

胸腺素 $\beta 4$ 对缺血心肌的保护作用

周新润 柯永胜

【摘要】 胸腺素 $\beta 4$ 可诱导内皮细胞分化、连接、迁移,促进血管形成,具有改善心肌血供、保护缺血心肌及促进心肌损伤修复的作用。该文主要介绍胸腺素 $\beta 4$ 对缺血心肌的保护作用及其机制。

【关键词】 胸腺素 $\beta 4$; 心肌缺血; 心脏保护; 血管生成

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.06.007

1 概述

1966 年 Goldstein 等^[1]首次从牛胸腺细胞中提取出一种促淋巴细胞生成因子,并将其命名为胸腺素(thymosin)。胸腺素是广泛存在于哺乳动物和其他脊椎动物多种组织细胞中的水溶性小分子多肽,根据等电位点不同可分为 α 、 β 、 γ 3 种亚型。在 β -胸腺素家族中以胸腺素 $\beta 4$ (T $\beta 4$)分布最广、含量最多,占 70%~80%。T $\beta 4$ 是一种血管生成因子,可增强祖细胞增殖、分化,诱导内皮细胞分化、连接、迁移,促进血管样结构形成,与炎症反应、肿瘤转移、血管生成、组织再生、创伤愈合、毛囊发育、角膜、神经及急性心肌梗死(AMI)后心肌保护等病理生理过程有密切联系。

2 T $\beta 4$ 与 AMI

T $\beta 4$ 能促进毛细血管生成、改善心肌血供、保护缺血心肌、减少梗死面积、减轻心肌纤维化、促进心肌再生、改善心功能^[2-5]。徐卫娟等^[6]在 AMI 大鼠的缺血区心外膜注射慢病毒载体携带的 T $\beta 4$ 基因,结果显示,治疗组 T $\beta 4$ 水平、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达量以及左室射血分数均显著高于对照组;且 VEGF 表达上调与 T $\beta 4$ 一致,提示 T $\beta 4$ 通过上调 VEGF 表达,促进微血管形成,改善心肌微循环,提高残存心肌存活率,从而改善心功能。Bao 等^[7]用 T $\beta 4$ 持续治疗 AMI 大鼠(28 d),观察 T $\beta 4$ 对 AMI 心脏保护作用,结果发现 T $\beta 4$ 持续治疗可使急性期心肌损伤标志物的血浆水平下降,激活损伤心肌组织的蛋白激酶 B(Akt)信号传导通路,减少

梗死面积,减轻缺血-再灌注损伤和心肌肥厚程度,增强心脏收缩功能,但不能增加心肌损伤区域的血管密度。Bock-Marquette 等^[8]以相同方法处理 AMI 大鼠 7~14 d,结果证实心肌梗死时 T $\beta 4$ 可以促进血管生成。上述结论不一致,原因可能与观察时间不同有关,提示 T $\beta 4$ 仅在 AMI 急性期短暂性提高血管密度。T $\beta 4$ 改善梗死后心脏功能的机制可能还与减少心肌细胞凋亡及纤维化,促进心肌细胞再生等有关。

Bollini 等^[9]在 AMI 大鼠腹腔中注射羊水干细胞,观察梗死心肌面积的变化。结果发现实验组梗死面积较对照组减小;并发现羊水干细胞以旁分泌方式分泌 T $\beta 4$,推测 T $\beta 4$ 可能参与心肌梗死后心肌细胞的再生、修复。有研究表明,WT1 及 Tbx18 标记的心外膜细胞是具有多向分化能力的心外膜源细胞(EPDC),能进一步分化为内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和心肌细胞等多种成熟的心血管细胞^[10]。Smart 等^[11]预先给予 AMI 大鼠外源性 T $\beta 4$ 处理,结果发现,成年大鼠受损心脏中 WT1 的表达被重新激活,WT1 及 Tbx18 于心肌梗死后第 2 天在心外膜显著上调,EPDC 在梗死后 2 周内持续增加并移行至梗死区周围,分化成有功能的心肌细胞。后续研究证实^[12],T $\beta 4$ 能激活心外膜上被 WT1 标记的心脏祖细胞,使其向冠状动脉平滑肌细胞、血管内皮细胞及心肌细胞分化。以上实验均表明,在心肌的再生、修复阶段,T $\beta 4$ 有重要作用。Zhou 等^[13]在结扎冠脉后给予大鼠外源性 T $\beta 4$,观察其对心肌梗死修复的影响,结果发现 T $\beta 4$ 并不能促进 EPDC 迁移、分化。两者结论不一致,可能由于 T $\beta 4$ 注射时间不同所致。

Sopko 等^[14]向 AMI 大鼠腹腔注射 T β 4, 发现心肌纤维化较前减轻, 推测 T β 4 可下调胶原蛋白 I、III 表达, 减少胶原蛋白沉积。Yan 等^[15]将表达 T β 4 的转基因胚胎干细胞(T β 4-EB)移植至 AMI 大鼠心脏, 发现 T β 4-EB 较普通胚胎干细胞更易分化成心肌细胞组分; 经 T β 4-EB 处理的大鼠心肌凋亡及纤维化程度减轻, 左室收缩功能明显增强, 推测与 T β 4 上调 Akt 表达, 下调人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)蛋白水平, 激活 Notch 信号通路有关。该研究为 T β 4-EB 用于梗死后心肌细胞再生治疗提供了支持证据。

3 T β 4 与慢性冠状动脉闭塞

慢性完全性冠状动脉闭塞(CTO)病变的部分患者经冠脉造影证实已有侧支循环形成, 侧支循环的建立对于改善缺血心肌的血供, 减轻缺血性心肌损伤有重要意义。VEGF 是促进侧支血管形成的关键因子, T β 4 可上调 VEGF 表达。

吕淑敏^[16]研究发现, 冠心病患者的血清 T β 4 水平与侧支循环程度明显相关; 且这种关联性独立于其他危险因素而单独存在(OR = 1.00, 95%CI: 1.00 ~ 1.01)。这表明机体自身 T β 4 参与侧支循环的建立, 可一定程度上减轻缺血心肌的低灌注程度, 改善心肌收缩功能。Bicer 等^[17]的研究亦得出了类似结论, 即在严重冠心病患者中, T β 4 水平与侧支循环的形成显著相关, T β 4 促进侧支循环形成。

4 T β 4 心脏保护的可能机制

4.1 促进 EPDC 旁分泌

EPDC 能通过旁分泌多种细胞因子, 促进成熟内皮细胞体外增殖、迁移和血管形成。T β 4 可促进 EPDC 旁分泌, 增加白细胞介素(IL)-8、VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等分泌。在 T β 4 诱导 VEGF 表达的过程中, 缺氧诱导因子(HIF)-1 α 起重要作用^[18]。也有研究者认为, T β 4 上调 VEGF 表达与促进 Akt 磷酸化有关。孤儿 G 蛋白偶联受体的天然配体 Apelin 是一种血管生成因子, AMI 时 Apelin 有类似 VEGF 的促微血管生成作用, 可能与 Akt/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)途径的激活有关^[19]。T β 4 对 Akt 产生作用, 从而参与 Apelin 促血管生成过程, 但该结论尚缺乏充分证据。

作为细胞有丝分裂刺激原, bFGF 可促进细胞自身和周围细胞分裂、增殖、分化、迁移, 刺激内皮细胞和平滑肌细胞增生, 促进血管形成。T β 4 可上

调 bFGF 受体, 促进 bFGF 表达^[20]。bFGF 可以促进 VEGF 的产生, 且 bFGF 与 VEGF 有协同作用。T β 4 与靶细胞受体结合, 进入核内作用于 DNA 反应元件, 调节 VEGF 和 bFGF 基因表达^[21]。此外, T β 4 还可上调 GATA-4、Mef2c、Tbx6 等多种心肌细胞转录因子的表达, 促进胚胎干细胞分化^[15]。

4.2 促进内皮细胞迁移

T β 4 可促进内皮祖细胞增殖、黏附、集落形成, 同时可作为潜在的化学趋化因子刺激内皮细胞迁移, 但作用机制存在争议。有研究发现, T β 4 促进细胞迁移时, 上调基质金属蛋白酶(MMP)的基因转录和蛋白表达, MMP 是 T β 4 发挥促内皮细胞迁移作用的关键因子^[22]。也有研究认为, T β 4 通过与 G 肌动蛋白结合, 增加内皮细胞增殖、黏附能力, 从而促进内皮细胞迁移^[23]。

4.3 激活相关信号通路

血管再生、心肌修复过程是由一系列信号分子及其下游信号传导途径来调节的。T β 4 可激活多种信号通路, 发挥心脏保护功能。

4.3.1 磷脂酰肌-3-激酶(PI3K)/Akt/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路 T β 4 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路, 调节 EPDC 迁移, 促进血管新生及心肌修复^[24]。Hu 等^[25]证实, T β 4 的裂解产物 N-乙酰基-丝氨酰-天门冬酰-脯氨酸(AcSDKP)可通过 PI3K/Akt 信号传导通路影响细胞增殖。T β 4 还可通过 PI3K/Akt/eNOS 途径激活 eNOS, 减缓内皮祖细胞衰老^[26]。

4.3.2 HIF/VEGF 信号通路 T β 4 可在蛋白质水平增加 HIF-1 α 表达及稳定性, 激活 VEGF 启动子, 诱导 VEGF 的转录表达, 当 T β 4 剂量过高, 则可反馈性抑制 HIF-1 α 及 VEGF 的表达^[18]。

4.3.3 Hand1 信号通路 Hand1 是心脏、神经嵴来源的转录因子。Smart 等^[27]发现, 在 Hand1 缺乏的胚胎中 T β 4 表达量减少, 血管形成出现障碍; 给予外源性 T β 4 可诱导胚胎干细胞分化, 促进卵黄囊的血管形成。故推断 T β 4 是 Hand1 下游调节因子, 并且是 Hand1 的直接作用靶点。

4.3.4 Notch 信号通路 Notch 信号通路在进化中高度保守, 它与 VEGF 信号通路相互影响。VEGF 可刺激 Notch 蛋白的表达, 而 Notch 被激活可抑制 VEGF 受体, 调节 VEGF 通路。吕淑敏^[16]发现, T β 4 可通过上调 Notch1 和 Notch4 表达, 影

响下游 VEGF 信号通路,促进内皮细胞管腔形成,表明 Notch1 与 Notch4 共同参与了 T β 4 促血管生成作用,且与 VEGF 通路相互作用。Yan 等^[15]也证实了 T β 4 可以上调 Notch1 的表达,发挥心脏保护功能。

4.4 抑制凋亡和衰老

T β 4 通过多种机制抑制细胞凋亡,包括抑制促凋亡蛋白 Bax、细胞凋亡蛋白酶的表达和活性,增加抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Survivin 的表达,抑制细胞线粒体细胞色素 C 的释放,减少氧自由基生成,上调抗氧化应激酶如超氧化物歧化酶(SOD)。

T β 4 还可在转录及翻译水平刺激抗氧化酶铜/锌过氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)及过氧化氢酶的表达。经 T β 4 处理的心肌细胞中抗凋亡及抗炎基因表达增加,而 Cu/Zn-SOD 及过氧化氢酶基因沉默,可致 T β 4 处理后的心肌细胞死亡,表明 T β 4 可选择性地上调抗氧化酶、抗炎基因及抗细胞凋亡酶的表达,保护心肌细胞免受氧化应激损伤^[28]。

T β 4 通过激活整合素连接激酶(ILK)基因及下游 Akt 途径,抑制细胞凋亡。人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)可通过去磷酸化抑制 PI3K/Akt 信号转导途径。心肌梗死时,PTEN 活性显著增加,PI3K/Akt 信号通路受到抑制,促使心肌细胞凋亡和心肌重构^[29-30]。Yan 等^[15]发现,过表达 T β 4 的胚胎干细胞可下调 PTEN 表达,促进 Akt 激活,减轻梗死后心肌细胞凋亡,延缓心肌重构,发挥心脏保护功能。

4.5 抑制炎症反应

缺血、缺氧致心肌损伤后,引起多种炎症介质聚集和释放,发生复杂炎症反应,导致心肌纤维化、瘢痕形成,心脏收缩功能减退。核因子- κ B(NF- κ B)是一种转录因子,可调节多种炎症因子的转录表达。Reilly 等^[31]发现,NF- κ B 信号通路与冠心病等慢性病发病机理有关。PINCH-1-ILK- α -parvin(PIP)复合物是由 PINCH-1、ILK、 α -parvin 组成的异聚体,它连接整合素和肌动蛋白骨架,调节细胞与细胞外基质黏附信号转导。研究表明,T β 4 可以促发 PIP 介导的 Akt 激活效应,抑制 NF- κ B 信号通路和胶原介导的心肌纤维化,从而抑制心肌重构,改善心肌收缩功能^[14]。T β 4 裂解片段 AcSDKP 能抑制血小板源性生长因子(PDGF)介导的心脏成纤维细胞增殖,下调 I、III 型胶原蛋白表达及胶原合成,从而抑制心肌

纤维化。该效应可能与 AcSDKP 抑制转化生长因子 β 4/Smad 蛋白/细胞外调节蛋白激酶 1/2(TGF β 4/Smad/ERK1/2)通路有关^[32]。研究发现,AMI 时坏死组织清除,胞外基质降解及胶原沉积均需要 MMP 的参与,T β 4 可能通过抑制 MMP-9 活性,减轻心肌纤维化^[15]。

T β 4 对缺血心肌具有的保护作用已被证实,这可能为 AMI 提供了新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Goldstein AL, Slater FD, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(3): 1010-1017.
- [2] Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin β 4 in the ischemic heart [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1269: 92-101.
- [3] Smart N, Risebro CA, Clark JE, et al. Thymosin beta4 facilitates epicardial neovascularization of the injured adult heart [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1194: 97-104.
- [4] Smart N, Dubé KN, Riley PR. Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation [J]. Vascu Pharmacol, 2013, 58(3): 164-173.
- [5] Bollini S, Smart N, Riley PR. Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(2): 296-303.
- [6] 徐卫娟,刘 艺,彭 雯. 胸腺素 β 4 对大鼠急性心肌梗死后心功能的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(9): 965-968.
- [7] Bao W, Ballard VL, Needle S, et al. Cardioprotection by systemic dosing of thymosin beta four following ischemic myocardial injury [J]. Front Pharmacol, 2013, 4: 149.
- [8] Bock-Marquette I, Shrivastava S, Pipes GC, et al. Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(5): 728-738.
- [9] Bollini S, Cheung KK, Riegler J, et al. Amniotic fluid stem cells are cardioprotective following acute myocardial infarction [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(11): 1985-1994.
- [10] Schlueter J, Brand T. Epicardial progenitor cells in cardiac development and regeneration [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2012, 5(5): 641-653.
- [11] Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury [J]. Nature, 2011, 474(7353): 640-644.
- [12] Chen S, Shimoda M, Chen J, et al. Stimulation of adult resident cardiac progenitor cells by durable myocardial expression of Thymosin beta 4 with ultrasound-targeted microbubble delivery [J]. Gene Ther, 2013, 20(2): 225-233.

- [13] Zhou B, Honor LB, Ma Q, et al. Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardio*, 2012, 52(1): 43-47.
- [14] Sopko N, Qin Y, Finan A, et al. Significance of thymosin beta4 and implication of PINCH-1-ILK- α -parvin (PIP) complex in human dilated cardiomyopathy[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20184.
- [15] Yan B, Singla RD, Abdelli LS, et al. Regulation of PTEN/Akt pathway enhances cardiomyogenesis and attenuates adverse left ventricular remodeling following thymosin β 4 overexpressing embryonic stem cell transplantation in the infarcted heart[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75580.
- [16] 吕淑敏. 胸腺肽 β 4 与体内血管再生的关系及促血管生成中的 Notch 通路机制的研究[D]. 浙江: 浙江大学医学部, 2011.
- [17] Biçer A, Karakurt Ö, Akdemir R, et al. Thymosin beta 4 is associated with collateral development in coronary artery disease[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71(8): 625-630.
- [18] Jo JO, Kim SR, Bae MK, et al. Thymosin β 4 induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a hypoxia-inducible factor (HIF)- α -dependent manner[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(11): 1244-1251.
- [19] 张 普, 刘铭雅, 朱 伟, 等. Apelin 经 Akt/AMPK 信号通路促进心肌微血管内皮细胞生成[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(1): 44-48.
- [20] Saghizadeh M, Kramerov AA, Tajbakhsh J, et al. Proteinase and growth factor alterations revealed by gene microarray analysis of human diabetic corneas[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(10): 3604-3615.
- [21] Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential[J]. *Angiogenesis*, 2007, 10(4): 229-241.
- [22] Qiu P, Kurpakus-Wheater M, Sosne G. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 165-173.
- [23] Selmi A, Malinowski M, Brutkowski W, et al. Thymosin β 4 promotes the migration of endothelial cells without intracellular Ca^{2+} elevation[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(14): 1659-1666.
- [24] Qiu FY, Song XX, Zheng H, et al. Thymosin beta4 induces endothelial progenitor cell migration via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(3): 209-214.
- [25] Hu P, Li B, Zhang W, et al. AcSDKP regulates cell proliferation through the PI3KCA/Akt signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79321.
- [26] Li J, Yu L, Zhao Y, et al. Thymosin β 4 reduces senescence of endothelial progenitor cells via the PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 598-602.
- [27] Smart N, Dubé KN, Riley PR. Identification of Thymosin β 4 as an effector of Hand1-mediated vascular development[J]. *Nat Commun*, 2010, 1: 46.
- [28] Wei C, Kumar S, Kim IK, et al. Thymosin beta 4 protects cardiomyocytes from oxidative stress by targeting anti-oxidative enzymes and anti-apoptotic genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42586.
- [29] Keyes KT, Xu J, Long B, et al. Pharmacological inhibition of PTEN limits myocardial infarct size and improves left ventricular function postinfarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(4): H1198-H1208.
- [30] Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): H2038-H2049.
- [31] Reilly SJ, Odeberg J, Tornvall P. Use of the whole leucocyte population in the study of the NF- κ B pathway[J]. *Scand J Immunol*, 2011, 73(4): 338-343.
- [32] Peng H, Carretero OA, Peterson EL, et al. Ac-SDKP inhibits transforming growth factor-beta1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(5): H1357-H1364.

(收稿: 2014-05-29 修回: 2014-07-20)

(本文编辑: 孙 雯)