

自噬在心脏疾病中的研究

钟春林综述 陈 丽审校

【摘要】 自噬是一个高度保守的蛋白质和细胞器分解过程,这个过程可使蛋白质再循环及清除衰老的细胞器,自噬与细胞内环境稳定及组织器官发育等多种细胞活动有关。近年来有研究表明自噬与多种疾病有关,如神经肌肉变性疾病、癌症及心脏疾病。在正常心脏中,存在着低水平的自噬活动,若自噬缺陷可引起心功能不全甚至心力衰竭,在心脏后负荷过重、缺血及缺血再灌注损伤中也可观察到自噬活动的增加,自噬的缺陷与增多都与疾病的进展有关,该文就自噬在心脏疾病中的相关研究作一综述。

【关键词】 自噬;心脏疾病;凋亡

自噬(autophagy)是蛋白质和细胞器的分解过程,由溶酶体介导,与衰老的细胞器及破坏的蛋白质的清除和维持细胞内环境稳定有关,在蛋白质的清除过程中,可产生游离的氨基酸和脂肪酸再次供细胞利用。如单细胞真核生物酵母缺乏调节细胞外环境中营养物质浓度的能力,当环境中营养物质缺乏时,通过自噬分解细胞内物质产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)维持细胞生存^[1]。在哺乳动物中自噬与多种细胞活动有关,如在发育过程中自噬与重塑组织和细胞分化有关,而无限制的自噬则导致细胞死亡^[2,3]。

1 自噬在心脏疾病中的促发机制

自噬在细胞中促发的分子机制还不清楚,有研究表明,心肌细胞内蛋白质聚集可促发自噬,而自噬也充当清除蛋白质聚集物的一种机制。Kostin等^[4]对 19 例特发性扩张型心肌病研究显示,泛素/蛋白酶体(ubiquitin/proteasome)的功能缺陷与心脏内的泛素蛋白(ubiquitinated protein)聚集有关,并推测泛素蛋白在细胞内的聚集可促发自噬。Tannous 等^[5]用蛋白酶体抑制剂(MG-132)抑制蛋白酶体活动后可增加新生鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVMs)内蛋白质的聚集,并同时检测到胞内自噬的增加,而用自噬抑制剂 3-甲基嘌呤后,

NRVMs 中可见到大量泛素蛋白样物质的聚集,表明蛋白质在胞内的聚集足以促发细胞自噬。 α B-晶体蛋白(α B-crystallin, CryAB)基因的错义突变(CryAB^{R120G})触发了结蛋白相关心肌病(desmin-related cardiomyopathy, DRC),以错误折叠蛋白质在胞内的聚集为特征,Tannous 等^[6]在体外培养的 NRVMs 中发现 CryAB 突变后心肌细胞中自噬显著增加,用 3-甲基嘌呤抑制自噬后 NRVMs 中聚集物数量增多且体积变大。在体内实验中,心肌细胞内表达 CryAB 突变的转基因小鼠也可见到自噬的增加。这些表明,表达 CryAB^{R120G}蛋白的心肌细胞足以引起自噬的增加,而自噬的增加与这些有潜在毒性的蛋白质聚集物的清除有关。

2 心脏疾病中的自噬与凋亡

心肌细胞的逐渐丢失是心脏疾病的一个重要病理过程,Kostin 等^[4]对 19 例特发性扩张型心肌病研究发现心肌细胞的丢失除凋亡(apoptosis)和胀亡(oncosis)外,自噬性细胞死亡(autophagic cell death)也参与其中。有研究显示,半胱天冬酶相关途径(caspase-dependent pathway)介导的细胞凋亡在心脏发育中起组织重塑作用^[2],而在心脏疾病中心肌细胞凋亡的水平却很低,心脏疾病病人的心肌细胞死亡与非半胱天冬酶相关途径即自噬性细胞死亡有关。在 DRC 中可检测到自噬的显著增加,而凋亡仅轻微增加^[6]。在白喉毒

作者单位: 637007 南充,四川省川北医学院附属医院心内科

素(diphtheria toxin, DT)介导的心肌细胞死亡中,没有显示 DNA 的断裂、半胱天冬蛋白酶 3 (caspase 3) 的激活、Bcl2 家族蛋白(Bcl2 family proteins)表达的改变、线粒体细胞色素 C 的释放,电镜也没有观察到凋亡的典型表现,即核断裂(nuclear fragmentation)和新月形的染色质凝集(crescent-shaped chromatin condensation),这些都表明心肌细胞死亡不是凋亡引起。免疫组织化学显示心肌细胞内组织蛋白酶 D(cathepsin D)、溶酶体相关膜蛋白 1(lysosome-associated membrane protein-1, LAMP-1)和泛素(ubiquitin)阳性,电镜观察到细胞核内波浪状的染色质浓集(lumpy chromatin condensation)、胞浆中丰富的各种大小自噬泡及包含降解的脂滴和线粒体,这些表明 DT 诱导的心肌细胞死亡不是凋亡而是自噬介导^[7]。

3 自噬在心脏疾病中的作用

自噬可清除衰老的细胞器及破坏的蛋白质,若破坏的蛋白质本身有毒性,则自噬清除蛋白质对心脏起着保护细胞的作用^[5]。在心脏疾病中有报道自噬对心脏起保护作用,也有报道自噬对心脏起损害作用,不同水平的自噬及自噬在不同疾病和疾病的不同阶段起着不同的作用。

3.1 自噬对心脏的保护及心功能的维持

3.1.1 自噬对心脏疾病的保护作用 为了评估自噬与 DRC 的关系, Tannous 等^[6]用表达 CryAB^{R120G}的转基因小鼠作为实验对象,发现表达 CryAB^{R120G}的转基因小鼠出现了迟发性心肌病及伴随心脏病理性重塑、细胞内蛋白质的聚集,且小鼠在 10~12 个月大时因心力衰竭而死亡。Beclin 1 蛋白参与自噬活性的调节,杂合破坏 beclin 1 基因(heterozygous disruption of beclin 1, beclin 1^{+/-})的小鼠,自噬活动较正常时减少^[3],与表达 CryAB^{R120G}的转基因小鼠相比,同时表达 CryAB^{R120G}与 beclin 1^{+/-}的小鼠自噬的减少使小鼠在 9 个月大时,出现心功能衰竭并导致早期死亡,同时促进了心肌间质纤维化、聚泛素蛋白大量蓄积。表明自噬在 DRC 等蛋白质毒性相关的心脏疾病中起保护作用。

3.1.2 自噬对心功能的维持 溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP-2)是自噬体成熟的调节器, LAMP-2 缺陷可导致自噬的缺陷,这种自噬缺陷显示了心功能的异常^[8]。如酸性麦芽糖酶正常的溶酶体性糖原病(Danon 病)是一个 LAMP-2 缺陷导致溶酶体内糖原蓄积的疾病,可累及多个系统,以原发性心肌病、肌病和智力发育迟缓为特征^[9]。给予自噬抑制剂巴佛洛霉素 A1(bafilomycin A1)对正常喂养的小鼠心功能无影响,在饥饿的小鼠巴佛洛霉素 A1 导致了明显的左心室扩张和心功能的显著下降。饥饿小鼠心肌细胞中氨基酸含量在无自噬抑制剂时增高,给予自噬抑制剂后心肌细胞中氨基酸和 ATP 含量都降低。表明饥饿状态时自噬在维持心功能方面起着重要作用^[10]。

3.2 自噬促进心脏疾病的进展

自噬在蒺环类抗生素诱导的心力衰竭、DT 诱导的心肌细胞死亡及人类扩张型心肌病的鼠模型中起着促进疾病进展的作用。自噬性细胞死亡在抗肿瘤药蒺环类抗生素阿霉素(adriamycin)诱导的心力衰竭中期起着重要的作用,给予自噬抑制剂可改善心脏功能^[11]。注射 DT 7 d 后,在心脏中表达人类 DT 受体的转基因小鼠表现出心室的扩张、心室壁变薄、心房血栓、心室收缩功能的恶化,这些病理改变都是自噬引起^[7]。在人类扩张型心肌病动物模型(UM-X71 地鼠)中,地鼠的心肌细胞内发现了大量的自噬变性,这些心肌细胞组织蛋白酶 D 过度表达,并发现许多断裂的心肌细胞膜上组织蛋白酶 D 为阳性,表明心肌细胞的死亡继发于自噬。心肌细胞死亡导致了心力衰竭的进行性发展,并在 30 周龄时导致 50% 的死亡率^[12]。

3.3 不同水平的自噬对疾病起着不同的作用

自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, atg5)是自噬过程中的一种必需物质,缺乏 atg5 导致自噬近完全消失。Beclin 1^{+/-}小鼠自噬量减少约 50%,在血流动力学负荷过重的情况下,缺乏 atg5 的小鼠没有增加自噬引起不良反应,过度表达 beclin 1 的转基因鼠心肌细胞中自噬增加过多则会导致不良反应^[3,13]。主动脉缩窄术是一个

使血流动力学负荷过重而诱导心力衰竭的造模术。主动脉缩窄后出现心力衰竭并检测到自噬的增加,且自噬在主动脉缩窄 48 h 后达高峰并持续至少 3 周。为了检测在血流动力学负荷过重时自噬起的作用,Zhu 等^[3]分别用 beclin 1^{+/-}与过度表达 beclin 1 的小鼠与正常小鼠比较,发现主动脉缩窄后 beclin 1^{+/-}小鼠心功能的降低较对照组减少,心脏病理性重塑也减少,相反过度表达 beclin 1 增加了自噬活动,较对照组心功能下降更严重,心脏病理性重塑也增多。这些表明,自噬在血流动力学负荷过重时起着促进疾病进展的作用。Nakai 等^[13]研究显示,缺乏 atg5 的小鼠在心脏发生早期没有表现出异常,在后负荷增加 1 周后显示了左心室的扩张和心功能障碍,当鼠成年后缺乏 atg5 导致了心脏的快速肥厚、心室的扩张、收缩功能异常及一系列与心力衰竭有关的症状,此实验显示基础水平的自噬在维持内环境稳定和心肌细胞大小,总的结构及功能方面起着重要作用,自噬适度的增加在血流动力学负荷过重的心脏中起着保护的作用。

3.4 自噬在疾病的不同阶段起着不同的作用

有研究表明,自噬在缺血阶段阻止心肌细胞死亡,在再灌注阶段促进心肌细胞死亡。也有研究表明,自噬在再灌注时也阻止心肌细胞死亡。心肌细胞培养基中葡萄糖缺乏可模拟心肌缺血,葡萄糖缺乏可抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和激活腺苷-磷酸(AMP)激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)增加自噬,若用 3-甲基嘌呤抑制自噬则减少心肌细胞的生存率,抑制 AMPK 则增加心肌细胞死亡,在再灌注阶段, beclin 1^{+/-}小鼠自噬减少,心肌细胞损伤也减少。表明自噬在缺血阶段起保护作用,在再灌注阶段起着促进疾病进展的作用^[5]。但 Hamacher-Brady 等^[14]观察到 atg5 的高表达增加了自噬,且自噬的增加在缺血再灌注中减少心肌细胞死亡,而 atg5^{K130R}减少自噬,则增加心肌细胞死亡。

4 展望

自噬在心肌中既有保护作用也有促进疾病进

展的作用,将自噬作为治疗目标时辨别自噬对疾病起保护性作用或者是促进疾病的进展非常重要。在与年龄相关的心功能障碍中自噬的缺失起着关键作用,任何提高自噬治疗的干预措施都有助于提高心功能^[15]。另外,粒细胞集落刺激因子治疗 UM-X71 地鼠减少自噬活动,提高生存率和心功能并改善心脏的病理性重塑及减少间质纤维化^[12]。随着对自噬研究的不断深入,调节自噬的分子机制逐步被揭示,自噬在疾病的进程中起的具体作用也在显现,选择性的激活或抑制自噬来阻止心脏疾病的进展可成为一个新的治疗手段。

参考文献

- [1] Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(6): 439-448.
- [2] He C, Bartholomew CR, Zhou W, et al. Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabara zebrafish embryos[J]. Autophagy, 2009, 5(4): 520-526.
- [3] Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress[J]. J Clin Invest, 2007, 117(7): 1782-1793.
- [4] Kostin S, Pool L, Elsasser A, et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts[J]. Circ Res, 2003, 92(7): 715-724.
- [5] Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy [J]. Circulation, 2008, 117(24): 3070-3078.
- [6] Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(28): 9745-9750.
- [7] Akazawa H, Komazaki S, Shimomura H, et al. Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 41095-41103.
- [8] Saftiq P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation[J]. Autophagy, 2008, 4(4): 510-512.
- [9] Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, et al. Generalized lysosome-associated membrane protein-2 defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in Danon disease[J]. Am J Pathol, 2006, 168(4): 1309-1320.
- [10] Kanamori H, Takemura G, Maruyama R, et al. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart[J]. Am J Pathol, 2009, 174(5): 1705-1714.
- [11] Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic

cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure[J]. Int J Cardiol, 2009, 134(1):82-90.

- [12] Miyata S, Takemura G, Kawase Y, et al. Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor[J]. Am J Pathol, 2006, 168(2):386-397.
- [13] 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.

- [14] Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 146-157.

- [15] Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology[J]. Cardiovasc Res, 2005, 68(3):355-365.

(收稿:2009-05-13 修回:2009-07-30)

(本文编辑:朱 映)

• 病例报告 •

射频导管消融术后并发左房血栓形成 1 例

杨 丹 项美香

患者,男性,72岁,因反复心慌头晕2个月入院。既往慢性支气管炎病史30年,吸烟史50年,20支/日。入院查体:血压140/82 mmHg,脉搏72次/分,体温37.0℃。桶状胸,两肺呼吸音偏低,对称,未闻及干湿性罗音。心律齐,心前各瓣膜区未闻及病理性杂音。入院行食管调搏检查示:房速;心脏超声示:左房增大,二尖瓣、三尖瓣少量返流。心电图、三大常规、肝肾功能正常。入院诊断:(1)阵发性心动过速;(2)慢性阻塞性肺病。

局麻下穿刺右颈内静脉、右股静脉, S1S2 诱发房速,三维标测可见左房前中上最早激动,予温控43℃放电,静息流量为冷盐水2 ml/min,放电时最大流量17 ml/min,最大功率30 W,放电5 s后房速终止,巩固放电300 s。S1S2 诱发房扑,重新三维标测,发现左房前中上部最早激动呈折返型,予放电5 s后房扑终止,巩固放电300 s,反复S1S2 诱发,未见房扑。

射频消融术后予达肝素5 000 IU注射,每12 h 1次,连用3 d,口服华法林片2.5 mg,每日1次。术后第2天至第6天有中等程度发热,术后第3天凝血酶原时间国际标准化比值(INR)1.35。术后第6天心脏超声示左房内6.5 cm×4.5 cm大小不均质回声团块,首先考虑血栓(见图1)。因患者手术风险大,选择保守治疗。据INR调整华法林用量,INR波动于2.38~4.99。术后1个月复查心脏超声左房内见4.8 cm×2.5 cm大小附壁血栓,较前明显缩小(见图2)。

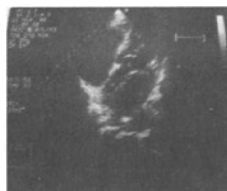


图1 消融术后第6天
左房血栓



图2 经抗凝治疗后左房
血栓缩小明显

讨论:射频消融术根治阵发性室上性心动过速的成功率可达95%以上。它具有创伤小、安全、成功率高、恢复快等优点,并发症发生率为2%~5%。血栓形成和栓塞是并发症之一,但消融部位血栓形成的报道不多。本例患者于三维标测射频消融术后第6天发现消融部位血栓形成,其机制可能是:(1)血小板激活。术后消融部位内皮损伤及电极周围温度升高可导致血小板黏附、激活、聚集和纤维蛋白生成。(2)促凝血物质含量或结构异常。(3)纤溶因子含量减少或功能减弱。(4)血黏度增高或血流减慢。本例虽然在三维标测系统指导下进行温控加冷盐水灌注导管消融,术后予肝素联合华法林抗凝,但是仍发生了左房血栓形成事件。在采取了及时的超声检查及抗凝治疗后,才避免了血栓的进一步增大、栓塞事件的发生。因此,早期床边心超监测,围手术期肝素抗凝,对消融后血栓形成的识别、监测、和预防是必要的。

(收稿:2009-02-17 修回:2009-04-17)

(本文编辑:丁媛媛)

作者单位:310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院心内科

通讯作者:项美香, E-mail: xiangmx@yahoo.com