

家兔心力衰竭早期心肌受磷蛋白磷酸化程度增加

陆文林 宋建平 邹 操 王 蕾 韩莲花 赵彩明 刘志华

【摘要】 目的:探讨心力衰竭(心衰)心肌细胞磷酸化受磷蛋白表达异常的临床意义。 方法:将 20 只家兔随机分为两组:假手术组和心衰组,各 10 只。通过超容量负荷联合压力负荷建立家兔心衰模型,利用心导管术和心脏多普勒观察手术前后家兔血流动力学及心脏结构和功能的变化。采用蛋白免疫印迹(Western blot)法测定心肌组织蛋白激酶 A(PKA)、总受磷蛋白(T-PLB)和第 16 位丝氨酸磷酸化受磷蛋白(Ser16-P-PLB)表达水平。 结果:家兔心衰组与假手术组相比,左室舒张末压明显增加,为(-7 ± 4.6) mmHg 对(24.6 ± 6.7) mmHg,左室短轴缩短率[(39.3 ± 5.53)%对(23.8 ± 7.30)%]和左室射血分数[(72.76 ± 4.85)%对(47.8 ± 6.05)%]均明显降低($P < 0.01$)。心肌组织 T-PLB 表达无明显差异,PLB 磷酸化程度 Ser16-P-PLB/T-PLB 和 PKA 表达均增加。

结论:心衰早期心肌受磷蛋白磷酸化程度表达增加,与蛋白激酶 A 表达增加有关。

【关键词】 心力衰竭;受磷蛋白;丝氨酸-16-磷酸化;蛋白激酶 A

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.014

Phosphorylation of phospholamban at Ser16 is increased in myocardium of rabbits with mild heart failure

LU Wen-lin¹, SONG Jian-ping², ZOU Cao², WANG Lei², HAN Lian-hua², ZHAO Cai-ming², LIU Zhi-hua² 1. Department of Cardiology, Huaiyin Hospital, Jiangsu 223300; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu 215006

【Abstract】 Objective: To investigate the abnormal abundances of phospholamban phosphorylation at Ser16 in cardiomyocytes of rabbit with mild heart failure. **Methods:** Twenty rabbits were divided into two groups: 10 rabbits with heart failure induced by volume plus pressure overload and 10 sham-operated animals. The hemodynamic parameters and cardiac structure and function were detected via catheterization and echocardiography, respectively. Protein kinase A (PKA), phospholamban (PLB) and phosphorylation of Ser16-phospholamban (P-Ser16-PLB) protein abundances were determined by Western blot analysis. **Results:** Left ventricular end diastolic pressure in heart failure rabbits was significantly increased compared with that in sham-operated rabbits(-7 ± 4.6 vs 24.6 ± 6.7 , $P < 0.01$), while their left ventricular shorting fraction [(39.3 ± 5.53)% vs (23.8 ± 7.30)%] and ejection fraction [(72.76 ± 4.85)% vs (47.8 ± 6.05)%] were decreased ($P < 0.01$). In heart failure rabbits, there was no significant difference with the abundances of T-PLB($R_{T-PLB/actin}$: 1.12 ± 0.023 vs 1.11 ± 0.045 , $P = 0.069$), whereas the expressions of Ser16-P-PLB, the degree of phospholamban phosphorylation at Ser16 and PKA were markedly increased. **Conclusion:** In early stage of heart failure, the increased phosphorylation of phospholamban at Ser16, which is due to increased expression of PKA, may contribute to maintenance of cardiac performance.

【Key words】 Heart failure; Phospholamban; Phosphorylation of Ser16-phospholamban; Protein kinase A

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(30800460)

作者单位:223300 淮安市淮阴医院心内科(陆文林);215006

苏州大学附属第一医院心内科(宋建平、邹 操、王 蕾、韩莲花、赵彩明、刘志华)

通信作者:宋建平 Email:j_psong@yahoo.com.cn

受磷蛋白(PLB)是肌浆网钙泵(SERCA2a)的一种功能调节蛋白^[1]。PLB 第 16 位丝氨酸通过蛋白激酶 A(PKA)介导磷酸化(Ser16-P-PLB)对 SERCA2a 功能调节起主要作用^[2]。正常情况下,交感神经系统通过 β_1 受体、G 蛋白、cAMP 途径激

活 PKA。Sande 等^[3]研究表明,心衰时 PLB Ser16 磷酸化程度降低,但也有实验显示心衰时 PLB Ser16 磷酸化程度无明显变化^[4]。这与慢性心衰时交感神经系统亢进似乎不符。因此,我们利用超容量负荷联合压力负荷建立兔心衰模型,测定家兔心衰心肌组织总受磷蛋白(T-PLB)、Ser16-P-PLB、PKA 蛋白表达水平,探讨其在心衰发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

家兔 20 只,雌雄不限,体重 2.0~2.5 kg,购于苏州大学实验动物中心。PLB 一抗购于 Thermo 公司,PKA 和 Pser16-PLB 一抗购于 abcam 公司,二抗羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG、蛋白免疫印迹(Western blot)试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型建立 动物常规饲养,经过超声心动图检查排除心脏器质性病变后,随机分为假手术组和心衰组,每组各 10 只。采用超容量负荷联合超压力负荷构建家兔心衰模型^[5-7]。首先诱导主动脉瓣关闭不全,两周后行腹主动脉缩窄,再观察 4~5 周。各组兔术后标准饲料喂养,密切观察其精神状态、食欲、活动量、呼吸困难及肺部啰音等心衰表现。

1.2.2 超声心动图 利用 Sonos 7500 型超声诊断仪,探头频率 5~12 MHz,分别于术前和术后 6~7 周行心脏超声检查,测量左室射血分数(LVEF),心衰标准为 LVEF<50%。

1.2.3 血流动力学检测 在术前和实验观察终点时,经颈总动脉行左心导管术。将 4F 导管送至左室,与多道生理信号记录系统(成都仪器厂 RM6240 生物信号采集处理系统)连接后测量心率(HR)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、压力上升最大速率($+dp/dt_{max}$)、压力下降最大速率($-dp/dt_{max}$),并用 Weiss 公式计算左室收缩指数、左室短轴缩短率(LVFS)。完成上述指标测定后,开胸取出心脏,迅速放于 4℃生理盐水的烧杯中,洗净残血,去除脂肪组织,-70℃保存备用。

1.3 蛋白表达的测定^[1,8]

1.3.1 总蛋白的提取 取左心室肌组织标本 100 mg,剪碎,置于离心管中,加入细胞裂解液及蛋白酶抑制剂,在冰上用高速匀浆器打碎。4℃离心 10 000 r/min、10 min,用 BCA 法测定蛋白浓度,-

70℃保存。

1.3.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 取含 25 μg 总蛋白的标本,于 95℃煮沸 5 min,用非连续梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(相对分子质量:PKA 43 000, T-PLB 25 000, Ser16-P-PLB 6500)。分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%。首先电压 35V、电泳 40 min 直到样品在浓缩胶底部成一直线,然后 100V、电泳 80 min(Ser-16-PLB 电压为 100V、电泳 60 min)至溴酚蓝到达分离胶底部。

1.3.3 蛋白免疫印迹 在冰水中将凝胶上的蛋白电转移到硝酸纤维膜上,电压 110V、75 min(Ser-16-PLB 为 110V、45 min);然后硝酸纤维膜置于封闭液中,室温平缓摇动温育 1 h;再加入一抗(抗体滴度为 1:1000),4℃冰箱过夜。第 2 天用洗脱液在平缓摇动条件下漂洗 4 次,第一次 10 min、后三次为 5 min,再加入 1:1000 二抗(PLB、PKA 为羊抗鼠 IgG, Ser-16-PLB 为羊抗兔 IgG),室温下摇床孵育 1 h;然后用洗脱液漂洗 4 次(方法同前)。最后将显色剂 LumiGLO A 液和 B 液按 1:1 混合,直接加到硝酸纤维膜上,1 min 后将显色液用滤纸吸干,放入暗盒,加盖一层透明薄膜,曝光 3~5 min。

1.3.4 蛋白表达半定量分析 将胶片扫描至计算机内,应用 UVIDoc 成像仪进行条带灰度分析。目标蛋白与 β -actin 灰度比值表示蛋白表达半定量水平;P-Se16-PLB/T-PLB 表示受磷蛋白 16 位丝氨酸磷酸化程度。

1.4 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件包进行数据处理,组间均数比较采用 Student's *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能指标比较

家兔饲养过程中,心衰组 2 只死亡,假手术组无死亡。心衰组家兔 7 周时均表现不同程度的精神萎靡、进食和活动减少、呼吸频率增快。与假手术组相比,心率、LVEDP 明显增加,LVEF、LVFS 及左室收缩指数明显降低($P<0.01$,见表 1)。

2.2 磷酸化受磷蛋白表达半定量分析比较

蛋白免疫印迹结果显示,与假手术组相比,心衰组家兔心肌 T-PLB 表达无明显差别,而 PKA 和 Pser-16-PLB 表达增加(见图 1)。半定量分析显示,两组间差异有统计学意义(见表 2)。

表 1 两组家兔心功能比较($\bar{x} \pm s$)

	假手术组	心衰组
心率(次/分)	223 ± 21.9	268 ± 16.7 ⁽¹⁾
LVSP(mmHg)	106.1 ± 15.2	114.8 ± 13.2
LVEDP(mmHg)	-7 ± 4.6	24.6 ± 6.7 ⁽¹⁾
LV + dp/dt _{max} (mmHg/s)	4639.9 ± 989.8	3540 ± 672.5 ⁽¹⁾
收缩指数(s ⁻¹)	44 ± 11	27 ± 7 ⁽¹⁾
LV-dp/dt _{max} (mmHg/s)	-3742 ± 905	-3621 ± 523
LVEF(%)	72.76 ± 4.85	47.8 ± 6.05 ⁽¹⁾
LVFS(%)	39.3 ± 5.53	23.8 ± 7.30 ⁽¹⁾

注:与假手术组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$

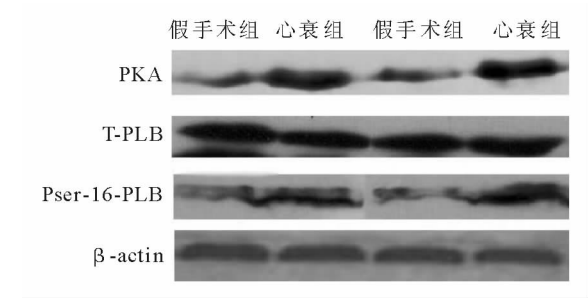


图 1 各组蛋白免疫印迹结果

表 2 两组家兔心肌蛋白表达水平半定量分析比较

	假手术组	心衰组
T-PLB	1.12 ± 0.023	1.11 ± 0.045
Pser-16-PLB	0.44 ± 0.144	0.86 ± 0.156 ⁽¹⁾
Pser-16-PLB/T-PLB(%)	39.24 ± 4.263	72.88 ± 5.047 ⁽¹⁾
PKA	0.38 ± 0.102	0.88 ± 0.151 ⁽¹⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$

3 讨论

本试验采用超容量联合超压力负荷构建家兔心衰模型。结果显示,与假手术组相比,心衰组家兔 LVEDP 明显增加, LVFS、收缩指数、LVEF 显著降低;心衰组家兔心肌组织 T-PLB 表达未见明显差异,而 PKA 和 Pser-16-PLB 表达增加。

PLB 最初是从心脏微粒体中提取,是 cAMP 依赖蛋白激酶的主要底物和心肌肌浆网钙泵(SERCA)的主要调节蛋白^[9-12]。PLB 的磷酸化状态主要受一些磷酸激酶如 cAMP 依赖的 PKA、Ca²⁺ 依赖性蛋白激酶 II 等影响,当这些蛋白激酶表达和活性升高时,就使 PLB 磷酸化程度增高而导致 SERCA2a 的活性升高^[13-15]。大量研究证实,PLB 第 16 位丝氨酸和第 17 位苏氨酸分别被 PKA 和 CaMK II 激酶磷酸化可增强 SERCA 的活性^[9-12,16]。

PLB 去磷酸化时与 SERCA2a 结合,抑制了 SERCA2a 对钙离子的亲和力,而磷酸化后与 SERCA2a 解离, SERCA2a 对钙离子亲和力增加,肌浆网钙回摄能力提高^[17]。PLB 有 3 个磷酸化位点,但主要发挥作用的是 Ser-16 位点的磷酸化。

Ito 等^[18]通过主动脉缩窄建立的鼠肥厚性心肌病模型,在心衰早期心肌 PLB 表达水平不变。Babu 等^[19]发现,鼠主动脉结扎后产生压力超负荷诱导心衰的模型中,心肌 PLB 蛋白表达水平降低。在人终末期心衰的心肌也发现 PLB 表达下降^[20]。也有实验发现心衰时心肌 PLB 表达水平不变^[21],这可能与不同的心衰动物模型、动物种类以及心衰不同阶段有关。本研究结果显示,心衰家兔心肌总 PLB 表达水平无差异,但 P Ser-16-PLB 表达增加,与 PKA 表达增加有关。Currie 等^[22]发现,心衰家兔心肌细胞 PLB Ser16 磷酸化增强, Boknik 等^[23]亦发现心衰大鼠心肌组织中 PLB 磷酸化程度增强。有研究表明,心衰时 PLB Ser16 磷酸化程度减低^[3],但也有实验显示心衰时 PLB Ser16 磷酸化程度无明显变化^[13,24],与本实验结果不完全一致。

慢性心衰时交感神经系统持续激活,早期通过 β₁ 受体介导激活 PKA,但在后期由于 β₁ 受体密度下调,胞内 cAMP 水平下降,PKA 活性下调。因此,PLB Ser16 磷酸化程度在不同心衰实验中结果不一致,除与不同动物模型有关之外,可能更重要的是心衰程度不同。本实验心衰组家兔处于心衰早期,PKA 表达增加,使 PLB 第 16 位 Ser 磷酸化程度增加, SERCA2a 活性增强,这有助于维持心肌舒缩功能。

参 考 文 献

[1] MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003,4 (7):566-577.

[2] Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, et al. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions [J]. Cardiovasc Res, 2005,68(3):366-375.

[3] Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, et al. Reduced level of serine (16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2a activity[J]. Cardiovasc Res, 2002,53(2):383-391.

[4] Boateng S, Seymour AM, Dunn M, et al. Inhibition of endogenous cardiac phosphatase activity and measurement of sarcoplasmic reticulum calcium uptake: a possible role of

- phospholamban phosphorylation in the hypertrophied myocardium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239(3):701-705.
- [5] 邹操,刘志华,赵彩明,等. 超容量负荷联合压力负荷制备家兔心衰模型的可行性探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2005,25(4):211-214.
- [6] Pogwizd SM. Nonreentrant mechanisms underlying spontaneous ventricular arrhythmias in a model of nonischemic heart failure in rabbits[J]. Circulation, 1995, 92(4):1034-1048.
- [7] Gilson N, el Houda Bouanani N, Corsin A, et al. Left ventricular function and beta-adrenoceptors in rabbit failing heart[J]. Am J Physiol, 1990, 258(3 Pt 2):H634-H641.
- [8] El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, et al. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(2):223-229.
- [9] Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function[J]. Physiol Rev, 1998,78(4):921-947.
- [10] MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 566-577.
- [11] Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000,32(12):2131-2139.
- [12] Kadambi VJ, Kranias EG. Phospholamban: a protein coming of age[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239(1): 1-5.
- [13] Mills GD, Kubo H, Harris DM, et al. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(1): H61-H70.
- [14] El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, et al. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,346(3): 700-706.
- [15] Chen Z, Akin BL, Jones LR. Mechanism of reversal of phospholamban inhibition of the cardiac Ca^{2+} -ATPase by protein kinase A and by anti-phospholamban monoclonal antibody 2D12 [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (29): 20968-20976.
- [16] Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, et al. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions [J]. Cardopvasc Res, 2005,68(3):366-375.
- [17] James P, Inui M, Tada M, et al. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum[J]. Nature, 1989, 342(6245):90-92.
- [18] Ito K, Yan X, Tajima M, et al. Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts[J]. Circ Res, 2000, 87(7):588-595.
- [19] Babu GJ, Bhupathy P, Carnes CA, et al. Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43 (2): 215-222.
- [20] Waggoner JR, Kranias EG. Role of phospholamban in the pathogenesis of heart failure[J]. Heart Fail Clin, 2005, 1(2):207-218.
- [21] Hoshijima M, Knöll R, Pashmforoush M, et al. Reversal of Calcium cycling defects in advanced heart failure toward molecular therapy[J]. J Am Coll Cardiol, 2006,48(9 Suppl 1):A15-A23.
- [22] Currie S, Smith GL. Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase type 2 (SERCA 2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure[J]. Cardiovasc Res, 1999, 41(1): 135-146.
- [23] Boknik P, Heinroth-Hoffmann I, Kirchhefer U, et al. Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2001,51(4):717-728.
- [24] Shintani-Ishida K, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(7): 743-751.

(收稿:2011-05-13 修回:2011-08-25)

(本文编辑:丁媛媛)