

脑源性神经营养因子经 NO/PKG/Sestrin2 通路提高内皮细胞血管生成能力

王碧蕾¹, 王锦玉², 金虹³, 夏宝妹¹

(1. 南京特殊教育师范学院康复科学学院医学康复教研室, 江苏省南京市 210038; 2. 东南大学附属中大医院康复医学科, 江苏省南京市 210009; 3. 东南大学附属中大医院心血管内科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 脑源性神经营养因子; Sestrin2; 内皮细胞; 血管新生; 慢性心力衰竭

[摘要] 目的 研究脑源性神经营养因子(BDNF)对内皮细胞 Sestrin2 表达的影响及机制,并探讨其在血管新生中的作用。方法 用 100 μg/L 的 BDNF 分别处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC)1 h、2 h、4 h、6 h、8 h,实时荧光定量 PCR 检测 Sestrin2 mRNA 水平,免疫荧光和 Western blot 检测 Sestrin2 蛋白表达。将 HUVEC 分为 6 组:对照组(Control 组)、BDNF 组(加 BDNF 100 μg/L)、BDNF+TrkB-Fc(1 mg/L)组、BDNF+KT-5823(500 nmol/L)组、BDNF+L-NAME(10⁻⁴ mol/L)组、BDNF+DMSO 组,共干预 4 h,Western blot 检测 Sestrin2 蛋白表达。将 HUVEC 分为 4 组:对照组(Control 组)、BDNF 组(加 BDNF 100 μg/L)、BDNF+Sestrin2 siRNA 组和 BDNF+Control siRNA 组,共干预 6 h,细胞迁移实验和小管成形实验分别检测 HUVEC 迁移能力和血管生成能力。结果 与 0 h 和 1 h 组比较,100 μg/L BDNF 分别干预 HUVEC 2、4 及 6 h 时段,Sestrin2 mRNA 水平显著增高($P < 0.001$),在 2、4 及 8 h 时段 Sestrin2 蛋白表达显著增高($P < 0.05$);阻断 NO/PKG 通路可抑制 BDNF 诱导的 Sestrin2 表达上调($P < 0.001$);抑制 Sestrin2 表达后,HUVEC 迁移及小管形成能力较 BDNF 干预组显著降低($P < 0.01$)。结论 BDNF 通过 NO/PKG 通路促进内皮细胞表达 Sestrin2,从而提高内皮细胞血管生成能力。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenesis by enhancing the expression of Sestrin2 in endothelial cells

WANG Bilei¹, WANG Jinyu², JIN Hong³, XIA Baomei¹

(1. Faculty of Rehabilitation Science, Nanjing Normal University of Special Education, Nanjing, Jiangsu 210038, China; 2. Department of Rehabilitation, Zhongda Hospital, Medical School of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 3. Department of Cardiology, Zhongda Hospital, Medical School of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] brain-derived neurotrophic factor; sestrin2; endothelial cells; angiogenesis; chronic heart failure

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on Sestrin2 expression and angiogenesis-related mechanisms in endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

were treated with BDNF (100 μg/L) for 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, and the protein and mRNA expression of Sestrin2 were detected with immunofluorescent staining, Western blot and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), respectively. HUVEC were divided into six groups: control group, BDNF (100 μg/L) group, BDNF+TrkB-Fc (1 mg/L) group, BDNF+KT-5823 (500 nmol/L) group, BDNF+L-NAME(NG-nitro-L-arginine methyl ester) (10⁻⁴ mol/L) group, BDNF+DMSO(dimethyl sulfoxide)group; after intervention for 4 h, the expression of Sestrin2 was detected with Western blot. HUVEC were divided into four groups: control group, BDNF (100 μg/L) group, BDNF+Sestrin2 siRNA group, BDNF+control siRNA group; after intervention for 6 h, the capacities of cell migration and tube formation were analysed.

Results Sestrin2 mRNA increased in 2 h, 4 h, 6 h group compared with that of the 0 h, 1 h group ($P < 0.001$), while the protein expression of Sestrin2 increased in 2 h, 4 h, 8 h group compared with that of the 0 h, 1 h group ($P < 0.05$).

[收稿日期] 2021-04-16

[修回日期] 2021-07-30

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81804068);江苏省自然科学基金项目(BK20190351)

[作者简介] 王碧蕾,博士研究生,主治医师,讲师,研究方向为动脉粥样硬化和心肺疾病康复,E-mail 为 wangbilei@126.com。通信作者夏宝妹,博士研究生,副教授,研究方向为心脑血管疾病的发生发展机制,E-mail 为 babaysummer@163.com。

BDNF-induced increase in Sestrin2 expression was abolished by L-NAME and PKG inhibitor ($P < 0.001$). BDNF-induced cell migration and tube formation were completely blocked because of the suppressed expression of Sestrin2 by Sestrin2 siRNA ($P < 0.01$). **Conclusion** BDNF confers certain aspects of its proangiogenic capacity through NO/PKG/Sestrin2 pathway.

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 发病率和致残率迅速上升, 已成为中国公众健康的严重威胁。急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是 CHD 的严重结果, 尤其长时间心肌缺血导致心肌细胞坏死或凋亡后, 随着心肌瘢痕和间质纤维化形成, 梗死区域发生心室重塑, 逐渐发展为慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF)。CHF 导致的呼吸困难、体液潴留等症状的进行性加重和反复发作使这类人群的运动耐力下降, 进一步增加其致残率和死亡率。近年来, 促进存活心肌血管新生从而改善心肌功能, 成为 CHD 治疗的新思路和新方向。

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是一种小分子二聚体蛋白质, 通过与其高亲和力受体原肌球蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 结合发挥其生物效应^[1]。我们前期的临床试验结果表明 CHD 患者内皮功能障碍与循环 BDNF 水平下降密切相关^[2]。进一步的动物实验结果发现, 有氧运动可提高 AMI 大鼠血清 BDNF 浓度, 并与其心肌血管密度和心功能水平呈正相关; 体外实验亦证实 BDNF 可促进内皮细胞迁移和小管形成^[3], 但其具体作用机制尚不明确。

Sestrin2 是 Sestrins 家族的一员。Sestrins 是一类高度保守的应激诱导蛋白, 在 DNA 损伤、氧化应激和缺氧等多种应激条件下均有明显上调^[4], 被认为可以减轻各种与年龄相关的代谢紊乱, 包括胰岛素抵抗、糖耐量降低、肌肉退化和心脏功能障碍^[5-7]。近年来, Sestrin2 的血管内皮保护作用已得到证实。Sestrin2 表达上调可触发人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 自噬、抑制细胞凋亡^[8]。Sestrin2 过表达还可激活红系衍生核因子 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)/血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路, 从而促进脑缺血后梗死区域的血管生成^[9-10]。而 Nrf2/HO-1 是促血管生成的关键因素^[11-12], 也是 Sestrin2 的重要下游信号通路^[5]。

有研究证实 BDNF 的下游 NO/PKG/NF- κ B 通路介导了皮层神经元中 Sestrin2 的表达^[13]。NO/PKG 通路在改善肝门静脉高压患者肝内血管功能^[14-15]、缓解心肌缺血再灌注损伤^[16]等方面均发挥重要作用。本研究旨在探讨 BDNF 对内皮细胞 Ses-

trin2 的影响及 NO/PKG 通路在其中发挥的作用, 明确该通路及 BDNF 诱导的血管新生效应的关联。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HUVEC 由东南大学医学院心血管病研究所提供。RPMI-1640 培养基和胰酶购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 人重组 BDNF (human recombinant brain-derived neurotrophic factor, rhBDNF)、重组人 TrkB-Fc 嵌合体蛋白 (TrkB-Fc) 购自 Proteintech 公司; Sestrin2 抗体、 β -actin 多克隆抗体购自 ABCAM 公司, Sestrin2 siRNA、Control siRNA 购自 Sigma-Aldrich 公司; LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 羊抗兔 FITC 购自 Proteintech 公司; 一氧化氮合酶抑制剂 NG-硝基-L-精氨酸甲酯基 (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 购自碧云天生物科技有限公司; 蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 抑制剂 (KT-5823) 购于德国 Merck 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma-Aldrich 公司; DAPI、抗荧光淬灭封片液购自碧云天生物科技有限公司; Trizol 试剂、RIPA 裂解液购自 Life Technologies 公司; Transwell 小室购自 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自 BD Bioscience 公司。

1.2 细胞培养

采用 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清) 培养 HUVEC, 并置于 37 °C 孵箱中培养 (含 5% CO₂)。采用 BDNF (100 μ g/L) 分别处理 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h。

1.3 实验分组

(1) 将 HUVEC 分为 6 组: 对照组 (Control 组)、BDNF 组 (加入 100 μ g/L 的 BDNF)、BDNF+TrkB-Fc 组 (100 μ g/L BDNF 和 1 mg/L TrkB-Fc 共同处理)、BDNF+KT-5823 组 (100 μ g/L BDNF 和 500 nmol/L KT-5823 共同处理)、BDNF+L-NAME 组 (100 μ g/L BDNF 与 10⁻⁴ mol/L L-NAME 共同处理) 和 BDNF+DMSO 组 (100 μ g/L BDNF 与 DMSO 共同处理); 以上各组干预时间均为 4 h, 用于探讨 BDNF 促进 Sestrin 表达的通路机制。(2) 将 HUVEC 分为 4 组: 对照组 (Control 组)、BDNF 组 (加入 100 μ g/L 的 BDNF)、BDNF + Sestrin2 siRNA 组 (转染 Sestrin2

siRNA 后加 100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 共同处理)、BDNF + Control siRNA 组(转染 Control siRNA 后加 100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 共同处理);以上各组干预时间均为 6 h,用于观察 BDNF 是否通过促进 Sestrin 表达影响 HUVEC 迁移能力和血管生成能力。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 Sestrin2 mRNA 表达水平

参考试剂盒说明书,采用 Trizol 试剂分别提取每组 HUVEC 的总 RNA。其纯度测定采用 RNA 测量仪,如 A_{260}/A_{280} 为 1.8 ~ 2.0 即符合后续实验要求。总 RNA 反转录 cDNA 采用 RT 试剂盒,随后行实时荧光定量 PCR 检测。特异性引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成。Sestrin2 引物序列为 F 5'-CAACCTGCCAACAGCAAG-3', R 5'-CCTGGAA GCAACCCACTTA-3';GAPDH 引物序列为 F 5'-GC ACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', R 5'-TGGTGAAGACG CCACTGGA-3'。GAPDH 用作管家基因进行标准化。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,再经 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 循环 40 次,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.5 细胞免疫荧光检测 Sestrin2 的表达情况

将 HUVEC 培养在激光共聚焦培养皿中,细胞为 1×10^8 个/L,待细胞贴壁后用 PBS 轻轻洗涤 2 次,每次 10 min,加 1 mL 0.3% Triton X100, PBS 洗涤 2 次,每次 10 min,加入 5% BSA 封闭液封闭 30 min, PBS 洗涤 2 次,每次 10 min,加入抗 Sestrin2 (1:100)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;第 2 天弃一抗, PBS 洗涤 2 次后,滴加羊抗兔荧光二抗(1:1000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次;加入 DAPI 50 μL , 室温避光反应 30 min, PBS 洗涤 2 次,滴加荧光淬灭封片液于载玻片上,封片避光保存,用荧光倒置显微镜于 488 nm 激发并接收荧光信号,拍照采集图片。

1.6 Western blot 检测 Sestrin2 蛋白表达水平

细胞裂解液提取各组细胞样本总蛋白,采用 BCA 法对蛋白含量进行定量检测。与上样缓冲液按比例混合均匀后 100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h,加入 1:1000 稀释的抗 Sestrin2 和 β -actin 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min;随后以 1:5000 稀释的二抗(FRP 标记)室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 15 min,加入化学发光试剂显色,胶片行显影、定影后扫描。

1.7 siRNA 转染

按照说明书,将 Sestrin2 siRNA 或 Control siRNA 溶解于 DMEM 培养基,将适量 LipofectamineTM 2000 与 DMEM 培养基混合均匀后加入 Sestrin2 siRNA 或

Control siRNA 充分混匀,室温静置 20 min 后加入 6 孔板培养的 HUVEC 中,温育 8 h。

1.8 Transwell 小室实验测定 HUVEC 迁移能力

取出干预后的 HUVEC,消化重悬细胞,调整为 5×10^8 个/L,吸去 0.1 mL 细胞悬液加入上室,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,18 h 后取出滤膜,4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 冲洗,棉签拭去上室表面内残存细胞,结晶紫染色。显微镜下随机选取 5 个清晰的视野拍照,计算穿膜细胞数取平均值(个/LPF)。

1.9 小管形成实验检测 HUVEC 体外血管生成能力

取出干预后的 HUVEC,消化重悬细胞,调整为 5×10^7 个/L。将细胞外基质胶溶解后铺于 96 孔板,细胞培养箱中孵育 60 min。将上述细胞悬液加入 96 孔板(300 μL /孔),每组设置 3 个复孔,继续培养 18 h。每组随机选取 5 个视野于倒置显微镜下观察、拍照并统计其每个视野下小管形成数量,取均值。

1.10 统计学处理

实验重复 3 次,取平均值进行比较,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学处理,多组间参数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BDNF 干预对 Sestrin2 mRNA 表达的影响

100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 分别干预 HUVEC 0、1、2、4、6 及 8 h,在 2、4 及 6 h 时段 Sestrin2 mRNA 水平显著高于 0 h、1 h 时段,差异有统计学意义($P < 0.001$;图 1),其中,6 h 时段 Sestrin2 mRNA 水平较 0 h 时段增加最为显著;而在 8 h 时段 Sestrin2 mRNA 水平显著低于其余各时段,差异有统计学意义($P < 0.01$;图 1)。

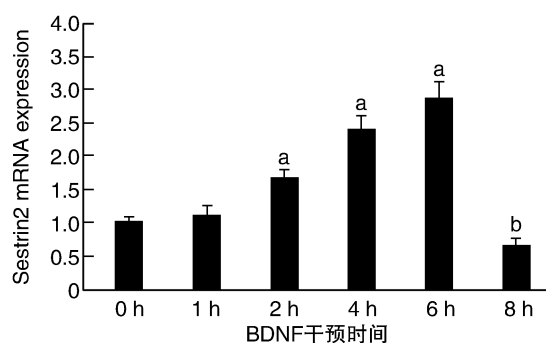


图 1. BDNF 干预对 Sestrin2 mRNA 表达水平的影响($n=3$)

a 为 $P < 0.001$,与 0 h(对照组)、1 h 组比较;b 为 $P < 0.01$,与 0 h(对照组)、1 h、2 h、4 h、6 h 组比较。

Figure 1. Effect of BDNF on the expression of Sestrin2 mRNA ($n=3$)

2.2 BDNF 干预对 Sestrin2 蛋白表达的影响

100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 分别干预 HUVEC 0、1、2、4 及 8 h, 在 2、4 及 8 h 时段 Sestrin2 蛋白表达量呈显著增高趋势, 在 8 h 时段 Sestrin2 蛋白水平显著高于其余各时段 ($P < 0.05$; 图 2)。

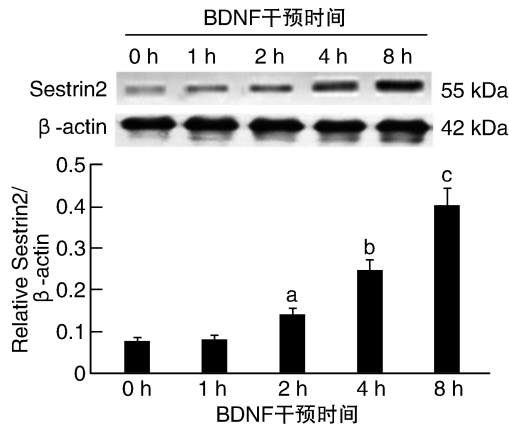


图 2. BDNF 干预对 Sestrin2 蛋白表达的影响 ($n=3$)
a 为 $P < 0.05$, 与 0 h (对照组)、1 h 组比较; b 为 $P < 0.001$, 与 0 h (对照组)、1 h、2 h 组比较; c 为 $P < 0.001$, 与 0 h (对照组)、1 h、2 h、4 h 组比较。

Figure 2. Effect of BDNF on the expression of Sestrin2 protein ($n=3$)

2.3 免疫荧光检测 BDNF 干预对 HUVEC 表达 Sestrin2 的影响

100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 分别干预 HUVEC 0、1、2、4 及 8 h, 在 2、4 及 8 h 时段 Sestrin2 蛋白表达量呈显著增高趋势, 在 8 h 时段 Sestrin2 蛋白水平显著高于其余各时段, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.4 BDNF 影响 Sestrin2 表达的机制

100 $\mu\text{g/L}$ BDNF 与 TrkB-Fc 共同干预 HUVEC 4 h, Western blot 检测结果显示, BDNF+TrkB-Fc 组在阻断 TrkB 后 Sestrin2 蛋白表达水平较 BDNF+DMSO 组显著下降 ($P < 0.001$; 图 4); 分别用一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 和 PKG 抑制剂 KT-5823 干预 HUVEC, 结果发现阻断 NO/PKG 通路后 BDNF 干预的 Sestrin2 蛋白表达水平较 BDNF+DMSO 组显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$; 图 4)。

2.5 BDNF 通过 Sestrin2 促进 HUVEC 迁移及小管形成

体外小管形成实验结果显示, BDNF 干预后 HUVEC 迁移、小管形成能力较对照组显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 5); 抑制 Sestrin2 表达后, HUVEC 迁移及小管形成能力较 BDNF 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 5)。

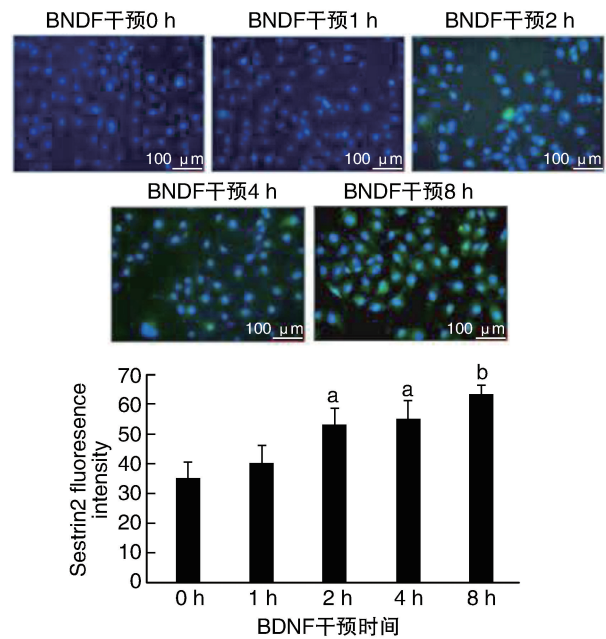


图 3. 免疫荧光检测 BDNF 干预各时段 Sestrin2 表达 ($n=3$)
a 为 $P < 0.05$, 与 0 h (对照组)、1 h 组比较;
b 为 $P < 0.01$, 与 0 h (对照组)、1 h、2 h、4 h 组比较。

Figure 3. Immunofluorescence was used to detect the effect of BDNF on the expression of Sestrin2 ($n=3$)

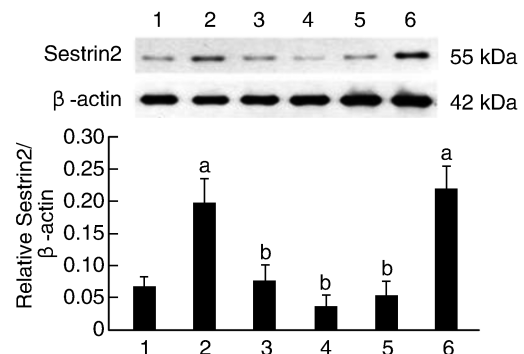


图 4. BDNF 通过 NO/PKG 通路调节 Sestrin2 蛋白表达 ($n=3$)

1 为对照组, 2 为 BDNF+DMSO 组, 3 为 BDNF+TrkB-Fc 组, 4 为 BDNF+L-NAME 组, 5 为 BDNF+KT-5823 组, 6 为 BDNF 组。
a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.001$, 与 BDNF+DMSO 组和 BDNF 组比较。

Figure 4. BDNF modulated the expression of Sestrin2 through NO/PKG pathway ($n=3$)

3 讨论

CHF 使 CHD 人群的致残率和死亡率居高不下^[17]。呼吸困难、体液滞留等症状的进行性加重和反复发作使 CHF 患者运动耐力下降^[18], 伴随而来的废用性肌萎缩导致机体氧利用效率低下, 使其运动功能进一步恶化。因此, 如何增加 CHF 患者运动

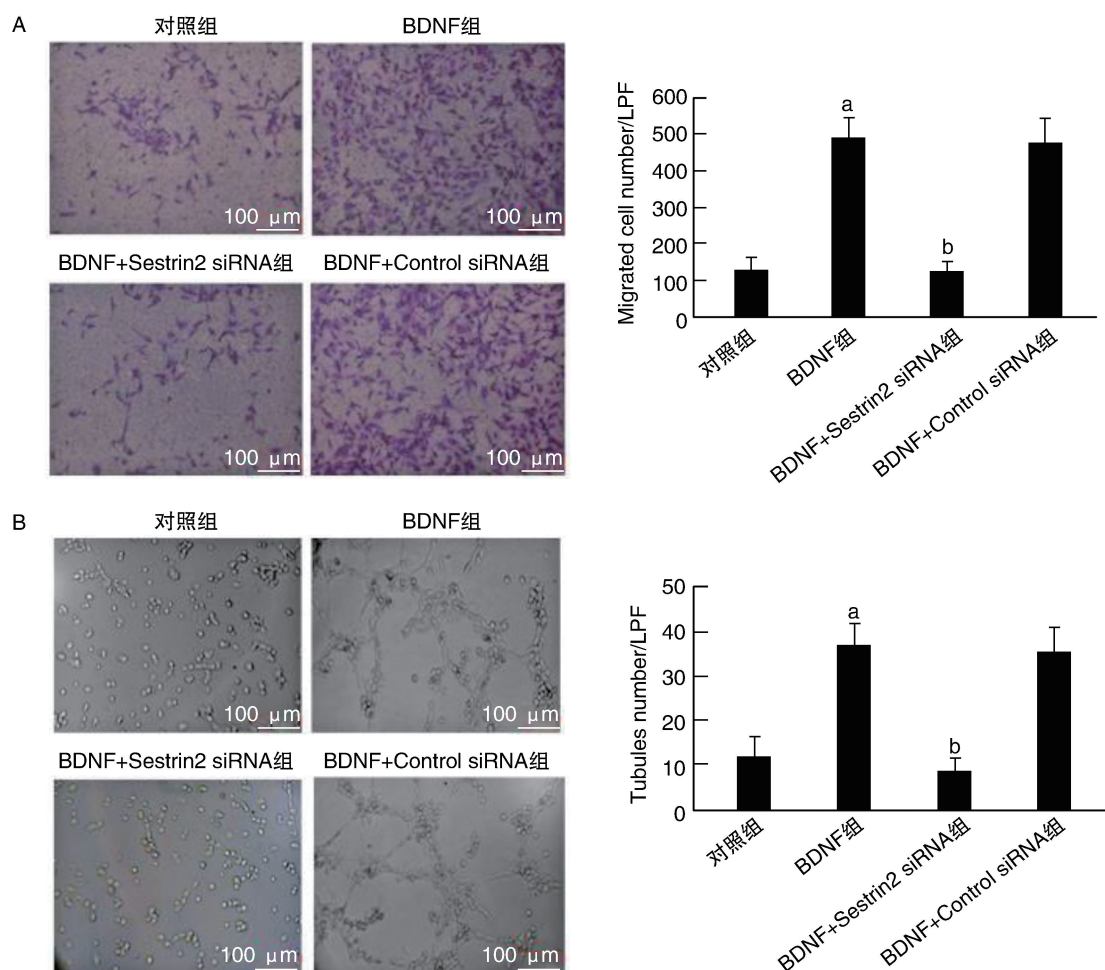


图 5. 转染 Sestrin2 siRNA 对 BDNF 诱导的 HUVEC 迁移(图 A)和小管成形(图 B)能力影响($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 BDNF 组比较。

Figure 5. Effect of Sestrin2 siRNA transfection on HUVEC migration (figure A) and tube formation (figure B) induced by BDNF ($n=3$)

耐力、提高生活质量、改善预后成为临床亟需解决的问题。

血管新生一般是指毛细血管的新生,形成新的毛细血管网,在细胞水平增加氧和营养物质的递送。心肌新生血管密度增高可改善心肌细胞代谢、抑制细胞凋亡进而调节心肌泵血能力、提高运动耐力。但是运动耐力的提高不仅仅取决于心脏功能,骨骼肌功能也是运动耐力的重要决定因素。骨骼肌功能下降直接导致运动耐受不良和日常活动的减少,这是生活质量和死亡率的一个强有力的预测指标^[19-20]。血管在骨骼肌中扮演运输氧气、营养物质和生长因子等重要角色,骨骼肌的血流量是影响骨骼肌功能的关键因素,对运动耐力具有特殊的意义,因为它直接影响到运动肌肉的能量底物供应^[21]。早在 1989 年, Sullivan 等^[22]研究了 CHF 患者中枢和外周血液动力学之间的关系,发现 CHF 患

者骨骼肌血流灌注量减少,阻力增加,影响氧气的运输,易导致骨骼肌的无氧代谢。

BDNF/TrkB 这一通路作为一种诱导性配体/受体系统在体内展现出促血管生成效应;近期研究发现,冠心病患者循环 BDNF 水平与血管内皮功能^[2]、心肺适应能力(峰值耗氧量)^[23]和运动耐力^[24]呈正相关。低水平 BDNF 和低水平峰值耗氧量结合可预测心衰患者的心血管相关死亡率等预后^[25]。皮下注射 BDNF 可改善 CHF 小鼠运动能力^[26]。但其具体作用机制尚不明确。

Sestrin2 通过促进血管新生^[9]、激活自噬^[5]、抑制内皮细胞凋亡^[27]和 mTOR 信号过度激活^[28]等效应对心肌缺血发挥保护作用;敲除 Sestrin2 可促进小鼠动脉粥样硬化斑块及其他动脉粥样硬化特征的形成^[29]。另外, Sestrin2 还可通过调节底物代谢来防止年龄相关性的心肌缺血和再灌注损伤^[30-31]。

这些发现均提示 Sestrin2 是一个潜在的靶点,可以预防年龄相关的缺血性心脏病易感性。除了血管保护效应,近年来,Sestrin 家族在运动获益中的作用引起普遍关注。Kim 等^[32]发现骨骼肌 Sestrin 基因敲除小鼠运动耐力下降且运动获益消失。那么,作为改善内皮功能障碍、保护心肌、提高运动效果的潜在靶点,促进 Sestrin2 表达、提升运动获益将获得重要的临床意义。

我们的研究表明,BDNF 可以增强 HUVEC 中 Sestrin2 的表达,从而提高内皮细胞血管生成能力。在 BDNF 干预 0~6 h,Sestrin2 基因及蛋白表达呈持续增高趋势,但 6~8 h 时段,基因表达下降、蛋白水平却仍继续增高。在重复实验仍得到相同的结果,排除技术问题后,我们考虑以下几个因素可能导致该现象的出现:①对于某个基因也存在转录后调节、反馈抑制的可能,故而转录水平和翻译水平不是完全一致的;②mRNA 的稳定性是需要考虑的因素,不同刺激虽可引起同样 mRNA 的表达,但表达出的 mRNA 的稳定性却不尽相同。即是说,某些情况下,虽然表达 mRNA,但很快降解;③有可能 mRNA 表达下降但是调控表达的因子上调了,翻译频率增加,蛋白水平也就随之上调;如果同时伴有蛋白稳定性加强、降解减少,那么检测出蛋白水平持续增加亦是有可能的。导致上述现象的具体机制我们将会在今后的实验中进行进一步探索。

在该研究中,我们发现 BDNF 通过激活 TrkB/NO/PKG 通路诱导 Sestrin2 表达,从而实现其促进血管生成的功能,进一步证实了 BDNF/TrkB 系统对运动促血管生成及心功能保护效应的介导作用。运动康复可改善心血管疾病患者心功能、增强其运动耐力,已被多个指南列为强推荐治疗意见,其中中等强度持续有氧运动是主要推荐的运动方式^[33-34]。近期国内外临床研究亦证实运动康复对 CHF 后或 PCI 术患者心肺功能和生活质量的改善作用^[35-36]。但大量患者因高龄、重症、体弱或并发症等原因不能保证充分的运动训练强度和时长,也影响了 BDNF 的分泌^[37]。另外,相当比例的冠心病患者存在高血压^[38]、糖尿病^[39]等并发症,其内皮功能不佳、BDNF 分泌能力亦不足,严重影响运动效应。还值得注意的是,Sestrin2 的表达随着年龄的增长而下降,导致缺血后腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)减少,其下游葡萄糖摄取和氧化速率明显降低,最终引起缺血时 Sestrin2 与 AMPK 上游 LKB1

(liver kinase B1)的结合亲和力减弱^[30]。故而,发掘外源性干预措施促进 Sestrin2 表达或可改善年龄相关性缺血损伤。

我们的研究为外源性补充 BDNF,改善血管内皮功能、强化运动获益提供了理论依据。下一步,我们将在动物水平进一步验证外源性补充 BDNF 结合运动对心肌组织 Sestrin2 表达、血管新生及运动获益等方面的影响。

[参考文献]

- [1] PIUS-SADOWSKA E, MACHALINSKI B. BDNF: a key player in cardiovascular system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 110: 54-60.
- [2] JIN H, CHEN Y, WANG B, et al. Association between brain-derived neurotrophic factor and von Willebrand factor levels in patients with stable coronary artery disease[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 23.
- [3] WANG B L, JIN H, HAN X Q, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in exercise-induced cardioprotection of post-myocardial infarction rats[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2867-2880.
- [4] WANG M, XU Y, LIU J, et al. Recent insights into the biological functions of sestrins in health and disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5): 1731-1741.
- [5] MORRISON A, CHEN L, WANG J, et al. Sestrin2 promotes LKB1-mediated AMPK activation in the ischemic heart[J]. *FASEB J*, 2015, 29(2): 408-417.
- [6] LIU Y, LI M, DU X, et al. Sestrin 2, a potential star of antioxidant stress in cardiovascular diseases[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 163: 56-68.
- [7] TAO R, XIONG X, LIANGPUNSAKUL S, et al. Sestrin 3 protein enhances hepatic insulin sensitivity by direct activation of the mTORC2-Akt signaling[J]. *Diabetes*, 2015, 64(4): 1211-1223.
- [8] CHEN T, LI T, WANG J. p53 mediates PEDF-induced autophagy in human umbilical vein endothelial cells through sestrin2 signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2): 1443-1450.
- [9] WANG P, ZHAO Y, LI Y, et al. Sestrin2 overexpression attenuates focal cerebral ischemic injury in rat by increasing Nrf2/HO-1 pathway-mediated angiogenesis[J]. *Neuroscience*, 2019, 410: 140-149.
- [10] LI Y, WU J, YU S, et al. Sestrin2 promotes angiogenesis to alleviate brain injury by activating Nrf2 through regulating the interaction between p62 and Keap1 following photothrombotic stroke in rats[J]. *Brain Res*, 2020, 1745(15): 146948.
- [11] LIN S, ZHANG Q, LI S, et al. Antioxidative and angiogenesis-promoting effects of tetrahedral framework nucleic acids in diabetic wound healing with activation of the Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(10): 11397-11408.
- [12] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E A, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [13] WU C L, CHEN S D, YIN J H, et al. Nuclear factor-kappaB-dependent sestrin2 induction mediates the antioxidant effects of BDNF

- against mitochondrial inhibition in rat cortical neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(6): 4126-4142.
- [14] ZHANG C G, ZHANG B, DENG W S, et al. Role of estrogen receptor β selective agonist in ameliorating portal hypertension in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(18): 4484-4500.
- [15] LIU S, ROCKEY D C. Cicletamine stimulates eNOS phosphorylation and NO production via Akt and MAP kinase/Erk signaling in sinusoidal endothelial cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(2): G163-G171.
- [16] PENNA C, TULLIO F, FEMMINÒ S, et al. Obestatin regulates cardiovascular function and promotes cardioprotection through the nitric oxide pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12): 3670-3678.
- [17] ZIAEIAN B, FONAROW G C. Epidemiology and aetiology of heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(6): 368-378.
- [18] GOMES N M, DURÃES A R, CONCEIÇÃO L, et al. High intensity interval training versus moderate intensity continuous training on exercise capacity and quality of life in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 261: 134-141.
- [19] ANKER S D, PONIKOWSKI P, VARNEY S, et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure [J]. *Lancet*, 1997, 349(958): 1050-1053.
- [20] ZHOU X, WANG J L, LU J, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival [J]. *Cell*, 2010, 142(4): 531-543.
- [21] MESSONNIER L A, EMHOFF C A, FATTOR J A, et al. Lactate kinetics at the lactate threshold in trained and untrained men [J]. *J Appl Physiol*, 2013, 114(11): 1593-1602.
- [22] SULLIVAN M J, KNIGHT J D, HIGGINBOTHAM M B, et al. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure [J]. *Circulation*, 1989, 80(4): 769-781.
- [23] SWARDFAGER W, HERRMANN N, MARZOLINI S, et al. Brain derived neurotrophic factor, cardiopulmonary fitness and cognition in patients with coronary artery disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(6): 1264-1271.
- [24] FUKUSHIMA A, KINUGAWA S, HOMMA T, et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(5): e142-e144.
- [25] SHIBATA A, HANATANI A, IZUMI Y, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor level and exercise tolerance complement each other in predicting the prognosis of patients with heart failure [J]. *Heart Vessels*, 2018, 33(11): 1325-1333.
- [26] MATSUMOTO J, TAKADA S, KINUGAWA S, et al. Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure [J]. *Circulation*, 2018, 138(18): 2064-2066.
- [27] 刘锋, 胡红娟, 范文静. 干扰 Sestrin2 表达对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(4): 350-354.
- [28] LIAO H H, JY R, LIU H J, et al. Sestrin family may play important roles in the regulation of cardiac pathophysiology [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 202: 183-184.
- [29] HWANG H J, JUNG T W, CHOI J H, et al. Knockdown of sestrin2 increases pro-inflammatory reactions and ER stress in the endothelium via an AMPK dependent mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(6): 1436-1444.
- [30] QUAN N, SUN W, WANG L, et al. Sestrin2 prevents age-related intolerance to ischemia and reperfusion injury by modulating substrate metabolism [J]. *FASEB J*, 2017, 31(9): 4153-4167.
- [31] QUAN N, WANG L, CHEN X, et al. Sestrin2 prevents age-related intolerance to post myocardial infarction via AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 115: 170-178.
- [32] KIM M, SUJKOWSKI A, NAMKOONG S, et al. Sestrins are evolutionarily conserved mediators of exercise benefits [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 190.
- [33] 中华医学会心血管病学分会预防学组, 中国康复医学会心血管病专业委员会. 冠心病患者运动治疗中国专家共识 [J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(7): 575-588.
- [34] ARNETT D K, BLUMENTHAL R S, ALBERT M A, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(10): e177-e232.
- [35] 任斌, 刘达瑾, 孔永梅, 等. 心脏运动康复对 PCI 术后冠心病患者心肺功能及生活质量的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(9): 779-782.
- [36] LONG L, MORDI I R, BRIDGES C, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation for adults with heart failure [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 1(1): CD003331.
- [37] MARINUS N, HANSEN D, FEYS P, et al. The impact of different types of exercise training on peripheral blood brain-derived neurotrophic factor concentrations in older adults: a Meta-analysis [J]. *Sports Med*, 2019, 49(10): 1529-1546.
- [38] PRIGENT-TESSIER A, QUIRIÉ A, MAGUIN-GATÉ K, et al. Physical training and hypertension have opposite effects on endothelial brain-derived neurotrophic factor expression [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3): 374-382.
- [39] ROZANSKA O, URUSKA A, ZOZULINSKA-ZIOLKIEWICZ D. Brain-derived neurotrophic factor and diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 841.

(此文编辑 许雪梅)