

[文章编号] 1000-4718(2007)07-1258-05

AMPK 通过增强心肌脂肪酸氧化抑制大鼠心肌肥厚*

殷 然¹, 董吁钢^{1△}, 李红良², 刘 丹¹(¹中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080; ²中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

[摘要] 目的: 探讨单磷酸腺苷(AMP)激活的蛋白激酶(AMPK)对心肌肥厚的影响及可能涉及的作用机制。方法: 通过对大鼠行腹主动脉缩窄术(TAC)引起压力负荷增加, 造成心肌肥厚的模型。术后 24 h 起经皮下注射 AMPK 的特异性激活剂 AICAR($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)直至术后 7 周。处死动物前, 对大鼠进行超声心动学指标的检测和血清游离脂肪酸浓度测定; 处死动物, 取心脏称重后计算心脏重/体重比值, 测量心肌细胞的平均直径、心肌中的游离脂肪酸含量、过氧化体增殖物激活型受体 α (PPAR α) 和肉碱棕榈酰转移酶(CPT-I)的 mRNA 表达。结果: (1) 心肌肥厚 + AICAR 组大鼠的心脏重/体重比值、心肌细胞平均直径、血清及心肌中游离脂肪酸的浓度明显低于心肌肥厚对照组; (2) 心肌肥厚 + AICAR 组大鼠心肌 PPAR α 及 CPT-I 的 mRNA 表达明显高于心肌肥厚对照组; (3) 心肌肥厚 + AICAR 组大鼠心脏超声心动学指标: 左室后壁舒张末期厚度、左室舒张、收缩末期内径(PWT, LVDD, LVSD) 低于心肌肥厚对照组, 左室短轴缩短率(FS%) 则高于心肌肥厚对照组。结论: 活化的 AMPK 可能通过增强心肌脂肪酸氧化从而抑制压力负荷增加引起的心肌肥厚。

[关键词] 一磷酸腺苷激活的蛋白激酶; 心肌肥厚; 脂肪酸氧化; 线粒体**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

Activated AMPK attenuates cardiac hypertrophy in rats through increasing myocardial fatty acid oxidation

YIN Ran¹, DONG Yu-gang¹, LI Hong-liang², LIU Dan¹*(¹ Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ² Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China. E-mail: ygdong@medmail.com.cn)*

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the antihypertrophic function of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and its effects on myocardial fatty acid oxidation. **METHODS:** The model of cardiac hypertrophy was produced by banding abdominal aorta (transaortic constriction, TAC) in male Sprague-Dawley rats. 5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), a pharmacological activator of AMPK, was injected subcutaneously ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 24 hours after operation and continued till 7 weeks after operation. Echocardiographic and ventricular remodeling parameters, free fatty acid concentration in blood serum and myocardium, and expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α) and carnitine palmitoyl transferase (CPT-I) mRNA were investigated after treatment of AICAR or vehicle for 7 weeks. **RESULTS:** Compared with control group, treatment of rats subjected to TAC with AICAR significantly increased the mRNA expression of PPAR α and CPT-I and subsequently decreased free fatty acid concentration in blood and myocardium, improved echocardiographic characteristics, and reduced the increases in the heart weight/body weight ratio and myocyte diameter. **CONCLUSION:** Pharmacological activation of AMPK may attenuate cardiac hypertrophy through increasing myocardial fatty acid oxidation.

[KEY WORDS] Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Cardiac hypertrophy; Fatty acid oxidation; Mitochondria

心肌肥厚是心肌对多种刺激的适应性反应, 以减轻室壁压力, 维持心功能。但长期的心肌肥厚会导致心肌缺血、心律失常、心衰甚至猝死。研究表明心肌能量代谢紊乱, 即脂肪酸氧化能力下降而葡萄

糖酵解增强, 在心肌肥厚的发病过程中起重要作用, 增强肥厚心肌的脂肪酸氧化能显著改善该类疾病的预后^[1]。AMPK 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 参与不同的生理及病理过程中细胞能量代谢的调控。近期

[收稿日期] 2005-09-22 [修回日期] 2005-12-01

* [基金项目] 广东省自然科学基金项目资助 (No. 31748)

△通讯作者 E-mail: ygdong@medmail.com.cn

研究表明,AMPK 的活性在早期肥厚的大鼠心肌细胞中明显升高^[2];体外应用 AMPK 的激活剂 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, AICAR)可抑制心肌细胞内的蛋白质合成,从而减轻由苯肾上腺素诱导的心肌细胞肥厚表型^[3]。但有关 AMPK 对肥厚心肌脂肪酸氧化的影响以及是否在体内抑制心肌肥厚,目前尚少见报道。本研究通过对大鼠行腹主动脉缩窄术(TAC)引起压力负荷增加,造成心肌肥厚的模型,并观察 AICAR 治疗后心脏病理、功能、以及心肌脂肪酸氧化相关酶活性的变化,探讨 AMPK 是否通过增强心肌脂肪酸氧化的途径从而抑制心肌肥厚。

材 料 和 方 法

1 实验分组及心肌肥厚模型的复制

雄性 SD 大鼠 40 只,体重 200-230 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为心肌肥厚 + AICAR 组(banded/AICAR, B/A)、心肌肥厚对照组(banded/control, B/C)、假手术 + AICAR 组(sham/AICAR, S/A)、假手术对照组(sham/control, S/C)。大鼠经 10% 水合氯醛(0.3 mL/kg)腹腔麻醉后行剑突下正中切口,于双侧肾动脉分支近心端处将腹主动脉与直径为 0.6 mm 的钢丝结扎在一起,然后抽出钢丝,缝合切口,术后饲养 7 周。心肌肥厚 + AICAR 组和心肌肥厚对照组按上述方法手术,假手术 + AICAR 组和假手术对照组只分离腹主动脉不予结扎。

2 给药方法

AICAR 购自 Calbiochem 公司。心肌肥厚 + AICAR 组和假手术 + AICAR 组自术后 24 h 起经皮下注射 AICAR(0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)直至术后 7 周。心肌肥厚对照组和假手术对照组在同样的时间皮下注射等量生理盐水直至术后 7 周。

3 超声心动学检测

术后 7 周,所有大鼠均用 12-HMz 脉冲多普勒超声仪(Philips, SONOS 5500)行超声心动学检测,胸前放置水囊,取胸骨旁左室长轴和短轴切面。由二维超声引导 M 型曲线并进行测量。超声测定指标:(1)左室后壁舒张末期厚度(PWT);(2)左室舒张、收缩末期内径(LVDD, LVSD);(3)左室短轴缩短率(FS%)。

4 取样

处死动物前称体重,处死后取心脏称重,计算心脏重与体重比值(HW/BW)。在距心尖与心底等距离处横行切断心脏,心底端置 10% 甲醛固定,进行病

理学实验;心尖端置液氮保存,进行分子生物学实验。并预留 1 mL 血清和 100 mg 新鲜的心肌组织,进行游离脂肪酸浓度的测定。

5 蛋白质印迹法检测 phos-AMPK 及 AMPK 表达水平

每克心肌组织加蛋白质匀浆缓冲液 1 mL,剪碎心肌组织,用超声波破碎 DNA。-20 °C 冻存组织 20 min,12 000 × g,4 °C 离心 20 min。上清液移至另一 EP 管中,加热 100 °C,6 min。Lowry 法测蛋白质含量。上样 50 μg 蛋白提取液,12% SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至醋酸纤维膜,室温封闭 3 h,加入 1:1 000 稀释的 I 抗(兔抗 AMPK 或抗 phos-AMPK 多克隆抗体,购于 Santa Cruz 公司)杂交,4 °C 过夜,封闭漂洗后加入 1:2 000 稀释的 II 抗(辣根酶标记的羊抗兔 IgG 抗体,购于 Santa Cruz 公司),室温下杂交 1 h,化学发光试剂增强反应,X 光压片曝光,漂洗后自显影,最后对结果进行吸光度扫描分析,以相对于内对照的灰度比值代表 phos-AMPK 及 AMPK 蛋白的相对表达值。

6 血清和心肌游离脂肪酸含量检测

按 Nixon 等^[4]的方法,根据吸光度计算血清和心肌匀浆游离脂肪酸的含量(单位:mmol/L)。

7 病理学检测

将甲醛固定的心脏组织做成石蜡切片,经苏木精-伊红染色后在显微镜下放大 40 倍拍照,每张切片随机取 10 个视野,每个视野选 10 个细胞,用 Image-Pro Plus 软件测量每个细胞的面积,取平均值后计算出其等效面积圆的直径,即为心肌细胞平均直径。

8 RT-PCR 检测心肌 PPAR α 和 CPT-1 mRNA 的表达

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法,按 Trizol 试剂盒说明提取心肌组织总 RNA。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性。紫外分光法确定 RNA 的量和纯度。按 MMLV 一步法 RT-PCR 试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)提供的说明书加入 RT-PCR 反应所需的试剂:引物、RNA 样品、Taq 酶、无菌双蒸水至终体积 50 μL。PPAR α 反应条件:94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 40 个循环,72 °C 延伸 10 min; CPT-1 反应条件:94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 42 个循环,72 °C 延伸 10 min; GAPDH 反应条件同 PPAR α 。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,PPAR α (509 bp):上游引物:5'-AAGCCATCTTCACGATGCTG-3',下游引

物:5' - TCAGAGGTCCCTGAACAGTG - 3'; CPT - I (690 bp): 上游引物:5' - TATGTGAGGATGCTGCTTCC - 3', 下游引物:5' - CTCGGAGAGCTAAGCTTGTC - 3'; GAPDH (231 bp): 上游引物:5' - ACGGCAAATTCAACGGCACAGTCA - 3', 下游引物:5' - TGGGGGCATCGGCAGAAGG - 3'。反应结束后,各取 PCR 产物 4 μL 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶成像系统分析处理,计算 PPARα、CPT - I mRNA 与 GAPDH mRNA 的灰度比值。

9 统计学处理

各组数据均用 SPSS 10.0 统计软件分析,以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析和 *q* 检验。

结 果

1 心肌肥厚及 AICAR 治疗对 AMPK 表达及活性的影响

腹主动脉缩窄造成压力负荷 7 周后,大鼠心肌 AMPK 及 phos - AMPK 表达水平明显高于假手术组。AICAR 对 AMPK 及 phos - AMPK 蛋白表达的基础水平无明显影响。与心肌肥厚对照组相比较,腹主动脉缩窄并应用 AICAR 治疗的心肌肥厚 + AICAR 组心肌 AMPK 的表达无明显差异,而 phos - AMPK 的表达则高于心肌肥厚对照组,见图 1。

2 AICAR 抑制压力过度负荷性心肌肥厚

表 1 各组心脏病理学及超声心动学参数

Tab 1 Cardiac pathological and echocardiographic parameters of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	HW/BW (mg/g)	Myocyte diameter (μm)	LVDD (mm)	LVSD (mm)	PWT (mm)	FS (%)
S/C	10	3.02 ± 0.21	9.11 ± 1.35	6.94 ± 0.33	3.52 ± 0.44	1.55 ± 0.27	54.2 ± 3.8
S/A	10	2.80 ± 0.11	9.59 ± 0.89	6.47 ± 0.72	4.17 ± 0.48	1.62 ± 0.15	48.5 ± 2.6
B/C	9	4.16 ± 0.45*	11.61 ± 1.34*	7.91 ± 0.56*	4.39 ± 0.41*	1.89 ± 0.09	41.4 ± 3.6*
B/A	9	2.99 ± 0.23 ^Δ	10.07 ± 1.07 ^Δ	6.88 ± 0.51 ^Δ	3.83 ± 0.42	1.69 ± 0.14 ^Δ	52.3 ± 2.4 ^Δ

S/C: sham/control group (*n* = 10); S/A: sham/AICAR group (*n* = 10); B/C: banded/control group (*n* = 9); B/A: banded/AICAR group (*n* = 9). **P* < 0.05 vs sham/control group; ^Δ*P* < 0.05 vs banded/control group.

3 AICAR 增强肥厚心肌的脂肪酸氧化

AICAR 对基础水平的血清及心肌游离脂肪酸浓度无明显影响。心肌肥厚对照组血清及心肌游离脂肪酸浓度明显高于假手术组,而心肌肥厚 + AICAR 组上述指标接近正常水平,见图 2。

4 AICAR 增强心肌肥厚时 PPARα 及 CPT - I mRNA 的表达

AICAR 对 PPARα 及 CPT - I mRNA 在心肌的基础表达水平无明显影响。心肌肥厚对照组中上述基因的表达明显低于假手术组,心肌肥厚 + AICAR 组其表达水平接近正常,见图 3、图 4。

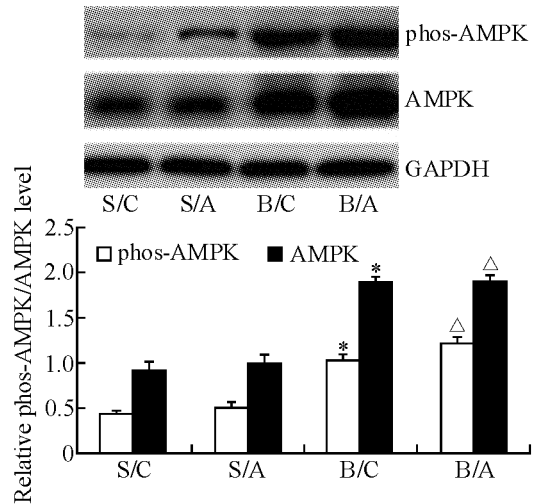


Fig 1 Changes of phos - AMPK and AMPK level after TAC in rat hearts and effects of AICAR. S/C: sham/control group (*n* = 10); S/A: sham/AICAR group (*n* = 10); B/C: banded/control group (*n* = 9); B/A: banded/AICAR group (*n* = 9). $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05 vs sham/control group; ^Δ*P* < 0.05 vs banded/control group.

图 1 TAC 大鼠心肌 phos - AMPK 和 AMPK 水平的变化及 AICAR 的作用

心肌肥厚对照组大鼠的心肌细胞平均直径、心脏重/体重比值、超声心动学检测指标如: LVDD、LVSD、PWT 均明显增大,FS% 明显降低。心肌肥厚 + AICAR 组的上述指标变化小于心肌肥厚对照组,见表 1。

讨 论

在对压力负荷引起的心肌肥厚的众多研究中,心肌能量代谢受到越来越多的关注^[1,5]。与正常心肌主要利用脂肪酸作为底物氧化供能不同,肥厚时的心肌更多依赖葡萄糖酵解供能。肥厚心肌能量底物的转变起初是一种适应性反应,这是因为葡萄糖供能时,氧的利用效率更高,但长期的转变将导致心肌重塑及心律失常。本研究显示,通过 AICAR 增强心肌 AMPK 的活性,可在大鼠压力过度负荷性心肌肥厚模型中减轻心肌肥厚的程度,并提示 AMPK 对

心肌肥厚的保护作用是通过上调心肌 PPAR α 及其相关脂肪酸氧化酶的表达进而增强心肌脂肪酸氧化、逆转能量底物的转变实现的。

AMPK 是丝/苏氨酸蛋白激酶家族的成员之一，由一个催化亚基(α)和两个调节亚基(β 、 γ)组成。

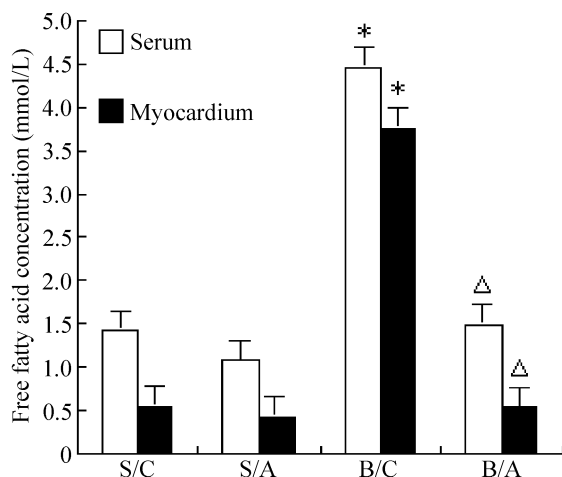


Fig 2 Changes of free fatty acid concentration in blood serum and myocardium after TAC in rats and effects of AICAR. S/C: sham/control group ($n = 10$); S/A: sham/AICAR group ($n = 10$); B/C: banded/control group ($n = 9$); B/A: banded/AICAR group ($n = 9$). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs sham/control group; $\Delta P < 0.05$ vs banded/control group.

图 2 TAC 大鼠血清及心肌游离脂肪酸浓度的变化及 AICAR 的作用

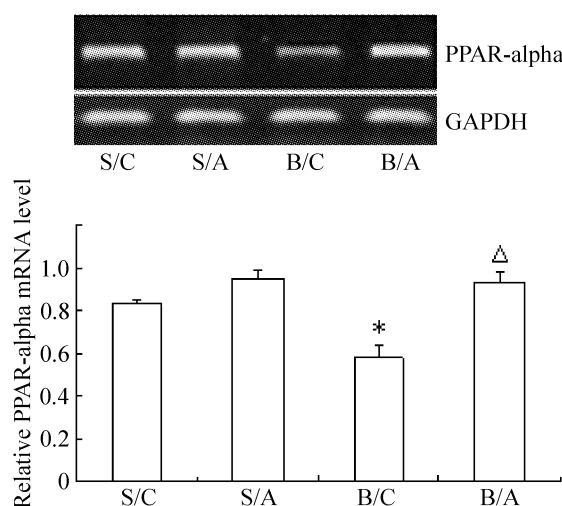


Fig 3 Changes of PPAR α mRNA level in rat hearts after TAC and effects of AICAR. S/C: sham/control group ($n = 10$); S/A: sham/AICAR group ($n = 10$); B/C: banded/control group ($n = 9$); B/A: banded/AICAR group ($n = 9$). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs sham/control group; $\Delta P < 0.05$ vs banded/control group.

图 3 TAC 大鼠心肌 PPAR α mRNA 水平的变化及 AICAR 的作用

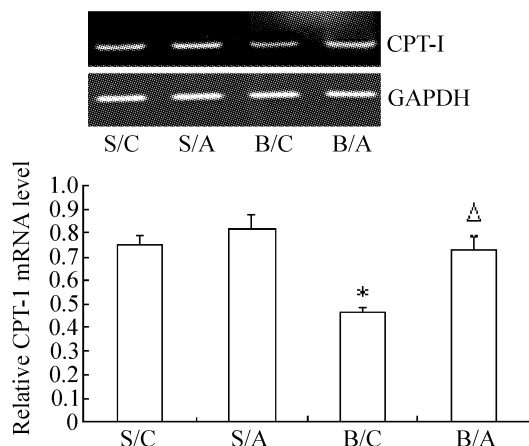


Fig 4 Changes of CPT - I mRNA level in rat hearts after TAC and effects of AICAR. S/C: sham/control group ($n = 10$); S/A: sham/AICAR group ($n = 10$); B/C: banded/control group ($n = 9$); B/A: banded/AICAR group ($n = 9$). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs sham/control group; $\Delta P < 0.05$ vs banded/control group.

图 4 TAC 大鼠心肌 CPT - I mRNA 水平的变化及 AICAR 的作用

AMPK 被称为是“细胞能量监测器”，当细胞内 AMP/ATP 比值增高时，AMPK 通过磷酸化而被激活，导致细胞耗能减少而产能增多^[6]。运动、缺氧和神经体液因子均能活化 AMPK。研究表明，在大鼠压力过度负荷性心肌肥厚模型中，AMPK 的活性明显增高^[2]。另有研究证实，AMPK γ 2 亚基的突变导致家族性 Wolff - Parkinson - White 综合症及肥厚性心脏病^[7]。最近有研究显示体外应用 AMPK 的激活剂 AICAR，可抑制心肌细胞内的蛋白合成，从而减轻由苯肾上腺素诱导的心肌细胞肥厚表型^[3]。但有关 AMPK 与心肌肥厚的体内实验，尤其是与肥厚心肌脂肪酸氧化的关系，尚未见报道。本研究采用压力负荷增加诱导大鼠心肌肥厚，血清及心肌中的游离脂肪酸浓度明显增高，经 AICAR 治疗后，上述脂肪酸浓度显著降低，且与 AICAR 抑制心肌肥厚的程度相一致。上述结果提示 AMPK 具有增强肥厚心肌脂肪酸代谢的作用，且这种作用可能是 AMPK 抑制压力负荷性心肌肥厚的机制之一。

为进一步探讨 AMPK 增强肥厚心肌脂肪酸代谢的机制，我们检测了心肌 PPAR α 及依赖 PPAR α 的脂肪酸氧化限速酶 CPT - I mRNA 的表达。PPAR α 是核激素受体超家族的新成员，主要分布在线粒体脂肪酸氧化效率高的组织。资料表明，控制线粒体脂肪酸代谢的酶至少有七个是依赖 PPAR α 的，其中 CPT - I 催化长链脂肪酸进入线粒体，是决定脂肪酸 β 氧化的限速酶之一^[8]。已有研究证实，心肌肥厚发展过程中能量底物的转变主要是由心肌 PPAR α

表达的下降及失活引起^[9,10];在腹主动脉缩窄造成心肌肥厚的大鼠模型中应用 PPAR α 的特异性激活剂 wy-14,643,可上调依赖 PPAR α 的脂肪酸氧化酶的表达,从而逆转能量底物的转变^[11]。本研究显示应用 AICAR 治疗可增强肥厚心肌的脂肪酸代谢,并伴有 PPAR α 及 CPT-I 表达的上调;这也说明 AMPK 之所以增强肥厚心肌脂肪酸代谢,主要是因为 AMPK 能再活化 PPAR α ,从而增强了心肌脂肪酸氧化。

目前有关 AMPK 与心肌肥厚关系的研究尚处于起始阶段,且大多集中于体外实验。我们的研究提示,AMPK 作为 PPAR α 调控通路的上游调节因子,在心肌肥厚的发展过程中起重要作用;同时表明,通过药物在体内活化 AMPK 可明显减轻心肌肥厚的程度,从而为治疗以心肌肥厚为特征的心血管疾病提供了一条新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, et al. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(2): 218-226.
- [2] Tian R, Musi N, D'Agostino J, et al. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy [J]. *Circulation*, 2001, 104(14): 1664-1669.
- [3] Chan AY, Soltys CL, Young ME, et al. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(31): 32771-32779.
- [4] Nixon M, Chan SH. A simple and sensitive colorimetric method for the determination of long-chain free fatty acids in subcellular organelles [J]. *Anal Biochem*, 1979, 97(2): 403-409.
- [5] Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, et al. Energy metabolism in the hypertrophied heart [J]. *Heart Fail Rev*, 2002, 7(2): 161-173.
- [6] Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(Pt 1): 216-219.
- [7] Murphy RT, Mogensen J, McGarry K, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome: natural history [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(6): 922-930.
- [8] Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2000, 10(6): 238-245.
- [9] Sack MN, Disch DL, Rockman HA, et al. A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6438-6443.
- [10] Barger PM, Brandt JM, Leone TC, et al. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(12): 1723-1730.
- [11] Young ME, Laws FA, Goodwin GW, et al. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 44390-44395.