

AMPK 与心肌缺血-再灌注损伤

蔡怀秋 张改改 尹新华

【摘要】 心肌缺血-再灌注损伤是急性心肌梗死后溶栓疗法、经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路移植术后心肌损伤的重要机制之一。单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)不仅是细胞内能量代谢的重要调控因子,而且能通过抗氧化应激、内质网应激、抑制凋亡、调节自噬、抗炎、参与缺血预处理或缺血后处理等心肌保护效应减轻心肌缺血-再灌注损伤。因此,AMPK 对防治心肌缺血-再灌注损伤有潜在的临床意义。

【关键词】 蛋白激酶;缺血-再灌注损伤;内质网应激;自噬;缺血预处理;缺血后处理
doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.01.005

心肌缺血-再灌注损伤是缺血心肌组织恢复血液灌注后,其代谢紊乱、功能障碍及结构损伤反而加重的现象,氧化应激、钙超载、心肌细胞能量代谢障碍、炎症、内质网应激等病理生理过程参与其发生。单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)是一种在真核细胞生物中广泛存在的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。研究发现 AMPK 广泛参与动脉粥样硬化、冠心病、心肌病、高血压等多种心血管疾病的发生、发展,本文就 AMPK 与心肌缺血-再灌注损伤方面研究进展做一简要综述。

1 AMPK 的概述

AMPK 是由催化亚基 α 和调节亚基 β 、 γ 组成的异源三聚体。 α 亚基中 N 末端的 Thr 172 位点的磷酸化为 AMPK 激活所必需;在能量缺乏时,AMPK α -Ser(485/491)位点的自磷酸化能减弱 AMPK 的活性^[1,2]。 β 亚基能够调节 AMPK 活性和亚细胞的定位,其保守的 C 末端序列是连接 α 、 γ 亚基的重要区域。 γ 亚基由 4 个串联的胱硫醚 β -合成酶区域(CBS)构成,能够结合单磷酸腺苷(AMP),在能量感受和调节中起作用^[3]。

人类的 AMPK 各亚基均有不同的亚型,分别是 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 等。 $\alpha 1$ 亚基主要存在于脂肪、胰岛、肝脏、内皮细胞和血管平滑肌细胞等; $\alpha 2$ 亚基在骨骼肌和心肌中表达丰富,是心脏 AMPK

活性的必需亚基; $\beta 1$ 在肝脏中高表达,骨骼肌中表达少,而 $\beta 2$ 则与之相反;在 γ 亚基的 33 种亚型中,心脏仅表达 $\gamma 1$ 和 $\gamma 2$ 亚基,且 $\gamma 2$ 亚基在心脏中占有主要地位^[2]。

研究发现,活化的 AMPK 能抑制消耗三磷酸腺苷(ATP)的物质合成代谢(糖原合成、脂肪合成、蛋白质合成、糖异生等)途径,增加产生 ATP 的分解代谢(葡萄糖的利用、脂肪酸氧化等)途径,以满足心肌细胞的代谢需要。

哺乳动物中 AMPK 主要的上游酶包括肿瘤抑制因子——肝激酶 B1(LKB1)、钙-钙调蛋白依赖的蛋白激酶激酶- β (CaMKK β)、转化因子 β -激活酶-1(TAK1)等^[2,4]。体内至少存在着 2 种及以上的调控 AMPK 活性的信号途径,一是能量消耗途径,主要依赖细胞内 AMP 水平和 LKB1 实现的;二是细胞内 Ca^{2+} -CaMKK 途径^[5]。另外,TAK1 也称为促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 7(MAP3K7),目前其激活 AMPK 的机制尚不明确,有报道缺血心脏中活化的 TAK1 可以调节 LKB1 活性,进而激活 AMPK。因此,调控 AMPK 活化的信号通路仍有待进一步研究。

2 AMPK 与心肌缺血-再灌注损伤

2.1 优化心肌能量代谢

2.1.1 增加缺血心肌对葡萄糖的摄取及糖酵解
AMPK 是缺血心脏中葡萄糖转运的重要调节因子。研究提示,AMPK 能通过激活一氧化氮(NO)-鸟苷酸环化酶信号系统、p38 促分裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及减少细胞对葡萄糖转运蛋白-4(GLUT-4)的胞吞等途径增加 GLUT-4 的转运,增

基金项目:国家自然科学基金(81000046)

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科(蔡怀秋,尹新华);100016 清华大学第一附属医院北京华信医院干部病房(张改改)

通信作者:尹新华,Email:harbin0910@yahoo.com

加心肌对葡萄糖摄取。然而, Webster 等^[6]提出, AMPK 通过 GLUT4 介导的葡萄糖摄取是不充分的, 补充 NO 虽能改善 GLUT4 在细胞膜的插入, 但不能增加葡萄糖的摄取, 这一机制有待进一步阐明。此外, AMPK 还可磷酸化并激活 6-磷酸果糖激酶-2(PFK-2), 使 2,6-二磷酸果糖合成增加, 从而变构激活糖酵解的限速酶——磷酸果糖激酶-1(PFK-1), 使糖酵解产生增加。

2.1.2 增加脂肪酸氧化及线粒体的生物合成 在再灌注早期, AMPK 可以磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC), 使其失活, 减少能抑制脂肪酸转运至线粒体的丙二酰辅酶 A 的含量, 增加脂肪酸的氧化。近有报道, AMPK 能通过激活心肌细胞线粒体生物合成的调节因子——过氧化物酶体增殖物激活受体- γ -共激活因子-1 α (PGC-1 α), 增加线粒体的生物合成, 继而增加脂肪酸的 β 氧化^[7]。

2.1.3 抑制蛋白质的合成和减少 ATP 的消耗 在缺氧条件下, 活化 AMPK 抑制蛋白质合成的主要机制: (1) 增加磷酸化的真核翻译起始因子-2 α (eIF-2 α) 表达, 减少蛋白质翻译的起始^[8]。(2) 磷酸化并激活调节肽链延长因子——真核延长因子 2(eEF2) 激酶, 使 eEF2 失活, 减少蛋白质合成。(3) 调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR), 通过磷酸化并使其失活; 或者通过磷酸化 mTOR 的上游酶复合型结节性硬化病-2(TSC2), 使其失活, 减少蛋白质合成。

2.2 抗氧化应激

再灌注初期, 氧自由基爆发所造成的氧化应激损伤是缺血-再灌注损伤的主要致病机制之一。研究表明多种药物如白藜芦醇、二甲双胍等均可以通过激活 AMPK 信号通路增加细胞活力, 减轻氧化应激所致的心肌细胞凋亡^[9-11]。Yi 等^[12]报道脂连素能抑制心肌梗死引起的尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX) gp91phox 亚基活性增加和超氧化物的产生, 这一作用可能部分通过 AMPK 依赖的途径实现。

2.3 减轻心肌异常的内质网应激反应

在心肌缺血-再灌注损伤中, 缺血缺氧、葡萄糖/营养物质匮乏引起的能量代谢障碍, 大量自由基及钙超载等各种刺激使内质网稳态遭到破坏, 通过细胞内相应的信号通路, 触发内质网应激(ERS)反应。严重、持久的 ERS, 会激活其特有的凋亡信号分子——C/EBP 同源蛋白(CHOP)、c-Jun 氨基末端

激酶(JNK)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)-12, 引发 ERS 所致的细胞凋亡。研究证实 AMPK 可以作为 ERS 的生理抑制剂^[13], 即活化的 AMPK 通过减轻异常的 ERS, 保护心肌缺血-再灌注损伤^[14]。这一机制可能与 eIF-2 α ^[8]、eEF2 的失活, 减轻蛋白质合成有关。另外, 活化的 AMPK 可以增加糖调节蛋白 78(GRP78)的水平、减少促凋亡分子 CHOP、caspase-12 及 caspase-3 的表达, 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2/促凋亡蛋白 Bax 比率, 抑制 ERS 诱导的凋亡^[8]。因此, AMPK 有望成为保护心肌缺血-再灌注损伤的新靶点。

2.4 抑制心肌细胞凋亡

活化的 AMPK 能够抑制心肌细胞凋亡^[8, 15]。大量文献提示, 多种 AMPK 的药理激动剂如二甲双胍、A-769662、脂连素、瘦素等在心肌缺血-再灌注中通过激活 AMPK 信号途径发挥抗凋亡的效应^[16-19]。在 C57BL/6J 小鼠心脏移植模型中, Chin 等^[16]发现二甲双胍通过激活 AMPK 减轻在移植过程中发生的缺血-再灌注损伤引起的细胞凋亡, 并能长期改善移植心脏功能, 减轻心脏移植血管病变及慢性排斥反应。Kim 等^[17]给予左冠状动脉结扎小鼠, 再灌注时预孵育 A-769662 激活 AMPK 后, 能增加心肌 eEF2 的磷酸化, 维持缺血期的能量供应, 延迟缺血性痉挛的发生, 减轻细胞凋亡。

2.5 调节自噬

自噬是与凋亡和坏死同时出现的另一种死亡方式, 即 II 型程序性细胞死亡。它是一种涉及长寿蛋白与细胞器降解的进化保守机制, 可以通过降解有害物质促进细胞生存, 然而过度的自噬又会通过降解细胞器导致细胞死亡。自噬在心肌缺血-再灌注损伤的不同阶段扮演着不同角色, 缺血期自噬轻度增加, 有一定的保护作用; 但在再灌注期自噬明显增加, 反而加重心肌损伤。Matsui 等^[20]研究发现, 在葡萄糖缺乏模拟心肌缺血诱导心肌细胞自噬中, 存在 AMPK 的激活和 mTOR 的失活, 抑制 AMPK 后可以减少葡萄糖缺乏诱导的保护性自噬, 提示心肌缺血期活化的 AMPK 可以引起保护性自噬; 而再灌注期是非 AMPK 依赖途径, 伴随自噬效应蛋白 Beclin1 的异常增加, 此时的自噬是有害的, 可能诱导细胞死亡。

2.6 抗炎

动物实验证实, AMPK 激活后能减少心肌梗死中促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)的产生,增加抑炎因子 IL-10 含量,减轻心肌损伤^[19]。然而,AMPK 减轻炎症的分子机制还不十分清楚,目前认为炎症相关转录因子——核因子(NF- κ B)可能是其发挥效应的靶点之一^[21]。研究发现,AMPK 激动剂 5-氨基咪唑-4-甲酰胺-1- β -D-呋喃核糖苷(AICAR)能抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌细胞 NF- κ B 转位^[22];长期 AMPK 的激活能抑制压力负荷诱导的大鼠心肌肥厚模型中活化的 NF- κ B 信号通路^[23]。因此,AMPK 可能通过调节 NF- κ B 的活性及炎症相关基因的表达,发挥抗炎效应。

2.7 参与缺血预处理、后处理的心肌保护效应

缺血预处理(IPC)和缺血后处理(ICPD)是近年来发现的能减少心肌梗死面积、抑制致死性再灌注损伤、减少再灌注心律失常的内源性心脏保护机制。研究表明,活化的 AMPK 参与 IPC 及 ICPD 的心肌保护效应^[24-26]。AICAR 在诱导大鼠心脏晚期 IPC 时,明显减少心肌梗死面积约 60%,并增加再灌注期心肌对葡萄糖的摄取^[24];激活的 AMPK 介导 IPC 可能通过调节细胞膜的 ATP 敏感的 K⁺ 通道活性和运输实现的^[25]。在 ICPD 的研究中,发现野生型小鼠缺血 30 min 后,给予 10s 冠状动脉再灌注/10 s 闭塞的 ICPD,能明显激活 AMPK,减少 AMPK 的去磷酸化酶 PP2C 表达,使心肌梗死面积明显减少^[26],提示活化的 AMPK 参与 ICPD 的心肌保护效应,但其具体机制尚不清楚。

3 结语

AMPK 不仅是调控机体细胞能量代谢的重要因子,也是心脏应对各种应激原的防御因子。AMPK 信号通路的激活是心肌缺血-再灌注损伤时的保护机制,具有重要的病理生理意义,为临床防治心肌缺血-再灌注损伤提供了新靶点。但是 AMPK 涉及的下游分子众多,信号网络复杂,它们之间的相互作用以及调控因子的表达尚未完全阐明,仍有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Beauloye C, Bertrand L, Horman S, et al. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(2): 224-233.
- [2] Ewart MA, Kennedy S. AMPK and vasculoprotection[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(2): 242-253.
- [3] Wong AK, Howie J, Petrie JR, et al. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116(8): 607-620.
- [4] Zungu M, Schisler JC, Essop MF, et al. Regulation of AMPK by the ubiquitin proteasome system[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 4-11.
- [5] Yan H, Zhang DX, Shi X, et al. Activation of the Prolyl-hydroxylase oxygen-sensing signal cascade leads to AMPK activation in cardiomyocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(9): 2049-2059.
- [6] Webster I, Friedrich SO, Lochner A, et al. AMP kinase activation and glut4 translocation in isolated cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2010, 21(2): 72-78.
- [7] Zhu L, Wang Q, Zhang L, et al. Hypoxia induces PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis in the myocardium of TOF patients[J]. *Cell Res*, 2010, 20(6): 676-687.
- [8] Yeh CH, Chen TP, Wang YC, et al. AMP-activated protein kinase activation during cardioplegia-induced hypoxia/reoxygenation injury attenuates cardiomyocytic apoptosis via reduction of endoplasmic reticulum stress[J]. *Mediators Inflamm*, 2010; 130636.
- [9] Hwang JT, Kwon DY, Park OJ, et al. Resveratrol protects ROS-induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells[J]. *Genes Nutr*, 2008, 2(4): 323-326.
- [10] Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, et al. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase[J]. *Circulation*, 2009, 119(19): 2568-2577.
- [11] Wang XF, Zhang JY, Li L, et al. Beneficial effects of metformin on primary cardiomyocytes via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(12): 1876-1884.
- [12] Yi W, Sun Y, Gao E, et al. Reduced cardioprotective action of adiponectin in high-fat diet-induced type II diabetic mice and its underlying mechanisms[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1779-1788.
- [13] Dong Y, Zhang M, Liang B, et al. Reduction of AMP-activated protein alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo[J]. *Circulation*, 2010, 121(6): 792-803.
- [14] Tao J, Zhu W, Li Y, et al. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(4): H1471- H1486.
- [15] Chen MB, Wu XY, Gu JH, et al. Activation of AMP-activated protein kinase contributes to doxorubicin-induced cell death and apoptosis in cultured myocardial H9c2 cells[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 60(3): 311-322.
- [16] Chin JT, Troke JJ, Kimura N, et al. A novel cardioprotective agent in cardiac transplantation: metformin activation of AMP-activated protein kinase decreases acute ischemia-reperfusion injury and chronic rejection[J]. *Yale J Biol Med*, 2011, 84(4): 423-432.
- [17] Kim AS, Miller EJ, Wright TM, et al. A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-

- reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(1): 24-32.
- [18] Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, et al. Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(2): 309-319.
- [19] McGaffin KR, Witham WG, Yester KA, et al. Cardiac-specific leptin receptor deletion exacerbates ischaemic heart failure in mice[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 60-71.
- [20] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. Circ Res, 2007, 100(6): 914-922.
- [21] Li XJ, Wang XW, Du YJ. Protective effects of erythropoietin on myocardial infarction in rats: the role of AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. Am J Med Sci, 2011, 342(2): 153-159.
- [22] Wang C, Li L, Zhang ZG, et al. Globular adiponectin inhibits angiotensin II-induced nuclear factor kappaB activation through AMP-activated protein kinase in cardiac hypertrophy [J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1): 149-155.
- [23] Li HL, Yin R, Chen D, et al. Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy [J]. J Cell Biochem, 2007, 100(5): 1086-1099.
- [24] Kristiansen SB, Solskov L, Jessen N, et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases myocardial glucose uptake during reperfusion and induces late preconditioning; potential role of AMP-activated protein kinase [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105(1): 10-16.
- [25] Sukhodub A, Jovanovi S, Du Q, et al. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K channels [J]. J Cell Physiol, 2007, 210(1): 224-236.
- [26] Bouhidel O, Pons S, Souktani R, et al. Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(4): 1580-1586.

(收稿:2012-09-04 修回:2012-10-26)

(本文编辑:金谷英)

(上接第 8 页)

- [11] Gupte R S, Vijay V, Marks B, et al. Upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase activity increases oxidative stress in failing human heart[J]. Journal of Cardiac Failure, 2007, 13(6): 497-506.
- [12] Takano H, Zou Y, Hasegawa H, et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases[J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(6): 789-794.
- [13] Zheng J, Koh X, Hua F, et al. Cardioprotection induced by Na⁺/K⁺-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. Cardiovasc Res, 2010, 89(1): 51-59.
- [14] Liu L, Zhao X, Pierre S V, et al. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(5): C1489-C1497.
- [15] Lee D I, Klein M G, Zhu W, et al. Activation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase modulates cardiac L-type Ca²⁺ channel function [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(4): 774-781.
- [16] Markou T, Makridou Z, Galatou E, et al. Multiple signalling pathways underlie the protective effect of levosimendan in cardiac myocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 667(1-3): 298-305.
- [17] Yano N, Suzuki D, Endoh M, et al. Beta-adrenergic receptor mediated protection against doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes: the impact of high ambient glucose [J]. Endocrinology, 2008, 149(12): 6449-6461.
- [18] Zheng J, Shen H, Xiong Y, et al. The β 1-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via Gas [J]. Amino Acids, 2008, 38(1): 75-84.
- [19] Kajimoto K, Shao D, Takagi H, et al. Hypotonic swelling-induced activation of PKN1 mediates cell survival in cardiac myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(1): H191-H200.
- [20] Endoh M. Novel signalling cascade for cardiac hypertrophy activation by uncoupling and internalization of 1-adrenoceptors [J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(1): 5-7.
- [21] Chu M, Iyengar R, Koshman Y E, et al. Serine-910 phosphorylation of focal adhesion kinase is critical for sarcomere reorganization in cardiomyocyte hypertrophy [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 409-419.
- [22] Franchini K G. Focal adhesion kinase — The basis of local hypertrophic signaling domains [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(2): 485-492.
- [23] Vitello A M, Du Y, Buttrick P M, et al. Serendipitous discovery of a novel protein signaling mechanism in heart failure [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 421(3): 431-435.
- [24] Chen P S, Ai T. Is c-Src tyrosine kinase a new target for antiarrhythmic drug therapy? [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(22): 2340-2341.
- [25] Hu G, Minshall R D. Regulation of transendothelial permeability by Src Kinase [J]. Microvasc Res, 2009, 77(1): 21-25.

(收稿:2012-07-31 修回:2012-10-08)

(本文编辑:金谷英)