌肥大的抑制作用比单用 LY294002 组大, 说明 PI3K 不是通过作用 RyR 调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 参与 TNF- α 诱导心肌肥大的。这与我们前面结果所表明的 TNF- α 激活 PI3K 诱导心肌 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高与 IP3R 有关, 与 RyR 无关相一致。

为了进一步证明 Ca^{2+} 信号在 TNF- α 诱导心肌肥大 PI3K 通路中的作用, 我们观察 PI3K 抑制剂 LY294002 对 TNF- α 诱导心肌细胞 CaN 和 CaMK II δB 表达的影响。结果显示: LY294002 明显抑制 TNF- α 诱导的心肌细胞 CaN 和 CaMK II δB 蛋白表达增加, 加用 2-APB 后其抑制作用无显著差异; 提示 PI3K 促使 TNF- α 诱导 CaN 和 CaMK II δB 的表达增加, 且上述反应可能与其作用 IP3R 增加心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有关。

本研究说明: TNF- α 激活的 PI3K 通过增加

CaN 和 CaMK II δ B 表达从而诱导心肌肥大。且这一过程与其增加心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 有关;PI3K 诱导的心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能通过 IP3R,而与 RYR 无关。但 TNF- α 激活 PI3K 诱导心肌肥大仅部分通过 Ca^{2+} -CaN 和 CaMK II δ B 信号途径,除此可能尚存在其他途径参与诱导心肌肥大。

介导心肌肥大的信号转导通路有多条,各个通路之间可能存在千丝万缕的联系,形成错综复杂的信息网络。研究表明 PI3K 能激活 MAPK^[11]。 Ca^{2+} -CaN-NFAT 信号通路与 MAPK 途径的三条主要支路均有交叉,其中 JNKs 和 p38 MAPKs 可抑制 CaN 与 NFAT 之间的信号联接,而 ERK MAPKs 则通过未知的机制促进 CaN-NFAT 信号转导^[12]。JNKs 和 p38 MAPKs 还可直接使 NFAT 转录因子磷酸化而促进其核移出^[13]。也有文献报道了 CaMK II 和 ERK 存在上下游关系^[14]。那么 TNF- α 激活的 PI3K 信号途径可能通过 Ca^{2+} 、CaN 和 CaMK II 等与 MAPK 等信号通路之间形成信息网络,参与 TNF- α 诱导心肌肥大。这些还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, et al. Tumor necrosis factor- α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes[J]. *Circulation*, 1997, 95(5): 1 247-252.
- [2] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 4(7): 517-529.
- [3] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2004, 93 (1): 111-118.
- [4] Couchonnal LF, Anderson ME. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease[J]. *Physiol*

ogy, 2008, 23(6): 151-159.

- [5] 王桂君,郭莲怡,王洪新. 钙离子在肿瘤坏死因子诱导心肌肥大中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(1): 47-51.
- [6] McMullen JR, Shioi T, Zhang L, et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (21): 12 355-360.
- [7] Shioi T, Kang PM, Douglas PS, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice[J]. *EMBO J*, 2000, 19(11): 2 537-548.
- [8] Wymann MP, Pirola L. Structural and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Biophys Acta* [J]. 1998, 1 436: 127-150.
- [9] Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, et al. TNF- α receptor expression in rat cardiac myocytes; TNF- α inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients [J]. *FEBS Lett*, 1995, 376(1-2): 24-30.
- [10] 王桂君,姚玉胜,李懋鹏,等. 肿瘤坏死因子 α 诱导心肌肥大中 Ca^{2+} 升高与 L 型钙通道无关[J]. *中华高血压杂志*, 2010, 18(7): 671-676.
- [11] Prasad SV, Perrino C, Rockman HA. Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(5): 206-212.
- [12] Oudit GY, Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(2): 250-260.
- [13] Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic sponse in coordination with the MAPKs[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(3): 467-475.
- [14] Lu YM, Shioda N, Han F, et al. DY-9760e inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy through inhibition of CaMK II and ERK activities[J]. *Cardiovasc Ther*, 2009, 27(1): 17-27.

(此文编辑 李小玲)