

[文章编号] 1007-3949(2015)23-02-0109-07

· 专家论坛 ·

PLN 蛋白复合物调控心脏泵功能研究概论及前景展望

赵文，石晓静，王慧敏，耿雪鹏

(郑州大学药学院，河南省郑州市 450001)

[专家简介] 赵文，1968年2月生，现任郑州大学药学院教授，博士研究生和硕士研究生导师，主要研究方向为心血管和肿瘤病理生理学、药理学以及新药研发。于1996年至1999年在北京医科大学心血管所攻读并获得博士学位，后赴美国辛辛那提大学医学院药理系进行博士后研究，指导教授为国际著名心血管专家 Evangelia G. Kranias 博士，期间作为主要工作者(key person)直接参与并完成了数项美国国家健康医学研究所(NIH)的心血管重大基础研究项目，曾先后发表高水平SCI收录研究论文20余篇，发表SCI收录会议论文摘要30余篇，并多次获得国际著名心血管会议论文摘要奖，包括国际心脏研究会世界大会的论文摘要展出大奖，美国心脏学会的论文摘要大奖，美国心力衰竭病学会的 Jay N. Cohn 青年科学家大奖。于2011年7月起以郑州大学海外引进人才到郑州大学工作并任药学院临床药学系教授，目前主持国家自然科学基金面上项目两项，教育部博士学科点基金一项，以主要参与人参与国家自然科学基金重点项目一项，并兼任中国病理生理学会(CAP)心血管专业委员会及国际心脏研究会(IHRS)中国分会全国委员，中华医学学会心血管专业委员会基础学组全国委员，河南省药理学会常务理事，郑州大学药学院教授委员会副主任委员及郑州大学药物关键制备技术教育部重点实验室副主任等。E-mail为zhaowen100@139.com。



[关键词] 肌浆网； PLN； SERCA2a； PLN 调控复合物

[摘要] 肌浆网(SR)钙转运功能障碍为目前公认的人和动物实验性心力衰竭的主要病理特征，SR钙转运受多个蛋白复合物的调控，包括：蛋白激酶及蛋白磷酸化酶以及一些与之相互结合的蛋白和调控亚基，这些蛋白共同作用精细调节肌浆网的钙转运。其中，SR钙摄入受SR Ca-ATPase(SERCA2a)及其磷酸化调控蛋白phospholamban(PLN)的调控，近年来研究显示：除SERCA2a和PLN之外机体内还存在其它与PLN相关的调控SR钙转运的因子，主要包括：蛋白磷酸化酶1抑制因子、热休克蛋白20(HSP20)和HS相关蛋白X-1(HAX-1)等，这些蛋白质与PLN之间存在直接或间接的相互作用通过蛋白复合物的形式精细调控SR的钙摄入、贮存和释放。值得一提的是，PLN/SERCA2a及其相关复合物不仅可调控心肌收缩功能，还可调控动物生存率及心肌重塑；人体研究发现上述SR相关蛋白的基因突变及活性改变也可导致心肌收缩功能抑制以及心室重塑，预期这些遗传学方面的改变可作为心脏病理生理的预后和诊断标志物。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Modulation of PLN Complex on Cardiac Pump Function and Perspectives

ZHAO Wen, SHI Xiao-Jing, WANG Hui-Min, and GENG Xue-Peng

(School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Avenue, Zhengzhou, Henan 450001, China)

[KEY WORDS] Sarcoplasmic Reticulum； PLN； SERCA2a； PLN Interacting Complex

[ABSTRACT] The major cause of human and experimental heart failure is related to the deregulated sarcoplasmic reticulum (SR) calcium cycling, controlled by several protein complexes. Those complexes, including protein kinase, protein phosphatase and some interacting proteins or subunits, work together to maintain normal cytosolic calcium homeostasis. Among them, SR calcium transport is regulated by SR calcium ATPase and the phosphorylated protein: phospholamban (PLN). Recently, some other proteins, such as: protein phosphatase 1 inhibitor 1, heat shock protein 20 (HSP20) and HS-associated protein X-1 (HAX-1) have been reported to play an important role in SR calcium handing as well as cardiac function. This review will focus on the recent findings in these PLN interacting complex and their contribution in cardiac

[收稿日期] 2014-11-30

[修回日期] 2014-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金(81270270, 81470524)；教育部博士学科点博导专项基金(20134101110013)；2013 河南省教育厅科技创新人才基金(13HASTIT029)；2013 年郑州大学优秀博士学位论文培育基金资助

pump function as well as the potential clinical application.

心血管疾病尤其是心力衰竭的发病率和死亡率在全球范围内仍高居首位,且呈逐年上升的倾向,其中肌浆网钙循环功能紊乱在心衰的发病中起重要作用,肌浆网通过调节心肌细胞胞浆钙离子浓度调控心肌细胞的每一次收缩和舒张,钙离子也可作为完整信号分子参与心肌细胞的其它功能,包括调控细胞的存活和死亡。

心肌细胞胞浆内钙离子浓度由进出胞浆的钙离子量的动态平衡维持,受细胞膜及肌浆网上多种蛋白共同调控,其中SERCA2a可将钙离子从胞浆摄入肌浆网内,SERCA2a活性受PLN的可逆性调控,PLN是一个由52个氨基酸组成的磷酸化蛋白^[1],去磷酸化的PLN可与SERCA2a相互作用并抑制此钙泵的活性, β 肾上腺素能刺激导致的PKA和CaMKII对PLN的磷酸化可释放这一抑制作用,从而增强心肌收缩力;另一方面,蛋白磷酸化酶1(PP1)可去除PLN的磷酸化并将心肌收缩功能恢复至基础状态^[2,3]。PP1活性受到两个PKA磷酸化蛋白,即PP1抑制因子1(I-1)和热休克蛋白20(HSP20)的调控, β 肾上腺素能刺激所致的I-1和HSP20的磷酸化可增强其对PP1的抑制活性,从而增强PKA磷酸化对心肌收缩功能的放大作用。

最近的研究表明:心肌细胞内存在另外两个调控肌浆网钙转运的因子,即:(1)抗凋亡蛋白HS-1相关蛋白X-1(HAX-1),可与PLN相互作用调控肌浆网的钙循环及心肌收缩力^[4];(2)肌浆网内富含组氨酸的钙结合蛋白(HRC),可以与SERCA2a和Ryr钙释放复合物相互作用^[5],以调控肌浆网钙释放和钙摄入^[6]。因此,SR钙转运调控因子包括:I-1/PP1/HSP20,PP1/PLN^[7],以及HAX-1/PLN/SERCA2a/HRC调控复合物等(图1),本文将对这些调控复合物的研究进展进行综述和讨论。

1 肌浆网钙ATP酶(SERCA)

SERCA是存在于肌浆网的跨膜蛋白家族,分子量约110 kDa,在人和哺乳动物中其序列高度保守。其中SERCA2a主要表达于心肌组织,调节肌浆网钙摄取并诱导肌肉舒张。在人和小鼠的心衰心肌组织中,SERCA2a的表达量和活性均显著下降且与肌浆网钙循环功能抑制直接相关。SERCA2a过表达及SERCA2a表达下调动物模型已证实SERCA2a表达水平改变对心功能的重要调控作用。在

基础条件下和心脏压力负荷增加情况下,SERCA2a过表达均可导致心肌收缩力显著增强,同时并不增加动物死亡率。另一方面,SERCA2a基因敲除导致早期胚胎死亡,但杂合子小鼠能够存活,心肌收缩抑制但未见明显心脏病表型特征^[8]。

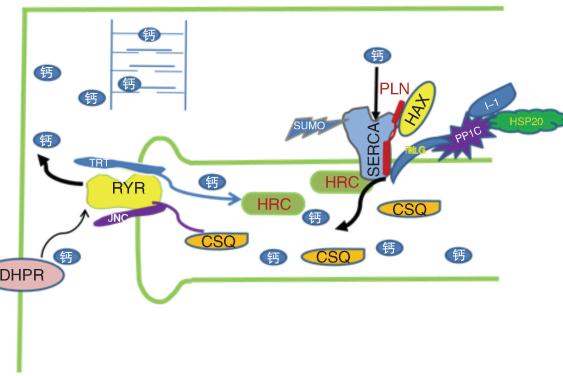


图1. 心肌细胞PLN/SERCA2a相互作用蛋白复合体模式图

Figure 1. Scheme of PLN/SERCA2a intercome in cardiomyocytes

SERCA2a基因敲除纯合子会导致胚胎早期死亡,因此,为了观察SERCA2a表达下调对心功能的影响,研究人员构建了SERCA2a心肌特异性敲除动物模型,发现在诱导成年小鼠SERCA2a心肌特异性表达下调4周之后,其心功能仅轻微下降,表明肌浆网钙循环机制的单纯改变可代偿SERCA2a表达水平下降对心功能的影响。但在诱导SERCA2a心肌特异性表达下调7~10周之后,小鼠出现心肌舒张功能明显障碍,并且死于心力衰竭。最近,Heini等^[9]利用SERCA2a心肌特异性表达下调小鼠模型进行离体心脏灌流研究,发现在诱导SERCA2a表达下调一周之后,SERCA2a蛋白水平下降至对照组的32%,但其心功能仍然正常。因此推测成年小鼠的心功能,可在心肌SERCA2a蛋白水平下调之后的一定时间内保持正常。尽管目前还不清楚其作用机制,但推测在SERCA2a心肌特异性表达下调小鼠模型中,L型钙通道、Na/Ca交换通道、质膜钙泵的表达水平以及活性的适度提高,同时伴随血清中去甲肾上腺素的水平提高,可共同发挥作用以代偿性增强心肌细胞膜的钙转运功能,从而在SERCA2a蛋白诱导下调之后的一定时间内使心功能得以维持正常。

在衰竭心肌中,肌浆网钙循环功能紊乱与SERCA2a表达下调以及去磷酸化的PLN对其抑制作用

增强有关^[1, 10]。因此, 腺病毒介导的 SERCA2a 瞬时过表达, 可增强衰竭动物的整体心脏和心肌细胞的收缩功能。在小动物或大动物心衰模型中应用腺病毒载体介导 SERCA2a 过表达, 已经预期可作为一个较好的靶向心衰治疗方法。事实上, CUPID 临床实验(第一次进行的 SERCA2a 基因治疗临床实验), 选取了 39 名 NYHA 诊断Ⅲ-Ⅳ 级心力衰竭的病人, 取得了令人可喜的成绩。与安慰剂组相比, 接受腺病毒载体介导 SERCA2a 基因治疗的病人, 其心功能分级有所改善或者趋于稳定, 最大耗氧量($VO_{2\text{ max}}$), 心脏应力测试, NT-proBNP 水平, 左心室收缩期末容积等指标均有所改善。另外, 心血管功能异常、心律失常事件的发生率并未增多, 住院周期有所降低^[11]。这些心衰病人在接受基因治疗后的第 3 年, SERCA2a 依然能够高表达, 并持续改善心功能^[12]。因此认为, 腺病毒载体介导 SERCA2a 基因治疗, 是一种安全有效的治疗心衰的方法。尽管, CUPID 实验证明在心衰的发病机理方面, SERCA2a 是一个非常关键的靶点, 但是依然需要做大量的实验来建立起腺病毒载体介导 SERCA2a 基因治疗晚期心衰的理念。该方法目前已经进入Ⅲ 期临床实验, 约有 250 例患者参与。

已经证明, 翻译后 SERCA2a 需经过小分子泛素样蛋白(SUMO-1)修饰, 改善其稳定性和活性^[13]。心衰时, SERCA2a 的蛋白水平和 SUMO-1 水平都下降。使用 shRNA 抑制 SUMO-1 表达, 会加剧心功能恶化;而在小动物心衰模型中, 使用腺病毒介导 SUMO 过表达, 其结果与介导 SERCA2a 基因治疗相似, 可改善心功能, 增加存活率^[13]。相反, 使用 shRNA 抑制 SERCA2a 表达会导致心衰加重, 利用腺病毒介导 SUMO 过表达将不能逆转心功能的降低^[13]。

在小鼠心衰模型中转基因实验结果, 提示在猪心衰模型中进一步进行 SUMO 转基因实验研究的必要性^[14]。与对照组相比, 腺病毒介导 SUMO 转基因治疗, 可显著改善心功能, 抑制左心室容积扩增。这些发现提示进一步进行转基因临床实验的必要性, 包括:单独进行腺病毒介导 SUMO 转基因实验, 或者联合 SERCA2a 一起进行转基因临床实验。

2 PLN 可逆性调节 SERCA2a 的活性和心功能

心肌组织中 SERCA2a 的活性受 PLN 的调节, PLN 是一个由 52 个氨基酸组成的磷酸化蛋白, PKA 和 CAMK II 可使其在 Ser16 和 Thr17 发生磷酸化, 蛋

白磷酸化酶 1(PP1)使其去磷酸化。PLN 的磷酸化水平进而影响 SERCA2a 的活性和心肌收缩功能。PLN 以单体和五聚体两种状态存在。图 2 中, 形象地描述了 PLN 对 SERCA2a 的抑制作用, PLN 单体能够抑制 SERCA2a 的活性, PLN 五聚体对 SERCA2a 的抑制活性降低(图 2)。PLN 磷酸化, 不仅能阻断其与 SERCA2a 的结合, 也可增加五聚体的稳定性。最近一些研究对这种传统的看法提出了质疑, 认为磷酸化 PLN 能够增加五聚体的稳定性, 同时磷酸化 PLN 的单体依然与 SERCA2a 具有微弱地相互作用^[15]。另外, X-射线晶体衍射研究表明, PLN 五聚体依然能与 SERCA2a 相互结合^[16]。

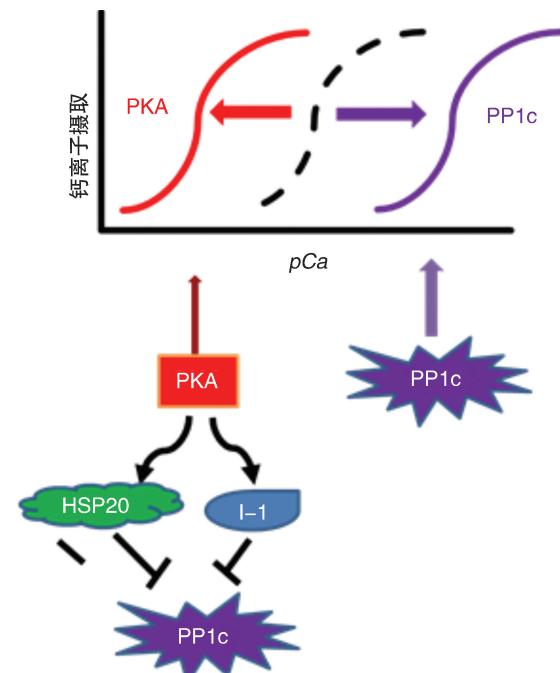


图 2. 蛋白激酶 A(PKA)通过调控 PLN 磷酸化对心肌收缩的调控作用 PLN 磷酸化可增加 SERCA2a 对钙离子的亲和力, PLN 主要通过以下途径磷酸化:(1)PKA 对 PLN 的直接磷酸化作用;(2)PKA 对 I-1 和 HSP20 的磷酸化作用, 抑制 PP1 的活性, 进而增加 PLN 的磷酸化;PP1c 对 PLN 去磷酸化作用可降低 SERCA2a 对钙离子的亲和力。PKA 和 PP1 对 PLN 磷酸化的动态调控可导致 SERCA2a 对钙离子的亲和曲线左移和右移。

Figure 2. Regulation of protein kinase A on PLN phosphorylation and cardiac contractility

通过构建转基因动物模型并对这些动物的心脏表型进行分析, Kranias 和她实验室的工作已经系统阐明 PLN 在心功能方面的调节作用。PLN 心肌特异性过表达, 能抑制肌浆网钙摄取, 钙负荷和心肌收缩力, 异丙肾上腺素刺激和 PLN 磷酸化减弱这种抑制

作用。PLN 基因敲除可显著增加钙循环和心肌收缩功能,其机制与肌浆网 SERCA2a 对钙离子亲和力增加有关。另外,研究发现,PLN 基因敲除小鼠心功能增强不会随年龄的变化而变化,也未见明显心肌重塑,提示 PLN 很可能成为心脏病治疗的重要靶点。

另外,在亚细胞水平、细胞水平、器官水平和整体动物水平,对野生型、杂合子型以及纯合子型 PLN-KO 小鼠进行分析,结果表明:PLN 表达水平与 SERCA2a 对钙离子亲和力直接相关,也与心肌细胞、离体心脏、在体心脏的收缩和舒张功能相关^[17]。这些结果表明,PLN 水平对肌浆网和心脏的收缩功能均起关键调节作用。事实上,PLN 无论是在分离的心肌细胞中的瞬时过表达,还是在转基因动物中心肌特异性长期过表达,都能显著抑制 SERCA2a 的活性和胞内钙离子循环,降低收缩指标功能^[18](图 3)。因此,内源性 PLN 水平的提高,不足以在功能上充分地抑制 SERCA2a 的活性。另一方面,从人的衰竭心脏分离得到的心肌细胞,抑制 PLN 水平,可改善肌浆网钙运输,心肌细胞钙循环和收缩功能。总结这些发现,得出如下结论:(1) PLN 对 SERCA2a 活性起到重要的调节作用;(2) PLN/SERCA2a 的比值,对心肌收缩功能起决定性作用;(3)还存在着其他的不被 PLN 抑制的 SERCA2a。

最近几年的研究还发现,人类 PLN 基因存在自然突变,同时有关 PLN 在调节肌浆网钙转运和兴奋收缩偶联方面的重要作用在这些人体突变研究中得到了进一步的验证。一些心衰病人的 PLN 编码区会出现自然突变。PLN R9C 突变导致内源性 PLN 磷酸化水平下降,进而长期抑制 SERCA2a 活性,最终导致扩张型心肌病(DCM)的产生。R9C 杂合子携带者在很年轻时即会死亡。奇怪的是,在这些 DCM 病人中,并未检测到 R9C 纯合子。另一人类 PLN 突变体(T116G)形成一个终止密码子(L39stop),其纯合子携带者在幼年期可致死亡。然而其杂合子携带者表现出无症状型心肌肥大,心功能也无改变。第三个突变是 PLN 第 14 位氨基酸缺失,其杂合子携带者会发展成左心室扩张,心功能下降和室性心律失常,并且在中年期死亡。有意思的是,荷兰约 15% 的 DCM 患者和 12% 的 ARVC 患者检测出了这一 PLN 突变^[19]。在小鼠转基因模型中进一步研究显示,含第十四位氨基酸缺失的 PLN 过表达,会过度抑制 SERCA2a 活性,出现早期的心脏病变和死亡。然而,在 WT-PLN 缺失的动物模型中,引入该 PLN 突变基因的过表达会导致其错误地

定位于肌纤维膜,并导致心脏重构^[20]。另外,在心衰病人中,发现 PLN 的 Arg9 出现 2 个基因多态性突变,即 R9L 和 R9H^[21]。因此,PLN 在编码区出现的这些突变会导致扩张型心肌病的倾向和猝死。另外,在 PLN 启动子区域也发现了一些突变,这些突变与 PLN 转录活性调节相关,可能会导致 PLN 表达水平的改变^[22]、心脏重构或心肌病的产生。

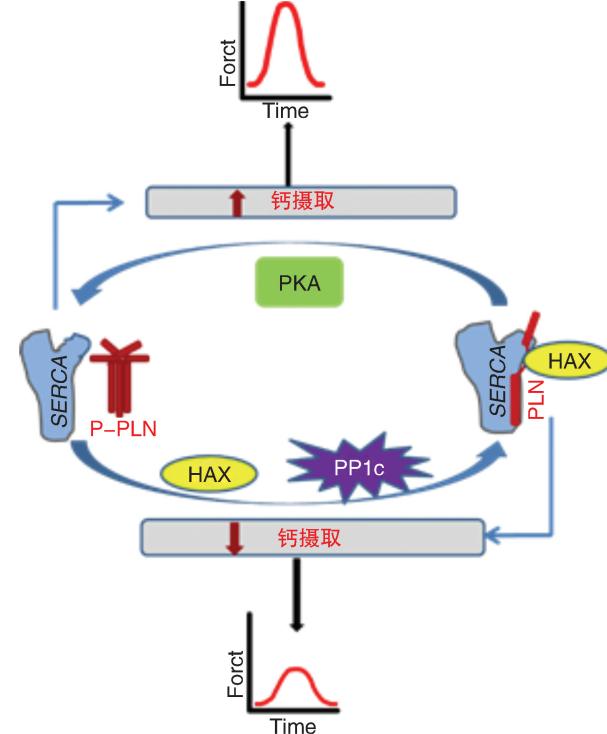


图 3. PLN 对 SERCA2a 的活性调控 PLN 以单体和五聚体形式存的。去磷酸化形式的 PLN 单体是对 SERCA2a 具有抑制作用的活性形式,五聚体形式的 PLN 可能仍然与 SERCA2a 相互作用,但不抑制其活性。单体形式 PLN 可降低 SERCA2a 对钙离子的亲和力,降低心肌收缩力,PLN 磷酸化可促进五聚体形式的 PLN 形成,释放其对 SERCA2a 的抑制作用,并导致肌浆网钙转运和心肌收缩力增强。HAX-1 和 PP1c 可增加 PLN 单体从而抑制心肌收缩功能。

Figure 3. Activity regulation of PLN on SERCA2a

3 抗凋亡蛋白 HAX-1 作为心脏收缩功能的调节因子

起初认为 HAX-1 (HS-1 相关蛋白-1) 仅存在于线粒体,最近研究发现 HAX-1 可与 PLN 结合^[23]。大量的生物化学实验结果显示:HAX-1 的 203-245 位氨基酸残基与 PLN 的 16-22 位氨基酸残基是两者相互作用的结构域,同时研究还发现:PLN 的磷酸化或 Ca²⁺ 的浓度增加将导致 HAX-1 与 PLN 结合

的解离,在培养的 HEK293(人胚胎肾)细胞中发现,HAX-1 存在于线粒体中,但是,当与 PLN 共表达时,HAX-1 将与 PLN 共同定位于内质网。

HAX-1 心肌特异性过表达可明显增加 PLN 单体的量,抑制 SERCA2a 的活性,进而抑制肌浆网 Ca 动力学和心肌的收缩功能。然而,异丙肾上腺素刺激所致的 PLN 磷酸化可促进 HAX-1 与 PLN 的解离,HAX-1 对 PLN 的抑制作用将被解除。已经证实 HAX-1 基因敲除导致严重的神经萎缩,罕见的免疫缺陷性疾病:中性粒细胞减少症。在小鼠体内,HAX-1 蛋白表达的缺失导致神经细胞发生退行性变,进而导致小鼠的寿命缩短。以往的研究还发现,HAX-1 在多种组织内能调控细胞存活,最近体内和体外研究发现,心肌缺血再灌后,HAX-1 心肌特异性过表达能够减少心肌梗死面积,明显改善心功能^[24]。HAX-1 通过与 Hsp90 形成复合物,发挥心肌保护效应,减少在内质网应激时由 IRE-1 信号通路引起的细胞死亡。在内质网应激和心肌细胞内 Ca²⁺ 浓度调控方面,HAX-1 会招募 Hsp90 到 PLN/SERCA2a 复合物上,形成一个功能性耦合物。值得注意的是,HAX-1 并不抑制内质网应激中的 PERK 和 ATF-6 这两条通路。因此,HAX-1 主要通过调节内质网应激的 IRE-1 信号通路增加细胞的存活。

4 Inhibitor-1 对心功能的调控作用

PP1 和 PP2 是两个经典的 Ser/Thr 磷酸化酶,其活性与其在细胞内的亚细胞定位及其结构域中与信号大分子形成复合物的亚基部位有关。PP1 通过其 RGL 亚基定位于肌浆网内,并与 PLN 作用易化 PP1 对肌浆网钙转运的调控。在人和实验性心力衰竭模型中 PLN-PP1 的活性均显著增强,从而抑制心功能,并导致心室重构。事实证明,在小鼠体内,心脏特异性过表达 PP1 催化亚基或者 PP1c,可抑制小鼠心功能,并诱导小鼠心脏重构,心衰及早期死亡,这些症状同人类心衰程度相似。因此,PP1 的内源性的抑制剂 I-2 和 I-1 抑制 PP1 的活性,有可能抑制心衰中 PP1 活性,具有较高的临床意义。I-2 最初是从骨骼肌中分离的耐高温的磷酸化酶,I-2 的磷酸化引起自身构象的改变,进而激活 PP1c/I-2 复合物。在转基因小鼠体内已经证实,I-2 能增加钙离子的转运,从而增强心肌的收缩功能。结果显示,将 I-2 基因转入到心衰小鼠中,将会阻止心衰的进一步恶化,延长存活时间。此外,增加 I-1 的活性显示出对心衰的治疗作用。PKA 可使 I-1 35 位的 Thr 磷酸

化,调控 I-1 的活性,进而抑制 PP1 活性,并增加 PLN 的磷酸化。PP2B(钙调神经磷酸酶)T35 位的去磷酸化,PKC 磷酸化 I-1 的 S67 和 T75,都会使 I-1 失活^[25]。

I-1 在心功能方面的调控作用已经通过多种转基因小鼠模型阐明。I-1 基因敲除的小鼠显示 PP1 活性增加,在基础状态下,心功能抑制,β 肾上腺素刺激效应减弱。这些效应主要与 PLN S16 和 T17 的磷酸化水平降低有关。I-1 1-65 位氨基酸主干的过表达以及 I-1 T35D 主干(I-1c)过表达均伴随 PP1 活性抑制以及 PLN Ser16 和 Thr17 位磷酸化水平的升高,同时还伴随主动脉缩窄所致的心肌肥厚反应的减弱,并延缓由此所致的心衰的进程^[26]。另外,诱导 I-1 在成年大鼠心肌特异性的过表达,也可导致心肌收缩功能增强,以及 PLN 的磷酸化水平升高。在一些应激状态下(包括跨主动脉缩窄、在体缺血再灌注损伤、长期慢性的 β 肾上腺素刺激),无论是普通的 I-1 过表达还是诱导型 I-1c 的过表达均可导致 PLN 的磷酸化水平升高,肌浆网钙离子的转运增加^[2, 26]。进而增加心脏对肥厚性刺激的适应能力,延缓心肌肥厚恶化至心衰的进程,在应激状态下促进细胞存活。因此,以 I-1c 为靶点的治疗可通过调控与 PLN 偶联的 PP1 的活性来削弱心衰的不良后果。

最近的研究表明通过诱导 I-1 在成年小鼠心肌特异性过表达以增加 I-1 的活性,能够长期(长达 20 个月)维持 PLN 的高磷酸化水平,并不伴随心肌的重构和动物寿命的缩短^[27]。另外,以腺病毒 AAV-9 为载体的基因转染实验表明,在心衰大鼠的心肌内长期过表达 I-1c,可维持 PLN 磷酸化状态,增加心肌的收缩力,降低心肌重构^[27]。这些发现为由心梗诱导的犬心衰模型的基因转染研究提供了理论基础。冠状动脉内注射 AAV9. I-1c,会阻止心衰心脏的心功能的进一步恶化,减少心肌梗死面积^[28]。这些研究表明通过激活 I-1 进而抑制 PP1 的激活,将有望改善血流动力学和心肌重构。另外,一种病人的 I-1 基因多态性可导致心肌细胞对 β 肾上腺素刺激的反应减弱,对这些病人的心衰发病应用 I-1 治疗是有益的。

5 HSP20 在肌浆网钙循环中的作用

热休克蛋白(HSP)可在多种应激条件下增强细胞的生存,它是与 β 肾上腺素刺激后短期正性肌力和长期的不良反应相关的一个磷酸化蛋白,由小鼠

左心室心肌细胞中分离并克隆出来 HSP20。β受体激动剂刺激心肌细胞可引起 HSP20 特异性表达和磷酸化水平升高。HSP20 的分子量约为 17kDa, 是一类分子伴侣蛋白, 属于小分子热休克蛋白家族成员, 包含至少 10 个不同的蛋白, 在应激条件下该家族成员瞬时增加并增强细胞的生存。HSP20 是唯一的一个可以在 Ser16 位点被 PKA/PKG 双激酶磷酸化的小分子热休克蛋白^[29, 30]。HSP20 虽然在不同的组织中都有表达, 但主要分布在平滑肌, 骨骼肌和心肌。在平滑肌中 HSP20 介导舒张, 其在骨骼肌的作用尚不清楚^[31]。

研究表明在分离的心肌细胞中瞬时增加 HSP20 的表达或者增强 HSP20 的活性导致收缩和钙瞬变的增强。在整体动物水平, HSP20 心肌特异性过表达可明显增强心脏收缩功能和心肌细胞钙动力学。反义 RNA 或者 microRNA-320 下调 HSP20 导致收缩功能障碍。HSP20 导致的钙循环增加与蛋白磷酸化酶 1 (PP1) 的抑制, 从而特异性的增加 PLN 的磷酸化, 最终对 SERCA2a 的抑制作用降低有关^[32]。小鼠非磷酸化 PLN (S16A/T17A) 过表达可抵消由腺病毒介导的心肌细胞 HSP20 过表达所诱导的心肌收缩功能的升高, 证实 HSP20 的正性肌力作用依赖 PP1/PLN 相互作用。HSP20 对 PP1 的抑制作用与这两种蛋白的直接物理结合相关。此外, HSP20 防止 β受体激动剂和低氧诱导细胞凋亡^[33], 显示出 HSP20 在心脏中额外的功能。过表达 HSP20 的心脏缺血/再灌注损伤后收缩功能恢复较对照组好, 并且梗死面积也显著降低。缺血/再灌注和心力衰竭时 HSP20 和其磷酸化水平显著升高, 提示心脏负荷状态时的一种代偿反应。HSP20 的突变体 (S16A 突变且不能被磷酸化) 过表达阻断 HSP20 的心肌保护作用, 导致细胞凋亡和梗死面积的增加^[34]。此外, 基因多态性研究发现一个与 HSP20 S16 位的磷酸化降低相关人的 HSP20 突变体形式 (P20L) 能抵消 HSP20 的心脏保护作用。鉴于 HSP20 在心肌收缩和病理状态下的保护作用, 建议在心脏疾病中靶向 HSP20 可能有潜在的双重益处。

综上所述, 从最初小鼠 PLN 基因敲除发现 PLN 对心肌收缩的关键调控作用至今已有 20 余年时间, 早期认为 PLN 作为唯一调控 SERCA2a 活性因素对心肌收缩功能起重要作用, 近年来研究发现一些和 PLN 相互作用的心肌收缩其它调控因子的存在, 包括: HAX-1、RGL、PP1、I-1 和 HSP20。心肌收缩功能的维持需要这些调控因子共同作用进行精细调节, 维持 SR 钙摄入、贮存和释放的动态平衡并调控心

肌细胞的生存和死亡。SR 这些钙调控因子的干扰和破坏, 尤其在各种应急情况下, 将抑制心肌收缩功能并导致心室重构, 因此, 靶向这些蛋白复合物预期将对临床严重威胁患者生命的心血管疾病尤其是心力衰竭起到积极有益的治疗作用。

[参考文献]

- Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome [J]. Circ Res, 2012, 110 (12): 1 646-660.
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, et al. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1 [J]. Circ Res, 2005, 96 (7): 756-766.
- Steenaart NA, Ganim JR, Di Salvo J, et al. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme [J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 293 (1): 17-24.
- Zhao W, Waggoner JR, Zhang ZG, et al. The anti-apoptotic protein HAX-1 is a regulator of cardiac function [J]. Proc Natl Acad Sci US A, 2009, 106 (49): 20 776-781.
- Arvanitis DA, Vafiadaki E, Fan GC, et al. Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293 (3): H1 581-589.
- Park CS, Chen S, Lee H, et al. Targeted ablation of the histidine-rich CaCa⁽²⁺⁾-binding protein (HRC) gene is associated with abnormal SR Ca⁽²⁺⁾-cycling and severe pathology under pressure-overload stress [J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108 (3): 344.
- Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D, et al. Identification of a protein phosphatase-1/phospholamban complex that is regulated by cAMP-dependent phosphorylation [J]. PloS One, 2013, 8 (11): e80867.
- Ji Y, Lalli MJ, Babu GJ, et al. Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (48): 38 073-080.
- Heinis FI, Andersson KB, Christensen G, et al. Prominent heart organ-level performance deficits in a genetic model of targeted severe and progressive SERCA2 deficiency [J]. PloS One, 2013, 8 (11): e79 609.
- Dash R, Frank KF, Carr AN, et al. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33 (7): 1 345-353.
- Jessup M, Greenberg B, Mancini D, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure [J]. Circulation, 2011, 124 (3): 304-313.
- Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality [J]. Circ Res, 2014, 114 (1): 101-108.
- Kho C, Lee A, Jeong D, et al. SUMO1-dependent modulation of SERCA2a in heart failure [J]. Nature, 2011, 477 (7 366): 601-605.
- Tilemann L, Lee A, Ishikawa K, et al. SUMO-1 gene transfer im-

- proves cardiac function in a large-animal model of heart failure [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5 (211) : 211ra159.
- [15] Pallikkuth S, Blackwell DJ, Hu Z, et al. Phosphorylated phospholamban stabilizes a compact conformation of the cardiac calcium-ATPase [J]. *Biophys J*, 2013, 105 (8) : 1812-821.
- [16] Glaves JP, Trieber CA, Ceholski DK, et al. Phosphorylation and mutation of phospholamban alter physical interactions with the sarcoplasmic reticulum calcium pump [J]. *J Mol Biol*, 2011, 405 (3) : 707-723.
- [17] Lorenz JN, Kranias EG. Regulatory effects of phospholamban on cardiac function in intact mice [J]. *Am J physiol*, 1997, 273 (6pt2) : H2 826-831.
- [18] Brittsan AG, Carr AN, Kranias EG. Maximal inhibition of SER-CA2 CaCa⁽²⁺⁾ affinity by phospholamban in transgenic hearts over-expressing a non-phosphorylatable form of phospholamban [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (16) : 12 129-135.
- [19] van der ZwaagPA, van Rijsingen IA, Asimaki A, et al. Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy [J]. *Eur J Heart fail*, 2012, 14 (11) : 1 199-207.
- [20] Haghghi K, Pritchard T, Bossuyt J, et al. The human phospholamban Arg14-deletion mutant localizes to plasma membrane and interacts with the Na/K-ATPase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52 (3) : 773-782.
- [21] Medeiros A, Biagi DG, Sobreira TJ, et al. Mutations in the human phospholamban gene in patients with heart failure [J]. *Am Heart J*, 2011, 162 (6) : 1 088-095.
- [22] Haghghi K, Chen G, Sato Y, et al. A human phospholamban promoter polymorphism in dilated cardiomyopathy alters transcriptional regulation by glucocorticoids [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29 (5) : 640-647.
- [23] Vafiadaki E, Sanoudou D, Arvanitis DA, et al. A. Kontogianni-Konstantopoulos, Phospholamban interacts with HAX-1, a mitochondrial protein with anti-apoptotic function [J]. *J Mol Biol*, 2007 , 367 (1) : 65-79.
- [24] Lam CK, Zhao W, Cai W, et al. Novel role of HAX-1 in ischemic injury protection involvement of heat shock protein 90 [J]. *Circ Res*, 2013 , 112 (1) : 79-89.
- [25] Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, et al. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [J]. 2007, 293 (1) : H762-769.
- [26] Nicolaou P, Rodriguez P, Ren X, et al. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2009 , 104 (8) : 1 012-020.
- [27] Pritchard TJ, Kawase Y, Haghghi K, et al. Active inhibitor-1 maintains protein hyper-phosphorylation in aging hearts and halts remodeling in failing hearts [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12) : e80 717.
- [28] Fish KM, Ladage D, Kawase Y, et al. AAV9. I-1c delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling [J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6 (2) : 310-317.
- [29] Chu G, Egnaczyk GF, Zhao W, et al. Phosphoproteome analysis of cardiomyocytes subjected to beta-adrenergic stimulation: identification and characterization of a cardiac heat shock protein p20 [J]. *Circ Res*, 2004, 94 (2) : 184-193.
- [30] Fan GC, Ren X, Qian J, et al. Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, HSP20, against ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation* , 2005, 111 (14) : 1 792-799.
- [31] Dreiza CM, Komalavilas P, Furnish EJ, et al. The small heat shock protein, HSPB6, in muscle function and disease [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15 (1) : 1-11.
- [32] Qian J, Vafiadaki E, Florea SM, et al. Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling [J]. *Circ Res*, 2011, 108 (12) : 1 429-438.
- [33] Fan GC, Chu G, Kranias EG. HSP20 and its cardioprotection [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15 (4) : 138-141.
- [34] Qian J, Ren X, Wang X, et al. Blockade of HSP20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death [J]. *Circ Res*, 2009, 105 (4) : 1 223-231.

(此文编辑 李小玲)