

Pyk2 促进血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌细胞肥大

鄢 雯, 刘立新, 孔祥照, 骆雨辰, 李中秋, 李 因*

(首都医科大学燕京医学院, 北京 101300)

摘要:目的 探讨富含脯氨酸蛋白酪氨酸激酶(Pyk2)对血管紧张素 II(Ang II)诱导大鼠心肌细胞肥大的作用及其机制。方法 提取大鼠乳鼠原代心肌细胞,随机分为对照组、Ang II 诱导组(Ang II 剂量为 100 nmol/L,将其加入心肌细胞培养皿中刺激 24 h)、Pyk2 抑制剂 PF-431396 组(PF-431396 剂量为 10 μmol/L,在 Ang II 刺激前 30 min 加入心肌细胞培养皿中)以及 PF-431396 干预 Ang II 诱导组(Ang II 剂量为 100 nmol/L,PF-431396 剂量为 10 μmol/L)。用细胞骨架蛋白(α-actinin)免疫荧光染色检测心肌细胞表面积大小;real-time PCR 检测心肌细胞中肥大指标(ANP 和 β-MHC)mRNA 表达;Western blot 检测心肌细胞 p-Pyk2、Pyk2 以及 p53 的蛋白表达。结果 在 Ang II 刺激下,心肌细胞表面积增大($P<0.05$)、肥大指标的 mRNA 水平升高($P<0.05$)、p-Pyk2 和 p53 的蛋白水平增加($P<0.05$);而加入 Pyk2 抑制剂 PF-431396 后,心肌肥大指标明显改善,p-Pyk2 和 p53 的蛋白表达降低($P<0.05$)。结论 Pyk2 通过 p53 信号通路促进 Ang II 诱导的大鼠心肌细胞肥大。

关键词: 心肌肥大;血管紧张素 II(Ang II);富脯氨酸蛋白酪氨酸激酶(Pyk2)

中图分类号:R33 文献标志码:A

Pyk2 promotes Ang II-induced cardiac hypertrophy in rat

YAN Wen, LIU Li-xin, KONG Xiang-zhao, LUO Yu-chen, LI Zhong-qiu, LI Nan*

(Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300)

Abstract: Objective To investigate the role of proline-rich protein tyrosine kinase (Pyk2) in angiotensin II (Ang II)-induced cardiac hypertrophy and the underlying mechanism in rat. **Methods** Primary rat cardiomyocytes were isolated from rats and randomly divided into control group, Ang II induction group (the dose of Ang II was 100 nmol/L, cardiomyocytes were stimulated in the cell culture dish for 24 hours), Pyk2 inhibitor PF-431396 group (the dose of PF-431396 was 10 μmol/L, added to the cell culture dish 30 minutes in advance before Ang II stimulation) and Ang II induction group intervened by PF-431396 (the dose of Ang II was 100 nmol/L, the dose of PF-431396 was 10 μmol/L). The size of cardiomyocytes was measured by α-actinin fluorescence staining. RT-qPCR was performed to detect the mRNA level of hypertrophic markers (ANP and β-MHC) in cardiomyocytes. The expressions of p-Pyk2, Pyk2 and p53 in cardiomyocytes were detected by Western blot analysis. **Results** Ang II stimulation increased the surface area of cardiomyocytes and the mRNA level of hypertrophic markers($P<0.05$). In addition, the proteins of p-Pyk2 and p53 were increased($P<0.05$). However, after treatment of Pyk2 inhibitor PF-431396, myocardial hypertrophy was significantly improved and the protein level of

收稿日期:2019-05-31 修回日期:2019-11-04

基金项目:首都医科大学燕京医学院自然科学基金(2016QD04)

* 通信作者 (corresponding author): linan881219@126.com

Pyk2 and p53 decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Pyk2 promotes cardiomyocyte hypertrophy in rat induced by Ang II through the p53 signaling pathway.

Key words: cardiac hypertrophy; angiotensin II (Ang II); proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2)

心肌肥大(cardiac hypertrophy)是心脏适应血流动力超负荷的一种代偿反应。病理性心肌肥大是引起心血管疾病发生的一种重要的独立危险因素,持续性的心肌肥大失代偿后将导致心肌收缩力减退和心力衰竭^[1-2],严重危害人体健康,探讨其发生机制具有重要意义。Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase-2),即黏着斑激酶家族新成员,是一种富含脯氨酸的酪氨酸激酶,在细胞内信号传导中占有重要地位,活化的Pyk2能参与ROS产生、凋亡信号传导和心肌细胞死亡等过程^[3]。有报道Pyk2在神经细胞缺血损伤和心血管疾病的发生发展中都发挥重要作用^[4-5]。本研究主要探讨Pyk2对Ang II诱导大鼠心肌细胞肥大的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:出生3 d内的SPF级Sprague Dawley (SD)大鼠乳鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001]。

1.1.2 试剂:血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), anti-PYK2 (phospho Y402) antibody 和 anti-PYK2 antibody (Abcam 公司); PF-431396 (Pyk2 抑制剂) (Selleck 公司); p53 antibody 和 GAPDH antibody (南京恩晶生物科技有限公司); FITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术公司); Trizol 总 RNA 抽提试剂 (Sigma-Aldrich 公司); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa 公司); GoScript[™] 反转录系统 (Promega 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo Fisher 公司); 免疫化学发光 HRP 底物 (Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验的分组及处理:常规提取大鼠乳鼠心肌细胞,随机分为4组:对照组、Ang II 诱导组、PF-431396组及PF-431396 干预 Ang II 诱导组。其中对照组的心肌细胞给予 DMEM 培养;Ang II 诱导组的心肌细胞在 DMEM 培养条件下,给予终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II 刺激 24 h;PF-431396 组的心肌细胞在 DMEM 培养条件下,给予终浓度为 10 μmol/L 的 PF-431396,在 Ang II 刺激前 30 min 加入;PF-431396 干预 Ang II 诱导组的心肌细胞在 DMEM 培养条件下,给予终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II 刺激 24 h,在 Ang II 刺激前 30 min,加入终浓度为 10 μmol/L 的 PF-431396。

1.2.2 细胞骨架蛋白(α-actinin)染色检测心肌细胞肥大:4%多聚甲醛固定细胞爬片,室温 30 min,1×PBS 冲洗,5 min/3 次;封闭通透室温 30 min,1×PBS 冲洗,5 min/3 次;滴加 α-actinin 一抗(10~20 μg/mL),4 °C 摇床过夜;隔天从 4 °C 取出复温 20 min,1×PBS 冲洗,5 min/3 次;加二抗室温孵育 1 h,1×PBS 冲洗,5 min/3 次;滴加 DAPI 染核 5 min,1×PBS 冲洗,5 min/3 次;蒸馏水、75%、95%、和 100%乙醇各 10 s;碘化钠甘油封片。

1.2.3 RT-qPCR 检测肥大指标的 mRNA;mRNA 提取、定量和反转实验方法见文献[10]。引物的设计及合成由上海生工生物工程技术有限公司完成(表 1)。

1.2.4 Western blot 检测心肌细胞中 p-Pyk2、Pyk2 及 p53 蛋白表达:提取心肌细胞总蛋白并测定蛋白浓度,将蛋白样品变性上样,进行电泳和电转。封闭液室温封闭 30 min,稀释一抗,4 °C 摇床孵育过夜,

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-qPCR

gene	forward primer	reverse primer
ANP	5'-GAGGAGAAGATGCCGCTAGA-3'	5'-AGCAGCTGGATCTTCGTAGG-3'
β-MHC	5'-ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA-3'	5'-TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG-3'
GAPDH	5'-GGTGTCTCCTCGCACTTCA-3'	5'-GGTGTCCAGGGTTTCTTACTC-3'

稀释二抗,室温摇床缓慢孵育 1 h,利用化学发光仪进行蛋白条带检测。

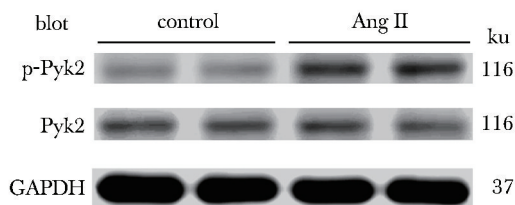
1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 软件处理数据,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间数据比较采用单向方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 Ang II 上调心肌细胞 p-Pyk2 表达

Ang II 组心肌细胞中 p-Pyk2 蛋白水平较对照组明显升高($P<0.05$)(图 1)。



* $P<0.05$ compared with control group

图 1 Ang II 刺激下 p-Pyk2 的蛋白表达增加

Fig 1 Ang II increased the protein expression of p-Pyk2 compared with group($\bar{x}\pm s, n=3$)

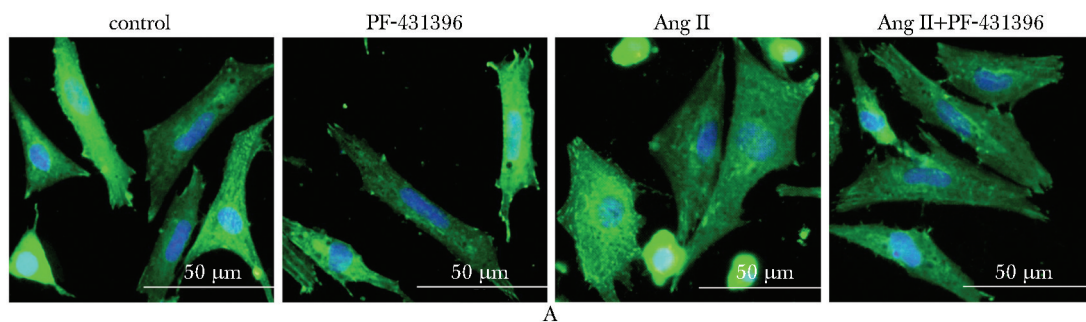
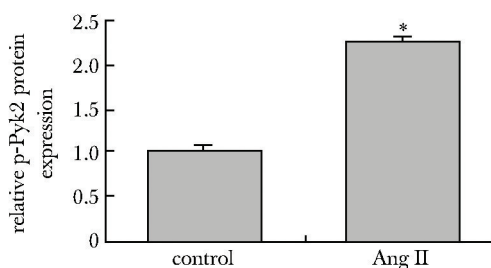
2.2 PF-431396 抑制心肌肥大

与对照组相比,Ang II 组的心肌细胞表面积明显增大($P<0.05$),PF-431396 干预组表面积明显减小($P<0.05$)(图 2A)。

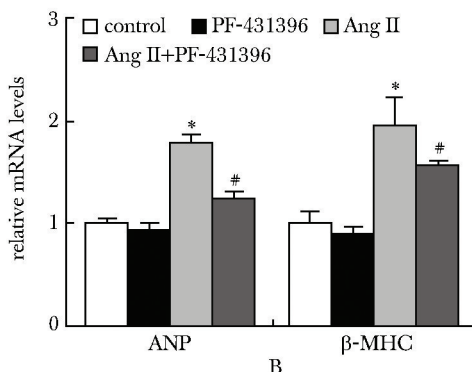
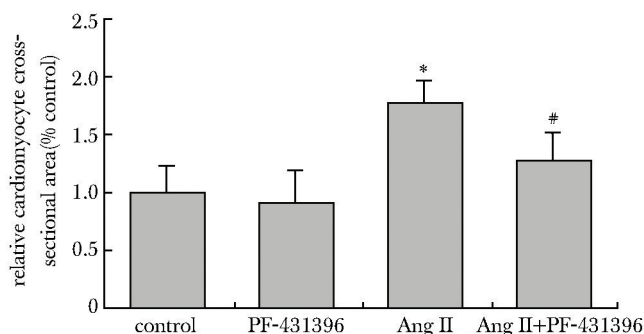
Ang II 组的肥大指标的 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),PF-431396 明显降低肥大指标的 mRNA 水平($P<0.05$)(图 2B)。

2.3 PF-431396 降低 p-Pyk2 和 p53 的蛋白水平

心肌细胞经 Ang II 刺激后,p-Pyk2 和 p53 蛋白水平较对照组升高($P<0.05$),PF-431396 明显降低其表达($P<0.05$)(图 3)。



A

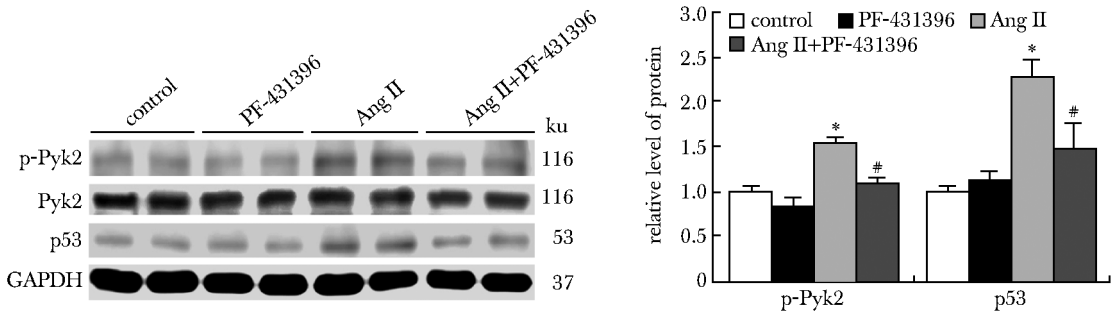


B

A. size of cardiomyocytes was detected by α -actinin fluorescence staining; B. mRNA level of hypertrophic markers (ANP and β -MHC) was detected by RT-qPCR; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with Ang II group

图 2 Pyk2 抑制剂 PF-431396 对心肌肥大指标的影响

Fig 2 Effect of Pyk2 inhibitor PF-431396 on the level of cardiac hypertrophy($\bar{x}\pm s, n=3$)



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Ang II group

图3 加入 PF-431396 后 p-Pyk2 和 p53 蛋白表达水平

Fig 3 Protein levels of p-Pyk2 and p53 after adding PF-431396 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

Pyk2 作为一种酪氨酸蛋白激酶,是黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)家族的新成员,在许多细胞中都可表达^[6],并参与细胞增殖、分化以及某些疾病的发生发展。Pyk2 可被一系列因子激活,如生长因子、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、G 蛋白耦联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)、Ang II 以及缓激肽等。体外培养幼年及成年鼠心肌细胞中,Pyk2 可被 ET-1 迅速激活^[7]。在压力负荷导致的左室肥厚模型中,Pyk2 被激活并发挥重要作用;在心脏移植手术失败的心脏中,Pyk2 的表达和活性也显著增加^[8]。

Ang II 通过与血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 结合调节心肌的正性变力、变时作用及心肌细胞的生长,参与调控心血管系统的功能和疾病的发生^[9-10]。本结果显示,Ang II 可明显上调肥大心肌细胞中 p-Pyk2 的蛋白水平,提示 Ang II 激活 Pyk2。PF-431396 作为 Pyk2 的一种有效抑制剂参与疾病的发展。PF-431396 通过抑制 Pyk2/MCU 通路阻止 Ca^{2+} 超载、线粒体损伤及细

胞死亡^[5]。本实验发现 PF-431396 可使 p-Pyk2 的蛋白水平明显降低,心肌肥大指标也明显改善,包括心肌细胞表面积减小,肥大指标的 mRNA 水平也明显降低,提示 Pyk2 的激活参与 Ang II 诱导心肌肥大的发生。

Pyk2 在肾脏组织中能被 Ang II 激活,并通过介导相关信号通路发挥一定作用^[11]。肿瘤抑制基因 p53,通过诱导细胞周期停滞和凋亡,达到抑制细胞增值的作用,在心肌肥大中也发挥重要的调节作用。Ang II 可通过抑癌基因 p53,参与调节心肌细胞肥大过程^[12-13]。p53 与 Pyk2 存在一定联系,在许多疾病发生发展过程中发挥重要作用^[14]。为了明确 Pyk2 在 Ang II 诱导下心肌细胞内的信号传导机制,本研究检测了 Ang II 诱导下肿瘤抑制基因 p53 的蛋白表达,发现 p53 的蛋白水平明显升高,而加入 PF-431396 后,表达明显降低。

综上所述,富脯氨酸蛋白酪氨酸激酶(Pyk2) 可通过调控肿瘤抑制基因 p53 的表达,促进 Ang II 诱导的心肌细胞肥大,这将为临床心肌肥大的治疗提供一个新的潜在靶点。

参考文献:

[1] Jonsson S, Becirovic-Agic M, Isackson H, et al. Angiotensin II and salt-induced decompensation in Balb/CJ mice is aggravated by fluid retention related to low oxidative stress[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316: F914-F933.

[2] Becirovic-Agic M, Jonsson S, Tveitaras MK, et al. Time-course of decompensation after angiotensin II and high-salt diet in Balb/CJ mice suggests pulmonary hypertension-induced cardiorenal syndrome [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2019, 316:

- R563-R570.
- [3] O-Uchi J, Jhun BS, Xu S, *et al.* Adrenergic signaling regulates mitochondrial Ca^{2+} uptake through Pyk2-dependent tyrosine phosphorylation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21: 863-879.
- [4] You K, Huang Y, Zhang MC, *et al.* Control and prevention of myocardial fibrosis using Pyk2-related non-kinase [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 18284-18292.
- [5] Zhang K, Yan J, Wang L, *et al.* The Pyk2/MCU pathway in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemic stroke [J]. *Neurosci Res*, 2018, 131: 52-62.
- [6] Stanzione R, Picascia A, Chieffi P, *et al.* Variations of proline-rich kinase Pyk2 expression correlate with prostate cancer progression [J]. *Lab Invest*, 2001, 81: 51-59.
- [7] Bayer AL, Ferguson AG, Lucchesi PA, *et al.* Pyk2 expression and phosphorylation in neonatal and adult cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 1017-1030.
- [8] Lang D, Glukhov AV, Efimova T, *et al.* Role of Pyk2 in cardiac arrhythmogenesis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301: H975-983.
- [9] Hu S, Cheng M, Guo X, *et al.* Down-regulation of miR-200c attenuates Ang II-induced cardiac hypertrophy via targeting the MLCK-mediated pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 2505-2516.
- [10] Li N, Wang HX, Han QY, *et al.* Activation of the cardiac proteasome promotes angiotensin II-induced hypertrophy by down-regulation of ATRAP [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 79: 303-314.
- [11] Chinnakkannu P, Reese C, Gaspar JA, *et al.* Suppression of angiotensin II-induced pathological changes in heart and kidney by the caveolin-1 scaffolding domain peptide [J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0207844. doi:10.1371/journal.pone.0207844.eCollection2018.
- [12] Hernandez JS, Barreto-Torres G, Kuznetsov AV, *et al.* Crosstalk between AMPK activation and angiotensin II-induced hypertrophy in cardiomyocytes: the role of mitochondria [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18: 709-720.
- [13] Huang CY, Pai PY, Kuo CH, *et al.* p53-mediated miR-18 repression activates HSF2 for IGF- II R-dependent myocyte hypertrophy in hypertension-induced heart failure [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2990. doi:10.10281/cddis.2017.320.
- [14] Cheng YH, Hooker RA, Nguyen K, *et al.* Pyk2 regulates megakaryocyte-induced increases in osteoblast number and bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28: 1434-1445.

新闻点击

老年女性腰围对健康至关重要,即使没有肥胖

美国医学学会在线《美国医学协会期刊》(*JAMA Network Open*) (2019-07-24) 公布的一项新近的研究显示,腰围扩大会损害老年妇女的健康,即使她们没有肥胖。

这是一个被称为“中央肥胖”的状态,肥胖浓缩脂肪在腹部。由于其他地方不胖,所以往往不足以将其体质指数(BMI)归入肥胖范围,爱荷华大学的流行病学教授 Wei Bao 解释说。他的研究发现,大腰围,约 35 英寸(89 cm)或更大,显著增加了 49 岁以上女性过早死亡的风险,即使她们的体重指数(BMI)正常。

在这项新的研究中,Bao 研究小组组织追踪了超过 15.6 万名美国女性的数据,年龄在 50 岁至 79 岁之间,从 1993 年至 2017 年追踪她们的健康状况,这是一项大型的全国性研究的一部分。被认为具有正常体重指数但腰围较大的女性在研究期间死亡的风险,比正常体重指数较低但腰围较小的女性高 31%,显示中央肥胖型人群是高风险人群。BMI 正常但腰围大的人死亡的两大原因是:心脏病和肥胖相关的癌。

Bao 指出,目前的临床指南说,医生只需要依靠一个人的体重指数来确定与肥胖相关的健康风险,因此其他危险因素就被忽略了,比如身体脂肪的分布,结果这些处于高危的中央肥胖型人群仍然相信自己是“健康的”。而实际上对于那些体质量正常但腰围更大的人来说,她们的体质量多是来自脂肪而不是肌肉,这种“内脏”脂肪与慢性炎症、胰岛素过量生成和胰岛素抵抗密切相关,这些因素会共同引发糖尿病、动脉硬化和心脏病。