

低氧与心肌细胞凋亡

董建文 朱卫中 周兆年*

(中国科学院上海生命科学研究院, 低氧生理实验室, 上海 200031)

摘要 细胞凋亡是心肌细胞低氧损伤的主要死亡形式之一。低氧引起心肌细胞凋亡可以通过外部的死亡受体通路以及内部的线粒体通路, 两条通路之间又存在复杂的交互作用, 其中, 线粒体通路在低氧诱导的心肌细胞凋亡中起重要作用。另外, 心肌细胞本身也具有多种内源性的凋亡抑制因子。因此, 低氧时心肌细胞凋亡的产生是多种因素综合作用的结果, Bcl-2 家族蛋白、线粒体通透性改变、细胞色素 *c* 的释放以及 caspases 的活化等参与了低氧引起的心肌细胞凋亡的调控。对低氧时心肌细胞凋亡的认识和深入研究, 为人类在缺血性心脏病的防治中提供了一个新的治疗措施。

关键词 低氧; 心肌细胞; 细胞凋亡

低氧可对机体产生各种损害, 并是缺血性心脏病产生的主要机制。以前认为心肌细胞是终末分化细胞, 在多种病理状态下, 如心肌缺血再灌注损伤、心肌肥大、心肌衰竭等病理过程中, 心肌细胞的损伤和死亡主要通过细胞坏死(necrosis)。但近年来已证明细胞凋亡在多种心脏疾病中也有着重要意义。无论是持续性心肌缺血或缺血后再灌注期均已观察到心肌细胞的凋亡现象。

1 心肌低氧、缺血和 / 或再灌注引起细胞凋亡

细胞死亡分为细胞坏死和细胞凋亡。坏死是一种以细胞膜损伤为特征的被动死亡过程, 可以引起明显的炎症反应; 细胞凋亡是指细胞在自身基因调控下, 启动其内部机制而发生的一种主动性死亡的过程, 不引起炎症反应。凋亡细胞的特征表现为核固缩、染色质聚集、染色质 DNA 片段化、胞质浓缩、凋亡小体的形成等。

关于缺血 / 再灌注引起的心肌细胞凋亡最初见于 1994 年 Gottlieb 等^[1]的报道, 他们在家兔离体心脏灌流模型中发现, 缺血 30 min 后再灌注 4 h 出现心肌细胞凋亡, 心肌细胞呈现 DNA 梯状现象及核染色质浓缩, 提示心肌细胞凋亡是再灌注心肌损伤的主要特征之一, 并可能与自由基诱发有关。随后越来越多的动物实验和临床病理标本均证实细胞凋亡

的产生。持续钳夹大鼠冠状动脉 2.25 h 后, 可见心肌细胞凋亡的特征性标志^[2]。在狗心肌中, 经过 90 min 缺血然后给予 6 h 再灌注, 有 8% 的心肌细胞显示凋亡细胞阳性染色。最近有研究发现, 离体大鼠心脏缺血 30 min 无明显的细胞凋亡出现, 但再灌注使心肌细胞凋亡显著增加, 应用 p38 MAPK 抑制剂可显著减少缺血 / 再灌注引起的细胞凋亡, 同时改善缺血后的心肌收缩功能^[3]。6 h 低氧培养的成年大鼠心肌细胞复氧 18 h 后表现出明显的细胞凋亡特征: 核染色质凝聚、边移, 染色质 DNA 梯现象, 并与线粒体细胞色素 *c* 的释放、caspase 的活化有关^[4]。有研究表明单纯严重低氧并不引起细胞凋亡, 但在酸中毒的情况下, 细胞凋亡可以大量产生^[5]。Saraste 等^[6]研究了 8 例死于心肌梗塞的人体心肌标本, 其中有 6 例患者接受过成功的溶栓疗法, 2 例病理检查显示出出血性梗死, 提示有自发性内膜下缺血再灌注损伤, 通过原位末端标记方法检测到典型的细胞凋亡生化特征, DNA 片段化广泛形成。心肌细胞凋亡特别是在梗死心肌的周围区域, 认为除了坏死, 在心肌缺血 / 再灌注损伤中还有细胞凋亡参与病变成形。

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-04-05

国家自然科学基金(No.30393130)和上海市科委基础研究基金(No.02JC4038)资助项目

* 通讯作者。 Tel: 021-54920305, Fax: 021-54920306, E-mail: znzhou@server.shnc.ac.cn

对于缺血/再灌注期间细胞凋亡产生的时相目前仍存在争议。许多学者认为单纯低氧或缺血并无明显的细胞凋亡出现,但是再灌注过程中,细胞凋亡明显增加。Zhao 等^[7]的工作表明,持续 7 h 夹闭犬冠状动脉左前降支,心肌梗死面积达 $(72\pm 5)\%$,而在坏死区心肌 TUNEL 阳性细胞只有 $(0.2\pm 0.1)\%$,也没有 DAN 梯出现,表明持续性缺血性细胞死亡主要由坏死引起;而在缺血(1 h)再灌注(6 h)组心肌 TUNEL 阳性细胞数显著增加至 $(26\pm 4)\%$,同时出现 DNA 梯状改变。Gottlieb 等^[1]的研究也发现,单纯缺血不会引起家兔心肌细胞出现凋亡细胞的特征性改变:DNA 片段化只在缺血后再灌注心肌出现。

另外一些学者则发现,细胞凋亡在缺血早期即有发生,再灌注可以加剧细胞凋亡的产生或者对细胞凋亡无明显影响。许多研究显示,冠状动脉梗阻 2 h 即可引起大鼠心肌细胞凋亡;缺血 45 min 后再灌注 1 h 可加剧细胞凋亡,提示单纯缺血和缺血后再灌注均可诱发细胞凋亡^[2,8]。也有工作表明单纯缺血即可引起凋亡早期的特征性改变:心肌细胞磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺的转位,而凋亡的执行步骤直到再灌注的后期才出现。而 Taimor 等^[9]在成年大鼠心肌细胞无氧/复氧损伤模型中发现,无氧/复氧损伤主要引起细胞坏死,细胞凋亡产生的比例非常低。上述结果的差异可能与动物种属、年龄(新生、成年)、缺血和/或再灌注的时间、低氧的严重程度和持续时间,以及其他实验条件的差异等有关。

2 低氧引起细胞凋亡的信号转导途径

心肌缺血缺氧和/或再灌注时,由于能量缺失、ATP 耗竭、细胞酸化、钙超载、氧自由基的大量产生等直接或间接触发细胞凋亡的产生。细胞的凋亡有两个独立的途径,一个是外部的,通过死亡受体,一个是内部的,通过线粒体。这两个途径并不是孤立存在的,具有交互作用即 cross-talk,并在激活 caspase 水平会进行会聚。这些通路在不同的水平还受到多种调控因子的作用,其中 Bcl-2、热休克蛋白(HSP)、cFLIP(cellular FADD-like inhibitory protein)、IAP(inhibitor of apoptosis)和 ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain)等通过不同的环节抑制凋亡的产生,而 Bax、Bad 和 Bid 等则可以促进凋亡的发生。因此,细胞凋亡的调控是一个复杂的网络,多种分子共同作用的最

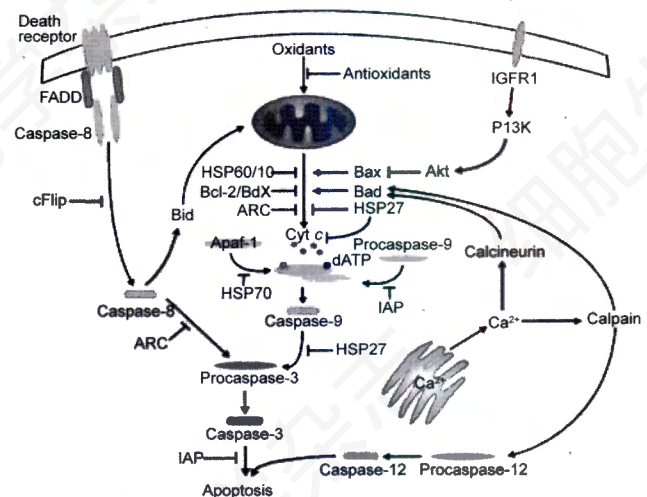


Fig.1 Scheme of apoptosis pathway including extrinsic death receptor pathway and intrinsic mitochondrial pathway^[10]

终结果决定细胞的生存命运(图 1)^[10]。

2.1 外部死亡受体通路

即由 Fas 和 TNFR-1 介导的通路。心肌细胞也表达 Fas 和 TNFR-1,并可被低氧、复氧、NO、过氧化物等多种氧化应激诱导。

Tanaka 等^[11]在培养的新生鼠心肌细胞中发现,细胞凋亡在低氧 12 h 即可出现,并随低氧时间的延长逐渐加重,同时 Fas mRNA 的表达也明显增加。Jeremias 等^[12]利用离体大鼠和小鼠 Langendorff 灌流模型发现,缺血后再灌注可引起 caspase 依赖的细胞凋亡产生,同时 CD95 配体/Fas 配体以及 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)合成和释放增加,而在缺乏功能性 CD95 的小鼠,缺血再灌注后凋亡的细胞数明显少于野生型小鼠。低氧刺激也增加培养的成年大鼠心肌细胞对 CD95 配体的致凋亡效应的敏感性。最近利用腺病毒构建含 FADD(Fas-associated death domain)的载体,结果发现 FADD 和 caspase-8 的活化在缺氧和血清缺乏引起的新生鼠心肌细胞凋亡中发挥关键作用^[13]。

2.2 内部线粒体通路

目前已知细胞色素 c、AIF(apoptosis initiating factor)、caspase-2,-3,-9 等凋亡诱导相关蛋白分布于线粒体,当这些蛋白质释放入胞浆即可启动凋亡的产生。其中,细胞色素 c 从线粒体释放入胞浆被认为是各种死亡模型诱导细胞凋亡中的重要环节。一旦胞浆中出现细胞色素 c,其可与 procaspase-9 和 APAF-1 形成凋亡小体,激活 caspase,诱导凋亡的产生。在心肌细胞,血清和葡萄糖的缺失、氧化

应激、G α_q 蛋白信号通路的活化等可启动“内源性”通路。大多数观点认为,低氧对心肌细胞凋亡的影响主要是通过线粒体途径,线粒体功能和结构正常与否是决定细胞生存还是死亡以及通过细胞坏死还是细胞凋亡而死亡的关键因素^[10]。主要依据如下:

(1) 哺乳动物心肌细胞线粒体约占其总体积的30%。因此,线粒体功能或膜电位的轻微变化即可影响心肌细胞的能量代谢,并最终影响细胞的生存。各种损伤和应激因素可直接影响线粒体结构、膜电位和氧化代谢能力,这些均与线粒体基质和膜蛋白(如细胞色素 *c*)含量的不可逆损失有关。

(2) 线粒体是真核细胞的重要细胞器。近年来发现线粒体跨膜电位与线粒体通透性改变在细胞凋亡过程中起重要作用,并提出了“线粒体通透性改变孔道复合物”(mitochondria permeability transition pore complex)的假说。陆续有报道说明线粒体跨膜电位的丧失早于核酸酶的激活,也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面。而一旦线粒体跨膜电位丧失,细胞就会进入不可逆的凋亡过程。在细胞凋亡过程中,线粒体跨膜电位丧失主要是由于线粒体内膜的通透性转变,这是由于生成了动态的由多个蛋白质组成的位于线粒体内膜与外膜接触位点的通透性转变孔道(PT孔)。PT孔道由线粒体各部分的蛋白质与细胞质中蛋白质联合构成。PT孔道可通过使线粒体跨膜电位耗散(线粒体跨膜电位是线粒体电化学梯度重要的组成部分,是线粒体呼吸链氧化磷酸化和ATP的合成正常进行所需要的前提条件)、大量Ca²⁺和凋亡相关蛋白释放等多种方式调控细胞凋亡。最近的研究显示利用 cyclosporin A 抑制线粒体PT的开放,可防止心肌缺血造成的线粒体功能障碍,细胞色素 *c* 的释放, caspase 的活化,同时凋亡的细胞数明显减少^[14]。

(3) 细胞死亡调节蛋白。无论是抑制死亡的 Bcl-2, 还是促进细胞死亡的 Bax, 均以线粒体作为靶细胞器。高表达 Bcl-2 能防止线粒体膜电位的丧失, 而高表达 Bax 则导致线粒体膜电位的丧失。

(4) 细胞色素 *c* 的释放被认为是 caspase 级联不可逆激活的关键步骤。已普遍认为是启动缺氧/复氧诱导细胞凋亡的重要因素之一。Bcl-2 高表达可以完全阻断复氧期间细胞色素 *c* 释放及 caspase-3、-9 活化而阻止凋亡发生, 也能保持缺氧/复氧细胞线粒体成份完整, 促使复氧期间利用底物而促进 ATP 再

生^[15]。Bax 高表达则导致线粒体跨膜电位崩溃, PT孔开放及细胞色素 *c* 释放入胞质。其促细胞色素 *c* 释放机制尚不完全清楚。缺氧/复氧细胞 ATP 耗竭情况下, Bax 易位到线粒体, 这一过程不受 caspase 抑制剂的影响。caspase 抑制剂可完全抑制由缺血引起的心肌细胞凋亡, 但只能部分抑制细胞色素 *c* 的释放, 这提示细胞色素 *c* 的释放和随后的 caspase-3 的活化是线粒体 PT 孔开放的结果, 而 caspase 的活化, 可反馈地增加细胞色素 *c* 的释放, 进一步加剧线粒体功能障碍, 参与细胞凋亡甚至细胞死亡的发生^[14]。

3 参与低氧细胞凋亡的调制剂(modulator)

3.1 Bcl-2 家族蛋白

Bcl-2 家族中的 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w 可抑制细胞凋亡, 而 Bax、Bad、Bak 和 Bcl-Xs 则促进细胞凋亡。通常认为 Bcl-2 家族成员之间的相互作用在凋亡的调控中发挥着重要的作用。例如, Bax 可以形成同源二聚体加速细胞死亡, 而与 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成的异聚体可以抑制细胞死亡。因此, Bcl-2 和 Bax 之间的比例改变可能降低 Bcl-2 的抑制缺血后心肌细胞凋亡的作用。

正常情况下, Bcl-2、Bcl-xL 主要位于线粒体, 而 Bad 和 Bax 主要存在于细胞浆中, 低氧和氧化应激后, 可引起 Bad、Bax 转位至线粒体, 同时低氧和缺血损伤可引起 Bcl-2 和 Bcl-xL 的下调或降解, 最终引起线粒体膜电位的下降, 增加线粒体细胞色素 *c* 的释放, 引起 caspase 的级联活化^[15,16]。

临床研究显示, 在围绕梗死组织周边的被挽救的心肌组织中有 Bcl-2 表达阳性的心肌细胞存在。Bax 只在梗死区心肌组织表达。Nakamura 等^[17]的工作表明缺血和再灌注并不影响缺血后心肌 Bcl-2 的表达, 但 Bax 表达的增加改变了 Bcl-2 和 Bax 的比例, 因此促进细胞死亡。而缺血预处理通过上调心肌 Bcl-2 的表达而抑制细胞凋亡。乳鼠心肌细胞过量表达 Bcl-2 可显著抑制缺氧/复氧引起的细胞凋亡及细胞色素 *c* 的释放、caspase 的活化^[15]。最近的研究证实, 高表达 Bcl-2 的转基因小鼠心脏, 缺血再灌注后细胞凋亡的产生明显减少, 同时缺血后心肌功能的恢复明显改善^[18]。间歇性低氧适应可增加 Bcl-2 的表达, 减少 Bax 的表达, 从而减少线粒体细胞色素 *c* 的释放, 减少缺血/再灌注引起的心肌细胞凋亡^[19]。上述这些结果表明低氧/缺血损伤可通过下

调 Bcl-2 和 / 或上调 Bax 的表达而引起细胞凋亡。

BNIP₃ 是一个新近被人们认识到的 Bcl-2 家族蛋白, 参与了低氧和细胞酸化引起的心肌细胞凋亡。研究发现, 新生大鼠和成年大鼠心肌细胞接受低氧刺激后, BNIP₃ mRNA 和蛋白质表达增加, 而且这些内源性 BNIP₃ 主要位于线粒体膜上, 并参与低氧引起的线粒体 PT 的开放, 并与细胞凋亡的产生相关^[20,21]。

3.2 p53

p53 是低氧诱导凋亡发生的一个介导因子, 其蛋白质水平在有 DNA 损伤和低氧的情况下上升。有报道在低氧状态下培养的新生鼠心肌细胞中可以使 p53 的量明显增加, 而在常氧下培养的心肌细胞如果出现 p53 的过分表达则可导致凋亡的发生^[22]。Webster 等^[5]报道, 培养的新生大鼠心肌细胞缺氧 / 复氧诱导的细胞凋亡与 p53 无关, 与以前的报道相反。他们进一步利用野生型和 p53 基因剔除小鼠的心脏灌注模型中证明, 缺血 / 再灌注诱导的细胞凋亡不需要 p53 的表达。另外, 低氧可增加低氧诱导因子(HIF-1 α)的水平, 而后者可起到稳定 p53 的作用, p53 可激活 Bax 而诱导细胞色素 c 的释放^[23]。

3.3 凋亡抑制因子

心脏需依赖葡萄糖、脂肪酸和酮体的氧化磷酸化提供能量, 来维持其正常的泵血功能。相对而言, 心肌细胞线粒体占细胞总体积的比例较高, 由于线粒体在细胞凋亡中的重要作用, 这可能使心肌细胞更易发生细胞凋亡。而短暂的心肌缺血和心脏手术过程中的心脏麻痹均可引起心肌线粒体在早期发生形态改变。心脏为了消除这种永久的威胁, 心肌细胞可能形成某种特殊的抗凋亡机制, 如线粒体结构功能的改变, 使促凋亡因子释放减少, 或心肌本身表达某种强大的抗凋亡的“先锋”(safeguards)。另外, 虽然多种损伤可引起心肌细胞凋亡, 但是细胞凋亡产生的比率依然很低。在心肌 H9c2 细胞的研究发现, 单纯 48 h 低氧并不引起明显的细胞凋亡, 但低氧刺激可以增加血清撤除的致凋亡作用^[24]。以前的研究也显示只有长期严重低氧才可使新生鼠心肌细胞出现细胞凋亡。这些现象均提示心肌细胞本身存在内源性的保护机制, 具有抵抗低氧致细胞凋亡的作用。

心肌本身具有一些内源性凋亡抑制因子, 如 cFLIP、IAP、ARC 和某些 HSP, 它们可以通过结合 caspase 或者直接抑制 caspase 而抑制凋亡的产

生。有观点认为, 新生或胚胎心肌细胞这些内源性凋亡抑制因子的水平较高, 这可以部分解释为什么新生或胚胎心肌细胞具有较好的抗低氧损伤的能力。在这些内源性的凋亡抑制因子中, ARC 主要表达于骨骼肌和心肌细胞, 可与 caspase 结合而抑制凋亡的产生。有研究显示新生和成年大鼠心肌细胞均表达 ARC, 来源于大鼠胚胎心脏的 H9c2 细胞在低氧条件下去血清培养后, 胞浆 ARC 水平下降, 同时出现线粒体细胞色素 c 释放增加, caspase 的活化, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)被切割, DNA 片段化; 过表达 ARC 的 H9c2 细胞则可抑制低氧引起的上述变化^[25]。

4 问题与展望

总之, 细胞凋亡是心肌缺血低氧损伤病变中的主要死亡形式之一。明确该事实, 对临床治疗和预防缺血缺氧损伤, 寻求如何保护心肌的措施开拓了思路。低氧时心肌细胞可通过外部的死亡受体途径和内部的线粒体途径发生凋亡, 但其确切机制仍未阐明, 还有许多问题亟待解决。阐明心肌细胞凋亡诱导因子、心肌细胞死亡的信号转导通路及死亡通路级联中关键性调节点的作用机制, 寻找对这些关键性调节点有特异性抑制作用并具有药理价值的药物或采取其他措施, 以更好地减少心肌细胞凋亡, 保护心脏功能, 具有重要的临床应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Gottlieb RA et al. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1621
- [2] Fliss H et al. *Circ Res*, 1996, **79**: 949
- [3] Ma XL et al. *Circulation*, 1999, **99**: 1685
- [4] Kang PM et al. *Circ Res*, 2000, **87**: 118
- [5] Webster KA et al. *J Clin Invest*, 1999, **104**: 239
- [6] Saraste A et al. *Circulation*, 1997, **95**: 320
- [7] Zhao ZQ et al. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**: 651
- [8] Kajstura J et al. *Lab Invest*, 1996, **74**: 86
- [9] Taimor G et al. *Cardiovasc Res*, 1999, **41**: 147
- [10] Gill C et al. *FASEB J*, 2002, **16**: 135
- [11] Tanaka M et al. *Circ Res*, 1994, **75**: 426
- [12] Jeremias I et al. *Circulation*, 2000, **102**: 915
- [13] Chao W et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 31639
- [14] Borutaite V et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, **35**: 357
- [15] de Mossac D et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32**: 53
- [16] Cook SA et al. *Circ Res*, 1999, **85**: 940
- [17] Nakamura M et al. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**: 661
- [18] Chen Z et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280**: H2313
- [19] Dong JW et al. *Cell Res*, 2003, **13**: 385
- [20] Regula M et al. *Circ Res*, 2002, **91**: 226
- [21] Kubasiak LA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12825

- [22] Long X *et al. J Clin Invest*, 1997, **99**: 2635
[23] An WG *et al. Nature*, 1998, **392**: 405

- [24] Bonavita F *et al. FEBS Lett*, 2003, **536**: 85
[25] Ekhterae D *et al. Circ Res*, 1999, **85**: e70

Hypoxia and Apoptosis in Cardiac Myocytes

Jian-Wen Dong, Wei-Zhong Zhu, Zhao-Nian Zhou*

(*Physiological Laboratory of Hypoxia, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

Abstract Apoptosis is one of the major forms of cardiac myocytes death caused by hypoxia. Cardiomyocytes apoptosis induced by hypoxia may follow via the extrinsic death receptor pathway and intrinsic mitochondrial pathway, with complex crosstalk between the two pathways. And, the latter plays an important role. In addition, there are a variety of endogenous inhibitors of apoptosis in cardiomyocytes. Therefore, cardiac myocytes apoptosis induced by hypoxia are the result of multi-factors interaction. Many factors, such as Bcl-2 family proteins, mitochondrial permeability transition, cytochrome *c* release and caspases activation, are involved in hypoxic cardiomyocytes apoptotic regulation. It is hoped that a better understanding of the pathways of apoptosis induced by hypoxia and their regulations may yield novel therapeutic targets for ischemic heart diseases.

Key words hypoxia; cardiomyocyte; apoptosis

Received: March 5, 2004 Accepted: April 5, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30393130) and the Grant (No.02JC14038) from Science and Technology Committee of Shanghai Municipality

*Corresponding author. Tel: 86-21-54920305, Fax: 86-21-54920306, E-mail: znzhou@server.shnc.ac.cn