

## PAR-2 对自噬介导的心肌缺血/再灌注损伤的研究进展\*

安军钰<sup>1</sup> 黄晏<sup>2</sup> 李万鹏<sup>2</sup>

**[摘要]** 心肌再灌注治疗是急性心肌梗死最重要的治疗方法之一,能够显著改善致死、致残率。但再灌注早期仍难以避免增加心肌损害,引起心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)损伤。心肌缺血阶段激活的自噬对心肌具有保护作用,而再灌注阶段激活的自噬对心肌具有损害作用,其机制可能与缺血阶段 AMPK-mTOR 信号通路,以及再灌注阶段 Bcl-2-Becn1 信号通路介导的自噬诱导 I/R 损伤的重要途径有关。蛋白酶激活受体 2 (protease activated receptor2,PAR-2)在缺血心肌细胞高度表达,是自噬的上游标记物之一,能够显著改善 I/R 损伤,具有心肌保护作用。在缺血阶段,PAR-2 可能通过激活 AMPK 途径,抑制其下游 mTOR 表达,从而激活自噬,保护心肌;在再灌注阶段,通过 Bcl-2 下调激活 Becn1 表达,诱导自噬发生,并且能够上调 Bcl-2 mRNA 表达水平。本文就 PAR-2 对自噬介导的 I/R 损伤的研究进展进行综述。

**[关键词]** 蛋白酶激活受体 2;自噬;缺血/再灌注;AMPK-mTOR;Bcl-2-Becn1

**doi:**10.13201/j.issn.1001-1439.2018.05.023

**[中图分类号]** R541.4 **[文献标志码]** A

## Research progress of PAR-2 in myocardial ischemia/reperfusion injury mediated by autophagy

AN Junyu<sup>1</sup> HUANG Yan<sup>2</sup> LI Wanpeng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730000, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, People's Hospital of Gansu)

Corresponding author: HUANG Yan, E-mail: Huangyanden@163.com

**Summary** Reperfusion is one of the most important methods in treatment of acute myocardial infarction, and can significantly improve fatality and disability. However, it does not prevent myocardium damaging in the early stage of reperfusion, which leads to myocardial ischemia and reperfusion (I/R) injury. Autophagy plays a protective role in myocardial ischemia phase but plays an opposite role in myocardial reperfusion phase. The underlying mechanism may be related to the signal pathway of AMPK-mTOR in ischemia phase and the signal pathway of Bcl-2-Becn1 in reperfusion phase. Protease activated receptor2 (PAR-2) is highly expressed in the cells of myocardial ischemia. As one of the upstream markers of autophagy, PAR-2 may be able to significantly reduce the I/R injury and pro-

\* 基金项目:甘肃卫生厅基金项目(No:989)

<sup>1</sup>甘肃中医药大学(兰州,730000)

<sup>2</sup>甘肃省人民医院心内科

通信作者:黄晏, E-mail: Huangyanden@163.com

- [20] Zhang WF, Xiong YW, Zhu TT, et al. MicroRNA let-7g inhibited hypoxia-induced proliferation of PSMCs via G0/G1 cell cycle arrest by targeting c-myc[J]. Life Sci, 2017, 170: 9-15.
- [21] Zhang WF, Zhu TT, Xiong YW, et al. Negative feedback regulation between microRNA let-7g and LOX-1 mediated hypoxia-induced PSMCs proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 488(4): 655-663.
- [22] Wang DZ, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional co-activators[J]. Curr Opin Genet Dev, 2004, 14(5): 558-566.
- [23] Zhang W, Zhu T, Wu W, et al. LOX-1 mediated phenotypic switching of pulmonary arterial smooth muscle cells contributes to hypoxic pulmonary hypertension[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 818: 84-95.
- [24] Zhu TT, Zhang WF, Luo P, et al. LOX-1 promotes right ventricular hypertrophy in hypoxia-exposed rats[J]. Life Sci, 2017, 174: 35-42.
- [25] 林清飞, 王华军, 林静, 等. 虾青素对糖尿病大鼠血管内皮功能的保护作用及机制[J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(6): 530-536.
- [26] Zhang MZ, Qian DH, Xu JC, et al. Statins may be beneficial for patients with pulmonary hypertension secondary to lung diseases[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(8): 2437-2446.
- [27] Chen M, Narumiya S, Masaki T, et al. Conserved C-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding[J]. Biochem J, 2001, 355(Pt 2): 289-296.
- [28] 陈霞, 肖煦. 载 LOX-1-siRNA 靶向超声微泡的制备及其对大鼠动脉粥样硬化斑块的生物学作用[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(24): 2359-2365.
- (收稿日期:2017-12-30; 修回日期:2018-03-19)

tect myocardium. In myocardial ischemia, PAR-2 plays a protective role through activating the pathway of AMPK and inhibiting the expression of downstream mTOR. During myocardial reperfusion, PAR-2 induces the autophagy by activating the expression of Beclin 1 through the downregulation of Bcl-2 and upregulates the expression of Bcl-2 mRNA. The research progress of PAR-2 in myocardial I/R injury mediated by autophagy is reviewed.

**Key words** protease activated receptor 2; autophagy; ischemia/reperfusion; AMPK-mTOR; Bcl-2-Beclin 1

《中国心血管病报告 2016》概要显示, 心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位, 农村占 45.01%, 城市占 42.61%, 呈持续上升趋势, 目前冠心病的病死率总体呈上升态势, 急性心肌梗死的病死率总体亦呈上升趋势。心脏是一个再生和修复能力有限的器官, 对于心肌梗死患者, 减少心肌缺血/再灌注(I/R)损伤是目前主要的研究目标和方向。近年来的研究表明心肌自噬现象在心肌 I/R 过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。

## 1 自噬

自噬现象首先由 Ashford 等<sup>[2]</sup>在 1962 年提出, 其将高血糖素加入肝灌流液中, 观察到肝细胞溶酶体增多, 并出现自我吞噬现象, 此后称这一现象为自噬。自噬是机体应对各种内外刺激, 将细胞内受损的长寿蛋白及细胞器等物质在溶酶体内降解, 并再次回收利用的进化上高度保守的代谢过程, 对细胞内环境稳态调控及细胞生存具有重要意义, 既属于一种正常生理过程, 又是一种自我防御机制。自噬分 3 类: 巨自噬、微自噬、分子伴侣介导的自噬。自噬已被证明是缺氧和饥饿状态下的一种响应, 由一系列自噬相关基因控制, 并由重要的营养感受途径调控, 包括雷帕霉素(mTOR)的作用靶点和激活自噬的蛋白激酶(AMPK)<sup>[3-4]</sup>。故自噬与人类的病理生理密切相关, 在某些疾病的发生发展过程及预后方面有着不同的作用机理。有研究发现, 在心脏病进展中可观察到通过双侧膜结构的自噬溶酶体进行降解, 可见自噬与心脏疾病有一定关系。

## 2 急性心肌梗死及 I/R 损伤

I/R 损伤是指在心肌发生缺血后经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCD)后心肌重新恢复再灌注时引起心肌超微结构、功能、代谢及电生理方面的进一步损害。急性心肌梗死时, 心肌血流量中断破坏心肌供氧, ATP 迅速下降, AMP/ATP 比率增加, 自噬作为心肌能量的补充被激活。有研究报道, 短期(20 min)的心肌缺血无法诱导自噬发生, 随后的再灌注可诱导心肌细胞的自噬, 而当心肌缺血时间延长(30 min), 心肌自噬上调, 诱导更多数量的自噬体, 再灌注时会进一步增加。但二者促进自噬的机制不同, 即: 心肌缺血时由 AMPK-mTOR 途径介导激活自噬, 再灌注时由 Beclin 1 信号途径激活自噬, 前者对心肌发挥有益作用, 促进心肌细胞存活, 后者促进心肌自

噬细胞死亡。再灌注时过度的自噬激活对心肌细胞是有害的<sup>[5]</sup>。可见自噬在 I/R 损伤中可能发挥双刃剑作用。

## 3 蛋白酶激活受体 2 与心肌自噬

Kanke 等<sup>[6]</sup>研究提出, 蛋白酶激活受体 2 (PAR-2)是一种可以被胰蛋白酶、类胰蛋白酶和其他丝氨酸蛋白酶激活的蛋白酶激活受体家族的第 2 成员, 在缺血心肌细胞中高度表达<sup>[7]</sup>。但 PAR-2 与心肌自噬又是怎样的关系呢? 有研究发现, PAR-2 具有降低心肌梗死面积, 抑制 I/R 后心肌细胞凋亡, 其机制可能与 PAR-2 预处理调控核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65 和 C-myc 参与的细胞凋亡有关。其中 NF- $\kappa$ B p65 与自噬呈负相关, 通过促进 C-myc 去磷酸化与降解诱导自噬发生。故推测 NF- $\kappa$ B p65 和 C-myc 及其上游的调控因子 PAR-2 可能在心肌自噬过程中发挥重要的调控作用。亦有研究<sup>[8-9]</sup>提出, PAR-2 特异性激活剂 SLIGRL-NH<sub>2</sub> 能够显著缩小心肌梗死损伤面积, 保护心肌, 改善心脏功能; PAR-2 基因缺陷则会加重心肌梗死局部的损伤。提高 PAR-2 在心肌细胞的表达, 可能对于心肌细胞的存活具有重要意义。

一项肝细胞癌研究<sup>[10]</sup>发现, PAR-2 激动剂能够下调 mTOR 表达, 诱发肝癌细胞自噬; 相反, 表达增加的 mTOR 负反馈性抑制 PAR-2, 进而抑制肝癌细胞自噬。该研究提出, 通过调控 mTOR 是 PAR-2 发挥自噬性保护机制的有效方法之一。上述研究证明 PAR-2 能够作为自噬上游的调控因子直接抑制 mTOR 表达, 但在心肌组织 PAR-2 是否同样通过抑制 mTOR 表达, 上调缺血心肌自噬尚不清楚。有研究发现, PAR-2 能够在自噬过程中激活 AMPK, 进而抑制 mTOR<sup>[11]</sup>。因此, 在缺血心肌细胞中, PAR-2 介导的自噬可能对心肌具有保护作用。另有研究发现, 应用 PAR-2 激动剂能够通过上调 Bcl-2 mRNA 表达水平, 抑制凋亡, 减小 I/R 损伤<sup>[12]</sup>。这使 PAR-2 介导的自噬可能成为心肌 I/R 损伤新的治疗靶点。

## 4 PAR-2 介导的自噬与 I/R 损伤中的信号通路

### 4.1 AMPK-mTOR 信号通路

心肌缺血通过 AMPK 抑制 mTOR 激活是一个经典的饥饿诱导自噬过程<sup>[13]</sup>。AMPK 是由 3 个亚基( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )组成的三聚体酶, 为主要的细胞内能量传感器, 具有调节自噬作用。AMPK 激活自噬的作用机制可能涉及下调 mTOR 活性, 而 mTOR

被称为重要的负面自噬调节因子<sup>[14]</sup>。

AMPK 在营养缺乏、低氧、活性氧等应激情况下被激活。研究显示,在小鼠心肌细胞模型显性负相 AMPK 表达中,AMPK 介导的自噬在缺血时反应减弱,导致更大范围心肌梗死和心肌功能进一步损害;在再灌注时,自噬上调,AMPK 灭活。mTOR 属于磷脂酰肌醇 3 激酶蛋白激酶类家族,是许多调控自噬信号通路的交汇点<sup>[15]</sup>。在 I/R 诱导的自噬中,mTOR 的活性随自噬的情况而不断发生动态变化:自噬初期,mTOR 被抑制,不断诱导产生自噬;后期为防止自噬过多,mTOR 被激活,抑制自噬直至终止<sup>[16-17]</sup>。故 AMPK、mTOR 本身及其上、下游的信号分子与心肌 I/R 损伤的发生有密切关系。张军等<sup>[18]</sup>指出,活性氧类(reactive oxygen species, ROS)在疾病的发生发展中可能涉及与自噬相关的 mTOR,且 ROS 对 mTOR 起着双向调控,小剂量 ROS 激活 mTOR,大剂量 ROS 抑制 mTOR,但都存在时间和浓度依赖性。有研究显示,mTOR 抑制剂在早期的肾脏 I/R 损伤中有免疫调节作用,也能特异性促进自噬体与溶酶体融合,被当作自噬的激活剂<sup>[19-20]</sup>。同样,有观点提出 mTOR 抑制剂与细胞增殖减少及内皮细胞和成纤维细胞的血管生成有关,可能限制动脉粥样硬化,mTOR 可作为稳定动脉硬化的标志<sup>[21-22]</sup>。mTOR 抑制剂对心肌 I/R 后的作用目前尚不明确。有文献报道 ULK1 在自噬诱导中起着核心作用,mTOR 主要通过磷酸化和抑制 ULK1 负调节自噬功能;相反,AMPK 通过磷酸化和激活 ULK1 直接激活自噬;在心脏,缺血刺激自噬通过 AMPK 依赖机制,而再灌注阶段刺激自噬通过 Beclin 1-依赖机制,但 AMPK 是独立机制,故 AMPK-mTOR 通路被认为是自噬对饥饿反应的重要调节器,也参与改善大脑缺血损伤和保护神经细胞的存活<sup>[23-24]</sup>。综上,AMPK-mTOR 信号通路在心肌 I/R 中的作用及机制极其复杂,还有待进一步证实。

#### 4.2 Bcl-2-Beclin 1 信号通路

Beclin 1 由一种肿瘤抑制基因编码,与抗凋亡蛋白 Bcl-2 相关<sup>[25]</sup>。研究发现,自噬在心肌肥厚和心力衰竭中发挥重要作用,其中 Beclin 1 介导的自噬与心肌肥厚的发生发展无关,但与心力衰竭相关<sup>[26]</sup>。有研究指出,Beclin 1 在自噬中起正调控作用,基因转录水平的调控、Beclin 1 或 Bcl-2 的磷酸化修饰等是调控 Beclin 1 水平的主要因素,可能对 Beclin 1/Bcl-2 调控自噬/凋亡互反馈作用起关键作用。在 Beclin 1<sup>+/-</sup> 杂交小鼠中,I/R 后自噬体的数目明显降低,心肌梗死范围也明显下降,对心肌具有保护作用,表明 Beclin 1 与自噬呈正相关,其机制可能与 Bcl-2 抑制 Beclin 1 的表达,抑制自噬有关<sup>[27]</sup>。而 I/R 可导致 Bcl-2 的下调,可见 Bcl-2

下调能通过激活 Beclin 1 诱导自噬,引起细胞死亡<sup>[28]</sup>。研究显示,自噬相关蛋白 Beclin 1 基因在小鼠再灌注期间敲除,小鼠心肌细胞凋亡及心肌梗死面积均减少,且心脏中 Bcl-2 过表达可减轻饥饿诱发的自噬,这可能与 Bcl-2 的表达能对抗凋亡及抑制 Beclin 1 而防止自噬过度活化有关<sup>[29]</sup>。Beclin 1 具有 1 个卷曲螺旋的结构域,可介导 Beclin 1 与 III 型 PI3K-Vps34 结合,增强心肌自噬,但 Beclin 1 的 BH3 结合位点可结合到 Bcl-2 亲水的凹槽中,结合后对 III 型 PI3K 亲和力下降,减轻心肌自噬,当 Beclin 1 发生 BH3 突变或其他变化时,Bcl-2 不能与 Beclin 1 相互作用而失去自噬的抑制作用,故可在再灌注期间通过增加 Beclin 1 与抗凋亡因子 Bcl-2 的相互作用而发挥心肌保护作用。因此,有观点提出调控自噬可作为减轻 I/R 损伤的有效治疗方法之一<sup>[30]</sup>。但仍需要大量基础实验及临床实验去验证。

#### 5 展望

目前 PAR-2 介导的自噬在心肌 I/R 阶段的作用机制尚不清楚,PAR-2 在心肌缺血阶段的 AMPK-mTOR 信号通路及再灌注阶段的 Bcl-2-Beclin 1 信号通路或许是 I/R 过程中重要的有效机制,可能为进一步探索 I/R 损伤的有效治疗新靶点提供临床依据。

#### 参考文献

- [1] Montecucco F, Carbone F, Schindler TH. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments[J]. *Eur Heart J*, 2015, 23(6): 221-228.
- [2] 陈富华, 张明芳, 齐元麟. 细胞自噬在心血管病发病过程中的作用[J]. *海峡药学*, 2016, 28(10): 80-84.
- [3] Weiner LM, Lotze MT. Tumor Cell Death, Autophagy, and Immunity[J]. *New Engl J Med*, 2012, 366(12): 1156-1158.
- [4] Masui A, Hamada M, Kameyama H, et al. Autophagy as a Survival Mechanism for Squamous Cell Carcinoma Cells in Endonuclease G-Mediated Apoptosis[J]. *Plos One*, 2016, 11(9): 1-19.
- [5] Huang C, Yitzhaki S, Perry CN, et al. Autophagy Induced by Ischemic Preconditioning is Essential for Cardioprotection[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(4): 365-373.
- [6] Kanke T, Takizawa T, Kabeya M, et al. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2 as a potential therapeutic target[J]. *J Pharmac Sci*, 2005, 97(1): 38-42.
- [7] Antoniak S, Sparkenbaugh EM, Tencati M, et al. Protease Activated Receptor-2 Contributes to Heart Failure[J]. *Plos One*, 2013, 8(11): 81733-81740.
- [8] 吴学富, 黄晏, 李万鹏. 蛋白激酶受体-2 对急性心肌梗死大鼠细胞间粘附分子、单核细胞趋化蛋白表达的影响

- 响[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(7): 876—878.
- [9] 刘阳, 李莉. PAR-2 对心肌缺血再灌注损伤大鼠 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学, 2012, 32(3): 548—549.
- [10] Chen KD, Wang CC, Tsai MC, et al. Interconnections between autophagy and the coagulation cascade in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2): 1244—1251.
- [11] Wang J, Chakrabarty S, Bui Q, et al. Hematopoietic Tissue Factor-Protease-Activated Receptor 2 Signaling Promotes Hepatic Inflammation and Contributes to Pathways of Gluconeogenesis and Steatosis in Obese Mice [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(2): 524—535.
- [12] Tong XH, Ding JW, Yang J, et al. The effect of protease-activated receptor 2 on rat apoptotic cardiomyocytes underwent ischemia reperfusion injury [J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2009, 37(9): 832—836.
- [13] Mao K, Klionsky DJ. AMPK Activates Autophagy by Phosphorylating ULK1 [J]. *Circ Res*, 2011, 108(7): 787—788.
- [14] Harhajitrajkovic L, Vilimanovich U, Kravicstevovic T, et al. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9): 3644—3654.
- [15] Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(12): 244—250.
- [16] 高荣敏, 马慧萍. 缺血缺氧状态下细胞自噬相关分子机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(7): 1153—1156.
- [17] 吴宥熹, 徐俊, 刘立亚, 等. PI3K-Akt-mTOR 信号通路介导的细胞自噬在荜草昔抗大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, (1): 20—24.
- [18] 张军, 谷翔, 黄问银, 等. ROS 调节 mTOR 信号通路参与自噬的研究进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(12): 1266—1270.
- [19] Kezic A, Becker JU, Thaiss F. The Effect of mTOR-Inhibition on NF- $\kappa$ B Activity in Kidney Ischemia-Reperfusion Injury in Mice [J]. *Transpl Proceed*, 2013, 45(5): 1704—1708.
- [20] 魏景迅, 徐会圃, 程艳丽, 等. 凋亡和自噬在氧化应激所致心肌细胞损伤中的作用 [J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(3): 308—313.
- [21] Charmillon A, Deibener J, Kaminsky P, et al. Angioedema induced by angiotensin converting enzyme inhibitors, potentiated by m-TOR inhibitors: successful treatment with icatibant [J]. *Intens Care Med*, 2014, 40(6): 893—894.
- [22] Zeier M, Van DGM. Calcineurin inhibitor sparing regimens using m-target of rapamycin inhibitors: an opportunity to improve cardiovascular risk following kidney transplantation? [J]. *Transpl Int*, 2011, 24(1): 30—42.
- [23] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914—922.
- [24] Fu L, Huang L, Cao C, et al. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy [J]. *Brain Res*, 2016, 16(50): 103—111.
- [25] Codogno P. Shining light on autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 153—154.
- [26] 李燕辉, 刘磊, 邹曼. 探讨心力衰竭不同阶段自噬水平变化 [J]. *临床心血管病杂志*, 2017, 33(4): 376—380.
- [27] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 927—939.
- [28] Grünfelder J, Miniati DN, Murata S, et al. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts [J]. *Circulation*, 2001, 104(12): 202—206.
- [29] Efeyan A, Zoncu R, Chang S, et al. Rag GTPase-mediated regulation of mTORC1 by nutrients is necessary for neonatal autophagy and survival [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 679—683.
- [30] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914—922.

(收稿日期: 2017-10-19)