

Notch信号通路在心肌缺血损伤中的作用研究

毛福英¹, 李冰², 杨震旻², 赵云生^{2,3*}

(¹河北中医学院实验中心, 石家庄 050091; ²河北中医学院药学院, 石家庄 050091;

³河北省中药炮制技术创新中心, 石家庄 050091)

摘要: Notch信号通路是相邻细胞间分子信息交流的媒介, 在心血管系统的发育和生长中起关键作用, 参与了心脏发生、发育、分化、增殖、病理生理的整个过程。当心肌缺血时, 该通路可通过不同路径参与调控心肌缺血损伤, 包括细胞凋亡、自噬、巨噬细胞调控及缺血后心室重构等过程, 在心肌缺血受损时能够发挥重要作用。本文以Notch信号通路为主线, 综述了其在心肌缺血损伤方面的研究进展, 以期为心肌缺血损伤的修复和寻求药物治疗靶点提供借鉴。

关键词: Notch信号通路; 心肌缺血; 损伤; 作用机制

The role of Notch signal pathway in myocardial ischemic injury

MAO Fuying¹, LI Bing², YANG Zhenmin², ZHAO Yunsheng^{2,3*}

(¹Experimental Center, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; ²School of Pharmacy, Hebei

University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; ³Traditional Chinese Medicine Processing Technology

Innovation Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050091, China)

Abstract: The Notch pathway is a mediator of the communication of molecular signals between adjacent cells, plays an extremely important role in the cardiovascular system, both during development and postnatal life. Notch signaling pathway is involved in the whole process of cardiac genesis, development, differentiation, proliferation and pathophysiology. When myocardial ischemia occurs, Notch signaling pathway is activated and participates in the regulation of myocardial ischemic injury through different pathways, including apoptosis, autophagy, macrophage regulation, and post-ischemic ventricular remodeling, etc. In this review, Notch signaling pathway is taken as the main line to explore the research progress of its mechanism of action in myocardial ischemic injury, and provides useful reference for therapy of myocardial ischemic injury and identifying therapeutic targets.

Key Words: Notch signaling pathway; myocardial ischemia; injury; mechanism of action

缺血性心脏病因其高发病率、高病死率、高致残率成为威胁人类生命健康的主要疾病之一^[1], 1990年以来, 中国居民缺血性心脏病死亡率增加了20.6%^[2]。Notch信号通路在心肌缺血损伤过程中

发挥重要作用, 本文总结了近5年Notch信号通路对心肌缺血损伤的修复研究, 主要包括细胞凋亡、自噬作用、巨噬细胞调控、心室重构、血管生成、调控药物等内容, 以期揭示Notch信号通路

收稿日期: 2021-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760687); 河北中医学院人才队伍建设项目(1020103022)

第一作者: E-mail: mfyzyz@126.com

*通信作者: E-mail: zwhjzs@126.com

在临床治疗心肌缺血中的作用提供借鉴。

1 Notch信号通路

Notch信号由Morgan等^[3]于1917年在黑腹果蝇中发现,1983年被首次克隆,是大多数细胞生物体中存在的保守配体-受体信号通路,涉及细胞产生、凋亡、增殖、促进干细胞自我更新等过程。Notch信号通路在哺乳动物体内有4种跨膜受体Notch 1-4和五种跨膜配体Delta-like ligand-1(DLL-1)、DLL-3、DLL-4和Jagged-1(Serrate-1)、Serrate-2。根据与果蝇原型Delta和Serrate的同源性,Notch配体分为两大类,统称为DSL家族(Delta/Serrate/LAG-2)^[4]。Notch受体是一种具有结构域组织的I型单程跨膜蛋白(图1),具有较大的胞外配体结合区(Notch extracellular domain, NECD)、跨膜区和胞内区(Notch intracellular domain, NICD)。NICD包括J kappa(RBP-Jk)相关分子结构域重组信号结合蛋白、锚蛋白重复序列、转录因子支架结构域或反式激活结构域(TAD),以及富含脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸-苏氨酸(PEST)的区域。Notch配体负责Notch信号调节的大部分过程^[4,5]。

Notch信号通路的活化通过相邻两个细胞的配体与受体结合后经过三次酶剪切过程(图1)。Notch受体首先被合成为单链前体,在高尔基体中被类弗林转化酶切割成胞外和跨膜亚基,并被糖基转移酶边缘修饰,接着Notch信号在配体-受体相互作用后被触发,导致去整合素-金属蛋白酶(ADAM)连续两次酶解去除胞外亚单位,然后由多亚基蛋白酶 γ -分泌酶催化第二次蛋白水解性切割,释放NICD,由NICD释放入胞质,并进入细胞核与转录因子CSL(人类中的CBF1,果蝇中的无毛抑制因子,线虫中的LAG)和Mastermind样蛋白(MAML)等共激活因子结合,形成NICD/CSL/MAML转录激活复合体,从而激活Hes1、Hey1/2等靶基因的转录,发挥典型Notch信号的生物学作用^[4]。

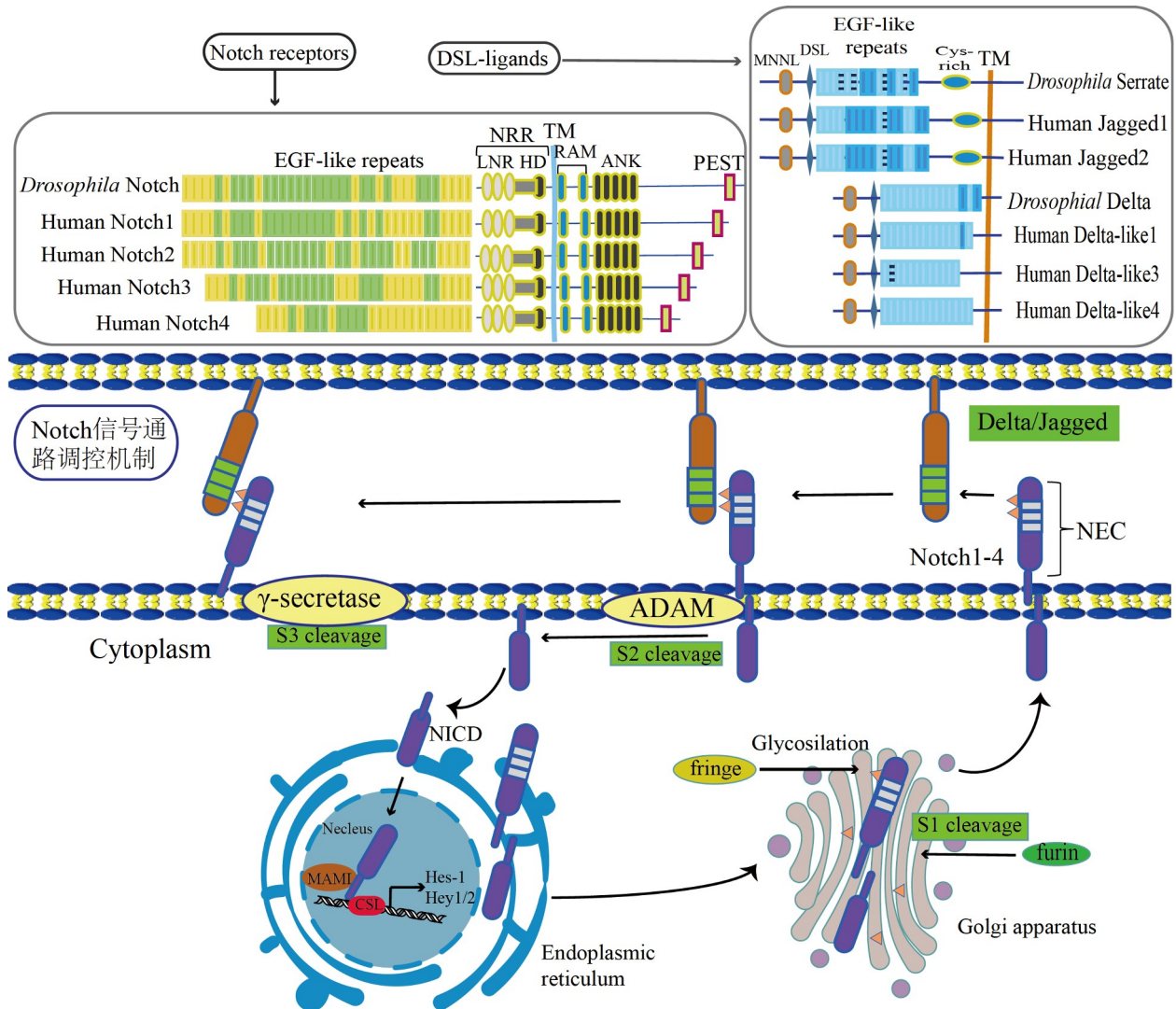
Notch信号通路几乎参与了心脏发生、发育、分化的全过程,在哺乳动物胚胎发育期,Notch信号分子水平较高,参与心肌及血管分化调节,不仅调控心脏房室沟、瓣膜、流出道及肌小梁的形成,还促进动脉分化,抑制向动脉发展中的细胞向静脉分化,调节血管分支形成。而出生后在哺

乳动物心脏内的Notch信号逐渐减弱,成体心脏中Notch1、Hes1、Jagged-1水平很低^[6,7]。Notch信号通路决定着成年动物组织和器官正常结构和功能的维持,其出生后的重新激活是成体心肌面对病理损伤的一种适应性反应。有研究发现,心梗后4 d的心肌细胞中Notch1、Hes1、Jagged-1水平明显增高^[7]。对心肌缺血梗死模型小鼠给予外源性Notch信号通路分子,可增加心肌细胞的生存率,改善心脏功能,活化心肌梗死小鼠内源性Notch信号通路,亦可改善其心功能、降低心肌纤维化、促进血管新生^[8]。心肌梗死后晚期心梗边缘组织中Notch信号通路关键分子Notch1和Hes1水平增加^[9],Notch1/Hes1信号通路可保护心肌细胞免受心肌缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion, I/R)损伤,改善心肌梗死后心脏功能,Notch1缺失可加剧心肌肥厚和衰竭,增加病死率^[7,10]。

2 Notch信号通路对心肌缺血损伤的影响

2.1 细胞凋亡

细胞凋亡是形态学与生化上有别于坏死的另一种细胞自我清除方式,当细胞受到内外因素刺激时启动,维持着机体细胞群体数量动态平衡。细胞凋亡调控异常是心血管疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等的重要发病机制,如心肌梗死(myocardial infarction, MI)、脑卒中时心肌细胞、脑细胞的凋亡。心肌细胞凋亡有助于缺血性心脏病(如MI)的病理过程,新兴证据表明,microRNA(miRNA)通过调节心肌细胞凋亡在MI的病理过程中发挥关键作用,miR-363是一种凋亡相关的miRNA,Notch1是其潜在靶基因,对miR-363的抑制可通过促进Notch1表达和激活Notch信号传导来保护心肌细胞免受缺氧诱导的细胞凋亡^[11]。有研究表明,缺氧通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭、促进细胞凋亡等途径诱导H9c2细胞损伤,明显增强了Malat1的表达,Malat1通过调节miR-217介导的Sirt1和下游PI3K/AKT及Notch信号通路减少细胞增殖并增加凋亡而在缺氧诱导的心肌细胞损伤中发挥重要作用^[12]。KRT1基因沉默后激活Notch1通路,使NICD、Hes1和Bcl-2的mRNA和蛋白质表达增加,Bax的mRNA和蛋白质表达减少,促使细胞增殖,抑制细胞凋亡,改善心肌缺血损伤^[13]。过



ANK: 锚蛋白; HD: 异二聚化结构域; LNR: Lin12/Notch重复序列; NEC: Notch胞外区; NRR: 负调节区; PEST: 脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸富集区; RAM: RBP-J κ 相关模块; TM: 跨膜区

图1 Notch受体与配体结构及其调控机制^[4,5]

表达miR-347时, 其靶基因*DTNA*的表达水平下降, 同时阻断了Notch1信号转导轴, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平增加, 促凋亡蛋白Bax表达水平下降, 促使心肌细胞增殖减少凋亡, 从而起到保护缺血心肌的作用^[14]。MiR-34a可导致内皮细胞分泌促炎细胞因子, 通过负向靶向Notch信号通路来促进心脏微血管内皮细胞凋亡并上调炎症细胞因子, 从而加重心脏微血管内皮细胞损伤并抑制血管生成^[15]。MI后, miR-381在缺血区边缘区表达呈时间依赖性上调, 而在非缺血区表达无明显变化, 在H₂O₂和缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)处理的心肌细胞中, miR-381表达上调, miR-

381的过度表达加剧了H₂O₂和H/R诱导的心肌细胞凋亡, 体内注射miR-381拮抗剂可显著减少心肌梗死面积, miR-381对心肌保护性Notch信号转导具有负性调节作用, 这可能是其对Jagged1的靶向抑制作用的结果^[16]。大鼠心肌灌注后, miR-34a-5p表达上调, miR-34a-5p抑制剂可减轻I/R损伤, 表现为细胞凋亡率降低, 梗死面积缩小, 活性氧积累减少。在体外细胞模型中, miR-34a-5p抑制剂通过靶向调节Notch受体1信号通路促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡和活性氧积累^[17]。MiR-146a-5p能够在大鼠I/R中减轻心肌损伤, 减少心肌梗死面积, 降低心肌细胞凋亡率, 降低Notch2、Hes1蛋白表达水

平,其作用机制与抑制*Notch2*基因的表达有关^[18]。缺氧再灌注后,新生大鼠心室肌细胞和H9c2细胞中miR-449a表达均明显上调,而抑制miR-449a可明显减少缺氧/再灌注诱导的细胞凋亡和坏死,miR-449a通过靶向*Notch1*调控*Notch1/Hes1*信号通路,阻断*Notch*信号通路可部分消除miR-449a抑制对H/R损伤的保护作用,而*Notch1*胞内区的过表达可部分逆转miR-449a过表达对H/R诱导的细胞损伤的影响,miR-449a抑制剂通过靶向*Notch1*信号通路保护H9c2细胞免受缺氧再灌注损伤^[19]。MiR322被鉴定为缺血诱导的血管生成miRNA,心肌缺血/再灌注损伤后24 h,心脏中的miR322水平显著降低,心肌内注射mimic-miR322可以显著减少心脏凋亡,并与FBXW7减少和活动性*Notch1*水平升高相关,将梗死面积减少约40%,FBXW7对激活的*Notch1*周转至关重要^[20]。MiR-208a是一种心肌富集型miRNA,CHD9是miR-208a的直接靶点,在模拟I/R损伤后的H9c2细胞中,miR-208a基因上调,细胞损伤加重,细胞凋亡升高,经由CHD9的激活,miR-208a与*Notch/NF-κB*信号通路呈正相关,miR-208a有可能成为I/R损伤早期诊断的生物标志物与缺血性心脏病临床治疗的靶点^[21]。

利拉鲁肽可显著提高H/R处理的H9c2细胞的存活率,减少凋亡,缺氧再灌注前用50 nmol/L利拉鲁肽处理2 h后,*Notch1*、Jagged-1和*Bcl-2*的表达水平明显高于对照组,*Bax*表达下调,提示利拉鲁肽激活了*Notch*信号转导通路,抑制了细胞凋亡^[22]。松弛素(17 nmol/L, EC50 4.7 nmol/L)在缺氧前24 h或复氧时加入,可保护心肌细胞免受损伤,显著提高细胞活力,减少细胞凋亡与氮氧化损伤,这些作用部分归因于松弛素上调*Notch1*信号通路的能力,用特异性抑制剂DAPT阻断*Notch1*的激活,可降低H/R时松弛素诱导的心脏保护作用^[23]。姜黄素能保护H9c2心肌细胞免受H/R诱导损伤,显著降低凋亡率,经姜黄素处理的H/R细胞中,与YRPW基序蛋白1(Hes-1)相关的*Notch*细胞内结构域、split(Hes)-1分裂毛和增强子、Hes-5、split分裂毛/增强子的表达水平显著降低,*Notch*途径的下调可能减轻H/R诱导的H9c2心肌细胞损伤^[24]。转录因子重组信号结合蛋白-J基因敲除降低了小鼠的成活率并降低了MI后的重塑和功能,这种作用与增加

心肌细胞凋亡有关,MI后心肌细胞中该结合蛋白介导的*Notch*信号传导通路限制了心室重构并改善了心脏功能,其介导的*Notch*信号通路在心脏损伤后的心肌细胞凋亡中具有保护作用^[25]。沉默Ras相关的C3肉毒素底物1可显著提高H9c2细胞存活率($P<0.05$),抑制凋亡($P<0.05$),清除ROS($P<0.01$),抑制*Notch*信号通路关键蛋白的表达($P<0.05$)。而过量表达C3肉毒素底物1对H/R处理的H9c2细胞有相反作用($P<0.05$)^[26]。抑制*Notch*信号通路,I/R可加重糖尿病大鼠MI的严重程度,33 mmol/L葡萄糖可降低缺氧后H9c2细胞的存活率并诱导细胞凋亡,抑制缺氧后H9c2细胞的*Notch*信号转导^[27]。

2.2 自噬

自噬是一种高度调控的分解代谢过程,能包裹老化受损细胞器和细胞中的长寿蛋白并转运至溶酶体中降解,在生理和病理状态下都起着十分重要的作用^[28]。研究表明,激活自噬能减轻心肌缺血/再灌注损伤,在缺血期起保护作用,而在再灌注期间产生不利影响^[29,30]。*Notch1*能增强自噬,提高心肌细胞活力并发挥心肌保护作用^[31]。加入*Notch1*激动剂Jagged-1后,自噬水平升高,在高温高湿条件下H9c2心肌细胞凋亡减少,线粒体膜电位增加,ATP含量增加,小鼠心功能改善,梗死面积减小,表明激活的*Notch1*通过增加自噬水平可以保护缺血/缺氧损伤心肌^[32,33]。H/R条件下H9c2细胞内*Notch2*和Hes1活性增加,加入*Notch*抑制剂DAPT后,*Notch 2*活性降低,细胞活力显著增强,*Bcl-2/Bax*的比率增大,caspase-3活性降低,自噬体、自噬溶酶体以及自噬相关蛋白LC3 II和Beclin-1增加,H9c2心肌细胞H/R损伤减轻^[34]。自噬和*Notch1*信号通路通过miRNA-30e参与缺血损伤心肌修复,抑制miRNA-30e可以增加I/R患者自噬水平,降低H/R H9c2细胞内caspase-3的活性和*Bax*、iNOS蛋白的表达,而敲减miRNA-30e可以增加氧化应激相关蛋白GSH、GSH-PX和SOD的活性及*Notch1*、Hes1和p-Akt蛋白在H/R细胞H9c2内的表达水平^[35]。

2.3 巨噬细胞调控

巨噬细胞是人体天然免疫系统的重要构成组份,能够吞噬病原体进而启动机体防御效应,也

能够分泌促炎性因子促进炎症反应, 还具有增强组织修复、促进代谢及抗炎、免疫调节等作用^[36]。巨噬细胞具有功能多样性和很强的可塑性, 根据其活化后的功能和表型可分为多种类型, 经典活化型M1和替代活化型M2是被广泛认知的, 当机体微环境改变时, M1与M2可相互转化, 随之功能也发生变化。心肌缺血半小时内, 循环中的Ly6Chigh单核细胞被招募至缺血心肌损伤边缘区, 分化为M1巨噬细胞即促炎巨噬细胞, 负责清除死亡细胞、碎片、凋亡的中性粒细胞, 随着再灌注或微血管再通, 巨噬细胞逐渐移至缺血心肌中心^[37]。心肌缺血后约4~7 d, 巨噬细胞逐渐转换成M2型^[38,39], 大量合成与释放抗炎细胞因子、免疫抑制因子和多种能促进心肌细胞生长、血管生成的细胞因子, 可抑制炎症反应、促进心肌细胞和血管再生、心肌组织修复、减轻心肌缺血损伤^[40]。可见巨噬细胞是心肌缺血后重要的炎症调控细胞, 是修复受损组织的关键细胞; 同时具有促炎和抑炎的双重作用, 参与心肌缺血后修复的全过程^[41,42]。

巨噬细胞的功能受多种信号通路调控, 其中Notch信号通路在其功能调控中发挥关键作用, 且与多种信号通路存在复杂的网络作用, 如干扰素调节因子、Toll样受体、NF- κ B和MAPK信号通路。MI急性期Notch信号在巨噬细胞中过度激活, 并参与了MI后巨噬细胞表型转换的调控, 抑制Notch信号使巨噬细胞早期向M2型转换且M1型数量减少, 下调神经生长因子的表达, 最终改善MI后交感神经过度增生, 降低心脏心律失常的易感性, 缓解心脏功能恶化^[43]。用冠状动脉结扎建立MI模型, 在模型建立3天后, 浸入梗塞区域的巨噬细胞中观察到高水平的Notch细胞内结构域, Notch抑制剂N-N-(3,5-二氟苯乙酰基-L-丙氨酰)-S-苯基甘氨酸叔丁基酯的给药(在MI前30 min静脉注射, 然后每天给药直至死亡)减少了巨噬细胞的数量, 并显著降低了早期增加的M2型巨噬细胞的活化特性, 减弱了神经生长因子的表达, MI后第7天, 电治疗的梗死大鼠的程序性电刺激心律失常评分高于N-N-(3,5-二氟苯乙酰基-L-丙氨酰)-S-苯基甘氨酸叔丁基酯治疗的大鼠, 大鼠心脏功能进一步恶化, 肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-1 β 水平下降^[44]。体外

研究表明, LPS/IFN- γ 以Notch依赖性方式上调M1型巨噬细胞中神经生长因子的表达, Notch在急性炎症反应阶段的抑制作用可能与神经生长因子的下调有关, 由巨噬细胞依赖性途径引起, 从而阻止了交感神经的过度神经支配过程^[44]。

2.4 心室重构

心肌缺血后由于心肌细胞缺氧, 能量供应不足, 引起心肌细胞、非心肌细胞胞外间质变化, 使心脏的形态功能改变, 发生不同程度的心室重构, 主要表现为缺血区室壁渐进性变薄顺应性降低, 心肌细胞坏死、间质纤维化或降解增加; 非缺血区心肌细胞代偿性增大、心肌细胞凋亡、胞外基质改变, 进一步可发展为心力衰竭^[45]。炎症反应及炎症介质的参与是MI后损伤心肌修复和瘢痕形成的必要过程, 对心肌重构具有重要作用^[46,47]。I/R时, 线粒体呼吸链受损, 正常的氧化磷酸化速度减慢, 而电子传递所产生的氧自由基却大量产生, 同时内源性清除功能下降, 造成大量氧自由基的聚集, 因此, 抑制心肌缺血后的炎症反应、氧化应激可改善心室重构及延缓心力衰竭^[48]。MiR-204可靶向下调Notch2从而抑制I/R大鼠NF- κ B信号通路的激活, 减轻大鼠的心肌炎症及氧化应激, 进而抑制心室重构^[49]。斑马鱼心脏在心室受损后通过炎症、细胞纤维化组织沉积/去除和心肌再生等过程再生, Notch信号与心内膜再生的不同方面有关, 是一个关键的高活性心内膜作用者, 调节再生斑马鱼心脏关键的再生过程^[50]。成纤维细胞向功能性心肌细胞的转化, 是MI后恢复心脏功能的一种潜在手段, 但该过程效率低下, 对其分子机制了解甚少, 经典的Notch抑制剂DAPT通过转录因子(GATA4、HAND2、MEF2C和TBX5)增强了小鼠成纤维细胞向诱导的心脏样心肌细胞的转化, DAPT与AKT激酶协同作用进一步增强了这一过程, 转化效率高达70%^[51]。建立大鼠急性MI模型, 与正常组和假手术组相比, MI组心肌梗死区的miR-29b表达下调, Notch1、DII4、Hes1表达增强, NICD1蛋白表达增强($P<0.05$); 与阴性对照组和空白组相比, 模型组Notch1、DII4、Hes1和NICD1表达上调($P<0.05$), 而抑制剂组Notch1、DII4、Hes1和NICD1的表达降低($P<0.05$), 可见miR-29b可通过激活Notch信号通路抑制心肌纤维

化和心肌肥厚, 保护心肌免受心肌梗死的影响^[52]。心脏前体细胞分化上调了骨形态发生蛋白拮抗剂Gremlin 2的表达, 激活了Notch1通路, Gremlin 2基因敲除可抑制心肌细胞分化, 其作用类似于体外抑制Notch1通路的作用, Jagged-1的过度表达挽救了Gremlin 2沉默的影响。在体内, Gremlin 2沉默取消了心脏前体细胞注射液对心肌纤维化和功能的保护作用。可见Gremlin 2通过调节Notch1信号调节心脏前体细胞的心脏分化, 在MI小鼠模型中, Gremlin 2增强了心脏前体细胞对心脏功能的保护作用^[53]。在梗塞心脏中, 心肌Notch1受miRNAs或antago miRNAs的调节, 可能通过减少心肌细胞凋亡和心肌纤维化、促进心肌干细胞增殖、促进血管生成和降低M1/M2巨噬细胞的比率来限制病理重塑, 微调受损心肌中的Notch1活性可能会通过减少瘢痕形成和心室重构而改善血流动力学功能^[4]。在大鼠MI模型中, 转化生长因子 β 1(transforming growth factor-beta 1, TGF- β 1)增加了大鼠心脏成纤维细胞的增殖、侵袭和黏附以及胶原 I 的分泌, 而这些作用被Notch1细胞内结构域(Notch1 intracellular domain, N1ICD)过表达抑制, 心脏成纤维细胞中的内源性Smad3磷酸化通过N1ICD抑制得以增强, 而TGF- β 1诱导的Smad3磷酸化则被N1ICD的过度表达拮抗, Notch信号通路通过拮抗TGF- β 1/Smad3信号抑制心肌成纤维细胞生成^[54]。建立Notch1功能丧失模型, 以研究Notch1在心梗后心内膜重塑和新血管形成中的潜在作用, 结果表明成年心脏在心梗后1~5 d之间会恢复为高束流状态, 并在7~14 d之间重复心内膜压紧过程, MI后心内膜中Notch通路被重新激活^[55]。Notch信号通路在心室发育中起着至关重要的作用, 在小梁形成和心室压实过程中, Dll4-Notch1信号以非细胞自主方式调节腔内膜的心肌增殖和分化, 在以后的阶段, 心肌Jagged-1和Jagged-2激活腔内膜的Notch1以维持Dll4-Notch1介导的同时, 形成冠状动脉腔室和压实^[56]。比较正常大鼠和尾部悬吊大鼠Notch信号表达和心肌梗死面积的差异, 数据显示, Notch1受体及其内源性配体Jagged-1在正常成年大鼠心脏中低表达, 但是, 与MI后的梗塞区域和远端区域相比, 在边界区域观察到了Notch1的表达明显更高, 与对照组相比, 尾

部悬吊大鼠的梗塞心脏中Notch1表达明显降低, MI面积明显增加^[57]。Notch信号的另一种发育后适应是纤维化, 参与间充质细胞命运的定向, 调节纤维化成纤维细胞的分化, 如降低纤维化细胞因子TGF- β 1的水平, Notch信号可以调节心肌与基质细胞之间的相互作用, 并将心脏修复从促纤维化默认途径转变为促心源性途径, 这些功能使Notch信号成为新的心脏疗法的合适靶标^[58]。功能受损和心肌细胞丢失是心脏衰老的主要特征, Notch通路调节心肌细胞、成纤维细胞和心脏祖细胞的活性, 可能高度参与了与衰老有关的心脏病, 尤其是心力衰竭的发生。对老化心肌中Notch系统的研究可能找到与年龄相关的心脏病治疗的分子靶标^[58]。

2.5 血管生成

心肌间充质干细胞(cardiac mesenchymal stem cells, C-MSCs)是一种衍生自心脏组织的新型间充质干细胞亚群, 负责心脏再生, Notch信号被认为有助于心肌损伤后的心脏修复, Notch激活的C-MSCs细胞外囊泡促进心肌细胞增殖和新血管生成, 心肌内Notch1基因敲除的C-MSCs移植对心脏功能和疤痕大小没有任何影响, 过表达N1ICD的C-MSCs(C-MSCs N1ICD)的移植表现出心脏功能的显著改善和纤维化的减轻, C-MSCs N1ICD分化为平滑肌细胞并形成新的血管, 细胞外囊泡-C-MSCs N1ICD在体外引起致密管形成, 并在体内增加梗死周围区域的新血管生成^[59]。MI模型大鼠的心脏功能障碍和血管生成可通过NICD过表达得到部分改善, 降低NICD水平则会恶化, Notch信号的人工激活可以促进H/R损伤后的心肌存活和血管生成, 改善心脏功能^[60]。在心脏中, Notch参与对缺血的保护性反应, 减少再灌注诱导的氧化应激和心肌损伤; Notch的心脏保护作用可能取决于新血管生成, 从而减弱致死性心肌缺血, 以及直接刺激心肌细胞以增加其对损伤的抵抗力^[61]。小鼠内皮细胞中的Notch信号对于在心脏中发现的血管床的发生发展至关重要^[62]。使用内皮特异性Cre靶向的Notch1功能丧失小鼠模型, 可观察到Notch活性受到破坏后, 小梁减少, 心内膜下血管数目减少^[55]。醛缩酶A在MI患者和H/R诱导的H9c2心肌细胞中表达水平低, 其过表达可抑制H/R诱导的氧化

应激和细胞凋亡, 通过免疫共沉淀和蛋白质印迹证明醛缩酶A通过上调血管内皮生长因子来调节Notch1-Jagged-1信号通路, 保护心肌细胞免受H/R诱导的氧化应激^[62]。

3 调控Notch信号通路治疗心肌缺血损伤的药物

目前已发现多种物质或途径参与保护受损心肌均与Notch信号通路相关, 如缓激肽、肿瘤坏死因子阻滞剂、二十二碳六烯酸等均可缩小梗死面积、增加心肌存活率、减少细胞凋亡, 而以上过程均通过激活Notch信号通路从而发挥作用^[10]。肿瘤坏死因子- α 抑制剂(依那西普)对I/R损伤心肌具有保护作用, 其作用机制与激活Notch1信号通路以调节caspase-3蛋白表达水平有关^[63]。阿托伐他汀或氯沙坦可通过Notch1-TGF- β -Smads通路抑制急性MI患者的心肌炎症及纤维化, 减少炎症及纤维化指标表达, 减轻心肌重构, 在一定程度上对心功能和血流动力学起到改善作用^[64]。丹参酮II A与r-secretase抑制剂均能显著降低缺血/再灌注大鼠成年鼠心肌组织或乳鼠原代心肌细胞内Notch1、Hes1、HIF-1 α mRNA表达量, 二者亦能够显著降低缺血/再灌注大鼠成年鼠心肌组织中乳酸脱氢酶含量, 降低乳鼠原代心肌细胞内丙二醛含量以及心肌细胞早期凋亡率^[65,66]。

中药宣痹通瘀方和麝香保心丸均能减少心肌缺血大鼠死亡率, 降低心肌损伤生化指标, 缩小心肌梗死面积, 促进梗死交接区血管生成, 其作用机制可能与二者抑制大鼠缺血心肌组织内Notch1与Dll4的表达、上调血管内皮生长因子基因和蛋白的表达、调控Notch-Dll4信号通路相关^[67]。黄精多糖能够改善急性MI大鼠心肌的损伤程度, 减轻炎症及氧化应激反应, 促进缺血区血管新生, 修复缺血心肌, 其作用机制与其降低缺血心肌组织Notch1、Dll4及Hey2的蛋白质表达有关^[68]。加味丹参饮能够抑制Notch信号通路Notch1、Hes1等相关蛋白, 降低因心肌缺血损伤产生的氧化应激反应, 保护心肌细胞^[69]。褪黑素与小檗碱治疗可显著激活I/R大鼠心肌Notch1/Hes1信号通路并调控PTEN/Akt信号, 从而下调心肌凋亡信号^[70,71]。心

痛泰具有保护缺血心肌的作用, 可能与其激活Notch信号通路, 上调Notch1、Dll4蛋白在缺血区的表达, 促进血管新生有关^[72]。益气活血方能够调节MI后的糖脂代谢, 改善心肌细胞线粒体能量代谢障碍, 其作用与提高Notch信号通路与AMPK信号通路交叉对话的调控有关^[73]。

Notch信号通路参与多种细胞间的生物转导, 且会受其它信号通路的干扰, 因此以调节Notch信号通路为靶标的治疗药物必须具有心肌选择性, 其治疗方式应对Notch信号通路具有高度特异性, 这些信号不能转导到Notch以外的其他通路, 能够靶向调节Notch蛋白而不破坏其他重要信号分子。Notch信号通路具有多组织表达性, 因此, 特异性的Notch信号调节药物容易产生毒副作用, 在药物研发中需要克服这些不良反应, 这也成为以Notch信号通路为靶点的药物研究的难点。目前关于Notch信号通路在心肌缺血中的作用机制仍然有很多未知之处, 许多依赖Notch信号通路的调控机制以及不同通路的相互联系等尚处于研究阶段, 而依赖Notch的药物研究则需要在上述研究进一步深入的基础上开展, 探讨Notch信号通路靶向治疗将为心肌缺血性疾病治疗开辟新的领域, 具有广阔的应用前景。

4 结语

Notch信号调控心肌缺血的作用机制复杂, 可以减少心肌细胞凋亡增加其活力, 通过自噬减轻心肌缺血损伤, 减小梗死面积, 缓解心脏形态功能的改变, 调控巨噬细胞M1、M2型转化, 在心肌缺血的不同阶段发挥促炎抗炎作用, 与氧化应激、炎症介质相互作用抑制心室重构缓解心功能恶化。Notch信号通路的多组织表达性, 使其成为靶点的心肌特异性药物容易产生不良反应, 这也成为该类药物研发的难点。Notch信号通路与多个信号通路存在复杂的网络作用, 在心肌缺血过程中发挥不同的作用。目前Notch信号通路在心肌缺血中的作用机制研究仍在不断进行中, 随着研究的逐步深入, 其作用机制会越来越清晰, 可以为临床治疗急性心肌缺血提供新的思路, 并对心肌缺血的临床靶向治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Olesen KKW, Madsen M, Lip GYH, et al. Coronary artery disease and risk of adverse cardiac events and stroke. *Eur J Clin Invest*, 2017, 47(11): 819-828
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158
- [3] Morgan TH. The theory of the gene. *The American Naturalist*, 1917, 51: 513-544
- [4] Aquila G, Kostina A, Viecei Dalla Sega F, et al. The Notch pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases? *Expert Opin Therapeutic Targets*, 2019, 23(8): 695-710
- [5] Alabi RO, Farber G, Blobel CP. Intriguing roles for endothelial adam10/notch signaling in the development of organ-specific vascular beds. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2025-2061
- [6] Pizzo E, Cervantes DO, Comelli M, et al. Abstract 16495: activation of notch signaling in the heart promotes electrical disturbances. *Circulation*, 2020, 142(Suppl_3):
- [7] 陶洁, 熊永红, 夏中元. Notch1/Hes1信号通路与糖尿病心肌缺血再灌注关系研究进展. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2021, 35(2): 209-212
- [8] 陈希瑶. Notch信号途径对缺血/再灌注心肌的保护作用[D]. 西安: 第四军医大学, 2014: 4-7
- [9] 赵峻峰. 基于Notch1信号通路探讨丹参酮对心肌缺血再灌注(I/R)损伤保护机制的研究[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2014: 9-13
- [10] 何砚如, 陈立娟, 马根山. Notch信号通路对缺血心肌的保护作用. *东南大学学报(医学版)*, 2016, 35(1): 139-143
- [11] Meng X, Ji Y, Wan Z, et al. Inhibition of miR-363 protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis through regulation of Notch signaling. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 509-516
- [12] Yao Y, Fan X, Yu B, et al. Knockdown of long noncoding RNA Malat1 aggravates hypoxia-induced cardiomyocyte injury by targeting miR-217. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28(6): 719-728
- [13] Fang HC, Wu BQ, Hao YL, et al. KRT1 gene silencing ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via the activation of the Notch signaling pathway in mouse models. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3634-3646
- [14] Zhao Z, Zhao Y, Ying-Chun L, et al. Protective role of microRNA-374 against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice following thoracic epidural anesthesia by downregulating dystrobrevin alpha-mediated Notch1 axis. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10726-10740
- [15] Li J, Gong J, Li X, et al. MicroRNA-34a promotes CMECs apoptosis and upregulate inflammatory cytokines, thus worsening CMECs damage and inhibiting angiogenesis by negatively targeting the Notch signaling pathway. *J Cell Biochem*, 2019, 120(2): 1598-1609
- [16] Lu L, Zhang H, Dong W, et al. MiR-381 negatively regulates cardiomyocyte survival by suppressing Notch signaling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54(8): 610-619
- [17] Wang Z, Wang Z, Wang T, et al. Inhibition of miR-34a-5p protected myocardial ischemia reperfusion injury-induced apoptosis and reactive oxygen species accumulation through regulation of Notch receptor 1 signaling. *Rev Cardiovasc Med*, 2019, 20(3): 187
- [18] 牛丹丹, 刘振, 李方方. miR-146a-5p通过调控Notch2表达对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌损伤的影响. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(5): 530-537, 554
- [19] Cheng J, Wu Q, Lv R, et al. MicroRNA-449a inhibition protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury by targeting the notch-1 signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2587-2600
- [20] Chen Z, Su X, Shen Y, et al. MiR322 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via FBXW7/Notch pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 67-74
- [21] Zhang S, Zhang R, Wu F, et al. MicroRNA-208a regulates H9c2 cells simulated ischemia-reperfusion myocardial injury via targeting CHD9 through Notch/NF-kappa B signal pathways. *Int Heart J*, 2018, 59(3): 580-588
- [22] Wu J, Xie F, Qin Y, et al. Notch signaling is involved in the antiapoptotic effects of liraglutide on rat H9c2 cardiomyocytes exposed to hypoxia followed by reoxygenation. *J Int Med Res*, 2020, 48(9): 030006052094839
- [23] Boccalini G, Sassoli C, Formigli L, et al. Relaxin protects cardiac muscle cells from hypoxia/reoxygenation injury: involvement of the Notch-1 pathway. *FASEB J*, 2015, 29(1): 239-249
- [24] Zhu P, Yang M, He H, et al. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by down-regulating Notch signaling. *Mol Med Report*, 2019, 20(2): 1541
- [25] He Y, Pang S, Huang J, et al. Blockade of RBP-J-Mediated Notch signaling pathway exacerbates cardiac remodeling after infarction by increasing apoptosis in mice. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1-8
- [26] Liu H, Xu M, Ma L, et al. Silencing Rac1 protects H9c2 cells against hypoxia-reoxygenation injury by inactivation of Notch pathway. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(12): 12543-12550
- [27] Wu F, Yu B, Zhang X, et al. Cardioprotective effect of Notch signaling on the development of myocardial

- infarction complicated by diabetes mellitus. *Exp Therapeutic Med*, 2017, 14(4): 3447-3454
- [28] Song B, Chi Y, Li X, et al. Inhibition of Notch signaling promotes the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through autophagy activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5): 1991-2002
- [29] Liu L, Wu Y, Huang X. Orientin protects myocardial cells against hypoxia-reoxygenation injury through induction of autophagy. *Eur J Pharmacol*, 2016, 776: 90-98
- [30] Mo Y, Tang L, Ma Y, et al. Pramipexole pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through upregulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1119-1124
- [31] 刘升. 自噬性心肌保护中基于Notch1信号相关miRNA和lncRNA的筛选[D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 25-26
- [32] 吕平, 李巍, 杨亚丽, 等. 激活Notch1通过促进自噬改善高温高湿条件下心肌缺血/再灌注损伤. 现代生物医学进展, 2017, 117(9): 1623-1627
- [33] 吕平, 李巍, 杨亚丽, 等. 激活Notch1通路减轻高温高湿条件下H9C2心肌细胞缺氧/复氧损伤. 心脏杂志, 2017, 29(5): 512-517
- [34] Li X, Xie X, Yu Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived conditioned medium protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury through Notch2/mTOR/autophagy signaling. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18906-18916
- [35] Zheng J, Li J, Kou B, et al. MicroRNA-30e protects the heart against ischemia and reperfusion injury through autophagy and the Notch1/Hes1/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2018, 41: 3221
- [36] Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, et al. Macrophages in vascular inflammation - From atherosclerosis to vasculitis. *Autoimmunity*, 2015, 48(3): 139-151
- [37] van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J*, 2014, 35(6): 376-385
- [38] Shiraishi M, Shintani Y, Shintani Y, et al. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Investigation*, 2016, 126(6): 2151-2166
- [39] Cheng B, Chen HC, Chou IW, et al. Harnessing the early post-injury inflammatory responses for cardiac regeneration. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 7
- [40] Hasan AS, Luo L, Yan C, et al. Cardiosphere-derived cells facilitate heart repair by modulating M1/M2 macrophage polarization and neutrophil recruitment. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0165255
- [41] Yang K, Xu C, Zhang Y, et al. Sestrin2 suppresses classically activated macrophages-mediated inflammatory response in myocardial infarction through inhibition of mTORC1 signaling. *Front Immunol*, 2017, 8: e728
- [42] Seidel T, Sankarankutty AC, Sachse FB. Remodeling of the transverse tubular system after myocardial infarction in rabbit correlates with local fibrosis: A potential role of biomechanics. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017, 130: 302-314
- [43] 殷洁. 巨噬细胞调控心梗后交感神经再生的作用和分子机制[D]. 济南: 山东大学, 2017: 115
- [44] Yin J, Hu H, Li X, et al. Inhibition of Notch signaling pathway attenuates sympathetic hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophages in rats post-myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(1): C41-C53
- [45] Brenner C. In depth understanding of adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2018, 257: 34
- [46] 徐标, 孙漩. 炎症在心肌损伤和修复中的作用. 中国心血管杂志, 2018, 31(7): 633-635
- [47] 余帮兴, 王文, 刘婷婷. 炎症在梗死心肌损伤与修复中的作用. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(12): 946-950
- [48] 黄震华. 急性心肌梗死抗炎治疗对心室重构的影响. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(10): 738-743
- [49] 李静, 武敏, 朱海慧, 等. miR-204改善心肌缺血再灌注大鼠炎症及氧化应激. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(5): 414-421
- [50] Münch J, Grivas D, González-Rajal Á, et al. Notch signalling restricts inflammation and *serpine1* in the dynamic endocardium of the regenerating zebrafish heart. *Development*, 2017, 144(8): 1425
- [51] Abad M, Hashimoto H, Zhou H, et al. Notch inhibition enhances cardiac reprogramming by increasing MEF2C transcriptional activity. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(3): 548-560
- [52] Liu Y, Wang H, Wang X, et al. MiR-29b inhibits ventricular remodeling by activating Notch signaling pathway in the rat myocardial infarction model. *Heart Surg Forum*, 2019, 22(1): E019-E023
- [53] Li W, Lu Y, Han R, et al. Gremlin2 regulates the differentiation and function of cardiac progenitor cells via the Notch signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 579-589
- [54] Zhou XL, Fang YH, Wan L, et al. Notch signaling inhibits cardiac fibroblast to myofibroblast transformation by antagonizing TGF- β 1/Smad3 signaling. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8834-8845
- [55] Thomas T. BS1 Investigating the role of endocardial notch signalling in neovascularisation of the heart after myo-

- cardial infarction. *Heart*, 2019, 105(Suppl 6): A140-A141
- [56] D'Amato G, Luxán G, de la Pompa JL. Notch signalling in ventricular chamber development and cardiomyopathy. *FEBS J*, 2016, 283(23): 4223-4237
- [57] Jiang S, Zhao XC, Jiao B, et al. Simulated microgravity hampers Notch signaling in the fight against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Report*, 2018, 17(4): 5150
- [58] Rizzo P, Bollini S, Bertero E, et al. Beyond cardiomyocyte loss: role of Notch in cardiac aging. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5670-5683
- [59] Xuan W, Khan M, Ashraf M. Extracellular vesicles from Notch activated cardiac mesenchymal stem cells promote myocyte proliferation and neovasclogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 11
- [60] Zhou XL, Zhu RR, Liu S, et al. Notch signaling promotes angiogenesis and improves cardiac function after myocardial infarction. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 7105-7112
- [61] Nistri S, Sassoli C, Bani D. Notch signaling in ischemic damage and fibrosis: evidence and clues from the heart. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 187
- [62] Luo G, Wang R, Zhou H, et al. ALDOA protects cardiomyocytes against H/R-induced apoptosis and oxidative stress by regulating the VEGF/Notch 1/Jagged 1 pathway. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2): 775-783
- [63] 王卫芳, 柳潇, 计晓玲, 等. TNF- α 抑制剂通过激活 Notch1信号通路治疗创伤后心肌再灌注损伤的实验研究. *中国循证心血管医学杂志*, 2016, 8(12): 1504-1507
- [64] 康琪. 阿托伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌炎症和纤维化反应相关Notch1与TGF- β -Smad信号通路的作用以及对冠心病患者血浆炎症因子Galectin-3作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2017: 85
- [65] 何琼笑, 赵峻峰. 丹参酮A对缺血再灌注大鼠心肌Notch信号通路的影响. *中华中医药学刊*, 2017, 35(7): 1840-1843
- [66] 赵峻峰, 祝骥, 陈微, 等. 丹参酮A对缺血再灌注损伤的乳鼠心肌细胞Notch信号通路的影响. *中国现代应用药学*, 2014, 31(12): 1435-1439
- [67] 李双娣. 基于Notch-Dll4信号通路探讨宣痹通瘀胶囊保护心肌损伤及干预血管新生作用机制的研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2018: 86
- [68] 李丽. 基于Notch1/Dll4在血管新生中的作用研究黄精多糖对急性心肌梗死模型大鼠的保护机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016: 39
- [69] 谭琦, 周小明, 邹瑾. 加味丹参饮通过Notch信号通路对心肌缺血损伤模型大鼠保护作用研究. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(12): 24-28
- [70] 于立明, 段维勋, 张秋芳, 等. 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的作用及其对Notch1/Hes1信号通路影响. *心脏杂志*, 2017, 29(1): 24-28
- [71] 于立明, 赵国龙, 金振晓, 等. 小檗碱减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及其对Notch1/Hes1信号通路的调控研究. *中国体外循环杂志*, 2015, 13(4): 240-244
- [72] 吴钟琴, 李雅, 郭志华, 等. 心痛泰干预心肌缺血大鼠心肌中Notch1、Dll4蛋白表达的研究. *中医药导报*, 2019, 25(6): 31-36
- [73] 武建功. 益气活血方基于Notch信号调控心肌梗死后心肌重构作用机理的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017: 1-4