

心肌细胞对机械刺激的细胞与分子反应

刘 东 综 述 吕俊升 审 校

(浙江医科大学附属第二医院心内科, 杭州 310006)

主题词 心肌; 机械刺激; 信号转导; 生长因子

摘 要 牵拉心肌细胞或心肌细胞低渗性肿胀均可使细胞膜张力增加, 从而对心肌细胞产生机械刺激。本文概述了心肌细胞对机械刺激的感受、信号转导、基因表达改变以及生长因子在此反应中所起作用的新进展。心脏前负荷和/或后负荷增加对心肌机械刺激可导致心脏代偿性肥大, 目前从细胞与分子水平对此过程进行的研究将有助于心脏肥大及心衰的防治。

牵拉心肌细胞将引起基因表达的快速变化和蛋白合成增加, 这表明在缺乏神经和激素条件下, 心肌细胞也能感受外部负荷。牵张心肌细胞引起表型改变的特征与在体心脏压力超负荷诱导的肥大现象非常相似。随着细胞与分子生物学

技术的发展, 心肌细胞在负荷诱导心肌肥大过程中是如何感受机械刺激并转化成细胞内生长信号有了进一步的认识。

1 机械感受器

在研究心肌细胞对机械刺激的反应中,最重要或许也是最困难的问题是机械感受器问题。心肌细胞似乎不可能具有类似于内耳中的毛细胞或皮肤触觉感受器那样的特异性机械感受分子。虽然目前已知机械牵拉心肌细胞可激活多个第二信使系统,但仍不能完全确定哪些分子是被牵拉直接激活,哪些分子是被其它信号分子间接激活。估计机械感受分子应与细胞膜有某种联系,以使感受细胞膜张力的变化。下面讨论心肌细胞中三个可能的机械感受机制。

1.1 离子通道

通过使用膜片钳技术发现,当以负压抽吸心肌细胞单通道膜片使局部膜张力增加时,测得某些通道开放的概率增加。这些通道被称为牵拉激活的(stretch-activated, SA)离子通道,包括不同离子电导的非选择性阳离子通道和 K^+ 通道。这些SA离子通道的开放引起细胞内 Ca^{2+} 增加。近来实验发现,机械刺激可影响心肌细胞多种离子通道和电流,如 K^+ -ATP通道、延缓性 K^+ 整流通道、 Cl^- 通道、L型 Ca^{2+} 通道和 Na^+/K^+ 泵电流等^[1,2]。在机械刺激心肌细胞时,这些SA通道是否为起始感受器,目前报道不一致。一方面,已证实克隆的肾脏上皮细胞 Na^+ 通道(在心脏也观察到其mRNA表达)在平面脂质双层模型中可被牵拉诱导激活,表明SA通道在细胞膜张力增加时确实可被直接激活^[3]。另一方面,部分SA通道也可继发于某些第二信使,如被细胞内 Ca^{2+} 及磷脂酶产生的脂肪酸激活^[4]。未来在此方向的工作可能将集中于通道分子在脂质双层系统中机械感受性的鉴定以及SA通道基因的鉴定与研究。

1.2 整联蛋白

整联蛋白(integrin)为异二聚体跨膜受体,是离体心肌细胞形态学的重要决定因素^[5]。其细胞质区域与细胞骨架成分直接连接,从而使细胞外基质成分与细胞骨架相关联。实验表明,表面覆有整联蛋白配体的磁珠确能转导机械刺激到细胞骨架。肿瘤坏死因子促心肌细胞肥大反应可能也是依赖于整联蛋白与细胞外基质的相互作用^[6]。整联蛋白的细胞质区域还可与粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)相互作用。粘着斑激酶是介导细胞增殖反应的重要激酶,它可与多个信号分子相互作用,这些信号分子再进一步激活其相应下游蛋白激酶链,包括 $p21^{ras}$ 、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等。在心肌细胞低渗性肿胀而产生细胞膜张力增加的机械刺激时,已证实整联蛋白在酪氨酸激酶的激活过程中起着一定作用。可见,整联蛋白有可能是转导机械信号进入细胞内的机械感受蛋白,但它是否介导牵拉诱导的心脏肥大反应尚不清楚。

1.3 酪氨酸激酶

受体型酪氨酸激酶自身具有跨膜区段,某些非受体型酪氨酸激酶,如Src家族可锚着于细胞膜内表面。所以细胞膜牵张有可能直接导致酪氨酸激酶构象变化而激活。故推测实验发现机械牵拉心肌细胞或心肌细胞低渗性肿胀均可导致细胞内 $p42$, $p44$, $p70$, $p85$ 和 $p120$ 等蛋白的快速酪氨酸磷酸化,最早在5 s即可测得蛋白酪氨酸磷酸化显著增加,由此

可见酪氨酸激酶的激活可能是细胞对机械刺激的最早反应之一^[7]。具体是哪一种或几种酪氨酸激酶在其中起作用至今仍未确定,可能与Src或/和FAK有关^[8,9]。深入研究机械刺激激活酪氨酸激酶的机制,对确定酪氨酸激酶是否是直接的机械感受器将非常重要。

2 机械刺激的信号转导

2.1 细胞内信号分子

机械刺激诱导信号转导的特征是多个第二信使系统同时激活。

2.1.1 磷脂酶 机械牵拉心肌细胞最早可于1 min内激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC),也可激活磷脂酶D(phospholipase D, PLD)和磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2 , PLA_2)以及由磷脂酶激活的各种脂源性第二信使,如花生四烯酸、磷脂酸、甘油二酯和三磷酸肌醇。后两者又可分别直接或通过 Ca^{2+} 间接激活PKC,PKC在牵拉诱导的即刻早期基因表达中起着重要作用。牵拉激活磷脂酶的机制尚不完全清楚,可能与原癌基因src(c-src)的激活^[8]、血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)的分泌及非选择性阳离子通道开放引起的钙内流等因素有关。

2.1.2 促分裂原活化蛋白激酶级联 机械刺激心肌细胞可激活MAPKKK(Raf-1和MAPKKK-1)和MAPKK,并由此先后激活Jun激酶(Jun N-terminal kinases, JNKs)和MAPK等^[10]。这些激酶是丝/苏氨酸激酶,可使多种促增殖因子磷酸化。有关它们的作用已有许多文献报道,如JNKs可使转录因子Jun磷酸化,MAPK可使 $p62^{TCF}$ 磷酸化,由此刺激c-fos基因转录等^[11]。机械牵拉心肌细胞还可迅速激活 $p21^{ras}$,后者在促细胞生长分化的不同信号转导链中居于中心地位,但它在牵拉诱导的心肌细胞肥大中所起的特定作用迄今尚无报道。

2.1.3 蛋白合成调节因素 在犬心室压力超负荷的在体实验中,可观察到翻译起始因子eIF-4E的磷酸化显著增加,从而刺激蛋白合成^[12],是何种激酶使eIF-4E磷酸化迄今未知。此外,血管紧张素II可激活心肌细胞内 $p70^{S6K}$,后者是磷酸化S6的生理激酶。S6是40S核糖体蛋白的成分之一,它被磷酸化后可通过刺激蛋白翻译的起始与延伸而增加蛋白合成率。机械刺激心肌细胞是否激活 $p70^{S6K}$,目前仍未确定。

2.2 基因表达

机械牵拉心肌细胞首先激活的基因是即刻早期基因,如c-fos、c-jun、Egr-1和c-myc等,其中以c-fos的激活机制研究得最多。将c-fos启动子报告基因转染心肌细胞,发现血清效应元件在牵拉致c-fos启动子反应中,是必需的也是足够的。最近在心肌细胞低渗性肿胀的机械刺激中也得到同样结论^[7]。这意味着在心肌细胞对膜张力增加的反应中血清效应因子— $p62^{TCF}$ 的激活可能是调节c-fos表达的共同机制。心脏肥大还与胚胎基因的表达上调有关,已鉴定有几种顺式作用元件可能与内皮素-1或 α_1 -肾上腺素能刺激诱导心钠素、 β -肌球蛋白重链和 α -肌动蛋白的表达有关。然而,机械牵拉时胚胎基因表达增加的机制仍待研究。

3 机械刺激与生长因子

越来越多的证据表明,机械牵拉可刺激心肌细胞内生长因子合成与分泌,生长因子又可介导机械牵拉诱导的细胞肥大反应。虽然不同机械刺激形式引起分泌的生长因子不完全相同,但现在认为生长因子的自分泌/旁分泌反应是牵拉诱导心肌细胞肥大的共同机制。

3.1 血管紧张素 II

血管紧张素 II 可能是参与机械刺激心肌细胞诱导肥大反应的主要生长因子。机械牵拉无血清培养基中的新生大鼠心肌细胞可引起培养基中 Ang II 浓度显著增加,峰值约在 10 min,同时出现细胞内 Ang II 浓度相应减少,这表明机械牵拉引起了 Ang II 的分泌。现已发现,在心室肌细胞的分泌性颗粒样结构中有 Ang II 贮藏^[13,14]。血管紧张素 II 的分泌机制目前认为有如下两种可能。第一,机械牵拉激活 PKC、Ca²⁺、低分子量 G 蛋白或其它信号分子,从而刺激生长因子分泌^[15];第二,机械刺激直接引起肌细胞膜通透性改变,而允许胞浆内生长因子释放^[16,17]。

机械牵拉心肌细胞可观察到其肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 上调,包括血管紧张素原、肾素、血管紧张素转化酶和 Ang II 受体的表达都上调。用外源性 Ang II 处理培养的心肌细胞也可使心脏 RAS 上调,但 Ang II 受体除外^[18]。这提示机械牵拉可能首先引起贮存的 Ang II 急性分泌,分泌的 Ang II 再作用于心肌细胞,通过上调局部 RAS 作用而增加 Ang II 合成,形成一个正反馈机制。机械牵拉引起的 Ang II 受体上调,则可能由非 Ang II 依赖的机制所介导。

外源性 Ang II 作用于新生大鼠心肌细胞所引起的肥大反应与机械牵拉所引起的反应基本相同,包括蛋白合成增加,即刻早期基因、胚胎基因和生长因子基因表达增加等,且均可被 Ang II 受体拮抗剂所阻滞。比较外源性 Ang II 与机械牵拉作用于心肌细胞时激活的第二信使,发现也基本相同,这表明局部合成与分泌的 Ang II 足以引起心肌肥大^[14,19]。机械牵拉引起的信号分子激活是否仅由 Ang II 介导,仍待澄清。要解决此问题,需对两者激活动力学更精细的比较,以及在 Ang II 受体拮抗剂存在下对机械牵拉反应的深入研究。

3.2 其它生长因子

有文献^[14]报道,在牵拉诱导心肌细胞内 MAPK 激活和蛋白合成率增加过程中,存在 Ang II 拮抗剂不能抑制的成分。这意味着肥大反应的一部分可能是由牵拉直接激活的信号机制所介导,或由其他生长因子的自分泌/旁分泌所介导^[20]。现已证实,机械牵拉新生大鼠心肌细胞可引起内皮素-1 分泌,虽然其分泌量远不足以单独引起肥大反应,但它可通过内皮素受体 (ETA) 依赖机制,增强 Ang II 诱导 Raf-1 和 MAPK 激活的作用。血管紧张素 II 和内皮素-1 等因子的信号转导需通过 G 蛋白,有实验表明,在心脏压力超负荷状态下,受机械刺激的小鼠心肌出现同心性左室重塑,呈代偿性肥大;而过表达 G_α 蛋白的转基因小鼠,则出现心肌非同心性肥大,射血功能受损,最后导致左室心衰^[21]。G_α 蛋白在其中

的确切意义尚无定论。另外,还发现碱性成纤维细胞生长因子的释放在心脏肥大中也起着一定的作用^[16]。

综上所述,虽然利用新生大鼠心肌细胞的体外培养实验研究,已清楚地揭示 Ang II 自分泌/旁分泌在牵拉诱导的心脏肥大中起着重要作用,但仍有许多问题存在。第一,Ang II 是否在不同年龄与种系的个体中以及在体的心脏中都是机械刺激诱导肥大反应的主要介导者;第二,需确定引起生长因子分泌的起始感受机制,以及确定 Ang II 非依赖机制及其在肥大反应中的作用;第三,虽然已证实心脏中有血管紧张素原、肾素和血管紧张素转化酶的 mRNA 存在,但 mRNA 表达量却相当低。所以,心脏局部 RAS 与循环 RAS 的相对作用仍需认真评估;第四,牵拉心肌细胞诱导的 Ang II 生成与贮藏过程仍需进一步阐明。解决上述问题,对防治心脏肥大与衰竭将有重要意义。

参考文献

- 1 Matsuda N, Hagiwara N, Shoda M, et al. Enhancement of the L-type Ca²⁺ current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocyte. *Circ Res*, 1996, **78**(4): 650-659
- 2 Sasaki N, Mitsuiye T, Wang Z, et al. Increase of the delayed rectifier K⁺ and Na(+)-K⁺ pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ Res*, 1994, **75**(5): 887-895
- 3 Awayda MS, Ismailov II, Berdiev BK, et al. A cloned renal epithelial Na⁺ channel protein displays stretch activation in planar lipid bilayers. *Am J Physiol*, 1995, **268** (6Pt1): C1450-459
- 4 Ordway RW, Petrou S, Kirber MT, et al. Stretch activation of a toad smooth muscle K⁺ channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol*, 1995, **484**(Pt2): 331-337
- 5 Simpson DG, Terracio L, Terracio M, et al. Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1994, **161**(1): 89-105
- 6 Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, et al. Tumor necrosis factor- α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*, 1997, **95** (5): 1 247-252
- 7 Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, et al. Tyrosine Kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. *EMBO J*, 1996, **15**(20): 5 535-546
- 8 Liu M, Qin Y, Liu J, et al. Mechanical strain induces pp60src activation and translocation to cytoskeleton in fetal rat lung cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**(12): 7 066-71
- 9 Hamasaki K, Mimura T, Furuya H, et al. Stretching mesangial cells stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase pp125FAK. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **212** (2): 544-549
- 10 Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 1995, **96**(1): 438-446

- 11 Thorburn J, Frost JA, Thorburn A. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *J Cell Biol*, 1994, **126**(6): 1 565-572
- 12 Wada H, Ivester CT, Carabello BA, et al. Translational initiation factor eIF-4E; a link between cardiac load and protein synthesis. *J Biol Chem*, 1996, **271**(14): 8 359-364
- 13 Lin C, Baker KM, Thekkumkara TJ, et al. Sensitive bioassay for the detection and quantification of angiotensin II in tissue culture medium. *Biotechniques*, 1995, **18** (6): 1 014-20
- 14 Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 1995, **77**(2): 258-265
- 15 Persson K, Sando JJ, Tuttle JB, et al. Protein kinase C in cyclic stretch-induced nerve growth factor production by urinary tract smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1995, **269** (4 Pt 1): C1018-24
- 16 Kaye D, Pimental D, Prasad S, et al. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. *J Clin Invest*, 1996, **97**(2): 281-291
- 17 Fischer TA, McNeil PL, Khakee R, et al. Cardiac myocyte membrane wounding in the abruptly pressure-overloaded rat heart under high wall stress. *Hypertension*, 1997, **30** (5): 1 041-46
- 18 Shyu KG, Chen JJ, Shih NL, et al. Angiotensinogen gene expression is induced by cyclical mechanical stretch in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **211** (1): 241-248
- 19 Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, et al. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiomyocytes: the critical role of Ca²⁺-dependent signaling. *Circ Res*, 1995, **76**(1): 1-15
- 20 Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 1996, **271**(6): 3 221-228
- 21 Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, et al. Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation*, 1998, **97** (15): 1 488-495

(此文1998-08-27收到, 1999-01-25修回)

(此文编辑 文玉珊)