

内源性二氧化硫抑制血管紧张素 II 致心肌肥厚小鼠 心肌细胞自噬的研究

张璐璐¹, 黄娅茜¹, 唐朝枢², 金红芳¹, 杜军保^{1,2}

(1. 北京大学第一医院儿科, 北京市 100034; 2. 北京大学教育部分子心血管学重点实验室, 北京市 100083)

[关键词] 二氧化硫; 血管紧张素 II; 心肌细胞; 自噬

[摘要] **目的** 探讨内源性二氧化硫(SO₂)对血管紧张素 II(Ang II)致心肌肥厚小鼠心肌细胞自噬的抑制作用。**方法** 9 周龄健康 C57BL 小鼠 16 只,按随机数字表法随机分为野生型对照组(WT Con 组)、野生型+Ang II 组(WT Ang II 组);心肌特异性天冬氨酸氨基转移酶 2(AAT2)转基因小鼠 16 只,按随机数字表法随机分为 AAT2 对照组(AAT2 Con 组)、AAT2+Ang II 组(AAT2 Ang II 组)。每组 8 只。每只小鼠在背部皮下植入预装生理盐水或 Ang II 的胶囊渗透压泵,连续给药 4 周。检测 4 组小鼠全心重/体重(HW/BW)比值;HE 染色观察心肌细胞结构变化;免疫组织化学染色检测心肌标志分子 α -重链肌球蛋白(α -MHC)的表达;高效液相色谱检测心肌组织 SO₂ 含量;Western blot 检测内源性 SO₂ 生成酶 AAT1 和 AAT2、心肌表型标志分子 α -MHC 和 β -MHC 以及心肌自噬标志分子 Beclin-1、LC3、Atg4B 以及 p62 蛋白表达变化。**结果** 与 WT Con 组相比,WT Ang II 组心肌组织 SO₂ 含量显著降低($P<0.01$),AAT1 蛋白表达无明显变化($P>0.05$),AAT2 蛋白表达显著减少($P<0.05$),HW/BW 明显增加($P<0.01$),心肌纤维明显增粗,免疫组织化学法显示心肌细胞浆中 α -MHC 蛋白表达明显减弱,Western blot 结果显示心肌细胞 α -MHC 蛋白表达显著降低($P<0.01$), β -MHC 蛋白表达显著升高($P<0.01$),心肌组织 LC3 II/LC3 I 比值显著升高,Beclin-1 和 Atg4B 蛋白表达显著升高,p62 蛋白表达显著降低(均 $P<0.01$)。与 WT Con 组相比,AAT2 Ang II 组小鼠心肌组织 SO₂ 含量和 AAT2 蛋白表达显著升高($P<0.01$),AAT1 的蛋白表达无显著变化($P>0.05$),HW/BW 显著降低($P<0.05$),心肌纤维的增粗显著减轻, α -MHC 蛋白向 β -MHC 蛋白的转化显著降低($P<0.01$),心肌细胞自噬水平显著降低。**结论** 内源性 SO₂/AAT2 体系可抑制 Ang II 致小鼠心肌肥厚及心肌细胞自噬。

[中图分类号] R725.4

[文献标识码] A

Endogenous sulfur dioxide inhibits cardiomyocyte autophagy in mice with myocardial hypertrophy induced by angiotensin II

ZHANG Lu-Lu¹, HUANG Ya-Qian¹, TANG Chao-Shu², JIN Hong-Fang¹, DU Jun-Bao^{1,2}

(1. Department of Pediatrics, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China; 2. Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Science, Ministry of Education, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Sulfur dioxide; Angiotensin II; Cardiomyocyte; Autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of endogenous sulfur dioxide (SO₂) in inhibiting cardiomyocyte autophagy in angiotensin II (Ang II)-induced myocardial hypertrophic mice. **Methods** 16 healthy 9-week-old C57BL mice were randomly divided into wild type control group (WT Con group) and wild type+Ang II group (WT Ang II group); 16 cardiac-specific aspartate aminotransferase 2 (AAT2) transgenic mice were randomly divided into AAT2 control group (AAT2 Con group) and AAT2+Ang II group (AAT2 Ang II group); 8 mice in each group. The mouse was subcutaneously implanted with a capsule osmotic pressure pump pre-filled with normal saline or Ang II in the back for continuous administration for 4 weeks. Total heart weight/body weight (HW/BW) ratio was detected in 4 groups of mice. HE staining was used to observe the changes of myocardial cell structure. The expression of α -myosin heavy chain (α -MHC) was detected by immunohistochemistry staining. The content of SO₂ in myocardial tissue was detected by high performance liquid

[收稿日期] 2018-04-13

[修回日期] 2018-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81622004);北京自然科学基金项目(7171010、7182168);全国青年拔尖人才支持计划项目

[作者简介] 张璐璐,硕士研究生,主要研究方向为气体信号分子与心血管疾病,E-mail 为 lulubjmu1915@163.com。通讯作者杜军保,教授,博士研究生导师,主要研究方向为气体信号分子与心血管疾病,E-mail 为 junbaodu1@126.com。

chromatography. Western blot was used to detect the expressions of endogenous SO_2 producing enzymes AAT1 and AAT2, cardiomyocyte phenotypic markers α -MHC and β -MHC as well as myocardial autophagy indicators Beclin-1, LC3, Atg4B and p62. **Results** Compared with WT Con group, the SO_2 content was significantly reduced ($P < 0.01$) but the expression of AAT1 protein had no obvious changes ($P > 0.05$), the expression of AAT2 protein was significantly decreased ($P < 0.05$), in the myocardial tissue of the mice in WT Ang II group; HW/BW was increased significantly ($P < 0.01$), and myocardial fibers were thickened; Immunohistochemistry showed that the expression of α -MHC protein was decreased in cardiomyocyte cytoplasm; Western blot results showed that the expression of α -MHC protein in cardiomyocytes was significantly decreased ($P < 0.01$), the expression of β -MHC protein was significantly increased ($P < 0.01$), and cardiomyocyte autophagy was significantly increased which was demonstrated by the fact that the ratio of LC3 II/LC3 I was significantly increased, the expressions of Beclin-1 and Atg4B protein were significantly increased, and the expression of p62 protein was significantly reduced (all $P < 0.01$). However, compared with WT Con group, the SO_2 content and AAT2 protein expression in AAT2 Ang II group were significantly increased ($P < 0.01$), AAT1 protein expression did not significantly change ($P > 0.05$), and the HW/BW ratio was significantly decreased ($P < 0.05$); The thickness of myocardial fibers was significantly reversed; The conversion of α -MHC protein to β -MHC protein was significantly reduced ($P < 0.01$), and the level of autophagy was significantly reduced in cardiomyocytes. **Conclusion** Endogenous SO_2 /AAT2 system can inhibit the cardiomyocyte autophagy and myocardial hypertrophy in the Ang II-treated mice.

心肌肥厚是多种心血管疾病所普遍存在的病理改变^[1],但是心肌肥厚的病理机制十分复杂。以往研究发现,内皮素、钙调蛋白、microRNA 等众多介质通过影响基因转录、钙处理、蛋白质合成、自噬、氧化应激以及炎症等参与心肌肥厚的发生^[2-3]。但是,心肌肥厚的发病机制至今仍未完全明确。自噬是进化上高度保守的细胞降解代谢的过程,自噬在心肌细胞中持续存在;在正常的心肌细胞中,自噬途径可以降解老化或者异常的细胞器或蛋白,完成心肌细胞的自我更新,并为细胞代谢提供能量,但是过度的自噬反而对心肌细胞造成损伤^[4]。研究发现,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 可促进心肌细胞自噬,诱导心肌肥大^[5]。本课题组前期研究发现,心血管系统中内源性二氧化硫 (sulphur dioxide, SO_2) 可经天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AAT) 代谢产生, AAT 是内源性生成 SO_2 的关键酶,有两种同工酶 AAT1 和 AAT2, AAT1 主要分布在细胞质中, AAT2 主要分布在线粒体中。内源性产生的 SO_2 在心肌损伤、血管重构中发挥重要的病理生理学调节作用^[6]。前期研究发现在 Ang II 诱导心肌肥厚小鼠中,心肌组织内源性 SO_2 /AAT2 体系显著下调^[7]。本研究采用心肌特异性 AAT2 转基因小鼠,研究内源性 SO_2 对 Ang II 诱导心肌细胞自噬的作用,以期深化内源性 SO_2 抑制心肌肥厚的心脏保护机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

9 周龄雄性健康 SPF 级 C57BL 野生型小鼠 16

只和 9 周龄雄性健康 SPF 级心肌特异性 AAT2 转基因小鼠 16 只。按随机数表法随机将野生型小鼠分为 2 组:(1)野生型对照组 (WT Con 组);(2)野生型 + Ang II 组 (WT Ang II 组)。将心肌特异性 AAT2 转基因小鼠分为 2 组:(1)AAT2 对照组 (AAT2 Con 组);(2)AAT2 + Ang II 组 (AAT2 Ang II 组)。每组 8 只小鼠。WT Con 组和 AAT2 Con 组小鼠背部皮下植入预装生理盐水的胶囊渗透压泵, WT Ang II 组和 AAT2 Ang II 组小鼠背部皮下植入预装 1440 ng/(kg · min) 的 Ang II 胶囊渗透压泵^[8],常规饲养,4 周后取材。4 组小鼠均为 SPF 级常规饲养,动物实验获得北京大学第一医院动物伦理委员会批准 (伦理批准号:J201713),严格按照北京大学动物伦理有关规定进行。胶囊渗透压泵购于美国 Alzet 公司 (型号:MODEL 2004), Ang II 购于美国 Phoenix 公司。

1.2 实验动物标本的留取与处理

小鼠背部皮下植入微量渗透泵给药 4 周后,脱颈处死,迅速打开胸腔,取出心脏,用生理盐水将血冲洗干净,滤纸吸干,称量全心重量,在心室中段切取 3 mm 厚度的心脏组织,4% 多聚甲醛固定 24 h 后, PBS 冲洗,浸入 20% 的蔗糖溶液中,随后进行石蜡包埋切片,剩余的左心室组织经液氮速冻后, -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 高效液相色谱法测定心肌组织及细胞上清中的 SO_2 含量

按照 1 g 组织加入 10 mL 0.01 mol/L PBS 制备组织匀浆,离心分离上清作为样本待测。配制亚硫酸盐标准品:将亚硫酸钠粉末溶于 0.01 mol/L PBS 中,浓度依次为 1、5、10、15、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$,现

配现用。100 μ L 标准品或组织匀浆液加入新鲜配制的 0.212 mol/L 硼氢化钠 70 μ L, 37℃ 放置 30 min。在每个 EP 管中加 70 mmol/L 单溴二铵 5 μ L, 混匀, 置于 42℃ 水浴锅中放置 10 min。取出后每个 EP 管中加 1.5 mol/L 高氯酸 40 μ L, 混匀后在室温以 12400 g 离心力离心 10 min。离心后留取上清, 加入 10 μ L (pH 3.0) Tris 混匀, 室温离心 10 min。取上清 100 μ L 于避光瓶中, 用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪进行检测, 取标本 10 μ L 进样分析。流速控制为 1.0 mL/min, 激发波长 392 nm, 检测波长 479 nm。

1.4 HE 染色观察心肌组织的显微结构

石蜡切片进行脱蜡处理后, 依次浸入苏木素和伊红染液染色, 在显微镜下观察心脏结构改变以及心肌细胞显微结构改变。

1.5 免疫组织化学法检测心肌组织 α 重链肌球蛋白表达

石蜡切片进行脱蜡处理, 3% H_2O_2 封闭 12 min, PBS 洗 3 次, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 微波修复, PBS 洗 3 次, 室温下胎牛血清蛋白封闭 1 h, 滴加 α 重链肌球蛋白 (α -myosin heavy chain, α -MHC) 一抗 (1 : 50 稀释; 美国 Santa Cruz 公司), 4℃ 过夜。PBS 洗 3 次, 滴加用生物素标记的羊二抗, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素染核, 1% 盐酸酒精脱色分化, 冲洗, 封片, 在光学显微镜下观察心肌组织 α -MHC 的表达。阳性染色在显微镜下观察呈黄色, 主要在心肌细胞的细胞浆中表达。

1.6 Western blot 检测小鼠心肌 AAT1、AAT2、 α -MHC、 β -MHC 及自噬相关蛋白的表达

称取适量的小鼠左心室组织, 加入组织裂解液, 研磨离心后取上清, 蛋白定量后加入等体积的 2×凝胶上样缓冲液, 煮沸 10 min。配制 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白, 采用湿转法将蛋白从凝胶转印至硝酸纤维膜上, 丽春红染色后参照蛋白 Marker 标记待测目的蛋白条带。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 min, 一抗室温孵育 1 min (AAT1, Sigma 公司, 1 : 1000; AAT2, Sigma 公司, 1 : 1000; α -MHC, Santa Cruz 公司, 1 : 100; β -MHC, Santa Cruz 公司, 1 : 100; LC3, CST 公司, 1 : 500; Atg4B, CST 公司, 1 : 1000; p62, CST 公司, 1 : 1000; Beclin-1, CST 公司, 1 : 1000; GAPDH, 上海康成公司, 1 : 4000), 4℃ 过夜。0.2% TPBS 洗膜 3 次, 每次 10 min。二抗室温孵育 1 h (兔抗羊 IgG, 1 : 2000; 羊抗鼠 IgG, 1 : 5000; 羊抗兔 IgG, 1 : 2000), 0.2% TPBS 洗膜 4 次, 每次 10 min。

取等体积的 ECL 发光液 A 液和 B 液 (避光, 现配现用) 充分混匀, 均匀滴加在目的条带上, 将目的条带放置于发光仪中, 采用 AlphaImager 3400 凝胶图像采集系统进行曝光。通过 Alpha Ease FS 软件分析条带灰度值, 以内参 GAPDH 条带的灰度值做校正。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行实验数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据呈正态分布时, 多组之间比较使用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组间比较采用最小显著性差异 (least significant difference, LSD) 法。当数据不符合正态分布时, 则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠心肌 SO_2 /AAT 体系表达的改变

4 组小鼠心肌组织 SO_2 含量和 AAT2 蛋白表达有统计学差异 (SO_2 含量: $F = 123.632$, $P < 0.01$; AAT2: $F = 24.462$, $P < 0.05$), 而 AAT1 蛋白表达则无统计学差异 ($F = 0.029$, $P = 0.993$)。与 WT Con 组小鼠相比, AAT2 Con 组小鼠心肌组织 AAT2 蛋白表达、 SO_2 含量显著升高 ($P < 0.01$), AAT1 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$), 提示心肌特异性 AAT2 转基因小鼠构建成功。

与 WT Con 组小鼠相比, WT Ang II 组小鼠心肌组织 AAT2 蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$), AAT1 蛋白含量无显著差异 ($P > 0.05$), 心肌组织 SO_2 含量显著降低 ($P < 0.01$)。与 WT Ang II 组小鼠相比, AAT2 Ang II 组小鼠心肌组织 AAT2 蛋白表达、 SO_2 含量显著升高 ($P < 0.01$), AAT1 蛋白含量无显著差异 ($P > 0.05$), 提示 AAT2 转基因可阻断 Ang II 对小鼠心肌内源性 SO_2 /AAT2 体系的抑制效应 (图 1)。

2.2 小鼠心脏比重与心肌大体及显微结构的改变

4 组小鼠全心重/体重比值有统计学差异 ($F = 9.785$, $P < 0.01$)。与 WT Con 组小鼠相比, WT Ang II 组小鼠全心重/体重比值增加 ($P < 0.01$); 与 WT Ang II 组小鼠相比, AAT2 Ang II 组小鼠全心重/体重比值降低 ($P < 0.05$)。小鼠心脏大体观察结果与全心重/体重比值变化趋势一致。提示 AAT2 转基因可显著抑制 Ang II 诱导小鼠心脏肥厚。HE 染色结果显示, WT Con 组小鼠心肌细胞大小正常, 而 WT Ang II 组小鼠心肌细胞肥大, AAT2 Con 组小鼠与 AAT2 Ang II 组小鼠心肌细胞大小均正常 (图 2)。

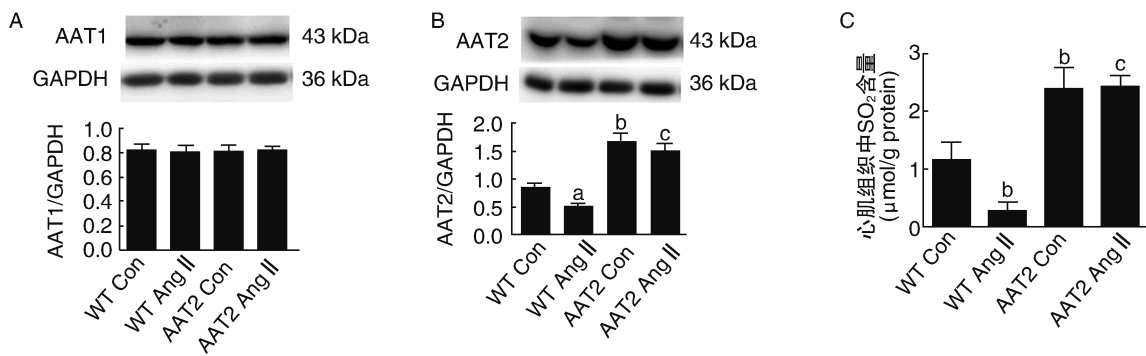


图1. 小鼠心肌组织内源性 SO₂/AAT 体系的变化 (n=8) A 为心肌组织 AAT1 蛋白表达;B 为心肌组织 AAT2 蛋白表达;C 为心肌组织 SO₂ 含量。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 WT Con 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 WT Ang II 组比较。

Figure 1. Changes of endogenous SO₂/AAT system in mouse myocardium (n=8)

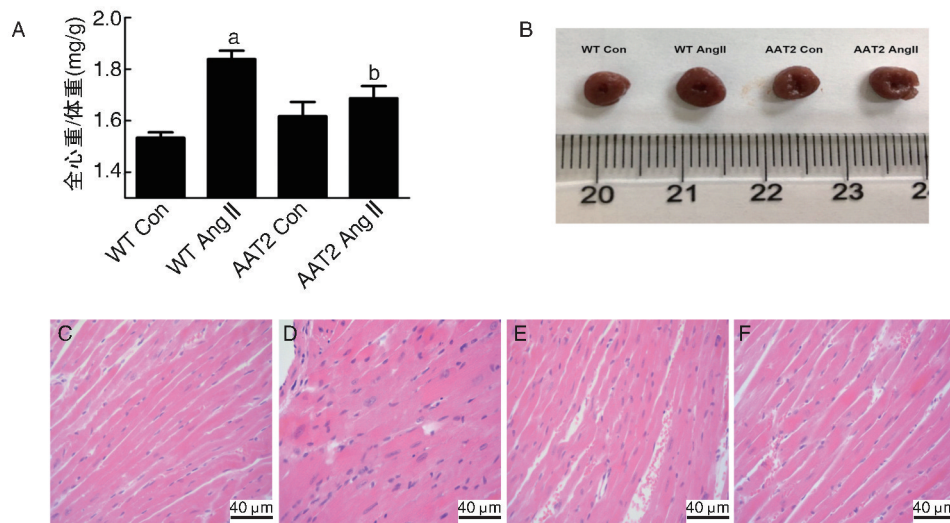


图2. 小鼠全心重/体重比值、心脏大体观及心肌组织 HE 染色 (n=8) A 为小鼠全心重/体重比值;B 为 4 组小鼠心脏横截面大体观;C、D、E、F 为心肌组织 HE 染色,其中 C 为 WT Con 组,D 为 WT Ang II 组,E 为 AAT2 Con 组,F 为 AAT2 Ang II 组。a 为 $P<0.01$, 与 WT Con 组比较;b 为 $P<0.05$, 与 WT Ang II 组比较。

Figure 2. Heart weight/body weight ratio, cardiac general view and myocardial tissue HE staining in mice (n=8)

2.3 小鼠心肌细胞表型的改变

4 组小鼠心肌组织 α -MHC 和 β -MHC 蛋白表达有显著性差异 (α -MHC: $F=7.21$, $P<0.01$; β -MHC: $F=10.05$, $P<0.01$)。Western blot 结果显示,野生型小鼠给予 Ang II 后,心肌细胞表型由收缩型向分泌型转化增多,即与 WT Con 组相比,WT Ang II 组心肌组织 α -MHC 蛋白表达显著减少 ($P<0.01$), β -MHC 蛋白表达显著增多 ($P<0.01$)。然而,心肌特异性过表达 AAT2 可阻断 Ang II 诱导小鼠心肌细胞表型转化,与 WT Ang II 组相比,AAT2 Ang II 组心肌细胞由收缩型向分泌型转化显著减少,即 α -MHC 蛋白表达显著升高和 β -MHC 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。免疫组织化学染色结果显示,WT Con 组心肌细胞浆中 α -MHC 蛋白阳性表达强,WT Ang II

组心肌细胞浆 α -MHC 蛋白阳性表达减弱。在心肌特异性 AAT2 转基因小鼠 AAT2 Con 组心肌细胞浆 α -MHC 蛋白阳性表达强,而 AAT2 Ang II 组心肌细胞浆 α -MHC 蛋白阳性表达仍然较强 (图 3)。

2.4 小鼠心肌细胞自噬水平的变化

通过检测自噬标志性蛋白 Beclin-1、LC3、Atg4B、p62 蛋白表达反映心肌细胞自噬水平的变化。结果发现 4 组小鼠心肌细胞中 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin-1、Atg4B 及 p62 蛋白表达均存在显著性差异 (LC3 II/LC3 I: $F=7.34$, $P<0.01$; Beclin-1: $F=21.75$, $P<0.01$; Atg4B: $F=16.784$, $P<0.01$; p62: $F=11.581$, $P<0.01$)。Western blot 结果显示,在野生型小鼠给予 Ang II 后,心肌细胞自噬显著增强,表现为与 WT Con 组相比,WT Ang II 组心肌组织 Beclin-1

蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$), LC3 II/LC3 I 比值显著升高 ($P < 0.01$), Atg4B 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$), p62 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 提示 Ang II 可显著增强小鼠心肌细胞自噬水平。然而, 心肌特异性 AAT2 转基因小鼠可以阻断 Ang II 诱导的小鼠心肌细胞自噬的增强, 表现为与 WT Ang II 组相比, AAT2 Ang II 组心肌细胞 Beclin-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Atg4B 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), LC3 II/LC3 I 比值显著降低 ($P < 0.01$), p62 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$) (图 4)。

3 讨论

心肌肥厚是心肌细胞受到各种有害刺激所发生的反应性应答的结果, 心肌失代偿肥大是猝死、冠心病和心力衰竭等的独立性危险因素^[9-12]。心肌肥厚的机制十分复杂, 目前尚未完全明确。本课题组前期研究发现, 内源性 SO_2 可在心血管系统经 AAT 催化内源性产生^[13], 在心血管系统中具有重要的生理和病理作用^[14-15]。生理浓度的 SO_2 可通过抑制心肌细胞 L 型钙通道, 发挥负性肌力调节作用^[16]; 心肌组织内源性 SO_2 /AAT 体系下调是异丙肾上腺素诱导心肌损伤的重要发病机制^[17]; SO_2 预

处理通过增强内质网应激拮抗心肌缺血再灌注损伤^[18]。上述研究提示内源性 SO_2 是心脏调节的重要信号分子。前期研究结果发现, Ang II 诱导心肌肥厚的小鼠心肌组织中 SO_2 /AAT2 体系显著下调^[7], 本研究构建了心肌特异性 AAT2 转基因小鼠, 在此基础上探索内源性 SO_2 /AAT 体系对 Ang II 诱导小鼠心肌肥厚的调节作用及机制。

本研究发现, 内源性 SO_2 不足是心肌肥厚的重要病理机制。给予野生型小鼠 Ang II 刺激后, 小鼠心脏重量显著增加, 心脏大体标本观察到左心室壁增厚, 显微结构观察发现肌纤维增粗。在正常的心肌组织中 MHC 以收缩型即 α -MHC 为主, 维持心肌正常的收缩功能, 在肥厚的心肌组织中心肌细胞 MHC 由收缩型向分泌型转化增多, 表现为分泌型即 β -MHC 为主, 影响心脏的正常收缩功能。本研究在给予 Ang II 刺激的小鼠心肌组织中发现心肌细胞中 MHC 由收缩型向分泌型转化增多, 由此表明 Ang II 诱导小鼠出现心肌肥厚。但是在心肌特异性 AAT2 转基因小鼠 Ang II 刺激后, 发现 AAT2 转基因小鼠心脏重量未有明显增加, 心脏大体以及显微结构均未观察到明显变化, 心肌细胞 MHC 由收缩型向分泌型的转化作用消失。上述研究提示心肌特异性 AAT2 转基因可阻断 Ang II 诱导小鼠心肌肥厚, 表明

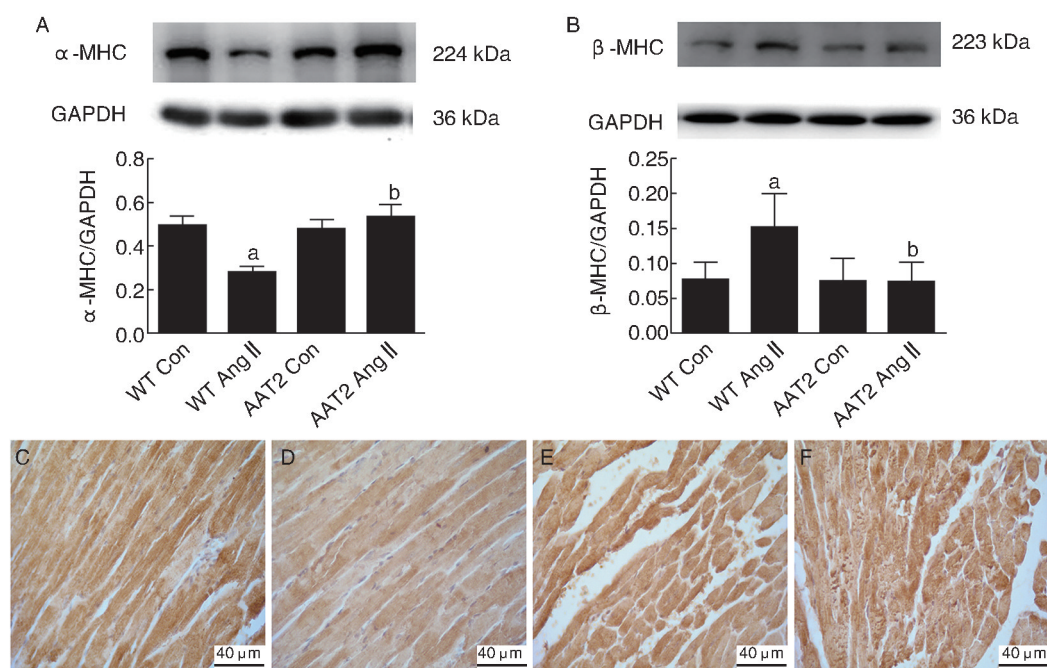


图 3. 小鼠心肌细胞表型的改变 ($n=8$) A 为心肌组织 α -MHC 蛋白表达; B 为心肌组织 β -MHC 蛋白表达; C、D、E、F 为心肌组织 α -MHC 蛋白免疫组织化学染色, 其中 C 为 WT Con 组, D 为 WT Ang II 组, E 为 AAT2 Con 组, F 为 AAT2 Ang II 组。a 为 $P < 0.01$, 与 WT Con 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 WT Ang II 组比较。

Figure 3. Change of phenotype in mouse cardiomyocytes ($n=8$)

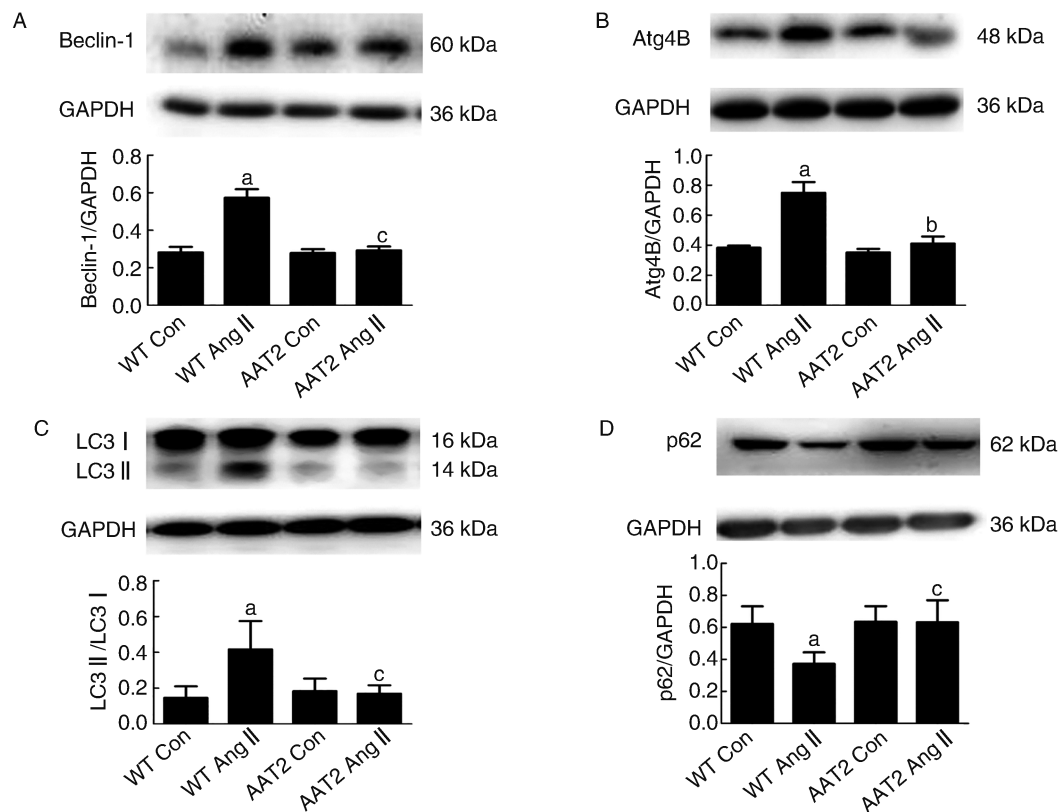


图4. 小鼠心肌细胞自噬水平的改变($n=8$) A为Beclin-1蛋白表达;B为Atg4B蛋白表达;C为LC3蛋白表达;D为p62蛋白表达。a为 $P<0.01$,与WT Con组比较;b为 $P<0.05$,c为 $P<0.01$,与WT Ang II组比较。

Figure 4. Change of autophagy level in mouse cardiomyocytes ($n=8$)

内源性 SO_2 /AAT2 体系下调是心肌肥厚的重要发病机制。

然而,内源性 SO_2 调节心肌肥厚的机制目前尚未清楚,本课题组前期研究发现, SO_2 可激活 PI3K/Akt 信号通路诱导心肌细胞内质网应激,通过 Bcl-2/Bax 通路抑制心肌细胞凋亡^[19-20]。有研究显示,Ang II 可诱导细胞出现病理性自噬^[21-22],以往的研究发现,PI3K/Akt/mTOR 也是心肌细胞自噬的重要调节分子^[23-25],过度的心肌细胞自噬可对心肌细胞造成病理损伤^[26],过度激活的心肌细胞自噬可加重心肌细胞肥大^[27],促进疾病的进展。而心肌细胞自噬是否参与了内源性 SO_2 对心肌肥厚的调节,目前尚不清楚。本研究通过检测自噬的标志性蛋白来观察心肌细胞自噬水平的改变。自噬作用开始于自噬起始复合物 Beclin-1 等蛋白结合,形成 PI3K 复合物参与吞噬小体的成核过程,随后细胞新合成的 LC3 的碳末端立即被 Atg4B 加工生成 LC3 I,自噬水平处于激活状态时,LC3 I 在泛素样反应酶的作用下与磷脂酰乙醇胺偶联生成 LC3 II,参与吞噬小体的延伸,在自噬小体形成的中后期 p62 偶联于

LC3,以调节因子的形式参与自噬小体的构成,最后封闭形成完整的自噬小体^[28]。在自噬水平增高的组织中 Beclin-1 蛋白表达显著升高,可通过检测 Beclin-1 蛋白表达来反映自噬水平。自噬水平处于激活状态时,Atg4B 蛋白表达增加,使 LC3 I 向 LC3 II 的转化增多,LC3 II/LC3 I 比值显著增高。除此之外,自噬的底物最普遍的主要包括 p62 和长寿命蛋白,p62 在自噬中晚期被降解,在自噬水平高的组织中 p62 降解显著增强,组织中 p62 的蛋白含量显著降低。故而,本实验通过检测 Beclin-1、LC3、Atg4B 和 p62 的蛋白表达来反映心肌细胞自噬的变化,从心肌细胞自噬的角度探索 SO_2 抑制心肌肥厚的保护机制。我们的研究结果发现,Ang II 可显著增加小鼠心肌肥厚和心肌细胞表型转化,同时观察到心肌细胞自噬水平显著增加,即 Beclin-1 的蛋白表达显著升高,LC3 II/LC3 I 比值显著增加,Atg4B 的蛋白表达显著升高,p62 的蛋白表达显著降低。心肌特异性 AAT2 转基因小鼠心肌组织中 SO_2 /AAT2 体系显著上调。给予心肌特异性 AAT2 转基因小鼠 Ang II 刺激后,可显著抑制小鼠心肌肥厚和心肌细胞表

型转化,检测心肌自噬水平发现小鼠心肌细胞自噬水平未有显著升高,具体表现为在给与 Ang II 后自噬标志蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I、Atg4B、p62 的蛋白表达与未给予 Ang II 的 AAT2 转基因小鼠相比没有显著差异,提示心肌细胞自噬可能参与了内源性 SO_2 对心肌肥厚的调节机制。

综上,本研究揭示了内源性 SO_2 /AAT2 体系对 Ang II 诱导心肌肥厚小鼠的心肌细胞自噬具有显著抑制作用,深化了心肌肥厚的发生机制,为心肌肥厚的防治研究提供了新的思路和方向。本研究也存在一些不足之处,由 Ang II 诱导的小鼠心肌肥厚模型不能涵盖所有心肌肥厚的病理改变,有待以后进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Kubo T, Kitaoka H. Imaging of left ventricular hypertrophy: a practical utility for differential diagnosis and assessment of disease severity[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(8): 65.
- [2] Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(9): 1 401-438.
- [3] 陈柏荣, 罗礼云, 黄茵, 等. Apelin-13 在自发性高血压大鼠心肌组织的表达及其与心肌肥厚和心功能的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(4): 375-380.
- [4] Sasaki Y, Ikeda Y, Lwabayashi M, et al. The impact of autophagy on cardiovascular senescence and diseases[J]. *Int Heart J*, 2017, 58(5): 666-673.
- [5] Porrello ER, Delbridge LM. Cardiomyocyte autophagy is regulated by angiotensin II type 1 and type 2 receptors[J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1 215-216.
- [6] Wang XB, Jin HF, Tang CS, et al. The biological effect of endogenous sulfur dioxide in the cardiovascular system[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 1-6.
- [7] 陈清华, 黄娅茜, 武娟娟, 等. 血管紧张素 II 致心肌肥大小鼠模型中内源性二氧化硫体系的变化[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(1): 59-62.
- [8] Pei JF, Yan YF, Tang X, et al. Human paraoxonase gene cluster overexpression alleviates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice[J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(11): 1 115-122.
- [9] Cappelli F, Toncelli L, Cappelli B, et al. Adaptive or maladaptive hypertrophy, different spatial distribution of myocardial contraction[J]. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2010, 30(1): 6-12.
- [10] Okin PM, Bang CN, Wachtell K, et al. Relationship of sudden cardiac death to new-onset atrial fibrillation in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2013, 6(2): 243-251.
- [11] 陈小龙, 丁春丽, 王璐. 原发性高血压合并左心室肥厚与血浆同型半胱氨酸水平的相关性研究[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2017, 9(6): 742-744.
- [12] 鲁轩浩, 赵连友, 张志敏, 等. 高血压伴高同型半胱氨酸血症大鼠心肌 ATF6 和 CHOP 表达对左室肥厚的影响及依叶片干预效果[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(6): 729-732.
- [13] Huang Y, Tang C, Du J, et al. Endogenous sulfur dioxide: a new member of gasotransmitter family in the cardiovascular system[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016(3): 8 961 951.
- [14] Zhang S, Du J, Jin H, et al. Endogenous sulfur dioxide aggravates myocardial injury in isolated rat heart with ischemia and reperfusion[J]. *Transplantation*, 2009, 87(4): 517-524.
- [15] Tian H. Advances in the study on endogenous sulfur dioxide in the cardiovascular system[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(21): 3 803-807.
- [16] Zhang SQ, Du JB, Tian Y, et al. Effects of sulfur dioxide on cardiac function of isolated perfusion heart of rat[J]. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88(12): 830-834.
- [17] Liang Y, Liu D, Ochs T, et al. Endogenous sulfur dioxide protects against isoproterenol-induced myocardial injury and increases myocardial antioxidant capacity in rats[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(1): 12-23.
- [18] Wang XB, Huang XM, Ochs T, et al. Effect of sulfur dioxide preconditioning on rat myocardial ischemia/reperfusion injury by inducing endoplasmic reticulum stress[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(5): 865-878.
- [19] Zhao MM, Yang JY, Wang XB, et al. The PI3K/Akt pathway mediates the protection of SO_2 preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 501-506.
- [20] Jin H, Liu AD, Holmberg L, et al. The role of sulfur dioxide in the regulation of mitochondrion-related cardiomyocyte apoptosis in rats with isopropylarterenol-induced myocardial injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5): 10 465-482.
- [21] Lin L, Liu X, Xu J, et al. Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodeling through inhibition of oxidative stress[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(1): 48-57.
- [22] 张紫薇, 杨丽霞, 吕晋琳, 等. 血管紧张素 II 诱发自噬对血管平滑肌细胞表型转换的调控作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(5): 452-456.
- [23] Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival[J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(3): 220-223.
- [24] Zhai P, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3 beta controls autophagy during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 138-139.
- [25] Zhang Y, Han X, Hu N, et al. Akt2 knockout alleviates prolonged caloric restriction-induced change in cardiac contractile function through regulation of autophagy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 71(3): 81-91.
- [26] Ghavami S, Gupta S, Ambrose E, et al. Autophagy and heart disease: implications for cardiac ischemia-reperfusion damage[J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(5): 616-629.
- [27] Lavandero S, Troncoso R, Rothermel BA, et al. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives[J]. *Autophagy*, 2013, 9(10): 1 455-466.
- [28] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473.

(此文编辑 曾学清)