

非诺贝特通过 FoxO1 抑制心肌肥大

刘 薇² 郑强荪^{1△} 郭万刚¹ 杨国栋³ 卢晓昭³

(1 解放军第四军医大学唐都医院心内科 陕西 西安 710038 2 解放军第四五一医院心内科 陕西 西安 710054 ;

3 解放军第四军医大学生物化学与分子生物教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨非诺贝特(fenofibrate)对血管紧张素 (Ang)诱导的肥大心肌细胞的抑制作用及对 FoxO1 表达的影响。方法 :首先采用 Ang 诱导心肌细胞肥大 将细胞分为三组 :对照组 :未给予任何干预 ;心肌细胞肥大组 :Ang (10⁻⁷ mol / L)刺激细胞 ;治疗组 :先给予 fenofibrate (10⁻⁵ mol / L) 30min 后 Ang (10⁻⁷ mol / L)刺激细胞。应用蛋白免疫印迹法(western-blotting)和实时定量 PCR 法(real time PCR)检测各组细胞中转录因子 FoxO1 的蛋白质及 mRNA 含量 心肌细胞肥大的判断使用脑钠肽(brain natriuretic peptide BNP)。结果 :心肌细胞肥大组的 FoxO1 表达较对照组明显降低 ,而治疗组的 FoxO1 表达较心肌肥大组明显升高。结论 :非诺贝特可能通过上调 FoxO1 表达 ,从而抑制心肌细胞肥大。

关键词 非诺贝特 ;血管紧张素 ;心肌肥大 ;FoxO1

中图分类号 :Q813 .R54 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)08-1449-03

Inhibiting Effects of Fenofibrate on Myocardial Hypertrophy Mediated by FoxO1

LIU-wei^{1,2} ,ZHENG Qiang-sun^{1△} ,GUO Wan-gang¹ ,YANG Guo-dong³ ,LU Xiao-zhao³

(1 Department of Cardiology,Tangdu Hospital,Fourth Military Medical University,Xian 710038,S hanxi,China;

2 NO.451 Hospital of PLA, Xian 710054, Shanxi, China;

3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Meducal University, Xi'an 710032,Shaanxi,China)

ABSTRACT Objective: To investigate effect of fenofibrateon on myocardial hypertrophy induced by angiotensin II (Ang II) and transcription factor FoxO1 expression for theoretical bases of preventing and treating myocardial hypertrophy. **Methods:** H9C2 cells were divided into 3 groups: nomal control group; hypertrophy group: cells were stimulated by Ang (10⁻⁷ mol/L); treatment group :cells were treated with fenofibrate (10⁻⁵ mol/L), 30 min before adding Ang (10⁻⁷mol/L). The method of western-blotting and real time PCR were adopted to detect the FoxO1 expression. Brain natriuretic peptide (BNP) was the symbol of cardiac myocyte hypertrophy. **Results:** The mRNA and protein level of FoxO1 decreased significantly in the hypertrophy group compared with that in the normal control and treatment group. **Conclusion:** Fenofibrate inhibits cardiac myocyte hypertrophy, upregulates the expression of FoxO1.

Key words: Fenofibrate; Angiotensin II; Myocardial hypertrophy; FoxO1

Chinese Library Classification(CLC): Q813, R54 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)08-1449-03

前言

心肌肥大是发生心肌缺血、心律失常和猝死的独立危险因素^[1],其发病机制尚不完全清楚,因而缺乏有效的防治措施。近期转录因子在心肌肥大中的作用受到广泛关注,其中转录因子 FoxO1 是研究的热点,参与氧自由基的生成、细胞凋亡、细胞周期的调控,是心肌肥大的负性调控因子^[2,3]。非诺贝特是过氧化物酶体增殖物激活受体-α(peroxisome proliferator-activated receptor-α,PPAR-α)的激动剂,大量研究表明 PPAR-α 不仅参与调节心脏能量代谢,还调节心肌肥大的发生,但是其具体机制并不清楚^[4]。本研究旨在探讨非诺贝特和转录因子 FoxO1 的相互作用与心肌肥大的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

H9C2 细胞系(中科院上海细胞库);Ang、fenofibrate(辉瑞公司);DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(Hyclone 公司);兔抗 FoxO1 多克隆抗体(Merck 公司);鼠抗 α-tubulun 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);TRIzol(Invitrogen 公司);反转录试剂盒(Promega 公司);引物(上海生工生物技术公司);实时定量 PCR 反应所用试剂(Genecopoeia 公司)。

1.2 肥大模型建立

以 5×10⁴ 个/mL 的密度将 H9C2 细胞接种于 6 孔板,每孔分别加入 2mL10%胎牛血清,置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养,24 小时后换 2%胎牛血清培养液,并继续孵育 24 小时后,每孔细胞均加入 10⁻⁷mol / L Ang,分别在 1 小时、6 小时、12 小时、18 小时、24 小时、36 小时收取样本。每组设 3 个复孔,实验重复 10 次。

1.3 实验分组

作者简介 刘薇(1980-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向心血管电生理研究,E-mail liuweii800626@sina.com

△通讯作者 郑强荪 E-mail qingshu@fmmu.edu

(收稿日期 2011-11-23 接受日期 2011-12-20)

将细胞分为三组 ,对照组 :培养液中无干预因素 ;心肌肥大组 :加入 10^{-7} mol/L Ang ; 治疗组 :预先给予 fenofibrate (10^{-5} mol/L) 30min 后再加入 Ang (10^{-7} mol/L)。每组设 3 个复孔 ,实验重复 10 次。根据成功建立肥大模型的结果 给予细胞相应时间段刺激。

1.4 RNA 提取和实时定量 PCR

收集上述各组细胞 ,每孔加入 TRIzol500ml ,按照操作说明提取细胞总 RNA ,并反转录合成 cDNA。使用 Primer Premier 5.0 进行引物设计 ,BNP 序列如下 :上游 5'-TGA TTC TGC TCC TGC TTT TC-3', 下游 5'-GTG GAT TGT TCT GGA GAC TG-3' ; FOXO1 引物序列 :上游 5'- TAC GAG TGG ATG GTG AAG GA -3', 下游 5'-GAC AGA TTG TGG CGA ATT GA-3' β -actin 引物序列 :上游 5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC-3', 下游 5'-AAC AGT CCG CCT AGA AGC AC-3'。扩增条件为 95℃ 预变性 10 S ,95℃ 5S ,60℃ 退火延伸 20S ,循环 40 次 ,反应体系为 20 μ L。

1.5 Western blot 法检测 FoxO1 蛋白表达

按本实验室常规方法提取蛋白样品及进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白 ,半干式电转移法将蛋白质转移到 NC 膜上。用含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭 2h 后 ,加入用 TBST 以 1 :1000 稀释的一抗 ,放入 4℃ 冰箱过夜 ,第二天 TBST5min 洗 3 次 ,加入按 1 :2000 稀释的二抗 ,室温避光摇晃孵育 2h ,用 TBST5min 洗 3 次 ,采用 Odessey 影像系统观察并照相分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 12.0 软件进行数据分析 ,各组数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 ,两组均数间比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 肥大模型的建立

Real time PCR 反应结束后 β -actin mRNA 的 CT 值作为参照 ,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果 ,计算 BNP mRNA 表达的相对量。Ang 作用 12 小时组较其他时间段明显增高($P<0.05$)。

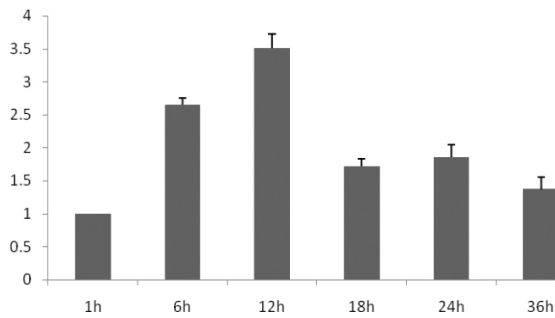


图 1 BNPmRNA 表达

Fig.1 Expression of BNP mRNA

注 :▲ $P<0.05$,1 小时对 12 小时;● $P<0.05$,6 小时对 12 小时;
$P<0.05$,18 小时对 12 小时;★ $P<0.05$,24 小时对 12 小时;◆ $P<0.05$,36 小时对 12 小时
Note: ▲ $P<0.05$,1h with 12h;● $P<0.05$,6h with 12h; # $P<0.05$,18h with 12h;★ $P<0.05$,24h with 12h; ◆ $P<0.05$,36h with 12h

2.2 非诺贝特对 Ang 诱导的肥大心肌细胞中 FoxO1 及 BNP

mRNA 表达的影响

BNP 表达变化 心肌肥大组明显高于对照组和治疗组 ($P<0.05$) ,见图 2。FoxO1 的表达变化 心肌肥大组明显低于对照组和治疗组($P<0.05$) ,见图 3。

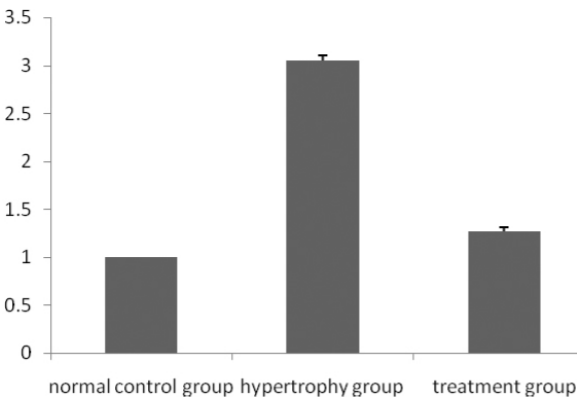


图 2 BNPmRNA 表达

Fig.2 Expression of BNPmRNA

注 :▲ $P<0.05$,心肌肥大组与对照组 ;● $P<0.05$,心肌肥大组与治疗组
Note: ▲ $P<0.05$,hypertrophy group compared with nomal control group;
● $P<0.05$,hypertrophy group compared with treatment group.

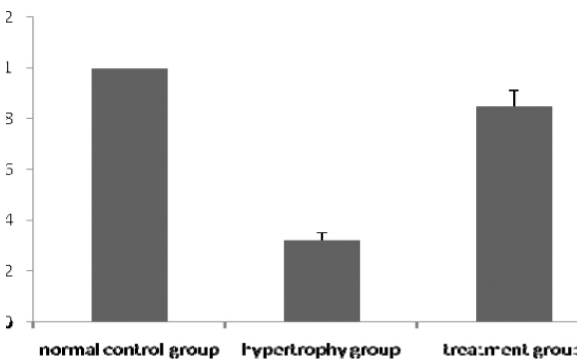


图 3 FOXO1 mRNA 表达

Fig.3 Expression of FOXO1mRNA

注 :▲ $P<0.05$,心肌肥大组与对照组 ;● $P<0.05$,心肌肥大组与治疗组
Note: ▲ $P<0.05$,hypertrophy group compared with nomal control group;
● $P<0.05$,hypertrophy group compared with treatment group.

2.3 非诺贝特对 Ang 诱导的肥大心肌细胞中 FoxO1 蛋白含量的影响

Western blot 检测的蛋白结果用凝胶成像系统分析 ,以 α -tublin 作为内参 ,FoxO1 与 α -tublin 的条带光密度值的性对量进行比较。心肌肥大组明显低于对照组和治疗组 ,($P<0.05$)。见图 4 表 1。

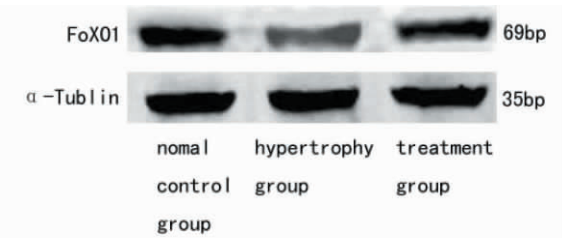


图 4 FoxO1 蛋白表达

Fig.4 Expression of protein FoxO1

表 1 FoxO1 蛋白表达($\bar{x}\pm s$, n=10)
Table 1 Expression of protein FoxO1

Experiment grouping	Protein (FoxO1/ β -actin)
Nomal control group	0.67 $\pm$ 0.07
Hypertrophy group	0.35 $\pm$ 0.08 $\blacktriangle$
Treatment group	0.6755 $\pm$ 0.01

Note: $\blacktriangle P < 0.05$, nomal control group compared with hypertrophy group ;
 $\bullet P < 0.05$, hypertrophy group compared with treatment group.

3 讨论

心肌肥大是心脏对机械负荷及神经体液因子改变的代偿性反应。心肌肥厚是心脏对机械负荷及神经体液因子改变的代偿性反应。先天性心脏病、高血压、心肌梗死、心脏瓣膜疾病等心血管疾病均会引起心肌慢性压力-容量负荷过重,心脏出现代偿性反应,表现为心肌肥大。若不及时干预,最终会导致严重心律失常、心力衰竭、甚至猝死。因此,如何从心肌肥大发生的机制上防止心血管恶性事件的发生,一直是心血管基础研究的热点。

心肌细胞的肥大在分子水平上包括三方面:胞外的肥大刺激信号、胞内信号转导及核内基因转录的活化。心肌细胞内有两条重要的信号转导通路:一是钙调神经磷酸酶通路,细胞内钙离子浓度的增加,活化了钙调素(Calmodulin, CaM)依赖的蛋白磷酸酶,即钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN),从而激活了通向核内的活化T细胞核因子信号通路;二是PI3K-Akt通路:生长因子与配体结合后激活了PI3K,后者通过激活磷脂酰肌醇依赖激酶1(PDK1)激活Akt,一方面引起下游分子mTOR和GSK3的活化^[5-6]。

转录因子通过于心肌细胞肥大相关基因的mRNA结合,引起相关基因的表达或抑制,从而调控心肌肥大。大量研究证实转录因子FoxO参与心肌肥大的调控:胞核内活化的FoxO,激活目标基因——肌肉萎缩相关因子-1(Atrogin-1),抑制CaN的活性,防止心肌肥大;而心肌肥大的PI3K-Akt通路中,活化的Akt却能导致FoxO的磷酸化,FoxO从细胞核移出到细胞质,失去活性。可见转录因子FoxO与心肌肥大中的多个信号通路有密切关系。FoxO包含4个成员:FoxO1、FoxO3、FoxO4和FoxO6,而FoxO1、FoxO3和FoxO4在心脏组织表达^[7-9],与心肌细胞的发育、能量代谢及肥大密切相关。

PPAR- α 主要表达于肝细胞及心肌细胞,其下调和失活可能参与了高血压性心脏病的发病与转归,PPAR- α 激活后对心血管有明确的保护作用,而这一保护作用通过PI3K-Akt通路实现^[10]。所以本实验通过非诺贝特给药,观察心脏肥大以及FoxO1表达情况来探讨两者之间的关系。

实验采用在心肌肥大中与原代大鼠心肌细胞具有相同反应的H9C2细胞系^[11-12]。首先是建立肥大模型,BNP作为判断心肌肥大的指标,单纯给予Ang刺激的细胞与对照组比较,BNP mRNA明显升高,而非诺贝特组与单纯Ang作用的细胞比较,其BNP mRNA明显降低。实验进一步证实了肥大模型建立的成功,以及非诺贝特对心肌肥大的抑制作用。我们通过

观察实验过程中FoxO1表达变化发现:肥大心肌细胞FoxO1的含量明显降低,而预先给予非诺贝特的心肌细胞,在Ang的作用下,细胞并未发生肥大,且细胞内FoxO1的含量较对照组明显升高。由此我们得出PPAR- α 激动剂对心肌肥厚的抑制作用,可能部分与转录因子FoxO1有关。

综上所述,非诺贝特除了有明确调节心肌能量代谢的作用,还有抑制心室重构、改善心功能,降低心血管疾病发病率及死亡率^[13-17]。本研究为PPAR- α 激动剂在临床的新用途提供了有力的实验支持。但是,该类药物对心肌肥大抑制作用可能涉及的机制仍需深入研究。

参考文献(References)

[1] el Azzouzi H, De Windt LJ. Heart Spotting [J]. Basic Res Cardiol, 2008,103(3): 228-231

[2] Creemers EE, Sutherland LB, McAnally J, et al. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo Proteins during cardiovascular development[J]. Development, 2006,133(21):4245-4256

[3] Ronnebaum SM, Patterson C. The FoxO Family in Cardiac Function and Dysfunction[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 17(72):81-94

[4] Irukayama TY, Miyauchi T, Sakai S, et al. Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α partly via blockade of C-jun NH2 terminal kinase pathway[J]. Circulation, 2004, 109(7):904-910

[5] Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling Pathway [J]. GenesDev, 2006, 20(24):3347-3365

[6] Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors[J]. Mol. Cell, 2004, 14(3): 395-403

[7] Ni YG, Berenji K, Wang N, et al. Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling [J]. Circulation, 2006,114(11):1159-1168

[8] Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional Pathway for cardiac hypertrophy[J]. Cell, 1998, 93(2):215-228

[9] Li HH, Kedar V, Zhang C, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex [J]. J.Clin. Investig, 2004, 114(8): 1058-1071

[10] Kerkela R, Kockeritz L, Macaulay K, et al. Deletion of GSK-3 β in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation[J]. J Clin Invest, 2008,118(11): 3609-3618

(下转第 1429 页)

作用^[11] ,同样 ,内质网应激预处理能保护肾脏细胞对抗氧化损伤^[12-14]。在内质网应激条件下 细胞在自我保护和凋亡之间是如何选择的 ,如何将内质网应激的两面性应用于临床 ,将是下一阶段的研究重点。

参考文献(References)

- [1] Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Hepatology, 2000, 32(2):169-173
- [2] Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6):1641-1654
- [3] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning[J]. Circulation, 1991, 84(1):442-445
- [4] Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications [J]. Dig Surg, 2003,20(5):383-396
- [5] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [J].Nature, 1999,398(6722):90
- [6] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response [J]. Mutat Res, 2005,569(1-2):29-63
- [7] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403(6765):98-103
- [8] Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, et al. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses [J].EMBO J, 1998, 17(19): 5708-5717
- [9] Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis [J]. Surgery,2005, 138(2): 342-351
- [10] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. Trends Biochem Sci, 2001, (8):504-510
- [11] Oikawa D, Kimata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1 [J]. J Cell Sci, 2007,120(Pt 9):1681-1618
- [12] Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 [J]. Nature, 2008, 457(7230):687-693
- [13] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. BiochemJ, 2009,417(1):1-13
- [14] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J].Cell, 2009,137(2):216-233
- [11] Huang CY, Chueh PJ, Tseng CT, et al. ZAK re-programs atrial natriuretic factor expression and induces hypertrophic growth in H9C2 cardiomyoblast cells[J].Biochem Biophys Res, 2004,324(3):973-980
- [12] Watkin SJ, Borthwick GM, Arthur HM, et al. The H9C2 cell line and Primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro[J].In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010, 47(2):125-131
- [13] Huang Y, Zhang H, Shao Z, et al. Suppression of endothelin-1 induced cardiac myocyte hypertrophy by PPAR agonists: role of diacylglycerol kinase zeta [J]CardiovascRes, 2011, 90(2):267-275
- [14] Hou N, Luo MS, Liu SM, et al. Leptin induces hypertrophy through activating the peroxisome proliferator-activated receptor α pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(11):1087-1095
- [15] Li CB, Li XX, Chen YG, et al. Effects and mechanisms of PPAR α activator fenofibrate on myocardial remodelling in hypertension[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(11-12):4444-4452
- [16] Lebrasseur NK, Duhaney TA, De Silva DS, et al. Effects of fenofibrate on cardiac remodeling in aldosterone-induced hypertension [J]. Hypertension, 2007, 50(3):489-496
- [17] Brigadeau F, GeléP, Wibaux M, et al. The PPAR α activator fenofibrate slows down the progression of the left ventricular dysfunction in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 49(6):408-415

(上接第 1451 页)