**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果， 也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

**学位论文知识产权权属声明**

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的说明**

## 1、 学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

## 2、 本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√” ）：

①答辩后即可送：是□否 □

②延迟一年后送：□

③延迟二年后送：□

④延迟三年后送：□

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日



**博士学位论文**



**miR-34a与ATG9A在心肌肥厚中的作用Role of microRNA-34a and ATG9A on myocardial hypertrophy**

**博士研究生：黄炯华**

**导**师：刘世明**教授**

**专**业：心血管内科学

**广州医科大学・广州二〇一四年三月**

**目** 录

[缩略词表 1](#_bookmark0)

[中文摘要 4](#_bookmark1)

[英文摘要 10](#_bookmark2)

[前 言 20](#_bookmark3)

[第一部分：大鼠肥厚心脏组织自噬活性和 ATG9A、miR-34a 的改变](#_bookmark4)

[材料与方法 25](#_bookmark5)

[结 果 39](#_bookmark6)

[讨 论 42](#_bookmark7)

[小 结 45](#_bookmark8)

[附 图 46](#_bookmark9)

[第二部分：ATG9A 与自噬活性的变化在 AngII 诱导心肌细胞肥大中的作用](#_bookmark10)

[材料与方法 49](#_bookmark11)

[结 果 63](#_bookmark12)

[讨 论 68](#_bookmark13)

[小 结 71](#_bookmark14)

[附 图 72](#_bookmark15)

[第三部分：miR-34a 与 ATG9A 的关系在 AngII 诱导心肌细胞肥大中的作用](#_bookmark16)

[材料与方法 75](#_bookmark17)

[结 果 84](#_bookmark18)

[讨 论 87](#_bookmark19)

[小 结 90](#_bookmark20)

[附 图 91](#_bookmark21)

[全文结论 93](#_bookmark22)

[参考文献 94](#_bookmark23)

[综 述 101](#_bookmark24)

[致 谢 122](#_bookmark25)

[攻读学位期间发表的论文 123](#_bookmark26)

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AngII | Angiotensin II | 血管紧张素 II |
| ANP | Atrial Natriuretic Peptide | 心房钠尿肽 |
| β-MHC | Myosin Heavy Chain | 肌球蛋白重链 |
| 30%Acr/Bic | Acrylamide/Bis-acrylamide | [丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺混](http://www.bio-equip.com/show1equip.asp?equipid=578906&amp;division=2599)  [合液](http://www.bio-equip.com/show1equip.asp?equipid=578906&amp;division=2599) |
| AP | Ammonium persulfate | 过硫酸胺 |
| TEMED | Tetrametyl ethylenediamine | 四甲基乙二胺 |
| Tris | N-tris (hydroxmethyl) aminomethane | N-三羟甲基氨基甲烷 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏氟乙烯 |
| Brdu | 5'-bromo-2'-dexoyuridine | 5'-溴脱氧尿苷 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium | Dulbecco's 改良Eagle培养基 |
| cDNA | Complementary Deoxyribonucleic  Acid | 互补脱氧核糖核酸 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole  dihydrochloride | 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 |
| EB | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylenediaminetetra-acetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| EF | Ejection factor | 射血分数 |
| FP | Forward primer | 上游引物 |
| GADPH | Glyceraldehyde-3-phosphate  dehydrogenase | 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| HE staining | Hematoxylin-Eosin staining | 苏木素伊红染色| |
| HWI | Heart weight index | 心脏重量指数 |

1

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| IVSs | Interventricular septal thickness at end-systole | 室间隔收缩末期厚度 |
| IVSd | Interventricular septal thickness at  end-diastole | 室间隔舒张末期厚度 |
| LVPWd | Left ventricular posterior wall  Thickness at end-diastole | 左心室后壁舒张末期厚度 |
| LVPWs | Left ventricular posterior wall  Thickness at end-systole | 左心室后壁收缩末期厚度 |
| LC3 | Microtubule-associated protein 1 light  Chain 3 | 微管相关蛋白 1 轻链 3 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase | 丝裂原活化蛋白激酶 |
| cAMP/PKA | Cyclic-AMP dependent protein kinase A | 环腺苷依赖蛋白激酶 A |
| ERK1/2 | Extra cellular regulated protein  Kinases 1/2 | 细胞外调节蛋白激酶 1/2 |
| Hsp70 | Heat shock protein 70 | 热休克蛋白 70 |
| LAMP2 | Lysosome-assiociated membrane  Protein 2 | 溶酶体相关膜蛋白 2 |
| miRNA | microRNA | 微小RNA |
| mRNA | Messenger Ribonucleotides | 信使核糖核酸 |
| Oligo(dT) | Oligonuteotide(dT) | 寡脱氧胸苷酸 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲盐液 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| RT | Reverse transcription | 反转录 |
| qRT-PCR | Quantificational reversetranscription  Polymerase chain reaction | 定量反转录聚合酶链式反应 |
| PAS | Pre-autopahgosomal structure | 自噬前体结构 |
| ATG9A | Autophagy-related protein 9A | 自噬相关蛋白 9A |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride | 苯甲磺酰氟 |
| RAS | Renin-angiotensin-system, | 肾素-血管紧张素系统 |
| RNAi | RNA interference | RNA干扰 |

2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| RNasin | RNA enzyme inhibitor | RNA酶抑制剂 |
| Rno | Rattus norvegicus | 大鼠 |
| Hsa | Homo sapiens | 人 |
| Mmu | Mus musculus | 小家鼠 |
| Ptr | Pan troglodytes | 黑猩猩 |
| Rp | Reverse primer | 下游引物 |
| Fp | Forward primer | 上游引物 |
| RT | Reverse transcriptase | 逆转录 |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate | 十二烷基磺酸钠 |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide  Gel electrophoresis | SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| shRNA | Short hairpin RNA | 短发夹RNA |
| TAAC | Transverse Abdominal  Aortic Constriction | 腹主动脉缩窄 |

3

**miR-34a与ATG9A在心肌肥厚中的作用**

博士研究生：黄炯华导师：刘世明

# 中文摘要

**背景**

心肌肥厚是以心室肌增厚，室腔变窄为主要特征改变。导致心肌肥厚最常见的病因是高血压和心脏瓣膜狭窄。在细胞水平，心肌肥厚通常是由于心肌细胞体积增大和细胞骨架出现重构所致，而不是由心肌细胞增多引起。在分子水平，心肌肥厚主要表现为胎儿基因表达增加。在生理情况下，心肌肥厚是心脏对压力负荷的适应性反应。然而，心肌肥厚持续进展往往导致不良的预后，最终会导致心衰和猝死。

到目前为止，心肌肥厚的病理生理机制仍不完全阐明，针对心肌肥厚的有效防治仍然比较局限。先前的研究表明，压力超负荷诱导的心肌肥厚促发了心肌细胞的自噬反应。此外，心肌细胞过度自噬会导致心肌细胞死亡。虽然，在真核细胞中，细胞生理水平上的自噬是必要的，因为细胞可以通过自噬反应清除体内有害的蛋白和细胞器进而维持自体代谢平衡。自噬不足或者过度均会导致疾病的病理进展。ATG9A是目前发现唯一完整的自噬泡膜蛋白，定位于自噬泡膜/自噬前体中，是自噬发生过程中的必须蛋白。

另外，miRNAs是生物体内一类非编码小分子RNAs，能靶向结合基因3’-UTR 互补的种子序列，在转录水平参与了基因表达的调控。要么分解

mRNA，要么抑制相关基因蛋白的表达。miRNAs异常改变与心肌肥厚的进展相关。最近的研究发现，miRNAs在心脏的生长和生理起到重要的作用。例如，miR-34a是一个多功能调控子，通过调控相关靶基因的表达，涉及对细胞分裂、衰老、凋亡和增殖的调控。Cheng等人通过基因芯片技术证实miR-34a在小鼠肥厚的心脏组织中，其表达是失调控。但是，对于miR-34a如何调控心肌肥厚的机制仍不清楚。有实验证实miR-34a通过抑制ATG9A介导的自噬活

4

性，进而调控漂亮新杆线虫的生长周期。我们也知道，血管紧张素II

（AngiotensinII, AngII）是重要的生长因子，可介导心肌肥厚；其受体能调控心肌细胞的自噬活性。

但是，仍不知道这些因子是否能在一起协同调控心肌肥厚？在AngII诱导的心肌细胞肥大中，ATG9A介导的自噬活性是否过度激活？同时，miR-34a能调控AngII诱导的心肌细胞肥大是否通过抑制ATG9A的表达来实现？为此，我们设想：miR-34a表达下调，导致ATG9A表达的增加，介导了心肌细胞自噬的过度激活，进而促进了心肌细胞肥大。

本研究首先拟建立大鼠心脏肥厚模型，探测肥厚心脏组织中miR-34a 和

ATG9A表达以及自噬活性的变化，以阐明心肌肥厚中miR-34a与ATG9A以及自噬活性变化的关系。其次，通过建立体外心肌细胞肥大模型，研究miR-34a对靶基因ATG9A的调控变化，以及其改变在AngII诱导的心肌细胞肥大中的作用，进一步阐明miR-34a是通过靶向于ATG9A来调控自噬活性从而参与心肌细胞肥大的发生发展。我们希望通过明确这些新发现来帮助我们进一步了解心肌肥厚的分子机制，从而为未来针对心肌肥厚的防治提供有希望的作用靶点。

# 第一部分

**大鼠肥厚心脏组织中自噬活性和ATG9A、miR-34a的改变**

**目的**

探测压力超负荷诱导大鼠心肌肥厚的心脏组织中自噬活性、ATG9A 和

miR-34a的改变。

**方法**

通过对SD大鼠进行跨腹主动脉进行缩窄（TAAC）来构建心脏肥厚模型。经超声心动图测量室壁厚度和组织切片HE染色等明确造模成功。组织miR-34a和ATG9A的表达用实时荧光定量聚合酶链反应（Real-time PCR, q-PCR）检测；自噬相关蛋白（ATG9A、p62和LC3 II/I）用蛋白印迹（Western blot）进行检测，而心脏组织自噬泡的改变用透射电镜来观察。

5

**结果**

1. 术后4周，多普勒超声心动图探测大鼠左室壁和腹主动脉。与假手术组大鼠比较，手术组大鼠左心室后壁收缩和舒张末期厚度（LVPWs和LVPWd）、室间隔收缩和舒张末期厚度（IVSs和IVSd）均明显增加；频谱多普勒显示：腹主动脉缩窄处血流充盈缺损、血流速度增快，压力阶差增高。

2. 与假手术组大鼠相比较，手术组大鼠大体心脏组织矢状切片HE染色示：室壁增厚，乳头肌和肉柱增粗。同时，心脏体重指数（HWI）增加。

3. 与假手术组大鼠相比较，手术组大鼠心脏组织局部切片HE染色示：心肌细胞增大、染色不均、着色浅，无核区多，肌纤维萎缩区域细胞核密度增加。Image Pro Plus软件测量心肌细胞表面积明显增大。

4. 与假手术组大鼠比较，手术组大鼠心脏ATG9A表达明显增加。

5. 与假手术组大鼠比较，手术组大鼠心脏自噬活性标记蛋白LC3II/ I表达上调，而p62表达下调，同时自噬泡明显增多。

6. 与假手术组大鼠比较，手术组大鼠心脏组织miR-34a表达下调。

## 小 结

## 1. 大鼠肥厚心脏组织自噬相关蛋白ATG9A表达上调和自噬活性增高。

## 2. 大鼠肥厚心脏组织miR-34a表达下调。

# 第二部分

**ATG9A与自噬活性的变化在AngII诱导心肌细胞肥大中的作用**

**目的**

明确ATG9A与自噬活性的变化关系，以及它们在AngII刺激导致心肌细胞肥大中的作用。

**方法**

大鼠原代心肌细胞给予1μmol/L AngII刺激构建体外心肌细胞肥大模型。分别观察RNAi *ATG9A*和过表达*ATG9A*对心肌细胞自噬活性的影响。自噬活性通过Western blot检测自噬活性标志蛋白p62和LC3II/I的表达、流式细胞仪检测

6

细胞自噬发生率和透射电镜观察心肌细胞自噬泡数量来评价；同时，用qRT-PCR检测肥厚基因表达和激光共聚焦观察心肌细胞形态的变化来评价心肌细胞肥大的改变。

**结果**

1. 与对照组比较，原代心肌细胞给予AngII刺激组ATG9A表达明显上调的同时，肥厚相关基因*β-MHC*和*ANP*的表达也明显上调和细胞表面积增大。

2. 与对照组比较，AngII刺激组心肌细胞自噬活性标记蛋白LC3II/ I表达上调，而p62表达下调。

3. 与对照组比较，AngII刺激组心肌细胞自噬率增加、自噬泡数量增多。

4. 与空载体组比较，过表达*ATG9A*组心肌细胞ATG9A的表达明显上调的同时，自噬活性标记蛋白LC3II/ I表达上调，而p62表达下调。

5. 与阴性对照病毒组比较，阴性对照病毒+AngII组心肌细胞ATG9A的表达明显上调的同时，自噬活性标记蛋白LC3II/ I表达上调，而p62表达下调。

6. 与阴性病毒+AngII组比较，*ATG9A*干扰病毒+AngII组心肌细胞ATG9A

表达下调，自噬活性标记蛋白LC3II/ I表达下调，而p62表达上调。

7. 与空载体组比较，过表达*ATG9A*组心肌细胞ATG9A的表达明显上调的同时，心肌细胞自噬率增加、自噬泡数量增多。

8. 与阴性对照病毒组比较，阴性对照病毒+AngII组心肌细胞自噬率增加、自噬泡数量增多。

9. 与阴性病毒+AngII组比较，*ATG9A*干扰病毒+AngII组心肌细胞自噬率下降、自噬泡数量减少。

10. 与空载体组比较，过表达*ATG9A*组心肌细胞肥厚相关基因表达增加的同时，心肌细胞表面积增大。

11. 与阴性对照病毒组比较，阴性对照病毒+AngII组心肌细胞肥厚相关基因表达上调的同时，心肌细胞表面积增大。

12. 与阴性病毒+AngII组比较，*ATG9A*干扰病毒+AngII组心肌细胞肥厚相关基因表达下调的同时，心肌细胞表面积减少。

7

## 小 结

## 1. 10-6mol/L AngII可刺激心肌细胞肥大，诱导ATG9A的表达和自噬活性的增加。

## 2. 过表达ATG9A可促进心肌细胞的自噬活性增加和肥大加剧。

## 3. 干扰ATG9A的表达能减轻AngII介导心肌细胞的自噬活性增加和肥大加剧。

# 第三部分

**miR-34a与ATG9A的关系在AngII诱导心肌细胞肥大中的作用**

**目的**

研究在心肌细胞中，miR-34a能否调控ATG9A介导的自噬活性而调控心肌细胞肥大。

**方法**

心肌细胞感染miR-34a过表达或抑制病毒后，共转染携带ATG9A 3'-UTR的荧光素酶基因载体与内参载体，荧光素酶仪器检测荧光素酶活性的改变。同时，对miR-34a 过表达或者抑制后，qRT-PCR 和Western blot 分别检测心肌细胞

*ATG9A*基因与蛋白的表达变化。用qRT-PCR探测AngII刺激后心肌细胞miR-34a和肥厚相关基因表达的变化，而心肌细胞大小的变化用激光共聚焦进行观察。通过miR-34a过表达或者抑制，观察心肌细胞肥厚相关基因表达、细胞大少及心肌自噬活性的变化。

**结果**

## 1. 与阴性病毒对照组比较，转染pGL3-*ATG9A* 3’-UTR-Wild Type时，过表达miR-34a，荧光素酶活性下降了45%；抑制miR-34a表达，荧光素酶活性升高了0.38倍。

## 2. 与阴性病毒对照组比较，转染pGL3-*ATG9A* 3’-UTR-Mutant Type时，过表达miR-34a或抑制miR-34a表达，荧光素酶活性无明显变化。

## 3. 与阴性病毒对照组比较，过表达miR-34a组或抑制miR-34a组，ATG9A

mRNA表达无变化；然而，ATG9A的蛋白分别下调到0.62倍和上升到1.7倍。

8

## 4. 与阴性病毒组比较，AngII+阴性病毒组心肌细胞自噬率明显上调

（11.27±0.61 vs 22.27±0.75，*P*<0.05）。

## 5. 与AngII+阴性病毒组比较，AngII+miR-34a过表达组心肌细胞自噬率明显下降（22.27±0.75 vs 12.47±0.35，*P*<0.05）。

## 6. 与阴性病毒组比较，AngII+阴性病毒组心肌细胞自噬泡数量明显增加

（0.9±0.1 vs 2.4±0.31，*P*<0.05）。

## 7. 与AngII+阴性病毒组比较，AngII+miR-34a过表达组心肌细胞自噬泡数量明显减少（2.4±0.31 vs 1.62±0.4，*P*<0.05）。

## 8. 与阴性病毒组比较，AngII+阴性病毒组心肌细胞肥厚相关基因*ANP* 和

*β-MHC*表达上调，心肌细胞表面积增加。

## 9. 与AngII+阴性病毒组比较，AngII+miR-34a过表达组心肌细胞肥厚相关基因*ANP*和*β-MHC*表达下调，心肌细胞表面积减少。然而，与AngII+miR-34a干扰组比较，肥厚基因*ANP*和*β-MHC*表达上调，心肌细胞表面积增加。

## 小 结

1. miR-34a与*ATG9A*基因的3’-UTR结合，调控其蛋白的表达。

2. miR-34a在AngII诱导的心肌细胞肥大中表达明显下调。

3. miR-34a上调可抑制AngII诱导心肌细胞的自噬活性。

**4.** miR-34a调控AngII诱导的心肌细胞肥大。**全文结论**

miR-34a可调控AngII诱导的心肌细胞肥大，而其调控作用是通过直接抑制

ATG9A蛋白的表达和心肌细胞自噬活性来实现。

**关键词：**微小； RNA； 自噬相关蛋白； 9A； 自噬活性； 血管紧张素； II； 心肌肥厚

9

**Role of microRNA-34a and ATG9A on myocardial hypertrophy**

**MD. Candidate: Jionghua Huang**

**Major: Shiming Liu**

**ABSTRACT**

**Background**

Myoardial hypertrophy refers to a thickening myocardium, resulting in a decrease in size of the heart chamber. A common cause of myocardial hypertrophy is hypertension or heart valve stenosis. At the cell level, myocardial hypertrophy is generally characterized by an increase in the size of cardiomyocytes, without increase in cell numbers, and by cytoskeletal reorganization. At the molecular level, myocardial hypertrophy shows an increased expression of fetal-type genes. Physiologically, myocardial hypertrophy is initially an adaptive response to stress overload. However, the continued presence of hypertrophic growth often carries a poor prognosis that may result in heart failure and sudden death of patients.

To date, appropriate therapy and prevention methods of myocardial hypertrophy progression have had limited success because the pathophysiological mechanisms responsible for myocardial hypertrophy development remain to be defined. To this end, a previous study showed that myocardial hypertrophy induced by pressure-overload stress triggers cardiomyocyte autophagy. Moreover, cardiomyocyte excessive autophagy may lead to cardiomyocyte death although physiological levels of autophagy are essential in eukaryotic cells to eliminate damaged proteins and organelles as part of the maintenance of cell homeostasis. This excessive or deficient autophagy may therefore contribute to disease pathogenesis. As the only integral membrane ATG protein, ATG9A is localized in the phagophore/pre-autophagosomal

10

Structure (PAS) and is an essential protein in the autophagic process.

In addition, microRNAs (miRNAs) are a class of endogenous non-coding small RNAs and modulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to the seed-matched sequence of the 3'-UTR region in their target mRNAs, which results in either degradation or translational repression of target gene expression. Altered expression of miRNAs has been associated with development of myocardial hypertrophy. Recent studies have further indicated that miRNAs also plays a role in cardiac development and physiology. For example, miR-34a is a multifunctional regulator, which is involved in cell division, senescence, apoptosis and proliferation through regulating the expression of its target genes. Using microarray profiling, Cheng at al. demonstrated that miR-34a was aberrantly expressed in hypertrophic mouse hearts. However, the molecular mechanism regulating myocardial hypertrophy by miR-34a has been poorly understood. Yang et al. elucidated that miR-34a modulated Caenorhabditis elegans lifespan via the repression of ATG9A-mediated autophagic activities. As known to us, Angiotensin II (AngII) is a critical growth factor and mediates myocardial hypertrophy, and its receptors can regulate cardiomyocyte autophagy.

However, it is unknown whether and how these factors work together to regulate myocardial hypertrophy, whether ATG9A mediated autophagic activity is excessively activated in AngII induced cardiomyocyte hypertrophy, and whether miR-34a can modulate AngII-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting ATG9A expression. Thus, we hypothesized that during development of myocardial hypertrophy, the decreased expression of miR-34a could accelarete the expression of ATG9A, which can mediate autophagic activity.

In this study, in order to clarify the relation of miR-34a, ATG9A and autophagic activity, we first construct a rat model of myocardial hypertrophy and detect the alternation of miR-34a, ATG9A expression and autophagic activity. In addition, in hypertrophic myocardiocytes induced by Ang II, we certify whether miR-34a can regulate ATG9A expression and the change of ATG9A expression can promote autphagic activity. Through those, we go furtherly to demonstrate that in the process

11

Of cardiomyocyte hypertrophy, miR-34a modulates AngII-induced myocardial hypertrophy by inhibition of ATG9A-mediated autophagic activity. We took this novel approach to help better understand the molecular mechanisms of myocardial hypertrophy development in order to develop a prospective therapeutic target for control of cardiac hypertrophy in the future.

## **Part one**

**Changes of autophagic activity, ATG9A and miR-34a expression in rat tissue of myocardial hypertropy**

**Objective**

To explore the alternation of autophagic activity, ATG9A and miR-34a expression in cardiac tissue from rats of myocardial hypertrophy induced by pressure over-load.

**Method**

Animal model produced a well-established rat myocardial hypertrophy by transverse abdominal aortic banding and evaluated by echocardiography, histopathological analysis of heart size, the ratio of heart weight to body weight (HWI), and cardiomyocyte size in hematoxylin and eosin (H&E) -stained heart cross-sections. Relative expression level of miR-34a and ATG9A was analyzed by Real-time PCR in cardiac tissue. Two established marker protein for autophagic activity (p62 and LC3II/I) was analyzed by Western blot in cardiac tissue. In addition, autophagic vacuoles were detected by transmission electron microscopy in cardiac tissue.

**Result**

## 1. Four weeks after the surgery, left ventricular well thickness and abdominal

12

Aorta was detected by Echocardiography. The data showed that the left ventricular end-diastolic and end-systolic dimension (LVIDd and LVIDs) and left ventricular posterior wall end-diastolic and end-systolic thickness (LVPWd and LVPWs) in rats from the TAAC group were significantly higher than those in the Sham group. Spectral Doppler demonstrated that Filling defects of bloodstream, blood flow velocity and pressure gradient increase where abdominal aortic constriction was performed.

2. The whole heart tissue section was prepared by H&E staining. The whole heart sections, cut at the papillary muscle level, showed that the heart volume was significantly expanded, while the papillary muscles and trabeculae carneae cordis were much coarser in appearance in the TAAC group than in the Sham group.

3. H&E stained tissue sections from the TAAC group displayed a lightly stained color in the regions of myocardial hypertrophy with inhomogeneous staining and numerous nuclear-free regions with an increased nucleolar density in regions of muscle fiber atrophy. Cardiac muscle fiber surface area measured by Image Pro Plus soft increased markedly in the TAAC group than in the Sham group.

4. Compared to the Sham group of rats, the TAAC group showed up-regulation of ATG9A expression in cardiac tissue.

5. Compared with those in the sham operation group, autophagic activity marker protein of LC3II/I expression and autophagic vacuoles was enhanced in rats from the operation group, but the p62 protein expression was decreased.

6. MiR-34a expression was significantly down-regulated in the TAAC group of rats compared to that of the Sham group.

**Brief summary**

1. The expression of autophagy-related protein 9A and autophagic activity were enhanced in rat tissue of cardiac hypertrophy.

## 2. MiR-34a expression was significantly down-regulated in rat hypertrophic hearts.

13

## **Part two**

**The role of altered ATG9A and autophagic activity on AngII-induced myocardial hypertrophy**

**Objective**

To clarify the relation of ATG9A and autophagic activity, and the effect of which had on AngII-induced myocardial hypertrophy.

**Method**

An in vitro cardiomyocytes hypertrophic medol was establised by teating with 1μmol/L AngII in cardiomyocytes. The influence of RNA interference or over-expression of *ATG9A* gene on the autophagic activity was assessed. In cardiomyocytes, relative protein expression level of p62 and LC3II/I detected by western blot, ratio of autophagic vacuoles analyzed by flow cytometry, the number of autophagic vacuoles observed by transmission electron microscopy were evaluated on autophagic activity. In addition, cardiomyocytes hypertrophy was evaluated by qRT-PCR for the expression of hypertrophy-related gene (*ANP* and*β-MHC*) and confocal microscopic detection of cardiomyocytes morphology.

**Result**

## 1. Compared to the control cardiomyocytes, AngII-treated cardiomyocytes showed markedly increased expression of hypertrophy-related genes and cell area.

2. Compared to the control cardiomyocytes, AngII-treated cardiomyocytes showed markedly increased expression of autphagic activity marker protein LC3II/I, but decreased expression of the other autophagic activity marker protein p62.

3. Compared with the controls, both the percentage of autophagic vacuoles and the number of autophagic vacuoles were up-regulated in neonatal cardiomyocytes stimulated with AngII.

14

4. Compared with the control-vetor group, over-expression of *ATG9A*-treated group demonstrated that the expression of autophagic activity marker protein LC3II/I was significantly enhanced, but the p62 expression was markedly lowered.

5. Compared to the negative control group, the expression of *ATG9A* and LC3II/I was up-regulated in neonatal cardiomyocytes stimulated with AngII plus negative cotrol, while the expression of p62 was down-regulated.

6. Compared to AngII plus negative group, the expression of ATG9A and LC3II/I was decreased in neonatal cardiomyocytes stimulated with AngII plus *ATG9A*-specific shRNA, but the p62 expression was increased.

7. Compared with the control-vector group, both the percentage of autophagic vacuoles and the number of autophagic activity were up-regulated in neonatal cardiomyocytes stimulated with overexpressed-*ATG9A* vector.

8. Compared with the negative control group, autophagic vacuoles number and ratio were increased in neonatal cardiomyocytes teated with AngII plus negative control.

9. Compare to AngII plus negative control group, cardiomyocytes treated with AngII plus *ATG9A*-specific shRNA showed that markedly decreased ratio of autophagic vacuoles and the number of autophagic vacuoles.

10. Compared with control-vector, cardiomyocytes treated with the overexpressed-vector of *ATG9A* confirmed that significantly increased the expression of hypertrophy-related gene and cell area.

11. Compared with negative control, cardiomyocytes stimulated with AngII plus negative control showed that increased both the hypertrophy-related gene expression and cell area.

12. Compared with AngII plus negative control, the expression of hypertrophy-related gene and the cell area were lowered in neonatal cardiomyocytes treated with *ATG9A*-specific shRNA.

15

**Brief summary**

1. Myocardial hypertrophy, autophagic activity and the expression of ATG9A were induced in cardiomyocytes stimulated with 1μmol/L AngII.

2. Overexpression of *ATG9A* could enhance myocardial hypertrophy and autophagic activity in cardiomyocytes.

3. Specific-*ATG9A* shRNA in cardiomyocytes could mitigate myocardial hypertrophy and autophagic avtivity induced by AngII-treated cardiomyocytes.

## **Part three**

**The effect of miR-34a on ATG9A and its potential role in AngII-induced myocardial hypertrophy**

**Objective**

To explore whether miR-34a can modulate AngII-induced myocardial hypertrophy by binding to the 3'UTR of *ATG9A* mRNA, which can alter autophagic activity in cardiomyocytes.

**Method**

After cardiomyocytes were cotransfected with Luciferase reporter vector containing *ATG9A* 3'UTR and internal control vector, miR-34a mimics or miR-34a inhibitors were transduced respectively, then performed the luciferase assay. In addition, after miR-34a expression was over-expressed or inhibited, the expression of ATG9A was analyzed by qRT-PCR and Western blot. After cardiomyocytes treated with AngII, the expression of miR-34a and hypertrophy-related gene was detected by qRT-PCR, while the alternation of cell morphology was observed by confocal microscopy. Finally, after over-expressed or inhibited miR-34a in cardiomyocytes, the changes of hypertrophy-related gene expression and autophagic activity were observed.

16

**Result**

1. Compared to cells treated with a negative control, after cardiomyocytes were transfected with pGL-3-*ATG9A* 3'-UTR-Wild Type, transduction with miR-34a mimics resulted in a 45% reduction in the relative luciferase activity. In contrast, transduction with miR-34a inhibitors resulted in a 1.38-fold increase in the relative luciferase activity, compared to cells treated with a negative control.

2. Compared to cells treated with a negative control, after in cardiomyocytes were transfected with pGL-3-ATG9A 3'-UTR-Mutant Type, neither transdution with miR-34a mimics nor transduction with miR-34a inhibitors can alter luciferase activity.

3. Compared with the negative control, after in cardiomyocytes were transduced with miR-34a mimics or miR-34a inhibitors, the expression of *ATG9A* mRNA was not different, while the ATG9A protein expression was down-regulated by 0.48 fold or up-regulated by 0.7 fold, respectively.

4. Compared to cardiomyocytes treated with negative control, ratio of autophagic vacuoles was increased by 11% in cells treated with AngII plus negative control.

5. The percentage of autophagic vacuoles was markedly decreased in cardiomyocytes treated with AngII plus miR-34a mimics, compared with AngII plus negative control.

6. Compared to cardiomyocytes treated with negative control, the number of autophagic vacuoles was increased in cells treated with AngII plus negative control (0.9±0.1 vs 2.4±0.31，*P*<0.05).

7. The percentage of autophagic vacuoles was markedly lowered in cardiomyocytes treated with AngII plus miR-34a mimics, compared with AngII plus negative control (2.4±0.31 vs 1.62±0.4，*P*<0.05).

8. Compared to negative control, cardiomyocytes treated with AngII plus negative control showed that markedly increased the expression of *ANP* and*β-MHC* and cell area.

*9.* Compared to AngII plus negative control, the expression of *ANP* and*β-MHC*

And cell area were mitigated in cardiomyocytes stimulated with AngII plus miR-34a

17

Mimics, whereas those was aggravated in cardiomyocytes treated with AngII plus miR-34a inhibitors.

**Brief summary**

1. miR-34a can bind to *ATG9A* mRNA 3'UTR, and regulate its protein expression.

2. MiR-34a was down-regulated in AngII-induced myocardial hypertrophy.

3. Up-regulation of miR-34a can inhibit autophagic activity induced by AngII in cardiomyocytes.

4. MiR-34a can modulate AngII-mediated myocardial hypertrophy.

18

**Conclusion**

The present study shows that miR-34a can modulate AngII-induced cardiomyocytes hypertrophy. This effect of regulation is implemented by direct inhibition of ATG9A expression and autophagic activity.

**Key words:** MicroRNA; Autophagy-related protein 9A; Autophagic activity; Angiotensin II; Myocardial hypertrophy

Zhi ku quan 20150807

19

前**言**

心力衰竭(heart failure, 心衰)是由于任何心脏结构或功能异常导致心室充盈或者射血功能受损的一组复杂临床综合征，是各种心脏疾病的严重和终末阶段。在发达国家，患心力衰竭的人群比例随年龄增大而增高[1]，成人大约1-2%，而在70岁以上人群，该比例高达10%以上。在美国，诊断5年内的心衰绝对死亡

率高达50%[2, 3]，每年因心衰为主要诊断住院为100万人[4]，1个月内再住院率为

25%[5]。心衰患者远期预后不良，耗费大量医疗资源，增加了国民经济负担。为此，针对心力衰竭的防治从20世纪90年代以来有了重大的转变：从旨在改变心衰短期血液动力学状态转变为长期的修复性策略，以改变衰竭心脏的生物学性质；从采用强心、利尿、扩血管药物转变为神经内分泌抑制剂（血管紧张素转换酶抑制剂，血管紧张素转换酶受体拮抗剂，β受体阻滞剂、醛固酮受体阻滞剂），并积极应用非药物的器械治疗（心脏再同步化治疗，cardiac resynchronization

therapy，CRT）。虽然，治疗z策hi略ku的q转ua变n在20一1定50程80度7上改善了患者的症状，减少

了住院率和死亡率，但长期疗效仍不容乐观[6, 7]。人类对心力衰竭发病机制的认识经历了从宏观到微观，从细胞水平到分子水平的不断深入过程。从最早的心肾学说的提出经历到血流动力学说的转变，再到近年来的心脏重构（cardiac

remodeling）学说的确立。然而，心力衰竭的发生机制仍然不能完全阐明。因此，对心力衰竭的发病机制进一步完善十分有意义。

近年来，人们逐渐认识到心室重构[8]是心力衰竭发生发展的基本机制，心肌细胞和细胞外基质的变化是心衰的本质，包括心肌细胞的掉失、肥大，细胞外胶原沉积和纤维化。心脏在各种压力负荷刺激下，在早期出现心肌肥厚性代偿改变，即为心肌肥厚（cardiac hypertrophy）。心肌肥厚在形态学上以心肌增厚，室腔变窄为特征，在细胞水平上则以细胞体积增大和细胞骨架重构为特点，而在分子水平上则表现为胎儿基因表达增多[9, 10]，是心脏重构的重要环节。心肌肥厚的病理生理机制十分复杂，目前关于心肌肥厚的防治效果不是十分理想。因此，对心脏肥厚机制深入研究可能为心肌肥厚得不到有效控制而逐渐进展成为心力衰竭寻找到新的防治靶点。

20

既往研究表明，压力超负荷诱导的心肌肥厚触发了心肌细胞自噬[11]。然而，心肌细胞自噬过度会导致心肌细胞自噬性程序性死亡，不依赖Caspase[12, 13]。近年来，自噬作为一种有区别于凋亡的程序性细胞死亡方式引起了医学界的广泛关注。自噬有三种类型：小分子自噬，分子伴侣介导的自噬，大分子自噬[14]。小分子自噬是胞浆物质直接与溶酶体结合而被吞噬的过程；分子伴侣介导的自噬是折叠坏死蛋白被热休克蛋白70（Hsp70）转运到溶酶体内而被清除的过程；而大分子自噬，是生物体最主要的自噬途径。关于大分子自噬最早被De Duve所描述[15]，细胞在缺乏能量、营养或受到外界应激情况下，胞浆中出现大量包裹着细胞器和受损蛋白的特异性双层或者多层膜结构的自噬体

（autophagosome），并与溶酶体(lysosome)结合形成自噬溶酶体(autolysosome)，自噬溶酶体将包裹的物质分解成为有用的小分子物质，这些小分子物质可以被重新合成各种能量物质供机体再利用。

在真核细胞中自噬是蛋白质降解和细胞结构再循环的重要途径。细胞内受损的细胞结构、衰老的细胞器及有害的生物大分子等通过自噬降解清除。同时，细

胞内自噬也为细胞器的构建提供原材料，即细胞结构的再循环。生理性自噬有助

Zhi ku quan 20150807

于细胞维持自身稳态平衡，是细胞体内自我保护的机制。然而，细胞的自噬缺乏

或者过度都会导致疾病的发生发展[16]。

自噬参与到各种心血管疾病的发生和发展过程，包括心肌病、心肌肥厚、缺血性心脏病、心衰和缺血再灌注损伤[17]。Danon's病性心肌病[18]是基因遗传X连锁缺陷导致溶酶体相关膜蛋白2（LAMP2）表达缺乏，线粒体有害物质不能通过自噬体与溶酶体结合而被清除从而出现线粒体功能紊乱。有实验证实[19]：在小鼠结蛋白相关性心肌病的动物模型中自噬是激活的，而自噬的激活是心肌细胞保护性反应。在缺血再灌注损伤实验中，自噬作为心肌对压力信号（包括ATP的减少、低氧和钙离子失衡）反应增加的形态学指标，在再灌注损伤的不同阶段其所起的作用也不一样[20]。缺血性心脏病之一冠状动脉粥样硬化性心脏病，其主要病理机制是动脉壁斑块形成，官腔狭窄心肌血流供应减少所致。其中，在动脉粥样斑块形成过程中，巨噬细胞起到重要作用。有研究证实粥样斑块的巨噬细胞自噬活性增加[21]，而自噬的增加有利于稳定粥样斑块防止斑块坏死和巨噬细胞凋亡[22]。

21

一系列的研究表明，心力衰竭时自噬活性上调[11, 12, 23]。而且，在终末期心衰患者，左室辅助装置能改善患者症状和预后，其中自噬活性水平减轻是主要原因

[24]. 同时，自噬不足会诱导老年性心肌肥厚的加剧[25]。跨腹主动脉缩窄（Transverse

Abdominal Aortic Constriction，TAAC）所导致的小鼠心肌肥厚中，心肌细胞自噬增强[11]。

血管紧张素II (AngiotensinII, AngII)是RAS系统中最主要的生长因子，体内AngII分泌增多介导心肌肥厚，促进了心肌重构的进程[26]，而其受体则可调控心肌肥厚[27]。无论是体内注射[28]或者是体外给予[29] AngII，均能引起心肌细胞自噬。自噬相关蛋白9A(autophag-related protein, ATG9A)是目前发现唯一的自噬体膜蛋白，定位于囊泡/自噬前体结构（pre-autophagosomal structure, PAS）上，是自噬过程中必不可少的蛋白。那么，由ATG9A参与的自噬过程是否在

AngII引起心肌肥厚中起作用呢？

microRNAs(miRNAs)是一类生物体内的小分子非编码RNA，可以与靶基因的3’UTR的互补序列结合而降解mRNA或抑制转录后的翻译，调节靶基因的表达，从而影响生物体的病理生理过程[30]。有报道[31]，在小鼠肥厚的心脏组织中，miR-34a的表达明显下调。而miR-34a作为一个多功能的调控子[32-34]，它可与其相关的靶基因结合调控细胞的分裂、增值、衰老和凋亡。Yang等证实，miR-34a能通过抑制ATG9A介导的自噬活性来调控漂亮新杆线虫的寿命[35]。同时，该实验在HEK293T和Hela细胞中[35]，证实*ATG9A*是miR-34a的靶基因。那么，miR-34a是否通过调控心肌细胞的ATG9A的表达而改变心肌细胞自噬活性呢？如果miR-34a能调控心肌细胞ATG9A介导的自噬活性，那么在心肌细胞肥大中，miR-34a调控的心肌细胞自噬活性是否参与其中呢？为了进一步明确上述疑问，我们首先明确大鼠肥厚心脏组织中miR-34a、ATG9A及自噬的变化关系；其次，体外AngII 诱导心肌细胞肥大模型中，进一步研究miR-34a 对自噬相关蛋白

ATG9A的调控变化，以及ATG9A介导的自噬活性变化在AngII诱导的心肌细胞肥大中的作用。最后，阐明miR-34a调控ATG9A的表达改变了自噬的活性进而影响心肌细胞肥大的发生和发展。

该研究拟在细胞和分子水平对miR-34a调控心肌肥厚的潜在机制进行探索，采用了过表达和RNAi（RNA干扰）技术，结合基因和蛋白检测、透射电镜、流式细

22

胞术、激光共聚焦等手段，从基因转录、翻译调控以及形态学等角度进行验证。实验包括三个部分。第一部分观察大鼠肥厚心脏组织中自噬活性和ATG9A、miR-34a的变化关系。第二部分探讨ATG9A与自噬活性的变化在AngII诱导心肌细胞肥大中的作用。第三部分研究miR-34a与ATG9A的关系在AngII诱导心肌细胞肥大中的作用。

研究结果有助于认识心肌肥厚的新机制，为心肌肥厚的防治提供有希望的作用靶点。

23

研究流程图



24

# 第一部分 ：大鼠肥厚心脏组织自噬活性和**ATG9A**、**miR-34a**的改变

为了明确miR-34a、ATG9A和自噬的活性在心肌肥厚组织中的变化，首先我们构建压力超负荷诱导心肌肥厚模型，通过对大鼠肥厚心脏组织的miR-34a、

ATG9A的表达检测，以及对自噬活性的测定，进一步了解它们在大鼠肥厚心肌组织中的变化情况。

# 材料与方法

## **1.** 动物、主要试剂和耗材

SD大鼠（广东省医学实验动物中心）戊二醛（广州化学试剂厂）

多聚甲醛（广州化学试剂厂）乙酸（广州化学试剂厂）

氯仿（广州化学试剂厂）异丙醇（广州化学试剂厂）

无水乙醇（广州化学试剂厂）

Hematoxylin（上海国药集团化学试剂有限公司）Blend Taq（日本TOYOBO, Lot:84040G3）

Eosin（上海国药集团化学试剂有限公司）10 x Buffer for Blend Taq(日本TOYOBO)琼脂糖（西班牙）

EDTA（广州化学试剂厂）

DNA marker DL2000（日本TakaRa, D501A）

EB（美国Amresco）

DEPC处理水（美国Invitrogen）

25

DNA loading buffer（德国AppliChem ）

TRIzol®Reagent（美国Invitrogen,15596-026）

SYBR®Premix Ex Taq™II for qRT-PCR（日本TaKaRa, DRR081A）PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR（日本TaKaRa, D6210A）

SDS粉(美国Sigma)

Taq聚合酶（美国Promega）

RNA酶抑制剂（日本TakaRa）甘油（力强化工厂）Leaptin（美国Sigma）

2.5 mM dNTP混合液（美国Invitrogen）PMSF（美国Sigma）

β-巯基乙醇（美国Sigma）

0.5M Tris HCl(PH6.8)（中国上海碧云天）

1.5M Tris HCl(PH8.8)（中国上海碧云天）溴酚蓝（美国Amresco）

AP(美国Sigma)

30%Acr/Bic(美国Sigma)

TEMED(美国Sigma) Tris (美国Sigma)

甘氨酸（美国Sigma）

脱脂奶粉（英国Oxoid）放射胶片（美国Kodak）吐温20(美国Sigma)

HRP AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG(H+L)(美国EarthOx, E030130-01)

TBS粉剂（上海博士德公司）

NP-40 Lysis buffer（中国上海碧云天

BSA(美国Sigma)

甲醇（广州化学试剂厂）

26

Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent S（美国Bio-Rad, 500-0115）Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent A（美国Bio-Rad, 500-0113）Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent B（美国Bio-Rad, 500-0114）

PVDF膜（美国Millipore）

蛋白预染marker（美国Fermentas）

SuperSignal@West Pico Chemiluminescent Substrate(美国Thermo Scientific, 34077)

ATG9A Antibody（美国Epidomic,2975-1）

LC3B Antibody（美国Cell Signaling Technology, 2775）P62 Antibody（英国Abcam, EPR4844）

GAPDH Antibody（美国Epidomic,2551-1）

EP管（美国Axygen）

PCR管（美国Axygen）

## **2.** 主要仪器

冰箱（德国Siemens，中国Haier）彩色心脏超声仪（荷兰Philips iE 33）电子分析天平（美国Mettler Toledo）高压灭菌锅（美国Astell）

石蜡切片机（德国Leika, RM2235）

Gemini染色机（美国Thermo scientific）

Histostar包埋机（美国Thermo scientific）excelsior ES脱水机（美国Thermo scientific）普通光学显微镜（德国Leika）

PCR仪（美国Bio-Rad）

荧光定量PCR仪（美国ABI7500）

微量移液器和台式冷冻离心机（德国Eppendorf）组织匀浆器（宁波新芝生物科技有限公司）

漩涡混和仪（美国Scientific Industries）

27

电泳仪（美国Bio-Rad）

超纯水系统（美国Millipore）多功能酶标仪（瑞士TECAN）

核酸微量分光光度计（美国NanoVue）

pH计（美国Mettler Toledo）湿式转印槽（美国Bio-Rad）医用胶片冲洗机（美国Kodak）

凝胶成像系统（英国Syngene）扫描仪（美国Hewlett Packard）

透射电镜（捷克FEI Tacnai 12 Spirit Twin）

## **3.** 主要试剂配方

**75％去核酸酶酒精：**

将DEPC处理水与无水酒精按1: 3比例混合。

**30%（Acr/Bic）丙烯酰胺溶液：**丙烯酰胺20g

甲叉双丙烯酰胺1g

加去离子水，定容至100ml调整溶液pH值不超过7.0，置棕色瓶中储存于室温。

**10%过硫酸铵（-20℃保存）：**过硫酸铵1g

加去离子水，定容至10ml，分装，每管1ml，共10管。

**1M Tris-HCL (pH 6.8)：**

Tris 12.12g

滴加HCL调pH至6.8

加去离子水，定容至100ml，再次调pH至6.8。

**1.5M Tris-HCL (pH 8.8)：**

Tris 18.2g

滴加HCL调pH至8.8

加去离子水，定容至100ml，再次调pH至8.8。

28

**10% SDS溶液：**

SDS粉末10g

加去离子水，定容至100ml，置37℃水浴里约1小时左右至充分溶解。**四甲基乙二胺缓冲液（TEMED）：**

四甲基乙二胺1.16g

加去离子水，定容至1000ml，滴加HCL调pH至4.7。

**50×TAE：**

Tris

冰乙酸

242g

57.1ml

0.5Mol/L EDTA(PH=8.0) 100 ml

加超纯水至1000ml。

**10％分离胶：**超纯水

30％Acr/Bic(36.5:1)

1.5 M Tris·HCl (pH8.8)

10％SDS

10%APS（过硫酸胺）TEMED

4.0Ml 3.3ml 2.5ml 0.1ml 0.1ml

0.004 ml

**12％分离胶：**超纯水

30％Acr/Bic(36.5:1)

1.5 mol/L Tris·HCl (pH8.8)

10％SDS

10%APS（过硫酸胺）TEMED

3.3 ml

4.0 ml

2.5 ml

0.1 ml

0.1 ml

0.4 ml

29

**5％浓缩胶：**超纯水

30％Acr/Bic(36.5:1)

10%APS（过硫酸胺）

10％SDS

0.5 mol/L Tris·HCl (pH6.8)

TEMED

2.10 ml

0.50 ml

0.03 ml

0.03 ml

0.38 ml

0.003 ml

**还原型5×SDS上样缓冲液：**

0.5 mol/L Tris·HCl(pH6.8) SDS

溴酚蓝甘油

3.125 ml

0.5 g

0.25 ml

6.25 ml

DdH2O 0.375 ml

使用前临时加β-巯基乙醇，按体积比19: 1。

**电泳缓冲液：**

Tris

甘氨酸

3.03g

14.4g

10％SDS 10 ml

加双蒸水至1000 ml。

**转膜缓冲液：**

Tris

甘氨酸

3.03g

14.4g

甲醇200ml

加双蒸水至1000 ml备用。在转膜时，往转膜槽加入10％SDS 500μl。

30

**TBST缓冲液（含0.05% Tween20的TBS缓冲液）：**

20% Tween20 1.65ml TBS 700ml

混匀后即可使用，最好现配现用。

**封闭液（含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液）：**脱脂奶粉5g

TBST 100ml

溶解后4℃保存。使用时，恢复室温，用量以盖过膜面即可，一次性使用。**抗体稀释液（3%牛血清白蛋白）：**

BSA 3g

超纯水100ml

溶解后，4℃保存，最好现配现用。

## **4.** 实验方法

### **4.1** **SD**大鼠心脏肥厚模型的构建

购自广东省实验动物中心的SPF级SD大鼠，体重85.16.2g，随机分为假手术组（Sham, n=6）和手术组（TAAC, n=8）。采用TAAC进行心脏肥厚模型的构建，建模前8小时禁食不禁水。予氯胺酮（80 mg/kg）和甲苯噻嗪（5 mg/kg）腹腔注射麻醉后，消毒铺无菌巾，腹正中线切口，逐层分离，暴露腹主动脉，在腹腔动脉下、前肠系膜动脉以上之间放置直径约0.5mm的钝器针，用4号尼龙丝线绑扎钝器针和腹主动脉，然后迅速拔除钝器针，腹主动脉则缩窄至原来直径

50%以上，制备压力超负荷大鼠模型。术后腿部肌肉注射5%氨苄青霉素1ml/kg. d，共3d，预防感染。假手术组大鼠腹主动脉不行缩窄术仅分离暴露即可。

### **4.2** **SD**大鼠缩窄动脉和心脏彩色多普勒超声检测

术后常规饲养，4周后称重，给予戊巴比妥(15 mg/kg)腹腔注射麻醉固定，剃去胸腹部毛发，L15-7io小动物超声探头探测心脏和腹主动脉。观察腹主动脉缩窄部位的情况，并探测左室舒张和收缩期末的直径(LVIDd and LVIDs)、左室收缩和舒张末期左室后壁的厚度(LVPWd and LVPWs)以及左室射血分数（EF%）。

31

### **4.3** **SD**大鼠心脏标本采集

术后4周行超声心动图检测完成后，予腹腔内注射过量麻醉药戊巴比妥处死大鼠，取出心脏，以预冷的PBS洗涤，滤纸尽量吸干液体，即置电子天平称称量全心重，并计算：全心重量（g）/体重（g）比值，同时将左心室均匀分成数等份。取部分心脏标本置于电镜检测固定液戊二醛中，以便后续的电镜检测。取部分标本用4％甲醛固定，行HE（Hematoxylin-Eosin）染色。剩余心脏标本放置已标记的冻存管里面，置液氮中保存，备用检测RNA和蛋白的表达。

### **4.4** **HE**染色

1）取材：将组织块从固定液中取出，按规则的矩形块修整（约0.8×0.5×0.3cm

大小）。

2）再固定：修整好的组织块放置4％甲醛浸泡24h。

3）水洗：取出再固定好的组织块用流水冲洗30min。

4）脱水：室温下组织块从低浓度乙醇开始逐级向高浓度乙醇移进脱水。

5）透明：浸泡二甲苯直至变透明。

6）浸蜡：反复浸泡56～58℃熔蜡2次，每次各1h。

7）包埋：组织块用组织包埋机包埋。

8）切片：石蜡组织块使用石蜡切片机切成厚薄片（约4μm）。

9）切片中组织的蜡块置于二甲苯中脱去，约10min，共2次。

10）切片置入不同浓度的酒精（100％、95％、85％、70％, 各5min），然后经蒸馏水转放进染液中。

11)染色液苏木精染5-10min。

12）残留在洗玻片上染液用水冲洗，玻片用分色液（0.5～1％盐酸酒精）分色片刻。镜检观察，直至胞核及核内染色质清晰为止，约数十秒。

13)流水冲洗15min。

14）置入另一种染色液（0.1～0.5％伊红染液）1min，若着色不明显，可将冰醋酸液加入染液中（每100毫升染色液可加1～2滴冰醋酸），使着色明显且不易脱色。

15)流水冲洗1min。

32

16）分别置入不同浓度酒精（70％、85％、95％、100％）脱水，各为5min，在95％以下浓度的酒精应适当缩短时间，以防伊红脱色。

17）再次用二甲苯致透明（二次），共约10min。

18）封片：残留在切片周围的二甲苯用滤纸擦去，适量的中性树胶滴加在玻片上，盖玻片封固，光学显微镜检测。

19）镜检：将玻片放置光学显微镜上，观察、拍图。

### **4.5** **qRT- PCR**检测组织**mRNA**

**4.5.1 Trizol法获取总RNA**

1）取心脏组织块约80-100mg，加入1ml Trizol，匀浆裂解，常温静置5min。

2）加入Trizol体积1/5的氯仿后，猛烈震动数次，常温静置3min分层。

3）4℃低温离心机12, 000 g离心15min，小心吸取最上层上清液，置另一个1.5ml Ep管。

4）加等体积的异丙醇，颠倒混匀，置冰上约10min。

5）4℃低温离心机12,000 g离心10min。

6）弃上清，再加0.5ml预冷的75%DEPC乙醇，振荡数次。

7）4℃低温离心机7,600g离心10min。

8）弃上清，再加0.5ml 预冷的无水乙醇，振荡数次。

9）4℃低温离心机7,600g离心10min。

10）弃上清。室温风干约5-10min。

11）加入适量DEPC水吹打溶解。

12）取1μl溶液用酶标仪测量A260/A280比值（1.8-2.0之间）及浓度，用琼脂凝胶电泳验证RNA质量（条带28S:18S吸光值约2: 1），取适量用于逆转录成cDNA，其余加RNA保护剂后保存-80℃低温冰箱里。

**4.5.2 mRNA逆转录（RT）**

1）按试剂盒说明书方法行逆转录合成cDNA，反应体系：（体系参照TaKaRa RT System说明）

Oligo (dT) Primer(50µM) dNTP Mixture(10mM)

1.0µl

1.0µl

33

RNA 1.0µg

RNase Free dH2O Up to 10µl 65℃5min→冰上迅速冷却

2）上述Microtube管中加入以下混合液：

5×PrimeScript II Buffer 4.0µl

Rnase Inhibitor(40 U/L) 0.5µl

PrimeScript II RTase(200 U/L) 1.0µl RNase Free dH2O Up to 10µl

30℃10min→42℃45min→95℃5min→4℃，+∞

**4.5.3梯度PCR摸索qRT-PCR引物退火温度**

1）灭菌超纯水溶解正、反方向引物（Fp、Rp）至浓度10µM。

2）配置下列反应体系（总体积：20µl）：

H2O

10×Buffer for Blend Taq

2.5 mM dNTP 10µM Fp 10µM Rp Blend Taq E

16.2µl

2.0µl

0.2µl

0.3µl

0.3µl

0.5µl

cDNA 0.5µl

95℃1min→95℃10s→Tx℃15s→72℃20s→72℃1min



40cycles

*4.5.4* **qRT-PCR引物序列**内参基因：*18S*

Fp: 5’-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3' Rp: 5’-GCCTCAGTTCCGAAAACCA-3'

目的基因：*ANP*

34

Fp: 5’-GGGGGTAGGATTGACAGGAT-3' Rp: 5’-CTCCAGGAGGGTATTCACCA-3'

目的基因：*β-MHC*

Fp: 5’-CCTCGCAATATCAAGGGAAA-3' Rp: 5’-TACAGGTGCATCAGCTCCAG-3'

目的基因：*ATG9A*

Fp: 5'-AAAGCCTGGTGCTGTCTGAATA-3' Rp: 5'-CTCTCTCCACTCTCATCACTCTCC-3'

由上海Invitrogen公司合成qRT-PCR引物。

**4.5.5温度梯度PCR产物琼脂糖电泳鉴定**

1）用0.5×TAE 40ml溶解0.6g琼脂糖，微波炉加热至沸腾。

2）沸腾的琼脂物逐渐冷却至60℃时，加入浓度为10mg/ml EB 2µl，充分混匀。

3）将液相凝胶倒入凝胶槽中，插上梳子，室温放置到凝胶凝固止。

4）拔除梳子，往凝胶槽中注入电泳液到完全淹没凝胶止。

5）将适量产物与loading buffer混合后加入样品孔。

6)电压140v电泳15min。

7)用Gene Snap from SynGene软件拍照。

**4.5.6 qRT-PCR检测**

检测*ANP*、*β-MHC* 和*ATG9A* mRNA的表达，18S 作为内参对照。计算

2**-ΔΔ**CT为mRNA相对表达量。20µl q-PCR反应体系：

SYBR®Premix Ex Taq™II (2×) Primer(F+R)

cDNA

10µl

1.6µl

2.0µl

DEPC-treated water 6.4µl 95℃30s→95℃5s→62℃20s



40cycles

35

每个样品做3个复孔，并重复荧光定量PCR的检测，结果取平均值。管家基因18S作为基因检测的内参，计算2-ΔΔCT值反映基因的相对表达量。

### **4.6** 蛋白印迹（**Western blot**）检测

1）提取蛋白样品：将适量心肌组织块，加入含蛋白抑制剂PMSF和Leaptin(两者终浓度为1mM)的蛋白裂解液NP-40，匀浆后，液氮研磨组织至单细胞状态；4℃

14,000g条件下离心5 min，取上清，并分装于EP管，保存于-80℃备用。

2）定量蛋白：取一定量蛋白液，用Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent试剂盒，通过BSA绘制标准曲线，根据已知浓度的BSA计算待测蛋白浓度。

3）变性蛋白：浓度测定后，根据每个样品的浓度情况，取适量蛋白液通过加入蛋白裂解液和上样缓冲液调至浓度一致，放置金属加热器变性。

4）蛋白电泳：依据待测蛋白分子量的大小制备5%的SDS-PAGE浓缩胶和不同浓度SDS-PAGE分离胶（GAPDH和ATG9A、p62用10％, LC3用12％），将胶放入电泳槽，内、外槽均注入电泳缓冲液；上样40µg蛋白，起始电泳30V，电泳约30分钟到达分离胶后，将电压改成100V电泳约1-1.5小时。

5）蛋白转膜：预先将PVDF膜放入甲醇中浸泡15分钟；待电泳完成后，将前三层滤纸、凝胶、膜和后三层滤纸按顺序夹好，280mA转膜（GAPDH、ATG9A和p62用1小时，LC3用40分钟）。

6）蛋白膜封闭：转膜完成后，立即将承载蛋白的膜取出放置到1×TBS溶液中，漂洗5min×3次；加入5%脱脂奶粉液室温缓慢摇动1h进行封闭。

7）蛋白膜孵育一抗：根据Mark指示将PVDF膜剪开，参考各抗体说明书，按照一定比例用3%BSA液稀释一抗；将PVDF膜分别放入含各自一抗容器中，4℃孵育过夜。

8）蛋白膜孵育二抗：回收一抗，将PVDF膜放置TBST在室温条件下漂洗

5min×4次，弃TBST；参考二抗说明书，按比例稀释二抗HRP AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG(H+L)；将PVDF膜加入稀释好的二抗，室温摇动孵育1小时。

9）蛋白膜显影：将PVDF膜放置TBST在室温条件下漂洗5min×3次，弃TBST；使用Chemiluminescence BeyoECL Plus化学发光试剂，黑暗处显色，用X光片压片，显影液及定影液洗片。

36

10）图像分析：胶片用扫描仪扫描后行灰度值分析。

### **4.7** 透射电镜（**Transmission electron microscopy**）检测

1）取材和前固定：快速切取大少约为0.5-1.0mm3的样品块，1分钟内把样品浸入4％戊二醛固定8-12小时。

2)漂洗：用1M PBS Buffer Ph 7.2冲洗3次，每次15分钟。

3）后固定：用2％锇酸处理样品变黑，一般约需1-2.5小时。

4)再漂洗：用1M PBS Buffer Ph 7.2冲洗3次，每次15分钟。

5)逐级脱水：室温下，丙酮浓度30% - 50% - 70% - 80% - 90%每级作用30

分钟，纯丙酮作用3次，每次作用30分钟。

5）包埋剂环氧树脂逐步渗透：无水丙酮/包埋剂=1: 5作用12小时→无水丙酮/包埋剂=3: 1作用12小时→无水丙酮/包埋剂=1: 1作用12小时→无水丙酮/包埋剂=1: 3作用12小时→无水丙酮/包埋剂=1: 5作用12小时→纯包埋剂作用45℃作用12小时。

6）环氧树脂包埋：用牙签将渗透好的样品挑到包埋板中，45℃聚合12小时，

60℃聚合48小时。

7）超薄（600A0）切片：在超薄切片机进行，切片面积最大不能超过0.5mm

×0.3mm。

8）柠檬酸铅正染色：超薄切片先用柠檬酸铅染色10分钟，去二氧化碳双蒸水清洗3次，再用醋酸铀染色30分钟，双蒸水清洗3次，干燥。

6）透射电镜检测：将干燥的切片放置透射电镜机上进行观察、照相、记录；在×13500倍下观察计数10个不同视野下自噬体数目。自噬体判定标准参照既往文献报道[36]。

### **4.8** **qRT-PCR**检测组织**miRNA**

**4.8.1总RNA提取（提取方法见4.5.1）**

**4.8.2 miRAN逆转录**

1）按试剂盒说明书方法行逆转录合成cDNA，反应体系：（体系参照TaKaRa RT System说明）

miRNA specific Primer(2µM) 1.0µl

37

RNA

DNTP Mixture(10mM)

1.0µl

0.5µg

RNase Free dH2O Up to 10µl 65℃5min→冰上迅速冷却

2）上述Microtube管中加入以下混合液：

5×PrimeScript II Buffer Rnase Inhibitor(40 U/L)

PrimeScript II RTase(200 U/L)

4.0µl

### 0.5 µl

1.0µl

RNase Free dH2O Up to 10µl 30℃10min→42℃30min→95℃5min→4℃，+∞

**4.8.3 qRT-PCR检测**

SYBR®Premix Ex Taq™ II (2×)

MiRNA specific Primer(F+R) cDNA

10µl

### 1.6 µl

2.0µl

DEPC-treated water 6.4µl

95℃30s→95℃5s→62℃20s



40cycles

miRNA-34a的表达，内参对照为U6. miRNA相对表达量，通过计算2-ΔΔCT

值获得。

**4.8.4 miRNA逆转录和qRT-PCR引物序列**

U6-RT

5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'

miRNA-34a-RT

5'-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACAACC AG-3'

38

U6

FP: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3' RP: 5' -GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'

miRNA-34a

FP: 5'-GCCCTGGCAGTGTCTTAG-3' RP: 5'-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3'

逆转录和qRT-PCR引物均由上海生物工程公司合成。

## **5.** 统计学分析

数据用均数±标准误表示。用Shapiro-Wilk 检验是否正态分布用。使用

Levene’检验判断是否方差齐性。两组间计量资料比较，符合正态分布资料采用Student's *t*检验，不符合正态分布应用Mann-Whitney U检验。*P*<0.05为统计学差异有显著性。使用SPSS 18.0统计软件分析。

# 结果

## **1.** **SD**大鼠心脏肥厚评价指标

### **1.1** 彩色多普勒超声结果

术后4周，彩色多普勒超声探测两组（TAAC组和Sham组）大鼠心脏各指标变化，与Sham组相比较，TAAC组LVIDd、LVIDs、LVPWd、LVPWs、IVSs均明显增加；然而，left ventricular ejection fraction（EF%）两组比较无差异，具体结果看表格1。

超声频谱多普勒探测TAAC 组的腹主动脉缩窄处血流速度明显增快，与

Sham组比较压力阶差增高（图1）。超声彩色血流探测腹主动脉缩窄处血流充盈缺损（图2）。

39

表格1 . 心脏结构和收缩功能各指标值

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Sham (n=6) | TAAC (n=8) |
| IVSd (10-3cm) | 127.83±4.71 | 196.25±9.53 \* |
| IVSs (10-3cm) | 216.5±16.43 | 320.13±15.32 \* |
| LVIDd (10-3cm) | 577.33±22.05 | 537.13±15.37 |
| LVIDs (10-3cm) | 358.17±19.24 | 263.88±9.62 \* |
| LVPWd (10-3cm) | 153.17±8.16 | 217.38±12.72 \* |
| LVPWs (10-3cm) | 217.33±0.79 | 321.25±8.24 \* |
| EF(%) | 85.7±1.69 | 88.38±0.92 |

数据用mean±SEM表示，*\*P* <0.05 .

### **1.2** 心脏组织病理

彩色多普勒超声探测完后注射过量的麻醉药戊巴比妥处死大鼠，取心脏，

PBS清洗残留血液，滤纸吸干，称量心脏净体重，计算心脏体重指数，心脏体重指数(heart weight index, HWI) =心脏重量/体重；将整个心脏石蜡包埋，行心脏矢状切片，HE染色，观察心脏结构变化。结果显示，TAAC组心脏左心室壁增厚，乳头肌和肉柱增粗（图3A），体重指数增加（图3B）。

与Sham组相比较，TAAC组局部心脏组织切片HE染色，镜下观察示：心肌细胞肥大、颜色变淡、染色不均一，大片无核区，心肌纤维萎缩区域细胞核密度增加（图4A）。IPP软件测量心肌纤维表面积增大显著（图4B）。以上指标显示TAAC构建心脏肥厚模型成功。

## **2.** 大鼠肥厚心脏组织自噬活性增强

### **2.1** 自噬相关基因**ATG9A**表达

Real time PCR检测心脏组织自噬相关基因*ATG9A*的mRNA水平，TAAC 组

*ATG9A*的mRNA表达水平是Sham组的1.71倍；与Sham组比较，其蛋白表达水平是1.47倍，***\*****P* <0.05 (图5)。

40

### **2.2** 自噬标志蛋白

检测心脏组织自噬活性的标志蛋白p62和LC3II/ I表达水平，与Sham组（n

=6）比较，TAAC组（n = 8）大鼠p62的蛋白表达下调0.58倍，***\*****P* <0.05；然而，自噬活性标志蛋白LC3II/ I表达上调1.53倍，***\*****P* <0.05（图5）。





图5. 大鼠肥厚心脏组织自噬相关蛋白ATG9A和自噬活性标志蛋白表达变化（基因与蛋白）。

（A）术后4周，qRT-PCR检测左心室组织*ATG9A* mRNA水平，***\*****P* <0.05。(B) ATG9A和自噬活性标志蛋白的蛋白印迹分析，***\*****P* <0.05。

### **2.3** 透射电镜观察超微结构（自噬泡）的变化

术后4周，局部组织电镜切片，在透射电镜下观察左心室组织超微结构（自噬泡）的变化。定义自噬泡的依据为：在超微结构水平下，空泡状双层膜环绕着

41

未与溶酶体融合的细胞质内容物，或者细胞核内细胞器如内质网和线粒体的片段或碎片（图6）。×13500倍电镜下观察组织电镜切片，计算10个不同视野下自噬泡平均个数。结果表明：与Sham组比较，TAAC组心脏组织自噬泡数量明显增多（0.8±0.07 vs 2.6±0.15, ***\*****P* <0.05, 图7）。

## **3.** 大鼠肥厚心脏组织**miR-34a**表达下调

与Sham组比较，TAAC组心脏组织miR-34a表达下调（1±0.05 vs 0.45±0. 03，U6作为内对照，计算2-ΔΔCT值，图8）。



图8. 大鼠肥厚心脏组织的miR-34a的表达变化。术后4周，qRT-PCR检测左心室组织miR-34a

的表达量（2-ΔΔCT），***\*****P* <0.05.

# 讨论

跨腹主动脉缩窄诱导大鼠心脏肥厚模型，是一种比较经典的构造心脏肥厚模型的方法之一。为此，在我们的实验中选用此方法来构建心脏肥厚模型。多普勒超声心动图由于其有操作简单、方便、可重复性和无创性的特点，目前被广泛应用于人和动物心脏结构和功能的检测[37-39]。术后4周，采用多普勒超声探测大鼠心脏，测量各室壁厚度来评价心脏肥厚；同时，结合大体心脏和局部心脏病理检查，进一步验证心脏肥厚造模成功。

自噬是一个由溶酶体介导受损蛋白和细胞器再循环的高度保守过程[40, 41]。在

42

这个过程中，首先细胞内受损物质被包绕在一个具有双层膜结构的运输器中。然后，运输器通过与细胞内溶酶体结合而把承载的受损物降解。同时，当有害折叠蛋白在细胞内出现大量堆积时，细胞也是通过这种方式对其进行降解。也许，生理水平的自噬有利于维持细胞和机体的代谢平衡，因为细胞和机体可通过这种方式将有害的蛋白和细胞器清除。然而，当自噬不足或者持续过度自噬时，会导致疾病的发生和发展。在压力超负荷诱导心肌肥厚中，文献[11, 12]证实心肌自噬是过度激活的。此外，其他实验也进一步证实压力超负荷诱导心肌肥厚的过程中，自噬激活起到重要作用[42, 43]。然而，在压力超负荷诱导的心衰中，自噬活性却是受损的[23]。当心肌重构处于心肌肥厚阶段，自噬活性的过度激活或许是机体一种保护反应；相反，当心肌重构进入失代偿期即心衰阶段，心肌自噬活性明显受损，从而加剧疾病进一步恶化。我们在跨腹主动脉缩窄诱导大鼠心脏肥厚模型中，同样证实心肌组织自噬活性是过度激活，结果与既往一致。

在分子水平上，LC3和p62蛋白表达水平的变化，均是检测自噬活性的标志物。LC3（microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3,简称LC3）即微管相关蛋白轻链3，存在两种可相互转化的形式：LC3-I和LC3-II. LC3-I

（约18kD）通过新合成的前体LC3经剪切修饰，C末端去除22个氨基酸获得，是一种胞浆可溶性蛋白。在自噬发生和发展过程中，LC3-II是通过对LC3-I剪切和泛素化加工修饰，与自噬泡膜表面的磷脂酸乙醇胺（PE）结合，成为膜结合形式的蛋白。LC3-II（约16kD）定位于自噬前体和自噬体，是自噬体的标志蛋白，随自噬体膜的增多而增多。LC3-II的含量或LC3-II/I的比例与自噬泡的数量呈正相关，在某种程度上反映了细胞的自噬活性。p62也被称为SQSTM1，是一种多功能蛋白。由于其包含多个蛋白相互作用结合区域，涉及到细胞信号通路的调控区域、蛋白堆积区域和降解区域[44]。p62与LC3的自噬定位相同，参与自噬的全过程，最后在自噬溶酶体中被选择性降解[45]；自噬被抑制时自噬体累积

p62升高[12, 46]，证明这种蛋白水平与自噬的活性成反比。因此，蛋白印迹技术检测p62的表达水平可反映自噬活性的程度。而p62的增加暗示着自噬/溶酶体降解途径被抑制。在形态结构上，透射电镜显微术是一种对组织和培养的细胞在超微水平检测自噬体形态的重要技术。当自噬被激活后，细胞质的组分被包裹在一个双层膜的自噬体结构中。然后自噬体与溶酶体融合。在融合阶段，自噬体的外

43

膜与溶酶体膜融合，自噬体包裹的组分释放到溶酶体中，这样形成的结构叫做自噬溶酶体。在我们实验中，我们应用了蛋白印迹技术检测p62和LC3-II/I的表达变化，以及在透射电镜下观察自噬泡，计算不同视野自噬泡的数量来进一步评判自噬活性的程度。实验结果提示，大鼠肥厚的心脏组织自噬活性是过度激活。

miRNA通过与靶基因mRNA的3’-UTR区域中的部分碱基序列互补结合，调控其蛋白的表达进而参与疾病的发生发展。目前报道的miR-34家族有miR-34a、miR-34b、miR-34c三个亚型。miR-34a除了在肺组织外，其他大部分组织中表达均非常丰富；然而，由于miR-34b和miR-34c在同一个染色体相同区域中编码表达，故它们的碱基序列接近，而且紧在肺组织中表达丰富而在其他组织中几乎不表达[47]。既往有在其它物种中报道[35]：ATG9A受miR-34a负调控而引起自噬活性的改变。且miR-34a与心血管疾病的关系间有报道。内皮细胞衰老是冠状动脉粥样硬化性心脏病发生发展的重要病理机制。SIRT1是抗衰老的重要蛋白之一。通过对来自冠心病患者内皮祖细胞的研究，Tabuchi T等[48]证实：miR-34a可调控SIRT1蛋白的表达而影响内皮功能，表明miR-34a在冠心病发生发展中起到重要的作用。同时，Boon RA等[49]研究显示：miR-34a在年老的小鼠心脏中表达增高，而在体外沉默其表达可以减少衰老相关的心肌细胞死亡。结果表明，miR-34a可调控心脏衰老。此外，最近一项研究表明[50]，通过共沉默miR-34a家族，能够防止心肌病理性重构和改善心脏功能。我们通过检测大鼠肥厚心脏组织和非肥厚心脏组织中miR-34a表达情况，证实大鼠肥厚心脏组织miR-34a表达明显下调。这与既往报道[31]一致。

综上所述，我们发现，在大鼠心脏肥厚组织中，自噬相关蛋白ATG9A和心脏自噬活性上调，然而miR-34a表达下调。ATG9A/自噬活性上调、miR-34a下调和心肌肥厚之间是否存在联系；如果有联系，它们之间又是如何相互作用的，有待下一步实验来阐明。

44

## 小**结**

1. 大鼠肥厚心脏组织自噬相关蛋白ATG9A的表达上调和自噬活性增高。

2. 大鼠肥厚心脏组织miR-34a表达下调。

45

# 附图



图1 . 腹主动脉频谱多普勒探测图



图2 . 超声探测腹主动脉缩窄处彩色血流图

46





图3。大体心脏组织矢状切面HE染色，病理观察和体重指数统计图。（A）HE染色后，TAAC组与Sham组心脏组织矢状切面比较室壁厚度图。（B）比较两组心脏体重指数HWI统计图，

\**P*<0.05.



图4。 左心室局部组织切片HE染色镜下观察和计算心肌横断面积图。（A）左心室局部组织

HE染色图（scale bar: 50µm）。（B）比较TAAC组与Sham组心肌横断面积，\**P*<0.05.

47



图6。 典型自噬泡的超微结构（×46000，scale bar: 200 nm）。





图7。大鼠肥厚心脏组织的自噬泡数量变化。术后4周，左心室组织电镜切片，镜下观察并计算组织自噬泡（箭头）个数(×13500, scale bar: 1µm)，\**P*<0.05。

48

# 第二部分 ：**ATG9A**与自噬活性的变化在**AngII**

**诱导心肌细胞肥大中的作用**

压力超负荷诱导心肌肥厚的重要机制之一是机械牵张。既往体外机械牵张诱导心肌细胞肥大实验[51-54]表明，机械牵张会导致心肌细胞神经内分泌激活，分泌大量的细胞因子，进而促进心肌细胞肥大。为此，这些细胞因子被用来诱导体外心肌细胞肥大实验研究[55, 56]。然而，在众多可诱导心肌细胞肥大的生长因子中，Ang II被证实最重要的刺激因子[57-60]，其受体能调控心肌细胞自噬活性[27]。那么，Ang II诱导心肌细胞肥大是否与自噬活性相关，对其机制进一步研究可以为心脏重构提供新的治疗靶点。

在前期的心肌肥厚动物模型中，我们发现大鼠肥厚心脏组织自噬相关蛋白

ATG9A表达上调及心脏自噬活性增加。该部分实验目的是进一步阐明ATG9A蛋白与自噬活性在Ang II诱导心肌细胞肥大中的作用。

# 材料与方法

**1．动物、主要试剂和耗材**

SD胎鼠（广东省动物实验中心）

血管紧张素II（Ang II）（美国Sigma, A9525）

1×PBS缓冲液（pH7.2，不含钙镁）（美国GIBCO）DMEM高糖培养基（美国GIBCO, C11995）

青霉素+链霉素（penicillin streptomycin）（美国GIBCO, 15140）

0.25%胰酶（TRYPSIN, 含EDTA）（美国GIBCO, 25200）

5-溴脱氧尿核苷（Brdu）（美国Sigma, B5002）胎牛血清（FBS）（美国GIBCO, C20270）

新生牛血清（NCBS）（美国GIBCO, 16010）

49

0.25%胰酶（TRYPSIN, 不含EDTA）（美国GIBCO, 15050）*ATG9A*-specific shRNA慢病毒（中国上海GenePharma合成）Negative Control慢病毒（中国上海GenePharma合成）Lipofectamine™LTX and PLUS Reagents（美国Invitrogen, 15338）LC3B Antibody（美国Cell Signaling Technology, 2775）

Goat anti-rabbit IgG-affinity pure(FITC conjugate secondary antibody, 美国

ImmunoReagents, GtxRb-003-D650NHSX)

Axy prep™DNA Gel Extraction Kit（美国Axygen）Axygen®AxyPrep™PCR Clean Up Kit（美国Axygen）Endo-free plasmid mimi Kit（瑞士Omega）

T4-DNA连接酶（日本TaKaRa）Hind III内切酶（日本TaKaRa）Xba I内切酶（日本TaKaRa）

pRc/CMV2载体（美国Invitrogen, Catalog no. V750-20）Triton-100(美国Sigma)

DAPI（美国Invitrogen, D1306）

Alexa Fluor®555 Phalloidin（美国Invitrogen）培养皿、培养板、离心管（美国Corning）余试剂和耗材见第一部分1.。

**2．主要仪器**

生化培养箱（上海一恒科技有限公司）超净工作台（苏州净化Sw-CJ-2FB型）电热恒温水浴箱（上海跃进医疗器械一厂）细胞CO2培养箱（美国Thermo Scientific）

Accuri C6流式细胞仪（美国Becton, Dickinson and Company）Zeiss LSM 710 confocal microscope(德国Carl Zeiss)

恒温空气浴摇床（上海福玛实验设备有限公司）余仪器见第一部分2.。

50

**3．主要试剂配方 LB培养基**Tryptione（蛋白胨）

Yeast Extract (酵母粉) NaCl (氯化钠)

### 2.5 g

5.0g

5.0g

ddH2O (三蒸水) 500ml

混合液搅拌至完全溶解，置高压锅灭菌。待液体逐渐冷却后加入25ug/ml氨苄青霉素，放置4℃冰箱保存备用。

**LB培养基平板**

Tryptione (蛋白胨)

Yeast Extract (酵母提取物) 1.2%Agarose powder (琼脂糖粉) NaCl (氯化钠)

2.5g

5.0g

6.0g

5.0g

ddH2O (三蒸水) 500ml

混合液搅拌至完全溶解，高压锅灭菌。放进超净工作台，待液体逐渐冷却致温热状态，加入25ug/ml氨苄青霉素充分混合后，迅速将一定量的液体倒进平板培养皿底，待胶状液冷却凝固后，盖上培养皿盖，封口胶封闭皿口，倒置放进4℃冰箱保存备用。

## **4**.实验方法

### **4.1** 原代心肌细胞培养**[61]**

1）新生Sprague Dawley （SD）大鼠（出生1~3天），新洁尔灭浸泡和75%酒精消毒后，用小剪刀从剑突处沿胸骨向上剪开外层皮肤，改用小弯剪开胸廓暴露心脏，弯镊子取左心室组织，立即放入冰冷PBS中漂洗3遍。

2）用小剪刀将收集到的心肌组织剪成大少约0.5-1.0mm3。

3）向剪碎的组织加入适量冰冻的PBS，用一次性灭菌吸管将悬浮于PBS心肌碎片移入灭菌的50ml锥形瓶中。

4）吸干PBS，再向锥形瓶中加入一定量冰冷的PBS漂洗组织碎片2次，然后吸干PBS；向组织碎片中加入4倍体积0.25%不含EDTA的胰蛋白酶，置37℃

51

水浴箱内震荡消化5min。

5）静置片刻后，灭菌接吸头的剥离吸管吸取上清液，转移至盛载终止液（新生牛血清和DMEM培养基混合液）的玻璃瓶中，混匀细胞。

6）重复上述步骤15-18次左右，收集上清，直至组织碎片被完全消化。

7）将收集到的上清液经细胞筛网过滤后，过滤液分盛到15ml 的离心管以

1200rpm离心5min。

8）弃上清，向离心管中加入含15% FBS的DMEM培养液，充分吹打重悬细胞，将重悬液接种于培养瓶中。

9）差速贴壁分离心肌细胞：将盛载细胞重悬液于37℃、5% CO2培养箱内静置培养。

10）培养1.5h后，绝大部分成纤维细胞已贴壁，吸取出悬液。

11）细胞计数：吸取10ul富含心肌细胞悬液滴进细胞计数板，显微镜下观察计数。

12）根据细胞计数，调整细胞浓度为3×105个/ml后铺至培养板或培养皿。

13）细胞培养：培养皿或板加入含15% FBS的DMEM、双抗和Brdu (终浓度0.1mmol/L)的培养基，置37℃、5% CO2培养箱内培养。

14）第3天早上，细胞换液。先用温热的PBS漂洗坏死的细胞，加入含有双抗和10% FBS的DMEM培养基培养。

15）第4天用无血清的培养基培养。

16）第5天，细胞用于实验。

### **4.2** 干预方案

**4.2.1 AngII刺激诱导体外心肌细胞肥大模型**

按照上述的原代心肌细胞培养方法，待原代细胞培养到第5天后，加入10-6mol/l AngII刺激。持续刺激48小时收集样本检测基因，72小时收集样本检测蛋白表达、流式、电镜和激光共聚焦。

**4.2.2 *ATG9A*基因表达RNAi实验**

按照上述的原代心肌细胞培养方法，待原代细胞培养到第5 天后，加入含

52

*ATG9A*-shRNA的慢病毒或阴性对照病毒感染心肌细胞[约4×105个心肌细胞给予

20µl病毒液（滴度为：1×109 TU/ml）和病毒感染增强剂polybrene(终浓度为：5 mg/ml)]，第6天同时加入10-6mol/l AngII刺激。第8天收集样本检测基因，第9天收集样本检测蛋白、流式、电镜和激光共聚焦。

*ATG9A*-shRNA序列：

5'-GGTTCACATGTATGCTCATTGTTCAAGAGACAATGAGCATACATGTGAACCTT-3'

Negative control序列：

5'-GTTCTCCGAACGTCACGTCAAGAGATTACGTGACACGTTCGGAGAATT-3'

**4.2.3过表达实验**

按照上述的原代心肌细胞培养方法，待原代细胞培养到第5天后，根据转染试剂盒Lipofectamine™ LTX and PLUS Reagents 操作说明，向心肌细胞转染

*ATG9A*过表达载体或对照空载体。第7天收集样本检测基因，第8天收集样本检测蛋白、流式、电镜和激光共聚焦。

**4.3 *ATG9A*（NM\_001034117.1）过表达质粒构建**



**4.3.1总RNA提取**

图9 . 过表达空载体示意图

1）取心脏组织块约80-100mg，加入1ml Trizol，匀浆裂解，常温静置5min。

2）加Trizol体积1/5的氯仿后，猛烈震动数次，常温静置3min分层。

3）4℃低温离心机12, 000 g离心15min，小心吸取最上层上清液，置另一个

53

1.5ml Ep管。

4）加等体积的异丙醇，颠倒混匀，置冰上约10min。

5）4℃低温离心机12,000 g离心10min。

6）弃上清，再加0.5ml预冷的75%DEPC乙醇，振荡数次。

7）4℃低温离心机7,600g离心10min。

8）弃上清，再加0.5ml 预冷的无水乙醇，振荡数次。

9）4℃低温离心机7,600g离心10min。

10）弃上清。室温风干约5-10min。

11）加适量DEPC水吹打溶解。

12）取1μl溶液用酶标仪测量A260/A280比值（1.8-2.0之间）及浓度，用琼脂凝胶电泳验证RNA质量（条带28S:18S吸光值约2: 1），取适量用于逆转录成cDNA，其余加RNA保护剂保存-80℃低温冰箱里。

**4.3.2 mRNA逆转录（RT）**

1）按试剂盒说明书方法行逆转录合成cDNA，反应体系：（体系参照TaKaRa RT System说明）

Oligo (dT) Primer(50µM) dNTP Mixture(10mM) RNA

1.0µl

1.0µl

1.0µg

RNase Free dH2O Up to 10µl 65℃5min→冰上迅速冷却

2）上述Microtube管中加入以下混合液：

5×PrimeScript II Buffer 4.0µl

Rnase Inhibitor(40 U/L) 0.5µl

PrimeScript II RTase(200 U/L) 1.0µl RNase Free dH2O Up to 10µl

30℃10min→42℃45min→95℃5min→4℃，+∞

**4.3.3以cDNA为模板，PCR获得大鼠*ATG9A*基因片段**

54

PCR反应体系：10×Blend Taq Buffer dNTP

Taq E cDNA

ATG9A (F+R) primer Mgcl2

2.0µl

0.3µl

0.5µl

0.5µl

0.6µl

1.0µl

H2O Up to 20.0µl

95 ℃1min→95℃10s→60℃30s→72 ℃30s→72 ℃1 min



40cycles

Forward: 5’-ATGGCACAGTTTGACACTGAATACC-3' Reverse: 5’-CTATACCTTGTGCACTTGAGG-3'

**4.3.4 PCR产物琼脂糖电泳**

1）用0.5×TAE 40ml溶解0.6g琼脂糖，微波炉加热至沸腾。

2）沸腾的琼脂物逐渐冷却至60℃时，加入浓度为10mg/ml EB 2µl，充分混匀。

3）将液相凝胶倒入凝胶槽中，插上梳子，室温放置到凝胶凝固止。

4）拔除梳子，往凝胶槽中注入电泳液到完全淹没凝胶止。

5）将适量产物与loading buffer混合后加入样品孔。

6)电压140v电泳15min。

**4.3.5凝胶回收试剂盒提取PCR产物*ATG9A-*DNA片段**

1）凝胶在紫外灯照射下用刀片切取含*ATG9A-*DNA片段凝胶条带，称重后置于2ml Ep管中。

2）根据凝胶体重，加入3倍凝胶质量体积的Buffer DE-A，混合均匀后于

75℃水浴箱加热，间断混合，每2-3分钟上下颠倒Ep管，直至凝胶完全溶解。

3）往Ep管中加入0.5倍Buffer DE-A体积的Buffer DE-B，混合均匀，液体变成黄色液体。

4）加入1倍凝胶重量体积的异丙醇，颠倒混匀。

55

5）吸取步骤3中的混合液，转移到DNA制备管（置于2ml离心管）中，

12,000g离心1min，弃滤液。

6）将制备管置回2ml的离心管，加入500µl Buffer W1, 12, 000g离心30s，弃滤液。

7）将制备管置回2ml的离心管，加入700µl Buffer W2, 12, 000g离心30s，弃滤液。以同样的方法再用700µl Buffer W2洗涤一次，12, 000g离心1min，弃滤液。

8）将制备管置回2ml的离心管，12, 000g离心1min，弃离心管。

9）将制备管置于洁净的1.5ml的EP管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央加入在65℃水浴箱预热的Eluent 25-30µl，室温静置2-3min; 12, 000g离心1min，洗脱DNA。

**4.3.6 PCR纯化试剂盒纯化已回收*ATG9A*-DNA片段**

1）将回收到的*ATG9A-*DNA片段溶液加入3倍体积Buffer PCR-A，充分混合均匀。

2）将步骤1所得的混合液转移到DNA制备管（置于2ml离心管）中，12, 000g离心1min，弃滤液。

3）将制备管置回2ml的离心管，加入700µl Buffer W2, 12,000g离心1min，弃滤液。

4）将制备管置回2ml的离心管，加入400µl Buffer W2, 12,000g离心1min，弃滤液。

5）将制备管置回2ml的离心管，12, 000g离心1min，弃离心管。

6）将制备管置于洁净的1.5ml的EP管（试剂盒内提供）中，在制备膜中央加入在65℃水浴箱预热的Eluent 25-30µl，室温静置2-3min; 12, 000g离心1min，洗脱DNA。

7）将洗脱的DNA取2µl在Eppendorf光密度仪上测定含量，其余保存在－

20℃备用。

**4.3.7酶切纯化的*ATG9A*基因片段和空载体**

56

pRc/CMV2空载反应体系：

10×M Buffer Xba I

Hind III DSA

Plasmid DNA

3.0µl

1.0µl

1.0µl

1.0µl 600ng

ddH2O Up to 20µl

纯化的*ATG9A*基因片段反应体系：

10×M Buffer Xba I

Hind III DSA

DNA片段

3.0µl

1.0µl

1.0µl

3.0µl

20µl

ddH2O Up to 30µl

上述酶切混合液置PCR仪37℃反应4.5小时。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **4.3.8**  **4.3.9** | **酶切产物进行电泳鉴定、胶回收和纯化**  步骤见 4.3.4、4.3.5 和 4.3.6.  **酶切产物用 T4-DNA 连接酶进行连接** |  |
|  | 酶切产物连接反应体系： |  |
|  | 5×Ligase Buffer Plasmid DNA 酶切产物  纯化 DNA 片段酶切产物  T4 Ligase | 2.0µl  0.5µl  1.0µl  1.0µl |

H2O Up to 10µl

上述酶切混合物置4℃冰箱过夜。

**4.3.10连接产物经大肠杆菌TG1进行转化**

57

1）将制备好TG1感受态细菌从-80℃冰箱内取出，并迅速放置冰上缓慢冻融。

2）将已解冻的感受态细胞放置到超净工作台上，在无菌条件下，取90µl加入预冷的200µl EP管中。

3）将全部酶切产物10µl加入感受态细菌中，轻轻混合后置冰上40分钟。

4）将上述3步骤的混合物置PCR仪进行热激反应，条件42℃反应90秒。

5）将热激完的反应物即置冰上3分钟。

6）将反应混合物转移到一个无菌的EP管中，内含400µl无抗生素的LB培养基。

7）将上述6的混合液放置到恒温摇床仪，于37℃、摇速220rpm下，温育

30分钟。

8）将温育后的混合液，3, 000g离心5分钟，弃大部分上清，剩下100µl菌液铺于含氨苄青霉素的琼脂平板上。

9）将平板倒置放进生化培养箱内，37℃培养18-20小时。

**4.3.11挑取阳性菌落划平板、送鉴定、摇菌和保种**

1）将生化培养箱内的培养板取出，放置到超净工作台上，选取约十个单菌落，分别划涂于新培养板已作标记的区域内。

2）将新划涂菌落的培养板倒置放进生化培养箱内，37℃培养18-20小时。旧培养板用封口胶封闭皿口，置4℃冰箱保存备用。

3）从培养板内，在画涂单菌落的10个区域中分别挑菌，置含氨苄青霉素LB培养基的15ml玻璃试管中，于恒温摇床仪于37℃220rpm摇菌、过夜。培养皿用封口胶封闭皿口，置4℃冰箱保存备用。

4）将摇菌过夜所得的菌液，分别吸取5ml，送公司测序鉴定。

5）分别挑取测序正确区域的菌液，置含氨苄青霉素LB培养基的50ml玻璃试管中，于恒温摇床仪37℃220rpm摇菌、过夜。封口胶封闭培养皿口，置4℃冰箱保存备用。

6）将上述摇菌过夜所得的菌液置于超净工作台上。先向2ml无菌EP管内加入50µl干净的甘油，然后吸取450µl菌液与之混合，封口胶封闭EP管口，置-80℃

58

长期保存菌液。剩余菌液进行下一步的质粒提取。

**4.3.12 Plasmid的抽提**

1）将摇菌过夜所得的菌液，取10-15ml加入体积为15ml的离心管中，室温下5, 000g离心10min收集菌液。

2）弃培养基，加入500µl Solution I/Rnase A混合置细菌完全悬浮状态，将液体转移到干净的2ml 离心管（试剂盒内提供）。

3）向重悬混合液中加入500µl Solution II，轻轻颠倒混匀7-10次，时间不应超过5min。

4）向上述混合液中，加入250µl冰浴Buffer N3，并温柔颠倒数次至混合物出现絮状沉淀。室温12, 000g离心10min。

5）转移上清液置2ml的离心管中，加入0.1倍体积的ETR溶液，混匀后冰浴10min；然后，置42℃水浴5min。室温12, 000g离心3min, ETR溶液在管底形成蓝色分层。

6）转移上清液置离心管中，加入0.5 倍体积的无水乙醇，混匀后室温静置

1-2min。

7）取干净的HiBind柱装在2ml的收集管内，转移上述混合液700µl置柱子内，10, 000g离心1min，弃滤液。

8）把柱子重新装回收集管，重复步骤9至所有混合液都从柱子中滤出。

9）把柱子重新装回收集管，加入500µl HB Buffer, 10, 000g离心1min，弃滤液。

10)把柱子重新装回收集管，加入700µl DNA Wash Buffer, 10,000g离心

1min，弃滤液。10, 000离心1min，弃去收集管中的废液。

11）重复步骤10一次。

12）把柱子重新装回收集管，空柱10, 000离心2min，以甩干柱子基底部的残留液，弃收集管。

13)把柱子重装到干净的2ml的离心管上，加入80-100µl Endotoxin-free Elution Buffer到柱子基质上。室温静放2min, 10, 000离心2min洗脱pRc/CMV2-ATG9A重组质粒。

59

14）取2µl在Eppendorf光密度仪上测定含量，剩余置－20℃保存备用。

**4.3.13 HindⅢ和XbaⅠ双酶切鉴定**

取适量已抽提的质粒行双酶切鉴定，若含有目的基因片段大少的即为

pRc/CMV2-ATG9A重组质粒。

### **4.4** 心肌细胞过表达质粒的转染

根据Lipofectamine™LTX and PLUS Reagents转染试剂盒操作说明，对空载体pRc/CMV2和过表达质粒pRc/CMV2-ATG9A进行转染。以24孔板每孔为例，其他孔板可根据孔的大小按比例放大或者缩小：心肌细胞经无血清培养基培养过夜后，细胞融合率达80~90％，更换新鲜的DMEM培养基（不含血清和抗生素）每孔400μl。首先，取灭菌EP管分别加入相同摩尔数的空载体或过表达载体、50µl Opti-MEM培养基和2µl Plus TM Reagent，轻柔混匀，室温放置5min；再取灭菌的EP管，向管中加入Opti-MEM培养基50ml和2µl Lipofectamine™ LTX

Reagent，轻柔混匀，室温放置5min。然后，将两管液体混合在一起，轻柔混匀室温孵育30min。最后，将混合液加入24孔板的各孔细胞中，轻摇混匀后于培养箱中培养48-72h后按实验需要处理细胞。

**4.5细胞标本的相关基因表达检测**

以12孔板为例，去掉培养基，预冷的PBS清洗两次×5min，吸干板孔内PBS，每孔加500µl Trizol，轻轻吹打30S，把液体转移到无核酸酶的EP管内，室温作用5min. RNA的提取、逆转录和qRT-PCR步骤见第一部分4.5。

**4.6细胞标本的Western Blot检测**

1）以6cm细胞培养皿为例，先去掉细胞培养基，用预冷的PBS漂洗两次

×5min，吸干PBS。

2）向皿内加入含蛋白抑制剂PMSF和Leaptin(两者终浓度为1mM)的蛋白裂解液NP-40 100µl，冰上作用10min。

3）用细胞刮刮下细胞，将裂解液转移到1.5ml EP管中。

4) 4℃14,000g条件下离心10 min，收集上清。

60

5）余下步骤见第一部分4.6。

**4.7细胞流式样品的检测**

1）将板孔内的培养基弃掉，用PBS冲洗2次×5min，吸干PBS。

2)向板孔（六孔板）加入含0.25%含EDTA的胰酶500µl于37 oC、5%CO2

孵育2min使细胞脱落。

3）将消化下来的细胞液转移到装有150µl新生牛血清的EP管以中和胰酶。

4）以1200转/min速度离心5min沉淀细胞，弃血清。

5）向EP管内加入400µl的PBS液重悬细胞，300g离心5min，弃上清。

6）重复步骤5一次。

7)向EP管内加入PBS调整细胞浓度至1×107Cell/ml(即1×106Cell/100µl)，取1×106细胞，在PBS中充分重悬于流式管中，加入适量250µl固定破膜液（BD Fixation/Permeabilization solution）于4 oC孵育20分钟。

8）上述液体300g离心5min，弃上清；用1ml PBS再重悬细胞，300g离心

5mim，弃上清。

9）加入1ml 1×perm/wash buffer漂洗，300g离心5min，弃上清，将细胞重悬于流式管中的残液中。

10)加入预稀释的一抗100µl(LC3B用BD perm/wash buffer稀释至1: 100)，4 oC孵育30分钟；300g离心5min，弃上清。

11）加入1ml 1×perm/wash buffer漂洗，300g离心5min，弃上清，将细胞重悬于流式管中的残液中。

12)加入预稀释的二抗100µl（用BD perm/wash buffer稀释至1: 2000），4 oC

孵育30分钟；300g离心5min，弃上清。

13)加入PBS漂洗，300g离心5min，弃上清。

14）加入PBS500µl重悬细胞，流式仪检测。BD accuri C6软件分析。

**4.8透射电镜的细胞样本检测**

1）将12cm的培养皿中的培养基弃掉，PBS冲洗2次×5min，吸干PBS。

2)向皿加入含0.25% EDTA的胰酶1ml于37 oC、5%CO2孵育2min使细胞

61

脱落。

3）将消化下来的细胞转移到装有650µl的新生牛血清的EP管以中和胰酶。

4)以1200转/min离心5min，弃上清。

5)用500µl PBS重悬细胞，2500转/min离心10min，弃上清。

6）加入4％戊二醛固定8-12小时。

7）余下步骤见第一部分4.7。

**4.9激光共聚焦细胞标本检测**

心肌细胞直接种植于激光共聚焦检测专用的细胞培养板（24孔）中培养。细胞干预后，按下列方法染色：

1）将孔板内的培养基弃掉，PBS清洗5min×3次，尽量吸干PBS。

2)向每孔加入3.7％的多聚甲醛200µl.37 oC固定15min。

3）吸干多聚甲醛，PBS清洗5min×3次，尽量吸干PBS。

4)向每孔加入破膜液PBST (1体积Triton X溶于100体积PBS) 300µl. 室温下浸泡20min破膜。

5）吸干破膜液，加入PBS清洗5min×3次，吸干PBS。

6)向每孔加入1: 45的Alexa Fluor®555 Phalloidin 200µl.37 oC避光孵育

40min。

7）吸干上述液体，向每孔加入PBS清洗5min×3次，吸干PBS。

8)向每孔加入300nM的DAPI工作液200µl，37 oC避光孵育10min。

9）吸干上述液体，向每孔加入PBS洗5min×1次，吸干PBS。

10）向每孔加入PBS 200µl后，置LSM 710激光共聚焦显微镜（Carl Zeiss, 德国）摄片观察。

11)图片结果用Image-Pro Plus软件分析。

## **5**.统计学处理

数据用均数±标准误表示。用Shapiro-Wilk 检验是否正态分布用。使用

Levene's检验判断是否方差齐性。两组间计量资料比较，符合正态分布资料采用

Student's *t* 检验，不符合正态分布应用Mann-Whitney U 检验。多组比较中，符

62

合正态分布和方差齐的计量资料采用ANOVA. *P*<0.05为统计学差异有显著性。使用SPSS 18.0统计软件分析。

# 结果

## **1.** 浓度为**10-6mol/l AngII**刺激心肌细胞的改变

**1.1 AngII刺激心肌细胞肥厚基因和形态学改变**

大鼠原代心肌细胞培养中，与对照组比较，给予10-6mol/l AngII刺激组心肌细胞肥厚相关基因（*ANP* 和*β-MHC*）的表达明显上调（图10），比较有统计学差异（*P*<0.05）。同时，用激光共聚焦检测，可见细胞表面积增大；用IPP 软件测量心肌细胞相对表面积的比值分别为1±0.08和2.14±0.24（图11），两组比较有统计学差异（*P*<0.05）。这些结果表明，给予10-6mol/l AngII刺激心肌细胞可构建体外心肌细胞肥大模型。



图10. qRT-PCR检测两组肥厚基因（*ANP*和*β-MHC*）的表达量，**\****P*<0.05

**1.2 AngII刺激心肌细胞ATG9A的表达和自噬活性的改变**

与control组比较，给予AngII刺激组心肌细胞，心肌细胞发生肥大改变的同时，自噬相关基因ATG9A 的相对表达量为1±0.052 vs 1.83±0.14（图

12A），而其蛋白相对表达量为1±0.02 vs 1.42±0.04（图12B），两组比较有统计学差异。同时，自噬活性标记蛋白p62的相对表达量下调；然而，LC3 II/I的相对表达量上调，分别为1±0.03 vs 1.52±0.04，数据比较有差异（图13）。另外，用流式细胞仪检测两组自噬发生比率，给予AngII刺激组自噬发生的

63

比率比对照组明显升高，两组比较有统计学差异（图14）。这些数据表明，

AngII构建的体外心肌细胞肥大模型，可诱导ATG9A表达上调和自噬活性的增高。



 

图12. AngII刺激心肌细胞致ATG9A表达变化。(A) qRT-PCR检测两组*ATG9A*基因的表达量，**\****P*<0.05. (B) Western blot检测ATG9A蛋白表达量，**\****P*<0.05.





图13。AngII刺激心肌细胞致自噬活性标志蛋白表达变化。Western blot检测p62和LC3

蛋白表达量，**\****P*<0.05。

## **2**.过表达***ATG9A***致心肌细胞自噬活性和肥大的变化

pRc/CMV2 是过表达质粒，我们通过体外构建ATG9A 过表达质粒（命名为

64

pRc/CMV2-ATG9A），用来诱导ATG9A的表达。大鼠原代心肌细胞，转染过表达质粒pRc/CMV2-ATG9A组，与转染阴性对照质粒组比较，ATG9A基因和蛋白的表达均明显上调，基因相对表达量为45.85±6.92 vs 1±0.06（图15），相对蛋白表达量为1.87±0.17 vs 1±0.01（图16），两组比较有统计学差异（*P*<0.05）。



图15. 过表达*ATG9A*后，qRT-PCR检测ATG9A基因的表达量，**\****P*<0.05

诱导*ATG9A*基因表达上调的情况下，我们检测了自噬活性标记蛋白的表达情况。标志蛋白p62，在转染过表达质粒后，其蛋白的表达量较对照组下调了0.45倍；然而，另外一个标志蛋白LC3（LC3 II/I）的表达上调了0.46倍（图16）。





图16 . 过表达*ATG9A*后，Western Blot检测ATG9A和自噬活性标记蛋白的表达量，

***\*****P*<0.05.

同时，我们用流式细胞仪检测了心肌细胞自噬率和透射电镜观察心肌细胞自噬泡的变化。流式细胞仪检测结果显示，过表达*ATG9A* 组心肌细胞自噬率为

36.33%，而对照组心肌细胞的自噬率是19.96%，过表达组心肌细胞自噬活性上

65

调（图17）；透射电镜结果同样表明，过表达组平均每个视野下心肌细胞自噬泡的数量明显比对照组增多，进一步表明过表达组心肌细胞自噬活性增高（图18）。然后，我们检测心肌细胞肥大的变化，评价指标有肥厚基因(*ANP*和*β-MHC*)

的表达和细胞形态大少的改变。与对照组比较，过表达组肥厚基因（*ANP* 和

*β-MHC*）的表达明显上调（1±0.07 vs 1.66±0.08和1±0.04 vs 1.62±0.03，*P*<0.05，

图19 ）；同时，心肌细胞表面积明显增大（1±0.07 vs 2±0.09，*P*<0.05，图20 ）。



图19。 过表达*ATG9A*后，q-PCR检测肥厚基因（*ANP*和*β-MHC*）的表达量，**\****P*<0.05.

## **3**.抑制***ATG9A***的表达对**AngII**诱导心肌细胞自噬活性和肥大的影响

原代心肌细胞，感染阴性对照慢病毒后，给予AngII刺激组与对照组比较，

ATG9A表达上调的同时，自噬活性标志蛋白LC3（LC3 II/I）的表达也上调；然而，另一个自噬活性标志蛋白p62表达下调。当细胞用AngII刺激后同时感染干扰ATG9A表达的慢病毒，与AngII刺激后同时感染NC慢病毒组比较，ATG9A表达下调的同时，自噬活性标志蛋白LC3（LC3 II/I）的表达也下调；但是，p62蛋白表达则上调（图21）。说明AngII可以诱导ATG9A表达的同时，促进自噬活性的增加；然而，RNA干扰慢病毒可以干扰AngII诱导ATG9A表达的同时，抑制了自噬活性的增加。

66





图21。 心肌细胞给予AngII刺激和慢病毒干扰ATG9A表达后，ATG9A和自噬活性标志蛋白表达的变化。（A）qRT-PCR检测ATG9A基因表达的变化。（B）Western Blot 检测ATG9A与自噬活性标志蛋白的变化。**\****P*<0.05表示与NC组比较；**#***P*<0.05表示与AngII+NC组比较。

进一步用流式细胞仪检测心肌细胞自噬率显示（图22）：感染NC慢病毒组

细胞给予AngII 刺激后随着*ATG9A* 的表达上调，心肌细胞自噬率也明显上调

（11.27±0. 61% vs 22.27±0. 75%, *P*<0.05）；然而，当感染RNA干扰病毒后随着

ATG9A的表达下调，心肌细胞自噬率也明显下调（22.27±0. 75% vs 12.47±0. 35%，

*P*<0.05）。同时透射电镜检测也证实（图23）：细胞给予AngII刺激后感染ATG9A基因干扰病毒随着*ATG9A*的表达下调，心肌细胞自噬泡明显减少（2.50±0.17 vs 1.40±0.38, *P*<0.05）。

最后，我们通过检测肥厚基因和细胞形态学的变化，评价心肌细胞肥大的改变。qRT-PCR检测心肌肥厚基因表达（图24）表明：感染阴性对照慢病毒的心肌细胞，给予AngII刺激后，肥厚基因（*ANP*和*β-MHC*）表达明显上调（1.00±0.02 vs 1.68±0.04; 1.00±0.02 vs 1.66±0.06, *P*<0.05）；然而，细胞给予AngII刺激后感染慢病毒干扰ATG9A表达，肥厚基因表达明显下调（1.68±0.04 vs 1.20±0.08；

67

1.66±0.06 vs 1.24±0.03，*P*<0.05）。同时，激光共聚焦检测心肌细胞形态结果与基因表达结果一致（图25）。

图24。心肌细胞给予AngII刺激和慢病毒干扰ATG9A表达后，qRT-PCR检测肥厚基因的表达。**\****P*<0.05表示与NC组比较；**#***P*<0.05表示与AngII+NC组比较。



# 讨论

自噬相关蛋白ATG9A是目前在哺乳动物体内发现的唯一的自噬体膜蛋白，定位于囊泡/自噬前体膜（phagophore/pre-autophagosomal structure, PAS）中，参与自噬过程和囊泡蛋白的募集[62, 63]。虽然，目前关于PAS在哺乳类细胞的结构仍不明确。然而，其形成过程包含一些自噬相关蛋白的募集，当然自噬体膜起源所必须的蛋白ATG9A也在其中[64, 65]。这表明ATG9A在自噬体形成起到至关重要的作用。

本部分实验，关于ATG9A对心肌细胞自噬活性的诱导以及其对心肌细胞肥大的改变作用我们通过设计三个体外小实验进行探讨：AngII诱导心肌细胞肥大模型中，ATG9A表达和自噬活性的变化；过表达ATG9A对自噬的活性和心肌细胞肥大的影响；抑制ATG9A的表达对AngII诱导心肌细胞自噬活性和肥大的改变。

首先，AngII作为参与心肌肥厚过程的重要细胞生长因子，被用来刺激心肌细胞构建体外细胞肥大模型。同时，为了进一步证实体外心肌细胞肥大模型和第一部分在体心脏肥厚模型中观察的现象是否一致，我们在AngII诱导的心肌细胞

68

肥大模型中，检测了ATG9A的表达和自噬活性的变化。10-6mol/l AngII刺激的心肌细胞，可致心肌细胞肥厚基因（*ANP*和*β-MHC*）表达上调，心肌细胞表面积变大，表明体外心肌细胞肥大模型构建成功。通过进一步检测*ATG9A*的基因和蛋白的表达，发现在AngII诱导的心肌细胞肥大中是明显上调；同时，自噬标记蛋白LC3II/I上调和细胞自噬率增加，而自噬底物p62则下调。这些均表明在心肌细胞肥大中，心肌细胞自噬活性增加，与既往的研究一致[11, 12, 42, 43]。

那么，心肌细胞过表达*ATG9A*是否会导致自噬活性上调的同时，加剧了心肌细胞肥大呢？我们通过转染携带能表达*ATG9A*的质粒进入心肌细胞，心肌细胞自噬活性增强的同时，心肌细胞肥厚基因表达上调和心肌细胞表面积增大。从而更进一步证实了*ATG9A*上调能诱导自噬活性增加，加剧了心肌细胞肥大。

然后，我们需证实在AngII诱导的心肌细胞肥大中，ATG9A表达的抑制，是否与自噬活性相关？为此，我们在AngII刺激的心肌细胞肥大中，感染慢病毒干扰ATG9A的表达，进一步求证了：干扰ATG9A的表达，可以减轻心肌细胞自噬活性，进而改善心肌细胞肥大。

该部分实验我们采用多种检测手段来评价自噬活性，在前一部分的动物标本中检测自噬活性标记蛋白LC3 II/I、自噬底物p62的表达和透射电镜观察自噬泡来评价自噬的活性变化，而本部分实验增加了流式细胞术检测自噬的发生率来进一步评价自噬活性的改变。既往实验[66, 67]亦用此法作为自噬发生过程中，从分子水平机制评价自噬活性的方法。自噬体形成依赖的第二个泛素样结合蛋白(Atg8)是位于自噬囊泡膜上，通过特异性的抗体与之结合后，用流式细胞仪检测可以很好地探测其发生率。联合检测自噬活性标志蛋白p62和LC3 II/I的表达、特异性抗体结合后流式细胞仪检测自噬率及透射电镜下观察自噬泡数量能综合评价

ATG9A介导的自噬活性变化。若p62表达下调而LC3 II/I表达上调、流式细胞仪检测细胞的自噬率增加及透射电镜下的自噬泡数量增多表明ATG9A介导的自噬活性增加。与之相反，若P62表达上调、而LC3 II/I表达下调、流式细胞仪检测细胞的自噬率下降及透射电镜下的自噬泡数量减少说明ATG9A介导的自噬活性减弱。当前的数据表明：AngII可引起ATG9A表达上调的同时，增加了自噬的活性，进而导致了心肌细胞肥大的发生；而过表达ATG9A可诱导自噬活性增加的同时，加剧了心肌细胞肥大；抑制ATG9A的表达，可以减轻AngII诱导其

69

表达的同时，抑制了自噬的活性，进而改善了心肌细胞肥大的发生。因此，我们推断：ATG9A诱导的心肌细胞自噬活性的改变介导了AngII引起心肌细胞肥大的变化。

近期的研究发现，自噬的激活与cAMP/PKA和MAPK/ERK1/2信号通路相关[43, 68]，而cAMP/PKA和MAPK/ERK1/2信号通路是心肌肥厚的关键机制[69]；同时，既往实验[11, 12]也证实自噬活性的增加促进心肌肥厚的发生和发展。然而，我们当前实验表明过表达*ATG9A*可介导自噬活性的增加，进而导致心肌细胞肥大的加剧。那么，ATG9A介导自噬活性的增加，进而导致心肌细胞肥大的信号通路是什么？为此，我们推测ATG9A引起的自噬活性上调进而引起心肌细胞肥大可能与cAMP/PKA和MAPK/ERK1/2信号通路变化有关。

我们推测ATG9A 引起的自噬活性增加进而导致心肌细胞肥大可能与

cAMP/PKA和MAPK/ERK1/2信号通路变化有关，有必要在以后的科研工作中去论证。我们采用原代的心肌细胞进行体外研究，而原代的心肌细胞的病理生理状态与动物体内并不完全接近。故若能在成年鼠心肌细胞或基因敲除鼠上作研究，实验将会更加严谨。

心肌肥厚的机制十分复杂，细胞生长因子分泌增加，尤其是AngII分泌的增加是诱导心肌肥厚的机制之一。然而，心脏肥厚除了心肌细胞肥大之外，心脏成纤维细胞的异常增生也起到重要的作用。心肌细胞外基质蛋白的稳态平衡，有赖于成纤维细胞分泌各种生长因子、细胞因子和基质金属蛋白酶来维持。心脏重构表现为心肌细胞基因异常表达和细胞外基质的受损，而在临床上则表现为心脏的大小、形态及功能的异常。本实验未对成纤维细胞进行研究，有待以后的实验中完善。

70

## 小**结**

## 1. 10-6mol/L AngII可刺激心肌细胞肥大，诱导ATG9A的表达和自噬活性的增加。

## 2. 过表达ATG9A可促进心肌细胞的自噬活性增加和肥大加剧。

## 3. 干扰ATG9A的表达能减轻AngII介导心肌细胞的自噬活性增加和肥大加剧。

71

# 附图



图11。AngII刺激心肌细胞后，激光共聚焦检测心肌细胞形态的变化，**\****P*<0.05。



图14。AngII刺激心肌细胞，流式细胞仪检测心肌细胞自噬比率的变化，**\****P*<0.05。



图17。 过表达*ATG9A*，流式细胞仪检测心肌细胞自噬比率的变化，**\****P*<0.05。



72

图18。 过表达*ATG9A*，透射电镜检测心肌细胞自噬泡的变化，**\****P*<0.05。



图20。 过表达*ATG9A*，激光检测心肌细胞形态的变化，**\****P*<0.05。



图22。心肌细胞给予AngII刺激和慢病毒干扰*ATG9A*表达后，流式细胞仪检测心肌细胞自噬率的改变。**\****P*<0.05表示与NC组比较；**#***P*<0.05表示与AngII+NC组比较。



图23。心肌细胞给予AngII刺激和慢病毒干扰*ATG9A*表达后，透射电镜检测心肌细胞自噬泡的变化，**\****P*<0.05。

73





图25。心肌细胞给予AngII刺激和慢病毒干扰*ATG9A*表达后，激光共聚焦检测细胞形态学的改变。**\****P*<0.05表示与NC组比较；**#***P*<0.05表示与AngII+NC组比较。

74

# 第三部分 ：**miR-34a**与**ATG9A**的关系在**AngII**

**诱导心肌细胞肥大中的作用**

我们上述实验揭示，在体内大鼠肥厚心脏组织和体外AngII诱导的心肌细胞肥大中，自噬相关蛋白ATG9A和自噬的活性上调，而miR-34a下调。同时，在第二部分实验中，进一步在体外阐明了自噬相关蛋白ATG9A诱导的心肌细胞自噬活性参与了AngII介导的心肌细胞肥大的发生。既往实验[34]表明，在Hela和

HEK293细胞中，miR-34a靶向作用于ATG9A的表达。因此，本部分实验目的是证实miR-34a能否靶作用于ATG9A的表达来影响心肌细胞自噬活性，进而导致心肌细胞肥大的改变。

# 材料与方法

## **1.** 动物、主要试剂和耗材

pGL3.0 Control（美国Promega）Taq DNA pol（美国Fermentas）10×Taq Buffer（美国Fermentas）

10×H Buffer（日本TakaRa, CA1071）ECOR I（日本TakaRa, D1040A）Xba I（日本TakaRa, D1093A）5×ligation buffer（日本，TaKaRa）

T4 -DNA ligase（日本，TaKaRa）

E. Z. N. ATM Blood DNA Kit试剂盒（美国Omega, D3392-01）慢病毒miR-34a mimics（上海GenePharma合成）

慢病毒miR-34a inhibitors（上海GenePharma合成）慢病毒阴性对照（上海GenePharma合成）

75

pRL-TK Vector（海肾萤光素酶报告基因对照载体）（美国Promega）Dual-luciferase Reporter Assay System (美国Promega)

玻璃底培养皿、培养板（香港NEST生物科技有限公司）其他试剂和耗材见第一、二部分1.。

## **2.** 主要仪器

Lumat LB 9507双荧光检测仪（德国Berthold technologies）其他主要仪器同前第一、二部分2.。

## **3.** 主要试剂配方

见第一部分和第二部分3.。

## **4.** 实验方法

**4.1生物信息网站软件预测靶基因**

在[http: //www. targetscan. org](http://www.targetscan.org/)网站上提供的软件对miR-34a的靶基因进行预测。

**4.2荧光素酶载体构建**



图26。pGL3荧光素酶载体结构图

76

**4.2.1大鼠血液全基因组DNA的提取**

1）将约250µl大鼠血液转移到离心管中，加入25µl OB蛋白酶和250µl Buffer

BL高速涡旋15秒。

2)加入5µl RNA酶，65oC水浴15-20分钟。

3）水浴过程中间断短暂涡旋混匀一次，每5分钟。

4）加入260µl的无水乙醇，高速涡旋20秒混匀，短暂离心收集管盖液体。

5）将混合液（包括形成的沉淀）全部转移到套在2ml收集管的Hibind DNA

柱子中，室温10, 000g离心1分钟，弃收集管。

6）把柱子装在新的收集管中，加500µl HB Buffer，室温10, 000g离心1分钟，弃滤液。

7)把柱子装回收集管中，加700µl DNA Wash Buffer, 室温10,000g离心 1

分钟，弃收集管中的滤液。

8）重复步骤7一次。

9）把柱子装回收集管中，12, 000g离心2分钟以甩干柱子基质残液，弃收集管。

10）把柱子装在干净的1.5离心管中，加50µl 65 oC预热的Elution Buffer置柱子中央基质，室温静置5分钟后，10, 000g离心2分钟以洗脱DNA。

**4.2.2 ATG9A**-**3'UTR引物的设计和合成**

野生型ATG9A-3' UTR片段通过用引物P1P4，以全基因组DNA为模板，直接

PCR扩增获得。而突变片段则以全基因组DNA为模板，先用P1P2引物扩增，获得片段1；然后，用P3P4引物扩增获取片段2；最后以片段1和片段2获得的产物为模板，用P1P4引物进行融合PCR后获得突变型ATG9A- 3' UTR片段。将野生型片段、突变型片段和荧光报告载体分别双酶（ECOR I和Xbal I）酶切后，将片段分别与双荧光素酶报告载体连接。双荧光素酶报告载体结构示意图见图26，引物序列如下所示：

P1引物序列

5'-CCGAATTC ACAAGGCAGAAGCTGGTTCC-3'

P2引物序列

5'-CCGTCTAGA CCCGTTCAAATTCCCTTCTTTA-3'

77

P3引物序列

5'-CAATGACACTGGGACTGGGCTGGGGACC-3'

P4引物序列

5'-GTGTCATTGTCTTTGCATCCACCCCACAG-3'

**4.2.3引物最佳退火温度摸索**

1)溶解引物P1P4、P1P2、P3P4至浓度10µM

2）梯度PCR反应体系：

10×Taq Buffer

2.5 mM dNTP Taq DNA pol 25mM MgCl2

10µM Primer (P 1P2 or P2P3 or P1P4)

Genomic DNA

2.0µl

0.3µl

0.2µl

1.6µl

0.6µl

1.0µl

H2O Up to 20µl

95℃1min→95℃10s→Tx℃15s→72℃20s→72℃1min



40cycles

4.2.4 **PCR产物琼脂糖电泳鉴定**步骤见第一部分实验4.5.5。

4.2.5**野生型3'**-**UTR片段、片段1和片段2用高保真酶扩增**反应体系：

10×KOD plus buffer 25mM MgSO4

2.5 mM dNTP

10µM Primer (P 1P2 or P2P3 or P1P4) KOD plus

Genomic DNA

2.0µl

0.8µl

0.3µl

0.6µl

0.5µl

1.0µl

H2O Up to 20µl

78

片段1反应条件

95℃1min→95℃10s→62℃30s→72℃15s→72℃1min



40cycles

片段2和野生型3'UTR片段反应条件

95℃1min→95℃10s→62℃30s→72℃40s→72℃3min



40cycles

4.2.6**上述PCR获得的片段琼脂糖电泳鉴定**步骤见第二部分4.3.4。

4.2.7**扩增获取的片段行胶回收和纯化**步骤见第二部分4.3.5和4.3.6。

4.2.8**用融合PCR扩增出突变型3'**-**UTR片段**反应体系：

10×KOD plus buffer 25mM MgSO4

2.5 mM dNTP

10µM Primer P 1P4

KOD plus

1/100片段1稀释液

2.0µl

0.8µl

0.3µl

0.6µl

0.5µl

0.5µl

1/100片段2稀释液0.75µl

H2O Up to 20µl

反应条件：

95℃1min→95℃10s→62℃30s→72℃40s→72℃3min



40cycles

79

4.2.9**所获片段琼脂糖电泳鉴定、胶回收和纯化**步骤见第二部分4.3.4、4.3.5和4.3.6。

4.2.10**双酶切3'-UTR野生型片段、突变型片段和pGL3-control载体**野生型3'-UTR片段酶切反应体系：

10×H Buffer ECOR I

Xba I

3'-UTR Wt

3.0µl

1.0µl

1.0µl

20µl

H2O Up to 30µl

突变型3'-UTR Mt片段酶切反应体系：

10×H Buffer ECOR I

Xba I

3'-UTR Mt

3.0µl

1.0µl

1.0µl

20µl

H2O Up to 30µl

pGL3-control酶切反应体系：

10×H Buffer ECOR I

Xba I

pGL3-control

3.0µl

1.0µl

1.0µl

1.5µl

H2O Up to 20µl

上述酶切混合液置PCR仪37℃反应4.5小时。

4.2.11**酶切产物行琼脂糖电泳鉴定、胶回收和纯化**步骤见第二部分4.3.4、4.3.5和4.3.6。

80

**4.2.12片段纯化后进行连接反应**

3'-UTR-ATG9A- Wt与pGL3.0连接反应体系：

5×ligase buffer T4 DNA ligase

纯化酶切后的3’-UTR Wt片断

纯化酶切后的pGL3.0片断

2.0µl

1.0µl

1.0µl

0.5µl

H2O Up to 10µl

3'-UTR-ATG9A- Mt与pGL3.0连接反应体系:

5×ligase buffer

纯化酶切后的3’-UTR Mt片断纯化酶切后的pGL3.0片断

T4 DNA ligase

2.0µl

1.0µl

0.5µl

1.0µl

H2O Up to 10µl

上述连接反应混合物于4℃冰箱连接反应过夜。

4.2.13**连接产物经大肠杆菌TG1进行转化**步骤见第二部分4.3.10。

**4.2.14双荧光素酶报告质粒的抽提**

用Endo-Free plasimid Minikit试剂盒提取质粒，步骤见第二部分4.3.12.

**4.2.15质粒双酶切验证和浓度测定**

取2µl在Eppendorf光密度仪上测定双荧光素酶报告质粒的浓度；然后，取适量已抽提的质粒行双酶（ECOR I和Xbal I）切鉴定，若含有目的基因片段大少的即为构建成功的报告质粒。

4.3**内对照质粒pRL-TK Vector的扩增提取**步骤见第二部分4.3.12。

81



图28。 海肾载体结构示意图

**4.4干预方案**

双荧光素酶报告质粒与miR-34a慢病毒共转染方案：SD大鼠原代心肌细胞培养在24孔板上进行。心肌细胞培养到第5天后，予以negative control或miR-34a

mimics或inhibitors的慢病毒感染心肌细胞[每4x105个心肌细胞加入20µl病毒(109 TU/ml)和polybrene(终浓度5 mg/ml)]，次日共转染200ng pRL-TK Vector和200ng pGL3- *ATG9A* 3'-UTR-Wild Type或者pGL3- *ATG9A* 3'-UTR- Mutant.48小时后于Lumat LB 9507双荧光素酶检测仪测定荧光素酶活性。

miR-34a与AngII刺激：心肌细胞培养到第5天后，先给予negative control

或miR-34a mimics或inhibitors的慢病毒感染心肌细胞[4x105个心肌细胞予以

20µl 病毒(109 TU/ml)和polybrene(终浓度5 mg/ml)]，次日予以10-6mol/l AngII

刺激。72小时后收集样本进行流式检测和细胞形态观察、拍图。

Negative control阴性对照病毒序列

5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTTC-3'

miR-34a mimics病毒序列

5'-TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'

miR-34a inhibitors病毒序列

5'-ACAACCAGCTAAGACACTGCCA-3'

**4.5质粒共转染**

双荧光报告质粒的共转染采用转染试剂Lipofectamine™ LTX and PLUS

Reagents进行：细胞融合率约80~90％，去血清培养过夜，更换新鲜不含血清和抗生素的DMEM培养基，每孔400μl。将荧光报告载体200ng pRL-TK Vector 和

82

200ng pGL3-*ATG9A* 3'-UTR-Wild Type或者pGL3-*ATG9A* 3'-UTR- Mutant用50µl Opti-MEM稀释。每管加入2µl Plus TM Reagent，轻柔混匀，室温放置5min后，与另一管加入Opti-MEM培养基50ml和2µl Lipofectamine™LTX Reagent液体充分混合，室温孵育30min. 将混合液加入24孔板的各孔细胞中，摇晃混匀后置培养箱中培养48h后收集样本。

**4.6荧光素酶活性检测**

1）按试剂盒说明，配备以下工作液：将1倍体积的5×Passive Lysis Buffer

（PLB）加到4倍体积的蒸馏水中，制备1×PLB；用Luciferase Assay Buffer II溶解冻干粉Luciferase Assay Substrate，制备LAR II液；取2.1ml 50×Stop & Glo®Substrate加到105ml Stop & Glo®Buffer，制备Stop & Glo®Reagent液。

2）去培养基，用PBS漂洗2次，弃PBS。

3）向24孔板每孔加入100µl 1×PLB液，室温轻柔晃动培养板15分钟。

4）把每孔的裂解液约20µl分别转移到检测试管中，先向检测管中加入100µl LAR II液进行避光检测，检测萤火虫荧光素酶活性。

5）再向检测管中加入100µl Stop & Glo®Reagent液进行避光检测，测定海肾荧光素酶活性。

6）上述检测均在Lumat LB 9507双荧光素酶检测仪中进行测定荧光素酶活性。

4.7**大鼠原代心肌细胞培养**步骤见第二部分4.1。

**4.8细胞样本mRNA和miRNA的qRT-PCR检测**

逆转录步骤见第二部分4.3.1和4.3.2，qRT-PCR检测见第一部分4.5.6和4.8.3.

4.9**细胞样本的Western Blot检测**步骤见第二部分4.6。

4.10**流式样品的准备和检测**步骤见第二部分4.7。

83

4.11**透射电镜标本的准备和检测**步骤见第二部分4.8。

**4.12激光共聚焦检测**

步骤见第二部分4.9。

**5．统计学处理**

数据用均数±标准误表示。用Shapiro-Wilk 检验是否正态分布用。使用

Levene’检验判断是否方差齐性。两组间计量资料比较，符合正态分布资料采用Student's *t*检验，不符合正态分布应用Mann-Whitney U 检验。多组比较中，符合正态分布和方差齐的计量资料采用ANOVA. *P*<0.05为统计学差异有显著性。使用SPSS 18.0统计软件分析。

# 结果

**1．miR-34a调控ATG9A的表达**

生物信息网的软件预测表明，miR-34a存在与ATG9A基因3’-URT匹配的种子序列，ATG9A基因可能是miR-34a的靶基因（图29A）。双荧光素酶活性检测提示：转染pGL3-*ATG9A* 3'-UTR-Wild Type时，与阴性对照组比较，感染过表达miR-34a 慢病毒组荧光素酶活性下降了45%（*P*<0.05），然而感染干扰miR-34a表达的慢病毒组荧光素酶活性升高到1.38倍（*P*<0.05）；但是，当转染pGL3-*ATG9A* 3'-UTR-Mutant时，与阴性对照组比较，无论是感染过表达miR-34a慢病毒组，还是干扰miR-34a表达慢病毒组荧光素酶活性均无明显变化（*P*>0.05, 图29B）。上述结果验证了miR-34a靶向作用于*ATG9A* 基因中的3’-UTR。



84



图29。双荧光素酶报告基因检测。（A）生物信息网软件预测不同种族miR-34a与ATG9A 3'-UTR匹配的种子序列。（B）心肌细胞转染pGL3-ATG9A 3'-UTR-Wild Type或pGL3-ATG9A 3'-UTR-Mutant时，miR-34a过表达或者抑制对心肌细胞相对荧光素酶活性的影响，\**P*<0.05。

进一步验证miR-34a对靶基因*ATG9A*表达的效果显示：与negative control组比较，心肌细胞无论是过表达miR-34a或者是干扰miR-34a的表达，*ATG9A*的基因表达均无变化（图30A）；但是，ATG9A基因转录翻译后的蛋白表达却明显差异。与negative control组比较，抑制miR-34a表达组ATG9A蛋白表达升高至1.7倍；然而，过表达miR-34a后，ATG9A蛋白的表达则下调。（*P*<0.05, 图30B）。



85



图30. miR-34a调控ATG9A表达的检测。(A) 心肌细胞感染慢病毒miR-34a mimics 或

inhibitors或negative controls后，qRT-PCR检测*ATG9A*基因的表达变化。(B)心肌细胞感染慢病毒miR-34a mimics或inhibitors或negative controls后，Western Blot检测ATG9A蛋白表达的变化，\**P*<0.05.

**2．过表达miR-34a可抑制AngII诱导的心肌细胞自噬活性上调**

体外AngII诱导的心肌细胞肥大中，存在miR-34a的表达明显下调（图31）。然而，过表达miR-34a是否可以抑制AngII诱导自噬活性的激活？我们通过流式细胞和透射电镜检测进一步评价miR-34a对体外AngII刺激心肌细胞诱导的自噬活性增加是否有抑制作用。心肌细胞感染阴性病毒后，给予AngII刺激可使心肌细胞自噬的比率明显升高；然而当细胞给予AngII刺激后，同时感染过表达miR-34a慢病毒组与感染阴性对照慢病毒组比较，前者的心肌细胞的自噬率明显减少，减少到12.4%（*P*<0.05, 图32A）。同时，透射电镜的检测结果也表现为同样的改变（*P*<0.05, 图32B）。



图31. 体外AngII诱导心肌细胞肥大后，qRT-PCR测定miR-34a的表达，\**P*<0.05

**3．miR-34a调控AngII诱导的心肌细胞肥大**

上述实验已经证实AngII可诱导心肌细胞肥大的同时，还会导致miR-34a 的

86

表达明显下调。然而，AngII诱导的心肌细胞肥大，是否受miR-34a的表达改变而调控，我们通过在体外的干预实验进一步验证。与感染阴性慢病毒的心肌细胞组比较，AngII刺激的心肌细胞组可诱导心肌肥厚基因表达上调；与给予AngII刺激同时感染阴性慢病毒组比较，感染过表达miR-34a慢病毒组，心肌肥厚基因表达下调，但是感染抑制miR-34a表达慢病毒组，相关的肥厚基因表达却明显上调（图33A）。激光共聚焦观察细胞形态的改变，与肥厚基因表达结果一致（图

33B）。上述结果表明，miR-34a可调控AngII诱导的心肌细胞肥大。

# 讨论

事实上，miR-34a在不同的病理状态下，其表达是有差异的。比如在衰老的心脏[49]和心肌梗死的组织[50]中，miR-34a表达明显上调；然而，在一些肿瘤疾病中，比如肺癌[70]、膀胱癌[71]，其表达却下调。此外，通过腹主动脉缩窄致压力超负荷诱导的心肌重构中，miR-34a在不同的病理阶段，其表达也不一样[31, 50]。在心肌肥厚阶段，miR-34a表达是下调的[31]，但是在心衰阶段miR-34a表达却是上调[50]。在我们实验中证实肥厚的心肌组织miR-34a表达是下调的，这与以往的基因芯片研究相一致[31]。但是，关于miR-34a调控心肌肥厚的机制仍不明确。所以，进一步实验明确miR-34a在心肌肥厚的作用机制十分必要。

既往也有相关文献报道过，不同的miRNA在心肌肥厚的作用不尽相同。抑制miR-1[72]、miR-23a[73]或miR-133[74]的表达均能促进心肌细胞肥大。同时，其他实验也表明，在体内诱导的心脏肥厚或体外诱导的心肌细胞肥大中，miR-22和miR-30a参与其调控[75, 76]。与此相同的结果证实，在心肌细胞短时过表达或者沉默miR-26a会导致心肌细胞肥大减轻或者加剧[77]。所有这些数据均表明，不同的miRNA通过不同的路径调控了心肌肥厚。我们知道，正如其他的miRNAs, miR-34a能靶作用于不同的基因进而调控不同疾病的发生和发展。例如，既往的研究表明：miR-34a的表达异常抑制了IMR90细胞的生长，分子机制是通过抑制c-MET和与细胞生长周期相关基因的表达而实现的[33]。另外一项研究也证实了，在不同的食管癌细胞株中，过表达miR-34a能抑制肿瘤细胞的增长、c-MET和cyclinD1基因的表达[78]。同时，miR-34a是肿瘤抑制基因p53蛋白的下游调控

87

物[33, 79]。在这部分实验中，我们首先验证了miR-34a参与AngII诱导的心肌细胞肥大，进一步实验需明确miR-34a靶向作用于什么基因起作用。

近来关于miRNA调控心肌自噬活性的研究表明：miR-204[80]和miR-30a[76]能靶向作用于LC3-II或Beclin-1的表达调控心肌自噬的活性。另外，miR-212和miR-132共同靶向于Foxo3的表达来调控心肌细胞自噬的活性[81]。既往的研究已经报道过，miR-34a不紧参与细胞的周期、分裂和凋亡的调控，靶基因分别是CDC25C、CREP和Bcl-2[32-34]；而且也参与了自噬活性的调控[82, 83]。因此，miR-34a在不同的细胞株的不同生理和病理状态所起的作用各不相同。在本部分实验中，我们证实：大鼠原代心肌细胞中给予AngII刺激可诱导心肌细胞自噬活性的增加；然而，给予AngII刺激的同时感染miR-34a过表达慢病毒后，自噬活性却被抑制。其分子机制是AngII刺激自噬活性的变化是通过miR-34a表达的改变导致ATG9A蛋白表达的异常所致。既往实验在Hela和HEK293细胞株中已经证实，ATG9A是miR-34a靶向基因，目前我们在大鼠原代的心肌细胞中也证实同样的结果。这些结果表明：miR-34a通过抑制ATG9A蛋白的表达，进而缓解了AngII诱导的心肌细胞自噬活性的激活。为此，我们在体外仍需进一步证实：miR-34a的改变介导了ATG9A蛋白和自噬活性的变化是否能调控AngII诱导的心肌细胞肥大。

首先，我们通过检测肥厚基因表达的变化来进一步评价miR-34a表达的改变是否调控AngII介导的心肌细胞肥大。

体外原代心肌细胞中，用阴性慢病毒感染细胞后给予AngII刺激，心肌细胞肥厚基因表达明显水平上调。同时，心肌细胞在AngII刺激同时，感染miR-34a过表达慢病毒，能抑制肥厚基因的表达；然而，感染抑制miR-34a表达的慢病毒，肥厚基因的表达明显上调。

然后，我们通过激光共聚焦对心肌细胞形态学进行观察验证。

鬼笔环肽是一种携带荧光基团的特异性染料，能特异性与细胞骨架蛋白F肌动蛋白相结合而着色，在激光共聚焦显微镜下可观察细胞的形态并拍图，同时可测量心肌表面积的大小。AngII刺激可诱导心肌细胞形态学上的肥大；感染miR-34a过表达慢病毒可减轻AngII诱导的心肌细胞肥大的形态学改变；然而，感染抑制miR-34a表达的慢病毒则加剧AngII诱导心肌细胞肥大的形态学改变。

88

总之，miR-34a能靶向于*ATG9A*基因的3’UTR，进而调控其蛋白的表达。miR-34a能导致ATG9A蛋白的表达和自噬活性的改变，miR-34a的表达下调加剧了AngII引起的心肌细胞肥大。结合第二部分实验结果我们得出：miR-34a可调控AngII介导的心肌细胞肥大，而其调控作用是通过直接抑制ATG9A蛋白的表达和自噬活性来实现的。我们的发现能为将来对心肌肥厚的调控提供有希望的作用靶点。

我们知道心肌肥厚是心脏重构病理生理过程中的一个阶段，故目前的发现不能盲目用来解析心脏重构的全过程。另外，我们仅从在细胞层面论证了miR-34a的改变引起ATG9A蛋白表达和心肌自噬活性的变化介导了AngII诱导的心肌细胞肥大，有待在动物体内进一步论证其作用机制。

89

## 小**结**

1. miR-34a靶向于*ATG9A*基因的3’-UTR，调控其蛋白的表达。

2. miR-34a在AngII诱导的心肌细胞肥大中表达明显下调。

3. miR-34a上调可抑制AngII诱导心肌细胞的自噬活性。

4. miR-34a调控AngII诱导的心肌细胞肥大。

90

# 附图



图27. *ATG9A* 3'- UTR野生片段和突变片段克隆结构简图。以全基因组DNA为模板，用P1和

P4引物扩增，获得*ATG9A* 3'-UTR野生型片段。用P1和P2引物扩增获得片段1，用P3和P4引物扩增获得片段2，以两片段为模板，用P1和P4为引物行融合PCR获得*ATG9A* 3'-UTR突变型片段。





图32. 心肌细胞感染慢病毒negative control或感染慢病毒miR-34a或同时给予AngII刺激后，检测心肌细胞自噬活性变化。（A）流式细胞仪检测心肌细胞自噬发生率，\**P*<0.05与阴性对照组比较，**#***P*<0.05与AngII+NC组比较。(B) 透射电镜观察心肌细胞自噬泡数量变化，

91

\**P*<0.05 与阴性对照组比较，**#***P*<0.05表示与AngII+NC组比较。



图33。miR-34a调控AngII诱导的心肌细胞肥大。（A）心肌细胞感染阴性对照慢病毒或者给予AngII刺激同时感染阴性对照慢病毒或者同时感染miR-34a mimics慢病毒或者同时感染miR-34a inhibitors慢病毒后，qRT-PCR检测肥厚基因的表达。\**P* <0.05与NC组比较；#*P* <

0.05与AngII + NC组比较。(B) 激光共聚焦检测心肌细胞形态学的改变。\**P* <0.05与NC

组比较；#*P* <0.05与AngII + NC组比较。

92

# 全文结论

miR-34a可调控AngII诱导的心肌细胞肥大，而其调控作用是通过直接抑制

ATG9A蛋白的表达和心肌细胞自噬活性来实现。

93

参考文献

[1] Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. Heart. 2007; 93: 1137-46.

[2] Pagley PR, Beller GA, Watson DD, et al. Improved outcome after coronary bypass surgery in patients with ischemic cardiomyopathy and residual myocardial viability. Circulation. 1997; 96: 793-800.

[3] Fowles RE, Mason JW. Endomyocardial biopsy. Annals of internal medicine. 1982; 97: 885-94.

[4] Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, et al. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. Journal of the American College of Cardiology. 2002; 39: 1151-8.

[5] Ardehali H, Qasim A, Cappola T, et al. Endomyocardial biopsy plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. American heart journal. 2004; 147: 919-23.

[6] Stewart S, Ekman I, Ekman T, et al. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital cases in Sweden (1988 to 2004). Circulation Cardiovascular quality and outcomes. 2010; 3: 573-80.

[7] Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, et al. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. Circulation. 2009; 119: 515-23.

[8] Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. The American journal of cardiology. 1997; 80: 15L-25L.

[9] Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005; 6: 185-216.

[10] Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol. 1997; 59: 551-71.

[11] Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. J Clin Invest. 2007; 117: 1782-93.

[12] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nat Med. 2007; 13: 619-24.

[13] Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, et al. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell

94

Death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. Oncogene. 2003;22:8529-35.

[14] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nature reviews Molecular cell biology. 2007; 8: 931-7.

[15] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. Nature.

2011;469:323-35.

[16] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of pathology. 2010; 221: 3-12.

[17] Kirshenbaum LA. Regulation of autophagy in the heart in health and disease. Journal of cardiovascular pharmacology. 2012; 60: 109.

[18] Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). Nature. 2000; 406: 906-10.

[19] Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008; 105: 9745-50.

[20] 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. Circulation research. 2007; 100: 914-22.

[21] Verheye S, Martinet W, Kockx MM, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. Journal of the American College of Cardiology. 2007; 49: 706-15.

[22] Liao X, Sluimer JC, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. Cell metabolism. 2012; 15: 545-53.

[23] Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. Circulation. 2008; 117: 3070-8.

[24] Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. Circulation. 2009; 120: S191-7.

[25] Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, et al. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. Basic research in cardiology. 2011; 106: 1173-91.

[26] Zhong J, Basu R, Guo D, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological

95

Hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. Circulation. 2010;122:717-28, 18 p following 28.

[27] Porrello ER, Delbridge LM. Cardiomyocyte autophagy is regulated by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. Autophagy. 2009; 5: 1215-6.

[28] Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. Circulation research. 2011; 108: 837-46.

[29] Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, et al. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. Hypertension. 2009; 53: 1032-40.

[30] Gu S, Jin L, Zhang F, et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. Nature structural & molecular biology. 2009; 16: 144-50.

[31] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophyAmJPathol. 2007; 170: 1831-40.

[32] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104: 15472-7.

[33] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature. 2007; 447: 1130-4.

[34] Tivnan A, Tracey L, Buckley PG, et al. MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma. BMC Cancer. 2011; 11: 33.

[35] Yang J, Chen D, He Y, et al. MiR-34 modulates Caenorhabditis elegans lifespan via repressing the autophagy gene atg9. Age (Dordr). 2013; 35: 11-22.

[36] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell.

2010;140:313-26.

[37] Pellieux C, Sauthier T, Domenighetti A, et al. Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y5 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97: 1595-600.

[38] Herring N, Lokale MN, Danson EJ, et al. Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal

96

Bradycardia via a Y2 receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. Journal of molecular and cellular cardiology. 2008;44:477-85.

[39] Ilebekk A, Bjorkman JA, Nordlander M. Influence of endogenous neuropeptide Y (NPY) on the sympathetic-parasympathetic interaction in the canine heart. Journal of cardiovascular pharmacology. 2005; 46: 474-80.

[40] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Developmental cell. 2004; 6: 463-77.

[41] Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. Nature reviews Molecular cell biology. 2005; 6: 439-48.

[42] Rifki OF, Bodemann BO, Battiprolu PK, et al. RalGDS-dependent cardiomyocyte autophagy is required for load-induced ventricular hypertrophy. Journal of molecular and cellular cardiology. 2013; 59: 128-38.

[43] Chen H, Wang X, Tong M, et al. Intermedin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy through activation of autophagy. PLoS One. 2013; 8: e64757.

[44] Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. Cell.

2009;137:1001-4.

[45] Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. The Journal of cell biology. 2005; 171: 603-14.

[46] Su H, Li F, Ranek MJ, et al. COP9 signalosome regulates autophagosome maturation. Circulation.

2011;124:2117-28.

[47] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Current biology: CB. 2007; 17: 1298-307.

[48] Tabuchi T, Satoh M, Itoh T, et al. MicroRNA-34a regulates the longevity-associated protein SIRT1 in coronary artery disease: effect of statins on SIRT1 and microRNA-34a expression. Clinical science. 2012; 123: 161-71.

[49] Boon RA, Iekushi K, Lechner S, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. Nature. 2013; 495: 107-10.

[50] Bernardo BC, Gao XM, Winbanks CE, et al. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. Proceedings of the

97

National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:17615-20.

[51] Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. The EMBO journal. 1993; 12: 1681-92.

[52] Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, et al. Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. J Biol Chem. 1993; 268: 12069-76.

[53] Rozengurt E. Neuropeptides as cellular growth factors: role of multiple signalling pathways. European journal of clinical investigation. 1991; 21: 123-34.

[54] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. Circulation research. 1995; 77: 258-65.

[55] Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1991; 5: 3037-46.

[56] Schneider MD, Parker TG. Cardiac growth factors. Progress in growth factor research.

1991;3:1-26.

[57] Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, et al. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. Hypertension. 1994; 23: 587-92.

[58] Ruzicka M, Leenen FH. Relevance of blockade of cardiac and circulatory angiotensin-converting enzyme for the prevention of volume overload-induced cardiac hypertrophy. Circulation. 1995; 91: 16-9.

[59] Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, et al. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. Hypertension. 1995; 25: 250-9.

[60] Weinberg EO, Schoen FJ, George D, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. Circulation. 1994; 90: 1410-22.

[61] Takemoto M, Node K, Nakagami H, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. J Clin Invest. 2001; 108: 1429-37.

[62] Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. The EMBO journal.

98

2001;20:5971-81.

[63] Yen WL, Klionsky DJ. Atg27 is a second transmembrane cycling protein. Autophagy.

2007;3:254-6.

[64] Krick R, Muehe Y, Prick T, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. Molecular biology of the cell. 2008; 19: 4492-505.

[65] Sekito T, Kawamata T, Ichikawa R, et al. Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms. 2009; 14: 525-38.

[66] Jiang YY, Yang R, Wang HJ, et al. Mechanism of autophagy induction and role of autophagy in antagonizing mitomycin C-induced cell apoptosis in silibinin treated human melanoma A375-S2 cells. European journal of pharmacology. 2011.

[67] Hundeshagen P, Hamacher-Brady A, Eils R, et al. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. BMC biology. 2011; 9: 38.

[68] Bravo-San Pedro JM, Niso-Santano M, Gomez-Sanchez R, et al. The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2013; 70: 121-36.

[69] Meng R, Pei Z, Zhang A, et al. AMPK activation enhances PPARalpha activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. Archives of biochemistry and biophysics. 2011; 511: 1-7.

[70] Basak SK, Veena MS, Oh S, et al. Correction: The CD44 Tumorigenic Subsets in Lung Cancer Biospecimens Are Enriched for Low miR-34a Expression. PLoS One. 2013; 8.

[71] Wang W, Li T, Han G, et al. Expression and role of miR-34a in bladder cancer. Indian J Biochem Biophys. 2013; 50: 87-92.

[72] Ikeda S, He A, Kong SW, et al. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. Mol Cell Biol. 2009; 29: 2193-204.

[73] Lin Z, Murtaza I, Wang K, et al. miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009; 106: 12103-8.

[74] Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med.

2007;13:613-8.

99

[75] Huang ZP, Chen J, Seok HY, et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. Circulation research. 2013; 112: 1234-43.

[76] Yin X, Peng C, Ning W, et al. miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy. Mol Cell Biochem. 2013; 379: 1-6.

[77] Zhang ZH, Li J, Liu BR, et al. MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target. Journal of cardiovascular pharmacology. 2013.

[78] Hu Y, Correa AM, Hoque A, et al. Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. Int J Cancer. 2011; 128: 132-43.

[79] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. Mol Cell. 2007; 26: 745-52.

[80] Jian X, Xiao-yan Z, Bin H, et al. MiR-204 regulate cardiomyocyte autophagy induced by hypoxia-reoxygenation through LC3-II. Int J Cardiol. 2011; 148: 110-2.

[81] Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, et al. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. Nat Commun. 2012; 3: 1078.

[82] Zhang XD, Wang Y, Wu JC, et al. Down-regulation of Bcl-2 enhances autophagy activation and cell death induced by mitochondrial dysfunction in rat striatum. J Neurosci Res. 2009; 87: 3600-10.

[83] Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, et al. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. Autophagy. 2009; 5: 720-2.

100

# 综述

**自噬的治疗靶点与心血管疾病**

**黄炯华综述刘世明审校**

据世界卫生组织研究报道：心血管疾病是全球性头号的致死病因。而这一结果将在未来数年中仍会持续不变[1]。心血管疾病的高发病率和死亡率耗费了十分昂贵治疗费用，仅美国一个国家就高达5000亿美元以上[1]。基于这些发人深省的事实，对疾病发病机制的深入研究寻求疾病有效的治疗靶点显得十分迫切。

在过去的二十年里，人们对于溶酶体途径介导受损蛋白分解参与了各种心血管疾病的研究越来越深入[2]。然而，在疾病的发生和发展过程中，关于这些代谢分解途径所起到的作用，到目前为止仍不十分明确。近年来，有学者在酵母菌中发现了一个十分复杂的分子级联反应现象：在生物体内，可通过特殊的分子级联反应把体内受损物质封闭起来，然后运输到溶酶体内进行分解的过程。我们称这个过程为自噬反应。这个反应过程是一个受损蛋白质和细胞器分解代谢的高度保守机制，存在于绝大多数真核细胞[3, 4]。目前，已经识别出大约有32种调控自噬过程的相关基因，当中包括一些以自噬形成所必须的核心环节来命名的相关基因

[5]. 对于自噬分子机制的深入探究，有望在将来阐明其在不同种疾病的病理过程中所起的作用[6]，当然也包括在心血管疾病的病理过程中所起的作用[7, 8]。

**1. 自噬的过程**

自噬被称为细胞内的分解器，是细胞内分解代谢的反应过程。当细胞受到能量缺乏等压力刺激下，细胞会通过这种方式将细胞内容物，包括蛋白质、核糖体、脂肪微粒，甚至整个细胞器进行分解代谢重获养分[9]。然而，当细胞给予足量的养分供给时，合成代谢反而占主导地位；同时，细胞会通过自噬反应提供维持机体正常的内环境稳定和平衡所需的最低养分[10, 11]。比如，在一些细胞中，尤其是在一些再生能力差的细胞（如心肌细胞、神经元细胞），基础水平的自噬对分解衰老蛋白、脂滴和受损的细胞器十分必要。通过能量供给不足或缺乏诱导机体饥饿应激反应，触发生长因子信号通路的活化和传递，进而快速激活自噬反应。自

101

噬激活的结果会导致胞浆受损蛋白被吞噬和分解。

来源于自噬分解的产物有两方面的作用。一方面可以提供生物合成原材料。另一方面则供给细胞内能量所需。而关于能量供给方面，细胞主要是通过自噬反应对氨基酸和脂肪酸进行分解进而合成能量物质ATP[12, 13]。这些能量物质除了提供细胞自身大分子物质的构建所需的能量外，还为分子物质加工过程提供能量所需，当然也包括自噬反应本身的能量所需[14]。此外，自噬可分解RNA产生核苷酸，核苷酸进一步降解成核糖磷酸盐。六个核糖磷酸盐分子约等于五个葡萄糖磷酸盐分子通过有氧或无氧酵解所产生的ATP能量物质[12, 13]。

自噬活性的过度激活除了机体在能量缺乏情况下出现外，在其他重要的临床病变下也会发生，比如退行性神经病、肿瘤、折叠蛋白异常堆积、微生物侵蚀和心血管疾病[7-9]。当细胞受到压力负荷刺激时，例如饥饿和缺氧，自噬反应被启动，进而释放新合成的能量物质和清除体内受损的细胞器。然而，自噬过度和持续激活会导致机体所需的分子物质和细胞器耗竭，促发了自噬性细胞死亡[7, 8, 15,

16]。

事实上，目前发现三种不同类型的自噬反应，分别为小分子自噬、分子伴侣蛋白介导的自噬和大分子自噬[10]。小分子自噬是细胞内有害物质被吞噬后直接运输到溶酶体内被降解的过程。分子伴侣介导的自噬是折叠蛋白与热休克蛋白-70结合后传递到溶酶体内而被清除的过程。大分子自噬是生物体内最主要的自噬方式，是降解和再循环衰老蛋白，清除受损细胞器的主要途径。

我们对溶酶体途径参与各种心脏病的发生和发展已认识多年，然而对自噬机制的认识却十分有限。近年来，随着探测自噬的手段越来越完善，对自噬机制的研究才得到深入。同时，由于这些探测手段的完善使得我们能够进一步明确自噬反应在心脏不同疾病状态下所起的不同作用。目前，大量的研究正试图进一步区分自噬在不同的疾病状态下所起不同作用，以及研究它们潜在的机制。总的来说，这些研究有望进一步明确自噬反应在心肌细胞的不同作用机制，为心血管疾病的治疗提供有效的防治靶点。

**2. 自噬的分子机理**

总而言之，自噬反应是细胞内容物被密闭包绕在一个特殊双层膜结构的运输

102

器（又称作自噬体）中，然后被传送到溶酶体内分解的过程[17]。然而这个反应过程十分复杂，涉及到包膜形成的动力学反应、囊泡的运输以及运输物的分解。自噬的级联反应被分成不同的阶段，包括自噬的诱导阶段、自噬内容物的识别和分选阶段、自噬囊泡的形成阶段、自噬体和囊泡融合阶段、承载物的分解以及分解产物释放阶段、自噬反应终止阶段[18-20]。自噬途径的分子构造由以下四个部分组成：

**2.1 Atg1激酶复合物**

这个信号复合物操控自噬体形成的早期阶段，而这个信号复合物的合成由

mTOR通路介导的能量效应调控[21]。在酵母菌中，Tor通过整合来自多个上游信号通路传递的信息来负调控Atg1的表达[22, 23]。如果Tor受抑制，比如给予雷帕霉素药物或者通过养分缺乏诱导，那么Atg1激酶的活性则被诱导激活。随后，

Atg13和Atg17结合Atg1增多，进而促进ATG1/ATG13/ATG17复合物的形成。这种复合物的增多反过来导致其他的Atg 蛋白的募集进而策动自噬体的形成。

ULK1/2是酵母菌Atg1与哺乳动物同源的基因[24, 25]。

在哺乳类细胞中，给予高养分培养，mTOR被磷酸化进而灭活ULK1/2[26, 27]。若细胞受到饥饿刺激或者给予雷帕霉素治疗，ULK1和ULK2则被激活，同时磷酸化Atg13和FIP200，然而所有这些变化均是诱导自噬反应所必须的[27]。

**2.2 mAtg9信号通路**

为了给自噬体双层膜构建添加新的膜材料，自噬体膜被募集到自噬前体结构

（pre-autophagosomal structure, PAS）中。随后，通过Atg9传递膜材料促使自噬体膜进一步扩大[23]。Atg9作为一种跨膜运输器穿梭于自噬前体和细胞内不同部位，完成了从宿主部位到自噬泡膜扩增运输的全过程[23, 28]。Atg9到自噬前体的顺行过程由Atg11、Atg23和Atg27调控。而Atg9从自噬前体内部逆行到自噬前体外部则由Atg1-Atg13、Atg2-Atg18和Atg14参与调控。当Atg2-Atg18复合物与Atg9共同募集在自噬前体结构时，会快速分选出其他特定部位的Atg9[9, 22, 23]。

**2.3 Class III phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K) /Vps34复合物**

多个Atg蛋白被募集到囊泡中参与了自噬体的形成过程。在众多的蛋白中，

103

Atg18, Atg20, Atg21和Atg24通过与由Vps34产生的磷脂酰肌醇-3 -激酶(PI3K)结合而被募集到自噬前体结构中[9, 22, 23]。Vps34可产生两种不同的PI3K复合物：复合物I由Vps34, Vps15/p150, Atg6/beclin 1和mAtg14组成；而复合物II则由Vps34, Vps15, Atg6和Vps38组成。PI3K复合物I的激活是使一些Atg蛋白

（例如Atg18等）定向结合在自噬前体结构上所必须的。当养分充足的情况下，则自噬反应诱导的Beclin 1激活会被Bcl-2所抑制；然而，解除Bcl-2对Beclin 1的抑制却是诱导自噬反应所必须的[9]。

**2.4两个泛素样蛋白共轭系统**

有两个特点相似的级联反应均是通过泛素样蛋白共轭促成囊泡扩增和自噬体形成的级联反应。Atg12先被类泛素E1样酶激活（Atg7），随后被转运到类泛素样E2酶（Atg10）。Atg12被共价藕联Atg5，而Atg5-Atg12复合物则可与Atg16相互作用。在其他泛素样蛋白级联反应中，LC3（与哺乳类动物同源的基因Atg8）则被Atg4切割而暴露出一个羧基末端的甘氨酸残基。在这个过程中，LC3-I首先被类泛素样E1样酶（Atg7）激活，随后被转运到类泛素E2样酶（Atg3）而进一步被切割，最后共价连接到磷脂酰乙醇胺分子上进一步脂化，定位到囊泡膜中。这个被切割/脂化的物质被称为LC3-II，由于它的分子量比LC3-I少，故其在蛋白凝胶SDS-PAGE电泳中迁移较快。同时，它的表达高低与自噬体形成多少相关。

因此，自噬反应的过程由上述各个反应体系相互交错协同调控的，其中包括两个激酶系统（Atg1-Atg13 和Class III PI3K）、两个泛素样蛋白共轭系统

（Atg5-Atg12和LC3-II-PE）和一个囊泡蛋白分选/成熟系统。

**2.5溶酶体**

囊泡通过自我封闭持续扩增进而形成自噬体；而自噬体通过与溶酶体进一步结合而形成自噬溶酶体。参与这个过程的物质与前期调控泡膜融合反应相同。在哺乳细胞中，自噬-溶酶体融合反应需要溶酶体膜蛋白（LAMP-2）和小分子物质

（GTPase Rab7）的参与[23]。融合反应后，承载器及其内容物的分解反应依赖于一系列的溶酶体/泡膜酸性水解酶的作用来实现，而这些酶中包括组蛋白酶B、D

104

和L[29]。最后被分解的小分子物质，包括氨基酸、糖以及核苷酸通过渗透作用被释放到胞浆中。然而，在分解的小分子物质被释放之前，即自噬体与溶酶体结合的早、晚期，自噬-溶酶体内的pH值会出现明显降低的变化。

人类Danon's疾病的病因是LAMP-2基因表达的缺失所致[30]。由于LAMP-2功能的缺失，导致自噬体与溶酶体结合受阻，进而受损蛋白增多，自噬体堆积，最后进展成为心肌病。

在自噬过程中，除了上述提到的重要Atg蛋白外，伴随细胞骨架分泌和内吞噬途径的自噬相关蛋白也是必需的。这些蛋白能为泡膜的形成提供材料，促使自噬体运输和清除被降解的自噬废物。鉴于此，自噬通路的分子路径以及其下游的溶酶体都是潜在的自噬调控靶点。

**3. 自噬调控的信号通路**

**3.1 mTORC1**

细胞自噬反应的核心调控环节是mTOR。这是一个当细胞受到养分、生长因子、ATP或其它压力刺激下起应答作用的蛋白激酶[31]。这个蛋白激酶能调控细胞生长和代谢。mTOR存在两种不同形式的多蛋白复合物：一个是TORC1；另一个是TORC2. TORC1由mTOR, Raptor和mLST8组成，是雷帕霉素敏感结合物，能够调控基因的翻译、转录以及自噬反应进而从时间上操控细胞生长速度；

TORC2由mTOR，Rictor，mLST8和Protor组成，是雷帕霉素非特异性结合物，能够通过调控细胞骨架上的肌动蛋白在空间上操控细胞的生长。细胞给予富含能量物质ATP和生长因子时，能激活TORC1进而维持细胞基础水平的大分子自噬反应[31]。然而，当TORC1由于养分缺乏或给予雷帕霉素（大环内酯类药物，能通过与FKBP12相互作用而阻断mTOR信号传递）治疗而受到抑制时，大分子自噬反应则被促发加剧[31]。TORC1通过上游物协调平衡蛋白磷酸化和激酶来调控其活性。促胰岛素生长/胰岛素样生长因子-1（pro-growth insulin/IGF-1）通路能通过激活I类PI3Ks复合物来抑制自噬的反应。磷脂酰肌醇-3, 4, 5，-三磷酸酯

（PIP3）是一系列酶活化的产物，它能首先激活AKt，最终活化mTOR，进而起到抑制自噬反应的作用[32]。相反，肿瘤抑制因子（磷酸酶和张力蛋白同源物）能通过调控PIP3磷酸酶的活性来拮抗insulin/IGF-1通路，从而触发自噬反应的发

105

生[33]。TORC1的调控因子是Rheb、结节性硬化复合物-1（tuberous sclerosis complex 1, TSC1）和结节性硬化复合物-2（tuberous sclerosis complex 2, TSC2）。其中Rheb与Ras同源，在大脑中比较丰富，是一种蛋白质能与TOR直接结合而促进TOR信号通路的激活。而TSC1和TSC2可共同调控TSC2中的GAP的活性来抑制Rheb。因此，TSC-Rheb-TOR复合物是多个调控自噬活性反应通路的交汇点[31]。

**3.2 IP3受体**

肌醇-1,4,5-三磷酸酯（IP3）和它的受体（IP3R）是自噬反应中内源的负性调控子[34, 35]。IP3R在促进细胞微区内Ca2+聚集和反馈来自细胞内Ca2+储备池到特殊部位（比如线粒体部位）[36, 37]的信号传递起到重要的作用。通过特殊的拮抗剂Xestospongin B抑制IP3R或者用小分子RNA片段沉默不同亚型的IP3R，能促发自噬活性反应加剧[35, 38]。例如，给予Xestospongin B药物或饥饿应激反应均可通过干扰分子复合物（IP3R与Beclin 1结合）的形成而诱导自噬的反应。最近的实验表明在内质网中IP3R可持续提供Ca2+给线粒体，促进丙酮酸转化成为乙酰辅酶A、三羧酸循环和通过电传递连锁反应产生ATP[37]。如果机体能量缺失而IP3R不被激活，则AMPK被激活，启动自噬反应用来维持生物体内能量平衡和细胞的存活[37]。

**3.3 AMPK**

AMPK是一类由三个亚型（α、β和γ）组成的异蛋白激酶。它们是调控多个能量平衡信号通路的整合子[39]。在特定情况下，AMPK通过抑制mTOR复合物形成而负调控自噬反应[40]。当生物体内ATP的水平降低的情况下，AMPK则会被其上游物LKB1激酶所活化。被活化的AMPK，则会反过来促进TSC1/TSC2复合物合成增多进而抑制Rheb的活性，随后抑制mTORC1的活性[40]。由AMPK或AKT介导TSC1/TSC2的磷酸化对mTORC1或mTORC1与能量、生长因子信号通路的作用是截然相反的。然而，AMPK 可以通过另一种作用机制调控

mTORC1。因为它可以直接磷酸化Raptor，进而抑制mTORC1。当然，通过AMP

依赖和Ca2+依赖途径，AMPK的上游激酶CaMKKβ同样能磷酸化AMPK[39]。同

106

样，细胞因子和细胞内Ca2+增加也是通过相同的机制激活AMPK和自噬反应[40]。

**3.4 PKA**

环磷酸腺苷-3’，5’-单磷酸(cAMP)是一个最常见的第二信使物质。它通过活化

G蛋白藕联受体参与生物体内多个生理反应过程[41]。它主要的效应物是cAMP依赖的蛋白激酶A（PKA），是由两个调控部位和两个催化亚基构成的异型四聚体。异型四聚体被分解后，催化亚基能通过磷酸化不同的底物来调控各种分子加工过程[41]。例如，PKA可通过细胞外的养分缺乏和其他压力应激反应来调控细胞生长。机体在高糖供给情况下，Ras能募集GTP结合的活性物进而上调cAMP随后活化PKA. PKA是自噬活性的负性调控子，它主要是通过Atg1、Atg8 和

Atg13来活化[42]。同样，cAMP也能通过Epac/Rap2B/phospholipase C-ε活化PKA

依赖的途径来抑制自噬反应[43]。

**3.5 p53**

越来越多的证据表明肿瘤抑制蛋白p53依据其定位的亚细胞器以一个独特的方式来调控自噬反应[44]。p53作为一个核转录因子通过转录激活反应诱导自噬反应，包括转录激活人类受损的自噬调节器的基因家族（Damage-Regulated Autophagy Modulator, DRAM）[44, 45]。实际上，生物体在DNA受损、Arf激活刺激或在p53阴性表达的肿瘤细胞中出现p53表达，则通过p53依赖诱导的自噬反应会被激发[44]。另一方面，胞浆内的p53可作为自噬活性反应的抑制物，而其作用机制并不十分明确。然而，在去核的细胞中，抑制p53同样能诱导自噬反应，这表明不仅是存在胞浆内的p53起到调控自噬反应的作用[44]。

**3.6 Chromatin remodeling enzymes**

在病理的心脏重构过程中，合成代谢和分解代谢路径被激活的同时，蛋白修饰和蛋白分解的复杂级联反应也会被激发。而在主要的转录后蛋白修饰中，蛋白乙酰化修饰后的调控功能无论是在普遍性和重要性方面均可媲美蛋白磷酸化修饰的作用[46]。如果在组蛋白中，一系列ε-赖氨酸乙酰化会导致染色质结构松弛，促进DNA-结合蛋白积聚，随后激活转录反应。这种表观遗传机制是机体对化疗

107

药物治疗敏感性以及对环境诱导应激作用的重要调控途径。乙酰化和去乙酰反应受组蛋白乙酰转移酶（HATs）和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)的拮抗作用调控。

HDACs 依据其对机体系统发育和功能标准被分为五类[47]：第一类包括HDACs

1, 2,3,8；第二类A组包括HDACs 4, 5,7,9，第二类B组包括HDACs 6, 10；第三类包括sirtuins；第四类包含HDAC 11。其中第一类、二类和四类被称为经典的

HDACs，它们均是目前用于临床肿瘤治疗的小分子抑制物的作用靶点[48-50]，同时也是在各种动物心脏疾病模型中证实有效的治疗靶点[51]。Sirtuin-1是机体对养分缺乏诱导自噬反应的必需物质，但并不是由其下游信号物（例如mTOR或者

p53受抑制）诱导的自噬反应所必需的[52]。HDAC6可与泛素酶相互作用调控自噬小泡的功能和自噬反应[53]。

当前，HDAC的生理功能已被证实，它在调控心肌的生长、代谢以及对压力负荷刺激的应答起到致关重要的作用[46]。此外，一系列动物实验表明，在心肌缺血中抑制HDAC能对心肌损害有潜在的保护作用。其他研究者同样表明，在小鼠模型中，HDACs是由血液动力学改变诱导心肌肥厚的重要调控质[54]。另外，

HDAC抑制物曲古抑菌素A（Trichostatin A, TSA）能减轻左心室病理性重构。TSA在心脏中调控的下游效应涉及促存活激酶通路的激活[55, 56]。同时，在肿瘤中，抑制HDAC能触发线粒体介导的细胞凋亡和caspase依赖的自噬性细胞死亡[50, 57]。总之，这是一种其他药物无法达到的有效治疗方法。

既往的实验已经证实由压力负荷诱导的心肌细胞自噬反应是失调控的，因此自噬调控可以作为潜在的治疗靶点[58]。有鉴于此，结合抑制HDAC对心肌有保护作用的有力证据，可以推测HDAC依赖的病理性自噬反应促进疾病的进展。所以假如能够通过抑制HDAC进而减轻病理性自噬反应也许能对心肌病理性重构的治疗带来有益的效果[51, 54]。为了进一步验证该假想，有实验证实在压力负荷诱导的心肌肥厚模型中应用HDAC小分子抑制剂可以产生与先前实验相一致的结果[54]，即能减轻压力负荷诱导的心肌细胞自噬的过度激活。进一步的实验证实这种自噬反应的过度激活是许多心病理性肌肥厚进展的必然结果[59]。同时，也有实验表明，通过抑制HDAC而减轻自噬的活性可逆转兴奋收缩功能失调和心肌细胞肥厚，为这种抑制物进一步应用到临床治疗心肌肥厚提供了重要的理论基础

[59]。

108

基于以往的研究表明，HDAC的抑制是调控心肌肥厚的治疗靶点。然后，进一步实验明确HDACs 和HDAC 抑制在心脏中的作用十分必要。既往认为，

HDACs是通过组蛋白乙酰化酶依赖途径控制基因的表达来实现其相关作用。然而，越来越多的证据表明，HDAC介导组蛋白去乙酰化的靶向作用效力远超过组蛋白本身[60, 61]。例如，来自一个综述性研究文章[62]报道，DNA依赖的Class III

HDACs,整体地被称作Sirtuins，是定向结合胞浆蛋白的主要活性物质，其介导的组蛋白乙酰化后产生了更大的靶向作用效力。事实上，关于在基因组或胞浆中的

HDACs及其抑制物的作用现已在不同领域展开研究。

**4.自噬在心血管的生物学特性**

自噬反应的途径是经过一系列级联反应实行的。在一端，低水平持续的自噬反应是维持细胞生存所需。而在另一端，过度自噬反应会耗竭维持细胞生命所需的原料，促使细胞自噬性死亡。在两个极端之间的自噬反应却是十分复杂的，同时存在促存活或促死亡的作用。

**4.1基础水平的自噬反应**

心肌细胞的功能和存活有赖于基础水平的自噬反应。事实上，在养分供给充分的情况下，心肌细胞自噬反应能够再循环利用受损的细胞内容物，维持重要的蛋白和细胞器的功能，清除细胞内受损的蛋白和细胞器。这个事实已被研究者所证实，在成鼠的心脏中，通过条件性灭活Atg5或Atg7基因的表达致使自噬反应通路传递的缺失，从而迅速导致心肌肥厚，左心室扩张以及心输出量明显下降[63,

64]. 在胚胎早期的心脏形成中，对Atg5表达进行干预会促发胎儿宫内发育缺陷和胎死宫内[65]。在老龄相关的方面，由于衰老相关的自噬清除能力受损会导致机体内有害蛋白和细胞器堆积，最后导致机体功能受损[64, 66]。常态的老龄相关心脏功能受损是由于舒张期心肌舒张功能受损所致[67]。各种能量限制（caloric restriction, CR）治疗方案均能延长患者寿命和改善左室舒张功能[68-70]；而其潜在的作用机制可能与自噬反应被诱导以及减少胰岛素/肌醇-1,4,5-三磷酸酯

（insulin/PI3K）信号通路传递有关[69, 70]。总之，这些事实均表明，心肌细胞的自噬反应作为对蛋白质和细胞器功能的监管和质量控制的一个系统器。

109

**4.2自噬在后负荷诱导心肌重构中的作用**

心力衰竭是各种心脏疾病发展到终末阶段的表现，其中心脏重构是其重要的病理机制。心脏肥厚是反映心脏重构的早期阶段。研究[58]表明，通过主动脉缩窄诱导的小鼠的心脏肥厚，心肌细胞自噬增强。然而，自噬的不足却是老年性心肌肥厚的重要诱因[71]。一系列研究[58, 63, 72]表明心力衰竭时自噬活性上调。而且，终末期心力衰竭患者，左室辅助装置（LVAD）可减轻患者的心脏自噬水平[73]，进而改善患者预后。

在正常心脏中，对于基础水平的自噬反应是维持心脏正常的功能和生理所需的认识已经十分明确；然而，在心脏病态的情况下，压力激发自噬反应的作用仍然是十分复杂的。正如较早前提过，在明确的病理应激条件下，养分缺乏或低氧诱导下，自噬反应被快速诱导激活，以便清除受损的细胞器和折叠蛋白、补充机体能量所需[9, 21, 74]。与此相一致，通过禁食诱导自噬反应的抑制会导致细胞内

ATP水平下降和减少心脏做工[65]。此外，由于各种压力包括后负荷的增加、慢性缺血和缺血/在灌注（ischemia/reperfusion, I/R）诱导的心脏病理改变被证实与自噬反应过度激活相关[7, 8]。目前，诱导自噬反应所起的作用已逐渐形成一个共识：根据自噬反应被诱导的情况和程度，其对疾病的进展要么产生抑制，要么产生促进。例如，当细胞受到饥饿刺激时和在缺血过程中，自噬反应是一种保护作用[75]。然而，在压力负荷诱导的心脏肥厚[58]和在缺血后再灌注的过程中[75]，自噬反应的激活缺却是失调控的。

在手术所致压力负荷改变的动物模型中，自噬反应的幅度与所致压力负荷的程度相关联[58, 59]。Beclin 1是自噬反应过程中重要的蛋白物质，在心肌细胞中过表达Beclin 1会进一步加剧压力负荷诱导的自噬反应[76]，进而迅速导致心衰发生。相反，在Beclin 1表达缺失的老鼠中，自噬反应活性会下降50%的同时，进一步减轻压力负荷诱导的心肌重构[58]。自噬反应的异常作用，可部分解析为自噬反应过度激活导致机体内重要的细胞器和分子物质耗竭，触发了自噬性细胞死亡

[7, 8, 16]。

**4.3自噬在心肌缺血和缺血在灌注损伤的作用**

近年来，有多个研究[56, 75, 77]报道了，不同组织的缺血损伤均可诱导自噬的应

110

答反应。然而，关于自噬反应对缺血/再灌注损伤所起的作用存在两个不同的观点。例如，在冠状动脉粥样硬化斑块中，血管平滑肌适度的自噬或者诱导巨噬细胞自噬反应可以稳定斑块；若平滑肌细胞自噬过度或内皮细胞自噬加剧则会导致斑块不稳定和血栓形成。其中，药物洗脱支架的涂层药物依维莫司能抑制mTOR通路的活性促进自噬反应，能选择性地清除粥样斑块中的巨噬细胞，起到稳定斑块作用[78]。然而，钙离子通道抑制药物，能通过诱导自噬反应抑制血管平滑肌增值进而防止血管狭窄进一步加剧[79]。心肌在轻度缺血刺激的情况下，自噬反应会通过AMP激活蛋白激酶（AMPK）抑制哺乳动物雷帕霉素靶点（mTOR）的活性，进而对心肌起到保护性作用[75]。在缺血模拟的情况下，通过药理抑制自噬的活性（例如，低糖和低氧刺激）会促进心肌细胞死亡，这种情况被认为是细胞促存活的自我保护反应[80]。但是，当恢复给氧和养分，在活体动物（如大鼠[81]、兔子[82]和猪[83]）、培养的细胞株（如H9c2[84]和HL-1[85]）以及原代培养的心肌细胞[75, 80]中细胞自噬反应会显著上调。当心肌缺血时，供给心肌的氧气和养分受限，心肌处于一种饥饿状态，则自噬反应是细胞的一种适应性调整过程；当心肌再灌注时，与缺血时的状态不一样，自噬活性的激活涉及到Beclin 1 依赖的

AMPK/mTOR通路的参与，并根据其参与模型系统的不同，自噬反应可以是对心肌保护性调整也可以是对心肌有害性反应[75]。简而言之，反复的缺血刺激，能起到有效的缺血预处理作用，包括自噬反应；同时，当自噬反应受到抑制时，这种预处理的保护作用则会丧失[83, 86]。

**4.4自噬在心肌病中的作用**

心肌病分为原发性心肌病和继发性心肌病。心肌病的病理机制复杂，目前对原发性心肌病的认识尚不足。近年来，一些研究表明心肌的自噬反应在心肌病的发生发展中起关键作用。

在蛋白毒性心肌病模型中，自噬反应是心肌细胞适应性的调整反应。由于编码蛋白伴侣αB-晶体蛋白的基因突变，蛋白功能缺失致抑制蛋白自我折叠能力受阻，进而促进自噬反应的激活[87]。在这种情况下，自噬反应的激活有利于清除细胞毒物、折叠蛋白和被氧化蛋白。

在扩张型心病患者中，其心肌组织的自噬活性是增加的。同时，在多柔比星

111

药物诱导或结蛋白相关性心肌病中，心脏自噬明显上调[88, 89]。在糖尿病心肌病时，由于高糖应激反应诱导小鼠心脏自噬活性加剧，进而导致心功能受损[90]。然而，另有研究[71]表明，从肥胖到代谢综合征的发展过程中，心肌自噬活性的改变是不同的。有证据表明在糖尿病时，O位N-乙酰葡萄糖胺（O-linked attachment ofβ-N-acetylglucosamine, O-GlcNAc）可介导抑制心脏自噬活性，导致心脏血液动力学的异常反应[72]。

**4.5自噬在其他心血管疾病中的作用**

与小鼠心脏工作细胞比较，其窦房结细胞的自噬更加活跃。因此，自噬可能参与了心律失常的发生[91]。Garcia L等[92]就观察到，心脏自噬下调与冠状动脉旁路术后患者并发心房颤动相关。同时，有研究[93, 94]表明，心脏分化的调控与自噬相关。然而，自噬在先天性心脏病中的作用亟待研究。自噬在心脏瓣膜病中的作用也有零星报道。其中，钙化性主动脉瓣狭窄的重要机制之一是自噬性死亡[95]。另外，严重的二尖瓣和三尖瓣反流时，心肌肌溶解与心肌自噬过度激活有关[96]。

**5. 心肌的自噬反应可作为一个治疗靶点**

近些年来，无论是从药理学还是基于器械辅助治疗方面针对心血管疾病的治疗均有了显著的进步；然而，心衰的发生率仍然十分高[1]。关于心衰防治上的失败最重要一个原因是我们对心脏的可塑性和病理性重构的潜在机制仍不完全明确[97]。但是，随着科学的进一步发展，针对心肌细胞自噬反应的调控作为一种新的治疗获益手段被认为是一个最诱人的治疗前景。

在细胞生长过程中，合成和分解代谢均被激活。在早期，合成代谢占主导地位时，有利细胞生长；然而，当自噬活性增加时，细胞生长调控会进入一个新的稳定状态。另外，根据生长刺激的强度和遗传背景情况，自噬活性要么被完全或部分抑制，甚至会被加剧，而自噬活性的变化会导致机体自我调控或失调控。事实上，围绕自噬活性的变化在心肌中的作用达成的共识是，压力负荷促发心肌细胞自噬活性的增高存在着机体自我调控和失调控的过程。若自噬被完全抑制，细胞存活受到影响。在压力刺激的状态下，自噬的激活在一定程度上对机体或许是有利的，但是，自噬的过度激活对机体确实有害的。在某个层面上讲，这并不奇

112

怪，因为在不同的器官系统和疾病状态，自噬的作用具有双重性[98]。也就是说，我们推测对自噬的病理和生理调控作用存在着一个连续的、最优化的治疗窗（自噬调控区域），而这个治疗窗对维持细胞体内平衡和功能十分重要。此外，心肌细胞内其他形式的自噬方式会同时并存，例如选择性的或非选择性的线粒体自噬，这些不同的自噬方式所起的作用迥异。

在任何情况下的绝大多数心脏疾病中，认为自噬激活的发生存在一个针对自噬调控获益的共同细胞通路。然而，由于我们将面对的挑战是深入认识自噬在不同的细胞类型中的不同作用，或许停下来细细思考是必须的。此外，我们必须设法在不影响生理状态下通过对自噬进行微调来获取其治疗效益，而不是设法完全消灭自噬反应[59]。值得高兴的是，当前一些研究结果表明这种做法是可以实现的。实际上，越来越多的针对调控自噬的相关药物已经在临床中应用或正被开发研制。

**6. 展望**

自噬反应是心肌细胞对来自不同形式的病理刺激的自我生存保护反应。基于此，越来越多实验证实，通过调控自噬的活性可对心肌有保护作用，这些结果令人振奋。例如，最近的一项研究表明，琥珀氯霉素在猪心肌缺血再灌注损伤模型中能激活自噬反应，这种通过药物激活自噬的治疗方法能使治疗获益[99]。展望未来，我们可以预测到，已经在临床应用治疗心肌自噬的药物能使治疗获益。这种调控自噬过程能通过直接调节自噬的核心机制或与自噬相关的其他额外信号通道来实现。在心脏不同病理状态下，通过自噬的激活会能带来一定的获益，但是其对心脏以外的影响也应引起重视。另外，确定使压力负荷触发的自噬反应在一个最佳的区域内起到有利的作用也是十分必要的。其中最佳的区域是指可以促进机体蛋白质内稳态和通过维持基础水平的自噬来控制蛋白的质量。对心肌自噬反应的作用必须全面审视，因为作为抑制病理通路的过度激活策略，就需准确调控自噬反应的活性避免调控过度或者不足扰乱体内各平衡机制。然而，要使心脏病患者可能通过对自噬调控来获益，我们仍需进一步深入研究和评价。

参考文献

[1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a

113

Report from the American Heart Association. Circulation. 2012;125: e2-e220.

[2] Decker RS, Poole AR, Griffin EE, et al. Altered distribution of lysosomal cathepsin D in ischemic myocardium. The Journal of clinical investigation. 1977; 59: 911-21.

[3] Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. Current topics in microbiology and immunology. 2009; 335: 1-32.

[4] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nature cell biology.

2010;12:814-22.

[5] Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy and its role in physiology and disease. Seminars in cell & developmental biology. 2010; 21: 663.

[6] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008; 132: 27-42.

[7] Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. Circulation research.

2008;103:1363-9.

[8] Wang ZV, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in hypertensive heart disease. J Biol Chem.

2010;285:8509-14.

[9] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature. 2008; 451: 1069-75.

[10] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nature reviews Molecular cell biology. 2007; 8: 931-7.

[11] Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. Developmental cell. 2008; 15: 344-57.

[12] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. Science. 2010; 330: 1344-8.

[13] Loos B, Lochner A, Engelbrecht AM. Autophagy in heart disease: a strong hypothesis for an untouched metabolic reserve. Medical hypotheses. 2011; 77: 52-7.

[14] Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. Cell metabolism.

2011;13:495-504.

[15] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nature reviews Molecular cell biology. 2007; 8: 741-52.

[16] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nature reviews Molecular cell biology. 2008; 9: 1004-10.

[17] De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular

114

Distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. The Biochemical journal. 1955;60:604-17.

[18] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nature cell biology. 2007; 9: 1102-9.

[19] Kanki T, Wang K, Cao Y, et al. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. Developmental cell. 2009; 17: 98-109.

[20] Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. Nature. 2010; 465: 942-6.

[21] Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. Annual review of pathology. 2008; 3: 427-55.

[22] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nature reviews Molecular cell biology. 2009; 10: 458-67.

[23] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annual review of genetics. 2009; 43: 67-93.

[24] Hara T, Mizushima N. Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17Autophagy. 2009; 5: 85-7.

[25] Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. J Biol Chem. 2007; 282: 25464-74.

[26] Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Molecular biology of the cell. 2009; 20: 1981-91.

[27] Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Current opinion in cell biology. 2010; 22: 132-9.

[28] Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, et al. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. The Journal of cell biology. 2010; 190: 1005-22.

[29] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. Autophagy. 2005; 1: 84-91.

[30] Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature. 2000; 406: 902-6.

[31] Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. Current opinion in cell biology. 2010; 22: 157-68.115

[32] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. J Biol Chem. 2000; 275: 992-8.

[33] Arico S, Petiot A, Bauvy C, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J Biol Chem. 2001; 276: 35243-6.

[34] Sarkar S, Rubinsztein DC. Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. Autophagy. 2006; 2: 132-4.

[35] Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, et al. The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. Autophagy. 2007; 3: 350-3.

[36] Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca2+ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. The Journal of clinical investigation. 2006; 116: 675-82.

[37] Cardenas C, Miller RA, Smith I, et al. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca2+ transfer to mitochondria. Cell. 2010; 142: 270-83.

[38] Vicencio JM, Ortiz C, Criollo A, et al. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. Cell death and differentiation. 2009; 16: 1006-17.

[39] Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. Physiological reviews. 2009; 89: 1025-78.

[40] Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. Acta physiologica. 2009; 196: 65-80.

[41] Enns LC, Ladiges W. Protein kinase A signaling as an anti-aging target. Ageing research reviews.

2010;9:269-72.

[42] Graef M, Nunnari J. Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. The EMBO journal. 2011; 30: 2101-14.

[43] Williams A, Sarkar S, Cuddon P, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. Nature chemical biology. 2008; 4: 295-305.

[44] Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, et al. Autophagy regulation by p53. Current opinion in cell biology. 2010; 22: 181-5.

[45] Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome.

European journal of cancer. 2011;47:44-50.

116

[46] Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nature reviews Genetics. 2009; 10: 32-42.

[47] McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. Gene. 2011; 474: 1-11.

[48] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009; 27: 5459-68.

[49] Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. Journal of cellular biochemistry. 2009; 107: 600-8.

[50] Marks PA. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. Expert opinion on investigational drugs. 2010; 19: 1049-66.

[51] Berry JM, Cao DJ, Rothermel BA, et al. Histone deacetylase inhibition in the treatment of heart disease. Expert opinion on drug safety. 2008; 7: 53-67.

[52] Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, et al. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. Autophagy. 2010; 6: 186-8.

[53] Simms-Waldrip T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, et al. The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies. Molecular genetics and metabolism. 2008; 94: 283-6.

[54] Kong Y, Tannous P, Lu G, et al. Suppression of class I and II histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy. Circulation. 2006; 113: 2579-88.

[55] Zhao TC, Cheng G, Zhang LX, et al. Inhibition of histone deacetylases triggers pharmacologic preconditioning effects against myocardial ischemic injury. Cardiovascular research. 2007; 76: 473-81.

[56] Granger A, Abdullah I, Huebner F, et al. Histone deacetylase inhibition reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008; 22: 3549-60.

[57] Shao Y, Gao Z, Marks PA, et al. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101: 18030-5.

[58] Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. The Journal of clinical investigation. 2007; 117: 1782-93.117

[59] Cao DJ, Wang ZV, Battiprolu PK, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011; 108: 4123-8.

[60] McKinsey TA. Isoform-selective HDAC inhibitors: closing in on translational medicine for the heart. Journal of molecular and cellular cardiology. 2011; 51: 491-6.

[61] Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. Nature. 2009; 460: 587-91.

[62] Sundaresan NR, Pillai VB, Gupta MP. Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. Journal of molecular and cellular cardiology. 2011; 51: 614-8.

[63] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nature medicine. 2007; 13: 619-24.

[64] Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. Autophagy. 2010; 6: 600-6.

[65] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature. 2004; 432: 1032-6.

[66] Demontis F, Perrimon N. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. Cell. 2010; 143: 813-25.

[67] Boluyt MO, Converso K, Hwang HS, et al. Echocardiographic assessment of age-associated changes in systolic and diastolic function of the female F344 rat heart. Journal of applied physiology. 2004; 96: 822-8.

[68] Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, et al. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. Rejuvenation research. 2007; 10: 281-92.

[69] Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, et al. Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice. Circulation. 2009; 120: 1695-703.

[70] Shinmura K, Tamaki K, Sano M, et al. Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. Journal of molecular and cellular cardiology. 2011; 50: 117-27.

[71] Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, et al. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. Basic research in

118

Cardiology. 2011;106:1173-91.

[72] Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. Circulation. 2008; 117: 3070-8.

[73] Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. Circulation. 2009; 120: S191-7.

[74] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science.

2000;290:1717-21.

[75] Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, 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. Circulation research. 2007; 100: 914-22.

[76] Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. Oncogene.

2008;27 Suppl 1: S137-48.

[77] Qian J, Ren X, Wang X, et al. Blockade of Hsp20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death. Circulation research. 2009; 105: 1223-31.

[78] Hsieh CH, Pai PY, Hsueh HW, et al. Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis. Annals of surgery. 2011; 253: 1190-200.

[79] Li ZL, Woollard JR, Ebrahimi B, et al. Transition from obesity to metabolic syndrome is associated with altered myocardial autophagy and apoptosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2012; 32: 1132-41.

[80] Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. Journal of molecular and cellular cardiology. 2006; 40: 846-52.

[81] Huang C, Liu W, Perry CN, et al. Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2010; 298: H570-9.

[82] Decker RS, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. The American journal of pathology. 1980; 98: 425-44.

[83] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102: 13807-12.119

[84] Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, et al. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. Journal of cellular and molecular medicine. 2009; 13: 373-87.

[85] Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. J Biol Chem. 2006; 281: 29776-87.

[86] Huang C, Yitzhaki S, Perry CN, Liu W, Giricz Z, Mentzer RM, Jr., et al. Autophagy induced by ischemic preconditioning is essential for cardioprotection. Journal of cardiovascular translational research. 2010; 3: 365-73.

[87] Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008; 105: 9745-50.

[88] Zhang J, Liu J, Huang Y, et al. FRS2alpha-mediated FGF signals suppress premature differentiation of cardiac stem cells through regulating autophagy activity. Circulation research. 2012; 110: e29-39.

[89] Zhang J, Liu J, Liu L, et al. The fibroblast growth factor signaling axis controls cardiac stem cell differentiation through regulating autophagy. Autophagy. 2012; 8: 690-1.

[90] Zhong J, Basu R, Guo D, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. Circulation. 2010; 122: 717-28, 18 p following 28.

[91] Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, et al. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. Hypertension. 2009; 53: 1032-40.

[92] Gu S, Jin L, Zhang F, et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. Nature structural & molecular biology. 2009; 16: 144-50.

[93] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. Autophagy. 2009; 5: 816-23.

[94] Ai D, Pang W, Li N, et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009; 106: 564-9.

[95] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell.

120

2010;140:313-26.

[96] Duisters RF, Tijsen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. Circulation research. 2009; 104: 170-8, 6p following 8.

[97] Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. The New England journal of medicine. 2008; 358: 1370-80.

[98] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiological reviews. 2010; 90: 1383-435.

[99] Sala-Mercado JA, Wider J, Undyala VV, et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Circulation. 2010; 122: S179-84.

121

致 **谢**

光阴似箭，日月如梭。三年光阴，转眼即逝。蓦然回首，过往点滴，不能忘怀。如今化作声声感谢，溢于言表！

衷心感谢刘世明教授收我入师门！感谢导师对我的鼓励与引导、包容与爱护！导师高尚的为人，兢兢业业、力求完美的工作作风，广博的知识，严谨的治学态度，严于律己，宽厚待人的品格给我树立了光辉的典范，使我受益匪浅，并将使我受益终生。

感谢我的硕士导师，广州市第一人民医院心血管内科潘宜智教授对我一如既往的支持和关怀，您给了我强大的精神动力！

感谢广州医科大学附属第二医院心内科熊龙根主任、李国强主任和陈佩贞主任对我临床工作的指导和帮助，感谢广州医科大学附属第二医院心血管支部曾静曦书记对我的关心。

感谢广州医科大学刘启才教授、赵路宁老师、董颀老师、彭杰老师对我实验技术的指导。感谢中ft大学医学院电镜室吴金德教授、中ft大学附属第一医院肾病国家重点实验室孔庆喻老师、南方医科大学附属珠江医院病理科王华寿老师对我实验技术的指导与援助。

感谢我的师兄弟、师姐妹和学友们：师姐田朝伟；师兄张振辉、钟赟、潘伟、黎佼和戴文军；师弟林晓圳、柴仁杰、莫沛、成传访、黄鹤和吴智业；师妹王丽、叶菁和邓菊。感谢我的同学：王薇、陈勇军、曹珂、高永华、时旭、郭红喜、李勋、关伟杰、龙捷、罗福全、孙文、曹创裕。感谢您们与我一路同行。

感谢广州心血管疾病研究所刘本荣老师对我孜孜不倦的教导与援助。感谢广州心血管疾病研究所李爱群实验员、刘连博士、尤祥宇博士、刘彬博士给予我的帮助。

感谢我的父母和所有家人对我的支持、理解和包容！感谢所有关心和帮助过我的人！

122

# 攻读学位期间发表的论文

1. **Jionghua Huang**, Wen Sun, He Huang, Jing Ye, Wei Pan, Yun Zhong, Chuanfang Cheng, Xiangyu You, Benrong Liu, Longgen Xiong, **Shiming Liu.** miR-34a modulates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy by direct inhibition of ATG9A expression and autophagic activity. PloS one. 2014;9: e94382.

**2.** Xiangyu You1, **Jionghua Huang**1**,** Bin Liu, Shaojun Liu, Yun Zhong, **Shiming Liu.**

HMGA1 is a new target of miR-195 invoving ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy. Biochemistry(Mosc). 2014 Jun; 79(6):538-44.

123