

外源性生长激素释放肽通过调节腺苷酸活化蛋白激酶通路改善大鼠心脏功能

李昭¹, 白英龙², 胡文宇¹, 孙英贤¹, 胡健¹

(中国医科大学 1. 附属第一医院心内科; 2. 公共卫生学院儿少部, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 生长激素释放肽; 腺苷酸活化蛋白激酶; 葡萄糖转运蛋白 4

[摘要] **目的** 探索生长激素释放肽(Ghrelin)的心脏保护效应机制,明确外源性 Ghrelin 是否通过调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK α_2)及葡萄糖转运蛋白 4(Glut4)表达而改善自发性糖尿病大鼠(GK)心脏功能。**方法** GK 大鼠编号随机分为 3 组:GK 组、二甲双胍组(二甲双胍灌胃 4 周)和 Ghrelin 组(外源性 Ghrelin 腹腔注射 4 周),另选 Wistar 大鼠为对照。通过透射电镜观察大鼠心肌超微结构;应用多道生理记录仪观察大鼠心脏功能;留取大鼠动脉血液计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);采用 RT-PCR 法测量 AMPK α_2 及 Glut4 基因表达。**结果** 实验 4 周后,与 Wistar 组及 GK 组比较,Ghrelin 组心率降低,舒张、收缩功能改善($P < 0.05$);Ghrelin 组大鼠的 HOMA-IR 指数低于 GK 组($P < 0.05$);Ghrelin 组大鼠心肌内线粒体及心肌间微血管接近 Wistar 组;Ghrelin 及二甲双胍干预后大鼠心肌 AMPK α_2 和 Glut4 mRNA 表达量有明显增加($P < 0.05$)。**结论** Ghrelin 腹腔注射可减轻自发性糖尿病大鼠胰岛素抵抗,提高自发性糖尿病大鼠心脏左心室舒张和收缩功能,其机制可能与较长期在体上调心肌细胞 AMPK 表达而促进葡萄糖转运有关。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

Effects of Exogenous Ghrelin Through Regulation of AMP-Activated Protein Kinase Pathway Improves Cardiac Function in Rats

LI Zhao¹, BAI Ying-Long², HU Wen-Yu¹, SUN Ying-Xian¹, and HU Jian¹

(1. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University; 2. Department of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Ghrelin; Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase; Glucose Transporter

[ABSTRACT] **Aim** To observe the role of Ghrelin on myocardial metabolism key enzyme AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. **Methods** Goto-Kakizaki (GK) rats (8-week-old males) were randomly divided into three groups with 8 rats in each group: GK group, metformin group (received metformin 350 mg/kg), and Ghrelin group (received Ghrelin 200 μ g/kg in twice daily). Normal male Wistar Kyoto rats ($n = 8$) served as normal controls. Four weeks later, the effects of Ghrelin on cardiac remodeling were evaluated by echocardiographic, hemodynamic and gene expression analysis (AMPK, Glut4 mRNA expression). **Results** After 4 weeks, compared with Wistar rats and GK group, heart rate reduced, diastolic, systolic function improved in Ghrelin group ($P < 0.05$); HOMA-IR index was lower than the GK rats in Ghrelin group ($P < 0.05$); Myocardial mitochondria and myocardial microvascular of Ghrelin group rats were close to Wistar group. Myocardial AMPK α_2 , Glut4 mRNA expression levels were significantly increased in Ghrelin group compared with GK group ($P < 0.05$). **Conclusions** Intraperitoneal injection of Ghrelin can reduce the spontaneous GK rats insulin resistance, and improve left ventricular diastolic and systolic function. Its mechanism may be associated with longer-term increase of AMPK expression of myocardial cell and the promotion of the glucose transporter.

生长激素释放肽(Ghrelin),是日本学者 Kojima 等在大鼠和人的胃内分泌细胞及下丘脑弓状核中发

[收稿日期] 2012-08-02

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20112104120002)

[作者简介] 李昭,博士,讲师,从事动脉粥样硬化的机制与防治研究。白英龙,博士,副教授,从事儿童肥胖的防治研究。通讯作者胡健,博士,教授,从事动脉粥样硬化的机制及防治研究,E-mail 为 meili_51@hotmail.com。

现的一种活性多肽,它含有 28 个氨基酸残基,是生长激素分泌物受体 Ghrelin 受体(growth hormone secre-tagogue receptor, GHS-R)的内源性配体^[1];人的心脏和血管中有广泛的 Ghrelin 及其受体分布^[2]。已有研究提示 Ghrelin 不仅具有心肌正性肌力作用增加心输出量,而且可以通过舒张血管降低心脏负荷^[3],因此 Ghrelin 的心脏保护效应越来越引起学者们的重视,然而 Ghrelin 的心脏保护效应确切信号机制仍需探索。最近有研究提示, Ghrelin 可能参与了心肌的能量重构^[4]。在体研究表明,下丘脑内注射外源性 Ghrelin,可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)调节机体的能量代谢^[5];细胞水平研究表明, Ghrelin 可以通过激活 AMPK 改善血管内皮细胞的氧化应激^[6]。总之, Ghrelin 可能与细胞代谢的关键酶 AMPK 有着密切的联系。本研究应用外源性 Rat-Ghrelin 注射于大鼠腹腔,观察其对糖尿病大鼠心肌细胞结构功能的影响,研究 Ghrelin 对心肌代谢关键酶 AMPK 相关信号通路基因表达的影响,以探索 Ghrelin 心血管效应可能的分子机制,为 Ghrelin 应用于临床提供新的理论依据和治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SPF 级 12 周龄雄性 2 型糖尿病 GK 大鼠(Goto-Kakisaki Wistar rats)24 只和 SPF 级 12 周龄雄性 Wistar 大鼠 8 只,购于上海斯莱科实验动物有限责任公司(合格证号为 SCXK(沪)2003-0003)。所有大鼠均在中国医科大学实验动物部 SPF 级饲养室分笼饲养,置于昼夜节律光照条件下,自由进食饮水,室温控制在 18℃~20℃,湿度 60%~70%。随机分组干预 4 周后取血,并采集心肌标本。Ghrelin 购于南京生物技术公司;p-AMPK 以及葡萄糖转运蛋白 4(Glut4)多克隆抗体、 β -actin 单克隆抗体、RT-PCR 试剂盒等购于上海 Sirocco Pharmaceutical 公司。

1.2 实验分组及处理方法

GK 大鼠编号随机分为 3 组:GK 组用同等容量蒸馏水灌胃 4 周;二甲双胍组采用二甲双胍 350 mg/(kg·d)灌胃 4 周;Ghrelin 组采用 Rat-Ghrelin 200 μ g/(kg·d)腹腔注射 4 周。Wistar 组大鼠采用蒸馏水灌胃 4 周。

1.3 血流动力学检测

各组大鼠麻醉固定、分离右侧颈总动脉,插入内充肝素生理盐水的测压导管至升主动脉,稳定 20

min 后用多道生理记录仪描记动脉收缩压(SBP)及舒张压(DBP),然后插管至左心室腔,稳定 20 min 后描计左心室收缩期末压(LVESP)、左心室舒张期末压(LVEDP)以及左心室最大收缩、舒张末压微分($\pm dp/dt_{max}$)左心室压力最大上升下降速率。

1.4 胰岛素抵抗指数的获取

采用葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(FPG);采用放射免疫法测定空腹胰岛素(FINS)。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算参考文献[7]方法:HOMA-IR = FPG \times FIN/22.5。

1.5 大鼠心肌细胞超微结构观察

按照常规透射电镜样品制备技术制样^[8],切取所需部位心肌组织,切成 1 mm³ 的小块,置于 4% 多聚甲醛固定液中 4℃ 固定,0.1 mol/L PBS 充分漂洗,锇酸固定 2 h,梯度乙醇丙酮脱水,浸透,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,透射电镜下观察,拍照记录超微结构。

1.6 RT-PCR 法测量 AMPK α_2 及 Glut4 基因表达

将大鼠胸主动脉及心肌组织剪碎后加入 1 mg Trizol 试剂制备成匀浆液,离心弃上清后,用去 RNA 酶水解管底沉淀 RNA 后,应用核酸测定仪测得 OD 值。AMPK α_2 引物序列为上游 5'-TTTACCTGTT-GACAATCGGAGCTA-3',下游 5'-AATCGACTT-GACCCGAGG TCTG-3'; Glut4 引物序列为上游 5'-ATTGGATCCAGCGGGTCCATCCATGAGT-3',下游 5'-AATCTCGTCTCCACTTTGGCTTAAGCTG-3'。RT-PCR 一步法反应体系为 10 \times one step RNA PCR Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 5 μ L, DNTP 2.5 μ L, Rnase Inhibitor 0.5 μ L, AMV 0.5 μ L, Taq 0.5 μ L, 靶基因上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L。 β -actin 上、下游引物各 0.5 μ L, 样本总 RNA 0.5 μ L, RNA free H₂O 11 μ L, 总体系 25 μ L。反应条件为 50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 60℃ 70 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。靶基因的 PCR 产物 5 μ L 与 β -actin 的 PCR 产物 5 μ L 混合。置 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 30 min。UVP 凝胶成像系统记录观察结果,靶基因/ β -actin 的比值代表靶基因的 mRNA 表达量。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有的数据均通过 SPSS13.0 处理。对于正态分布的变量采用方差分析进行多组间比较,方差不齐者用秩和检验,采用 *t* 检验进行两组间比较;非正态分布的变量经对数转换后采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ghrelin 对血流动力学指标的影响

实验 4 周后,与 Wistar 组大鼠比较,GK 组大鼠

的心率、LVEDP 升高;而 LVESP、 $\pm dp/dt_{max}$ 降低 ($P < 0.05$);Ghrelin 干预 GK 大鼠 4 周后心率、LV-EDP 降低,LVESP 及 $\pm dp/dt_{max}$ 显著升高 ($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 大鼠血流动力学指标 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The rat hemodynamic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数	Wistar 组	GK 组	Ghrelin 组	二甲双胍组
心率(次/分)	335.5 \pm 12.3	428.5 \pm 19.5 ^a	375.8 \pm 14.7 ^{ab}	409.6 \pm 13.8 ^{ac}
LVESP(mmHg)	95.5 \pm 7.8	80.6 \pm 8.9 ^a	83.1 \pm 9.4 ^a	83.8 \pm 7.2 ^a
LVEDP(mmHg)	5.5 \pm 0.3	12.8 \pm 0.9 ^a	7.6 \pm 0.4 ^{ab}	10.1 \pm 0.8 ^{ac}
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	4483 \pm 196	3236 \pm 188 ^a	4389 \pm 211 ^{ab}	3538 \pm 223 ^{ac}
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	4784 \pm 119	3013 \pm 202 ^a	4005 \pm 187 ^{ab}	4335 \pm 158 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$,与 Wistar 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 GK 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 Ghrelin 组比较。

2.2 Ghrelin 对胰岛素抵抗指数的影响

所有自发性糖尿病大鼠的 HOMA-IR 指数在实验干预因素处理前,均高于 Wistar 组大鼠 ($P < 0.05$);实验 4 周后,二甲双胍组和 Ghrelin 组大鼠 HOMA-IR 指数均明显低于 GK 组 ($P < 0.05$),但两组之间差异无显著性 ($P > 0.05$;图 1)。

2.3 Ghrelin 对大鼠心肌超微结构的影响

Wistar 组大鼠心肌内线粒体正常,心肌间微血管正常;GK 组大鼠心肌细胞内有线粒体脊溶解,心肌间微血管管腔狭窄;Ghrelin 组大鼠心肌内线粒体及心肌间微血管接近正常;二甲双胍组大鼠心肌细胞内有线粒体空泡变性,心肌间毛细血管内皮细胞胞质有部分溶解发生(图 2)。

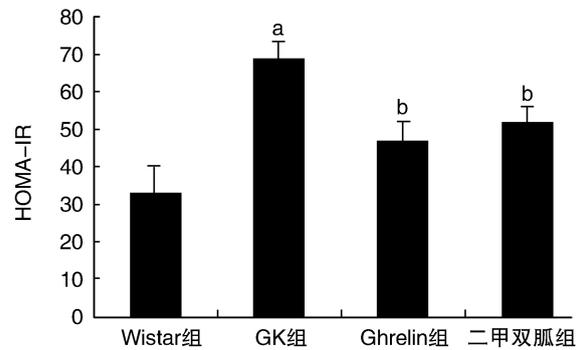


图 1. Ghrelin 对 GK 大鼠胰岛素抵抗指数的影响 a 为 $P < 0.05$,与 Wistar 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 GK 组比较。

Figure 1. Effect of Ghrelin on insulin resistance index

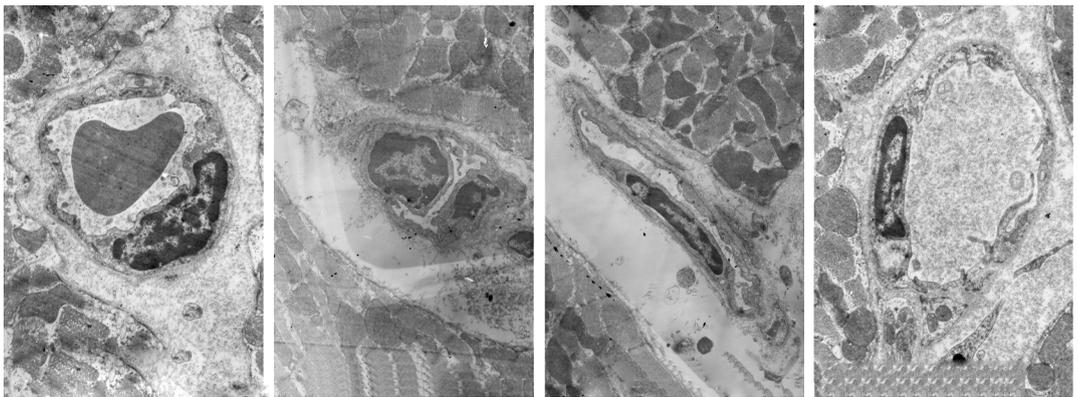


图 2. 大鼠心肌超微结构(8000 \times) 从左到右依次为 Wistar 组、GK 组、Ghrelin 组和二甲双胍组。

Figure 2. Rats myocardial ultrastructure

2.4 Ghrelin 对心肌 AMPK α_2 和 Glut4 mRNA 表达的影响

GK 组大鼠心肌 AMPK α_2 和 Glut4 的 mRNA 表达量较 Wistar 组降低 ($P < 0.05$);Ghrelin 及二甲双

胍干预后大鼠心肌 AMPK α_2 和 Glut4 的 mRNA 表达量有所增加 ($P < 0.05$),尤以 Ghrelin 组增加更显著 ($P < 0.05$;图 3)。

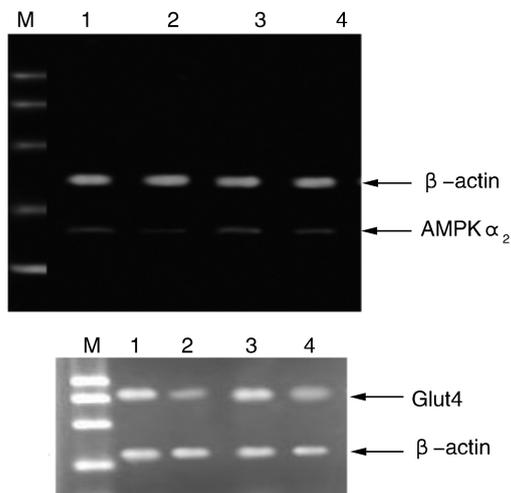


图3.大鼠心肌 AMPK α_2 和 Glut4 的 mRNA 表达量 1 为 Wistar 组,2 为 GK 组,3 为 Ghrelin 组,4 为二甲双胍组。

Figure 3. mRNA expression of myocardial AMPK α_2 and Glut4 in each group

3 讨论

AMPK 在心血管系统中的作用近年来逐渐引起学者们的重视,它是一个异源三聚体蛋白,由 α 、 β 和 γ 三个亚单位组成,每个亚单位都存在由 2~3 种基因所编码 (α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 、 γ_1 、 γ_2 、 γ_3),其中 α_2 主要分布于心脏、肝脏和骨骼肌^[9]。AMPK 是细胞的能量变化感受器,机体受到生理应激或病理刺激时,AMPK 影响糖原、脂肪酸及蛋白质代谢,对心血管系统功能起重要调节作用^[10]。在心肌及血管平滑肌受缺血/缺氧或心血管活性物质刺激时,AMPK 激活还能通过影响细胞周期及物质代谢抑制细胞增殖^[11],在高血压及动脉粥样硬化的防治中起重要作用。研究表明,AMPK 可通过 NO₂ 鸟苷酸环化酶通路增加 Glut4 转运以及葡萄糖的摄入^[12],参与细胞能量代谢。

现有研究提示,葡萄糖转运蛋白负责将细胞外葡萄糖跨膜转运入细胞内,在葡萄糖转运蛋白家族中 Glut4 是能够应答胰岛素刺激的重要转运蛋白,Glut4 表达减少或缺失将导致严重的胰岛素抵抗^[13]。本研究中,GK 组大鼠心肌细胞膜上 Glut4 的表达量明显低于 Wistar 大鼠,其原因可能包括胰岛素信号传导障碍、高糖及游离脂肪酸水平增高抑制 Glut4 基因表达等^[14]。与 GK 组比较,Ghrelin 组大鼠心肌 Glut4 基因表达明显增加,表明 Ghrelin 是通过增加细胞膜 Glut4 的表达提高心肌对葡萄糖的利用而改善糖尿病的心肌能量代谢。已有研究表

明,将能量底物的来源从脂肪酸代谢转向葡萄糖代谢将有益于心脏^[15]。缺血介导的 Glut4 转位机制中,AMPK 被认为是一个重要的介质^[16],因此,Ghrelin 可能通过激活 AMPK 上调 Glut4 表达或促进 Glut4 转位改善胰岛素抵抗,提高心肌葡萄糖摄取,从而增加 2 型糖尿病心肌舒缩功能,发挥其心血管保护效应。

实验中选取二甲双胍作为另一个干预组,二甲双胍是 AMPK 激活剂,可提高机体对胰岛素的敏感性、改善内皮功能和血液动力学、减轻心血管系统的负荷^[17]。实验结果表明,Ghrelin 与二甲双胍同样可以增加 AMPK 及 Glut4 的表达,但 Ghrelin 在改善血液动力学、维护血管内皮功能、逆转心肌肥厚和缓解胰岛素抵抗等方面对机体的正性综合效应优于二甲双胍,其更进一步的信号机制有待深入探讨。

综上所述,本实验探讨了 Ghrelin 在能量代谢方面的作用,并初步研究其在糖尿病心血管并发症发生发展中的作用和基本机制,关于 Ghrelin 对葡萄糖转运的影响目前在国内外尚未见文献报道,具有一定的创新性。Ghrelin 作为心血管活性相关肽,与其他的心血管疾病也可能存在密切联系,还有待更多深入研究。

[参考文献]

- [1] Tesauro M, Schinzari F, Caramanti M, et al. Cardiovascular and metabolic effects of ghrelin[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2010, 6(4): 228-235.
- [2] Lim CT, Kola B, Grossman A, et al. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues[J]. *Endocr J*, 2011, 58(8): 707-710.
- [3] Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280(5): R1 483-487.
- [4] Alloati G, Arnoletti E, Bassino E, et al. Obestatin affords cardioprotection to the ischemic-reperfused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(2): H470-481.
- [5] Verhulst PJ, Janssen S, Tack J, et al. Role of the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway in the orexigenic effects of endogenous ghrelin[J]. *Regul Pept*, 2012, 173(1-3): 27-35.
- [6] Chen JH, Huang SM, Chen CC, et al. Ghrelin induces cell migration through GHS-R, CaMKII, AMPK, and NF- κ B signaling pathway in glioma cells[J]. *J Cell Biochem*,

- 2011, 112(10): 2 931-941.
- [7] Xu A, Lam MC, Chan KW, et al. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(17): 6 086-091.
- [8] Vanhecke D, Graber W, Studer D. Rapidly excised and cryofixed rat tissue[J]. *Methods Cell Biol*, 2010, 96: 513-527.
- [9] Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 251-262.
- [10] Beauloye C, Bertrand L, Horman S, et al. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(2): 224-233.
- [11] Riera MF, Regueira M, Galardo MN, et al. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(8): E914-E923.
- [12] Meepprom A, Sompong W, Suwannaphet W, et al. Grape seed extract supplementation prevents high-fructose diet-induced insulin resistance in rats by improving insulin and adiponectin signalling pathways[J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(8): 1 173-181.
- [13] Senese R, Valli V, Moreno M, et al. Uncoupling protein 3 expression levels influence insulin sensitivity, fatty acid oxidation, and related signaling pathways[J]. *Pflugers Arch*, 2011, 461(1): 153-164.
- [14] Ndisang JF, Jadhav A. Up-regulating the hemeoxygenase system enhances insulin sensitivity and improves glucose metabolism in insulin-resistant diabetes in Goto-Kakizaki rats[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2 627-636.
- [15] Dirx E, Schwenk RW, Coumans WA, et al. Protein kinase D1 is essential for contraction-induced glucose uptake but is not involved in fatty acid uptake into cardiomyocytes[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5 871-881.
- [16] Turdi S, Fan X, Li J, et al. AMP-activated protein kinase deficiency exacerbates aging-induced myocardial contractile dysfunction [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(4): 592-606.
- [17] Ford RJ, Teschke SR, Reid EB, et al. AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2012, 30(4): 725-733.

(此文编辑 许雪梅)