

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.22.001

蛋白激酶 D2 在血管紧张素 II 诱导的病理性心肌肥大中的作用*

魏 薇¹,刘秋子²,李琛琛²,应开承²,李 静³,李长林^{2△}
(1. 济宁医学院公共卫生学院,山东济宁 272067;2. 济宁医学院精准医学研究院,山东济宁 272067;3. 南开大学医学院药理学系,天津 300071)

[摘要] 目的 研究蛋白激酶 D2(PKD2)在血管紧张素 II (Ang II)诱导的病理性心肌肥大中的作用。方法 通过 Ang II 诱导新生大鼠和成年大鼠病理性心肌肥大,应用 siRNA 干扰抑制心肌细胞 PKD2 基因表达,探讨 PKD2 对 Ang II 诱导的病理性心肌肥大形成过程中的调控作用。结果 Ang II 上调新生大鼠和成年大鼠心肌细胞的 PKD2 基因表达;沉默 PKD2 阻断 Ang II 诱导病理性心肌肥大基因心房利尿因子(ANF)和 β-肌凝蛋白重链(β-MHC)表达上调和细胞表面积增大。结论 PKD2 参与 Ang II 诱导的病理性心肌肥大,可能是预防干预和逆转心肌肥大的潜在靶点。
[关键词] 心房利尿因子;β-肌凝蛋白重链;心肌细胞;蛋白激酶 D2
[中图法分类号] R364.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)22-3781-04

Role of protein kinase D2 in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy*
WEI Wei¹,LIU Qiuzi²,LI Chenchen²,YING Kaicheng²,LI Jing³,LI Changlin^{2△}
(1. College of Public Health, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China ;
2. Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China ;
3. Faculty of Pharmacology, Medical College of Nankai University, Tianjin 300071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of protein kinase D2 (PKD2) in angiotensin II (Ang II)-induced pathological cardiac hypertrophy (PCH). **Methods** PCH in neonatal and adult rats were induced by Ang II. The PKD2 gene expression was inhibited by using siRNA interference. The regulatory effect of KD2 during the formation process of Ang II-induced PCH was investigated. **Results** Ang II up-regulated PKD2 gene expression in both neonatal and adult rat cardiomyocytes. Silencing PKD2 blocked the up-regulation of Ang II-induced PCH gene atrial natriuretic factor (ANF) and β-myosin heavy chain (β-MHC) expressions and increase of cell surface. **Conclusion** PKD2 participates in Ang II-induced PCH, which may be a potential target point for preventing,interfering and reversing PCH.
[Key words] atrial natriuretic factor;β-myosin heavy chain;protein kinase

病理性心肌肥大(PCH)心肌应对某些刺激时所表现出的一种适应性反应,主要表现为细胞增大。病理性心肌肥大是许多心血管疾病如高血压、冠心病发展过程中的重要病理改变,其最终往往会导致心力衰竭、心律不齐,甚至猝死^[1-2]。

病理性心肌肥大的发生是一个复杂的病变过程,目前关于其机制仍不是很清楚。以往研究表明,多种蛋白激酶在 PCH 的形成过程中扮演重要角色。目前已经发现多种蛋白激酶参与 PCH 形成过程。研究较为广泛的有蛋白激酶 C (PKC)^[3]、蛋白激酶 D (PKD)^[4-5]、钙调蛋白激酶 II (CAMK II)^[6]、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)^[7]。

PKD 是一个色氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,有 3 个成员,即 PKD1、PKD2 和 PKD3^[8]。以往研究表明 PKD1 和 PKD3 在 PCH 的形成中发挥重要作用^[4-5]。虽然关于 PKD1 和 PKD3 在参与病理性心肌肥大形成的研究比较多,但是关于 PKD2 是否参与心肌肥大调控缺少研究。本实验旨在探讨 PKD2 与 PCH 发生之间的关系,揭示 PKD2 在 PCH 形成中的作用,为干预和逆转心肌肥大,预防和治疗相关的心血管疾病提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 血管紧张素 II (Ang II)、Trizol、α-actin 和 β-actin 抗体购自美国 Sigma 公司。Anti-PKD2 抗

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072629)。 作者简介:魏薇(1980—),助理实验师,硕士,主要从事心血管药理研究。 △ 通信作者,E-mail:changlinli@mail.jnmc.edu.cn。

体购于美国 Bioworld 公司。Lipofectamine™2000 购于美国 Invitrogene 公司。HRP-标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 购于武汉三鹰公司。Trizol、Al-exaFluor-488(激发波长 488 nm,最大发射波长 519 nm,绿色)和碘化丙啶(PI,激发波长 488 nm,最大发射波长 630 nm,红色)购于英国 Abcam 公司。SD 成年大鼠和新生大鼠(乳鼠),购自军事医学科学院动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞分离 新生大鼠和成年大鼠心肌细胞分离参照本实验室建立的分离方法^[5]。

1.2.2 Real-time PCR 分析 用 Trizol 裂解心肌细胞提取 RNA,使用反转录酶反转形成 cDNA 进行 RT-PCR 和 Real-time PCR 分析。RT-PCR 引物为:PKD2:正向 5'-ATC ACC GCC AAT GT CAC CTA CT-3',反向 5'-GTT TCT CCA TCA CCA CGA ATA CC-3';18S rRNA:正向 5'-ACC GCA GCT AGG AAT AAT GGA-3',反向 5'-GCC TCA GTT CCG AAA ACC A-3';18s rRNA 作为内参基因。Real-time 引物为心房利尿因子(ANF):正向 5'-GGG GGT AGG ATT GAC AGG AT-3',反向 5'-CTC CAG GAG GGT ATT CAC CA-3';β-肌凝蛋白重链(β-MHC),正向 5'-CCT CGC AAT ATC AAG GGA AA-3',反向 5'-TAC AGG TGC ATC AGC TCC AG-3'^[9]。

1.2.3 siRNA 干扰 针对 PKD2 基因设计两个 siRNA 干扰位点,将两个位点的 siRNA 序列混合后用

Lipofectamine™2000 转染新生大鼠细胞。siRNA PKD2 的两个位点序列为:5'-CCU UCC UUA UAC AUA GCU ATT-3',5'-CGG GCU GAA UUA CCA CAA ATT -3';对照 siRNA (NC siRNA) 序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。

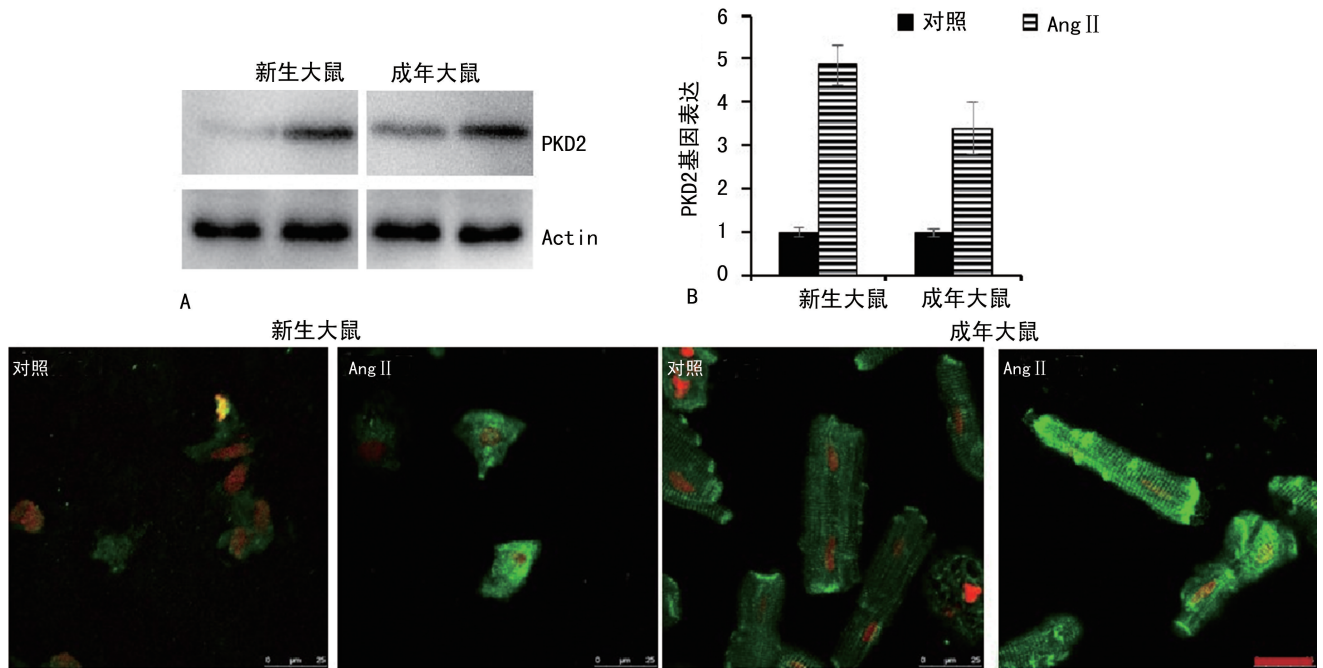
1.2.4 Western blot 分析 细胞蛋白用 RIPA 裂解液裂解,取等量的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。转膜后与一抗 4℃孵育过夜。应用过氧化物酶(HRP)标记的二抗显色。

1.2.5 免疫荧光 细胞用 4%的多聚甲醛固定 5 min,0.5% triton×100 穿透后血清封闭 30 min,一抗孵育 2 h,绿色荧光标记的二抗孵育 1 h,进行共聚焦荧光显微镜分析(德国 Leica 公司)。应用 LSM 800 Zeiss 共聚焦荧光显微镜照相。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析和 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

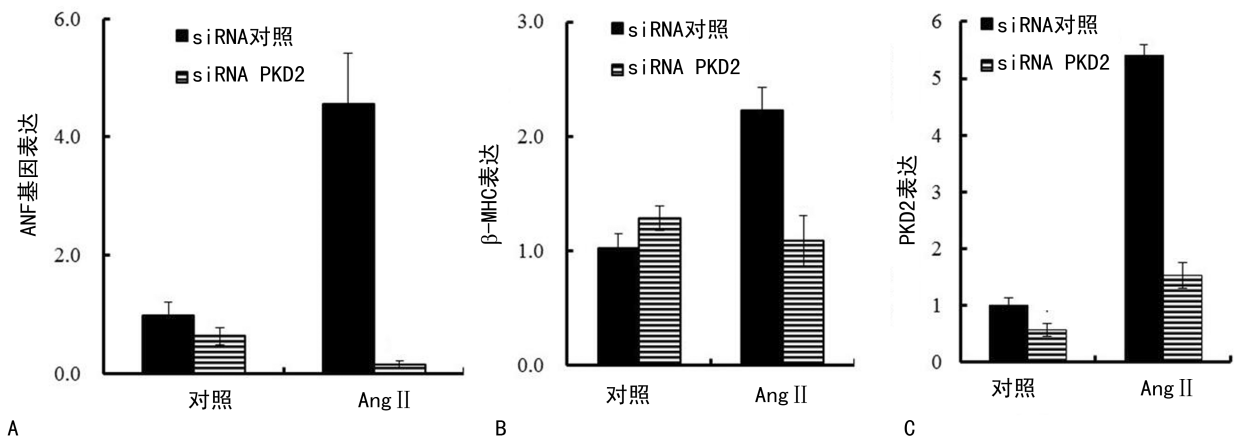
2 结果

2.1 Ang II 促进心肌细胞 PKD2 基因和蛋白表达 Western blot 结果表明,Ang II (100 nmol/L)处理新生大鼠心肌细胞 48 h 显著增加 PKD2 表达。与之相似,Ang II (100 nmol/L)处理成年大鼠心肌细胞 24 h 显著上调 PKD2 蛋白表达。Real-time PCR 显示,PKD2 的 mRNA 水平在 Ang II 诱导的 PCH 中也显著上调。共聚焦荧光显微镜分析与 Western blot 和 Real-time PCR 结果一致,Ang II 处理显著增加 PKD2 蛋白在新生和成年大鼠心肌细胞中表达。见图 1。



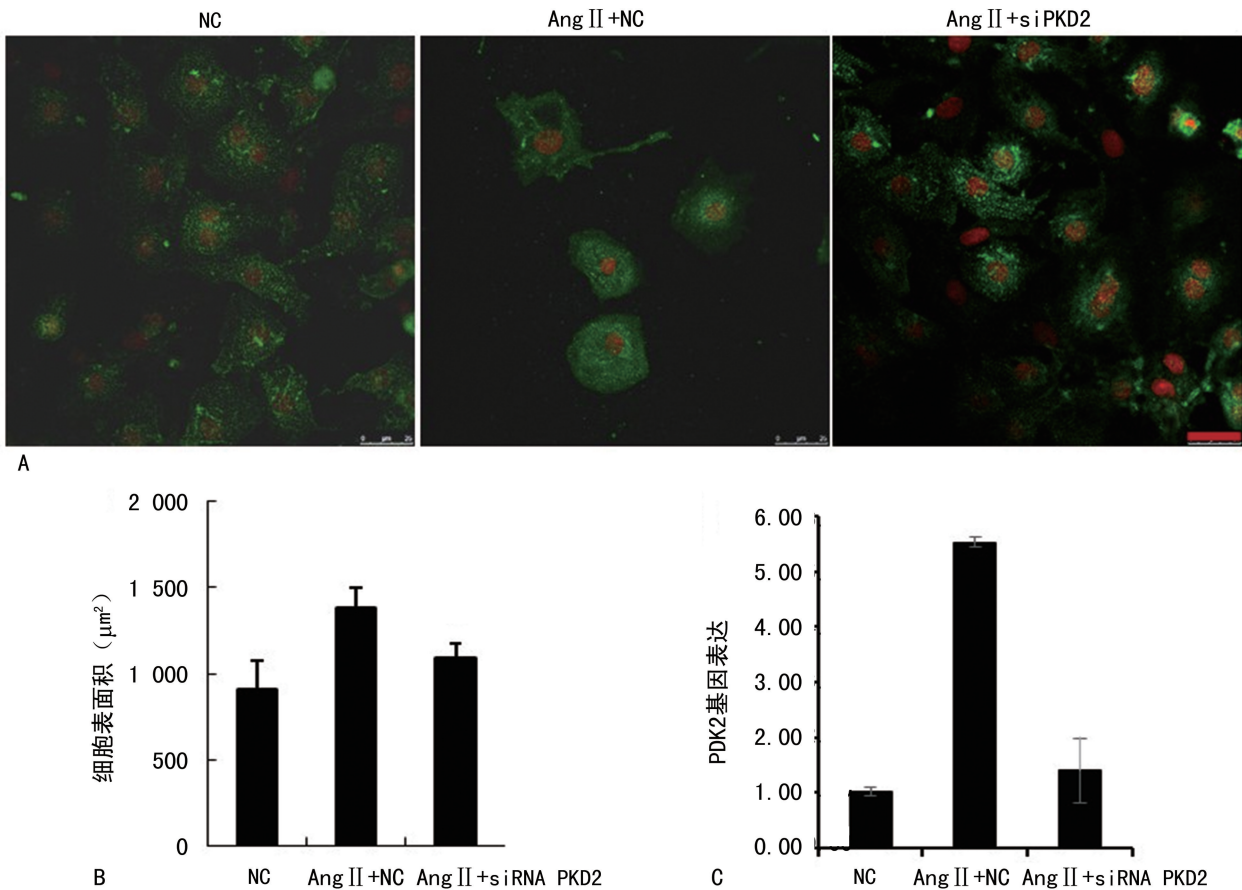
A: Western blot 分析;B:Real-time PCR 分析;C:免疫荧光分析

图 1 PKD2 在 Ang II 诱导的 PCH 中表达上调



A:降低 PKD2 抑制 Ang II 诱导 ANF 表达上调;B:降低 PKD2 抑制 Ang II 诱导 β-MHC 表达上调;C:PKD2 的干扰效率

图 2 降低 PKD2 抑制 Ang II 诱导的心肌肥大基因表达上调



A:α-actin 荧光染色(×20);B:细胞表面积分析;C:PKD2 基因表达

图 3 心肌细胞表面积分析

2.2 沉默 PKD2 可以抑制 Ang II 诱导的心肌肥大基因上调 经 Ang II 处理 ANF 基因表达显著上调 [(4.21±0.87)倍]。通过 siRNA 降低 PKD2 表达显著抑制了 Ang II 诱导的 ANF 表达上调。与之相似, Ang II 处理显著上调 β-MHC 表达 [(2.23±0.20)倍],降低 PKD2 表达显著抑制了 Ang II 诱导的 β-MHC 表达上调。见图 2。

2.3 降低 PKD2 表达阻断 Ang II 诱导的心肌细胞表

面积增大 Ang II 处理显著增大心肌细胞细胞面积,通过 siRNA 降低 PKD2 表达显著抑制 Ang II 诱导心肌细胞增大。Real-time PCR 结果显示 siRNA 显著降低 PKD2 表达。见图 3。

3 讨 论

PCH 发生机制非常复杂,目前普遍认为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)过度激活在 PCH 发生过程中起关键调控作用^[10-13]。RAAS 是一类由多种

肽类激素和相应酶组成的体液调节因子的总称。当受到病理刺激时,在肾素、血管紧张素转化酶(ACE)、氨基肽酶 A(APA)和氨基肽酶 N(APN)等多个酶共同作用下,血管紧张素源转变为 Ang I、Ang II、Ang III 和 Ang IV^[14]。其中 Ang II 是介导 RAAS 参与 PCH 发生的重要效应因子。Ang II 可以与细胞表面受体相结合,活化细胞内 PCH 相关的基因表达,最终导致 PCH^[12]。因此研究参与 Ang II 诱发 PCH 过程的关键基因,是发掘治疗 PCH 新靶点的重要途径。本研究发现,在 PKD2 在 Ang II 诱导的 PCH 中表达显著上调,降低 PKD2 表达可以有效抑制 Ang II 诱导的 PCH 标志基因 ANF 和 β -MHC 表达上调和心肌细胞表面增大。这表明,PKD2 在 Ang II 诱导的 PCH 过程中发挥重要作用,抑制其表达可以降低 Ang II 诱导的 PCH。通过小分子抑制剂或基因干预方法抑制 PKD2 活性有可能会成为一种治疗 PCH 的潜在新策略。

PKD 广泛参与细胞增殖、分化等多个生物学过程。PKD 有 3 个亚型:PKD1、PKD2 和 PKD3^[8]。PKD1 和 PKD3 参与 PCH 的发生。BOSSUYT 等^[15]研究发现,过表达 PKD1 可以使 HDAC5 超磷酸化,促使后者迁出细胞核进入细胞质,从而促进心肌肥大病程相关蛋白表达,导致 PCH。TAN 等^[16]报道 Ang II 可以促进 PKD1 表达,介导 PCH 发生。以往研究表明,PKD3 通过激活钙调神经磷酸酶(CaN),CaN 促进活化 T 细胞核因子(NFAT4)去磷酸化,去磷酸化 NFAT4 进入细胞核增强 PCH 相关基因的表达,最终诱导 PCH^[5]。本研究发现,PKD2 参与调控 Ang II 诱导的 PCH 发生。这表明 PKD 基因 3 个亚型 PKD1、PKD2 和 PKD3 均在 PCD 的发生过程起重要调控作用。MEREDITH 等^[17]研究发现 PKD1 选择性抑制剂对防止实验动物 PCH 的发生效果不理想。出现这一结果的原因可能会很多,但最可能的一个原因就是单一抑制 PKD1 亚型时,其他两个亚型 PKD2 或 PKD3 仍然在 PCD 形成过程中发挥作用,诱导 PCD 发生。因此,探索能够同时抑制 PKD1、PKD2 和 PKD3 的小分子化合物或基因干预方式可能是基于 PKD 靶点治疗 PCH 的新思路。

综上所述,PKD2 在 Ang II 诱导的 PCH 中发挥重要作用,抑制 PKD2 表达能显著降低 Ang II 诱导的 PCH。

参考文献

[1] SHIMIZU I,MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. J Molecul Cell Cardiol,2016,

97(2):45-62.

[2] NAKAMURA M,SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. Nature Rev Cardiol,2018,15(7):387-407.

[3] VEGA R B,HARRISON B C,MEADOWS E,et al. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5[J]. Molecul Cellular Biol,2004,24(19):8374-8385.

[4] FIELITZ J,KIM M S,SHELTON J M,et al. Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(8):3059-3063.

[5] LI C,LI J,CAI X,et al. Protein kinase D3 is a pivotal activator of pathological cardiac hypertrophy by selectively increasing the expression of hypertrophic transcription factors[J]. J Biol Chem,2011,286(47):40782-40791.

[6] BACKS J,BACKS T,NEEF S,et al. The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2009,106(7):2342-2347.

[7] MIA S,CASTOR T,MUSCULUS K,et al. Role of AMP-activated protein kinase α 1 in angiotensin-II-induced renal Tgfss-activated kinase 1 activation[J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,476(4):267-272.

[8] MANNING G,WHYTE D B,MARTINEZ R,et al. The protein kinase complement of the human genome[J]. Science,2002,298(5600):1912-1934.

[9] AI D,PANG W,LI N,et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. Proc Nat Aca Sci U S A,2009,106(2):564-569.

[10] SHUBEITA H E,MCDONOUGH P M,HARRIS A N,et al. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis,sarcomere assembly,and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy[J]. J Biolog Chem,1990,265(33):20555-20562.

[11] ARONOW B J,TOYOKAWA T,CANNING A,et al. Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy[J]. Physiol Genom,2001,6(1):19-28.

[12] VAN THIEL B S,VAN DER PLUIJM I,TE RIET L,et al. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease[J]. Europ J Pharmacol,2015,763(Pt A):3-14.

[13] MIRABITO COLAFELLA K M,BOVEE D M,DANSER A H. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets[J]. Exp Eye Res,2019,186:107680.

(下转第 3789 页)

参考文献

- [1] LANCET T. Lung cancer; despite advances, prevention is still best[J]. *Lancet*, 2016, 388(10044): 533.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA*, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] HORINOUCI H. The Prospect of patritumab for treating non-small cell lung cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(12): 1549-1555.
- [4] LIN X, HU D, CHEN G, SHI Y, et al. Associations of THBS2 and THBS4 polymorphisms to gastric cancer in a Southeast Chinese population[J]. *Cancer Genet*, 2016, 209(2): 215-222.
- [5] MCCART REED AE, SONG S, KUTASOVIC JR, et al. Thrombospondin-4 expression is activated during the stromal response to invasive breast cancer[J]. *Virchows Arch*, 2013, 463(4): 535-545.
- [6] KIM D J, CHRISTOFIDOU E D, KEENE D R, et al. Intermolecular interactions of thrombospondins drive their accumulation in extracellular matrix[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(14): 2640.
- [7] HUANG T, WANG L, LIU D, et al. FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5): 1501-1512.
- [8] LIU J, CHENG G, YANG H, et al. Reciprocal regulation of long noncoding RNAs THBS4-003 and THBS4 control migration and invasion in prostate cancer cell lines[J]. *Mol Med Reports*, 2016, 14(2): 1451-1458.
- [9] SU F, ZHAO J, QIN S, et al. Over-expression of thrombospondin 4 correlates with loss of miR-142 and contributes to migration and vascular invasion of advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23277-23288.
- [10] MUPPALA S, XIAO R, KRUKOVETS I, et al. Stenina-Adognravi O; Thrombospondin-4 mediates TGF-beta-induced angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2017, 36(36): 5189-5198.
- [11] CURTIS C, SHAH S P, CHIN S F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups[J]. *Nature*, 2012, 486(3): 346-352.
- [12] GUO Y, ZHANG Z, WU H E, et al. Increased thrombospondin-4 after nerve injury mediates disruption of intracellular calcium signaling in primary sensory neurons[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 117(3): 292-304.
- [13] HORIGUEHI H, YAMAGATA S, RONG QIAN Z, et al. Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis[J]. *J Med Invest*, 2013, 60(1/2): 91-96.
- (收稿日期: 2019-06-05 修回日期: 2019-09-10)
- (上接第 3784 页)
- [14] PACURARI M, KAFOURY R, TCHOUNWOU P B, et al. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling[J]. *Int J Inflam*, 2014, 2014: 689360.
- [15] BOSSUYT J, HELMSTADTER K, WU X, et al. Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure[J]. *Circulat Res*, 2008, 102(6): 695-702.
- [16] TAN M, XU X, OHBA M, et al. Angiotensin II-induced protein kinase D activation is regulated by protein kinase C δ and mediated via the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12): 2271-2276.
- [17] MEREDITH E L, BEATTIE K, BURGIS R, et al. Identification of potent and selective amidobipyridyl inhibitors of protein kinase D[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(15): 5422-5438.
- (收稿日期: 2019-05-09 修回日期: 2019-08-08)