

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00011

## Urocortin 抑制心肌缺血再灌注诱导的自噬

张冠鑫<sup>1</sup>, 韩林<sup>1\*</sup>, 郭志福<sup>1</sup>, 王崇<sup>1</sup>, 任安经<sup>2</sup>, 钟铿<sup>1</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 袁扬<sup>1</sup>, 徐志云<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究 urocortin (UCN) 对缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬的影响, 探讨 UCN 的心肌保护机制。**方法** 构建大鼠在体心脏缺血再灌注损伤和离体新生大鼠心肌细胞的缺氧复氧模型, 进行缺血/缺氧 1 h 再灌注/复氧 2 h 的损伤, 在缺血/缺氧前 1 h 给予 UCN 预处理; 在再灌注/复氧 2 h 后观察 UCN 对缺血再灌注/缺氧复氧诱导的心肌损伤、细胞自噬和自噬相关基因表达的影响。**结果** UCN 预处理可以显著降低缺血再灌注损伤导致的心肌损害, 使梗死面积降低, 血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)降低; 增加缺氧复氧离体心肌细胞活力、减少培养上清的 LDH 水平。与上述心肌保护作用相伴随的是 UCN 预处理还能抑制缺氧复氧导致的心肌细胞自噬, 使 LC3B II / LC3B I 的比值显著降低, 并且抑制自噬相关基因 *Beclin1*、*Bnip3* 的 mRNA 表达。**结论** UCN 可以抑制缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬, 可能在抗缺血再灌注损伤中起重要作用。

**[关键词]** urocortin; 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 心肌细胞; 自噬

**[中图分类号]** R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0011-06

### Urocortin inhibits myocardium ischemia/reperfusion-induced autophagy

ZHANG Guan-xin<sup>1</sup>, HAN Lin<sup>1\*</sup>, GUO Zhi-fu<sup>1</sup>, WANG Chong<sup>1</sup>, REN An-jing<sup>2</sup>, ZHONG Keng<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, YUAN Yang<sup>1</sup>, XU Zhi-yun<sup>1</sup>

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the regulatory effect of urocortin (UCN) on ischemia/reperfusion (I/R)-induced myocardial autophagy, so as to explore the myocardial protection mechanism of UCN. **Methods** Cardiac I/R model was established with rats and hypoxia/reoxygenation(H/R) model was also established with neonatal rat cardiomyocytes. The injury was created by ischemic/hypoxia for 1 h plus reperfusion/reoxygenation for 2 h, and UCN pretreatment was given 1 h before ischemia/hypoxia. The I/R or H/R-induced myocardial injury, myocardial autophagy and autophagy-related gene expression were observed 2 h after reperfusion/reoxygenation. **Results** UCN pretreatment greatly reduced I/R-induced myocardial damage by decreasing the infarct size, serum creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) concentration, increasing the vitality of H/R cardiomyocytes *in vitro*, and reducing LDH level in the culture supernatant. Moreover, UCN pretreatment also inhibited H/R-induced myocardial autophagy by reducing the ratio of LC3B II / LC3B I and inhibiting expression of autophagy-related genes (*Beclin1* and *Bnip3*). **Conclusion** UCN can inhibit I/R-induced myocardial autophagy, which may play an important role in the protection against I/R injury.

**[Key words]** urocortin; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; cardiac myocytes; autophagy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 11-16]

心肌缺血再灌注损伤是临床常见的心脏损害<sup>[1-4]</sup>, 如何减轻缺血再灌注对心脏的损伤一直是生物医学研究的热点。心脏在缺血再灌注期间可产生多种具有内源性心肌保护作用的心血管活性物质,

其中 urocortin (UCN) 近年来受到广泛关注<sup>[5]</sup>。研究发现, 在心肌缺血时心脏会产生内源性 UCN, 保护心肌细胞<sup>[6-7]</sup>; 并且无论在缺血前或再灌注期间给予外源性 UCN, 都具有抗心肌缺血再灌注损伤的作

**[收稿日期]** 2012-12-23 **[接受日期]** 2013-01-05

**[基金项目]** 国家卫生部公益基金(200802096)。Supported by Public Welfare Fund of the Ministry of Health of China (200802096)。

**[作者简介]** 张冠鑫, 博士, 讲师、主治医师。E-mail: zhanggx97@163.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161752, E-mail: sh\_banl@163.com

用<sup>[8-11]</sup>。鉴于 UCN 显著的心肌保护作用,已有学者将其作为一种心血管活性药物开展临床前研究<sup>[12-13]</sup>。然而 UCN 的作用机制尚未完全阐明,它最终能否应用于临床还有待进一步研究。

以往认为心肌细胞死亡主要包括坏死和凋亡,近年研究发现,细胞自噬也是心肌细胞死亡的重要机制<sup>[14]</sup>。自噬是细胞内普遍存在的一种降解机制,细胞内基础状态下的自噬可以清除细胞内损伤的细胞器,从而对维持细胞稳态有重要意义<sup>[15-16]</sup>。但是过度的自噬可以导致细胞死亡,并且对坏死和凋亡都有促进作用<sup>[17]</sup>。研究发现心脏在缺血期间自噬是增强的,而适度增强的自噬对心脏有保护作用,可以在缺血期间维持细胞的能量代谢,如果阻断缺血期间的细胞自噬反而使缺血损伤加重;但是再灌注期间自噬又进一步增强,从而导致细胞损伤、死亡<sup>[18-19]</sup>。Matsui 等<sup>[20]</sup>发现,心肌在缺血再灌注期间,Beclin1 在介导自噬体形成的过程中起了关键的作用。此外,Hammacher-Brady 等<sup>[21]</sup>发现 Bnip3 也是介导再灌注期间自噬增强的重要途径。

鉴于以上研究背景,我们推测调节再灌注期间的心肌细胞自噬,可能是 UCN 减少心肌细胞损伤、抗缺血再灌注损伤的一种重要机制,本研究主要针对 UCN 预处理对缺血再灌注后的心肌细胞自噬及其相关信号分子 Beclin1 和 Bnip3 的影响展开研究。

## 1 材料和方法

1.1 大鼠缺血再灌注损伤模型制备<sup>[22]</sup> 本研究动物实验经第二军医大学动物伦理委员会批准。成年雄性 SD 大鼠(250~300 g),购自第二军医大学实验动物中心,饲养环境维持 25℃、黑暗与照明各 12 h 交替。随机分为 UCN 干预组和对照组,每组 10 只。UCN 干预组在缺血前 1 h 静脉注射 UCN (Sigma-Aldrich) 30 μg/kg 预处理,对照组给予等量的溶剂(生理盐水)。所有动物均经 1% 戊巴比妥钠麻醉并气管插管,小动物呼吸机机械通气,开胸后于左心耳和肺动脉根部下方 2 mm 处缝扎阻断左冠状动脉前降支(left anterior descending artery, LAD)造成左室前壁心肌缺血 1 h,然后开放 LAD 恢复供血再灌注 2 h,造成心肌急性缺血再灌注损伤。成功标准:结扎 LAD 后心电图 II 导联 ST 段出现弓背向上抬高、T 波高耸等表现,为缺血模型成功;放松结扎线后,抬高的 ST 段下降 1/2 以上为再灌注成功。完成

后检测心肌损伤情况。

1.2 大鼠心脏缺血再灌注损伤的检测 (1)心肌梗死面积检测:在心脏缺血再灌注后,经大鼠颈内静脉插管,缓慢推注 2% 伊文思蓝 (Sigma-Aldrich) 1 mL,待心肌蓝染后,取心肌组织,由心尖至结扎水平平均切片(约 2 mm×5 片),用 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)于 37℃ 孵育 15 min,4% 多聚甲醛固定。苍白区为梗死区、红染区为危险区、蓝染区为非梗死区,以梗死区/危险区的比值评价相对梗死面积大小。(2)血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)检测:在心脏缺血再灌注后,经股动脉插管取血,4℃ 静置 30 min 后离心取血清。利用全自动生化分析仪检测各组血清 CK、LDH。

1.3 新生大鼠心肌细胞缺氧复氧培养<sup>[23]</sup> 取出生 3 d 以内 SD 乳鼠(购自第二军医大学实验动物中心)的心脏,用胰蛋白酶和胶原酶联合消化的方法,获得心肌细胞。采用差速贴壁法纯化心肌细胞,并培养于 20% 胎牛血清、0.1 mmol/L BrdU (Sigma-Aldrich,抑制成纤维细胞生长)的 DMEM 培养液 (Sigma-Aldrich) 中。培养 72 h 后更换为无血清 DMEM 培养液培养,经 UCN(终浓度 0、0.1、1.0、10、100 nmol/L)预处理 1 h,随后在含 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>混合气体的三气培养箱内,采用低糖无血清 DMEM 培养液培养 24 h,然后恢复正常培养条件培养 2 h,造成离体心肌细胞缺氧复氧损伤。完成后检测细胞的损伤程度和相关分子 mRNA 和蛋白的表达。

1.4 心肌细胞缺氧复氧损伤的检测 采用 MTT (Beyotime)法检测细胞存活率,全自动生化分析仪检测细胞培养上清中 LDH 含量。

1.5 心肌细胞自噬检测 提取心肌细胞总蛋白,应用蛋白质印迹法检测各组心肌细胞的自噬特异性标志蛋白 LC3B(LC3B 抗体购自 Cell signaling)的表达变化,以 LC3B II /LC3B I 的比值反映心肌细胞自噬率的变化。

1.6 基因表达的检测 使用 TRIzol (Invitrogen)方法提取心肌细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定样品中总 RNA 的浓度,根据  $D_{260}/D_{280}$  比值判断其纯度。取 2 μg 总 RNA,加入 1 μg Oligo(dT),70℃ 5 min 后立即冰浴,并加入 5×扩增缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂、反转录酶和 DEPC 处理过的蒸馏水,42℃ 1 h,72℃ 10 min 合成 cDNA。利用 PrimerPremier 5.0 软件设计大鼠  $\beta$ actin (NM\_031144)、Beclin1 (NM\_031144)

053739)、*Bnip3*(NM\_Q53420)基因特异性引物,交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。应用 RG-3000 实时荧光定量 PCR 仪,以 SYBR green 作荧光标记染料进行 PCR 扩增。应用 Roter-gene 6.0 软件绘制标准曲线,用标准曲线法定量样本中特异 cDNA 的相对浓度,用目的基因与  $\beta actin$  的相对 cDNA 浓度表示目的基因 mRNA 的表达量。

1.7 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用 ANOVA,并通

过 LSD 法进行两两比较。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 UCN 抑制心肌缺血再灌注损伤 通过 SD 大鼠缺血再灌注损伤模型,我们发现在心肌缺血前 1 h 静脉注射 UCN( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ),能够降低心肌梗死面积(图 1),降低血清 CK、LDH 水平( $P < 0.05$ ;图 2),提示 UCN 在本实验条件下具有抗心肌缺血再灌注损伤作用。

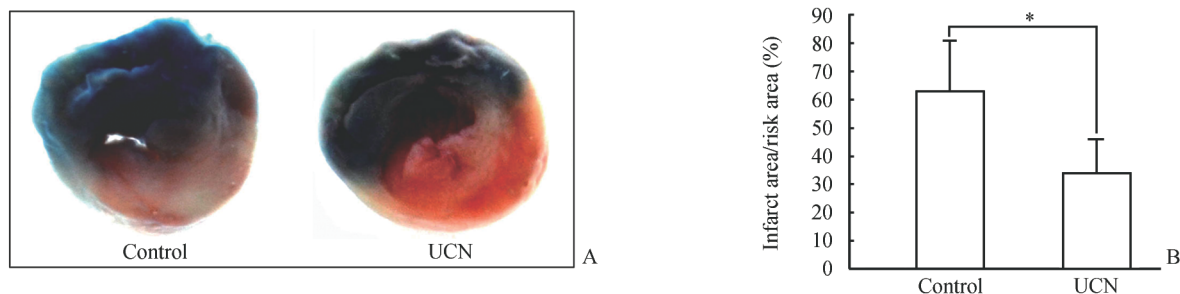


图 1 UCN 减少大鼠心肌缺血再灌注损伤梗死面积

Fig 1 UCN reduced infarct size of rat heart caused by H/R injury

UCN: Urocortin; I/R: Ischemia/reperfusion. UCN ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ , iv) was given 1 h before I/R. A: Representative sections showing the infarct area (pale) and the risk area (red); B: Relative infarct size of rat hearts. \*  $P < 0.05$ .  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

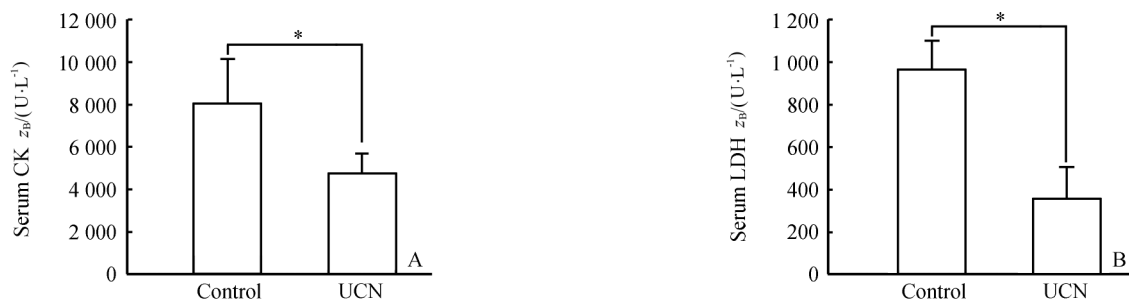


图 2 UCN 降低心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 CK、LDH 水平

Fig 2 UCN decreased serum levels of CK and LDH of cardiac I/R injury rats

UCN: Urocortin; I/R: Ischemia/reperfusion; CK: Creatine kinase; LDH: Lactate dehydrogenase. UCN ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ , iv) was given 1 h before I/R. A: Serum CK level; B: Serum LDH level. \*  $P < 0.05$ .  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

通过新生大鼠心肌细胞缺氧复氧模型,我们发现在缺氧前 1 h 给予  $0.1 \sim 100 \text{ nmol}/\text{L}$  UCN 预处理,与单纯缺氧复氧损伤对照( $0 \text{ nmol}/\text{L}$  UCN)相比,UCN 可剂量依赖地提高心肌细胞活力,减少培养上清 LDH 水平(图 3)。进一步提示 UCN 能够发挥抗心肌缺血再灌注损伤作用。

2.2 UCN 抑制缺氧复氧损伤诱导的心肌细胞自噬 在新生大鼠心肌细胞缺氧复氧模型中,通过蛋白质印迹法检测细胞 LC3B II 和 LC3B I 的表达比例,判断细胞自噬情况。我们发现缺氧复氧损伤可

以使心肌细胞的自噬作用显著增强;而在缺氧前给予  $0.1 \sim 100 \text{ nmol}/\text{L}$  UCN 预处理 1 h,与单纯缺氧复氧损伤相比,UCN 可降低细胞自噬水平,并呈现出剂量依赖性(图 4)。提示缺氧前给予 UCN 能够抑制缺氧复氧损伤诱导的心肌细胞自噬。

2.3 UCN 抑制缺氧复氧损伤诱导的心肌细胞自噬相关分子 *Beclin1* 和 *Bnip3* mRNA 表达 在新生大鼠心肌细胞缺氧复氧模型中,通过实时荧光定量 PCR 法检测细胞 *Beclin1* 和 *Bnip3* mRNA 表达。我们发现在缺氧前给予  $0.1 \sim 100 \text{ nmol}/\text{L}$  UCN 预

处理 1 h,与单纯缺氧复氧损伤对照相比,UCN 可下调 *Beclin1* 和 *Bnip3* mRNA 表达,并呈现剂量依赖性(图 5)。提示缺血前给予 UCN 抑制缺氧复氧损

伤诱导的心肌细胞自噬其机制可能与调节细胞自噬相关分子的表达有关。

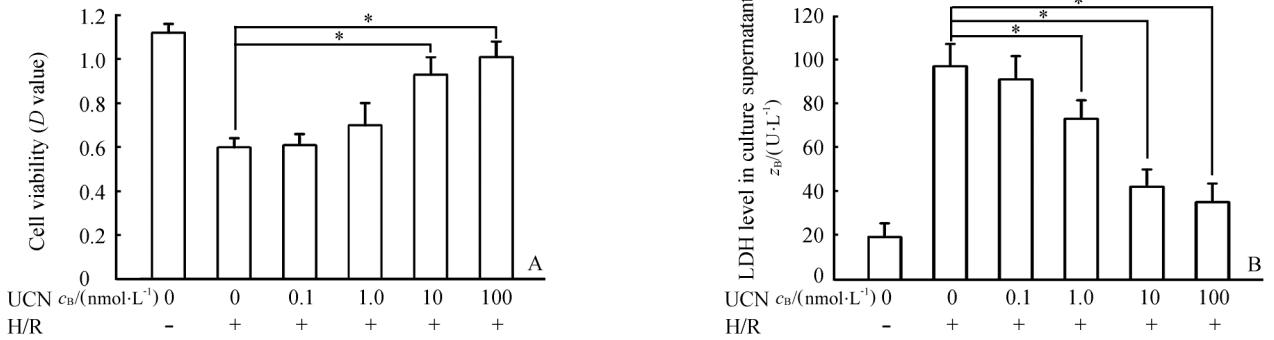


图 3 UCN 抗新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤

Fig 3 Protective effect of UCN against H/R injury in neonatal rat cardiomyocytes

UCN; Urocortin; H/R; Hypoxia/reoxygenation; LDH; Lactate dehydrogenase. UCN (0, 0.1, 1.0, 10, and 100 nmol/L) was given 1 h before H/R. A; Cell viability analyzed by MTT method; B; LDH level in culture supernatant. \*  $P < 0.05$ .  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$

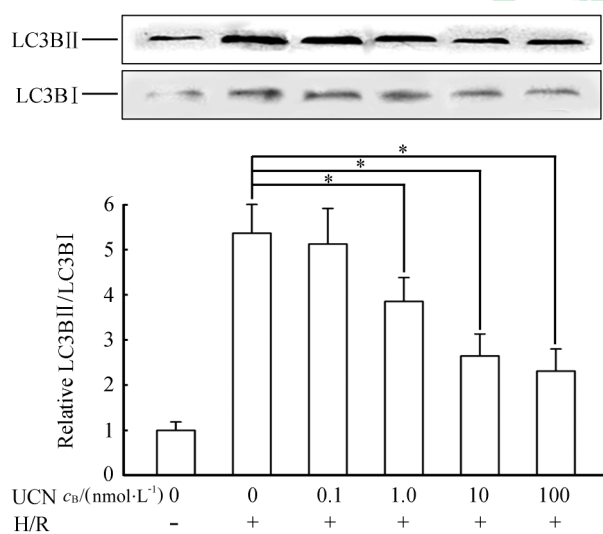


图 4 UCN 抑制缺氧复氧诱导的心肌细胞自噬

Fig 4 UCN inhibited H/R-induced myocardium autophagy

UCN; Urocortin; H/R; Hypoxia/reoxygenation. UCN (0, 0.1, 1.0, 10, and 100 nmol/L) was given 1 h before H/R. The extent of autophagy was analyzed by the ratio of LC3B II /LC3B I in myocardium. \*  $P < 0.05$ .  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$

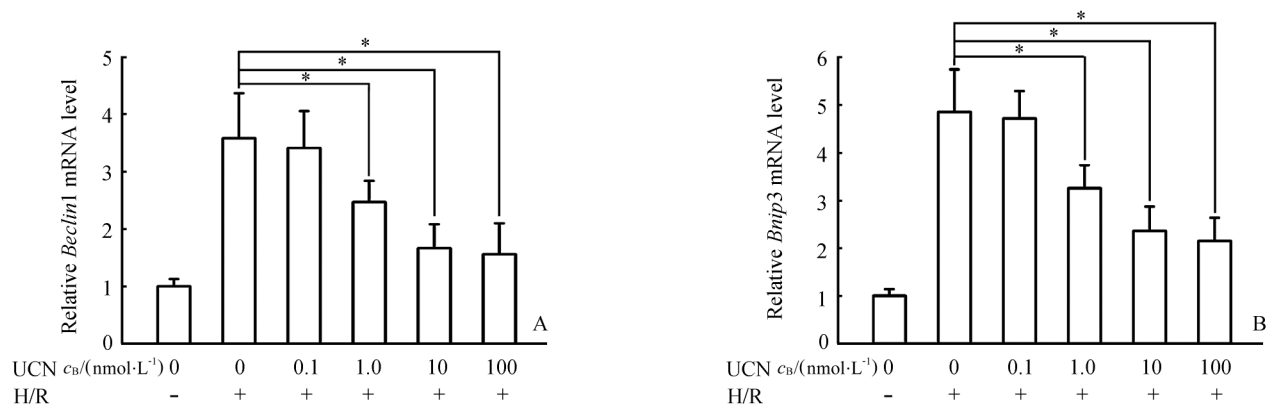
### 3 讨论

关于 UCN 抗缺血再灌注损伤的机制,以往研究主要关注于抑制坏死和凋亡,而对自噬的影响鲜有报道。自噬是细胞死亡的一种重要机制<sup>[14]</sup>。心脏缺血再灌注造成的营养物质匮乏、氧化应激等损伤可以诱发细胞过度的自噬,进而导致细胞死亡,并且自噬本身还可能对细胞的坏死和凋亡具有促进作

用<sup>[17]</sup>。我们在本研究中主要发现,UCN 预处理可以显著降低缺血再灌注损伤导致的心肌损害,并抑制缺血再灌注损伤导致的心肌细胞自噬。我们的研究阐述了 UCN 可能通过抑制自噬,进而抑制心肌缺血再灌注损伤。然而,我们的结果仅仅提示一种可能性,关于 UCN 抑制自噬和抗缺血再灌注损伤的直接联系还有待进一步研究。

Matsui 等<sup>[20]</sup>研究发现心肌在缺血再灌注发生以后,活性氧(ROS)大量生成,进而诱导 *Beclin1* 表达增加,而 *Beclin1* 在自噬体形成的过程中起了关键的作用。我们在研究中发现,与 UCN 抑制心肌细胞自噬现象相伴随的是,UCN 抑制心肌自噬相关基因 *Beclin1* mRNA 表达,由此可能阻断 ROS 引发的过度自噬发生。不仅如此,我们还发现 UCN 还可以抑制 *Bnip3* mRNA 表达,而 *Bnip3* 也是介导再灌注期间自噬增强的重要途径<sup>[21]</sup>。因此,我们推测,UCN 可能通过多条途径阻断缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬,进而实现心肌保护作用。

目前认为,UCN 的心肌保护作用是通过与心肌细胞膜的 CRHR2 结合而实现的<sup>[5]</sup>。CRHR2 是一种 G 蛋白偶联受体,UCN 与 CRHR2 结合后可以激活受体后的 PI3K-Akt、p42/44 MAPK 等信号通路,发挥抗缺血再灌注损伤作用<sup>[23-25]</sup>。UCN 对缺血再灌注损伤的抑制作用以及对自噬相关基因 *Beclin1* 和 *Bnip3* mRNA 的抑制作用是否也有 PI3K-Akt、p42/44 MAPK 等信号通路的参与还有待进一步研究。

图5 UCN抑制缺氧复氧诱导的*Beclin1*和*Bnip3* mRNA表达Fig 5 UCN inhibited H/R-induced *Beclin1* and *Bnip3* mRNA expression in myocardium

UCN: Urocortin; H/R: Hypoxia/reoxygenation. UCN (0, 0.1, 1.0, 10, and 100 nmol/L) was given 1 h before H/R. *Beclin1* (A) and *Bnip3* (B) mRNA expression was analyzed by real-time PCR. \*  $P < 0.05$ .  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$

对于自噬来说,一个非常有趣的现象是自噬对细胞的存活和死亡具有双重作用。研究发现心脏在缺血期间自噬是增强的,此时增强的自噬对心脏有保护作用;再灌注期间自噬会进一步增强,但过度增强的自噬会导致细胞损伤、死亡<sup>[18-19]</sup>。我们在本实验中只关注了UCN对再灌注诱导的自噬的影响,而UCN对单纯缺血诱导的自噬具有怎样的作用是我们今后需要关注的问题。

我们在本研究中主要发现了UCN能抑制缺血再灌注诱导的细胞自噬,并抑制自噬相关基因*Beclin1*和*Bnip3* mRNA的表达,上述作用可能在UCN抗缺血再灌注损伤中具有重要意义。然而,UCN抑制缺血再灌注诱导的细胞自噬具体的分子机制还有待进一步阐明。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] WRITING GROUP MEMBERS; Lloyd-Jones D, Adams R J, Brown T M, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics; 2010 update; a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2010, 121: e46-e215.

[2] Klatte K, Chaitman B R, Theroux P, Gavard J A, Stocke K, Boyce S, et al. Increased mortality after coronary artery bypass graft surgery is associated with increased levels of postoperative creatine kinase-myocardial band isoenzyme release; results from the GUARDIAN trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38: 1070-1077.

[3] Weman S M, Karhunen P J, Penttil A, Järvinen A A, Salminen U S. Reperfusion injury associated with one-fourth of deaths after coronary artery bypass grafting [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70: 807-812.

[4] Moore G W, Hutchins G M. Coronary artery bypass grafts in 109 autopsied patients. Statistical analysis of graft and anastomosis patency and regional myocardial injury [J]. *JAMA*, 1981, 246: 1785-1789.

[5] Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin M H, Lewis K, Sutton S, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor [J]. *Nature*, 1995, 378: 287-292.

[6] Brar B K, Stephanou A, Okosi A, Lawrence K M, Knight R A, Marber M S, et al. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 158(1-2): 55-63.

[7] Knight R A, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, McCauley R B, Di Rezze J, Scarabelli G M, et al. Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582: 984-990.

[8] Calderón-Sánchez E M, Ruiz-Hurtado G, Smani T, Delgado C, Benitah J P, Gómez A M, et al. Cardioprotective action of urocortin in postconditioning involves recovery of intracellular calcium handling [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50: 84-90.

[9] Barry S P, Lawrence K M, McCormick J, Soond S M, Hubank M, Eaton S, et al. New targets of urocortin-mediated cardioprotection [J]. *J Mol Endocrinol*, 2010, 45: 69-85.

[10] Townsend P A, Davidson S M, Clarke S J, Khaliulin I,

- Carroll C J, Scarabelli T M, et al. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293: H928-H938.
- [11] Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, Barry S P, et al. Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 325(1-2):1-7.
- [12] Davis M E, Pemberton C J, Yandle T G, Fisher S F, Lainchbury J G, Frampton C M, et al. Urocortin 2 infusion in healthy humans; hemodynamic, neurohormonal, and renal responses[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49: 461-471.
- [13] Davis M E, Pemberton C J, Yandle T G, Fisher S F, Lainchbury J G, Frampton C M, et al. Urocortin 2 infusion in human heart failure[J]. *Eur Heart J*, 2007, 28: 2589-2597.
- [14] Mughal W, Dhingra R, Kirshenbaum L A. Striking a balance: autophagy, apoptosis, and necrosis in a normal and failing heart[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14: 540-547.
- [15] Ma X, Liu H, Foyil S R, Godar R J, Weinheimer C J, Hill J A, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury[J]. *Circulation*, 2012, 125: 3170-3181.
- [16] Dimitrakis P, Romay-Ogando M I, Timolati F, Suter T M, Zuppinger C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 350: 361-372.
- [17] Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2):1528-1534.
- [18] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Autophagy in ischemic heart disease[J]. *Circ Res*, 2009, 104: 150-158.
- [19] Nishida K, Kyo S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 31-38.
- [20] Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, 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 [J]. *Circ Res*, 2007, 100: 914-922.
- [21] Hamacher-Brady A, Brady N R, Logue S E, Sayem M R, Jinno M, Kirshenbaum L A, et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 146-157.
- [22] Jeanes H L, Tabor C, Black D, Ederveen A, Gray G A. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER) $\alpha$  agonist and unaffected by an ER $\beta$  antagonist [J]. *J Endocrinol*, 2008, 197: 493-501.
- [23] Brar B K, Jonassen A K, Egorina E M, Chen A, Negro A, Perrin M H, et al. Urocortin- II and urocortin- III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury; an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart[J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 24-35.
- [24] Brar B K, Jonassen A K, Stephanou A, Santilli G, Railson J, Knight R A, et al. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 8508-8514.
- [25] Brar B K, Stephanou A, Knight R, Latchman D S. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34: 483-492.

[本文编辑] 孙 岩