DOI:10.16016/j.1000-5404.201411089

论著

腺苷酸激活蛋白激酶激活参与促进慢性缺氧时心肌细胞存活

李烜波,鞠胜杰,蹇 朝,李经纬,唐富琴,肖颖彬 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所)

[摘要] **目的** 检测腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)在慢性缺氧心肌组织中的激活水平,探讨AMPK激活对慢性缺氧心肌细胞存活的影响及其意义。**方法** 选择本科2013年行手术矫治的先心病患儿24例,其中紫绀型先心病患儿12例,非紫绀型先心病患儿12例,取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本;选用4~6周龄清洁级雄性SD大鼠24只,分为常氧组和缺氧组($n=12$)。将缺氧组置入低压舱(模拟海拔5 000 m,气压405 mmHg),常氧组正常饲养。同时喂养28 d后,处死大鼠后迅速取出心脏并分离出右心室部分作为标本。采用Western blot分别检测p-AMPK在人体、大鼠缺氧心肌组织中的激活水平。选用H9c2心肌细胞株,并将其分为常氧组、低氧组、阻断组、激活组。将后3组细胞置入缺氧培养箱3 d(94% N_2,5% CO_2,1% O_2),建立H9c2心肌细胞株慢性缺氧模型;常氧组置入细胞培养箱3 d,对照培养。分别向阻断组和激活组中加入AMPK特异性阻断剂Compound C和激活剂AICAR,采用Western blot检测p-AMPK的表达,流式细胞仪、TUNEL法检测心肌细胞凋亡,Hoechst33528染色观察细胞核形态、LDH测定心肌细胞死亡率。**结果** Western blot结果显示与常氧组相比,缺氧心肌组织中p-AMPK/AMPK比值明显增高。与低氧组比较,AMPK阻断组凋亡细胞比例升高,TUNEL-阳性细胞比例、不正常核比例、细胞死亡率均明显升高($P<0.05$,$P<0.01$);AMPK激活组与低氧组比较,凋亡细胞比例、TUNEL-阳性细胞比例、不正常核比例、细胞死亡率均有降低($P<0.05$)。**结论** 在慢性缺氧条件下,AMPK蛋白磷酸化水平增强,p-AMPK对心肌细胞慢性缺氧适应具有一定保护作用。

[关键词] 腺苷酸激活蛋白激酶;慢性缺氧;心肌细胞
[中图法分类号] R322.11;R345.57;R364.4 [文献标志码] A

AMPK activation participates in promoting myocardial cell survival in chronic hypoxia

Li Tianbo, Ju Shengjie, Jian Zhao, Li Jingwei, Tang Fuqin, Xiao Yingbin (Institute of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation level in chronic hypoxic myocardial tissues, and explore the protective effect of phosphorylated AMPK (p-AMPK) to the currival of chronic hypoxic myocardial cells. **Methods** Twenty-four children with congenital heart disease, including 12 cases of cyanotic type and type 12 cases of non-cyanotic, were selected from Xinqiao Hospital of Third Military Medical University in 2013, and the myocardial tissues of right ventricular outflow tract were taken out as samples. Twenty-four SD male rats were divided into normoxic control group and hypoxia group. The hypoxia group was placed in a low-pressure tank (simulated altitude of 5 000 m, 405 mmHg), while the normoxic control group received normal feeding. After feeding for 28 d, the rats were executed and the hearts were immediately taken out to isolate the right ventricular tissues. Western

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270228)
[通信作者] 肖颖彬,E-mail:xiaoyb@vipsina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150312.1030.003.html(2015-03-12)

blotting was used to detect the activation level of AMPK in the hypoxic myocardial tissues of the children and rats. H9c2 myocardial cells were divided into normoxic control group, hypoxia group, blocking group and activation group. Except the normoxic control group, other three groups were placed in a hypoxia incubator (94% N_2, 5% CO_2, 1% O_2) for 3 d to establish H9c2 chronic hypoxia cell models, while the normoxic control group was cultured in a cell culture box for 3 d in comparison. AMPK-specific blocker Compound C and activator AICAR were added to the blocking group and the activation group, respectively. Western blotting was employed to detect the expression of p-AMPK, and flow cytometry and TUNEL assay were adopted to detect myocardial cell apoptosis. The cell nucleus shape was observed by Hoechst staining, and myocardial cell death was measured with LDH test kit. **Results** Western blot results showed that compared with the normoxian group, the p-AMPK/AMPK ratio in the hypoxic myocardial tissue was increased significantly. Compared with the hypoxia group, the apoptosis cell percentage, TUNEL-positive cell percentage ($P < 0.05$), abnormal nuclear scale ($P < 0.01$), and cell mortality ($P < 0.01$) of the blocking group were increased significantly. Compared with the hypoxia group, the apoptosis cell percentage, TUNEL-positive cell percentage ($P < 0.05$), abnormal nuclear scale ($P < 0.05$), and cell mortality ($P < 0.05$) of the AMPK activation group were decreased. **Conclusion** Under the condition of chronic hypoxia, AMPK protein phosphorylation level is enhanced, and p-AMPK provides a certain protective effect to myocardial cells in chronic hypoxia adaptation.

[**Key words**] monophosphate-activated protein kinase; chronic hypoxia; myocardial cell

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270228). Corresponding author: Xiao Yingbin, E-mail: xiaoyb@vipsina.com

先天性心脏病是婴幼儿最常见的先天性畸形,而紫绀型先心病是其重要的组成部分。尽管目前紫绀型先心病的临床治疗已较为成熟,但复杂性紫绀型先心病的手术死亡率仍然较高[1]。复杂性紫绀型先心病的病理生理改变尚不清楚,导致围手术期中缺乏有效的心肌保护策略,是制约临床治疗水平的瓶颈[2],而心肌慢性缺氧是紫绀型先心病共有的临床特点及病理改变,因此,深入研究心肌慢性缺氧的适应机制具有重要意义。

在心肌慢性缺氧适应机制的研究中,既往研究已证实在慢性缺氧条件下,心肌通过增加线粒体生物合成[3]、改变能量代谢相关酶活性以及转录水平[4-5]等一系列调节来满足心肌能量需求。能量代谢调节是心肌适应慢性缺氧的关键步骤,深入研究心肌慢性缺氧能量代谢调节可能为围手术期的有效心肌保护提供新的方向。

腺苷酸激活蛋白激酶(monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是一种在真核细胞生物中广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛参与糖类代谢、脂质代谢、蛋白质代谢等细胞生理代谢的调控。近年来,AMPK在心血管系统中的作用被广泛关注,被认为是疾病状态下心脏能量代谢的"中心调控分子"[6]。既往研究证实心肌细胞在慢性缺氧适应中,AMPK激活水平增加并作用于转移抑制因子(migration inhibitory factor, MIF),但对心肌细胞的影响暂不清楚[7]。本研究将检测AMPK在慢性缺氧条件下的激活水平,探讨AMPK激活对慢性缺氧心肌细胞的影响及意义,旨在提高紫绀型复杂先心病围手术期的心肌保护治疗水平。

1 资料与方法

1.1 临床资料与分组

研究经第三军医大学新桥医院伦理委员会批准,术前征得患儿家属同意并签署知情同意书。以入院后经我院经验丰富的心脏彩超技师复查的心脏彩色多普勒超声检查结果为诊断标准,如行心室造影检查,则以造影检查结果作为确诊标准。常温环境不吸氧1 h以上测四肢血压和血氧饱和度。纳入标准:紫绀组,平均血氧饱和度<85%且四肢血氧饱和度差异≤2%,临床诊断为法洛氏四联症(tetralogy of fallot, TOF),术中需要行右室流出道疏通术;非紫绀组,平均血氧饱和度>95%且四肢血氧饱和度差异<2%,临床诊断为室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)合并右室流出道狭窄,术中行室间隔修补术、同时行右室流出道疏通术。按照以上纳入标准[8],入选2013年在本科行手术治疗的先心病患儿34例,其中紫绀组20例,非紫绀组14例。从上述2种疾病中各选出12例患儿(表1)。所有患儿入院后病史、查体和实验室检查排除心脏合并畸形、唐氏综合征及其他系统病变。

表1 紫绀组和非紫绀组患儿临床资料

组别	n	性别(男/女)	手术时年龄(月,$\bar{x}\pm s$)	临床诊断	射血分数(%,$\bar{x}\pm s$)	术前血氧饱和度(%,$\bar{x}\pm s$)	血红蛋白(g/L,$\bar{x}\pm s$)
紫绀组	20	5/7	87.0±27.9	TOF	71.4±1.7[a]	81.7±2.0[a]	148.7±8.5
非紫绀组	14	8/4	72.0±47.3	VSD	70.3±2.5	98.3±1.6	129.3±2.2

a:$P<0.05$,与非紫绀组比较

1.2 材料

1.2.1 动物与分组 选用24只清洁级SD大鼠,4~6周龄,雄性,购自第三军医大学新桥医院实验动物中心,分为常氧组和缺氧组($n=12$),体质量(156.1±16.3)g。

1.2.2 试剂 p-AMPK(T172)兔抗大鼠单克隆抗体、AMPK兔抗大鼠单克隆抗体(CST),β-actin兔抗大鼠单克隆抗体(博奥森公司),辣根酶标记山羊抗兔IgG(中杉金桥公司),RIPA(自配),PMSF、磷酸酶抑制剂、BCA试剂盒(碧云天公司),H9c2心肌细胞株(ATCC),DMEM高糖、FBS(Gibco公司),双抗(Hyclone公司),胰酶、Compound C、AICAR(Sigma公司),DMSO(索莱宝公司),LDH细胞检测试剂盒、Hoechst染色试剂盒、TUNEL检测试剂盒(碧云天公司)、Annexin V-FITC双染(BD公司)

1.3 方法

1.3.1 动物处理 将缺氧组SD大鼠置入低压舱(贵州风雷航空军械有限责任公司);模拟海拔5 000 m,气压405 mmHg(第三军医大学高原军事医学系低压氧舱);大鼠自由进食和饮水;常氧组SD大鼠由第三军医大学新桥医院动物中心正常饲养。同时喂养28 d后,建立SD大鼠慢性缺氧模型和常氧对照SD大鼠(表2)。

表2 2组SD大鼠血氧饱和度和血红蛋白比较($n=12$,$\bar{x}\pm s$)

组别	血氧饱和度(%)	血红蛋白(g/L)
常氧组	91.67±1.20	14.20±1.36
慢性缺氧组	71.00±1.16[a]	17.30±1.53

a:$P<0.05$,与常氧组比较

1.3.2 标本的收集 ①人体心肌组织:常规麻醉、开胸建立体外循环,取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本。②大鼠心肌组织:缺氧组经过慢性缺氧处理后,测定血氧饱和度后经断颈法处死并迅速开胸取出心脏,分离右心室及左心室和室间隔,取右室部分,锡箔纸包裹后存于-80 ℃备用。

1.3.3 Compound C和AICAR处理缺氧心肌细胞

将H9c2细胞株置入缺氧培养箱(94% N_2,5% CO_2,1% O_2),36 h更换1次培养液(培养液含10%胎牛血清),培养72 h后建立慢性缺氧模型[9]。根据不同实验要求,将慢性缺氧心肌细胞转移至6孔板、96孔板或制作细胞爬片,细胞密度在$5\times10^4/cm^2$左右,向各组细胞加入处理因素:低氧组(加入等量DMSO)、阻断组(加入Compound C,使其终浓度为20 μmol/L)[10-11]、激活组(加入AICAR,使其终浓度为0.5 mmol/L)[12-13],继续置入缺氧培养箱培养12 h。与此同时,设立同等时间的常氧对照组。抽提上述4组心肌细胞蛋白,用Western blot测定p-AMPK激活水平;将细胞爬片用TUNEL和DAPI染色,并在荧光显微镜下观察荧光;用Annexin V-FITC染色,流式细胞仪观察细胞凋亡比例;用LDH细胞检测试剂盒处理,酶标仪测定光密度值;用hoechst染色后,荧光显微镜下对比各组细胞核变化。

1.3.4 Western blot测定p-AMPK激活水平 心肌组织:从-80 ℃中取出冻存的心肌组织,取0.1 g溶解于组织裂解液中制成匀浆;心肌细胞:收集上述各组处理的细胞于EP管中,PBS缓冲液漂洗后,加入细胞裂解液。离心30 min后取上清液用BCA法测定蛋白质含量。各标本取等量蛋白质样品于100 ℃加热5 min后,上样于10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白质从SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移到聚偏二氟乙烯滤膜上,在5% BSA中封闭1 h。随后,加入p-AMPK(T172)兔抗大鼠单克隆抗体,置4 ℃过夜,以β-actin为内参。再加入山羊抗兔IgG室温孵育1 h,ECL显影成像,凝胶成像系统采集图片。图像用Image-Pro Plus 6.0软件进行分析,用p-AMPK/AMPK条带灰度比值表示蛋白表达量。

1.3.5 TUNEL实验 将4组细胞爬片用4%多基甲醛固定30 min,PBS缓冲液洗5 min,加入含0.1% Triton X-100的PBS冰浴孵育2 min,PBS缓冲液冲洗10 min×2次,将TUNEL工作液加入6孔板中37 ℃避光孵育60 min,PBS缓冲液冲洗10 min×3次,DAPI

染色液染色 10 min,PBS 缓冲液冲洗 5 min×3 次,将爬片取出,抗荧光淬灭剂封片,免疫荧光显微镜下采集图片。用 Image-Pro Plus 6.0 软件随机抽取 6 个区域分别测定 TUNEL 荧光数量,DAPI 染色细胞核数量,用 TUNEL 荧光数量/DAPI 细胞核数量表示细胞凋亡水平。

1.3.6 流式细胞仪检测 收集上述 4 组处理的细胞于 EP 管,PBS 缓冲液漂洗,加入 Annexin V-FITC 检测液重新悬浮细胞,同时加入碘化丙啶染色液,轻轻混匀,室温避光孵育 20 min,随即进行流式细胞仪检测。以损伤细胞比例(%) = Q_2(晚期凋亡 + 坏死细胞) + Q_3(早期凋亡细胞)评价心肌细胞损伤水平。

1.3.7 LDH 细胞死亡率检测实验 将正常心肌细胞、慢性缺氧心肌细胞分别接种于 96 孔板,按照上述分组,每组 6 孔(3 孔为 LDH 测定孔,另 3 孔为 LDH 最大酶活性测定孔),另加 3 孔背景空白孔,共计 27 孔。待细胞贴壁后,PBS 缓冲液漂洗,更换培养基,按上述方法处理细胞,提前 1 h 向 LDH 最大酶活性测定孔中加入 LDH 释放剂,37 ℃孵育 1 h,离心机 400×g 离心 5 min,分别吸取各孔上清液,加入 LDH 检测工作液,酶标仪测定各孔光密度值。计算细胞死亡率[细胞死亡率 =(处理样品光密度值 - 样品对照孔光密度值)/(细胞最大酶活性的光密度值 - 样品对照孔光密度值)×100%]。

1.3.8 Hoechst 染色实验 将含有上述 4 组处理细胞的 96 孔板用 PBS 缓冲液漂洗,加入 Hoechst33528 染色液,37 ℃孵育 20 min,弃染色液,PBS 缓冲液漂洗 5 min×3 次,滴入抗荧光淬灭液,用荧光显微镜采集图像。每组随机选取 6 个区域观察不正常细胞核,采用不正常细胞核数量/总细胞核数量表达各组细胞凋亡情况。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析法,两两比较用 LDS 法;两组比较采用独立样本 t 检验。

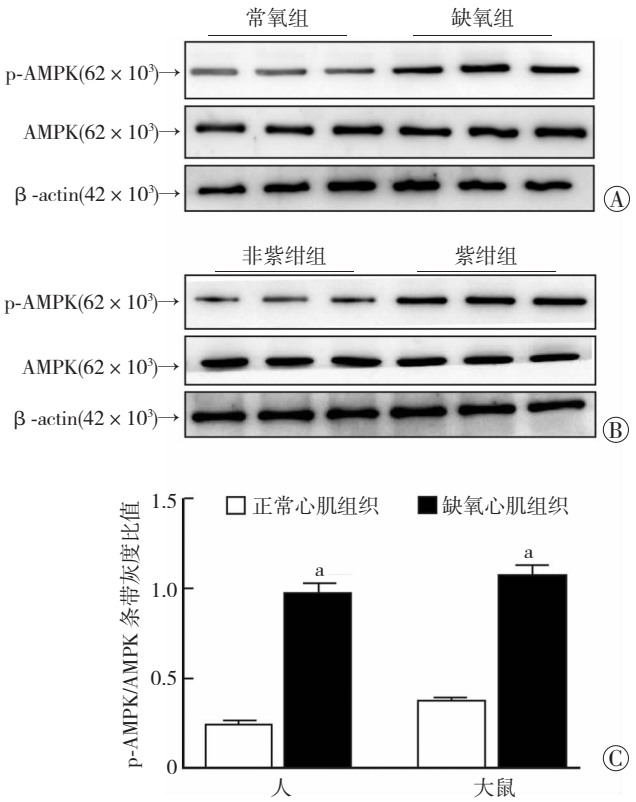
2 结果

2.1 慢性缺氧心肌组织中 AMPK 磷酸化水平

与非紫绀组(常氧组)相比,紫绀组先心病患儿(慢性缺氧组 SD 大鼠)心肌细胞中 AMPK 蛋白激活水平明显增加($P<0.01$,图 1)。

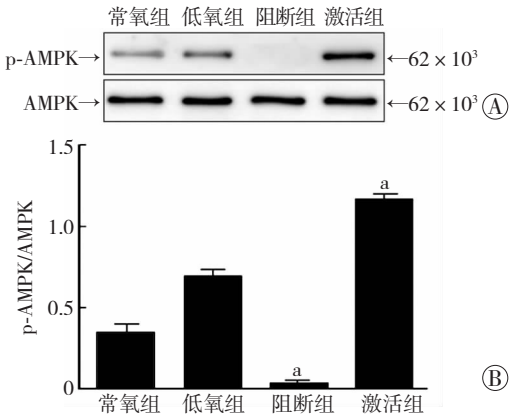
2.2 药物干预后慢性缺氧心肌细胞 AMPK 磷酸化水平

常氧组、低氧组、阻断组、激活组 4 组心肌细胞中 p-AMPK 蛋白激活水平均有明显差异($P<0.05$),且阻断组、激活组分别与低氧组比较,差异有统计学意义($P<0.01$,图 2)。



A、B:分别为 SD 大鼠和人体心肌组织 Western blot 检测结果;C:半定量分析 a:$P<0.01$,与正常心肌组织比较

图 1 Western blot 检测 p-AMPK 在慢性缺氧心肌组织中的激活

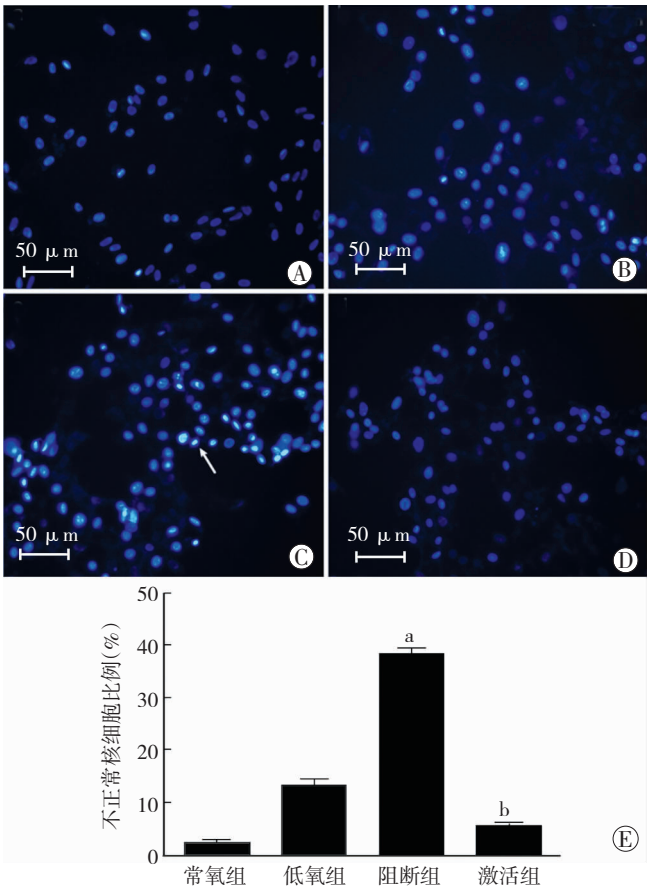


A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 a: $P<0.01$,与低氧组比较

图 2 Western blot 检测药物干预后各组心肌细胞 p-AMPK 激活水平

2.3 药物干预后各组心肌细胞 Hoechst 染色观察

与低氧组比较,阻断组不正常核细胞比例明显增多($P<0.01$),同时,激活组与低氧组相比不正常核细胞比例降低($P<0.05$,图 3)。



A ~ D:Hoechst33528 染色观察,分别为常氧组、低氧组、阻断组、激活组 箭头示不正常细胞核;E:不正常细胞核数与总细胞核数比值 a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与低氧组比较

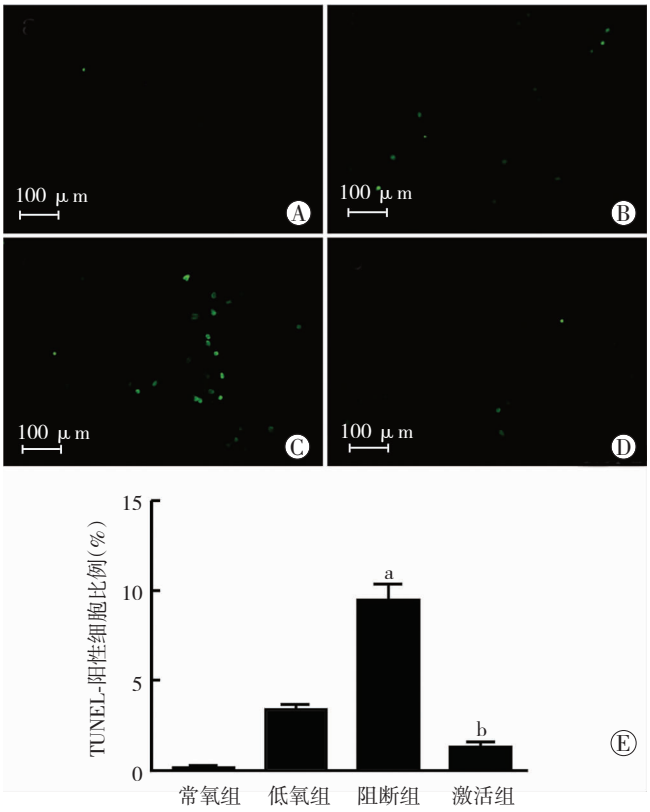
图 3 药物干预后各组心肌细胞 Hoechst 染色观察

2.4 流式细胞仪检测药物干预后各组心肌细胞凋亡

常氧组、低氧组、阻断组、激活组凋亡细胞比例分别为 4.33%、8.15%、18.45%、5.12%,与低氧组相比,激活组凋亡细胞比例降低,而阻断组凋亡细胞比例升高(图 4)。

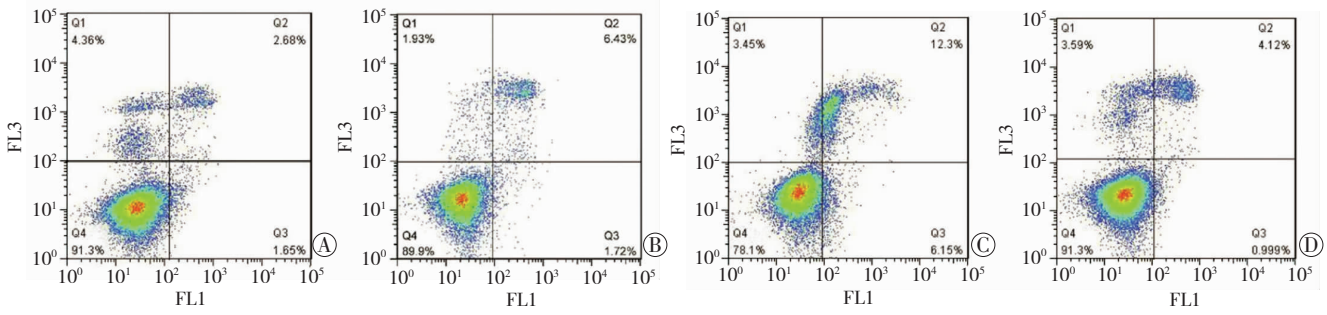
2.5 TUNEL 检测药物干预后各组心肌细胞凋亡

常氧组、低氧组、阻断组、激活组 4 组间 TUNEL-阳性细胞比值差异均有显著性($P<0.05$)。与低氧组比较,阻断组 TUNEL-阳性比值升高,激活组降低($P<0.01$,$P<0.05$,图 5)。



A ~ D: TUNEL 检测心肌细胞凋亡,分别为常氧组、低氧组、阻断组、激活组;E:TUNEL-阳性细胞与总细胞数(DAPI 染色)比值 a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与低氧组比较

图 5 TUNEL 检测药物干预后各组心肌细胞凋亡

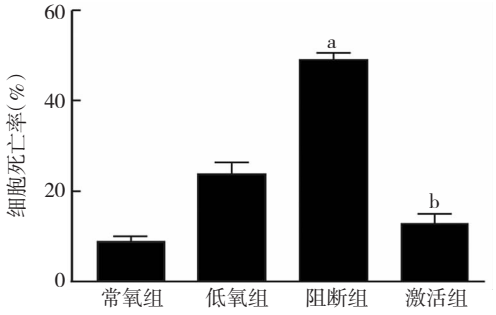


A ~ D:分别为常氧组、低氧组、阻断组、激活组

图 4 流式细胞仪检测药物干预后各组心肌细胞凋亡

2.6 各组心肌细胞死亡率

与低氧组比较,阻断组细胞死亡率明显增高,而激活组则降低($P<0.05$,$P<0.01$,图6)。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与低氧组比较

图6 LDH测定药物干预后各组心肌细胞死亡率

3 讨论

心肌慢性缺氧是临床常见的病理生理过程,紫绀型先心病、稳定型冠心病等是临床常见的导致心肌慢性缺氧的疾病类型。在慢性缺氧过程中,心肌会逐渐产生一系列适应性变化,以保证心肌的存活和功能维持,这些防御性变化被统称为心肌慢性缺氧适应[14]。目前认为心肌慢性缺氧适应中的保护作用包括ATP敏感性钾通道激活、NOS活性改变及NO生成增加、各种蛋白激酶激活等方面[15-16],但心肌细胞能量代谢调节仍是心肌慢性缺氧适应中的保护作用中的主要环节。

作为心肌细胞能量调节的关键激酶[17],AMPK在慢性缺氧条件下,与常氧条件相比,其激活水平明显增高;在进一步探讨p-AMPK在心肌慢性缺氧适应的影响研究中,我们通过加入AMPK特异性阻断剂Compound C和特异性激活剂AICAR,实现对AMPK的阻断和激活。在细胞凋亡方面,流式细胞仪和TUNEL实验的结果显示:与低氧组相比,AMPK阻断组凋亡细胞比例明显升高,相反,AMPK激活组凋亡水平低于低氧对照组;同时在细胞死亡方面,Hoechst染核和LDH心肌细胞死亡率测定结果显示:AMPK阻断组心肌细胞死亡率明显高于低氧对照组,而AMPK激活组与低氧对照组相比,细胞死亡率却有所下降。本研究结果提示:在心肌慢性缺氧适应中,AMPK的激活对减少心肌损伤有着重要作用。

既往研究中,虽有文献[18]报道AMPK激活可促进肿瘤细胞在慢性缺氧条件下的存活,但本研究发现AMPK激活仍然参与促进慢性缺氧时心肌细胞的存活,这无疑给复杂性紫绀型先心病围手术期的心肌保护治疗提供了新的方向,但AMPK激活对慢性缺氧时心肌细胞的保护作用的具体机制仍不清楚。究其原因,AMPK在急性或慢性缺氧、心肌缺血、心室超负荷等能量状态时被激活,活化的AMPK通过调节下游效应分子,增加葡萄糖的摄取、转移进而增加能量合成,同时抑制蛋白合成的能量消耗途径[19-20],从而对心肌产生一定的保护作用。最新研究表明,激活的AMPK还可能通过AMPK-ULK1-Beclin1-VSP34途径介导细胞自噬[21-22],通过溶酶体对细胞结构的降解、原料的再循环对心肌产生保护作用。因此,进一步研究AMPK在心肌慢性缺氧适应中的保护作用的机制,可能为紫绀型先心病围手术期的心肌保护治疗提供新的策略。

参考文献:

[1] Kornosky J L, Salihu H M. Getting to the heart of the matter: epidemiology of cyanotic heart defects[J]. Pediatr Cardiol, 2008, 29(3): 484-497.

[2] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, *et al*. Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2012, 125(1): e2-e220.

[3] Chitra L, Boopathy R. Altered mitochondrial biogenesis and its fusion gene expression is involved in the high-altitude adaptation of rat lung[J]. Respir Physiol Neurobiol 2014, 192: 74-84.

[4] Nouette-Gaulain K, Biais M, Savineau J P, *et al*. Chronic hypoxia-induced alterations in mitochondrial energy metabolism are not reversible in rat heart ventricles[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2011, 89(1): 58-66.

[5] Essop M F. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia[J]. J Physiol, 2007, 584(Pt 3): 715-726.

[6] Arad M, Seidman C E, Seidman J G, *et al*. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease[J]. Circ Res, 2007, 100(4): 474-488.

[7] Jian Z, Li J B, Ma R Y, *et al*. Increase of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in cardiomyocytes during chronic hypoxia[J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1/2): 132-138.

[8] 蹇朝, 马瑞彦, 王咏, 等. 缺氧诱导因子-1α在紫绀型先心病患儿心肌中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1189-1192.

[9] He S, Liu P, Jian Z, *et al*. miR-138 protects cardiomyocytes

from hypoxia-induced apoptosis *via* MLK3/JNK/c-jun pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(4): 763-769.

[10] Borgdorff V, Rix U, Winter G E, *et al*. A chemical biology approach identifies AMPK as a modulator of melanoma oncogene MITF[J]. Oncogene, 2014, 33(19): 2531-2539.

[11] Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al*. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132-141.

[12] Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, *et al*. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD + metabolism and SIRT1 activity[J]. Nature, 2009, 458(7241): 1056-1060.

[13] Liang J, Shao S H, Xu Z X, *et al*. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(2): 218-224.

[14] Kolar F, Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia[J]. Physiol Res, 2004, 53(Suppl 1): S3-S13.

[15] Baker J E, Holman P, Kalyanaraman B, *et al*. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 874: 236-253.

[16] Eells J T, Henry M M, Gross G J, *et al*. Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics? [J]. Circ Res, 2000, 87(10): 915-921.

[17] Hardie D G, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? [J]. Eur J Biochem, 1997, 246(2): 259-273.

[18] Borger D R, Gavrilescu L C, Bucur M C, *et al*. AMP-activated protein kinase is essential for survival in chronic hypoxia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(2): 230-234.

[19] Young L H. AMP-activated protein kinase conducts the ischemic stress response orchestra[J]. Circulation, 2008, 117(6): 832-840.

[20] Dyck J R, Lopaschuk G D. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? [J]. J Physiol, 2006, 574(Pt 1): 95-112.

[21] Egan D F, Shackelford D B, Mihaylova M M, *et al*. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. Science, 2011, 331(6016): 456-461.

[22] Russell R C, Tian Y, Yuan H, *et al*. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 741-750.

(收稿:2014-11-23;修回:2014-12-28)

(编辑 王 红)