论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1314-03

压力超负荷下大鼠左心室活性氧水平及凋亡信号调节激酶蛋白表达

邱 敏,马康华 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

提 要:目的 研究凋亡信号调节激酶(apoptosis signal regulating kinase 1, ASK1)在高血压心脏肥大中的作用。**方法** 复制腹主动脉缩窄高血压大鼠模型,用比色法测定假手术组和高血压组左心室活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,用免疫印迹法测定 ASK1 蛋白表达。**结果** 高血压大鼠左心室质量指数、ROS 水平、ASK1 蛋白表达均显著高于假手术组($P<0.05$)。**结论** 压力超负荷下随着 ROS 的升高,激活的 ASK1 可能在心脏肥大信号传导途径中发挥重要作用。

关键词: 高血压;心脏肥大;活性氧;凋亡信号调节激酶

中图法分类号: R322.11;R345;R544.102 **文献标识码:** A

ROS level and ASK1 protein expression in myocardium during chronic pressure overload in rat left ventricle

QIU Min, MA Kang-hua (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effect of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) protein expression in hypertrophic myocardium in rat models of hypertension. **Methods** The rat model of hypertension was established by abdominal aortic constriction. Six weeks later, the reactive oxygen species (ROS) level and ASK1 protein expression in myocardium of left ventricle were detected respectively by color matching and Western blotting. **Results** The left ventricular mass index, ROS level and ASK1 protein expression all increased significantly in hypertensive rats as compared with those underwent sham operation. **Conclusion** Under chronic pressure overload, the activated ASK1 with the increasing ROS may play an important role in signal transduction pathway of myocardial hypertrophy.

Key words: hypertension; myocardial hypertrophy; reactive oxygen species; apoptosis signal regulating kinase 1

心脏肥大是影响心血管疾病病死率和发病率的独立危险因素,其发病机制仍未完全明了。近年来发现有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是多种细胞外信号引起细胞增生和肥大反应的共同通路[1]。真核细胞中的 MAPK 信号转导通路最终均以三级激酶级联式形式激活,即 MAPKKK-MAPKK-MAPK, ASK1(也叫 MAPKKK5)是 MAPKKK 家族成员之一,本研究旨在研究大鼠腹主动脉缩窄模型上,ASK1 与心脏肥大、ROS 之间的关系。以探讨 ASK1 在高血压心脏肥大中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

抑制与产生超氧阴离子自由基试剂盒、羟自由基测试盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司,兔抗大鼠 ASK1 多克隆抗体购自 Santa cruz 公司。

1.2 动物模型复制

SD 大鼠 16 只,雌雄不拘,体质量 200~250 g,购自重庆医科大学实验动物中心。分为 2 组:腹主动脉缩窄模型组和对照组,每组 8 只。腹主动脉缩窄模型的构建参照文献[2]方法,术前禁食 12 h,10% 水合氯醛(按 0.5 ml/100 g 给麻醉药量)行腹腔注射麻醉,左上腹切口,使腹主动脉充分暴露,在左肾动脉上方 0.3 cm 处将 7 号针头沿主动脉方向与分离的腹主动脉一起结扎,小心拔除针头,造成腹主动脉环行缩窄约 60%。假手术组 8 只仅分离腹主动脉不结扎作为对照组。逐层关腹缝合,术后连续 3 d 腹腔内注射青霉素 20 万单位预防感染。常规饮水照明。

1.3 检测指标及方法

术后 6 周动物禁食 12 h,自由饮水,10% 水合氯醛(0.5 ml/100 g)腹腔注射麻醉后立即将充满肝素的大鼠动脉插管插入右侧颈总动脉,经换能器连接多导生理记录仪,动物稳定 30 min后描记平均动脉血压。迅速开胸取出心脏,冰生理盐水

作者简介:邱 敏(1979-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事高血压、冠心病发病机制方面的研究。电话:(023)89014394, E-mail: cqqiu1010@hotmail.com

通讯作者:马康华,电话:(023)89012911

收稿日期:2005-10-19;修回日期:2006-02-03

洗净,滤纸吸干,沿房室沟剪掉两心房,剪掉主肺动脉,紧贴室间隔右侧剪下右心室游离壁,将剩余部分用电子天平称重为左心室质量,取左心室质量除以体重即相应的左心室质量指数。沿左心室最宽处垂直于长轴将其分为两部分,经液氮速冻后 -80 ℃冰箱保存,用于 ROS 检测,ASK1 蛋白免疫印迹。所有标本制作条件完全相同以避免人工误差。

1.3.1　ROS 检测　　取左心室 200 mg 左右组织制备成 10% 的组织匀浆,3 000 r/min 离心 10 min 吸取上清液,用 752 型紫外分光光度计按抑制与产生超氧阴离子自由基试剂盒及羟自由基测试盒的说明测定抗羟自由基和抗超氧阴离子的活力单位。

1.3.2　免疫印迹法分析 ASK1 蛋白表达　　称取约 200 mg 组织在冰浴下研碎后加入 1.0 ml 蛋白裂解液(其组成为:50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40;0.25% 脱氧胆酸钠; 150 mmol/L NaCl;1 mmol/L EGTA;1 mmol/L PMSF;1 mmol/L Na_3VO_4;1 mmol/L NaF;1 μg/ml aprotinin;1 μg/ml leupeptin)孵育 30 min,组织匀浆后 4 ℃离心机以 12 000 × g,离心 20 min,留取上清弃沉淀,上清即所含要测定的胞浆蛋白。按考马斯亮蓝法测定蛋白质量浓度,使蛋白质浓度调至 200 mg/L,聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白(上样量为 50 μg 总蛋白),电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉封闭 1.5 h,分别加一抗(工作浓度 1∶150)4 ℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记二抗(工作浓度 1∶1 500)室温孵育 1 h,DAB 显色,以凝胶成像系统扫描,Quantity One 1-D 5.4.1 图像分析软件分析图片,总的光密度值作为衡量 ASK1 相对含量的指标,实验重复 3 次。

1.4　统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　左心室质量指数与平均动脉压

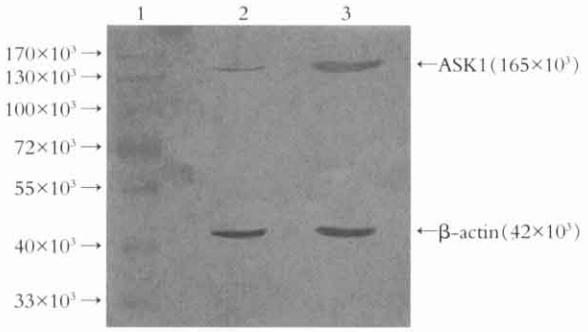
手术组与对照组相比,左心室质量指数、平均动脉压显著升高($P<0.01$)。

2.2　ROS 水平和 ASK1 蛋白表达

由于抗活性氧活力单位与 ROS 水平呈逆向关系,即体内产生抗活性氧活力单位越低其产生的 ROS 水平越高。实验结果表明抗羟自由基和抗超氧阴离子的活力单位在手术组明显降低,因此手术 Z 组的 ROS 水平比对照组明显升高。ASK1 蛋白在假手术组仅有微量表达,在心肌肥厚组的表达明显增多,免疫印迹结果显示蛋白含量增加了 3.2 倍。结果见表 1、图 1。

表 1　后负荷过载对左心室质量指数、平均动脉压、ROS 的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	左心室质量指数(mg/g)	平均动脉压(mmHg)	抗羟自由基活力单位	抗超氧阴离子活力单位
手术组	2.499 8 ±0.088 7	182.97 ±8.11	66.17 ±9.39	102.65 ±8.65
对照组	1.951 2 ±0.044 2	123.95 ±7.27	174.82 ±11.43	155.64 ±7.46
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01



1:标准; 2:假手术组;3:手术组

图 1　后负荷过载对左心室 ASK1 蛋白免疫印迹结果的影响

3　讨论

以往对高血压心脏肥大机制的研究已经明确,压力和(或)容量超负荷及某些生长因子如 α 受体激动剂、内皮素-1、血管紧张素 Ⅱ、TNF-α 等均为导致心脏肥大的重要因子,在这些肥大刺激因子诱导的心脏肥大中 ROS 是重要的细胞内信号分子[3]。本实验也证实大鼠腹主动脉缩窄术后 ROS 生成明显增多。

ASK1 是氧敏感性 MAPKKK,是 MAPK 信号通路的上游激酶。在静息状态下负性调节因子硫氧还蛋白(Trx)以还原形式结合在 ASK1 的 NH2-末端抑制其激活,在不同的心肌肥大因子刺激下(TNF、Ang Ⅱ、Fas、牵张刺激等)心肌细胞中 ROS 水平增加氧化 Trx 使其从 ASK1 分离从而激活 ASK1。ASK1 参与细胞的生长、分化、凋亡,近年来体内外研究表明它与心脏肥大的发生也存在密切关系[4,5]。Yamaguchi 等[5]将 ASK1 基因敲除小鼠与正常小鼠比较,在左冠状动脉结扎心肌梗死和胸主动脉缩窄后负荷过载模型中,心脏结构和功能正常,仅有轻微的心肌间和血管周围组织纤维化,同时凋亡的心肌细胞数量明显减少,说明在心肌梗死和后负荷过重条件下,ASK1 在调节左室重塑中起着重要作用。

ASK1 在心脏肥大中的作用主要通过两方面来实现:①通过 MAPK 信号通路诱导心脏肥大。MAPK 为细胞内广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶超家族,由其介导的信号途径有调控基因表达和促有丝分裂作用,参与细胞的生长、分化和形态改变,分为细胞外信号调节激酶(ERK)、压力激活蛋白激酶(JNK)和 p38-MAPK 3 个亚组。由 ASK1 介导的 ASK1-MKK4/MKK7(MKK4 和 MKK7 是特异性激活 JNK 的 MAPKK)-JNK 通路和 ASK1-MKK3/MKK6-P38MAPK 是 JNK、p38 激活的信号通路之一[1]。活化后的 JNK 和 p38 以磷酸

化方式激活的转录因子如 *c-jun*、*c-fos*、ELK-1、ATF2 等能够增加参与心肌肥大的特有基因的表达[7]。②ASK1 通过凋亡途径诱导心脏肥大。ASK1 最初是作为凋亡诱导激酶被发现的，很多肥大刺激 TNF、ROS、机械牵张等都可激活 ASK1，通过压力激活蛋白激酶（JNK、p38）的活化，细胞色素 C 从线立体的释放，caspase 通路的激活，细胞核的碎裂以及与 Fas 结合蛋白 Daxx 的交互作用等而导致细胞凋亡[8]。最近研究证实细胞凋亡是心脏肥大的重要病理生理学基础之一。一方面细胞凋亡本身可导致修复性的纤维化，另一方面心肌细胞凋亡导致有效收缩功能单位进行性丧失，存活心肌细胞的代偿性功能增强，当超过一定限度失代偿后，即会引起存活心肌细胞的适应性不良肥大及细胞外基质的沉积和反应性间质纤维化。

心肌肥大的胞内信号转导通路是一个复杂的调节网络，对肥大信号通路的调控及肥大信号对核内基因表达的调控是当前该领域的热点课题。在众多的信号通路中，MAPK 途径起到了至关重要的作用，这不仅因为几乎所有的肥大刺激均可活化 MAPK 级联反应，还因为 MAPK 可活化与肥大基因结合的多种转录因子。MAPK 上游激活剂 MAPKKK 在心肌肥大中的作用也越来越受到关注。ASK1 是最近被发现的 MAPKKK 家族的一员，已被 Hirotani 等[4]作为调节心脏肥大的新的信号通路，当然目前对于 ASK1 在体内心脏肥大以及从心脏肥大到心力衰竭不同阶段中的作用研究还远远不够。对 ASK1 作用机制的研究有望为心脏肥大的治疗提供一定的理论依据。

参考文献：

[1] 胡 智，曹 亚. MAPK/JNK 信号传导通路研究进展[J]. 国外医学：分子生物学分册，2002，24(4)：222－225.

[2] 徐叔云，卞如濂，陈 修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版，北京：人民卫生出版社，2002：1028－1029.

[3] TSUJIMOTO I, HIKOSO S, YAMAGUCHI O, *et al*. The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy[J]. Hypertension 2005, 45(5): 921－926.

[4] HIROTANI S, OTSU K, NISHIDA K, *et al*. Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. Circulation, 2002, 105(4): 509－515.

[5] IZUMIYA Y, KIM S, IZUMI Y, *et al*. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin Ⅱ-induced cardiac hypertrophy and remodeling[J]. Circ Res, 2003, 93(9): 874－883.

[6] YAMAGUCHI O, HIGUCHI Y, HIROTANI S, *et al*. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15883－15888.

[7] RAMIREZ M T, SAH V P, ZHAO X L, *et al*. The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy[J]. J Biol Chem, 1997, 272(22): 14057－14061.

[8] CHARETTE S J, LAMBERT H, LANDRY J. A kinase-independent function of Ask1 in caspase-independent cell death[J]. J Biol Chem, 2001, 276(39): 36071－36074.

（编辑 王 红）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很习惯的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1. 公历世纪、年代、年、月、日和时刻　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95 年；1953－1958 年不能写成 1953－58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“：”分隔的形式，如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2. 计数和计量（整数、小数、分数、百分数、约数）包括序数、编号　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2 431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多、5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但千前以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部