

自噬信号通路在冠脉支架后血管狭窄中的研究进展

邵磊¹,赵春燕¹,王贤良²

(天津中医药大学第一附属医院介入治疗中心¹,心内科²,天津 300192)

摘要:血管支架术后再狭窄是严重影响心脑血管患者预后的重要因素,自噬信号通路等发挥了重要的作用。本文对自噬信号通路在支架术后再狭窄过程中的可能作用及其机制进行综述。

关键词:支架;狭窄;自噬

中图分类号:R392

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.21.009

文章编号:1006-1959(2018)21-0028-05

Progress of the Research on Autophagy Signal Pathway in Coronary Artery Stenosis after Stent

SHAO Lei¹,ZHAO Chun-yan¹,WANG Xian-liang²

(Interventional Treatment Center¹,Department of Cardiology²,the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine,Tianjin 300192,China)

Abstract:Restenosis after stenting is an important factor affecting the prognosis of cardiovascular and cerebrovascular patients, and autophagy signaling pathway plays an important role. This paper reviews the possible role and mechanism of autophagy signaling pathway in restenosis after stenting.

Key words:Stent;Stenosis;Autophagy

进入 21 世纪以来,经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention,PCI)在我国心脑血管疾病治疗中的应用日益广泛,据文献报道,2013 年全国完成 PCI 手术 454505 例^[1]。然而,PCI 术后有 20%~30% 患者发生血管再狭窄,是影响心血管介入治疗更好发展的最大问题^[2,3]。支架内再狭窄(in-stentrestenosis,ISR)是指支架植入后 6~9 个月冠状造影发现其官腔直径狭窄 $\geq 50\%$,其病理机制目前仍然是临床及实验研究争论的焦点,也是心血管领域的研究热点。研究表明,血管支架置入后多种因素导致血管新生内膜的增生以及血管重构^[4]。近年来国内研究人员发现,血小板源性生长因子、炎症因子在损伤部位聚集等因素都参与了 ISR 的病理过程^[5],以及自噬信号通路(autophagy singaling pathway)在其病理机制中也发挥了重要的作用^[6]。本文对自噬信号通路在血管支架术后再狭窄过程中的作用及其机制进行综述,以期为临床上积极防治血管支架术后再狭窄提供更多理论支持。

1 血管支架术后再狭窄病理机制

ISR 是由于异常的伤口愈合反应或是动脉血管对血运重建期间诱发的创伤适应的不良反应,是机体对损伤的一种过度的愈合反应^[7]。其病理过程包

括:新生内膜增生,即内膜增厚和血管重构。以往研究表明在支架植入过程后冠状动脉内皮细胞受损,胶原组织暴露,引起血小板集聚和血栓形成;冠状动脉粥样斑块破裂,脂质体暴露,这些因素综合作用,导致血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖并向内膜下迁移,以及合成大量细胞外基质使血管内膜增厚,管腔狭窄(新生的血管内膜主要由 VSMC 和细胞外基质组成)^[8]。针对 ISR 的病理改变如抑制血栓形成、改善内皮功能、抑制新生内膜过度增生的机制研究受到研究人员的广泛重视。

1.1 血管内膜增生的病理机制 血管内膜增生是指血管成形术中的内皮损伤或剥脱,并由一系列炎症因子、游离氧自由基和促有丝分裂和趋化因子参与的病理过程。血管内膜增生由多种细胞参与,如血管内皮细胞(vascular endothelial cells,VEC)、循环祖细胞(circulating progenitor cells,CPC)、和单核或者巨噬细胞^[9]。目前研究详细的揭示了不同亚型的血管细胞参与血管支架术后再狭窄,特别是内皮细胞向间充质细胞转分化(endothelial-to-mesenchymal transition,EndMT)。在正常心血管发育过程中,EndMT 发挥了重要作用。但在病理情况下,外界刺激使血管内皮细胞丧失正常形态,且其表面的特殊性标记物改变,获得了间质细胞的能力及表型^[10]。其在血管损伤过程中可被再次激活,参与血管损伤修复、组织再生等,同时其也存在于肝组织纤维化和癌

基金项目:天津市科技计划项目(编号:15ZXLCZY00020)

作者简介:邵磊(1980.12-),男,天津人,本科,主管技师,研究方向:心脑血管介入治疗

症等疾病中。

1.2 血管重构病理机制 血管重构是指外界刺激诱导血管壁的各种血管细胞重组及重排,其过程是代偿性的,导致血管管壁增厚,管腔变窄^[11]。重构过程中通常伴有新生内膜增生,并且通过血管损伤过程中的炎症反应释放蛋白水解酶诱发,例如金属蛋白酶(MMPs)等,从而导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解,并引起新的外基质沉积。同时,血管平滑肌细胞异常增殖也是导致血管重构的关键因素^[12]。研究表明,在动物实验中也观察到自噬血管支架术后血管重构中发挥了重要影响^[13]。

2 自噬信号通路和血管支架术后再狭窄

2.1 自噬信号通路概况 通常认为,溶酶体在细胞内的主要功能是降解以胞吞或者吞饮方式进入细胞的外部物质。溶酶体降解胞内成分(蛋白质和细胞器)的过程,称之为自噬。然而,越来越多的证据表明自噬在人类疾病的发生、发展中也发挥了重要作用,自噬参与多种疾病的调控机制,包括癌症,神经退行性疾病,心血管疾病及炎症等。更为重要的是在营养剥夺、缺氧以及应激等情况下,细胞通过自噬作用再利用细胞质的代谢成分可以维持细胞存活^[14]。自噬与血管平滑肌异常增殖密切相关。有研究表明,他汀类药物洗脱支架,通过增强巨噬细胞自噬,抑制血管内皮细胞增生以及平滑肌细胞增殖进而改善血管支架后再狭窄^[15]。自噬是一个进展性的过程,通过一系列蛋白重组和细胞内的膜易位来完成。其每个阶段由不同的自噬蛋白参与调控作用。自噬蛋白是由自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)编码,Atg 首先在低等有机体(酵母)研究中发现并命名,在哺乳动物中也同样发现存在这些基因的同源染色体。复杂的细胞信号调控网络中 Atg 基因产物相互作用,进而调控自噬的起始和执行。Salabei JK 等^[16]人在离体实验中发现,分离大鼠主动脉血管平滑肌细胞培养,给予钙离子通道阻断剂维拉帕米(Verapamil)增强平滑肌细胞中 Atg5 表达增高,Atg5 蛋白是 Atg12-Atg5-Atg16L1 复合物的一部分,其定位于自噬体前体并在自噬体形成中起重要作用,诱导平滑肌细胞自噬水平升高,抑制增殖。结果表明给予维拉帕米和其他钙离子通道阻断剂激活血管平滑肌细胞的自噬机制,有助于提高对术后再狭窄的治疗效果。

2.2 自噬过程 自噬过程主要包括 4 个阶段:起始阶段、聚集阶段、延长阶段和融合阶段。

2.2.1 起始阶段 由外界环境刺激,如营养剥夺或缺氧所致的内质网应激、线粒体损伤、活性氧(reactive oxygen species, ROS)积聚等细胞损伤均可引起自噬诱导信号的激活和聚集响应,通过雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)-ULK1(uncoordinated-51-like protein kinase)(在酵母中为 Atg1)途径调控自噬发生。mTOR 是主要调控蛋白之一。mTOR 的激活和抑制受多种途径调控。Sakuma 等^[17]分离人血管支架术后再狭窄部位的血管平滑肌细胞给予 rapamycin 培养 3 d 后检测细胞增殖及细胞周期的变化,结果表明,与单独培养血管平滑肌细胞相比,给予 rapamycin 后抑制细胞增殖,阻滞细胞周期,改善血管重构。表明抑制 mTOR 通路的激活,继而激活血管平滑肌细胞自噬,可以改善血管支架术后再狭窄部位重构的发生。

2.2.2 聚集阶段 启动“隔离膜”的形成,研究认为这种“隔离膜”来源于内质网和高尔基体的部分双层膜结构^[18],并需要Ⅲ型磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)调控。Vps34(vacuolar protein sorting protein 34),一种Ⅲ型 PI3K,可与多种蛋白相互作用调控自噬。Beclin1(Bcl-2 相互作用蛋白,酵母中为 Atg6)作为调控自噬聚集的主要因子,与 Vps34 结合激活自噬;新发现的 Rubicon 蛋白通过与 Vps34 不同的结构域结合抑制自噬发生^[19]。Tang B 等^[20]研究表明,给予依维莫司增强血管平滑肌中自噬蛋白 Beclin1 的表达,抑制细胞增殖和诱导凋亡的能力,有助于治疗血管再狭窄。这些研究表明,激活自噬泡的形成可以增强血管平滑肌细胞的凋亡,抑制细胞增殖。

2.2.3 延长阶段 隔离膜向周围延伸形成双层膜结构的自噬小体或者完整的自噬泡,并且吞噬细胞质中的蛋白质和细胞器^[21]。成熟的自噬小体也可以与细胞内的吞噬泡、吞饮泡和胞内液泡(核小体)融合形成自噬内涵体(amphisomes)。在自噬体形成的延伸阶段,由两类泛素化结合系统共同调控。第 1 类系统,由泛素化蛋白 Atg12 通过 Atg7(E1 泛素活化酶样蛋白)和 Atg10(E2 泛素交联酶样蛋白)介导与 Atg5 结合形成 Atg12-Atg5 复合物,该复合物再与 Atg16L 结合,参与自噬膜的延伸过程。第 2 类系统

则需要通过泛素化蛋白:微管相关蛋白-1 轻链 3 (microtubule-associated protein-1 light chain-3, LC3; 酵母中为 Atg8) 发挥作用。Atg8 的同源染色体包括 LC3 及其相关蛋白。LC3 一般在哺乳动物中有两种编码基因:LC3A/LC3B。LC3 可被细胞内的脂质磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE) 激活。PE 通过 Atg7 (E1-like) 和 Atg3 (E2-like) 连续激活反应与 LC3-I (无活性) 结合形成 LC3-II (PE 结合形式)。在哺乳动物中, LC3-I 向 LC3-II 的转变是自噬形成的一个关键调节步骤^[22]。细胞质中 LC3-II 的重新分配, 可以使 LC3 的着色方式从弥散转变为点状, 这是自噬形成的一个重要指标。LC3-II 通过 Atg5-Atg12-Atg16L 复合物的介导与自噬体膜结合。除上述两种泛素化结合系统, Su LY 等^[23]研究发现缺乏 Atg5/Atg7 基因的小鼠细胞, 在应激情况下依然可以形成自噬体, 提示自噬的形成延伸阶段还有其他非依赖 Atg5/Atg7 途径的参与。Zhang Y 等^[24]在动物和离体培养人血管内皮细胞中发现, 给予西罗莫司离体培养内皮细胞 3 d 后, 显著抑制了血管内皮细胞的血管形成能力, 同时体外培养 GFP-LC3 转基因动物分离的血管给予西罗莫司刺激后, 内皮细胞 LC3 高表达, 表明西罗莫司刺激血管内皮细胞自噬增强。体外实验结果显示, 金属支架上生长的血管平滑肌细胞中自噬相关基因 (ATG)5 和 ATG7 显著上调, 并且 Atg7 促进 Atg5 和 Atg12 蛋白的二聚化, 继而影响下游因子, 最终激活细胞凋亡。指出血管平滑肌细胞增殖是细胞凋亡与自噬相互作用的结果^[25]。这些研究结果表明, 增强自噬可以显著抑制血管细胞的增殖。

2.2.4 融合阶段 自噬小体或自噬内涵体与溶酶体融合形成具有降解能力的自噬溶酶体 (autolysosome)。同时, LC3B 也与自噬体膜结合。随后通过 Atg4B 使细胞膜上的 LC3B-II 去脂化或者通过自噬内涵体内的蛋白水解酶降解重新成为 LC3B-I, 与膜脱离以供重新利用。成熟的自噬体融合过程需要一些蛋白的参与, 包括小 GTP 酶 (如 Rab7), C 型 Vps 蛋白, UVRAG 和溶酶体相关膜蛋白 (如 LAMP2)^[26]。到目前为止已经发现了超过 33 个 Atg 及其相关蛋白。随后通过一系列的溶酶体蛋白水解酶 (如组织蛋白酶和其他酸性水解酶) 消化密闭在自噬溶酶体中的内容物, 进而将降解的成分释放到细胞质中, 通过生物合

成途径再利用。

2.3 自噬信号通路参与的血管疾病

2.3.1 自噬与冠状动脉粥样硬化症 (atherosclerosis, AS) Liu BX 等^[27]观察到, 白藜芦醇, 作为自噬诱导剂, 通过激活 Sirt1 介导的自噬清除 oxLDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡, 表明白藜芦醇离体情况下对 AS 保护作用, 表明白藜芦醇激活 Sirt1 介导的自噬可能作为治疗 AS 的新疗法。此外, 在高胆固醇血症兔模型中, 给予白藜芦醇可以使动脉粥样硬化斑块大小和密度的降低以及初始层厚度的降低, 这表明白藜芦醇具有潜在的治疗 AS 的作用^[28]。但是, 有研究表明, 白藜芦醇不能增加他汀类药物的抗动脉粥样硬化作用^[29]。因此, 当白藜芦醇与其它降低血脂类药物组合使用时, 应充分考虑各自的药理作用。

2.3.2 自噬与缺血性脑血管疾病 Shen M^[30]等动物研究大鼠脑组织皮质经受打击后 24、48 h 后, 取脑组织进行蛋白质印迹分析, 免疫组织化学或电子显微镜检查。观察到雄性大鼠脑组织中 LC3-II 显著增加。免疫组织化学结果显示, 在急性创伤后, LC3 标记蛋白扩散到海马同侧皮质区和丘脑中, 并诱导神经元死亡。此外, 在这些区域通过电子显微镜观察到自噬泡, 次级溶酶体。这些数据表明, 创伤诱导的自噬不仅限于哺乳动物脑组织, 并且与体外营养剥夺研究相似^[31]。然而, 缺血性细胞死亡的机制以及其动力学是复杂的。特别是在局部缺血区域中的一些细胞表现出自噬蛋白质标志物的存在, 如 Beclin 1 和 LC3-II^[32]。在局限性病灶和短暂性脑缺血的动物模型中观察到大量自噬体及自噬蛋白的表达。这些结果表明, 在脑血管缺血损伤过程中自噬发挥了重要作用。

3 总结

血管支架术后再狭窄是影响手术预后的重要因素, 在支架处局部血管内皮细胞增生, 存在严重的血管重构。而在新型药物涂层型支架周围提高自噬蛋白表达, 将信号通路进一步传递, 抑制血管细胞异常增殖。自噬过程的调节涉及多种信号传导通路, 如, LC3 I/II 和 Beclin1 起到了重要的作用。目前, 血管支架术后再狭窄依然是世界性难题, 血管支架植入术成功后的患者仍然存在着很高的再狭窄率, 与金属裸支架相比, 药物涂层支架可一定程度上降低再狭窄率, 但依然存在机制不明确等问题, 仍需不断的

深入研究,为临床上预防和治疗提供新的理论支持。

参考文献:

- [1]Gao Runlin.The development of percutaneous coronary intervention[J].Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science (Electronic Version),2015,7(1):1-6.
- [2]Buccheri D,Piraino D,Andolina G,et al.Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment [J].J Thorac Dis,2016,8 (10):E1150-E1162.
- [3]Pourier VE,de Borst GJ.Technical options for treatment of in-stent restenosis after carotid artery stenting [J].J Vasc Surg, 2016,64(5):1486-1496.
- [4]Shu ZW,Yu M,Chen XJ,et al.Ghrelin could be a candidate for the prevention of in-stent restenosis [J].Cardiovasc Drugs Ther,2013,27(4):309-314.
- [5]张冠龙,王继群,辛若丹,等.冠状动脉支架内再狭窄的研究新进展[J].中国老年学杂志,2016,3(36):1264-1267.
- [6]潘娜娜.Rho 激酶对大鼠动脉内膜损伤后平滑肌细胞凋亡的作用及机制的研究[D].青岛大学,2017.
- [7]Alfonso F,Byrne RA,Rivero F,et al.Current treatment of in-stent restenosis[J].J Am Coll Cardiol,2014,63(24):2659-2673.
- [8]Cannavale A,Tsetis D,Krokidis M.The endovascular approach for in-stent restenosis in femoropopliteal disease [J].Expert Rev Cardiovasc Ther,2015,13(4):391-401.
- [9]Nicolosi PA,Tombetti E,Maugeri N,et al.Vascular Remodelling and Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis[J].Stem Cells Int,2016(6):4636859.
- [10]Zhang H,Chang H,Wang LM,et al.Effect of Polyelectrolyte Film Stiffness on Endothelial Cells During Endothelial-to-Mesenchymal Transition [J].Biomacromolecules,2015,16 (11): 3584-3593.
- [11]Tanaka LY,Laurindo FR.Vascular remodeling: A redox -modulated mechanism of vessel caliber regulation [J].Free Radic Biol Med,2017(109):11-21.
- [12]Westman PC,Lipinski MJ,Luger D,et al.Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction[J].J Am Coll Cardiol,2016,67 (17):2050-2060.
- [13]Park HS,Han JH,Jung SH,et al.Anti-apoptotic effects of autophagy via ROS regulation in microtubule-targeted and PDGF-stimulated vascular smooth muscle cells [J].Korean J Physiol Pharmacol,2018,22(3):349-360.
- [14]Cui F,Guan Y,Guo J,et al.Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects vascular endothelium by ameliorating autophagy in metabolic syndrome rats[J].Life Sci,2018(205):145-154.
- [15]Hu HJ,Zhou SH,Liu QM.Blockade of mTOR pathway inhibition in the neointimal hyperplasia and promoting macrophage autophagy - Effect of statin-eluting stents to reduce in-stent restenosis[J].Int J Cardiol,2015(187):31-32.
- [16]Salabei JK,Balakumaran A,Frey JC,et al.Verapamil stereoisomers induce antiproliferative effects in vascular smooth muscle cells via autophagy[J].Toxicol Appl Pharmacol,2012,262(3):265-272.
- [17]Sakuma M,Nasuno T,Abe S,et al.Mobilization of progenitor cells and assessment of vessel healing after second generation drug-eluting stenting by optical coherence tomography [J].Int J Cardiol Heart Vasc,2018(18):17-24.
- [18]Zeng X,Ju D.Hedgehog Signaling Pathway and Autophagy in Cancer[J].Int J Mol Sci,2018,19(8): E2279.
- [19]Toton E,Lisiak N,Sawicka P,et al. Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy [J].J Physiol Pharmacol,2014,65(4): 459-467.
- [20]Tang B,Dong X,Wei Z,et al.Enhanced autophagy by everolimus contributes to the antirestenotic mechanisms in vascular smooth muscle cells[J].J Vasc Res,2014,51(4):259-268.
- [21]Koyama-Honda I,Itakura E,Fujiwara TK,et al.Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site[J].Autophagy,2013,9(10):1491-1499.
- [22]Jong-Ok Pyo,Jihoon Nah,Yong-Keun Jung.Molecules and their functions in autophagy[J].Exp Mol Med,2012(44):73-80.
- [23]Su LY,Luo R,Liu Q,et al.Atg5- and Atg7-dependent autophagy in dopaminergic neurons regulates cellular and behavioral responses to morphine [J].Autophagy,2017,13 (9):1496-1511.
- [24]Zhang Y,Zhang Y,Tang J,et al.Oxymatrine Inhibits Homocysteine-Mediated Autophagy via MIF/mTOR Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells [J].Cell Physiol Biochem,2018,45(5):1893-1903.
- [25]Lizaso A,Tan KT,Lee YH. β -adrenergic receptor-stimulated lipolysis requires the RAB7-mediated autolysosomal lipid degradation[J].Autophagy,2013,9(8):1228-1243.
- [26]Li L,An L,Zhou X,et al.Biological behaviour of human umbilical artery smooth muscle cell grown on nickel-free and nickel-containing stainless steel for stent implantation[J].Sci Rep, 2016(6):18762.
- [27]Liu BX,Zhang BC,Guo R,et al.Enhancement in efferocytosis of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptotic RAW264.7 cells through Sirt1-mediated autophagy [J].International Journal of Molecular Medicine,2013,33(3):523-533.

[28]Zhang Y,Cao X,Zhu W,et al.Resveratrol Enhances Autophagic Flux and Promotes Ox-LDL Degradation in HUVECs via Upregulation of SIRT1 [J].Oxid Med Cell Longev,2016: 7589813.

[29]Berbée JF,Wong MC,Wang Y,et al.Resveratrol protects against atherosclerosis, but does not add to the antiatherogenic effect of atorvastatin, in APOE*3-Leiden.CETP mice [J].J Nutr Biochem,2013,24(8):1423-1430.

[30]Shen M,Wang S,Wen X,et al.Dexmedetomidine exerts neuroprotective effect via the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with traumatic brain injury[J].Biomed

Pharmacother,2017(95):885-893.

[31]Feng Y,Cui C,Liu X,et al.Protective Role of Apocynin via Suppression of Neuronal Autophagy and TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in a Rat Model of Traumatic Brain Injury[J].Neurochem Res,2017,42(11):3296-3309.

[32]Wang S,Wang C,Yan F,et al.N-Acetylcysteine Attenuates Diabetic Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Inhibiting Excessive Autophagy [J].Mediators Inflamm,2017 (5): 9257291.

收稿日期:2018-8-7;修回日期:2018-8-21

编辑/成森