

## 基础与实验研究

## Apelin 对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大的作用及其机制

周颖, 陈游洲, 乔树宾

## 摘要

目的: 探讨 Apelin 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌细胞肥大的作用及其细胞内信号转导机制。

方法: 培养 1~3 d 新生 Sprague-Dawley 大鼠心肌细胞, 给予 Ang II 刺激。在此基础上给予不同浓度 Apelin。测定 [<sup>3</sup>H] 亮氨酸掺入量、细胞表面积以及总蛋白表达量评价心肌细胞肥大程度。免疫印迹法测定细胞 B 型尿钠肽、β 肌球蛋白重链、活化 T 细胞的核因子 3、钙调神经磷酸酶、磷酸化钙调神经磷酸酶、钙调蛋白激酶 II、磷酸化钙调蛋白激酶 II 的蛋白表达水平。逆转录-聚合酶链反应法测定 B 型尿钠肽和 β 肌球蛋白重链 mRNA 表达水平。

结果: Apelin 可以抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 其作用呈剂量依赖性。同时, Apelin 可以抑制 Ang II 诱导的 B 型尿钠肽和 β 肌球蛋白重链 mRNA 表达水平、B 型尿钠肽和 β 肌球蛋白重链、活化 T 细胞的核因子 3、磷酸化钙调神经磷酸酶、钙调蛋白激酶 II 和磷酸化钙调蛋白激酶 II 的蛋白表达水平升高, 且均与 Apelin 浓度呈剂量依赖性。

结论: Apelin 可以抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 其机制与 Ca<sup>2+</sup> 依赖的钙调神经磷酸酶信号转导通路有关。

关键词 血管紧张素 II; 心肌细胞肥大; 钙调神经磷酸酶; 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II

### Effect of Apelin on Angiotensin II-induced Cardiomyocyte Hypertrophy With its Mechanism in Experimental Rats

ZHOU Ying, CHEN You-zhou, QIAO Shu-bin.

Department of Cardiology, Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing (100037), China

Corresponding Author: QIAO Shu-bin, Email: qsbfw@sina.com

## Abstract

Objective: To explore the effect of apelin on angiotensin II (Ang II)-induced cardiomyocyte hypertrophy and intracellular signal transduction mechanism in experimental rats.

Methods: The cardiomyocyte from 1 to 3 days neonatal rats were cultured with Ang II to induce the cardiomyocyte hypertrophy, and the cells were treated by apelin at different concentrations. The [<sup>3</sup>H] Leucine incorporation, cardiomyocyte surface area and total protein expression were analyzed to evaluate the degree of cardiomyocyte hypertrophy. The protein expressions of intracellular BNP, β-MHC, nuclear factor 3 of activated T cells (NFATc3), calcineurin, phospho-calcineurin, calmodulin kinase II (CaMK II) and phospho-CaMK II were assessed by Western blot analysis. The mRNA expressions of BNP and β-MHC were examined by RT-PCR.

Results: Apelin may inhibit Ang II induced cardiomyocyte hypertrophic response in a dose-dependent manner, the maximum inhibition was achieved at Ang II 1000 nmol/L. Meanwhile, apelin may inhibit Ang II-induced elevations of intracellular resting free calcium level, mRNA expressions of BNP and β-MHC, protein expressions of NFATc3, phospho-calcineurin, CaMK II and phospho-CaMK II in a dose-dependent manner.

Conclusion: Apelin may inhibit Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy in experimental rats which might be related to Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signal pass ways.

Keywords Angiotensin II; Cardiomyocyte hypertrophy; Calcineurin; Calmodulin kinase II

(Chinese Circulation Journal, 2014,29:733.)

心肌肥厚是各种心脏疾病的重要表现之一。引起心肌肥厚的因素很多,包括神经体液因素、应力负荷等<sup>[1,2]</sup>。肾素-血管紧张素系统(RAS)中的血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)通过不同的信号转导途径诱导心肌肥厚<sup>[3]</sup>。在钙依赖的信号通路中,AngⅡ通过延长动作电位,使心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>水平升高,激活钙调神经磷酸酶(Calcineurin)和钙调蛋白激酶Ⅱ(CaMKⅡ)<sup>[4]</sup>,促进心肌肥厚的发展。

1993年,发现了一个结构与血管紧张素Ⅱ1型受体(AT1R)相似的蛋白,命名为血管紧张素1型受体相关蛋白(APJ)<sup>[5]</sup>,1998年从牛胃分泌物中提取了APJ内源性配体,命名为Apelin<sup>[6]</sup>。Apelin与AngⅡ具有同源性,APJ与AT1R在疏水跨膜区也有40%~50%的同源性,是RAS的新成员<sup>[7]</sup>。研究表明,Apelin与AngⅡ在体内,尤其在心血管系统影响着若干相同的生物过程,例如Apelin扩张血管,降低血压;在慢性心室压力超负荷所致的心肌肥厚模型中,Apelin mRNA明显减少,而AngⅡ mRNA明显增加<sup>[8,9]</sup>;机械牵拉是引起心肌肥厚的因素之一,牵拉心肌细胞12 h或24 h后,心肌细胞的Apelin和APJ mRNA水平也显著减少,与AngⅡ正好相反<sup>[10]</sup>。说明Apelin可能在心肌肥厚的发生发展过程中起到与AngⅡ相反的作用。

本实验以AngⅡ诱导SD大鼠乳鼠原代心肌细胞肥大,采用不同浓度Apelin进行干预,观察Apelin能否拮抗AngⅡ诱导的心肌细胞肥大,并且进一步探讨其细胞内信号转导机制。

## 1 材料与方法

试验材料:实验动物:1~3 d的SD乳鼠1只(维通利华实验动物有限公司,中国)。试剂:Apelin-13(Sigma公司,美国),AngⅡ(Sigma公司,美国),DMEM培养基(Gibco公司,美国),胰蛋白酶(Sigma公司,美国),胶原酶Ⅱ(Invitrogen公司,美国),无钙镁PBS,胎牛血清(Gibco公司,美国),5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、青霉素、链霉素、乙醇、鼠抗横纹肌肌动蛋白单克隆抗体(Sigma-Aldrich公司,美国),<sup>[3</sup>H]-亮氨酸、闪烁液、闪烁瓶(Perkin Elmer公司,美国),心肌细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(碧云天生物技术研究所,江苏,中国),一抗B型脑钠肽(BNP)抗体、CaMKⅡ抗体、p-CaMKⅡ抗体

(Santa Cruz公司,美国)、β-肌球蛋白重链(β-MHC)(Abcam and Alpha公司,美国)、Calcineurin抗体、p-Calcineurin抗体、活化T细胞的核因子3(NFATc3)抗体(BD公司,美国)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、β-actin抗体(全式金生物技术公司,中国),二抗(兔抗鼠IgG)(Invitrogen公司,美国)、SuperscriptⅡ逆转录酶(Invitrogen公司,美国),SYBR Green Realtime PCR Master Mix(TaKaRa公司,日本)。仪器:CO<sub>2</sub>培养箱(SANYO 17-AC,日本),倒置相差显微镜(Olympus BHL,日本),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国),荧光显微镜,酶标仪,高速低温离心机,RT-PCR仪,液体闪烁仪(Tri-Carb 2900TR,美国)。

试验方法:心肌细胞培养:取1~3 d SD乳鼠心室肌,用0.1%胰蛋白酶加0.04%胶原酶Ⅱ消化,差速贴壁1.5 h,将未贴壁的心肌细胞用含10%胎牛血清及青霉素、链霉素DMEM培养液稀释成1×10<sup>8</sup>/L,并加入0.1 mmol/L BrdU抑制非心肌细胞增殖,接种于6孔培养板,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。换用普通培养基再培养24 h。倒置相差显微镜镜下观察,24 h后90%的细胞都自发性搏动,频率一致,约200次/分。

肌动蛋白单克隆抗体的免疫组化染色:将原代心肌细胞放入预先放置有载玻片的培养皿中培养48 h后,取出载玻片,采用肌动蛋白单克隆抗体进行免疫组化染色,90%以上的细胞呈阳性染色,则继续以下实验。

实验分组:SD乳鼠的心肌细胞换无血清培养液,培养24 h。Apelin及AngⅡ均由无菌过滤器过滤除菌后加入心肌细胞。实验分组如下:①对照组:正常心肌细胞不加任何干预因素;②Apelin组:正常心肌细胞分别给予Apelin-13 10 nmol/L(10 nM亚组)、100 nmol/L(100 nM亚组)和1000 nmol/L(1000 nM亚组);③AngⅡ组:心肌细胞给予AngⅡ 100 nmol/L,刺激心肌细胞肥大;④AngⅡ+Apelin组:心肌细胞给予AngⅡ 100 nmol/L,同时再分别给予Apelin-13 10 nmol/L[AngⅡ+A(10 nM)亚组]、100 nmol/L[AngⅡ+A(100 nM)亚组]和1000 nmol/L[AngⅡ+Apelin(1000 nM)亚组]。每天加药1次,每2天换液1次。

观测指标:心肌细胞表面积测定:加药后72 h,每孔随机选择5个视野摄片,每个视野再任取15个细胞,用美国Image-Proplus专业图像分析软件测定细胞表面积,取其平均值。

心肌细胞蛋白合成速率测定: 心肌细胞加入各种干预因素和  $18.3 \text{ kBq} \mu\text{L}^{-1}$  [H]-亮氨酸继续培养 72 h。弃培养液, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 3 遍, 用 0.1% 胰蛋白酶消化后收集细胞于玻璃纤维素膜上, 用 10% 三氯乙酸固定, 滤膜烘干后用液体闪烁仪测定掺入量。

心肌细胞蛋白的提取和总蛋白含量的测定: 各组心肌细胞培养 72 h 后, 终止细胞培养, 用冰 PBS 收集贴壁心肌细胞, 加入心肌细胞裂解液 50  $\mu\text{L}$  和苯甲基磺酰氟(PMSF) 1  $\mu\text{L}$ , 冰上裂解 30 min。4 000 g 离心 15 min, 移上清于 1 ml 的 EP 管中。用二辛可酸(BCA)法测定心肌细胞样品总蛋白含量<sup>[11]</sup>。

免疫印迹法测 BNP、 $\beta$ -MHC 和 Calcineurin 抗体、p-Calcineurin 抗体、NFATc3、CaMK II、p-CaMK II 的蛋白表达: 每组取 50  $\mu\text{L}$  蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后以一抗(1:2000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 继与辣根过氧化物酶标记抗体(1:2000) 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。常规洗膜, ECL 显色系统(Amersham)检测, Ban&can 图像分析系统定量各蛋白条带的总灰度值。

逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测 BNP、 $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达: 各组心肌细胞培养 72 h 后, 终止细胞培养,  $1 \times 10^6$  细胞经 PBS 洗涤后用 Trizol 提取总 RNA。取总 RNA 4  $\mu\text{g}$ , 加入 Oligo-(dt)18 (0.5

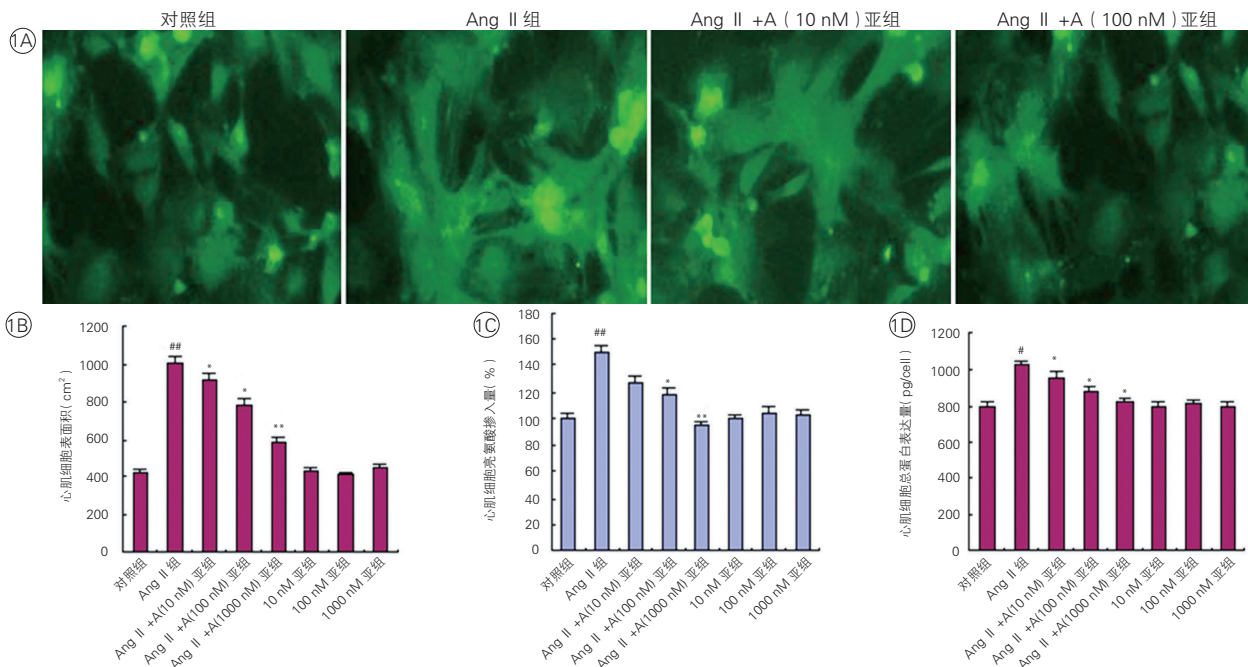
$\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 再加入 DEPC 水, 配成总体积为 12  $\mu\text{L}$  的反应体系, 逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 扩增目的基因。引物由上海生工设计合成。

统计学处理: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据的分析处理。所有计量资料采用均数  $\pm$  标准差表示, 组间差异只有两组时用 *t* 检验, 有多组时用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以  $P < 0.05$  作为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Apelin对肥大心肌细胞的表面积、蛋白合成速率、总蛋白表达量的影响

在 Ang II 组, 肥大心肌细胞给予 Ang II (100 mmol/L) 作用 72 h 后, 可以使心肌细胞表面积、总蛋白表达量明显增加, 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。在 Ang II + Apelin 组, 不同浓度的 Apelin 与 Ang II 共同作用于心肌细胞 72 h 后, 心肌细胞表面积、亮氨酸掺入量和总蛋白表达量与 Ang II 组相比明显减少, 呈 Apelin 剂量依赖性。在 Apelin 组, 单独以不同浓度 Apelin 作用于心肌细胞, 以上指标与对照组相比差异无统计学意义。图 1

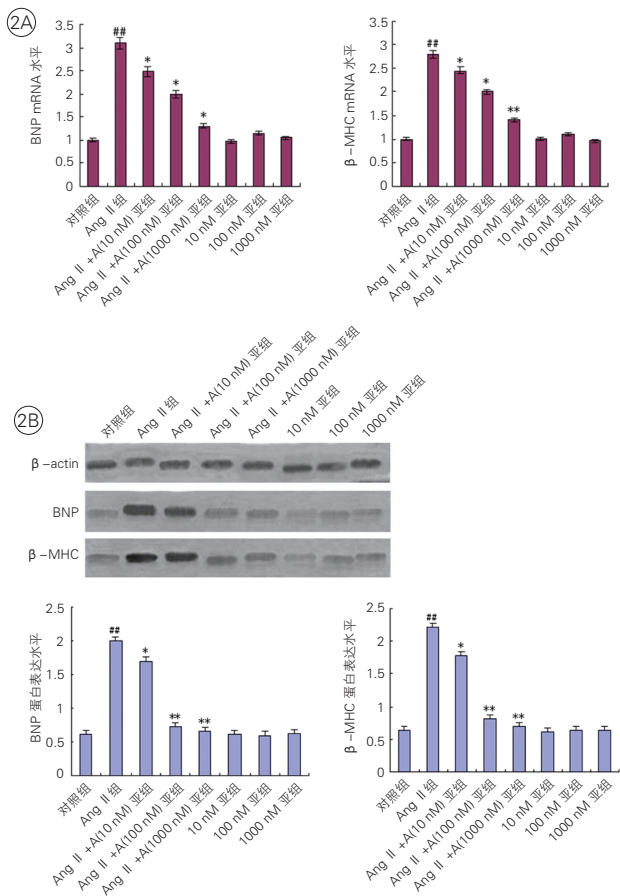


注: 1A: 各组心肌细胞肌动蛋白免疫组化染色。绿色染色为心肌细胞胞浆内肌动蛋白。可见 Ang II 组心肌细胞较对照组染色增强, 心肌细胞体积增大; Ang II + A (10 nM) 亚组较 Ang II 组心肌细胞染色减弱, 心肌细胞体积减小; Ang II + A (100 nM) 亚组心肌细胞染色最弱, 心肌细胞体积最小。1B: 心肌细胞表面积测定。随机测量 100 个心肌细胞。1C: 心肌细胞亮氨酸掺入量测定。1D: 心肌细胞总蛋白表达量测定。结果为三次独立实验的均数  $\pm$  标准差。与 Ang II 组比较 <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与对照组比较 <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。Ang II: 血管紧张素 II

图 1 Apelin 在体外可剂量依耐性地抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大

## 2.2 Apelin 对心肌细胞肥大标志物的影响

在 Ang II 组, 100 mmol/L 的 Ang II 作用 72 h 后, 心肌细胞 BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。在 Ang II + Apelin 组, Apelin 与 Ang II 共同作用于心肌细胞时, 随着 Apelin 作用浓度的增加, BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 和蛋白表达水平逐渐下降, 呈剂量依赖性。在 Apelin 组, 单独以不同浓度的 Apelin 作用于心肌细胞, 其 BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 和蛋白表达水平与对照组相比无显著性差异。图 2



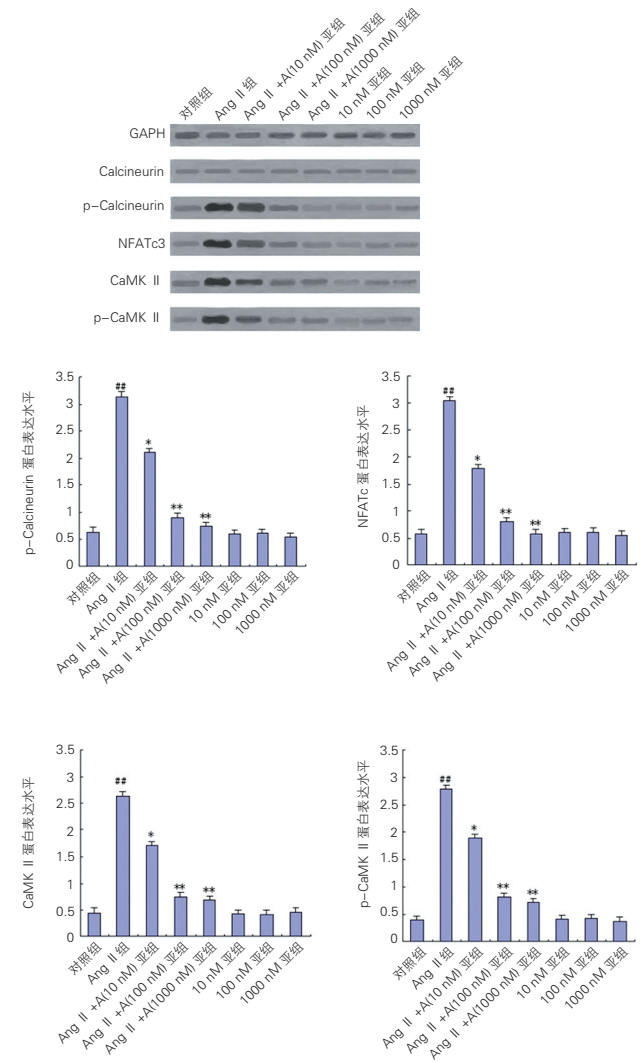
注: 2A: 逆转录-聚合酶链反应法检测心肌细胞 BNP 和  $\beta$ -MHC 的 mRNA 水平。2B: 免疫印迹法检测心肌细胞 BNP 和  $\beta$ -MHC 的蛋白表达水平。结果为三次独立实验的均数  $\pm$  标准差。与 Ang II 组比较 \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与对照组比较 # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。Ang II: 血管紧张素 II  $\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白 BNP: B 型脑钠肽  $\beta$ -MHC:  $\beta$ -肌球蛋白重链

图 2 Apelin 对心肌细胞肥大标志物的影响

## 2.3 Apelin 对心肌细胞内钙调神经磷酸酶、活化的 T 细胞核因子 3 和钙调蛋白激酶 II 信号通路的影响

在 Ang II 组, Ang II 对心肌细胞 Calcineurin 蛋白表达无明显影响, 但可明显上调其磷酸化产物 p-Calcineurin 的蛋白表达水平, 同时提高心肌细胞

NFATc3 的蛋白表达水平。同时, Ang II 可明显提高心肌细胞 CAMK II 及其磷酸化产物 p-CAMK II 的蛋白表达水平。在 Ang II + Apelin 组发现上述作用可被 Apelin 抑制, 并呈剂量依赖性。在 Apelin 组, 单独以不同浓度的 Apelin 作用于心肌细胞, 以上指标与对照组相比差异有统计学意义。图 3



注: 结果为三次独立实验的均数  $\pm$  标准差; 与 Ang II 组比较 \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与对照组比较 # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。Calcineurin: 钙调神经磷酸酶 NFATc3: 活化的 T 细胞核因子 3 CaMK II: 钙调蛋白激酶 II

图 3 免疫印迹分析 Apelin 对心肌细胞内钙调神经磷酸酶, 活化的 T 细胞核因子 3 和钙调蛋白激酶 II 蛋白表达量的影响

## 3 讨论

心肌肥厚是心血管疾病死亡率升高的一个独立危险因素。循环中或心肌局部 Ang II 是引起心肌细胞肥大的最重要的活性物质之一<sup>[12]</sup>。Apelin 扩张血

管、降低血压,与 Ang II 所致的缩血管效应相反<sup>[6]</sup>。我们假设 Apelin 能够发挥与 Ang II 相反的作用,改善心肌肥厚,并进一步探讨了 Apelin 在 Ang II 诱导的心肌细胞肥大中的作用机制。

Apelin 在体内分为 Apelin-36, Apelin-13 和 Apelin-12<sup>[7]</sup>。本研究使用的是生物活性最强的 Apelin-13。

本研究发现,当 Apelin 与 Ang II 联合作用时,Ang II 的促心肌细胞肥大作用显著受到抑制。表现为心肌细胞表面积明显减小,蛋白合成速率下降,总蛋白合成量减少,同时可使 BNP 和  $\beta$ -MHC 的蛋白表达水平明显下降。以上作用呈剂量依赖性。

研究发现,Ang II 致心肌细胞肥大,主要通过激活钙依赖的信号通路,活化 Calcineurin 及其下游的活化的 T 细胞核因子,调节心脏肥大基因的表达<sup>[3, 4]</sup>。通过转基因的方法过表达 Calcineurin 或者 NFAT 可以诱导明显的心肌肥厚<sup>[13]</sup>。阻断 NFATc3 活性能逆转心肌肥厚进程<sup>[14, 15]</sup>。CaMK II 被激活后也可诱导肥大基因表达,促进心肌肥厚<sup>[4]</sup>。肥厚心肌中 CaMK II 的表达增加<sup>[16]</sup>。阻断 CaMK II 可以抑制心肌肥厚<sup>[17]</sup>。预先给予 Apelin 可以抑制缺血再灌注损伤造成的心肌细胞内钙超载<sup>[18]</sup>。因此,我们假设 Apelin 可以通过  $Ca^{2+}$  介导的 Calcineurin 和 CaMK II 信号转导通路,对抗 Ang II 诱导的心肌肥厚。

本研究首次探讨了 Apelin 在肥大的心肌细胞中对  $Ca^{2+}$ /calmodulin (CaM) 依赖的 Calcineurin 和 CaMK II 信号通路的影响。在本研究中,Ang II 可明显上调 Calcineurin 的磷酸化产物 p-Calcineurin 及其下游因子 NFATc3,以及 CaMK II 的蛋白表达水平,与心肌细胞肥大的趋势一致。而 Apelin 可以明显抑制 AngII 的促心肌细胞肥大作用,并呈剂量依赖性。因此推断,Apelin 可能通过  $Ca^{2+}$  介导的 Calcineurin-NFAT 和 CaMK II 信号通路,抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。可行进一步的研究探索 Apelin 的抗心肌肥厚的作用是否能被 Calcineurin、NFATc3 和 / 或 CaMK II 的拮抗剂所抑制,明确 Calcineurin-NFAT 和 CaMK II 信号通路在 Apelin 抗心肌肥厚作用中的作用。

## 参考文献

[1] 胡海锋,邹云增,葛均波.机械压力刺激导致心肌肥厚的分子机制.中国循环杂志,2006,10:152-155.  
 [2] 刘健,何作云,王培勇.压力超负荷性心肌肥厚大鼠心肌细胞内钙激活蛋白酶活性分布的研究.中国循环杂志,2001,12:469-471.

[3] Zhang Y, Bloem LJ, Yu L, et al. Protein kinase C beta II activation induces angiotensin converting enzyme expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2003, 57: 139-146.  
 [4] Fischer TH, Herting J, Tirilomis T, et al.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in human cardiac pathology. *Circulation*, 2013, 128: 970-981.  
 [5] O' Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 1993, 136: 355-360.  
 [6] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251: 471-476.  
 [7] Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem*, 2000, 74: 34-41.  
 [8] Yu XH, Tang ZB, Liu LJ, et al. Apelin and its receptor APJ in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta*, 2014, 428: 1-8.  
 [9] Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, et al. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41: 798-806.  
 [10] De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 10464-10469.  
 [11] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150: 76-85.  
 [12] Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, et al. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2008, 118: 3343-3354.  
 [13] Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, et al. Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin Abeta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4586-4591.  
 [14] Wang LN, Wang C, Lin Y, et al. Involvement of calcium-sensing receptor in cardiac hypertrophy-induced by angiotensin II through calcineurin pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369: 584-589.  
 [15] Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, et al. Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 7603-7613.  
 [16] Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMK II in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51: 468-473.  
 [17] Ke J, Chen F, Zhang C, et al. Effects of calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, KN-93, on electrophysiological features of rabbit hypertrophic cardiac myocytes. *J Hua zhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32: 485-489.  
 [18] Wang C, Liu N, Luan R, et al. Apelin protects sarcoplasmic reticulum function and cardiac performance in ischaemia-reperfusion by attenuating oxidation of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase and ryanodine receptor. *Cardiovasc Res*, 2013, 100: 114-124.

收稿日期:2014-05-05)

(助理编辑:许菁)