

# 自噬在预处理心肌保护中的作用研究进展

邹丽华 刘晋萍

**【摘要】** 预处理可通过调节自噬发挥心肌保护作用。缺血预处理对自噬的调节可能与 Bcl-2 结合的抗凋亡蛋白 BAG-1、自噬相关蛋白 Beclin-1 相关。此外,多种药物预处理也可以通过诱发自噬,减轻缺血-再灌注引发的心肌损伤。该文介绍自噬在预处理心肌保护中的作用及机制。

**【关键词】** 预处理;自噬;缺血再-灌注损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.06.003

## 1 预处理

在体外循环心血管手术过程中,主动脉的阻断与开放会引发心肌缺血-再灌注损伤。目前的研究认为,在缺血-再灌注前给予一次或多次短暂的缺血或者给予药物等处理,可以有效调动内源性保护机制,增加心肌细胞对缺血-再灌注损伤的耐受能力,从而减轻心肌缺血-再灌注损伤<sup>[1-3]</sup>。离体及在体研究均已证实预处理的心肌保护作用<sup>[4-5]</sup>。预处理与自噬在心肌保护中存在多种共同信号通路,预处理对自噬的调节作用参与了其心肌保护<sup>[6]</sup>。

## 2 自噬

自噬是指将细胞内受损、变性或衰老的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体内进行降解,并同时回收能源物质的过程。自噬在正常生理状态下即存在,对维持细胞稳态十分重要。在某些病理状态下,自噬可以由能量的消耗及缺血-再灌注等应激状态诱发,加强损伤蛋白的清除及能源物质的回收,以使细胞适应不同应激状态,但过度的自噬会导致正常蛋白及细胞器的过度降解,损伤细胞<sup>[7]</sup>。1976 年, Sybers 等<sup>[8]</sup>认为自噬可能在修复亚致死性损伤中起重要作用。Decker 等<sup>[9]</sup>继而发现,自噬在缺氧损伤后修复细胞,自噬体数目在缺血期间增加并在再灌注期间进一步增加。缺血与再灌注期间可通过多种不同的信号通路调节自噬从而发挥截然不同的心肌保护作用,自噬在缺血期间呈保护作用,而

在再灌注期间的过度增强将呈损伤作用<sup>[10]</sup>。因此,在缺血期间适当增强自噬,而再灌注期间抑制自噬的进一步增加,可能更有利于心肌保护。

## 3 预处理对自噬的调节

缺血与药物预处理是最有效且易于操作的心肌保护措施。有研究发现,自噬是缺血预处理及各种药物预处理的一个共同特点<sup>[11]</sup>。多个研究团队已证实自噬在缺血及药物预处理后增强<sup>[12-16]</sup>。

### 3.1 缺血预处理对自噬的调节

参与缺血预处理信号途径的主要有 G 蛋白偶联受体及各种蛋白激酶,如蛋白激酶 C(PKC)及丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)、线粒体三磷酸腺苷敏感性钾通道( $K_{ATP}$ )、一氧化氮产物、活性氧(ROS)<sup>[17-19]</sup>。

离体及在体研究均表明,缺血预处理的心肌保护作用与增加自噬体的形成相关。缺血预处理可以通过增强自噬而进一步对抗心肌缺血再灌注损伤;抑制自噬可以消除缺血预处理的心肌保护效果<sup>[11]</sup>。给予实验猪数次短暂的缺血预处理后发现,自噬参与了心肌保护。在 mCherry-LC3 转基因小鼠中,在预处理组心脏危险区自噬体数目明显增加<sup>[12]</sup>。与此相似,对大鼠 Langendorff 模型缺血预处理后 10 min,观察到自噬增强,而在重组了 Tat-ATG5K130R 的 Langendorff 模型大鼠中用 Tat-ATG5K130R 抑制自噬,缺血预处理的保护效果减弱<sup>[11, 20]</sup>。因此,自噬作为内源性防御机制之一,可以由缺血预处理激活。

缺血预处理对自噬的调节可能与抗凋亡蛋白 BAG-1 有关。BAG-1 是 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白,可与 Bcl-2 相互作用增加后者的抗凋亡作用。缺血预处理可以增加 BAG-1 表达从而促进自噬,抑制

基金项目:国家自然科学基金(81100178)

作者单位:100037 中国医学科学院北京协和医学院阜外心血管病医院体外循环科

通信作者:刘晋萍,Email: jinpingfw@hotmail.com

BAG-1 表达后自噬减弱。具体机制可能是 BAG-1 含有“BAG 功能域”，这一结构能与热休克蛋白 HSC70 结合形成一个有功能的活性构象，再进一步与自噬标志物微管相关蛋白(LC3-II)的结合，从而增强自噬，免疫共沉淀技术证实了 BAG-1 可与自噬标志物 LC3-II 的结合<sup>[21-22]</sup>。

再灌注期间自噬增强是有害的，主要由自噬相关蛋白 Beclin-1 介导。敲除 Beclin-1 基因的小鼠再灌注期间心肌细胞凋亡及心梗面积都减少。与此相似，内皮素通过磷脂酰肌醇-3-羟激酶/苏氨酸激酶(PI3K/Akt)途径减少 Beclin-1 的表达，抑制自噬<sup>[10]</sup>。心脏中 Bcl-2 过表达可以减轻饥饿诱发的自噬已得到验证<sup>[23]</sup>，这可能与表达 Bcl-2 可以对抗凋亡及抑制 Beclin-1 而防止自噬过度活化有关。缺血预处理抑制了再灌注期间依赖 Beclin-1 途径而过度增强的自噬，再灌注期间缺血预处理通过增加 Beclin-1 与抗凋亡因子 Bcl-2 的相互作用而发挥心肌保护作用<sup>[24]</sup>。在成年雄性 SD 大鼠中，缺血预处理组可以观察到大量自噬空泡的形成，并且伴随着自噬标志物 LC3-II 升高，且在缺血预处理组 Beclin-1 及 Bcl-2 间的相互作用明显增加。Beclin-1 具有一个卷曲螺旋的结构域，这个结构域可介导 Beclin-1 与 III 型 PI3K-Vps34 的结合，从而增强心肌细胞的自噬<sup>[25]</sup>。但是 Beclin-1 的 BH3 结合位点可结合到 Bcl-2 或 Bcl-xL 中亲水的凹槽中，与 Bcl-2 或 Bcl-xL 结合后的 Beclin-1 对 III 型 PI3K 亲和力下降，进而减轻心肌细胞自噬。当 Beclin-1 发生 BH3 突变时，Bcl-2/Bcl-xL 不能与 Beclin-1 相互作用而失去自噬的抑制作用<sup>[26-27]</sup>。以上结果表明，缺血预处理可以通过抑制 Bcl-2 从 Beclin-1 中分离，从抗心肌缺血-再灌注损伤。

### 3.2 药物预处理对自噬的调节

多种具有潜在心肌保护的物质可能诱发自噬，药物预处理有助于减轻长期缺血引发的心肌损伤<sup>[11, 15]</sup>。这些物质包括雷帕霉素、疏水他汀类药物、腺苷受体-1(A1)激动剂、P450 抑制剂磺胺苯吡唑等。应用以上物质行心肌预处理，可快速诱发自噬起到心肌保护作用。

物质可以通过激活各种腺苷酸受体亚型而发挥心肌保护作用，其中主要为 A1 受体。2-氯-N6-环戊基腺苷(CCPA)是一种 A1 受体激动剂，在绿色荧光蛋白-微管相关蛋白(GFP-LC3)转染的 HL1 细胞中及新生大鼠心肌细胞中，CCPA 可以在处理

10 min 内引起自噬体增加，并减弱了缺血再灌注后乳酸脱氢酶的释放，达到抗缺血再灌注损伤的心肌保护作用。在 HL1 细胞中通过瞬时转染或者蛋白转导自噬抑制剂 ATG5K130R，则 CCPA 心肌保护效应消失。有趣的是，研究同时发现缺血期间 CCPA 增加了自噬，但在再灌注期间自噬体的数量比未进行缺血-再灌注处理的心肌细胞少<sup>[13]</sup>。这似乎是自相矛盾的作用，但若将自噬视为细胞损伤修复的形式，则可得到解释：在预处理细胞中，CCPA 在缺血期间增强自噬，加强废弃的蛋白及细胞器的清除，因此，CCPA 预处理的细胞在缺血期保护较好，在再灌注期间需要更少的自噬体修复细胞。研究者为了进一步评估在体的自噬，用 CCPA 处理 mCherry-LC3 转基因的小鼠，也发现自噬增强及更好的心肌保护效果<sup>[13]</sup>。

除 CCPA 外，还有多种物质预处理与自噬调节相关。(1)自噬由哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及 I 型 PI3K 参与的信号机制负性调节，而雷帕霉素可以作为一种自噬诱发剂可抑制 mTOR 途径<sup>[28]</sup>。用 mTOR 抑制剂雷帕霉素预处理，可以减小心梗面积<sup>[20]</sup>。(2)在 HL1 细胞中，辛伐他汀预处理后，发现辛伐他汀心肌保护作用可能参与抑制 Akt-mTOR 信号，进而引发线粒体自噬<sup>[29]</sup>。(3)心肌保护物质三磷酸尿苷、二氮嗪、雷诺嗪可以引起自噬，抑制自噬可以消除它们的保护效应<sup>[11]</sup>。(4)在挥发性麻醉物质预处理中，发现其可能通过上调自噬从而保护心肌<sup>[30]</sup>。总之，自噬可能是缺血及物质预处理的终末效应。

### 4 小结

在细胞及动物实验中，预处理确实可以通过上调自噬而达到心肌保护作用，但具体机制还有待研究<sup>[6]</sup>。一方面，虽然大部分研究发现缺血期间自噬上调、再灌注期间自噬下调，具有心肌保护作用，但目前这一结论尚存在争议。预处理如何在自噬的利弊间寻找平衡点，而始终发挥心肌保护作用也待证实。另一方面，由于自噬仅在应激达到一定水平时才会被增强<sup>[12]</sup>。预处理对自噬上调的程度、缺血-再灌注时间的长短也会影响心肌的保护效果。在不同模型中采用不同的缺血-再灌注时间、不同的预处理策略，可能会产生不同的作用。因此，预处理对自噬的调节作用需要在同种模型中反复验证。此外，虽然缺血预处理及物质预处理对自噬的调节作用在细胞及动物水平得以证实，但是很可能在

临床研究中失败。基础研究中采用年轻且健康的动物,而临床研究的对象常为代谢综合征、糖尿病、高血压的老年患者,其中多种病理状态本身可能与自噬的调节相关<sup>[31]</sup>。在法洛四联症术前,应用缺血预处理并没有发现心肌保护作用及对自噬的调节作用<sup>[32]</sup>。在成人冠脉搭桥术中则发现,缺血预处理虽然具有心肌保护作用,但是与自噬并不相关<sup>[33]</sup>。总之,预处理能减轻缺血-再灌注损伤,其心肌保护机制可能涉及对自噬的调节,而具体调节机制及临床可能的应用还需进一步探索。

### 参 考 文 献

- [1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(3):377-386.
- [2] Fudickar A, Kunath S, Voss D, et al. Effect of ischemic and pharmacological preconditioning of lower limb muscle tissue on tissue oxygenation measured by near-infrared spectroscopy-a pilot study[J]. *BMC Anesthesiology*, 2014, 14(54):1471-2253.
- [3] 李上海,梁伟钧,孙炎华,等. 缺血预处理对心肌缺血再灌注诱发凋亡的保护机制[J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(4): 48-50.
- [4] Lukas A, Botsford MW. Cardioprotection induced by ischemic preconditioning in the mammalian heart: effects on arrhythmogenesis[J]. *Can J Physiol Pharm*, 1997, 75(4): 316-325.
- [5] Ji L, Zhang X, Liu W, et al. AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury [J]. *PloS one*, 2013, 8(7):e69910.
- [6] Yan WJ, Dong HL, Xiong LZ. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(5):636-643.
- [7] Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart[J]. *Antioxid Redox Sign*, 2007, 9(9):1373-1381.
- [8] Sybers HD, Ingwall J, DeLuca M. Autophagy in cardiac myocytes[J]. *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*, 1976, 12:453-463.
- [9] Decker RS, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts: Ultrastructural and cytochemical changes[J]. *AM J pathol*, 1980, 98(2):425-444.
- [10] 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.
- [11] Huang C, Yitzhaki S, Perry CN, et al. Autophagy induced

by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection [J]. *J Cardiovasc Transl*, 2010, 3(4):365-373.

- [12] Yan L, Sadoshima J, Vatner DE, et al. Autophagy in ischemic preconditioning and hibernating myocardium [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):709-712.
- [13] Yitzhaki S, Huang C, Liu W, et al. Autophagy is required for preconditioning by the adenosine A1 receptor-selective agonist CCPA [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(2): 157-167.
- [14] Huang C, Liu W, Perry CN, et al. Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole [J]. *Am J Physiol Heart C*, 2010, 298(2):H570-579.
- [15] Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, et al. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(2): 373-387.
- [16] Park HK, Chu K, Jung KH, et al. Autophagy is involved in the ischemic preconditioning[J]. *Neuroscience letters*, 2009, 451(1):16-19.
- [17] Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2008, 1123:187-196.
- [18] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(1):16-23.
- [19] Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals[J]. *Circ Res*, 2000, 87(6):460-466.
- [20] Khan S, Salloum F, Das A, et al. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(2):256-264.
- [21] Yang X, Chernenko G, Hao Y, et al. Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells [J]. *Oncogene*, 1998, 17(8):981-989.
- [22] Overbye A, Fengsrud M, Seglen PO. Proteomic analysis of membrane-associated proteins from rat liver autophagosomes [J]. *Autophagy*, 2007, 3(4):300-322.
- [23] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. *Cell*, 2005, 122(6):927-939.
- [24] Peng W, Liu Y, Xu WJ, et al. Role of Beclin 1-dependent autophagy in cardioprotection of ischemic preconditioning[J]. *J Huazhong U Sci Med*, 2013, 33(1):51-56.
- [25] Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(12):5360-5372.
- [26] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):619-624.

- macrophages[J]. *Menopause*, 2010, 17(2):379-387.
- [8] Dietz M, Mohr P, Kuhn B, et al. Comparative molecular profiling of the PPARalpha/gammaactivator aleglitazar: PPAR selectivity, activity and interaction with cofactors[J]. *Chem Med Chem*, 2012, 7(6):1101-1111.
- [9] 高雯,李红莉. PPAR $\alpha$  在动脉粥样硬化斑块中作用及机制的研究[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(3):178-181.
- [10] Toth PP. Novel therapies for increasing serum levels of HDL [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2009, 38(1):151-170.
- [11] Saely CH, Rein P, Drexel H. Combination lipid therapy in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(7):692; author reply 694-695.
- [12] Davis TM, Ting R, Best JD, et al. Effects of fenofibrate on renal function in patients with type 2 diabetes mellitus: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) Study[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(2):280-290.
- [13] Mohiuddin SM, Pepine CJ, Kelly MT, et al. Efficacy and safety of ABT-335 (fenofibric acid) in combination with simvastatin in patients with mixed dyslipidemia; a phase 3, randomized, controlled study [J]. *Am Heart J*, 2009, 157(1):195-203.
- [14] Krysiak R, Gdula-Dymek A, Bachowski R, et al. Pleiotropic effects of atorvastatin and fenofibrate in metabolic syndrome and different types of pre-diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(10):2266-2270.
- [15] Younk LM, Uhl L, Davis SN. Pharmacokinetics, efficacy and safety of aleglitazar for the treatment of type 2 diabetes with high cardiovascular risk[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(6):753-763.
- [16] Rosenson RS, Wright RS, Farkouh M, et al. Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects [J]. *Am Heart J*, 2012, 164(5):672-680.
- [17] Cariou B, Zaïr Y, Staels B, et al. Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(9):2008-2014.
- [18] Moreno-Santos I, Pavón FJ, Romero-Cuevas M, et al. Computational and biological evaluation of N-octadecyl-N'-propylsulfamide, a selective PPAR $\alpha$  agonist structurally related to N-acylethanolamines [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92195.
- [19] Fruchart JC. Selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  modulators (SPPARM $\alpha$ ): the next generation of peroxisome proliferators-activated receptors-agonists [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12:82.
- [20] Choi SH, Hong ES, Lim S. Clinical implications of adipocytokines and newly emerging metabolic factors with relation to insulin resistance and cardiovascular health[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4:97.
- [21] Jin QR, Bando Y, Miyawaki K, et al. Correlation of fibroblast growth factor 21 serum levels with metabolic parameters in Japanese subjects[J]. *J Med Invest*, 2014, 61(1-2):28-34.

(收稿:2014-06-12 修回:2014-07-23)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 361 页)

- [27] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart [J]. *New Engl J Med*, 1997, 336(16):1131-1141.
- [28] Ryter SW, Lee SJ, Smith A, et al. Autophagy in vascular disease[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2010, 7(1):40-47.
- [29] Andres AM, Hernandez G, Lee P, et al. Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(14):1960-1973.
- [30] Qiao S, Xie H, Wang C, et al. Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of autophagy[J]. *J Anesth*, 2013, 27(2):251-260.
- [31] Bergamini E, Cavallini G, Donati A, et al. The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases[J]. *Int J Biochem Cell B*, 2004, 36(12):2392-2404.
- [32] Pepe S, Liaw NY, Hepponstall M, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on phosphorylated protein signaling in children undergoing tetralogy of Fallot repair: a randomized controlled trial[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(3):e000095.
- [33] Gedik N, Thielmann M, Kottenberg E, et al. No evidence for activated autophagy in left ventricular myocardium at early reperfusion with protection by remote ischemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass grafting[J]. *PLoS one*, 2014, 9(5):e96567.

(收稿:2014-07-24 修回:2014-09-15)

(本文编辑:丁媛媛)