

## • 综 述 •

## 受磷蛋白在心血管疾病中的研究进展

汪文杰 孙黎明

随着人民生活条件的逐渐改善,心血管病逐渐成为常见病,这一变化和已发生在发达国家中的情况相似,成为“流行病学转变”的重要内容<sup>[1]</sup>。在各种病因引起心功能障碍时最终都主要表现为心肌细胞收缩和舒张的异常。细胞内钙浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础,也是心肌细胞收缩和舒张的主要原因。越来越多的证据表明<sup>[2]</sup>,钙循环异常在心脏病的发生发展中起着重要作用。钙循环主要包括肌浆网钙释放、钙回摄及钙储存三个过程。钙回摄是由 SERCA2a(sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase)完成,将其细胞质内钙回摄至肌浆网内储存,维持细胞内钙稳态。而 SERCA2a 的活性又受受磷蛋白(phospholamban, PLB)的调节,SERCA2a 与 PLB 的比值常被作为评价心肌舒缩功能的指标<sup>[3]</sup>,因此 PLB 是保障心功能极为重要的因素之一。

## 1 分子结构及生物学功能

1.1 分子结构 PLB 是一单跨膜蛋白<sup>[4]</sup>,以五个相同的单体组成的五聚体形式存在,它由 52 个氨基酸构成,主要在心肌细胞中表达,在慢速骨骼肌、平滑肌和内皮细胞中也有少量表达。PLB<sup>[5]</sup>的一级结构可以分成两部分,细胞质结构域和跨膜结构域,细胞质结构域含有被磷酸化的位点,这部分是发挥功能的主要区域。二级和三级蛋白质结构也被分为两个主要区域:一个区域为亲水性的,含有胞浆部分和三个磷酸化位点,而另一个区域为疏水区域,此区域嵌入心肌肌浆网膜内。实验<sup>[6]</sup>表明,在 PLB 对 SERCA2a 的调节作用中亲水区域有着重要意义。

1.2 生物学功能 在肌质网,PLB 的主要功能就是调节 SERCA2a 酶的生理活性。PLB 是一种可以被磷酸化的蛋白,而且通过调节 PLB 的磷酸化和去磷酸化来调节 SERCA2a 活性。研究发现,PLB 决定 SERCA2a 和钙亲和力,调节钙在细胞内的稳态和心肌的收缩性。

## 2 受磷蛋白的基础研究

Schmitt 等<sup>[7]</sup>对充血性心脏病和心力衰竭患者的 PLB 测序发现,有患者的 PLB 第 25 位核苷酸发生 C-T 错义突变,对突变的 PLB 生化分析表明,它阻断了蛋白激酶 A 介导的野生型 PLB 的磷酸化,从而延迟了心肌细胞中钙的瞬间变化,造成了人类的心肌细胞收缩和舒张的异常。有报道<sup>[8,9]</sup>用核磁共振等方法研究了 PLB 氨基酸的结构和功能,以及结合 SERCA2a 后细胞质结构域的变化。结果发现,SERCA2a 可以使 PLB 寡聚体之间以及 PLB 和膜表面的相互作用减弱,同时 SERCA2a 的一个或多个半胱氨酸可与 PLB 的半胱氨酸-11 形成二硫键,可见 PLB 的细胞质结构域的构象变化对于 SERCA2a 的活性调节有重要作用。PLB<sup>[10]</sup>主要有三个位点可被磷酸化,丝-10 与钙磷脂依赖性蛋白激酶,苏-17 与 CAMP,丝-16 与 CaM 依赖蛋白激酶,这些位点一个或多个磷酸化均可使 SERCA2a 活性增高。PLB 有五聚体和单体两种存在形式<sup>[11]</sup>,单体分亲水区和疏水膜结合区。细胞内 25% 的 PLB 为单体形式,一般认为单体为其功能形式,五聚体则是活性单位的保存形式。PLB 通过可逆磷酸化调节 SERCA2a 酶活性,而本身的磷酸化还受到许多其他因素的调节,如甲状腺激素可以增加 SERCA2a 酶的表达水平,而降低 PLB 的表达水平,蛋白激酶 C 可以通过影响 PLB 的磷酸化状态而调节心肌的收缩性<sup>[12]</sup>。

## 3 受磷蛋白的临床研究

3.1 受磷蛋白与心力衰竭 心力衰竭是大多数器质性心脏病的晚期表现,尽管现在对心力衰竭的治疗有了较大进展,但仍不能很好地解决心肌收缩和(或)舒张功能障碍这一根本问题,于是学者们开始关注心肌钙调控蛋白,因为心肌细胞胞浆中钙是心

收稿日期:2008-10-29

作者单位:222023 连云港市,蚌埠医学院附属连云港医院,连云港第二人民医院心内科(在读研究生)

通讯作者:孙黎明, Tel:13236336289, E-mail:sunliming98@yahoo.cn

肌舒缩活动的中心环节。实验<sup>[13]</sup>显示,心力衰竭时钙泵功能受损,肌浆网钙摄取下降,SERCA2a、PLB mRNA、蛋白水平降低。因此,希望能够从心力衰竭的基础研究中,进一步了解关于心力衰竭病程进展中的细胞内信号传导和基因表达过程,开发出新的药物进行干预,以纠正和延缓心衰的进程。

**3.2 受磷蛋白与心肌病** 扩张性心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种比较严重的心脏疾病,发病率较高,其病因及发病机制仍不十分清楚。近年来,随着分子遗传学的进展,在DCM的病因、发病机理等方面进行了不同程度的研究,发现了一些与该类疾病有关的基因突变。国外有两个家系研究分别发现PLB基因外显子第25位核苷酸C→T和第116位核苷酸T→G的错义突变与DCM发生有关<sup>[14]</sup>,因此人们推测PLB基因可能成为心肌病病因及治疗研究的又一新的靶点。

**3.3 受磷蛋白与心肌梗死** 急性心肌梗死后心室重构包括梗死区室壁局限性变薄、扩张及膨出和非梗死区心肌肥厚,发生机制尚不完全清楚,可能与细胞内钙的调节有关。有研究<sup>[15]</sup>显示,在心肌梗死后心衰大鼠心脏中,SERCA2a的蛋白和mRNA表达显著减少,而PLB蛋白和mRNA水平是增高的。因此,心肌梗死后心衰中SERCA2a和PLB的改变可能是心肌收缩功能失调的机制之一,具体机制仍待进一步研究。

#### 4 针对受磷蛋白的干预措施

临床试验<sup>[16]</sup>证实,慢性心力衰竭应用强心方法可能使死亡率升高,考虑到钙升高可诱导心肌肥厚和细胞死亡,应用能使钙泵能力增强的治疗方法,降低舒张期胞内钙浓度,即可能减少磷酸化酶激活,从而阻断细胞凋亡和心肌肥厚的信号传导,这样除改善心力衰竭症状外,也可延缓心衰进程,这可能为心力衰竭的治疗提供了一种方法。PLB在心力衰竭患者中作用的相对专一性有望成为基因治疗的靶基因。于是可以想到,导入能够强制促进表达低下的SERCA2a蛋白表达的基因或者找到抑制PLB功能的方法<sup>[17]</sup>,通过降低PLB mRNA就有可能增加SERCA2a的活性,提高心脏功能。随着对基因转移在动物模型和I期临床试验的更多理解,特别是来源于腺病毒相关病毒的载体的应用,PLB打靶可能成为心功能失调治疗成功的范例。RNA干扰<sup>[18]</sup>(RNAi)是新兴的一种由双链RNA介导的转录后基因沉默,能高效特异地降低靶基因表达,实现基因

的降低或敲除。抑制PLB功能的方法有通过强制表达磷酸化PLB的变体、反义寡核苷酸法或RNAi来抑制PLB的表达,此外还可开发针对性的抑制剂来抑制PLB活性来实现治疗目的。

#### 5 结语

心脏病的发生是多种因素、多种机制共同作用的结果,治疗上应从不同的环节着手,随着分子生物学的迅速发展和对发病机制研究的深入,对心血管疾病的治疗定会取得更大进展。

#### 参考文献

- [1] Zhao XY, Hu SJ, Li J, et al. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem*, 2006, 62: 1-8.
- [2] Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84: 509-521.
- [3] Del Monte F, Harding SE, Dec GW, et al. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation*, 2002, 105: 904-907.
- [4] Haghghi K, Kolokathis F, Pater L, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*, 2003, 111: 869.
- [5] Janczewski AM, Zahid M, Lemster BH, et al. Phospholamban gene ablation improves calcium transients but not cardiac function in a heart failure model. *Cardiovasc Res*, 2004, 62: 468-480.
- [6] Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, et al. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest*, 2004, 113: 727-736.
- [7] Schmitt JP, Kamisago M, A sahi M, et al. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*, 2003, 299: 1410-1413.
- [8] 郭晓强, 时兰春. 受磷蛋白与心力衰竭. *心脏杂志*, 2005, 17: 487-489.
- [9] Song Q, Young KB, Chu G, et al. Overexpression of phospholamban in slow-twitch skeletal muscle is associated with depressed contractile function and muscle remodeling. *FASEB J*, 2004, 18: 974-976.
- [10] Wold LE, Dutta K, Mason MM, et al. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39: 297-

- 307.
- [11] Shao Q, Ren B, Saini HK, et al. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  transport and gene expression in congestive heart failure are modified by imidapril treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H1674-H1682.
- [12] Zhou BQ, Hu SJ, Wang GB. The analysis of ultrastructure and gene expression of sarco/endoplasmic reticulum calcium handling proteins in alloxan-induced diabetic rat myocardium. *Acta Cardiol*, 2006, 61:21-27.
- [13] Li J, Bigelow DJ, Squier TC. Conformational changes within the cytosolic portion of phospholamban upon release of  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibition. *Biophys J*, 2004, 43:3870-3879.
- [14] Reiken S, Gabuajakova M, Guatimosim S, et al. Protein kinase a phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. *J Biol Chem*, 2003, 278:444-453.
- [15] Mackiewicz U, Lewartowski B. Temperature dependent contribution of  $Ca^{2+}$  transporters to relaxation in cardiac myocytes; important role of sarcolemmal  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57:3-15.
- [16] Hoshijima M. Gene therapy targeted at calcium handling as an approach to the treatment of heart failure. *Pharmacol Ther*, 2005, 105:211-228.
- [17] 孙益兰, 胡申江, 王利宏, 等. 急性心肌梗死大鼠钙调蛋白的改变及卡维地洛的干预作用. *中国病理生理杂志*, 2005, 21:1085-1089.
- [18] 惠海鹏, 李小鹰. 肌浆网  $Ca^{2+}$ -ATPase 和受磷蛋白基因转导治疗心力衰竭的研究现状. *中华老年心脑血管病杂志*, 2004, 6:276-277.

(上接第 471 页)

- [26] Akao M, Ohler A, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res*, 2001, 88: 1267-1275.
- [27] McCully JD, Wakiyama H, Cowan DB, et al. Diazoxide amelioration of myocardial injury and mitochondrial damage during cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74:2138-2145.
- [28] Dairaku Y, Miura T, Harada N, et al. Effect of ischemic preconditioning and mitochondrial  $K_{ATP}$  channel openers on chronic left ventricular remodeling in the ischemic-reperfused rat heart. *Circ J*, 2002, 66: 411-415.
- [29] Xia Y, Rajapurohitam V, Cook MA, et al. Inhibition of phenylephrine induced hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes by the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel opener diazoxide. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38: 237-239.
- [30] Wang X, Wei M, Kuukasjarvi P, et al. Novel pharmacological preconditioning with diazoxide attenuates myocardial stunning in coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 24: 967-973.

(上接第 473 页)

- [12] 黄文, 朱佩芳, 王正国, 等. 老年人载脂蛋白 E 基因型与认知功能关系的研究. *中国行为医学科学*, 2002, 11:614-617.
- [13] Linstedt U, Meyer O, Kropp P, et al. Serum concentration of S2100 protein in assessment of cognitive dysfunction after general anesthesia in different types of surgery. *J Acta Anaesthesiol Scand*, 2002, 46: 384-389.
- [14] Arrowsmith JE, Grocott HP, Newman MF, et al. Neurologic risk assessment, monitoring and outcome in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 1999, 13:736-743.
- [15] 李洪, 赵宝龙, 吴敏仙, 等. 焦虑、抑郁状态与老年患者术后认知功能障碍相关性的研究. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2007, 28:389-392.
- [16] Wang Y, Sands LP, Vaurio L, et al. The effects of postoperative pain and its management on postoperative cognitive dysfunction. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2007, 15:50-59.
- [17] Murkin JM. Etiology and incidence of brain dysfunction after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 1999, 13(Suppl 1):12-17.
- [18] De Vroeghe R, Van Oeveren W, Van Klarenbosch J, et al. The impact of heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits on pulmonary function and the release of inflammatory mediators. *J Anesth Analg*, 2004, 98: 1586-1594.
- [19] 丁冬. 老年人术后认知功能障碍的研究与防治. *实用医学杂志*, 2007, 23:2616-2618.