

[文章编号] 1000 - 4718(2008)02 - 0266 - 04

p38MAPK 信号通路在钙调磷酸酶促心肌凋亡中的作用

张秀娥, 成蓓, 彭雯, 何平

(华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 探讨钙调磷酸酶(CaN)在缺氧/复氧和肾上腺素能刺激诱导心肌凋亡中的作用及 p38 MAPK 在 CaN 调节心肌凋亡中的作用。方法: 采用体外培养新生 Wistar 大鼠心肌缺氧/复氧(H/R)模型, 模拟在体缺血再灌注损伤, 将心肌细胞随机分为 3 组: 正常对照组(N组)、H/R + 异丙基肾上腺素组(Ao组)、H/R + 异丙基肾上腺素 + 环孢菌素 A 组(A1组)。采用流式细胞仪检测细胞凋亡, RT-PCR 检测 CaN mRNA 的表达, Western 免疫印迹法检测 CaN 及 p38MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达。结果: H/R 和异丙基肾上腺素(Iso)共同作用心肌后, 心肌细胞凋亡率明显增加, 给予 CaN 抑制剂环孢菌素(CsA)后, 细胞凋亡率显著少于干预前($P < 0.05$)。H/R 和 Iso 共同作用下, 心肌 CaN mRNA 及蛋白表达水平均明显上调, 同时 p38 MAPK 的活化状态 p-p38 MAPK 蛋白表达也显著增加, CsA 干预后, CaN 表达并无明显变化, 但 p-p38 MAPK 蛋白表达显著减少($P < 0.05$)。结论: CaN 促进缺氧/复氧和肾上腺素能刺激诱导心肌细胞凋亡, 可通过活化 p38 MAPK 而发挥促凋亡的作用。

[关键词] p38MAP 激酶; 钙神经素; 心肌; 异丙肾上腺素; 细胞凋亡

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of p38 MAPK signal pathway on myocardium apoptosis mediated by calcineurin

ZHANG Xiu-e, CHENG Bei, PENG Wen, HE Ping

(Department of Geratology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: yuji5832@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effect of calcineurin (CaN) on the myocardium apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) and adrenergic stimulation and the influence of p38 MAPK on myocardium apoptosis mediated by CaN. **METHODS:** Primary cultures of cardiac myocytes were prepared from ventricles of 3-day olds Wistar rats, which were disposed with isoproterenol (Iso, 10 $\mu\text{mol/L}$) and H/R (24 h/4 h). The cultured myocardium cells were divided into three groups randomly: normal group (N), H/R + Iso group and H/R + Iso + cyclosporin A (CsA, 500 $\mu\text{g/L}$, CaN inhibitor) group. The rate of the cardiac myocyte apoptosis was evaluated by flow cytometry. The level of CaN mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the levels of CaN, p38MAPK and p-p38 protein were determined by Western blotting. **RESULTS:** After H/R and Iso stimulating, the rate of cardiac myocytes apoptosis was increased obviously. The rate of apoptosis was decreased after CsA added. Pretreatment of cardiac myocytes with H/R and Iso stimulated CaN mRNA and protein expression. The expression of p-p38MAPK protein was also increased. However, interference of CsA inhibited p-p38MAPK protein expression and no significant change was observed in CaN mRNA and protein expression. **CONCLUSION:** CaN has the promoting effect on the cardiac myocyte apoptosis induced by H/R and Iso. Activated p38 MAPK might be involved in the course of pro-apoptotic effect of CaN.

[KEY WORDS] p38MAP kinase; Calcineurin; Myocardium; Isoproterenol; Apoptosis

心肌缺血再灌注损伤是目前冠脉再通术后的主要并发症, 缺血再灌注可导致细胞凋亡, 最终引起心功能不全。钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)主要表达于细胞浆, 是 1 种受钙离子调节的丝/苏氨酸蛋白磷

酸酶, 普遍分布于多种细胞, 包括心肌细胞, 作为 1 种重要的信号转导酶, 日益受到重视^[1,2]。脑缺血再灌注时 CaN 活性是上调的, 并促进神经元细胞凋亡^[3]。但目前尚无报道显示心肌缺血再灌注是否影

[收稿日期] 2006 - 08 - 16 [修回日期] 2006 - 11 - 14

Tel: 027 - 85351552; E-mail: yuji5832@163.com

响 CaN 表达水平,而且心肌缺血再灌注基础上合并神经内分泌的激活尤其是交感神经系统的激活是常见的临床状态,因此有必要对这种状态下心肌细胞凋亡与 CaN 的关系进行研究。p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38 mitogen - activated protein kinases, p38 MAPK) 是 1 个重要的细胞内信号酶,介导了细胞的多种病理生理过程^[4],如炎症、应激、细胞周期调控等。近年来,已证实 p38 MAPK 是心肌缺血再灌注损伤信号传递通路的重要步骤^[5]。本研究采用体外培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型,探讨 CaN 在 β 肾上腺素能刺激促心肌缺血再灌注损伤所诱导心肌细胞凋亡中的作用及 p38 MAPK 在 CaN 调节心肌凋亡中的作用,为临床防治心肌缺血再灌注损伤提供新的思路。

材 料 和 方 法

1 材料

1-3 d 大小 Wistar 乳鼠购自华中科技大学同济医学院动物中心,DMEM 培养基(高糖及低糖型)、Trizol、新生牛血清购自 Gibco,异丙基肾上腺素(isoproterenol, Iso)及环孢菌素(cyclosporin A, CsA)购自 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,所有引物均由上海生物工程公司合成,兔抗 CaN 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,兔抗 p38 多克隆抗体、小鼠抗 p-p38 单克隆抗体由北京中山生物有限公司分装提供,辣根酶标记抗兔 IgG 及抗小鼠 IgG 由北京中山生物有限公司提供,ECL 购自武汉凌飞科技公司,FITC - Annexin V 凋亡试剂盒由深圳晶美公司提供,其它试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 心肌细胞原代培养 参阅 Taigen 等^[6]方法进行,出生 1-3 d 的乳鼠,无菌条件下取心室肌组织,磷酸缓冲液(PBS)漂洗后,剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块,用 0.125% 胰酶,37 °C 水浴消化 5 次,每次 10 min,收集细胞,用含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液,置于 50 mL 培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 培养箱(95% 空气)中孵育 2 h 后,将含心肌细胞的培养液转移至另 1 培养瓶中(去除非心肌细胞)继续培养 2 d。

2.2 心肌 H/R 模型的构建 将已培养 2 d 的心肌细胞换无血清培养基(高糖),继续培养 24 h 使细胞同步化,再换已被配好的缺氧气体(含体积分数为 95% 的 N₂ 和 5% CO₂) 饱和的低糖型培养基,然后进行模型的构建。将缺氧气体通过气体流量计后,经空气滤过装置除去空气中细菌等微生物,再经已消

毒的玻璃滴管通入培养瓶底部,调节气体流量计使气体流速为 5 L/min,通气 5 min,迅速抽出通气管旋紧培养瓶瓶盖[上述方法缺氧可使瓶内氧分压维持在 34.5-45.0 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa) 约 72 h],缺氧 24 h。复氧时,迅速旋开瓶盖,放在超净工作台内静置 10 min,瓶内氧分压恢复正常,置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱(95% 空气)中继续孵育,复氧 4 h。

2.3 实验分组及细胞处理 原代培养第 3 d 的心肌细胞随机分为 3 组:正常对照组(N 组),H/R + Iso 组(Ao 组),H/R + Iso + CsA 组(A1 组)。心肌 H/R(24 h/4 h)模型的建立参阅上述的方法,Iso(10 μ mol/L)及 CaN 抑制剂 CsA(500 μ g/L)分别在 H/R 模型构建前 30 min 及 1h 加入瓶中。

3 Annexin V - FITC/PI 双染色法检测心肌细胞凋亡

将培养细胞先用滴管轻轻吹打,凋亡细胞一经吹打可能脱壁,收集到 10 mL 的离心管中,没脱壁的细胞用 0.02% 的 EDTA 消化使之脱壁,每样本细胞数为 $(1-5) \times 10^6$,500-1 000 r/min 离心 5 min 弃去培养液;用孵育缓冲液洗 1 次,500-1 000 r/min 离心 5 min;用 100 μ L 的标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育 10-15 min;500-1 000 r/min 离心 5 min 沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次;加入荧光溶液 4 °C 下孵育 20 min,避光并不时振动;流式细胞仪分析。结果判断:在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限显示活细胞,为(FITC - /PI -);右上象限是非活细胞,即坏死细胞,为(FITC + /PI +);而右下象限为凋亡细胞,为(FITC + /PI -)。

4 CaN mRNA 检测

逆转录及 PCR 反应按试剂盒说明书操作。CaN 上游引物 5' - ACT GGC ATG CTC CCC AGC GGA - 3',下游引物 5' - GTG CCG TTA GTC TCT GAG GCG - 3',产物为 241 bp;内参 GAPDH 上游引物 5' - CCA TTC CTC CAC CTT TGA - 3',下游引物 5' - GTG CCG TTA GTC TCT GAG GCG - 3',产物为 336 bp。引物均用 Primer Premier 4.0 软件设计。PCR 反应条件:94 °C 变性 10 min 后 94 °C 60 s,56.5 °C 45 s,72 °C 60 s,进行 30 个循环,72 °C 延伸 10 min,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描并分析。

5 免疫印迹

取 10^7 个细胞以 5 mL PBS 4 °C 洗涤后加入细胞裂解液[50 mmol/L Tris - HCl (pH8.0),150 mmol/L NaCl,0.02% NaN₃,0.1% SDS,1% NP-40,0.5% 去氧胆酸钠] 200 μ L 裂解细胞,Bradford 法测定蛋白浓度,各孔上样量为 50 μ g,10% SDS PAGE 胶电泳,

转膜,封闭,加 I 抗、辣根过氧化物酶标记 II 抗,化学发光试剂增强反应,X 光片压片曝光,凝胶成像系统分析结果,蛋白水平以与对照组的灰度值相比表示。

6 统计学处理

以上实验均重复 3 次。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析。

结 果

1 心肌细胞凋亡的表达

H/R(24 h/4 h) 和 Iso 共同作用心肌细胞,心肌细胞凋亡率(20.36% ± 2.48%)显著高于对照组(5.34% ± 0.35%), $P < 0.05$ 。给予 CaN 抑制剂 CsA 后心肌细胞凋亡率(10.34% ± 2.67%)明显少于干预前($P < 0.05$)。

2 心肌 CaN 的表达

H/R(24 h/4 h) 和 Iso 共同作用心肌细胞后, CaN mRNA 水平处于较高的水平, CaN mRNA 同 GAPDH mRNA 的吸光度比值为(0.91 ± 0.04),与对照组(0.20 ± 0.01)有显著差异($P < 0.01$),给予 CsA 后吸光度比值(0.81 ± 0.03)同干预前无明显差异。同一时点采用免疫印迹法发现,CaN 蛋白水平的变化趋势与 mRNA 水平相类似,见图 1、2。

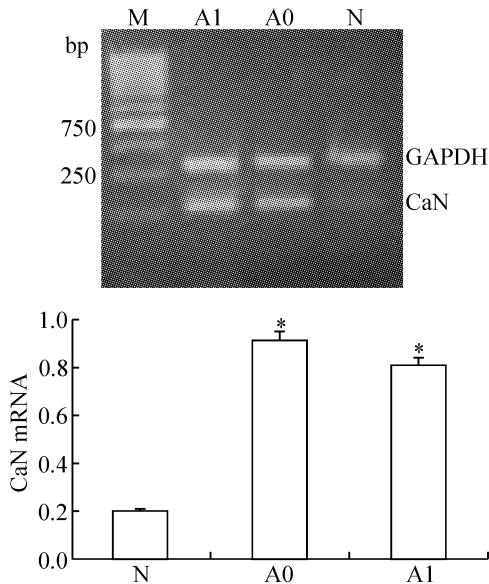


Fig 1 Changes of expression of calcineurin mRNA during three groups of myocardial cells. M: molecular weight standard; N: control group; A0: hypoxia/reoxygenation (H/R) + isoproterenol (Iso) group; A1: H/R + Iso + cyclosporine A (CsA) group. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs N group.

图 1 3 组心肌细胞 CaN mRNA 水平变化

3 心肌 p - p38 及 p38 MAPK 蛋白的表达

H/R(24 h/4 h) 和 Iso 共同作用于心肌细胞后, p - p38 MAPK 蛋白表达明显高于正常对照组(2.67

± 0.12, $P < 0.05$), CsA 的加入导致 p - p38 MAPK 蛋白表达明显少于加入前(0.95 ± 0.12) ($P < 0.05$)。但心肌细胞 p38 MAPK 的表达在 3 组心肌细胞中变化无显著差异,见图 3、4。

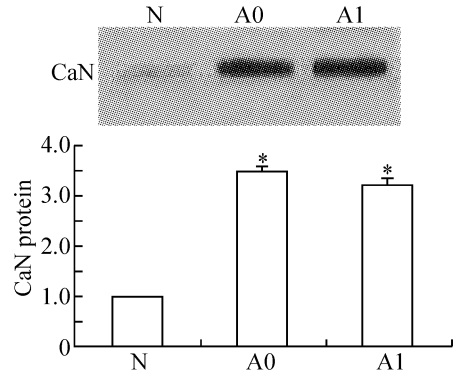


Fig 2 Changes of expression of calcineurin protein during three groups of myocardial cells. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs N group.

图 2 3 组心肌细胞 CaN 蛋白表达变化

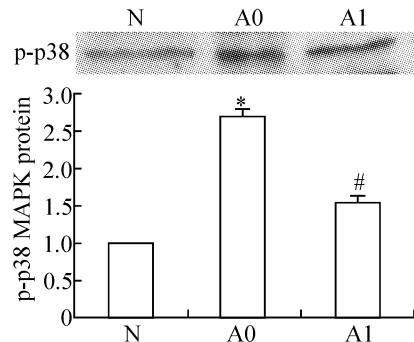


Fig 3 Changes of expression of p - p38 MAPK protein during three myocardial cells. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs A0 group.

图 3 3 组心肌细胞 p - p38 MAPK 蛋白表达变化

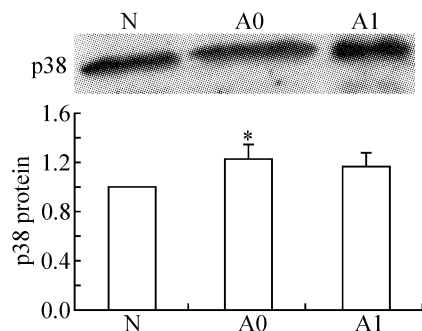


Fig 4 Changes of expression of p38 MAPK protein during three myocardial cells. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P > 0.05$ vs N group.

图 4 3 组心肌细胞 p38 MAPK 蛋白表达变化

讨 论

心肌缺血再灌注可诱发心肌细胞凋亡^[7],心肌细胞丢失是心肌梗死后心功能不全的重要原因。在心肌缺血再灌注期间,许多神经内分泌物质可释放

出来,尤其是交感神经系统激活释放出儿茶酚胺,可诱发心肌细胞凋亡,进一步促进心衰和心律失常的发展。CaN 属丝/苏氨酸蛋白磷酸酶家族成员(又称蛋白磷酸酶 2B, PP2B),是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} /钙调素(CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,能催化多种丝/苏氨酸残基使磷酸化的蛋白去磷酸化,如一氧化氮合酶、Bad 等,发挥多种生物学效应。CaN 作为 1 种重要的信号酶,在心血管领域的研究最初是从心肌肥大开始的^[8],近年来,CaN 对心肌细胞凋亡的影响和心肌重构机制中的作用受到关注^[9-11]。

本实验采用体外培养乳鼠心肌细胞 H/R 模型,模拟在体缺血再灌注损伤,研究发现,H/R 和 Iso 联合作用下,心肌细胞 CaN 表达明显上调,细胞凋亡率也相应增加,给予 CaN 抑制剂 CsA 干预后,上述诱导凋亡的作用可被抑制,这提示 CaN 参与 H/R 和 Iso 介导的心肌细胞凋亡过程,CaN 的激活具有促进心肌细胞凋亡作用,与 Mano 等^[12]报道一致。同时本研究还发现 CsA 加入后抑制细胞凋亡是通过抑制 CaN 与底物的结合,而不是减少 CaN 蛋白的合成。

p38MAPK 是存在于胞浆的蛋白质激酶,是信号从细胞表面转导到细胞核内部的重要传递者,在各种细胞刺激,包括应激(紫外线、热休克、缺血再灌注等)、细胞因子(如 IL-1、TNF- α 等)和 G 蛋白偶联受体激活等作用下,p38MAPK 被激活,一旦激活,细胞浆中的 p38MAPK 即移位到细胞核,调控细胞生长、增殖、分化、凋亡等病理生理过程,因此,p38MAPK 是细胞信息传递的交汇点或共同通路^[13]。最近有研究发现,p38MAPK 的激活或过度表达 p38MAPK 基因均使缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡明显增加,心功能降低^[14]。实验结果表明,H/R 和 Iso 作用于心肌细胞,激活 CaN,同时伴随 p38MAPK 的激活,即 p-p38MAPK 酶蛋白表达增加,心肌凋亡率升高。为进一步明确是否 p38MAPK 在 CaN 介导的心肌凋亡中发挥作用,我们将 CaN 抑制剂 CsA 作用于心肌,发现 p-p38MAPK 酶蛋白表达较前明显减少,心肌凋亡率相应有所减少,CsA 的加入对 p38MAPK 酶蛋白表达影响不大,提示 p38MAPK 的激活可能参与了 CaN 的促心肌细胞凋亡过程,但关于 CaN 具体如何激活 p38MAPK,目前知道不多,尚需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, et al. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function[J]. *Nature*, 2006,443(7109):345-349.
- [2] Khoo MS, Li J, Singh MV, et al. Death, cardiac dysfunction, and arrhythmias are increased by calmodulin kinase II in calcineurin cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2006, 114(13):1352-1359.
- [3] Hansson MJ, Persson T, Friberg H, et al. Powerful cyclosporine inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria[J]. *Brain Res*, 2003,960(1-2):99-102.
- [4] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2):320-344.
- [5] Ballard-Croft C, Locklar AC, Kristo G, et al. Regional myocardial ischemia-induced activation of MAPKs is associated with subcellular redistribution of caveolin and cholesterol[J]. *Am J Physiol*, 2006,291(2):H658-667.
- [6] Taigen T, Windt LJ, Lim HW, et al. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. *PNAS*, 2000,97(3):1196-1201.
- [7] Scarabelli TM, Gottlieb RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(Suppl 2):S144-S152.
- [8] Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2004, 94(1):110-118.
- [9] Gonzalez-Juanatey IR, Pineiro R, Iglesias MJ, et al. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured *in vitro* through a calcineurin-dependent mechanism[J]. *J Endocrinol*, 2004,180(2):325-335.
- [10] Baines CP, Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005,38(1):47-62.
- [11] 胡厚祥,高兴玉,李治明,等. 钙调神经磷酸酶参与心衰患者心肌重构的信号[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(9):1717-1720.
- [12] Mano A, Tatsumi T, Shiraiishi J, et al. Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways[J]. *Circulation*, 2004,110(3):317-323.
- [13] 黄翠萍,杨和平,张珍祥,等. p38 蛋白激酶对支气管哮喘大鼠 Th2 类细胞因子表达的调控[J]. *中国病理生理杂志*, 2006,22(2):311-313.
- [14] Kasier RA, Bueno OF, Lips DJ, et al. Targeted inhibition of P38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5):15524-15530.