

· 基础研究 ·

运动对正常大鼠心肌 JNK 激活及 MKP-1 表达的影响

王颖 王晋明 朱珊珊 李华 王芳 涂欣

【摘要】目的 探讨运动对大鼠心肌 c-Jun 氨基末端活化蛋白激酶(JNK)活性及丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)表达的影响,从 JNK 失活的角度探讨运动对心肌组织生长的影响。**方法** 14 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为对照组、急性运动组和运动训练 1 周组、2 周组、3 周组。采用运动平板进行运动训练,坡度为 10%,速度为 15 m/min,每次运动 30 min。急性运动组仅运动 30 min;运动训练各组,每日 1 次。采用免疫沉淀法检测左室心肌 JNK 活性,Western blot 检测 MKP-1 蛋白表达水平。**结果** 急性运动显著增加心肌 p46JNK、p54JNK 活性,分别为对照组的 2.2、2.6 倍;MKP-1 的表达水平与对照组相比有增加趋势,但无统计学意义。运动训练呈时间依赖性促进运动后心肌 MKP-1 表达水平、抑制 JNK 活化。**结论** 运动训练能增强正常大鼠心肌组织 MKP-1 的可诱导性,抑制 JNK 过度活化。

【关键词】 c-Jun 氨基末端活化蛋白激酶; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1; 心肌; 运动

Effect of exercise on cardiac expression of c-Jun N-terminal activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in rat WANG Ying*, WANG Jin-ming, ZHU Shan-shan, LI Hua, WANG Fang, TU Xin. * Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 430060, China

【Abstract】Objective To determine the effect of acute and chronic exercise training on c-jun N-terminal activated protein kinase (JNK) and mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression in rat myocardium. **Methods** Forty male untrained rats aged 14 weeks were familiarized with the treadmill and then assigned to one of 5 groups: control ($n=8$), acute exercise ($n=8$), exercise training for 1 week ($n=8$), 2 weeks ($n=8$), 3 weeks ($n=8$), respectively. The rats in the exercise groups were forced to run on a treadmill with 10% grade at a speed of 15m/min. Acute exercise group was subject only to a bout of 30 min running exercise. Exercise training group was forced to exercise once a day until the indicated time. JNK activity and MKP-1 protein expression were detected by immuno-precipitation and Western blot, respectively. **Results** Compared with the control, acute exercise significantly increased p46JNK and p54JNK activity by 2.2 and 2.6 fold, respectively, but did not affect the MKP-1 protein expression. Chronic training increased MKP-1 induction in the left ventricle and inhibited JNK activation in a time-dependent manner. **Conclusion** Exercise can enhance the inducibility of MKP-1 and inhibit the over-activation of JNK.

【Key words】 c-Jun N-terminal activated protein kinase; Mitogen activated protein kinase; Myocardium; Exercise

c-Jun 氨基末端活化蛋白激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK)是丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)的亚家系之一,主要在高渗、机械应激等条件下活化,因此又被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinases, SAPK),活化后与心肌组织细胞的生长、分化、增殖关系密切^[1]。丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)是心肌组织中重要的特异

性双向调节磷酸酶,对 MAPKs 去磷酸化有较高特异性,对 MAPKs 的活性调节有重要的意义^[2]。

以往的研究从 JNK 激活的角度证实了运动作为一种机械应激源与大鼠心肌 JNK 通路关系密切,并发现不同的运动时间、频率对 JNK 激活有不同影响^[3,4],但其中机制不明,是否与 MKP-1 有关,目前尚未见相关报道。本研究通过观察正常大鼠经急性运动或长期运动训练后,其心肌 JNK 通路活化及 MKP-1 蛋白表达的改变情况,从 JNK 失活的角度探讨运动对心肌组织生长的影响。

材料与方法

一、实验动物分组与处理

基金项目:湖北省教委自然科学基金项目(No. 2000B03023; 301140080)

作者单位:450000 郑州,郑州大学第一附属医院干部病房(王颖、李华);武汉大学人民医院心内科(王晋明、王芳、涂欣),康复医学科(朱珊珊)

14 周龄雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 (228 ± 15) g, 由武汉大学医学院实验动物中心提供。大鼠饲养 2 周后进入实验, 以排除环境因素的影响。将大鼠随机分为对照组、急性运动组、运动训练 1 周组、运动训练 2 周组、运动训练 3 周组, 每组 8 只。采用活动平板进行运动训练, 运动强度参数设定为坡度 10%、速度 15 m/min、每次运动 30 min^[4]。急性运动组仅运动 1 次 (30 min), 各运动训练组每天运动 1 次, 对照组不予任何干预。大鼠于末次运动结束后, 腹腔注射苯巴比妥钠 (50 mg/kg 体重) 麻醉, 迅速开胸取出心脏, 去除心房及右心室, 保留左心室及室间隔, 称重, 计算左心室肥厚指数 (left ventricular hypertrophy index, LVHI), $LVHI = \text{左心室重量} / \text{体重}$ 。标本置于液氮中保存。

二、心肌组织 JNK 活性测定

取左心室肌剪碎, 裂解缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.4, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA, 1% Triton, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -磷酸甘油, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 , $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 亮肽, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF) 4℃ 匀浆、离心 ($10\,000 \text{ g}$, 10 min), 弃沉淀, Lowry 法对上清液进行蛋白定量。取总蛋白 40 μg 加入 c-Jun 融合蛋白珠 (Cell Signaling Technology, USA) 4 μg , 4℃ 振荡过夜, 提取 JNK。离心, 清洗沉淀, 加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP, 30℃ 孵育 30 min 进行激酶反应。SDS 加样缓冲液终止反应, 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 转膜, 兔抗磷酸化 c-Jun (Ser63) 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1 000 稀释) 行免疫印迹, 4℃ 过夜。TBS (Tween 20, TBS) 冲洗后用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (Cell Signaling Technology, USA, 1:3 000) 孵育 2 h。PBS 冲洗, LumiGo 化学发光试剂反应 (Cell Signaling Technology, USA), X 线片曝光, 洗片。采用全自动图像分析仪和同济 HPLAS-2000 图像分析软件进行图像扫描、分析。以相应条带的平均光密度值代表 JNK 活性的相对强度。

三、Western blot 检测 MKP-1 蛋白表达

组织裂解及蛋白定量同前。取 40 μg 蛋白, 加入上述缓冲液, 94℃ 加热变性 10 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 兔抗鼠 MKP-1 单克隆抗体 (Santa Cruz, USA, 1:5 000) 进行抗原抗体结合反应, HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗, LumiGo 化学发光反应及蛋白条带的光强度检测方法同前。

四、统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析。结果数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、运动对大鼠 LVHI 的影响

运动对大鼠体重、左心室重及 LVHI 的影响见表 1。5 组大鼠 LVHI 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重、左心室重及 LVHI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	体重 (g)	左室重 (g)	LVHI (mg/g)
对照组	8	225 ± 12	0.546 ± 0.126	2.46 ± 0.29
急性运动组	8	221 ± 9	0.589 ± 0.153	2.77 ± 0.36
运动训练 1 周组	8	227 ± 11	0.631 ± 0.201	2.73 ± 0.43
运动训练 2 周组	8	232 ± 15	0.577 ± 0.168	2.49 ± 0.20
运动训练 3 周组	8	240 ± 20	0.604 ± 0.211	2.52 ± 0.26

注: 5 组大鼠 LVHI 组间比较, $P > 0.05$

二、运动对大鼠左心室心肌 JNK 活性的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠心肌存在基础量 JNK 活化; 急性运动 30 min 后, 心肌 p46JNK、p54JNK 被显著激活, 分别为对照组的 2.2、2.6 倍 (P 均 < 0.05)。与急性运动组相比, 运动训练各组 JNK 活性显著降低 (P 均 < 0.05), 并且随运动训练时间的延长而逐渐降低, 但运动训练 3 周后大鼠心肌 JNK 活性仍高于对照组 ($P < 0.05$)。

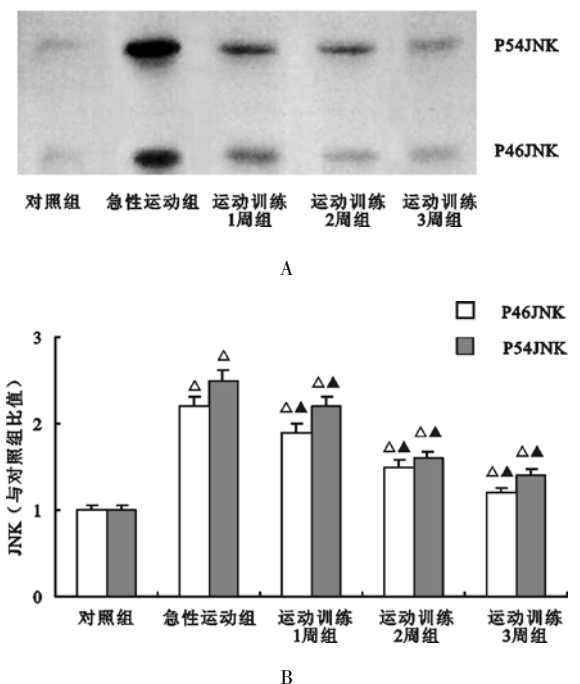


图 1 各组大鼠左心室心肌 JNK 活性

注: A——JNK 活性免疫沉淀检测结果; B——各组大鼠左心室心肌 P46JNK、P54JNK 活性比较; 与对照组相比, $\Delta P < 0.05$; 与急性运动组相比, $\blacktriangle P < 0.05$

三、运动对大鼠左心室心肌 MKP-1 表达的影响

如图 2 所示, 对照组大鼠左心室心肌 MKP-1 基础表达量较低; 急性运动后 MKP-1 的表达水平与对照组

相比无统计学意义;与急性运动组相比,运动训练 1 周、2 周、3 周组大鼠心肌 MKP-1 蛋白水平均显著增加,分别为急性运动组的 1.6, 1.9, 2.1 倍(P 均 < 0.05)。

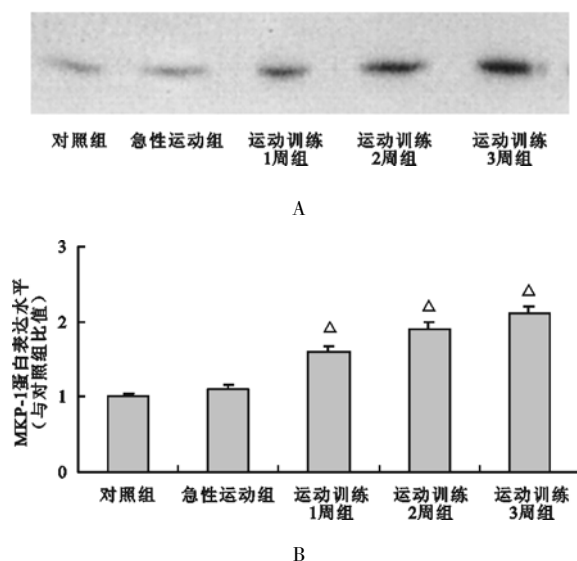


图 2 各组大鼠左室心肌 MKP-1 蛋白表达

注:A——MKP-1 蛋白 Western blot 检测结果;B——各组大鼠左室心肌 MKP-1 蛋白表达水平比较;与对照组相比, $^{\Delta}P < 0.05$

讨 论

JNK 通路是 MAPKs 的亚家系之一,主要在细胞应激(如紫外线照射、高渗、机械应激等)条件下被激活,活化后的 JNK 以转位的方式进入细胞核,激活其下游底物 c-fos、c-Jun、Elk-1 等表达、启动核转录,促进心肌组织蛋白、核酸合成。目前业已证实,心肌组织 JNK 过度、持续激活是左心室肥厚发生、发展的重要影响因素之一^[1]。在心肌组织, MKP-1 是重要的特异性双向调节磷酸酶,其对 MAPKs 去磷酸化有较高特异性。生理条件下, MAPKs 与 MKP-1 之间存在环路联系。一方面, MKP-1 通过磷酸化 MAPKs,使其失活;另一方面,心肌组织 MKP-1 具有可诱导性,多种细胞外生长刺激可通过活化的 MAPKs 反馈性引起 MKP-1 表达增强^[2]。研究证实, ERK-1/ERK-2 通过丝氨酸羧基残端 S359、S364 使 MKP-1 磷酸化,这种磷酸化能增加 MKP-1 的稳定性却不改变其对 ERK-1/ERK-2 的去磷酸化能力,因而增强 MKP-1 的水平和生物效应^[5]。MAPKs 与 MKP-1 之间的这种负反馈环路对维持 MAPKs 激活、失活之间的动态平衡有重要生理学意义。

本研究发现,急性运动作为一种机械应激源对大鼠心肌 JNK 有显著激活作用,这与国外学者的研究发现相似^[4]。本研究还发现,急性运动组大鼠心肌组织 MKP-1 表达水平与对照组相比,差异无统计学意义;而运动训练能显著增加 MKP-1 表达水平,并且随 MKP-1 表达水平的增加, JNK 活性逐渐降低。这些均

提示运动训练能够增强心肌组织 MKP-1 的可诱导性,加速由 JNK 活化引发的 MKP-1 表达,促进 JNK 与 MKP-1 之间反馈环路进程,对维持 JNK 激活与失活之间的动态平衡具有积极作用。

以往研究发现,在高血压肥厚的左心室心肌中存在 JNK 过度激活、诱导 MKP-1 表达能力下降(即 MKP-1 的可诱导性降低)的现象,并证实维持、促进 MKP-1 良好的可诱导性,防止 MAPKs 过度、持续激活对高血压左心室肥厚的防治有积极意义^[6,7]。目前在抗高血压药物中,通过影响 MAPKs 通路而抑制心肌肥厚的方式主要有两种:一是抑制生长信号(主要是 MAPKs)过度激活;二是激活某些负性调控激酶,以促使各种生长信号激酶失活,如 MKP-1。理想的降压药物应该是既能抑制 MAPKs 活性、又能诱导 MKP-1 的表达。目前尚未发现兼具上述两种特性的药物。血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素 II 1 型受体阻断剂是目前高血压治疗的一线临床用药,它们均通过抑制 MAPKs 过度活化而有效逆转左心室肥厚,但不利的是它们同时也抑制了 MKP-1 的表达^[7]。本研究结果证实运动训练可有效增强心肌 MKP-1 的可诱导性,抑制 JNK 过度活化。那么,在常规抗高血压药物治疗的基础上辅以适量运动训练,对左心室肥厚逆转有积极作用,除以往已知的相关分子机制外,是否也与运动训练能有效地增强 MKP-1 的可诱导性有关,还有待在高血压个体中开展进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Strniskova M, Barancik M, Ravingerova T. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys*, 2002, 21:231-255.
- 2 Bokemeyer D, Lindemann M, Kramer HJ. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1998, 32: 661-667.
- 3 江钟立,陈家伟,苏恩本,等. 运动对大鼠肌细胞丝裂素活化蛋白酶信号传导系统的调节作用. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24: 353-355.
- 4 Boluyt MO, Loyd AM, Roth MH, et al. Activation of c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in rat heart by exercise; effect of training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: 2639-2647.
- 5 Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44^{mapk}-dependent phosphorylation. *Science*, 1999, 286: 2514-2517.
- 6 Begum N, Song Y, Rienzie J, et al. Vascular smooth muscle cell growth and insulin regulation of mitogen-activated protein kinase in hypertension. *Am J Physiol*, 1998, 275: 42-49.
- 7 张美春,王晋明,张庆华,等. 厄贝沙坦和咪唑普利对高血压大鼠心肌细胞外信号调节激酶的影响. *中华心血管病杂志*, 2002, 30: 342-346.

(修回日期:2004-09-01)

(本文编辑:郭正成)