

本文引用:刘亚坤,吕风华,司澳洋,等.骨形成蛋白4诱导大鼠H9c2心肌细胞肥大的作用机制[J].新乡医学院学报,2018,35(4):260-265. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.04.002.

【基础研究】

骨形成蛋白4诱导大鼠H9c2心肌细胞肥大的作用机制

刘亚坤¹, 吕风华¹, 司澳洋¹, 王卓¹, 吴林²

(1.新乡医学院第一附属医院心内科,河南 卫辉 453100;2.河南大学淮河医院心内科,河南 开封 475000)

摘要: **目的** 探讨骨形成蛋白4(BMP4)诱导大鼠H9c2心肌细胞肥大的作用机制。**方法** 培养大鼠心肌细胞株H9c2,使细胞同步化。实验分2部分,第1部分取同步化的心肌细胞,加50 μg·L⁻¹ BMP4 60 μL进行干预,分别在干预后0、1、4、8、12、24 h检测磷酸化蛋白激酶B(P-Akt)蛋白的表达;第2部分将同步化的心肌细胞随机分为对照组、BMP4组、BMP4+LY294002组及BMP4+3MA组。对照组细胞应用体积分数1%胎牛血清培养基培养;BMP4组细胞应用含50 μg·L⁻¹ BMP4的体积分数1%胎牛血清培养基培养;BMP4+LY294002组细胞先应用25 μmol·L⁻¹的LY294002预处理120 min,再以含50 μg·L⁻¹ BMP4的体积分数1%胎牛血清培养基培养;BMP4+3MA组细胞先应用10 mmol·L⁻¹的自噬抑制剂3MA预处理120 min,再以含50 μg·L⁻¹ BMP4的体积分数1%胎牛血清培养基培养。各组细胞给予BMP4 48 h后采用Image J软件测量细胞表面积。二喹啉甲酸法检测各组心肌细胞内蛋白含量。采用western blot检测各组细胞给予BMP4 1 h后磷酸化磷脂酰肌醇3(P-PI3K)、P-Akt及自噬微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白的表达,给予BMP4 48 h后检测脑钠肽(BNP)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达。**结果** BMP4作用心肌细胞0、1、4、8、12、24 h后P-Akt蛋白相对表达量分别为0.56±0.02、0.92±0.12、0.42±0.10、0.63±0.11、0.64±0.23、0.29±0.08,BMP4作用大鼠心肌细胞1 h后P-Akt蛋白相对表达量均高于其他时间点($P<0.05$)。BMP4组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量高于对照组($P<0.01$);BMP4+LY294002组与对照组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量比较差异无统计学意义($P>0.05$);BMP4+3MA组大鼠心肌细胞表面积大于对照组($P<0.01$),BMP4+3MA组与对照组大鼠心肌细胞总蛋白含量比较差异无统计学意义($P>0.05$);BMP4+LY294002、BMP4+3MA组H9c2大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量均低于BMP4组($P<0.05$);BMP4+LY294002组与BMP4+3MA组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。BMP4组、BMP4+3MA组大鼠心肌细胞内P-PI3K蛋白表达水平高于对照组,BMP4+LY294002组心肌细胞内P-PI3K蛋白表达水平低于对照组($P<0.01$);BMP4、BMP4+3MA、BMP4+LY294002组大鼠心肌细胞内P-PI3K蛋白表达水平呈逐渐降低趋势,3组大鼠心肌细胞内P-PI3K蛋白表达水平两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。BMP4、BMP4+3MA组大鼠心肌细胞内P-Akt、LC3蛋白表达水平高于对照组($P<0.01$),BMP4+LY294002组与对照组大鼠心肌细胞内P-Akt、LC3蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);BMP4+3MA、BMP4+LY294002组大鼠心肌细胞内P-Akt、LC3蛋白表达水平低于BMP4组($P<0.05$);BMP4+3MA组与BMP4+LY294002组大鼠心肌细胞内P-Akt、LC3蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。BMP4组大鼠心肌细胞内α-SMA蛋白表达水平高于对照组($P<0.01$),BMP4+3MA、BMP4+LY294002组与对照组大鼠心肌细胞内α-SMA蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);BMP4+3MA、BMP4+LY294002组大鼠心肌细胞内α-SMA蛋白表达水平低于BMP4组($P<0.05$);BMP4+3MA组大鼠心肌细胞内α-SMA蛋白表达水平高于BMP4+LY294002组($P<0.05$)。BMP4、BMP4+3MA组大鼠心肌细胞内BNP蛋白表达水平高于对照组($P<0.01$);BMP4+LY294002组与对照组大鼠心肌细胞内BNP蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);BMP4+3MA、BMP4+LY294002组大鼠心肌细胞内BNP蛋白表达水平低于BMP4组($P>0.05$)。**结论** BMP4可能通过激活PI3K-Akt通路增加自噬活性,从而诱导大鼠H9c2心肌细胞肥大。

关键词: 骨形成蛋白4;心肌肥大;磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B信号通路;自噬

中图分类号: R542.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)04-0260-06

Mechanisms of the bone morphogenetic protein 4 induced cardiomyocytes hypertrophy of rats

LIU Ya-kun¹, LYU Feng-hua¹, SI Ao-yang¹, WANG Zhuo¹, WU Lin²

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Cardiology, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms of the bone morphogenetic protein 4 (BMP4) induced cardiomyo-

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.04.002

收稿日期:2016-12-28

基金项目:河南省高等学校青年骨干教师资助项目(编号:2009GGJ5-085)。

作者简介:刘亚坤(1990-),男,河南南阳人,硕士研究生在读,研究方向:心力衰竭的基础与临床。

通信作者:吕风华(1970-),女,河南新乡人,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:心力衰竭的基础与临床;E-mail:doctorlvfh@163.com。

cytes hypertrophy of rats. **Methods** Rat myocardial cell line H9c2 was cultured to synchronize the cells. This experiment was divided into two parts. Part I: the synchronized myocardial cells were taken and then the BMP4 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $60 \mu\text{L}$ was added to the cells for intervention. The expression of phosphorylated protein kinase B (P-Akt) protein was detected at 0, 1, 4, 8, 12, 24 h after intervention. Part II: the synchronized myocardial cells were randomly divided into control group, BMP4 group, BMP4 + LY294002 group and BMP4 + 3MA group. The cells in the control group were cultured with volume fraction 1% fetal bovine serum medium; the cells in the BMP4 group were cultured with volume fraction 1% fetal bovine serum medium which contained $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4; the cells in the BMP4 + LY294002 group were given LY294002 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pretreatment for 120 min, then the cells were cultured with volume fraction 1% fetal bovine serum medium which contained $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4; the cells in the BMP4 + 3MA group were given autophagy inhibitor 3MA pretreatment ($10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 120 min, then the cells were cultured with volume fraction 1% fetal bovine serum medium which contained $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4. The cell surface area was measured after giving BMP4 for 48 h by Image J software in all groups. The content of protein in myocardial cells in all groups was detected by bicinchoninic acid method. The protein expression of phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase (P-PI3K), P-Akt and microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) in myocardial cells in all groups were detected at 1 h after giving BMP4 by Western blot. The protein expression of brain natriuretic peptide (BNP) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in myocardial cells in all groups were detected at 48 h after giving BMP4 by western blot.

Results The expression of P-Akt protein in myocardial cells at 0, 1, 4, 8, 12, 24 h after giving BMP4 was 0.56 ± 0.02 , 0.92 ± 0.12 , 0.42 ± 0.10 , 0.63 ± 0.11 , 0.64 ± 0.23 , 0.29 ± 0.08 respectively; the expression of P-Akt protein in myocardial cells at 1 h after giving BMP4 was significantly higher than that at the other time point ($P < 0.05$). The surface area and protein content of myocardial cells in BMP4 group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$); there was no statistic difference in the surface area and protein content of myocardial cells between the BMP4 + LY294002 group and the control group ($P > 0.05$); the surface area of myocardial cells in the BMP4 + 3MA group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); there was no statistic difference in the protein content of myocardial cells between the BMP4 + 3MA group and the control group ($P > 0.05$). The expression of P-PI3K protein in myocardial cells in the BMP4 group, the BMP4 + 3MA group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); the expression of P-PI3K protein in myocardial cells in the BMP4 + LY294002 group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). The expression of P-PI3K protein in myocardial cells in the BMP4, BMP4 + 3MA, BMP4 + LY294002 group decreased gradually, there was statistic difference in the expression of P-PI3K protein among the BMP4, BMP4 + 3MA, BMP4 + LY294002 groups ($P < 0.05$). The expression of P-Akt and LC3 protein in myocardial cells in the BMP4 group and the BMP4 + 3MA group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); there was no statistic difference in the expression of P-Akt and LC3 protein in myocardial cells between the BMP4 + LY294002 group and the control group ($P > 0.05$). The expression of P-Akt and LC3 protein in myocardial cells in the BMP4 + 3MA group and the BMP4 + LY294002 group was significantly lower than that in the BMP4 group ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the expression of P-Akt and LC3 protein in myocardial cells between the BMP4 + 3MA group and the BMP4 + LY294002 group ($P > 0.05$). The expression of α -SMA protein in myocardial cells in the BMP4 group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); there was no statistic difference in the expression of α -SMA protein in myocardial cells between the BMP4 + 3MA group, the BMP4 + LY294002 group and the control group ($P > 0.05$); the expression of α -SMA protein in myocardial cells in the BMP4 + 3MA group and the BMP4 + LY294002 group was significantly lower than that in the BMP4 group ($P < 0.05$); the expression of α -SMA protein in myocardial cells in the BMP4 + 3MA group was significantly higher than that in the BMP4 + LY294002 group ($P < 0.01$). The expression of BNP protein in myocardial cells in the BMP4 group and the BMP4 + 3MA group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); there was no statistic difference in the BNP protein expression between the BMP4 + LY294002 group and the control group ($P > 0.05$); the expression of BNP protein in myocardial cells in the BMP4 + 3MA group and the BMP4 + LY294002 group was significantly lower than that in the BMP4 group ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the BNP protein expression between the BMP4 + 3MA group and the BMP4 + LY294002 group ($P > 0.05$). **Conclusion** BMP4 may induce H9c2 cardiomyocyte hypertrophy by activating PI3K-Akt pathway and increasing autophagy activity.

Key words: bone morphogenetic protein-4; cardiac hypertrophy; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signal pathway; autophagy

心肌肥大是心肌对各种刺激产生的一种适应性反应,其主要病理改变是心肌细胞表型变化、体积增大及蛋白质合成增加。早期肥大有一定的代偿意

义,长期肥大则是引发多种心血管疾病和患者死亡的危险因素。目前,心肌肥大的机制尚未完全明确。骨形成蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)

是一种分泌性多功能蛋白,是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的成员之一,在细胞的增殖、分化、迁移、凋亡方面发挥多种作用^[1-2]。研究表明,BMP4 可诱导病理性心肌肥大^[3],其具体机制仍在研究中。磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 是膜受体信号向细胞内转导的途径之一,参与细胞的生长代谢、增殖、分化、凋亡等多种生物过程。有研究报道,心脏过表达 PI3K 的小鼠表现为心肌细胞肥大, Akt 可能是重要的下游效应分子^[4-5]。自噬是通过包裹待降解物形成自噬体,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解所包裹的内容物,以实现细胞本身的代谢需要。研究发现,自噬与心肌肥大关系密切^[6-8],但具体作用机制说法不一,故探讨自噬在心肌细胞中的作用对于阐明心肌肥大的分子机制具有一定指导意义。有研究证实, BMP4 可能通过激活细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinases, ERK1/2) 而诱导大鼠 H9c2 心肌细胞肥大^[9]。本研究以大鼠 H9c2 细胞为对象,通过 BMP4 刺激,观察心肌细胞中 PI3K、Akt、自噬微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)、脑钠尿肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的表达,并探讨 PI3K-Akt 通路和自噬在心肌细胞中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 大鼠 H9c2 心肌细胞株 (中国科学院上海细胞库), BMP4、PI3K-Akt 抑制剂 LY294002 (美国 PeproTech 公司), 自噬抑制剂 3MA (美国 Selleckchem 公司), 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司), $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶、青链霉素混合液 (北京索莱宝公司), 蛋白磷酸酶抑制剂混合物、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒、高灵敏度化学发光试剂盒、抗甘油醛 3 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔多克隆抗体 (北京康为世纪生物技术有限公司), α -SMA 抗体 (美国 Abcam 公司)、脑钠尿肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 抗体 (南京恩晶生物公司), PI3K-Akt 及磷酸化 PI3K-Akt 信号通路抗体、LC3 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), 山羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Jack-

son Immuno Research 公司); 电转移仪 (北京君意东方电泳设备有限公司), Amersham Imager 凝胶成像系统 (美国通用电器公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 取 H9c2 细胞接种于含体积分数 10% FBS 的高糖培养基中常规培养,待细胞生长至约 70% 融合后用含体积分数 1% FBS 的培养基培养 24 h,使细胞同步化。实验分 2 部分,第 1 部分不进行分组,取同步化细胞加 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 $60\text{ }\mu\text{L}$ 进行干预,分别在干预后 0、1、4、8、12、24 h 测 P-Akt 蛋白表达;第 2 部分将同步化的心肌细胞随机分为对照组、BMP4 组、BMP4 + LY294002 组及 BMP4 + 3MA 组。对照组细胞应用体积分数 1% FBS 培养基培养;BMP4 组细胞应用含 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 的体积分数 1% FBS 培养基培养;BMP4 + LY294002 组细胞先应用含 $25\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LY294002 预处理 120 min,再以含 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 的体积分数 1% FBS 培养基培养;BMP4 + 3MA 组细胞先用含 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的自噬抑制剂 3MA 预处理 120 min,再以含 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 的体积分数 1% FBS 培养基培养。各组细胞在给予 BMP4 1 h 后检测 P-PI3K、P-Akt、LC3 蛋白的表达,给予 BMP4 48 h 后检测 BNP、 α -SMA 蛋白的表达。

1.2.2 Western blot 法检测各组大鼠心肌细胞内 P-PI3K、P-Akt、LC3、 α -SMA 及 BNP 蛋白的表达

提取各组细胞总蛋白,按体积比 4 : 1 加入缓冲液,于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下变性 5 min;电泳 (浓缩胶 90 V,分离胶 120 V)。电泳后转至聚偏二氟乙烯膜膜上 (250 mA , 80 min),三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (tris buffered saline tween, TBST) 室温封闭 2 h;分别加入一抗 α -SMA (1 : 5 000)、BNP (1 : 100)、LC3 (1 : 5 000)、PI3K (1 : 1 000)、P-PI3K (1 : 1 000)、P-Akt (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000) 及 GAPDH (1 : 10 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加入对应二抗 (1 : 5 000),室温孵育 1 h。加入高灵敏度化学发光剂,置入 Amersham Imager 凝胶成像系统,曝光。应用 Image J 软件分析目的蛋白条带的灰度值。 α -SMA、BNP 以 GAPDH 为标准化,LC3 II 与 LC3 I 条带的比值代表 LC3 蛋白表达水平,P-PI3K、P-Akt 以 PI3K、Akt 进行标准化。

1.2.3 细胞表面积测量 各组大鼠心肌细胞干预 48 h 后,倒置显微镜下拍照 ($\times 200$),每组观察 5 个视野,每个视野随机选取 15 个细胞,用 Image J 软件测量细胞表面积,取均值。

1.2.4 BCA 法检测各组大鼠心肌细胞总蛋白含量 各组细胞干预至预定时间后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $2\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$

离心 5 min,弃上清液,磷酸盐缓冲液漂洗 3 次。将放射免疫沉淀分析蛋白裂解液与蛋白酶抑制剂按 99:1 混匀后加入细胞中,轻轻吹打数次,冰上裂解 1 h,4℃下 12 000 r·min⁻¹离心 20 min 取上清液,计算各组体积。以牛血清白蛋白(2 g·L⁻¹)为标准品绘制标准曲线,测定蛋白浓度。根据各组蛋白浓度、体积、细胞计数计算各组细胞中每个细胞的平均蛋白含量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,所有实验均重复 3 次,取均值,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量数据的方差分析比较不同时间点 P-Akt 的差异,多组间均数的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量比较 结果见表 1。BMP4 组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);BMP4 + LY294002 组与对照组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞表面积大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),BMP4 + 3MA 组与对照组大鼠心肌细胞总蛋白含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);BMP4 + LY294002、BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量均低于 BMP4 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);BMP4 + LY294002 组与 BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞表面积及总蛋白含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌细胞表面积、蛋白含量比较
Tab.1 Comparison of area and protein content of rats cardiomyocytes in groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞表面积/ μm^2	总蛋白含量/ μg
对照组	3	274.27 \pm 52.56	142.91 \pm 14.97
BMP4 组	3	593.73 \pm 53.72 ^a	214.21 \pm 19.22 ^a
BMP4 + 3MA 组	3	356.33 \pm 47.73 ^{ab}	157.06 \pm 11.12 ^b
BMP4 + LY294002 组	3	256.41 \pm 51.31 ^b	134.73 \pm 13.83 ^b

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与 BMP4 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.2 BMP4 干预后不同时间大鼠心肌细胞内 P-Akt 蛋白表达 结果见图 1。BMP4 作用于大鼠心肌细胞 0、1、4、8、12、24 h 后 P-Akt 蛋白相对表达量分别为 0.56 \pm 0.02、0.92 \pm 0.12、0.42 \pm 0.10、0.63 \pm 0.11、0.64 \pm 0.23、0.29 \pm 0.08。BMP4 作用于心肌细胞后 P-Akt 蛋白相对表达量随时间出现先增高后降低的趋势,1 h 时达高峰,各时间点 P-Akt 蛋白相对表达量总体上比较差异有统计学意义

($F = 10.465, P < 0.05$);BMP4 作用于大鼠心肌细胞 1 h 时 P-Akt 蛋白相对表达量均高于其他时间点($P < 0.05$)。

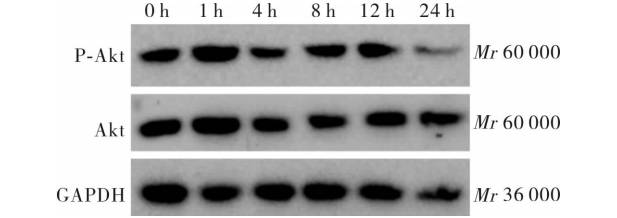
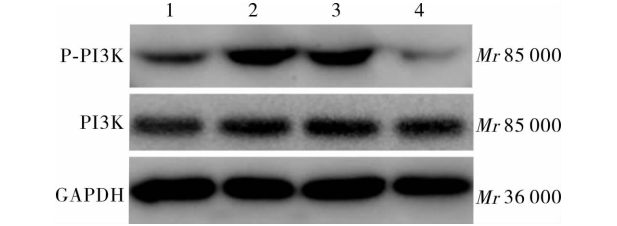
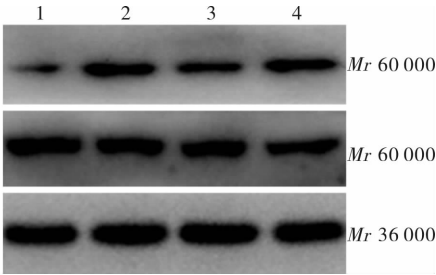


图 1 BMP4 作用不同时间时大鼠心肌细胞内 P-Akt 蛋白表达(western blot)
Fig.1 Expression of the P-Akt protein in the rats cardiomyocyte at different times of BMP4 intervention (western blot)

2.3 BMP4 干预 1 h 后各组大鼠心肌细胞内 P-PI3K、P-Akt 及 LC3 蛋白表达 结果见图 2、图 3、图 4 和表 2。BMP4 组、BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K 蛋白表达水平高于对照组, BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K 蛋白表达水平低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);BMP4 + 3MA 组、BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K 蛋白表达水平低于 BMP4 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K 蛋白表达水平低于 BMP4 + 3MA 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。BMP4、BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞内 P-Akt 蛋白及自噬相关蛋白 LC3 表达水平高于对照组($P < 0.01$),BMP4 + LY294002 组与对照组大鼠心肌细胞内 P-Akt 蛋白及自噬相关蛋白 LC3 表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);BMP4 + 3MA、BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 P-Akt 蛋白及自噬相关蛋白 LC3 表达水平低于 BMP4 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);BMP4 + 3MA 组与 BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞 P-Akt 蛋白及自噬相关蛋白 LC3 表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

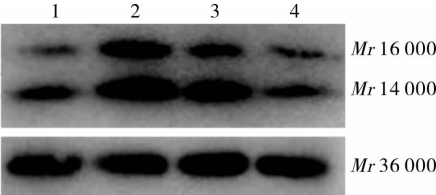


1:对照组;2:BMP4 组;3:BMP4 + 3MA 组;4:BMP4 + LY294002 组。
图 2 BMP4 干预大鼠心肌细胞 1 h 后 P-PI3K 蛋白表达(western blot)
Fig.2 Expression of P-PI3K protein after BMP4 intervention in rats cardiomyocytes for 1 h(western blot)



1:对照组;2:BMP4 组;3:BMP4 + LY294002 组;4:BMP4 + 3MA 组。
图 3 BMP4 干预大鼠心肌细胞 1 h 后 P-Akt 蛋白表达 (western blot)

Fig.3 Expression of P-Akt protein after BMP4 intervention in rtas cardiomyocytes for 1 h (western blot)



1:对照组;2:BMP4 组;3:BMP4 + 3MA 组;4:BMP4 + LY294002 组。
图 4 各组大鼠心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 表达 (western blot)

Fig.4 Expression of autophagy related protein LC3 in rats cardiomyocytes in each group (western blot)

表 2 BMP4 干预 1 h 后各组大鼠心肌细胞内 P-PI3K 及 P-Akt 蛋白表达比较

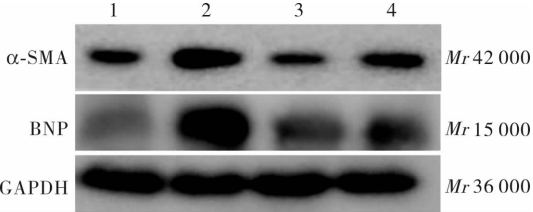
Tab.2 Comparison of expression of P-PI3K and P-Akt protein in rats cardiomyocytes in each group after 1 h intervention of BMP4

组别	n	P-PI3K 蛋白	P-Akt 蛋白	LC3
对照组	3	0.56 ± 0.06	0.83 ± 0.27	1.53 ± 0.21
BMP4 组	3	0.88 ± 0.10 ^a	1.84 ± 0.24 ^a	3.27 ± 0.32 ^a
BMP4 + 3MA 组	3	0.73 ± 0.21 ^{ab}	1.21 ± 0.17 ^{ab}	2.28 ± 0.40 ^{ab}
BMP4 + LY294002 组	3	0.38 ± 0.11 ^{abc}	0.96 ± 0.34 ^b	1.77 ± 0.52 ^b
F		25.091	27.030	28.212
P		0.021	0.036	0.020

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与 BMP4 组比较^b $P < 0.05$;与 BMP4 + 3MA 组比较^c $P < 0.05$ 。

2.4 BMP4 作用 48 h 后各组大鼠心肌细胞内 α -SMA 和 BNP 蛋白表达 结果见图 5 和表 3。BMP4 组大鼠心肌细胞内 α -SMA 蛋白表达水平高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);BMP4 + 3MA、BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 α -SMA 蛋白表达水平与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);BMP4 + 3MA 组、BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 α -SMA 蛋白表达水平低于 BMP4 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞内 α -SMA 蛋白表达水平高于 BMP4 + LY294002 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。BMP4、BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞内 BNP 蛋白表达水平高于对照组 ($P < 0.01$),BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 BNP 蛋白表达水平与对照组比

较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);BMP4 + 3MA、BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 BNP 蛋白表达水平低于 BMP4 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



1:对照组;2:BMP4 组;3:BMP4 + LY294002 组;4:BMP4 + 3MA 组。
图 5 各组大鼠心肌细胞内 α -SMA 和 BNP 蛋白表达 (western blot)

Fig.5 Expression of α -SMA and BNP protein in rats cardiomyocytes in each group (western blot)

表 3 BMP4 作用 48 h 后各组大鼠心肌细胞内 α -SMA 及 BNP 蛋白表达比较

Tab.3 Comparison of expression of α -SMA and BNP protein in rats cardiomyocytes in each group after 48 h intervention of BMP4

组别	n	α -SMA 蛋白	BNP 蛋白
对照组	3	0.97 ± 0.08	0.53 ± 0.05
BMP4 组	3	1.61 ± 0.06 ^a	1.45 ± 0.12 ^a
BMP4 + 3MA 组	3	1.32 ± 0.24 ^b	0.74 ± 0.08 ^{ab}
BMP4 + LY294002 组	3	0.58 ± 0.24 ^{bc}	0.45 ± 0.09 ^b
F		28.351	78.468
P		0.009	0.018

注:与对照组比较^a $P < 0.01$;与 BMP4 组比较^b $P < 0.05$;与 BMP4 + 3MA 组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌肥大是多种心血管疾病发展到一定阶段的病理过程,已被公认为是猝死、心律失常等心血管事件的独立危险因素。心肌肥大的本质是核内基因表达改变,如 β -肌球蛋白重链、SMA、心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 等基因的表达上调。因此,探讨其发生的病理生理机制,寻找心肌肥大的潜在靶点,对于改善心肌功能及心血管疾病的治疗有重要意义。多种因素均可诱导心肌肥大的发生,如机械应激和神经体液因子、容量及压力负荷的增加、炎症刺激等^[10]。BMP4 是 TGF- β 超家族中的一员,最早由 OZKAYNAK 等^[11]从牛成骨蛋白提取物中分离出来,在软骨、骨的形成和修复过程中有独特的诱导活性。SUN 等^[3]研究发现,BMP4 能诱发病理性心肌肥大,在压力负荷构建的病理性心肌肥大模型中 BMP4 及心肌肥大标志物 ANP、BNP 表达增加,而在游泳训练导致的生理性肥大小鼠模型中 BMP4、ANP 及 BNP 的表达未见明显改变。本研究发现,用 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 刺激大鼠心肌细胞后,BMP4 组心肌细胞的细胞表面积明显大于不给予 BMP4 刺激的对照组,总蛋白含量也高于对照组;同时,BNP、 α -SMA 表达也高于对照组。而 BMP4 + LY294002、

BMP4 + 3MA 组心肌细胞的细胞表面积、总蛋白含量、BNP 表达少于 BMP4 组。说明 LY294002、3MA 在一定程度上抑制了心肌肥大的发生。

PI3K-Akt 通路是膜受体信号向细胞内转导的重要途径,可介导细胞的生长、增殖和分化。PI3K 是一种细胞内蛋白激酶,其是由 1 个催化亚基 p110 和 1 个调节亚基 p85 构成的异源二聚体。Akt 属于丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族成员,是一种相对分子量为 60 000 的蛋白质。无活性的调节亚基 p85 和催化亚基 p110 复合物存在于细胞质,当受到某些刺激激活后在细胞膜上生成第 2 信使 PIP3,PIP3 可使下游分子 Akt 磷酸化,进一步发挥生物学功能^[12-13]。有研究发现,转基因小鼠心脏过表达活性 PI3K 可引起心肌细胞体积增大,Akt 可能是重要的下游效应分子^[4]。PI3K-Akt 通路的激活及 P-PI3K、P-Akt 蛋白表达的增高可能是心肌肥厚发生的机制^[5]。WU 等^[14]研究发现,BMP4 可通过激活 PI3K-Akt 通路而减少肺动脉平滑肌细胞凋亡。本研究以 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ BMP4 刺激大鼠心肌细胞不同时间后发现,P-Akt 蛋白表达在 1 h 达到高峰,随后呈下降趋势。同时还发现,BMP4 作用于大鼠心肌细胞 1 h 时,BMP4 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K、P-Akt 蛋白表达水平明显高于对照组,而 BMP4 + LY294002 组大鼠心肌细胞内 P-PI3K、P-Akt 蛋白表达变化不明显,提示 BMP4 可能是在早期通过激活 PI3K-Akt 通路而诱导心肌细胞肥大。

自噬的主要生理功能是将胞质中的大分子物质和一些细胞内源性底物在单位膜包裹的囊泡中大量降解,实现再循环,以维持内环境自身的稳定。自噬在维持心肌细胞大小、结构和功能等方面发挥重要作用^[15-16]。有研究表明,心肌肥大和心脏衰竭中自噬增加^[17]。NAKAI 等^[6]研究表明,自噬基因 Atg7 敲除后大鼠心肌细胞进一步肥大,提示抑制自噬可能诱导心肌细胞肥大。而 ZHU 等^[7]采用主动脉缩窄法建立了心力衰竭小鼠模型,结果显示,病理状态下心肌细胞自噬能诱导细胞肥大,在心肌缺血再灌注时能够诱导心肌细胞自噬,从而增加对心肌的保护作用,因此,在不同诱导因素及心肌肥大的不同阶段,自噬发挥的作用可能不同,具体机制仍待进一步研究。本研究发现,在 BMP4 诱导大鼠心肌细胞肥大的过程中自噬活性增加,自噬相关蛋白 LC3 表达水平明显增高。BMP4 + 3MA 组大鼠心肌细胞内 LC3 蛋白表达降低,自噬活性降低,该组大鼠心肌细胞表面积及 BNP 表达较 BMP4 组少,提示 BMP4 可能通过激活自噬而诱导心肌肥大。

BMP4 诱导大鼠心肌细胞肥大可能与激活 PI3K-Akt 信号通路有关,而特异性抑制剂 LY294002 可减弱 BMP4 诱导的心肌肥大。同时,心肌肥大中的自噬受到激活,而抑制自噬可以减少心肌肥大的

发展,提示自噬可能也是 BMP4 诱导心肌肥大的一个因素。本研究在一定程度上丰富了心肌肥大的分子机制,为临床提供一定的理论基础,也为心肌肥大的预防及治疗提供新的方向。

参考文献:

- [1] 王涛,康涛,雷琦,等.重组人骨形成蛋白成熟肽 4 对急性放射损伤小鼠造血系统的修复作用[J].新乡医学院学报,2017,34(12):1043-1047.
- [2] RIDER C C, MULLOY B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists[J]. *Biochem J*, 2010, 429(1):1-12.
- [3] SUN B, HUO R, SHENG Y, et al. Bonemorphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*, 2013, 61(2):352-360.
- [4] SHIOI T, KANG P M, DOUGLAS P S, et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice[J]. *EMBO J*, 2000, 19(11):2537-2548.
- [5] 穆灵敏,王文锋,郭志坤,等. PI3K 和 Akt 蛋白在异丙肾上腺素所致大鼠心肌梗死中的表达[J]. *四川动物*, 2010, 29(4):560-562.
- [6] NAKAI A, YAMAGUCHI O, TAKEDA T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):619-624.
- [7] ZHU H, ROTHERMEL B A, HILL J A. Autophagy in load-induced heart disease[J]. *Methods Enzymol*, 2009, 453:343-363.
- [8] MEI Y, THOMPSON M D, COHEN R A, et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2):243-251.
- [9] 陶业珍,李华旭,袁宇.骨形成蛋白4通过激活 ERK1/2 信号通路诱导大鼠 H9C2 心肌细胞肥大的机制[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(2):153-158.
- [10] 姜志胜.心肌肥大过程中的信号转导[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(2):125-128.
- [11] OZKAYNAK E, RUEGER D C, DRIER E A, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family[J]. *EMBO J*, 1990, 9(7):2085-2093.
- [12] XIAO L, GONG L L, YUAN D, et al. Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(9):1448-1462.
- [13] COSTA C, HIRSCH E. More than just kinases; the scaffolding function of PI3K[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 346:171-181.
- [14] WU J, YU Z, SU D. BMP4 protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis by PI3K/AKT/Smad1/5/8 signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(8):13738-13754.
- [15] PRZYKLENK K, UNDYALA V V, WIDER J, et al. Acute induction of autophagy as a novel strategy for cardioprotection: getting to the heart of the matter[J]. *Autophagy*, 2011, 7(4):432-433.
- [16] 池瑞芳,田晶,李保,等.心肌细胞自噬在心室重构中的作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(3):285-288.
- [17] GUO R, HU N, KANDADI M R, et al. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts[J]. *Autophagy*, 2012, 8(4):593-608.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)