

AMPK α 2 在主动脉夹层形成中的作用及机制*

华中科技大学同济医学院附属同济医院 雷蕾 杨晓云 郭倩男 周雁荣 郑智 潘友民*, 武汉 430030

摘要 目的:研究 AMPK α 2 蛋白在主动脉夹层(AD)形成中的作用。方法:通过临床标本收集和体外实验,检测主动脉组织磷酸化 AMPK α (Thr172)表达水平、血管平滑肌细胞表型转化、基质金属蛋白酶及炎症通路激活情况。结果:通过临床标本检测,发现 AD 患者主动脉组织磷酸化 AMPK α (Thr172)表达下调,血管平滑肌细胞发生表型转化,基质金属蛋白酶表达上调及炎症通路激活。体外实验采用 AMPK α 2 质粒和相应突变失活型 DN-AMPK α 2(T172A)质粒转染原代大鼠主动脉血管平滑肌细胞,予以 Ang II (10 μ mol/L)刺激 24 h,发现过表达 AMPK α 2 可缓解 Ang II 诱导的磷酸化 AMPK α (Thr172)下调,减轻血管平滑肌细胞表型转化、基质金属蛋白酶表达及炎症通路激活。而过表达失活型 DN-AMPK α 2(T172A)加重上述病理改变。结论:AMPK α 2 促进磷酸化 AMPK α (Thr172)表达,缓解主动脉血管平滑肌细胞表型转化、基质金属蛋白酶表达上调及炎症通路激活。

关键词 主动脉夹层;AMPK α ;表型转化;基质金属蛋白酶;炎症

中图分类号 R543.1 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20190615

Role and mechanism of AMPK α 2 in formation of aortic dissection LEI Lei, YANG Xiao-yun, GUO Qian-nan, ZHOU Yan-rong, ZHENG Zhi, PAN You-min*. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To elucidate the role and mechanism of AMPK α 2 in the formation of aortic dissection. Methods: The tissue samples were collected from controls and patients with type I aortic dissection, and the expression of phosphorylated-AMPK α (Thr172), phenotypic switch of vascular smooth muscle cells (VSMCs), expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and activation of inflammation were detected. Results: Down-regulation of phosphorylated-AMPK α (Thr172), phenotypic switch of VSMCs, up-regulation of MMPs and activation of inflammation were found in human aortic dissection tissues as compared with controls. *In vitro*, primary rat aortic smooth muscle cells were transfected with AMPK α plasmid or inactive mutant DN-AMPK α 2 (T172A) plasmid, incubated with AngII (10 μ mol/L) for 24 h and then subjected to subsequent assays. It was found that the overexpression of AMPK α 2 attenuated the down-regulation of phosphorylated-AMPK α (Thr172) and the phenotypic switch of VSMCs, up-regulation of MMPs and activation of inflammation, which were reversely exaggerated by the overexpression of DN-AMPK α (T172A). Conclusion: AMPK α 2 up-regulates the expression of phosphorylated-AMPK α (Thr172) and ameliorates the phenotypic switch of VSMCs, up-regulation of MMPs and activation of inflammation.

Key words Aortic dissection; AMPK α ; Phenotypic switch; Matrix metalloproteinases; Inflammation

主动脉夹层(aortic dissection, AD)为心血管急危重症,发病急剧,病死率高^[1]。高血压、肥胖、高脂血症、动脉粥样硬化、吸烟、年龄、高同型半胱氨酸血症、遗传学背景等是 AD 的危险因素^[2,3]。在高血压、炎症、氧化应激等刺激因素作用下,内膜受损形成破口,血液循破口进入血管中层,主动脉壁撕裂,形成真假双腔^[4]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]有 α 、 β 、 γ 三个亚基,其中催化亚基 α 有 α 1 和 α 2 两个亚型, α 2 主要表达于心肌、骨骼肌等肌组

织^[5]。AMPK α 2 在改善糖脂代谢、调节血管内皮功能、抑制平滑肌细胞增殖、抗心肌肥厚、抗炎、抗氧化应激方面有重要作用。AMPK α 2 在 AD 中作用尚未阐明。本文尝试研究 AMPK α 2 在 AD 形成中的作用。

材料与方法

人主动脉组织收集 人主动脉组织的收集遵循赫尔辛基宣言并符合华中科技大学同济医学院附属同济医院伦理审查委员会要求。所有纳入研究的患者均签署知情同意书。收集 5 名既往无心血管疾病病史的心脏移植供体主动脉组织和 9 名 I 型 AD 患者夹层破口附近主动脉组织,经年龄性别匹配,各筛选出 3 例,进行 Western Blotting 和免疫组化检测。

*基金项目:湖北省科技厅自然科学基金项目

(No:2015CFB072)

*通信作者:潘友民, E-mail:panyoumin@126.com

Western Blotting 主动脉组织匀浆或细胞裂解产物,测量蛋白质浓度。将蛋白质样品上样后电泳、转膜,5% BSA 封闭 2 h,加入一抗 4℃ 摇床过夜,二抗孵育 2 h,曝光。条带采用 Gel-ProAnalyzer 4.0 分析。所有一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司。

免疫组化 将人主动脉组织包埋、固定、脱水后切片,枸橼酸-枸橼酸钠抗原修复,用 3% H_2O_2 溶液(碧云天)去除组织内源性过氧化物。山羊血清(CST 公司)封闭 1 h,PBS 洗 3 遍。加入相应一抗,4℃ 封闭过夜,HRP 标记二抗孵育 0.5 h,DAB 显色。显微镜拍摄后,图片用 Image-pro Plus 分析。

大鼠原代血管平滑肌细胞分离和培养 取 3 月龄的 SD 大鼠 2 只,麻醉后打开胸腔,取胸主动脉,用眼科剪去除肋间动脉分支,轻柔去除血管外层脂肪组织。用生理盐水冲洗血管腔后,放入 1 mL 的 II 型胶原酶溶液(4 mg/mL)(Life Technology)中浸泡 20 min,用眼科镊剥除血管外膜,勿牵拉血管,纵行剪开血管,用无菌棉签刮除内皮细胞,将中层平滑肌组织剪碎,放入 3 mL II 型胶原酶溶液(4 mg/mL)中,室温摇床上消化 2~3 h。1000 g,10 min 离心后,弃上清。加入 5 mL 含 20% 胎牛血清和 100 U/L 双抗的 DMEM 培养基重悬,将组织块平铺在培养瓶瓶底,竖立培养瓶,使组织稍干,紧贴于培养瓶底。20 min 后,将培养瓶放平,使培养基浸润组织块,动作轻柔,勿使组织块飘起。培养箱培养 7 d,观察血管平滑肌细胞生长情况。用 1:200 稀释的 α -SMA (Abclonal 公司)鉴定原代主动脉血管平滑肌细胞,

FITC 标记荧光二抗。

细胞干预 原代主动脉血管平滑肌细胞长至 50%~70% 时,用 Thermo Scientific 公司转染试剂 TurboFectTransfection Reagent 转染 pEnter-GFP、pEnter-AMPK α 2 或 pEnter-DN-AMPK α 2 (T172A) 质粒(山东维真),24 h 后加入 10 μ mol/L 的 Ang II 干预 24 h,收集细胞行 Western Blotting 检测。

统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异分析使用单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

AD 患者主动脉组织磷酸化 AMPK α (Thr172) 表达水平下调、血管平滑肌细胞表型转化,基质金属蛋白酶及炎症通路激活 收集并筛选 3 名 AD 患者和 3 名正常供体主动脉组织,通过 Western Blotting,我们发现夹层破口处主动脉组织磷酸化 AMPK α (Thr172) 表达下调,而总 AMPK α 表达未见明显改变,见图 1A。AD 患者血管组织收缩性标志蛋白 α -SMA 表达显著下调,而分泌型标志蛋白 MMP-2、MMP-9 和炎症通路中 p-IkBa、p-STAT3 和 p-STAT4 表达均上调,见图 1B、1C。免疫组化检测发现 AD 患者破口处主动脉组织 I 型胶原 Col1 和 α -SMA 表达显著下降,而 MMP-9 显著上调,MMP-9 阳性细胞浸润多。血管中层 α -SMA 表达降低、走行紊乱且有囊性改变。正常组织 I 型胶原沉积显著, α -SMA 表达水平高且中层条纹较清楚,见图 2。

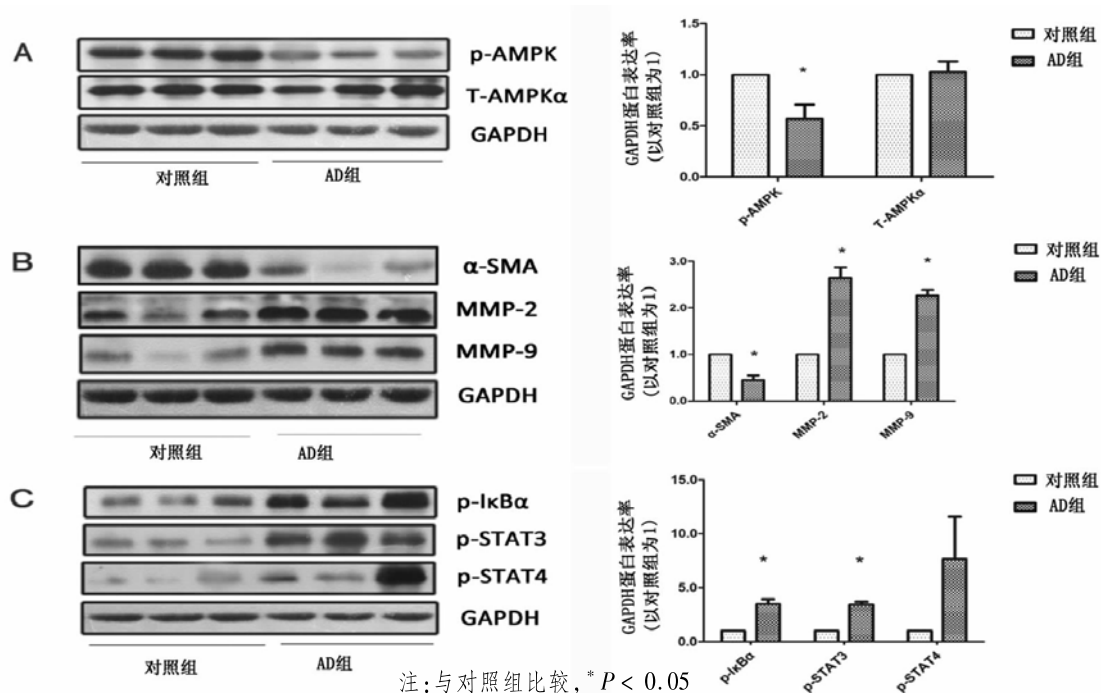


图1 Western Blotting 检测患者主动脉组织磷酸化 AMPK α (Thr172) 表达水平、血管平滑肌细胞表型转化,基质金属蛋白酶表达及炎症通路激活情况

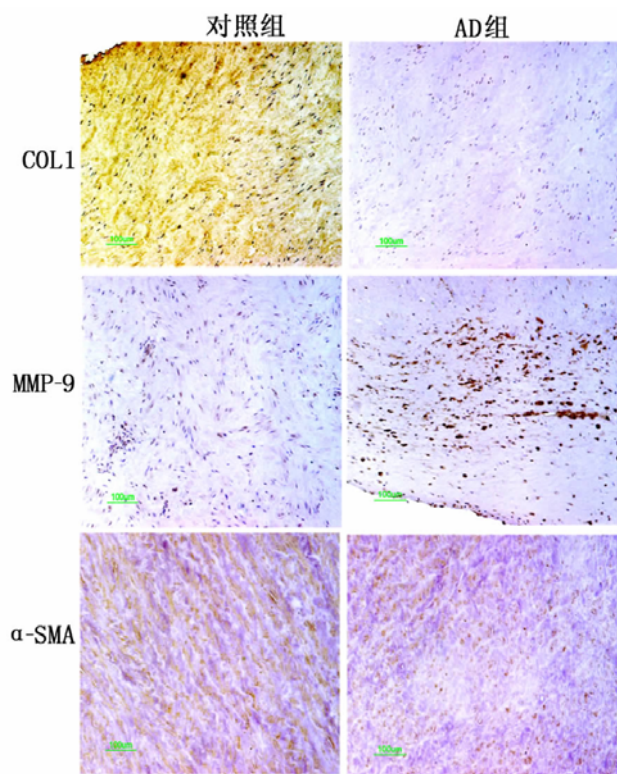


图2 对照组与AD患者破口处主动脉组织免疫组化

AMPK α 2 缓解 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化和基质金属蛋白酶表达上调 大鼠原代主动脉血管平滑肌细胞经鉴定,纯度高达 100%,见图 3A。Ang II 诱导原代血管平滑肌细胞 p-AMPK α (Thr172) 表达下调,见图 3B,收缩表型标记蛋白 α -SMA 和 Calponin1 表达下调,分泌表型标记分子 Vimentin 表达上调,基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 表达上调,见图 3C。而过表达 AMPK α 2 可缓解 Ang II 诱导的 p-AMPK α (Thr172) 表达下调,逆转 α -SMA 和 Calponin1 表达下调,MMP-2/MMP-9 表达上调的情况。但过表达 DN-AMPK α 2 (T172A) 无法缓解 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化和基质金属蛋白酶表达上调。

AMPK α 2 缓解 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞炎症通路激活 过表达 AMPK α 2 减轻 Ang II 诱导的 p-I κ B α 、p-STAT3 和 p-STAT4 上调,而过表达 DN-AMPK α 2 进一步加重 Ang II 诱导的 p-I κ B α 、p-STAT3 和 p-STAT4 表达,见图 4。

讨论

本研究通过免疫印迹方法发现 AD 患者组织磷酸化 AMPK α (Thr172) 表达显著下调,细胞外基质 I 型胶原减少,平滑肌收缩表型标记分子 α -SMA 表达降低,而促进细胞外基质降解的基质金属蛋白酶家族中 MMP-2、MMP-9 表达增高。此外炎症相关通路

p-I κ B α 、p-STAT3 和 p-STAT4 表达上调。我们推测 AD 发生与主动脉中层平滑肌细胞表型转化、细胞外基质降解过度、炎症激活有关。在体外实验中,过表达 AMPK α 2 上调磷酸化 AMPK α (Thr172),缓解 Ang II 诱导的平滑肌细胞表型转化、基质金属蛋白酶表达上调和炎症激活。过表达 DN-AMPK α 2 (T172A),由于 AMPK α 2 第 172 号位点发生突变,由苏氨酸突变为丙氨酸,失去保护作用。

AD 发生病理生理学改变:平滑肌细胞大量丢失,表型转化,基质金属蛋白酶过度激活、细胞外基质稳态破坏和炎症细胞浸润。平滑肌细胞表型转化:在各种因素作用下,血管平滑肌细胞由正常静止状态下的收缩特表型向高分泌性表型转变,收缩型表型标记分子 α -SMA、钙调蛋白 Calponin、平滑肌 β -MHC 等表达降低^[6],分泌型表型标记分子波形蛋白 Vimentin、骨桥蛋白 OPN、基质金属蛋白酶 MMP-2/MMP-9 等上调^[3,7],分泌大量细胞外基质。夹层发生时发现基质金属蛋白酶 MMPs 家族表达及活性显著升高,主要为 MMP-2、MMP-9,分解血管弹力纤维及胶原纤维,细胞外基质合成与降解失衡,血管壁中层局部断裂^[8,9]。同时,MMPs 促进单核/巨噬细胞等大量炎症细胞浸润,而大量炎症细胞分泌 MMPs,加重血管胶原和弹力纤维降解,进一步促进炎症细胞招募和浸润,形成“正反馈”。

磷酸化 AMPK 活化 PPAR- γ 转录辅助活化因子 1 (PGC1- α),促进脂肪分解,脂肪酸氧化,提高细胞内 ATP 水平;AMPK α 2 可抑制 TSC/mTOR、PI3K/AKT 活性,抑制下游 P70S6K,抑制蛋白质合成,发挥抗心肌肥厚作用。AMPK α 2 可抑制高糖诱导 ROS 及下游炎症激活对血管内皮细胞损伤^[10]。AMPK α 2 敲除后,内皮产生 eNOS 减少,NAPDH 氧化酶 NOX 激活,血管舒张功能受损^[11]。AMPK α 2 可缓解 Ang II 诱导心肌肥厚及心力衰竭^[12]。此外,AMPK α 2 可通过减少 S-周期激酶相关蛋白 (S-phase kinase-associated protein2, Skp2) 表达缓解血管损伤导致平滑肌增生^[13]。AMPK α 2 在改善血管内皮功能,抑制平滑肌细胞增殖,抗氧化应激方面有重要作用^[6,10],尤其 AMPK 激动剂二甲苯胍减轻肾脏 ROS 产生,缓解终末期糖尿病肾病进一步恶化^[14]。

本研究通过人主动脉组织和细胞实验,证明 AMPK α 2 促进磷酸化 AMPK α (Thr172) 表达,减轻主动脉血管平滑肌细胞表型转化,降低基质金属蛋白酶表达并抑制炎症通路激活。Wang 等^[15]报道,AMPK α 2 促进 AP-2 α 磷酸化激活,促进 MMP 表达

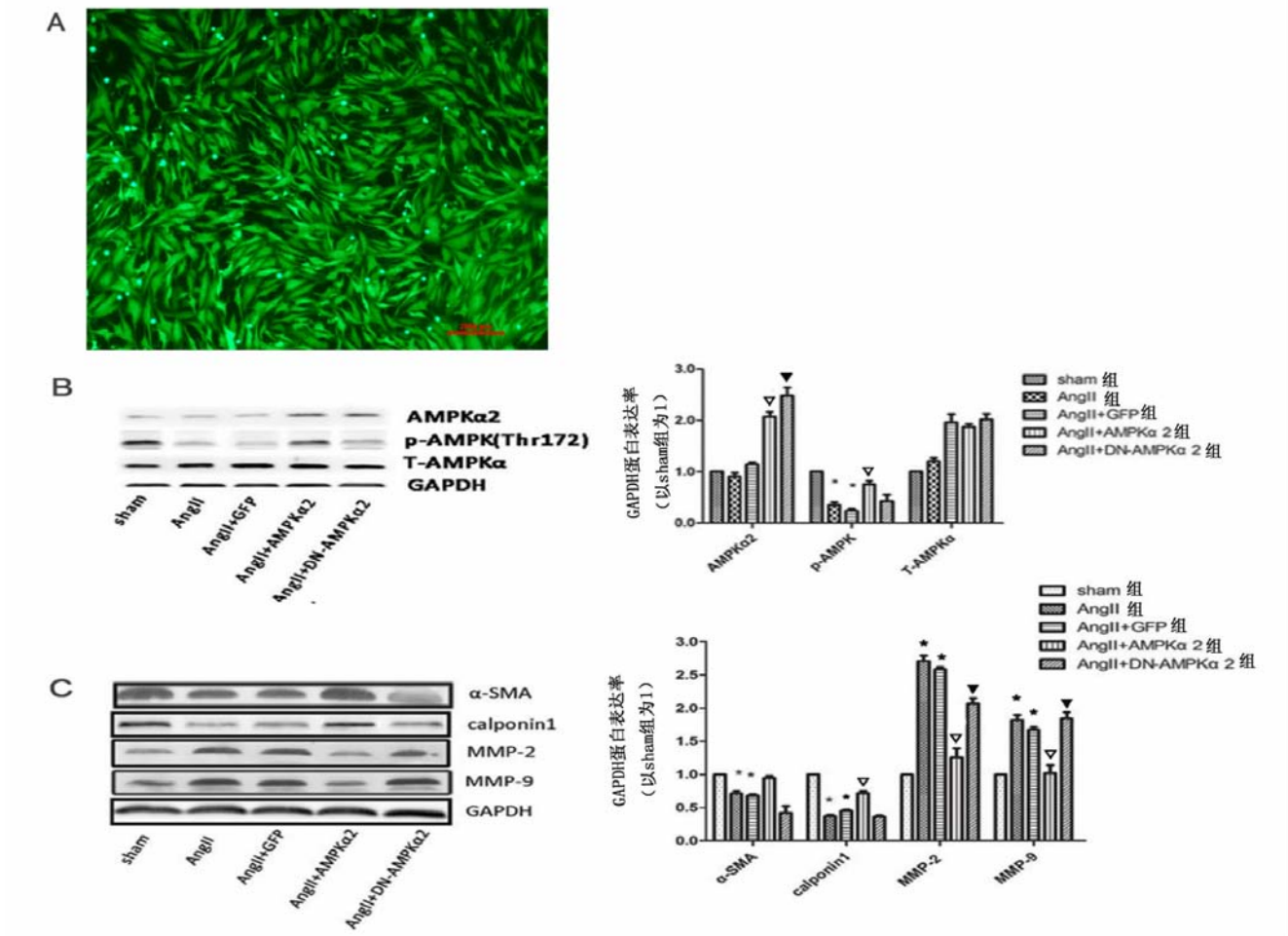


图 3 AMPK α 2 缓解 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞表型转化和基质金属蛋白酶表达上调

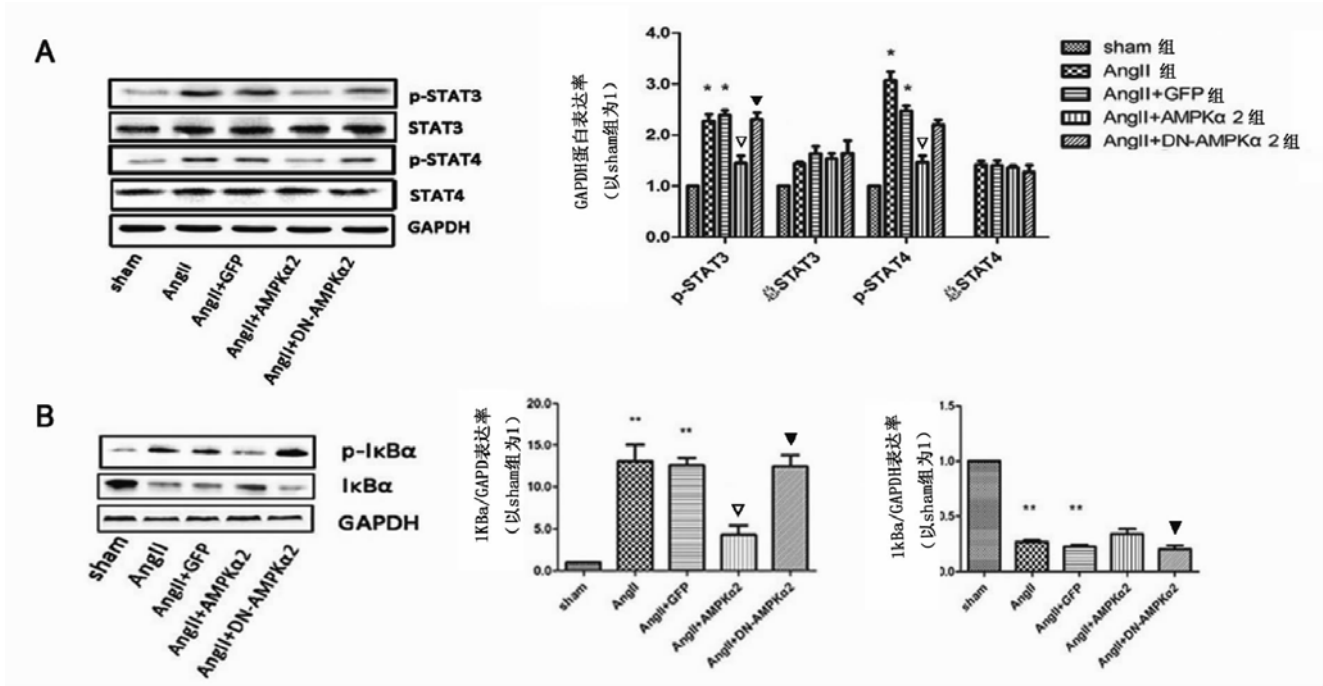


图 4 AMPK α 2 缓解 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞炎症通路激活

上调,从而诱导 Ang II 诱导主动脉瘤形成,与实验结果相矛盾。基质金属蛋白酶表达及活性上调,弹力纤维降解,促进主动脉瘤和 AD 形成。基质金属蛋白酶表达丰富的细胞除血管平滑肌细胞外,还有众多炎症细胞,如中性粒细胞、巨噬细胞和 T 细胞^[16~18],既往研究已经证实中性粒细胞和巨噬细胞在主动脉瘤及 AD 形成中的重要作用。Wang 等^[15]研究集中于血管平滑肌细胞,未研究炎症细胞在主动脉瘤形成中的作用。AMPK α 2 被证实具有抗炎作用,AMPK α 2^{-/-}小鼠主动脉炎症细胞浸润,磷酸化 STAT1 表达上调^[19]。AMPK α 2 可能通过抑制血管平滑肌细胞和炎症细胞内炎症通路激活,从而缓解炎症激活所诱导的基质金属蛋白酶表达上调,从而缓解 AD 形成。

参考文献

- Colledge J, Eagle KA. Acute aortic dissection [J]. The Lancet, 2008,372(9632): 55-66.
- Goldfinger JZ, Halperin JL, Marin ML, et al. Thoracic aortic aneurysm and dissection [J]. J Am Coll Cardiol, 2014,64(16): 1725-1739.
- Wu D, Shen YH, Russell L, et al. Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection [J]. J Surg Res, 2013,184(2): 907-924.
- 徐昶, 贺行巍, 李柱锡, 等. 主动脉夹层症状与原发破口位置、撕裂范围关系的探讨[J]. 内科急危重症杂志, 2015,21(4): 266-268.
- Daskalopoulos EP, Dufeys C, Bertrand L, et al. AMPK in cardiac fibrosis and repair: actions beyond metabolic regulation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016,91: 188-200.
- Branchetti E, Poggio P, Sainger R, et al. Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm [J]. Cardiovasc Res, 2013,100(2): 316-324.
- Inamoto S, Kwartler CS, Lafont AL, et al. TGFBR2 mutations alter smooth muscle cell phenotype and predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections [J]. Cardiovasc Res, 2010,88(3): 520-529.
- Shen YH, Zhang L, Ren P, et al. AKT2 confers protection against aortic aneurysms and dissections [J]. Circ Res, 2013,112(4): 618-632.
- Cai Z, Zhao G, Yan J, et al. CYP2J2 overexpression increases EETs and protects against angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice [J]. J Lipid Res, 2013,54(5): 1448-1456.
- Fan LM, Douglas G, Bendall JK, et al. Endothelial cell-specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection [J]. Circulation, 2014,129(25): 2661-2672.
- Wang S, Zhang M, Liang B, et al. AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes [J]. Circ Res, 2010,106(6): 1117-1128.
- Wang B, Zeng H, Wen Z, et al. CYP2J2 and its metabolites (epoxyeicosatrienoic acids) attenuate cardiac hypertrophy by activating AMPK α 2 and enhancing nuclear translocation of Akt1 [J]. Aging Cell, 2016,15(5): 940-952.
- Song P, Wang S, He C, et al. AMPK α 2 deletion exacerbates neointima formation by upregulating Skp2 in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2011,109(11): 1230-1239.
- Dugan LL, You YH, Ali SS, et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function [J]. J Clin Invest, 2013,123(11): 4888-4899.
- Wang S, Zhang C, Zhang M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase α 2 by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo [J]. Nat Med, 2012,18(6): 902-910.
- Del Porto F, Cifani N, Proietta M, et al. MMP-12 and macrophage activation in acute aortic dissection [J]. Cardiology, 2014,128(4): 314-315.
- Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, et al. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013,33(10): 2374-2379.
- Kurihara T, Shimizu-Hirota R, Shimoda M, et al. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9 triggers acute aortic dissection [J]. Circulation, 2012,126(25): 3070-3080.
- He C, Li H, Viollet B, et al. AMPK suppresses vascular inflammation in vivo by inhibiting signal transducer and activator of transcription-1 [J]. Diabetes, 2015,64(12): 4285-4297.

(2018-05-11 收稿 2018-08-08 修回)

(上接第 490 页)

- 刘元生. 心肺复苏 2015 年指南与解读[J]. 临床心电学杂志, 2015,36(6): 401-409.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33 an interleukin-1like cytokine that signals via the IL-1I receptor related protein ST2 and induces T helper type 2 associated cytokines [J]. Immunity, 2005,23(5): 479-490.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, et al. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system [J]. J Clin Invest, 2013,117(15): 1538-1549.
- Januzzi JL Jr, Rehman S, Mueller T, et al. Importance of biomarkers for long term mortality prediction in acutely dyspneic patients [J]. Clin Chem, 2010,56(12): 1814-1821.
- Socrates T, Defilippi C, Reichlin T, et al. Interleukin family member

ST2 and mortality in acute dyspnea [J]. J Intern Med, 2014,268(5): 493-500.

- Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, et al. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases [J]. Circ Res, 2012,91(11): 1127-1134.
- 曹志民, 于海侠, 檀立端, 等. 心脏骤停患者心肺复苏成功后利钠肽水平变化与预后关系的研究 [J]. 中国循环杂志, 2015,30(9): 859-862.
- Bettencourt P, Ferreira A, Dias P, et al. Evaluation of brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure [J]. Cardiology, 2014,123(1): 19-25.

(2018-04-20 收稿 2018-07-27 修回)