

尿促皮素诱导乳大鼠心肌细胞肥大的作用及信号传导机制

梁春光¹, 王洪新^{1*}, 黄雷², 刘杰¹

(1. 辽宁医学院药理学教研室, 2. 锦州市药品检验所, 辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 探讨尿促皮素(urocortin)诱导大鼠心肌细胞肥大的作用及其信号传导机制。**方法** 实验分8组,正常对照组、尿促皮素 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、星形孢菌素(Sta) $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、H89 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和维拉帕米(Ver) $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及尿促皮素分别加 Sta, H89 和 Ver 组。采用体外培养的乳大鼠心肌细胞,应用尿促皮素 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导心肌肥大,观察 Sta $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, H89 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 Ver $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的作用,进一步探讨尿促皮素 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导心肌肥厚的作用机制。用消化分离法及计算机图像分析系统检测心肌细胞直径; $[^3\text{H}]$ 亮氨酸掺入法测定心肌细胞蛋白质的合成;用 Lowry 法检测心肌细胞蛋白质含量;用 Western 蛋白印迹法测定心房钠尿肽(ANP)表达;采用 Till 阳离子测定系统,以 Fura-2/AM 为荧光探针,观察心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化。**结果** 尿促皮素使心肌细胞直径、蛋白质合成、蛋白质含量和 ANP 表达分别增加30.9%, 36.3%, 35.5%和34.7%;尿促皮素 + Sta 组使心肌细胞直径、蛋白质合成、蛋白质含量和 ANP 表达分别降低了16.5%, 22.1%, 18.1%和 21.3%;尿促皮素 + H89 组使心肌细胞直径、蛋白质合成、蛋白质含量和 ANP 表达分别降低了 16.6%, 21.5%, 19.5%和 20.6%;尿促皮素 + Ver 组使心肌细胞直径、蛋白质合成、蛋白质含量和 ANP 表达分别降低了 17.1%, 20.9%, 17.9% 及 19.9%;尿促皮素能够使心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化水平增高, Sta, H89 和 Ver 能

够降低尿促皮素引起的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化升高。**结论** 尿促皮素可能通过蛋白激酶 C 和蛋白激酶 A 信号途径影响 L-型 Ca^{2+} 通道,进而影响细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化水平,诱导乳大鼠心肌细胞肥大。

关键词: 尿促皮素; 肌细胞, 心脏; 信号传导通路

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)06-0436-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.06.004

尿促皮素是 1995 年发现的一个神经肽,在心脏中有表达^[1],是一个很重要的心血管活性肽。尿促皮素对心脏具有正性肌力作用、对缺血再灌注心肌有保护作用,具有促进心肌肥厚的作用。有学者已经证明了尿促皮素可以通过依赖环磷腺苷(cAMP)的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号途径^[2]和磷脂酰肌醇-3 激酶信号途径^[3]诱导心肌肥厚。同时有研究否定了信号传导及转录活化蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)^[4]及丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) p42/44^[3]参与尿促皮素诱导的心肌肥厚作用。研究表明,在心肌肥大过程中有许多的细胞内信号通路参与调节,其中 MAPK、蛋白激酶 C (PKC)、钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 这 3 条通路起着关键的作用^[5];并在 CaN 转基因大鼠的肥大心脏中发现有活化 PKC 和 MAPK;对转基因大鼠的肥大心脏分析表明,心肌肥大时 PKC α , PKC β 1 和 PKC θ 等因子的活性增强,但 PKC ϵ , PKC β 2 和 PKC λ 等因子的活性没有改变。有研究发现,L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂维拉帕米(verapamil, Ver)能够抑制异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso)诱导的心肌肥厚^[6]。本实验室曾经报道了不同药物对心肌细胞的作用与 Ca^{2+} 关系密切^[7-10]。尿促皮素的心血管作用与细胞内 Ca^{2+} 有关,而且 Ca^{2+} 信号在心肌肥厚和基因表达发挥着中心作用。而 PKC 及 L-型

收稿日期: 2009-03-18 接受日期: 2009-07-02

基金项目: 辽宁省高等学校优秀人才支持计划资助项目(2008RC33);辽宁省教育厅创新团队资助项目 2007T113)

作者简介: 梁春光(1980-),女,讲师,药理学硕士,主要从事心血管药理学研究;王洪新(1964-),男,辽宁省锦州市人,教授,医学博士,主要从事心血管药理学及天然药物研究。

* 联系作者 E-mail: jyhwxwang@163.com Tel: 13304169343

Ca²⁺通道是否参与尿促皮素诱导的心肌肥厚作用却未见报道。

为了进一步探讨尿促皮素诱导心肌肥厚的作用机制,采用尿促皮素体外诱导心肌细胞肥大,观察PKC抑制剂星形孢菌素(staurosporine, Sta)、PKA拮抗剂H89和钙通道阻滞剂Ver对心肌肥大的影响,并进一步观察尿促皮素对心肌细胞[Ca²⁺]_i的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD乳大鼠,2~3 d,雌雄不拘,由辽宁医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2003-0007。

1.2 药品和试剂

胰蛋白酶、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、DMEM培养基、尿促皮素、Sta、H89及Ver均为美国Sigma公司产品;小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; [³H]亮氨酸为上海原子核研究所产品;兔抗大鼠心房钠尿肽(atrinal natriuretic peptide, ANP)抗体为Millipore公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.3 乳大鼠心肌细胞的体外培养

在无菌条件下,取出生2~3 d的SD大鼠心脏,放入D-Hank液冲洗3次后,剪成约1 mm³的小块,用0.8 g·L⁻¹胰蛋白酶消化分离细胞,向分离的细胞中加入15%的小牛血清,84%的DMEM培养基,1%的双抗液(含青霉素100 kU·L⁻¹,链霉素100 mg·L⁻¹)的培养基,吹打均匀后以1×10⁹ L⁻¹的密度接种于24孔培养板,送入通以5% CO₂及95%空气的孵箱中培养。

1.4 细胞分组及给药

常规培养心肌细胞2 d后,换液,为了减少血清成分对实验结果的影响,换液时更换含0.04%小牛血清的培养基及各种浓度的试剂。设正常对照,模型(尿促皮素0.1 μmol·L⁻¹),Sta 1 μmol·L⁻¹, Ver 1 μmol·L⁻¹, H89 0.1 μmol·L⁻¹, Sta+尿促皮素, Ver+尿促皮素和H89+尿促皮素组;在加入尿促皮素0.1 μmol·L⁻¹ 30 min后分别加入Sta, Ver及H89。给药48 h后进行各项指标的测定。

1.5 心肌细胞直径测量

细胞体积是通过测量细胞直径获得的。用D-Hank液快速冲洗长满细胞的培养孔3次,每孔加

0.3 mL胰蛋白酶(1 g·L⁻¹),放入37℃恒温箱中30 min后,再加入0.2 mL含有体积分数为0.1血清的培养基终止消化,收集细胞注入细胞室内(该细胞室底部是一经硅化的盖玻片,以防心肌细胞贴壁),在放大400倍的倒置显微镜下观察细胞,几乎均呈球形。用计算机CIAS大恒细胞图像分析系统测量单个细胞的直径。每组测4个孔,每孔随机选择1个视野,每个视野测20个细胞^[11]。

1.6 心肌细胞蛋白质合成的测定

培养48 h后更换含有 [³H]亮氨酸37 TBq·L⁻¹及各种浓度试剂的培养基,一起培养72 h后倒掉培养液,用冷D-Hank液快速洗3遍,每孔加入1 mL SDS 10 g·L⁻¹溶解细胞,用1 mL三氯醋酸50 g·L⁻¹沉淀蛋白,应用GF/C过滤,用5 mL D-Hank液冲洗3遍,烘干滤膜,置于4 mL闪烁液的闪烁杯中。用液闪仪测量 [³H]亮氨酸的结合,进行蛋白质合成的分析。根据计数,每孔的细胞数大致为5×10⁴个,实验结果以每孔的cpm值表示^[12]。

1.7 心肌细胞蛋白质含量的测定

吸去培养板各孔中的培养液,用D-Hank液快速冲洗3次后,加入0.5 mL SDS 10 g·L⁻¹溶解细胞,根据计数,每孔细胞数约为5×10⁵,Lowry等^[13]方法测定每孔细胞蛋白质含量。

1.8 Western 蛋白印迹法测定 ANP 表达

细胞加药作用48 h后,用细胞刮刀刮下细胞,用PBS冲洗下来,90×g离心15 min,弃上清,把细胞沉淀置于-70℃冰箱备用,测定指标时,取出样品放入RIPA缓冲液,并加入苯甲基磺酰氟10 g·L⁻¹,超声裂解后离心提取上清液。BCA法进行蛋白质浓度测定。分取50 μg加等体积的2×SDS上样缓冲液并煮沸,然后各取10 μL样品以及蛋白质标准品点样。Tris-SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳3~5 h,转膜8~12 h;封闭,洗膜,然后以稀释后的兔抗大鼠ANP(1:200)室温反应2 h,再与二抗(1:1500)各反应1 h,Supel/Sigal West Pico试剂盒中反应5 min。显影条带经1200Pro型图像扫描仪扫描,CAMIAS008图像分析系统处理,根据积分吸光度(integrated absorbance, IA)值对比分析条带的强弱。以β-肌动蛋白为内参照,显影条带经1200Pro型图像扫描仪扫描,CAMIAS008图像分析系统进行半定量分析,即以ANP/β-肌动蛋白的IA比值表示ANP的相对表达水平。

1.9 心肌细胞[Ca²⁺]_i瞬间变化的测定

将长有自发性搏动的心肌细胞的盖玻片从培养

皿中取出置于含有 Fura-2/AM $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMEM 培养基中,其中含有白蛋白 0.2%,在 37℃ 水浴中孵育 30 min,取出盖玻片,用 HEPES 缓冲液冲洗后,放于荧光显微镜下的灌流槽中,恒温 37℃,用 HEPES 缓冲液灌流,灌流速度为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,所有药物均在指定时间内加入灌流液中。所用的测定仪器为 Till 阳离子测定系统(德国),采用 DM3000 软件。激发光波长分别为 340 及 380 nm,发射光波长为 505 nm,采样间隔为 300 ms。每次选取 5~10 个细胞,测量心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的瞬间变化,连续记录心肌细胞在给药前后的荧光强度。根据文献[14]方法计算心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 前应减去细胞自身的荧光。

1.10 统计学分析

实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 LSD 法进行统计学处理。

2 结果

2.1 尿促皮素及其他药物对心肌细胞直径的影响

表 1 结果显示,与正常对照组相比,尿促皮素组心肌细胞直径增加,单独给 Sta, Ver 及 H89,细胞直径均未见明显改变,表明尿促皮素能够诱导心肌细胞体积增加,而 Sta, Ver 和 H89 对正常心肌细胞直径无影响。与尿促皮素组相比,尿促皮素 + Sta, 尿促皮素 + Ver 和尿促皮素 + H89 组心肌细胞直径

Tab 1. Effects of urocortin and different agents on cell diameter of cultured ventricular myocytes of neonatal rats

Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell diameter/ μm
Normal control	18.9 ± 0.7
Urocortin 0.1	24.7 ± 0.7**
Staurosporine 1.0	19.1 ± 0.6
Verapamil 1.0	18.9 ± 1.0
H89 0.1	19.0 ± 1.1
Urocortin 0.1 + staurosporine 1.0	20.6 ± 1.5##
Urocortin 0.1 + verapamil 1.0	20.5 ± 1.6##
Urocortin 0.1 + H89 0.1	20.6 ± 1.3##

The drugs were added respectively to the medium at the same time and cultured for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 80$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; ## $P < 0.01$, compared with urocortin group.

均减小,表明 Sta, Ver 和 H89 均能抑制尿促皮素诱导的心肌细胞体积的增大。

2.2 尿促皮素及其他药物对心肌细胞蛋白质合成的影响

表 2 结果显示,与正常对照组相比,尿促皮素组心肌细胞蛋白质合成增加,Sta, Ver 和 H89 组细胞蛋白质合成均未见明显改变,表明尿促皮素能够诱导心肌细胞蛋白质合成增加,而 Sta, Ver 和 H89 对正常心肌细胞蛋白质合成无影响。与尿促皮素组相比,尿促皮素 + Sta, 尿促皮素 + Ver 和尿促皮素 + H89 组心肌细胞蛋白质合成减少,表明 Sta, Ver 和 H89 均能抑制尿促皮素诱导的心肌细胞蛋白质合成的增加。

Tab 2. Effects of urocortin and different agents on protein synthesis of cultured ventricular myocytes of neonatal rats

Group	Protein synthesis($[\text{}^3\text{H}]$ leucine incorporation/ cpm in 5×10^4 cells)
Normal control	1030 ± 60
Urocortin	1405 ± 95**
Staurosporine	1007 ± 64
Verapamil	1018 ± 49
H89	998 ± 56
Urocortin + staurosporine	1095 ± 49##
Urocortin + verapamil	1112 ± 56##
Urocortin + H89	1102 ± 53##

See Tab 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; ## $P < 0.01$, compared with urocortin group.

2.3 尿促皮素及其他药物对心肌细胞蛋白质含量的影响

表 3 结果显示,与正常对照组相比,尿促皮素组心肌细胞蛋白质含量增加,Sta, Ver 和 H89 组细胞蛋白质含量均未见明显改变,表明尿促皮素能够诱导心肌细胞蛋白质含量增加,而 Sta, Ver 和 H89 对正常心肌细胞蛋白质含量无影响。与尿促皮素组相比,尿促皮素 + Sta, 尿促皮素 + Ver 和尿促皮素 + H89 组心肌细胞蛋白质含量减少,表明 Sta, Ver 和 H89 均能抑制尿促皮素诱导的心肌细胞蛋白质含量的增加。

Tab 3. Effects of urocortin and different agents on protein content of cultured ventricular myocytes of neonatal rats

Group	Protein content/ μg in 5×10^5 cells
Normal control	17.6 ± 1.1
Urocortin	$23.9 \pm 1.2^{**}$
Staurosporine	17.4 ± 1.2
Verapamil	18.5 ± 0.9
H89	17.7 ± 1.2
Urocortin + staurosporine	$19.6 \pm 1.3^{##}$
Urocortin + verapamil	$19.6 \pm 0.9^{##}$
Urocortin + H89	$19.2 \pm 1.2^{##}$

See Tab 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. $^{**} P < 0.01$, compared with normal control group; $^{##} P < 0.01$, compared with urocortin group.

2.4 尿促皮素及其他药物对心肌细胞 ANP 表达的影响

图 1 结果显示,与正常对照组相比,尿促皮素组心肌细胞 ANP 表达明显增加,Sta, Ver 和 H89 组细胞 ANP 表达均未见明显改变,表明尿促皮素能够诱导心肌细胞 ANP 表达增加,而 Sta, Ver 和 H89 对正常心肌细胞 ANP 表达无影响。与尿促皮素组相比,尿促皮素 + Sta, 尿促皮素 + Ver 和尿促皮素 + H89 组心肌细胞 ANP 表达减少,表明 Sta, Ver 和 H89 均能抑制尿促皮素诱导的心肌细胞 ANP 表达的增加。

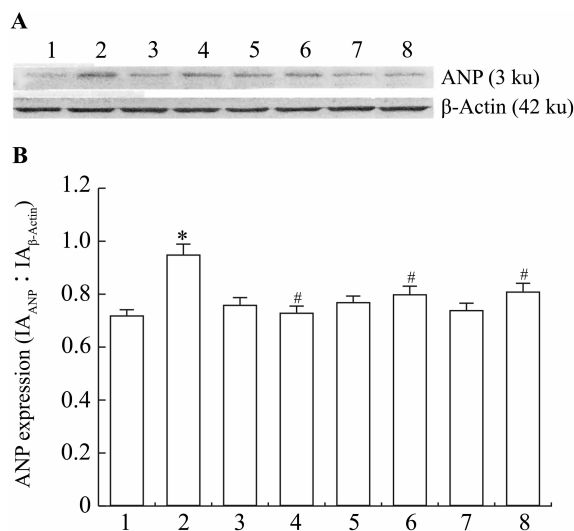


Fig 1. Effects of urocortin and different agents on atrial natriuretic peptide (ANP) expression in cultured ventricular myocytes of neonatal rats.

1: normal control; 2: urocortin $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: staurosporine $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: urocortin $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + staurosporine $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: verapamil $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: urocortin $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + verapamil $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 7: H89 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 8: urocortin $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + H89 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^* P < 0.05$, compared with normal control group; $^{\#} P < 0.05$, compared with urocortin group.

2.5 尿促皮素及其他药物对心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化的影响

Sta, Ver 和 H89 未明显改变正常心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化(表 4)。尿促皮素使心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化幅度增高,但不影响基线水平,使

Tab 4. Effects of urocortin and different agents on spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in cultured ventricular myocytes of neonatal rats

Group	$[\text{Ca}^{2+}]_i$		Frequency/ min^{-1}
	Peak amplitude/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Resting/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
Normal control	191.3 ± 3.5	109.9 ± 2.4	58.5 ± 0.5
Urocortin	$290.3 \pm 2.8^{**}$	112.7 ± 6.4	$89.8 \pm 1.5^{**}$
Staurosporine	190.1 ± 2.2	111.7 ± 4.7	59.1 ± 0.4
Urocortin + staurosporine	$184.9 \pm 2.3^{##}$	113.9 ± 5.8	$57.3 \pm 0.9^{##}$
Verapamil	190.3 ± 3.1	109.8 ± 6.1	58.4 ± 0.8
Urocortin + verapamil	$185.2 \pm 4.1^{##}$	113.3 ± 3.3	$56.9 \pm 0.9^{##}$
H89	191.9 ± 5.5	113.5 ± 3.5	59.7 ± 0.7
Urocortin + H89	$186.7 \pm 3.5^{##}$	112.6 ± 4.7	$57.9 \pm 0.7^{##}$

See Tab 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^{**} P < 0.01$, compared with normal control group; $^{##} P < 0.01$, compared with urocortin group.

心肌细胞自发频率加快;Sta, Ver 和 H89 能降低由尿促皮素诱导的心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间变化幅度增高,且减慢由尿促皮素诱导的心肌细胞自发频率加快作用,三者作用相似,对心肌细胞内静息钙负荷均无影响。

3 讨论

心肌肥厚作用是心脏的一种很重要的调整机制,是心脏负荷过重时一种代偿表现,是心肌细胞对高血压、瓣膜病和急性心肌梗死等常见临床疾病的一种基本应答。疾病的初始阶段,心肌肥厚可以通过平衡应激的增加改善心脏的功能,然而,长时间应激所致的持续性心肌肥厚最终会因心脏功能失常导致心力衰竭,是心血管病患者死亡的重要原因之一。因此,研究心肌肥厚的信号传导机制和确定此作用中的调节因子非常重要。

许多研究已经表明,尿促皮素是一个很重要的心血管活性肽。有研究表明,尿促皮素正性肌力作用的分子机制主要通过 cAMP-PKA 信号途径介导^[15]。尿促皮素具有缺血再灌注心肌的保护作用,这种保护作用可以通过 MAPK p42/44^[16-17], 磷脂酰肌醇-3 激酶^[18] 和 PKC ϵ ^[19] 等信号途径介导。Kir 6.1 (K_{ATP}) 通道^[20] 及下调磷脂酶 A₂^[21] 的基因表达也是尿促皮素保护心肌细胞的机制。许多研究表明, $[Ca^{2+}]_i$ 变化是心肌肥大的一个信号。大量实验表明, $[Ca^{2+}]_i$ 的改变能通过多种钙调节酶来传导不同信号,其中 Ca^{2+} /CaMK 家族中钙调素依赖蛋白激酶发挥重要作用^[22-23]。PKC 是一种依赖 Ca^{2+} 和磷脂的蛋白激酶,可以与 Ca^{2+} 相互调节而达到基因表达和细胞增殖等长期反应。

有实验研究采用尿促皮素 5, 10, 50 及 100 nmol·L⁻¹ 诱导心肌细胞肥大,结果发现这些浓度的尿促皮素均能不同程度引起心肌细胞面积的增加,而尿促皮素 100 nmol·L⁻¹ 使心肌细胞面积增加最明显,说明不是尿促皮素浓度越高诱导心肌细胞肥大作用越强^[4]。本研究在预实验中也做了尿促皮素诱导心肌细胞肥大的浓度依赖性实验,分别测了心肌细胞直径、蛋白质含量和蛋白质合成 3 个指标,结果发现尿促皮素 100 nmol·L⁻¹ 这一浓度诱导心肌细胞肥大作用最强,与文献报道结果一致。

本研究发现,Sta 1 μ mol·L⁻¹ 能够抑制尿促皮素诱导的心肌肥大,说明尿促皮素对心肌细胞的肥厚

作用可能与 PKC 信号通路有关,但是尿促皮素对心肌细胞的肥厚作用究竟通过哪种 PKC 亚型实现的仍需要进一步的研究。本研究发现,利用 L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂 Ver 能够抑制尿促皮素诱导的心肌肥大,还观察到尿促皮素不仅能够引起心肌细胞肥大,而且还可以对心肌细胞内钙离子瞬间变化有明显的影响,提示尿促皮素对心肌肥厚的作用可能通过调节细胞内钙稳态来达到。PKA 抑制剂 H89 也能够抑制尿促皮素诱导的心肌肥大,提示 PKA 信号途径参与了尿促皮素诱导的心肌肥大过程,这一点与文献报道一致。

4 参考文献:

- [1] Kimura Y, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Darnel AD, *et al.* Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**(1):340-346.
- [2] Ikeda K, Tojo K, Sato S, Ebisawa T, Tokudome G, Hosoya T, *et al.* Urocortin, a newly identified corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250**(2):298-304.
- [3] Chanalaris A, Lawrence KM, Townsend PA, Davidson S, Jamshidi Y, Stephanou A, *et al.* Hypertrophic effects of urocortin homologous peptides are mediated via activation of the Akt pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **328**(2):442-448.
- [4] Railson JE, Liao Z, Brar BK, Buddle JC, Pennica D, Stephanou A, *et al.* Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathways in cardiac myocytes[J]. *Cytokine*, 2002, **17**(5):243-253.
- [5] De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T, Molkenin JD. Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(18):13571-13579.
- [6] Wu GQ, Wang HX, Jing L. Inhibitory effect of kappa-opioid receptor stimulation on isoprenaline induced myocardial hypertrophy of neonatal rats[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学毒理学杂志), 2008, **22**(3):186-192.

- [7] Wu G, Wang H, Yang J, Yang Y, Liu C, Jing L, *et al.* kappa-Opioid receptor stimulation inhibits augmentation of Ca^{2+} transient and hypertrophy induced by isoprenaline in neonatal rat ventricular myocytes – role of CaMK II delta (B) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, **595** (1–3):52–57.
- [8] Tang B, Wang HX, Wang DP, Yu XC. Effect of morphine on serum hungry-induced apoptosis in cardiac myocytes [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2008, **24**(8):1035–1040.
- [9] Zhang L, Wang HX, Gao JH, Yu XC, Xu W. Effects of puerarin on ventricular fibrosis and cytosolic calcium in myocardial hypertrophy induced by isoproterenol in rat [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2008, **30**(8):1220–1222.
- [10] Wang DP, Wang HX, Tang B, Yu XC. Effects of δ -opioid receptor stimulation on serum deprivation-induced cardiac myocyte apoptosis depended on protein kinase C pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2009, **25**(1):124–129.
- [11] Yang YH, Wang HX. The effects of adenosine on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy [J]. *Chin J Hypertension* (中国高血压杂志), 2003, **11**(6):583–586.
- [12] Wang HX, Tao L, Rao MR. Effects of angiotensin II on DNA and protein synthesis in cultured cardiac nonmyocytes of neonatal rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1996, **12**(5):417–420.
- [13] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265–275.
- [14] Wang HX, Kwan CY, Wong TM. Electrically induced intracellular Ca^{2+} transient in single ventricular myocytes: a useful parameter for the study of cardiac drugs [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1999, **26**(10):835–836.
- [15] Terui K, Higashiyama A, Horiba N, Furukawa KI, Motomura S, Suda T. Coronary vasodilation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart [J]. *J Endocrinol*, 2001, **169**(1):177–183.
- [16] Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, *et al.* Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart [J]. *Endocrinology*, 2004, **145**(1):24–35.
- [17] Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight RA, *et al.* Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(12):8508–8514.
- [18] Brar BK, Stephanou A, Knight R, Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34**(4):483–492.
- [19] Lawrence KM, Kabir AM, Bellahcene M, Davidson S, Cao XB, McCormick J, *et al.* Cardioprotection mediated by urocortin is dependent on PKC epsilon activation [J]. *FASEB J*, 2005, **19**(7):831–833.
- [20] Lawrence KM, Chanalaris A, Scarabelli T, Hubank M, Pasini E, Townsend PA, *et al.* K_{ATP} channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect [J]. *Circulation*, 2002, **106**(12):1556–1562.
- [21] Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, Chanalaris A, Townsend PA, Carroll CJ, *et al.* Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression [J]. *FASEB J*, 2003, **17**(15):2313–2315.
- [22] Zhou Q, Liu J, Xiao YB. The effect of Ca^{2+} and CaMK II in the cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis* (心肺血管病杂志), 2006, **2**(25):57–59.
- [23] Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, *et al.* CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2000, **105**(10):1395–1406.

Effect and mechanism of signal transduction pathway in urocortin-induced cardiomyocytes hypertrophy in neonatal rat

LIANG Chun-Guang¹, WANG Hong-Xin^{1*}, HUANG Lei², LIU Jie¹

(1. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, 2. Jinzhou Institute for Drug Control, Jinzhou 121001, China)

Abstract: **AIM** To investigate the effects and mechanism of cardiomyocyte hypertrophy induced by urocortin. **METHODS** The cardiomyocytes were divided into 8 groups: normal control, urocortin, staurosporine (Sta), verapamil(Ver), H89, urocortin + Sta, urocortin + Ver, and urocortin + H89 groups. The cardiomyocytes diameter was measured by computer photograph analysis system. The protein synthetic rate was obtained through measuring the incorporation of [³H]-leucine into myocyte protein by liquid scintillation method. The total protein content was assayed by Lowry method. The expression of atrial natriuretic peptide (ANP) was determined by Western blot. [Ca^{2+}]_i transient was measured by Till image system by cell loading Fura-2/AM. **RESULTS**

Urocortin group enhanced cardiomyocyte volume, protein synthesis, total protein content and expression of ANP by 30.9%, 36.3%, 35.5% and 34.7%; urocortin + Sta group decreased cardiomyocyte diameter, protein synthesis, total protein content and expression of ANP by 16.5%, 22.1%, 18.1% and 21.3%;

urocortin + H89 group decreased the cardiomyocyte diameter, the protein synthesis, total protein content and expression of ANP by 16.6%, 21.5%, 19.5% and 20.6%; urocortin + Ver decreased the cardiomyocyte diameter, the protein synthesis, total protein content and the expression of ANP by 17.1%, 20.9%, 17.9% and 19.9%; Sta, H89 and Ver could decrease the [Ca^{2+}]_i transient induced by urocortin.

CONCLUSION The hypertrophic effect of urocortin in rat neonatal cardiomyocytes is mediated via activation of protein kinase C and protein kinase A pathway and L-type calcium channels.

Key words: urocortin; myocytes, cardiac; signal transduction pathway

Foundation item: The project supported by Program for Liaoning Excellent Talents in University (2008RC33); Innovation Project Team of Liaoning Provincial Bureau of Education (2007T113)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)