论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0790-04

ATM-Akt 蛋白在梗死灶周围心肌的表达及苯肾上腺素对其的干预效应

牟 杨[1],张灿晶[2],李 刚[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院老年科心血管病组[1];400050 重庆,重庆市西郊医院功能检查科[2])

[摘要] **目的** 探讨共济失调毛细血管扩张突变-蛋白激酶 B(ATM-PKB/Akt)在梗死灶周围心肌中的改变及苯肾上腺素对其的干预效应。**方法** 32 只雄性 SD 大鼠分为心肌梗死组、假手术组、心肌梗死苯肾上腺素组、假手术苯肾上腺素组,每组 8 只。按 Litwin 方法建立心肌梗死及假手术模型。多谱勒超声仪测定心脏左室后壁厚度(LVPWd)、左室舒张末期内径(LVDd)和短轴缩短率(FS)、射血分数(EF);干预 12 周后 Western blot 检测梗死灶周围心肌中磷酸化共济失调毛细血管扩张突变蛋白(p-ATM)底物,免疫组化检测磷酸化蛋白激酶 B(p-PKB/Akt)蛋白表达。**结果** 干预后 12 周,与假手术组比较,心肌梗死组 LVPWd 增厚,LVDd 显著变大,FS、EF 显著降低($P<0.05$)。与假手术苯肾上腺素组比较,心肌梗死苯肾上腺素组 LVPWd、LVDd、FS、EF 均无显著差异($P>0.05$)。Western blot 显示心肌梗死组与假手术组 p-ATM 底物蛋白表达无显著差异($P>0.05$);与心肌梗死苯肾上腺素组(0.99±0.07)比较,心肌梗死组和假手术组p-ATM 底物蛋白表达显著下调($P<0.05$);与假手术苯肾上腺素组(0.65±0.04)比较,心肌梗死苯肾上腺素组 p-ATM 底物蛋白表达显著增高($P<0.05$)。免疫组化显示心肌梗死组与假手术组 p-Akt 阳性细胞数无显著差异($P>0.05$);与心肌梗死苯肾上腺素组(98.80±3.17)比较,心肌梗死组(74.38±3.06)和假手术组(74.50±3.99)阳性细胞数显著下调;与假手术苯肾上腺素组(75.88±2.77)比较,心肌梗死苯肾上腺素组阳性细胞数显著增高($P<0.05$)。**结论** 梗死灶周围心肌中 ATM-Akt 蛋白表达及活性无显著改变,但苯肾上腺素能显著增强 ATM-Akt 蛋白表达及活性。

[关键词] 1-磷脂酰肌醇 3-激酶;ATM-Akt;心肌梗死;苯肾上腺素

[中图法分类号] R542.220.2;R341;R977.11 **[文献标志码]** A

Changes of ATM-Akt signaling in myocardium around infarcted zones and its intervention by phenylephrine in rats

Mu Yang[1], Zhang Canjing[2], Li Gang[1] ([1]Division of Cardiology, Department of Geriatrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Function Examination, Chongqing Xijiao Hospital, Chongqing, 400050, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-Akt in the myocardium around the infarcted zones and its intervention by phenylephrine in rats. **Methods** Myocardial infarction (MI) and sham operation were established in Sprague Dawley male rats by Litwin's method. Three days after operation, surviving rats were divided into MI group ($n=8$), sham operation group ($n=8$), MI phenylephrine intervention group [$n=8$, phenylephrine 0.65 mg/(kg·d), i.p., for 8 weeks), and sham operation phenylephrine intervention group ($n=8$, phenylephrine administered as above). Cardiac left ventricular posterior wall end-diastolic thickness (LVPWd), left ventricular end-diastolic diameter (LVDd), fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) were examined by Doppler ultrasonography. Twelve weeks after treatment, the expression of p-ATM substrate protein and p-Akt protein in the myocardium around the infarcted zones were detected by Western blot analysis and immunohistochemical assay respectively. **Results** In 12 weeks after treatment, LVDd (0.79±0.06) and (0.54±0.06) cm, FS (17.31±2.60)% and (38.58±2.56)%, and EF (67.75±3.54)% and (70.25±4.33)% ($P<0.05$) respectively in group MI and sham operation. In group MI phenylephrine intervention and sham operation phenylephrine intervention groups, LVPWd was (0.12±0.01) and (0.13±0.03) ($P<0.05$), LVDd (0.64±0.05) and (0.66±0.06) cm, FS (32.00±2.73)% and (33.09±2.90)%, and EF (67.75±3.54)% and (70.25±4.33)%. The integration optical density of p-ATM substrate protein was (0.59±0.07) and (0.63±0.05) in MI and sham

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5276);重庆市卫生局医学科学技术研究项目(04-2-154,09-2-290)

[通信作者] 李 刚,电话:(023)89013841, E-mail:ganglicqmn@126.com

operation groups respectively ($P>0.05$), and was (0.99 ± 0.07) and (0.65 ± 0.04) in MI phenylephrine intervention group and sham operation phenylephrine intervention group respectively ($P<0.05$). The numbers of p-Akt positive cells were (74.38 ± 3.06) and (74.50 ± 3.99) in MI group and sham operation group respectively ($P>0.05$); and were (98.80 ± 3.17) and (75.88 ± 2.77) in MI phenylephrine intervention group and sham operation phenylephrine interventin group respectively ($P<0.05$). **Conclusion** There is no significant change in the expressions and activities of ATM-Akt signaling in myocardium around the infarcted zones. However, phenylephrine can significantly up-regulate the expressions and activities of ATM-Akt signaling.

[Key words] 1-phosphatidylinositol 3-kinase; ATM-Akt; myocardial infarction; phenylephrine

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5276) and the Research Program of Sci & Tech of Chongqing Municipal Health Bureau (04-2-154, 09-2-290). Corresponding author: Li Gang, Tel: 86-23-89013841, E-mail: harborli@126.com

共济失调-毛细血管扩张突变(ataxia-telangiectasia mutated,ATM)基因是磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)基因家族成员,PKB/Akt是PI3K家族重要的下游蛋白。研究显示Akt是重要的促心肌细胞生存分子[1],ATM与代谢综合征密切相关,ATM基因功能丧失性突变可增加冠心病易感性[2],提示ATM亦可能是促心肌细胞生存的另一重要分子。众所周知,梗死灶周围心肌细胞生存降低,凋亡增加是导致心肌梗死后心脏重塑的重要原因,但ATM-Akt信号途径分子在梗死灶周围心肌中表达是否有改变,苯肾上腺素是否对该信号途径有影响,仍然不十分清楚。因此,本研究通过观察ATM-Akt信号在梗死灶周围心肌中的改变及其苯肾上腺素干预,以期为阻止心肌梗死后心室重塑提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

32只清洁级12周龄雄性SD大鼠,体质量(250 ± 30)g(重庆医科大学实验动物中心),盐酸去氧肾上腺素注射液(批号国药准字H31021175,上海禾丰制药有限公司),彩色多普勒超声仪(美国GE公司),抗p-(Ser/Thr)ATM/ATR substrate抗体(产品号2851)、抗p-Akt(ser473)抗体(产品号4060)均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制作与实验分组 按文献[3]的方法结扎冠状动脉左前降支建立心肌梗死模型;假手术模型在相同部位只穿线不结扎。术后3 d仍存活的SD大鼠分为心肌梗死组、假手术组、心肌梗死苯肾上腺素组、假手术苯肾上腺素组,每组8只。心肌梗死组和假手术组给予等量生理盐水腹腔注射,心肌梗死苯肾上腺素组和假手术苯肾上腺素组给予盐酸苯肾上腺素注射液腹腔注射0.65 mg/(kg·d)[4],持续8周,各组常规饲养到干预后12周。

1.2.2 超声心动术检测心脏结构与功能 按美国超声心动图学会制定标准[3],于干预前及干预后每隔2周用彩色多普勒超声仪测定左室后壁舒张末期厚度(left ventricular posterior wall end-diastolic thickness,LVPWd)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVDd)和左室短轴缩短率(fractional shortening,FS)、射血分数(ejection fraction,EF)。

1.2.3 HE染色观察心肌病理改变 干预后12周,处死大鼠,取左室梗死区周边3 mm×3 mm×3 mm心肌组织,4%甲醛固定,石蜡包埋切片,HE染色,镜下观察心肌病理改变。

1.2.4 天狼猩红(PSR)染色测定心肌胶原含量 干预后12周,处死大鼠,取左室梗死区周边3 mm×3 mm×3 mm心肌组织,4%甲醛固定,石蜡包埋切片,0.1%饱和苦味酸PSR染色,每只取2张切片,镜下拍摄每张切片不含血管并互不重叠的4个视野,用IPP 6.0图像分析软件分别计算每个视野中Ⅰ、Ⅲ型胶原所占面积百分比,取其均数,分别代表Ⅰ、Ⅲ型胶原容积分数(CVFⅠ、CVFⅢ)。

1.2.5 Western blot测定心肌p-ATM底物蛋白表达 取左室梗死区周边组织50 mg,提取蛋白,电泳,免疫印迹。Quantity One图像分析。计算目的条带与β-actin条带吸光面积积分比值测定蛋白表达水平。

1.2.6 免疫组化测定心肌p-Akt蛋白表达 取左室梗死区周边3 mm×3 mm×3 mm心肌组织,4%甲醛固定,石蜡包埋切片,S-P法染色,镜下拍摄每张切片p-Akt染色阳性细胞最多但互不重叠的3个视野,用IPP 6.0图片分析软件计数每个视野的平均阳性细胞数。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SAS 8.2统计软件,多组间均数比较行方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏结构和功能改变

心肌梗死组LVPWd于实验后4周内逐渐增厚,8周后逐渐变薄,LVDd逐渐变大,FS、EF逐渐下降。干预后12周,与假手术组比较,心肌梗死组LVPWd增厚,LVDd显著变大,FS、EF显著降低($P<0.05$)。心肌梗死苯肾上腺素组在干预12周内,LVPWd逐渐增厚,LVDd逐渐变大,FS、EF逐渐升高。但干预后12周,与假手术苯肾上腺素组比较,心肌梗死苯肾上腺素组LVPWd、LVDd、FS、EF均无显著差异($P>0.05$)。见表1。

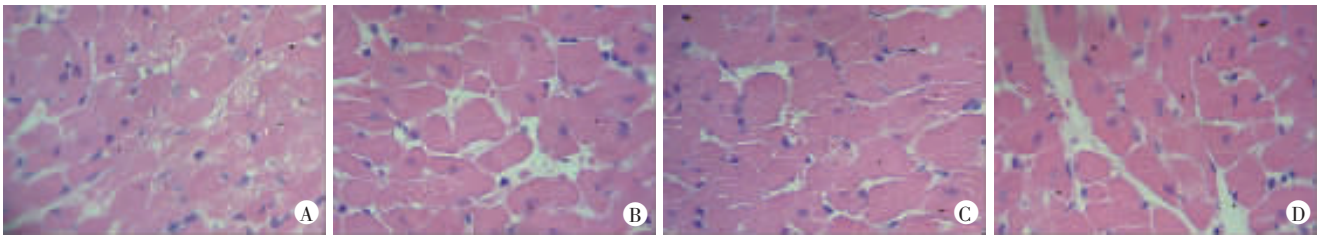
2.2 各组大鼠心肌病理改变

普通光镜HE染色下可见假手术组、假手术苯肾上腺素组左室非梗死区心肌细胞排列整齐,结构清楚;心肌梗死组左室非梗死区心肌间质广泛纤维化,残留细胞肥大;心肌梗死苯肾上腺素组左室非梗死区心肌细胞未见明显肥大。见图1。

表1 各组大鼠不同时间点心脏结构、功能及其苯肾上腺素的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

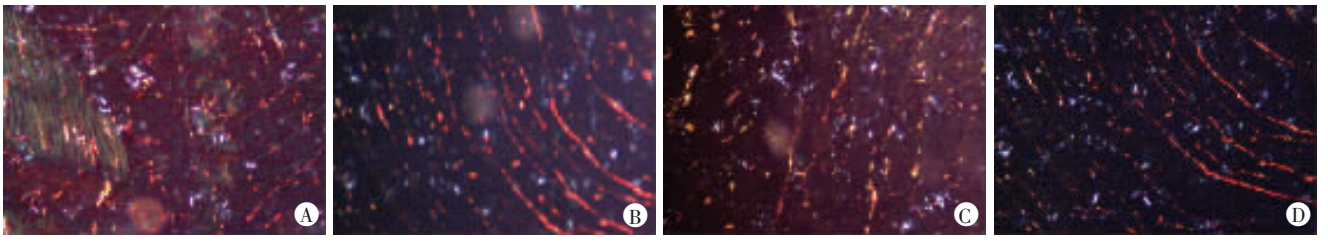
组别	LVPWd(cm)				LVDd(cm)			
	0周	4周	8周	12周	0周	4周	8周	12周
心肌梗死组	0.11±0.02	0.12±0.01	0.10±0.01[b]	0.10±0.01[bc]	0.60±0.07	0.72±0.10[a]	0.73±0.05[ac]	0.79±0.06[abc]
假手术组	0.10±0.01	0.10±0.02	0.11±0.01[b]	0.10±0.01[bc]	0.52±0.05	0.58±0.05	0.58±0.06	0.54±0.06
心肌梗死苯肾上腺素组	0.09±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	0.13±0.03	0.57±0.03	0.67±0.05	0.64±0.06	0.64±0.05
假手术苯肾上腺素组	0.09±0.09	0.11±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	0.56±0.05	0.61±0.07	0.60±0.03	0.57±0.06
组别	FS(%)				EF(%)			
	0周	4周	8周	12周	0周	4周	8周	12周
心肌梗死组	29.01±3.28	21.59±2.86[abc]	18.72±3.26[abc]	17.31±2.60[abc]	58.38±4.50	47.63±4.63[abc]	41.75±3.06[abc]	38.5±3.82[abc]
假手术组	29.40±4.73	33.46±4.73	36.83±3.08[b]	38.58±2.56[b]	62.88±6.15	64.38±5.53	70.88±2.36[b]	76.37±2.13[b]
心肌梗死苯肾上腺素组	29.76±2.65	32.60±1.79	29.90±2.45	32.00±2.73	59.63±3.96	61.88±4.05	63.00±3.63	67.75±3.54
假手术苯肾上腺素组	28.84±2.62	30.72±1.91	31.37±1.72	33.09±2.90	61.13±4.70	62.50±4.60	65.50±3.12	70.25±4.33

a：$P<0.05$ 与假手术组比较；b：$P<0.05$，与心肌梗死苯肾上腺素组比较；c：$P<0.05$，与假手术苯肾上腺素组比较



A：心肌梗死组；B：假手术组；C：心肌梗死苯肾上腺素组；D：假手术苯肾上腺素组

图1 心脏病理改变及其苯肾上腺素的影响（HE ×400）



A：心肌梗死组；B：假手术组；C：心肌梗死苯肾上腺素组；D：假手术苯肾上腺素组

图2 心肌胶原含量及其苯肾上腺素的影响（PSR ×400）

2.3 各组大鼠心肌胶原含量

偏振光显微镜下可见苦味酸天狼猩红染色Ⅰ型胶原呈黄色片状或丝状，Ⅲ型胶原呈绿色丝状。与假手术组比较，心肌梗死组及心肌梗死苯肾上腺素组CVFⅠ、CVFⅢ显著增加（$P<0.05$）；与假手术苯肾上腺素组比较，心肌梗死苯肾上腺素组CVFⅠ、CVFⅢ也显著增加（$P<0.05$）；与心肌梗死苯肾上腺素组比较，心肌梗死组CVFⅠ、CVFⅢ显著增加（$P<0.05$），而假手术组与假手术苯肾上腺素组CVFⅠ、CVFⅢ无显著差异（$P>0.05$）。见图2、表2。

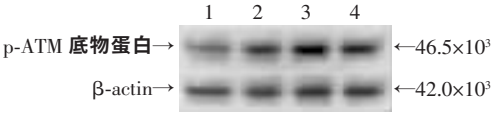
表2 各组大鼠心肌胶原容积分数［$n=8$，$(\bar{x}\pm s)\%$］

组别	CVFⅠ	CVFⅢ
心肌梗死组	14.9±0.32[ab]	3.95±0.14[ab]
假手术组	4.49±0.24[b]	1.59±0.17[b]
心肌梗死苯肾上腺素组	8.95±0.35[c]	2.88±0.13[c]
假手术苯肾上腺素组	4.23±0.36	1.46±0.09

a：$P<0.05$ 与假手术组比较；b：$P<0.05$，与心肌梗死苯肾上腺素组比较；c：$P<0.05$，与假手术苯肾上腺素组比较

2.4 各组大鼠心肌p-ATM底物蛋白表达

Western blot检测结果显示，心肌梗死组与假手术组p-ATM底物蛋白表达无显著差异［(0.59±0.07) *vs* (0.63±0.05)，$P>0.05$］；与心肌梗死苯肾上腺素组(0.99±0.07)比较，心肌梗死组和假手术组p-ATM底物蛋白表达显著下调（$P<0.05$）；与假手术苯肾上腺素组(0.65±0.04)比较，心肌梗死苯肾上腺素组p-ATM底物蛋白表达显著增高（$P<0.05$）。见图3。

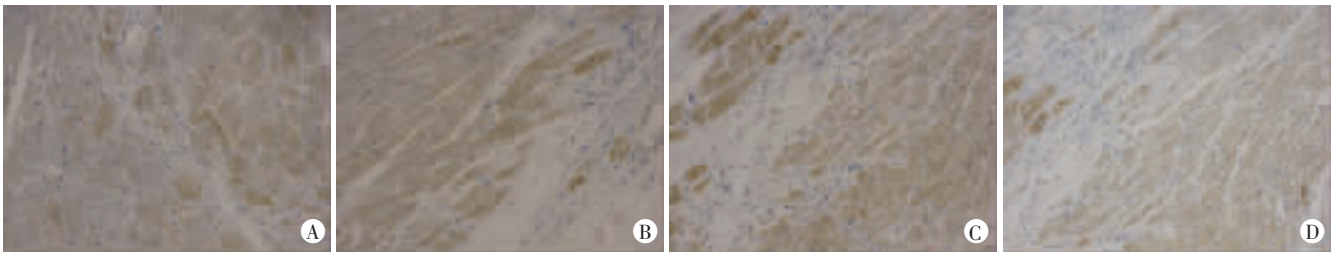


1：心肌梗死组；2：假手术组；3：心肌梗死苯肾上腺素组；4：假手术苯肾上腺素组

图3 Western blot检测心肌p-ATM底物蛋白表达及苯肾上腺素的影响

2.5 各组大鼠心肌p-Akt蛋白表达

心肌梗死组与假手术组p-Akt阳性细胞数无显著差异［(74.38±3.06) *vs* (74.50±3.99)，$P>0.05$］；与心肌梗死苯肾上腺素组(98.80±3.17)比较，心肌梗死组和假手术组阳性细胞数显著下调；与假手术苯肾上腺素组(75.88±2.77)比较，心肌梗死苯肾上腺素组阳性细胞数显著增高（$P<0.05$）。见图4。



A:心肌梗死组;B:假手术组;C:心肌梗死苯肾上腺素组;D:假手术苯肾上腺素组

图4 心肌 p-PKB/Akt 蛋白表达及其苯肾上腺素的影响(S-P ×400)

3 讨论

单基因遗传病致病基因 ATM 编码的 ATM 蛋白激酶参与细胞周期调控、DNA 损伤信号的转导及修复、凋亡、染色体稳定性的维持等过程。当细胞遭受电离辐射、药物等各种损伤因子作用造成 DNA 损伤后,依靠与 DNA 双链断裂处直接结合,染色质结构的改变均会诱导 ATM 蛋白激酶活化。有研究[5]报道在心肌细胞缺氧复氧时产生的过氧化物可使 DNA 损伤,导致 ATM 激酶的活化;ATP 的减少也能够使 ATM 激酶发生自磷酸化而被激活。但本研究显示,心肌梗死后 12 周,梗死灶周边心肌 p-ATM 底物表达无显著改变,因此我们推测 ATM 在梗死灶周边心肌中不是持续激活的。

另外,ATM 蛋白激酶是 PI3K 家族成员,广泛表达于包括心脏在内的多种组织[6]。有研究[7]发现,缺血预处理通过活化心肌 PI3K-PKB/Akt 信号通路可保护心脏。在心肌细胞、心脏成纤维细胞等心脏细胞中,PI3K 的激活能显著提高细胞存活,保护细胞免受凋亡,这些作用是其通过激活 Akt 实现的[8]。因此,激活的 Akt 具有抗细胞凋亡作用[9,10]。近年有研究[11]报道,PKB/Akt 可促进梗死灶周围尚存活心肌的生存。Hamada 等[12]用转基因小鼠研究发现增强 PI3K 活性造成的心肌肥厚是一种生理性肥厚。有研究[13]发现,在缺血预处理过程中,p-PKB/Akt 的表达存在 2 个高峰,第 1 个高峰出现在缺血预处理之后,第 2 个高峰出现在再灌注阶段,并且认为第 2 个高峰对缺血预处理诱导的心肌保护作用至关重要。本研究显示,心肌梗死后 12 周,梗死灶周边心肌 p-PKB/Akt 蛋白表达无显著改变,因此我们推测 Akt 信号通路在梗死灶周边心肌中不是持续激活的,待进一步探究。

近年研究发现,α1A/C-AR 在压力超负荷,心肌梗死等病理情况下可能通过激活 Akt、ERK 细胞生存信号通路对心肌具有保护作用[14]。苯肾上腺素是 α1-肾上腺素受体激动剂。本实验显示心肌梗死后 12 周苯肾上腺素可使梗死灶周边心肌 p-ATM 底物、p-PKB/Akt 蛋白表达及活性显著上调,使心肌胶原容积分数显著降低,使梗死室壁肥厚,其可阻止心肌梗死后心室失代偿变薄,心脏腔室扩大及心脏结构功能重构。由此我们认为苯肾上腺素可通过激活 ATM-PKB/Akt 细胞生存信号途径,调节心脏生理性肥大,增加心肌收缩力,抑制心肌细胞凋亡,促进梗死周边心肌细胞存活,加速损伤细胞修复,改善心肌梗死后心脏结构及功能重塑。

参考文献:

[1] Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38 (1): 63 - 71.
[2] Schneider J G, Finck B N, Ren J, *et al*. ATM-dependent suppression of stress signaling reduces vascular disease in metabolic syndrome[J]. Cell Metab, 2006, 4(5): 377 - 389.
[3] Litwin S E, Katz S E, Morgan J P, *et al*. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat[J]. Circulation, 1994, 89 (1): 345 - 354.
[4] Nishida M, Takagahara S, Maruyama Y, *et al*. G beta gamma counteracts G alpha(q) signaling upon alpha(1)-adrenergic receptor stimulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4): 995 - 1000.
[5] Kato H, Takashima S, Asano Y, *et al*. Identification of p32 as a novel substrate for ATM in heart[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(4): 885 - 891.
[6] Hammond E M, Denko N C, Dorie M J, *et al*. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(6): 1834 - 1843.
[7] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, *et al*. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway [J]. Cardiovasc Res, 2006, 72 (1): 152 - 162.
[8] Oudit G Y, Crackower M A, Eriksson U, *et al*. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure[J]. Circulation, 2003, 108(17): 2147 - 2152.
[9] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59 - 71.
[10] Goswami A, Burikhanov R, de-Thonel A, *et al*. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival [J]. Mol Cell, 2005, 20(1): 33 - 44.
[11] DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, *et al*. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival[J]. J Biol Chem, 2006, 281(43): 32841 - 32851.
[12] Hamada K, Sasaki T, Koni P A, *et al*. The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis[J]. Genes Dev, 2005, 19(17): 2054 - 2065.
[13] Hausenloy D J, Tsang A, Mocanu M M, *et al*. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): H971 - H976.
[14] Huang Y, Wright C D, Merkwan C L, *et al*. An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes[J]. Circulation, 2007, 115(6): 763 - 772.

(**收稿**:2009-10-22;**修回**:2009-12-17)
(编辑 吴培红)