

磷酸二酯酶在心脏环磷酸鸟苷 信号转导通路调控中的作用

付德明

山西医科大学附属太原中心医院/太原市中心医院心血管内科, 山西 太原 030009

磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs)是一个庞大而复杂的超家族,由水解环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)或环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的11种各具特性的同工酶组成,每种同工酶在细胞内的分布、表达、调节功能以及对抑制剂的敏感性不同。两种环核苷酸由相应的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)或鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)在细胞内产生,并被不同的PDEs超家族同工酶分解代谢。cAMP和cGMP的合成和分解会因生理和病理性应激发生改变,对于维持心脏功能具有重要的稳态作用,但在病理状态下也会导致心力衰竭。 β -肾上腺素受体(β -adrenergic receptor, β -AR)激动剂、有机硝酸盐或一氧化氮供体、可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanosine cyclase, sGC)激动剂或利钠肽(natriuretic peptides, NPs)均可触发心脏的环核苷酸信号通路^[1]。

尽管只有cAMP和cGMP两种环核苷酸,但目前已发现至少100种PDEs亚型异构体。这些异构体的差异主要在于N末端的调控结构域不同,以控制细胞内定位和细胞调节,并赋予催化结构域的底物特异性。到目前为止,心脏有7种PDEs同工酶表达。其中PDE1、2和3是cAMP和cGMP双底物酯酶,PDE4和PDE8选择性作用于cAMP,PDE5和PDE9则选择性作用于cGMP。每种同工酶都在心肌细胞表达,有些也在成纤维细胞、血管平滑肌细胞和某些情况下的内皮细胞表达。PDEs的许多同工酶可导致患病心脏的环核苷酸功能失调,因此成为潜在的治疗靶点^[2-3]。

1 PDE1:从cGMP到cAMP的心脏区域化调控

PDE1由Ca²⁺/钙调蛋白(calmodulin, CaM)激活,是一种cAMP/cGMP双底物酯酶,主要表达为1A、1B、1C三种亚型。其中,1A和1C在心脏表达。PDE1A对

cGMP更具选择性,而PDE1C对cAMP/cGMP有相同的亲和力。PDE1A是小鼠和大鼠心脏主要表达的亚型,而PDE1C在人类、犬和兔子等大型哺乳动物心脏占主导地位^[4]。PDE1在N-末端包含两个Ca²⁺/CaM结合位点和Ser120磷酸化位点,Ser120可被PDE1A的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和PDE1B的钙-钙调蛋白依赖性激酶II(calcium calmodulin-dependent kinase II, CaMK II)修饰,以抑制对Ca²⁺/CaM的敏感性,从而抑制PDE1的过度激活。PDE1A和1C在啮齿类动物的肥厚心脏和人类的衰竭心脏中表达上调。在小鼠,抑制PDE1可通过激活cGMP激酶-1 α (cGMP kinase 1 α , cGK-1 α , PKG-1 α)抑制 β -AR刺激导致的心肌肥厚。PDE1A在啮齿类动物心肌梗死后的成纤维细胞中表达上调,且通过抑制PDE1可阻断促纤维化基因表达。抗纤维化效应主要涉及cGMP和cAMP的信号转导。

PDE1C是大型哺乳动物心脏主要表达的亚型。尽管PDE1C在正常心脏的基础表达水平很低,但敲除PDE1C基因的心肌细胞可免受细胞毒性应激诱导的细胞凋亡,且在压力超负荷的心脏中较少表现出病理性肥厚、心肌纤维化、细胞凋亡和收缩功能障碍,从而发挥保护效应。研究发现这种保护效应与激活cGMP信号通路无关,而是与激活cAMP-PKA信号通路有关^[5]。

近期研究发现了PDE1C在调控cAMP相关信号通路中的关键作用。研究揭示了PDE1C-cAMP依赖性通路在抑制应激诱导的心肌细胞凋亡中的关键机制,发现了与腺苷A_{2A}受体(adenosine A_{2A} receptor, A_{2A}R)耦联的cAMP调控,以及通过瞬时受体电位阳离子通道3(transient receptor potential canonical type 3, TRPC3)引起Ca²⁺内流对PDE1C的激活^[6],并发现了一种连接PDE1C、TRPC3和A_{2A}R的新型蛋白复合物,还发现了通过抑制PDE1C调控腺苷介导的抗凋亡效应,进而发挥细胞保护作用的信号通路。

有研究探讨了抑制PDE1所有亚型对心血管的病理生理影响^[4],发现在犬和兔子以及人类心脏,PDE1C的表达远超PDE1A,而在小鼠和大鼠心脏,PDE1A的表达远超PDE1C。在正常清醒的犬体内使用选择性PDE1

doi: 10.16439/j.issn.1673-7245.2024-0297

基金项目: 山西省自然科学基金基础研究项目(20210302123088); 太原市区域医疗中心科技创新项目(202229)

通信作者: 付德明, E-mail: fdm_ap@126.com

抑制剂 ITI-214 抑制 PDE1 表达可导致心脏正性变力、变时,舒张增强以及血管扩张效应;当犬的心脏在超速起搏 3~4 周诱发心力衰竭后,除心率变化外,还观察到心脏正性肌力、舒张增强和血管扩张变化。随后研究探讨了 ITI-214 抑制 PDE1 对收缩性心力衰竭患者急性血流动力学的影响,证实 ITI-214 在临床具有正性肌力和血管扩张作用,并且耐受性良好,无严重不良事件^[7]。抑制 PDE1 并不能增强多巴酚丁胺激动 β_1 -AR 所产生的正性变力作用,其作用也不能通过 β -AR 阻滞剂所阻断。然而,ITI-214 的心脏和全身动脉扩张效应可被腺苷 A2B 受体(adenosine A2B receptor, A2BR)抑制剂所阻断。

这些研究将心脏中 PDE1 的区域化调控从 cGMP 转向 cAMP 信号通路,而 cAMP 信号转导与 A2AR 而非 β -AR 耦联。A2AR 激动对缺血性心肌损伤具有保护作用,通常是通过抑制 PDE1 发挥作用。此外,正性变力和舒张增强作用可能与 β -AR-cAMP 信号通路耦联不同,激动 A2AR 的安全性和毒性可能与 PDE3 抑制剂不同^[8]。一项 I a~II b 期临床试验(Clinicaltrials.gov: NCT03387215)于 2018 年启动,研究单剂量 PDE1 抑制剂 ITI-214 对扩张型心肌病所致心力衰竭患者的安全性和血流动力学效应,目前研究仍在进行中。

2 PDE2: 区域化信号转导的交互及可替代作用

PDE2 也是一种双底物酯酶,以相似的速率水解 cAMP 和 cGMP。单个 *PDE2A* 基因可产生三种亚型: 2A1、2A2 和 2A3,分别定位在胞质溶胶、细胞膜和线粒体亚细胞结构域。PDE2A 主要通过 cGMP 与 N 末端 GAF 结构域结合发生变构激活,从而将 cAMP 的催化活性提高 10~30 倍。由于 GAF 结构域对 cAMP 的亲合力较低,通常不会发生 cAMP 介导的 cGMP 水解的反向激活^[9]。由此可见,PDE2 可能与 cGMP/cAMP 之间的交互作用有一定关系。

研究发现,PDE2 对心肌细胞的调节因实验条件不同而异。在成年心肌细胞,抑制质膜 PDE2 可增强与利钠肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)耦联的 GC-A 表达或由一氧化氮激活 GC-1 产生 cGMP。通过激活成年心肌细胞纳米结构域受体,研究揭示了 PDE2 在心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)激活 NPR1 产生 cGMP 区域化信号转导中的作用机制^[10]。使用 cGMP 荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)传感器靶向作用于 NPR1 所在的富含小窝蛋白的纳米结构域,进一步证实了这一局部区域化调控作用。虽然 ANP 激活 NPR1 不会改变钙循环调节蛋白(calcium cycling regulating protein, CCRP)与受磷蛋白(phospholamban, PLN)的磷酸化,但如果同时

抑制 PDE2,则会改变 CCRP 与 PLN 表达^[11]。在肺血管平滑肌中发现,通过抑制 PDE2 可增强 cGMP 和 cAMP 信号转导,进而改善肺动脉高压,也证实了 PDE2 与 NPs 耦联,而不是与一氧化氮依赖性信号通路耦联^[12]。

PDE2 可水解由一氧化氮激活 GC-1 产生的 cGMP。在新生乳鼠心肌细胞,激动 β_3 -AR 通过活化一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)产生一氧化氮,随后激活 GC-1 生成 cGMP,进而与调节性 GAF 结构域结合激活 PDE2,由此增强 PDE2 对 cAMP 的水解,从而对抗儿茶酚胺刺激引起的收缩效应。抑制 PDE2 还增强了前列腺素 I₂ 诱导产生的 cAMP 介导的血管扩张,进而支持 cAMP 水解在血管组织中的作用。另一项研究发现,在分离的新生乳鼠心肌细胞,应用一氧化氮供体而不是 NPR1 激动剂[ANP 或脑利尿钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)]共同刺激 cGMP 时,抑制 PDE2 可对抗血管紧张素 II 刺激所引起的心肌细胞肥大^[13]。此外,在成纤维细胞,过表达 PDE2 不会改变 NPs 激动剂刺激 NPR1 产生的 cGMP,但对一氧化氮激活可产生轻微影响^[14]。

研究发现,PDE2 也可水解 cAMP,从而调控 β -AR 激动的信号通路。此外,PDE2 通过 cAMP 依赖性调节可抑制心肌细胞肥大、心肌纤维化和线粒体损伤。 β_1 -AR 激动的主要效应是 cAMP 激活的 PKA-I,当持续激动时可诱导心肌细胞肥大。相反,PKA-II 通过磷酸化活化 T 细胞核因子,可阻断其核转位介导的心肌细胞肥大^[15]。由此可见,PKA-II 可发挥抗心肌肥厚效应。进一步研究表明,抑制 PDE2 的作用是通过增强 cAMP-PKA-II 信号通路实现的^[14]。在成纤维细胞,无论是否存在 PKA-I 和 PKA-II 共同刺激,过表达 PDE2 可降低 cAMP 水平,并可诱导成纤维细胞表型活化。这种转变可被 cGMP 通过一氧化氮或 NPs 协同刺激所抵消,表明在这种情况下,上调 PDE2 可能通过优先水解 cAMP 实现。在小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)和原代新生大鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVM),抑制 PDE2A2 可影响线粒体的延伸和融合,通过增加线粒体跨膜电位,对抗促凋亡刺激。这些变化主要通过线粒体动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, DRP1)磷酸化介导的 cAMP-PKA 依赖性信号通路实现^[16]。

近期在小型啮齿类动物心肌细胞揭示了调节 PDE2 引起的各种病理生理改变^[13]。在动物模型和人类衰竭心脏,PDE2 在患病心肌细胞的表达上调^[17]。虽然这种改变在心脏疾病中发挥重要的病理生理作用,但是对于抑制或激活 PDE2 能否带来治疗获益尚存争议,可能取决于不同的心脏疾病。在压力超负荷诱导心肌肥大的动物模型,抑制 PDE2 可减少心肌肥

大和纤维化,并可改善心功能^[13]。相关机制也有争议:一些研究认为抑制 PDE2 与增强 cAMP-PKA II 信号通路相关^[15],另一些研究则认为与 cGMP 水解减少导致 PKG 激活产生抗心肌肥大的信号通路有关。还有研究表明心脏过表达 PDE2 可发挥抗心律失常作用,可能是由于 PDE2 阻止了 β -AR 激动诱导的 L 型钙电流增加^[18]。另有研究发现, C 型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)可能促进 PDE2 介导的 cAMP 和 cGMP 信号通路之间的负向交互性调控,从而发挥抗心律失常的有益作用^[19],表明 CNP-PDE2 是未来抗心律失常策略的一个新的作用靶点。

与细胞研究结果相似,在体内抑制 PDE2 所产生的病理生理效应也因研究条件不同而异。在肺动脉高压和右心室肥大动物模型,尽管 PDE2 可抑制 NOS 表达,但靶向敲除 *NPR1* 基因仍可消除抑制 PDE2 而减少右心室肥大效应^[12]。相反,在降主动脉缩窄所致左心室肥大小鼠,抑制 PDE2 可减少左心室肥大,而不依赖于 GC-A(GC 与 *NPR1* 耦联)表达,但在缺乏一氧化氮激动 GC-1 α 的小鼠,未能显示出减少左心室肥大的效应^[13]。与压力应激性心脏肥大的动物模型不同,在儿茶酚胺过度刺激或心肌梗死引起的心力衰竭, PDE2 主要通过抑制 β -AR 激动而发挥保护作用^[20]。这些研究结果表明,上调 PDE2 可抑制 β -AR 失敏,并可限制儿茶酚胺过度激活导致的细胞损伤,从而进一步激活 PDEs。在过表达 PDE2A 的小鼠,静息心率降低,儿茶酚胺刺激引起的心律失常减少,心功能改善^[20]。相反,通过慢性抑制 PDE2 可以恢复心力衰竭时下调的 β -AR 信号通路,但这种改变尚未在急性抑制 PDE2 的研究中发现^[21]。PDE2A 可作为心力衰竭时交感神经过度激活所致 β -AR 信号通路失敏的治疗靶点^[22]。

由此可见,近期关于调控 PDE2 介导的心脏效应及其治疗心脏疾病的研究,揭示了环核苷酸的底物来源和选择性,以及抑制或激活 PDEs 是否发挥保护效应的复杂性,表明 PDE2 在体内的作用在很大程度上取决于环境条件,可能会改变 cGMP 与 cAMP 之间的相对平衡以及各自信号区域化通路的交互调控作用。虽然这些因素在动物模型更易受到控制,但动物实验结果也有很大差异,从而引起人们对于 PDE2 改变引发心脏疾病的担忧。由于人类疾病的病理生理改变很复杂,因此很难预测调控 PDE2 所带来的治疗效应。

3 PDE3: 用于临床治疗的亚型异构体区域化信号转导

PDE3 是另一种调控心脏的双底物酯酶,对 cAMP 与 cGMP 均有水解作用,但对 cAMP 的水解约为 cGMP 的 10 倍,在包括人类的大型哺乳动物心脏中发挥主要的调节作用。通过催化位点的竞争性结合, cAMP 的水解可被 cGMP 所抑制,在低水平 cGMP 下可产生 cGMP

依赖的收缩性增强效应。PDE3 由 *PDE3a* 和 *3b* 两个基因转录而成,分别定位于染色体 11 和 12。其中 PDE3A 又可进一步分为 3A1、3A2 和 3A3 三种亚型异构体,这些异构体因可供选择的转录和翻译起始位点而异;而 PDE3B 仅以一种异构体形式存在。所有亚型在 N 末端不同,其中 PDE3A1 和 3B 存在介导脂质膜插入的疏水环,以及促进蛋白质-蛋白质相互作用的磷酸化位点,后者对于确定同种亚型的细胞内定位非常重要。特别是 PDE3A 已被发现可与磷脂酰肌醇-3-激酶- γ (phosphatidylinositol 3-kinase gamma, PI3K γ) 和肌浆网钙-ATP 酶 2(sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2, SERCA2) 形成复合体,主要定位于心肌细胞的肌浆网;而 PDE3B 则主要定位于心肌细胞的 T 小管膜^[23]。

鉴于 PDE3 可水解 cAMP,最初研究主要集中在 PDE3 对心脏功能的调控,结果显示抑制 PDE3 可增强心脏收缩性,增加心输出量,减轻心脏负荷,降低心肌耗氧量,同时引起血管扩张,这些药理学特性可用于治疗心室收缩功能下降的心力衰竭。20 世纪 80 年代,急性血流动力学研究证实 PDE3 抑制剂可有效改善心力衰竭的血流动力学,氨力农、米力农等 PDE3 抑制剂被临床用于治疗急性失代偿性心力衰竭(acute decompensated heart failure, ADHF)。然而,早期的乐观情绪被一项慢性抑制 PDE3 的临床研究所打破。1991 年,米力农生存率前瞻性随机评估试验(prospective randomized milrinone survival evaluation trial, PROMISE)结果显示,口服米力农治疗不仅与更频繁的住院、更多的低血压和晕厥发作有关,而且使心力衰竭患者死亡率增加 28%,心血管疾病死亡风险增加 34%^[24]。随后静脉注射米力农治疗慢性心力衰竭恶化的前瞻性临床试验(outcomes of a prospective trial of intravenous milrinone for exacerbations of chronic heart failure, OPTIME-CHF)结果显示,米力农对死亡率或再入院终点均无益处^[25]。随机接受米力农治疗的心力衰竭患者出现与负荷剂量相关的低血压和新发房性心律失常(心房颤动),缺血性心脏病患者使用米力农的住院死亡率明显增高,相比之下,非缺血性心脏病患者在主要终点(60 d 内因心血管原因住院的天数)以及死亡或再住院方面有所改善,提示 PDE3 抑制剂对于 ADHF 不同病因的双相影响。由此可见,在两项具有里程碑意义的研究中, PDE3 抑制剂均未能能为 ADHF 患者提供额外的临床获益。究其原因可能由于目前的 PDE3 抑制剂不具有选择性,而是抑制 PDE3 所有亚型,从而引起细胞内 cAMP 过度升高。心力衰竭时心脏代偿机制可通过激活 AC 导致心肌细胞 cAMP 升高,而 PDE3 抑制剂则进一步升高 cAMP,持续刺激使得心肌细胞发生失代偿,导致细胞钙超载进而引起心肌损伤,同时发生与能量供需失调相关的致命性心律失常。

在心力衰竭患者,抑制 PDE3 通过增强 cAMP 具有潜在的心脏毒性作用,但是可通过 β -AR 阻滞剂而减轻。一项在约 2 000 例心力衰竭患者中进行的新型 PDE3 抑制剂依诺西酮的多中心国际临床试验结果显示,依诺西酮对心力衰竭的生存率或其他临床结果没有不良影响,但也没有显著获益^[26]。临床获益的缺乏可能是由于 *Pde3a* 启动子区域插入/缺失 29nt 的基因多态性所致^[27]。转录因子 ATF3 通常与启动子插入位点结合以抑制 cAMP 反应元件的活性,从而导致 PDE3A1 的转录不会以反馈形式被 cAMP 上调。在缺失该结合位点基因多态性的心力衰竭患者中,cAMP 反应元件激活可进一步增强 *PDE3A1* mRNA 表达^[27]。由于抑制 PDE3 可增加细胞 cAMP 水平,因此 PDE3 基因多态性的缺失可能通过增强 PDE3A 的表达而抵消这一效应。由此为心力衰竭患者随着时间推移对 PDE3 抑制剂产生耐受性提供了遗传学基础。

短期口服 PDE3 抑制剂可增加心输出量的储备能力,用于终末期心力衰竭患者等待心脏移植的桥接治疗,但该疗法目前仍处于探索性研究。有研究开发了一种米力农新型缓释剂型(CRD-102)用于治疗终末期心力衰竭,并取得一些良好的临床结果^[28]。这种制剂是否能最终改变米力农治疗心力衰竭的有效性和安全性,进而引发心力衰竭治疗的变革,有待进一步研究。

抑制 PDE3 的另一种方法是通过在催化位点与 cGMP 竞争结合以阻止 cAMP 的水解。当低水平 cGMP 与 cAMP 的催化位点发生竞争性结合进而增强心脏收缩时,就会发生这种情况。在肾上腺素能刺激或同时抑制 PDE3 的情况下,PDE3 主要水解 cAMP,而 cGMP 的变化主要通过激活 PDE2 减少 cAMP 以拮抗 cAMP 激活介导的心肌收缩效应。由此可见,在 PDE2 和 PDE3 间存在交互作用,可调控心肌 cGMP/cAMP 变化。血管平滑肌(vascular smooth muscle, VSM)研究表明,一氧化氮-GC-1 信号转导可增强 PDE3A 表达,因为这些细胞 *GC-1* 基因缺失可降低主动脉 PDE 表达和活性^[29]。在缺乏 GC-1 产生 cGMP 时,可能有助于调节 PDE 稳态情况,以维持 cAMP 水平。目前尚不清楚这种调控作用是否有利于心脏疾病的治疗。这种交互调节需要在胞内纳米结构域进行 cGMP 和 cAMP 的协同信号转导。这可能解释了为什么 ANP 或 BNP 激动 NPR1 对抑制或增强 β -AR 耦联的信号转导缺乏影响,而 CNP 激动 NPR2 则可通过抑制 PDE3 增强 cAMP 信号转导,从而改善正常和衰竭心脏的收缩力^[30]。

提高抑制 PDE3 安全性和有效性的方法是开发亚型选择性 PDE3 抑制剂。有学者研究了 *PDE3A* 或 *PDE3B* 基因缺失型小鼠,采用主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)诱导压力超负荷导致的心力衰竭,并给予 PDE3 抑制剂米力农,结果发现米力农治疗

的 TAC 野生型(wild-type, WT)小鼠,较少表现为适应不良的心室重构,*PDE3A*^{-/-}小鼠也表现出类似的保护作用,但是米力农干预并没有带来额外的获益^[31]。另有研究表明 *PDE3A* 基因突变可保护心脏免受高血压引起的损伤^[32]。相比之下,*PDE3B*^{-/-}小鼠对 TAC 的反应与 WT 小鼠相似,表明 PDE3A 在 TAC 导致心力衰竭模型的选择性作用。然而,*PDE3B* 基因缺失对心肌缺血-再灌注损伤具有保护作用,其机制与 cAMP-PKA 诱导的线粒体保护作用相关^[23]。

由于 PDE3 各亚型异构体之间的催化位点相同,现有的小分子抑制剂对它们具有等效性。然而,被各亚型调控的局部 cAMP,细胞内定位和蛋白质配对的差异为其提供了在心脏疾病中的治疗潜力^[23]。PDE3A 与 A 激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring protein 18, AKAP18)、PLN、SERCA2 都是肌浆网多蛋白复合物的组成部分。当 PKA 被 cAMP 激活时,PKA 磷酸化 PLN 并促进其从复合物解离,进而导致 SERCA2 的活性增加。抑制 PDE3 能够增强 PLN 磷酸化并激活 SERCA2 的活性。PDE3A1 本身可被 PKA 磷酸化,并促进其与 SERCA2 复合物的交互作用。如果这种交互作用被破坏,PLN 和 SERCA2 可选择性升高 cAMP,引起心肌收缩力增强,同时也可避免抑制 PDE3 产生的毒性作用。近期通过蛋白质组学研究发现 PDE3A2 是心肌细胞肥大的调节因子^[33]。在血管内皮细胞,研究了 PDE3B 与 cAMP 激活的交换蛋白 1(exchange protein directly activated by cAMP 1, EPAC1)和 p84 调节的 PI3K γ 复合物的干扰作用。实验中引入了一种小分子肽以干扰 PDE3B 调节的 EPAC1,可通过增加 cAMP 与 EPAC1 结合以促进 PI3K γ 信号转导^[34]。这种小分子肽干扰物能否发展为一种可行的心脏治疗药物还有待研究,但是早期的实验结果提示有望成功。

4 PDE5:心脏 cGMP 的区域化信号转导和调控

PDE5 可以特异性水解 cGMP,只有 1 种亚型 PDE5A,由于起始密码子不同,PDE5A 又可分为 5A1、5A2 和 5A3,全部存在于人类和小鼠,并在 N 末端发生变化。尽管不同亚型存在器官特异的差异性表达,但是它们在体外的生化功能相似,并且存在亚细胞定位的不同^[35]。PDE5A 调节 cGMP 的催化活性是通过 cGMP 与 GAF 调节结构域结合,以及通过 PKG 磷酸化人类丝氨酸 S102(小鼠丝氨酸 S92)发生激活。在心肌细胞,PDE5A 与肌动蛋白结合蛋白 Z 盘状蛋白共定位。与 NPs(GC-A 或 GC-B)信号通路相比,这种定位通常有利于一氧化氮-GC-1 α 信号通路产生的 cGMP 水解。然而,通过成年犬和小鼠心肌细胞研究发现,在心脏肥大和心力衰竭动物模型,如果 NOS3 发生遗传性缺失或受到药理学抑制,PDE5A 可能会发生胞质的定位改变^[36]。在慢

性抑制 NOS 的心脏, 可通过直接激活 GC-1 α 生成 cGMP, 其 Z 盘定位也会恢复。对于心脏疾病状态, 尚不清楚细胞内 PDE5A 发生定位改变的确切机制。

PDE5A 抑制剂被广泛用于诱导 VSM 松弛, 最显著的是在阴茎海绵体和肺 VSM。在过去 20 多年, 研究了在心脏疾病状态, PDE5A 抑制剂对心脏结构和功能病理改变的影响。研究揭示 PDE5 抑制剂西地那非在激活心脏 cGMP-PKG 后, 可发生病理性应激介导的蛋白调控^[37]。在这些蛋白质中, 一种是 G 蛋白信号转导的调节因子(RGS2 和 RGS4), 通过增强 GTP 从活化 G α 亚基分解, 进而抑制 Gq 蛋白耦联受体的信号通路激活, 另一种是瞬时受体电位阳离子通道 6(transient receptor potential canonical type 6, TRPC6), 是一种非选择性非电压门控阳离子通道, 主要传导钙离子并激活与钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)/活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)耦联的促纤维化和促肥大信号通路, PKG 磷酸化则可抑制 TRPC6 通道激活^[38]。西地那非还可通过增强泛素-蛋白酶体系统对错误折叠蛋白质(如突变的 ab 晶体蛋白)的清除来阻止其在细胞的不断积累。PDE5A 抑制剂还可减少缺血-再灌注动物的心肌梗死面积和心肌细胞凋亡, 通过靶向作用于线粒体结构和功能可改善与阿霉素相关的心脏毒性, 并可减少 Zucker 糖尿病肥胖大鼠的心脏代谢疾病^[39]。这些作用的确切机制(如靶向抑制哪些确切的蛋白质和氨基酸残基)尚未确定, 而 PKG 对代谢和线粒体功能的调节, 目前仍在研究中。

2019 年, PDE5A 首次被证明是通过结节性硬化症蛋白复合物 2(tuberous sclerosis complex 2, TSC2)诱导 cGK-1 α 依赖性磷酸化以抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)的作用靶点而发挥抑制作用的^[40]。这种作用主要发生在相邻丝氨酸中的一个或两个(人类中 S1364、S1365), 可进一步激活 TSC2, 进而通过 Rheb 依赖性途径抑制 mTORC1 的信号转导。这项研究是迄今为止首次使用基因敲入(knock-in, KI)技术在体内突变 cGK-1 α 的特定氨基酸残基靶标, 并研究了对抑制 PDE5 的影响。出乎意料的是, 在丝氨酸-丙氨酸取代的 TSC2 纯合 KI 小鼠(S1365 小鼠, 对应于人类 S1364), 当心脏暴露于压力超负荷时, 未能表现出对抑制 PDE5 的反应, 最终导致心肌细胞显著肥大和心脏功能障碍。表达相同突变杂合子的小鼠对压力超负荷也表现出类似的恶化效应。除了通过 PDE5 调节的 cGK-1 α 信号转导对病理性心肌细胞生长和功能障碍的调控外, 研究还揭示了 PDE5 对 mTORC1 调节相关细胞自噬的影响。西地那非以 cGK-1 α 依赖的方式诱导心肌细胞自噬, 并在 S1364 与 TSC2 磷酸化耦联。

尽管大量研究揭示了通过调节(包括过表达和抑制)PDE5A 对心脏分子、细胞和器官的影响, 但是关于 PDE5A 是否在心肌细胞表达, 以及表达水平是否足以观察到变化, 尚存争议。目前已有研究报道, PDE5A 在小鼠、犬和人类的心肌细胞表达, 特别是在心脏肥大和扩张型心肌病的人类心脏表达^[41]。PDE5A 通过一氧化氮信号通路对 cGMP 的调节取决于通路被激活的程度, 并且 cGMP 的减少可取消抑制 PDE5A 对心脏的改善作用。PDE5A 对心脏疾病的调节作用还需足够的应激存在, 以及相应的 PKG 靶向蛋白的参与。在轻度压力超负荷诱导心肌疾病的情况下, 抑制 PDE5A 带来的影响最小, 但随着 PKG 信号通路的激活, 可对严重心脏疾病的进展产生改善作用。

在西地那非治疗射血分数保留的心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)的临床试验中, 只有少数受试者患有心脏肥大, 总体血压略高于正常值^[42]。与射血分数减低的心力衰竭(heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF)不同, 目前尚无确切数据支持 PDE5A 在 HFpEF 的心脏表达上调。因此, 抑制 PDE5A 在 HFpEF 的治疗中缺乏疗效, 可能是由于 PDE5A 在 HFpEF 的心脏中没有发生表达上调。在 HFpEF 和 HFrEF, 常见的氧化应激可能影响 PDE5A 抑制剂的治疗效果。NOS 和 cGC-1 氧化可导致 cGMP 生成减少, 并且 cGK-1 α 在 C42 残基氧化后, 在同源二聚体之间的 N 末端形成二硫键, 从而降低 PDE5A 抑制剂对心力衰竭的改善作用。这可能与氧化的和 C42S 突变不被氧化的 cGK-1 α 在细胞内的定位发生变化有关, 并有利于 cGK-1 α 在成人心肌细胞的质膜分布。总之, 这些氧化还原反应损害了 PDE5A 抑制剂在患病心脏的治疗作用。相反, 表达 C42S 突变体 cGK-1 α 的小鼠心肌细胞未能显示出 cGK-1 α 激活增强和 PDE5A 抑制所产生的有益作用, 而直接刺激 cGK-1 α 通常是有益的, 并与其氧化状态无关^[43]。在这种情况下, 氧化应激对西地那非的疗效可能发挥积极作用。该机制似乎与 PKG-1 α 在细胞内的定位改变有关, 因为氧化应激是西地那非与 PDE5A 调节的 cGMP 进行最佳结合所必需的。

PDE5A 抑制剂治疗心脏疾病的临床研究目前仍在进行中。一项随机对照临床试验的荟萃分析(13 项研究 555 例患者)显示, PDE5A 抑制剂对于 HFrEF 患者的临床疗效、生活质量、运动能力和心肺血流动力学有显著改善作用^[44], 但是大多数试验来自单中心临床研究。一项关于 PDE5 抑制剂对 HFpEF 患者运动能力和临床状态影响的临床随机对照试验结果显示, PDE5A 抑制剂在 HFpEF 患者中没有获益^[42]。2022 年发布的西地那非治疗心力衰竭研究(sildenafil in heart

failure, SiHF) 是一项随机安慰剂对照多中心临床试验, 结果显示西地那非并未改善 HFrEF 和肺动脉高压患者的症状、生活质量或运动能力^[45]。未来需要更规范的, 以事件驱动、全因死亡、心血管死亡和心力衰竭再住院等指标为终点事件的多中心随机对照试验, 以进一步研究 PDE5 在 HFpEF 和 HFrEF 中的临床疗效。

5 PDE9A: 一氧化氮与 NPs 产生 cGMP 区域化信号转导的差异效应

PDE9A 是一种 cGMP 特异性酯酶, 由单个基因编码, 然后选择性剪接产生多种亚型异构体。在全身都有表达, 包括肺脏、肾脏、心脏和骨骼肌, 但在小脑浦肯野神经元表达最为显著, 而在皮层、海马和纹状体的表达水平较低。大脑表达的 PDE9A 在突触可塑性方面发挥重要作用, 研究发现, 记忆和学习与 cGMP 浓度调节以及谷氨酸相关的信号通路有关, 因此 PDE9A 被认为是治疗或减轻认知障碍的药理学靶点^[46]。抑制 PDE9A 可用于治疗阿尔茨海默病、精神分裂症, 或由各种神经退行性变引起的认知功能障碍。PDE9A 在不同组织中存在亚型特异性表达, 大脑表达 PDE9A6 和 9A13 以及三种高分子量异构体——PDE9x-100、-120 和 -175, 但这些都没有在心脏中被发现, 在心脏表达的是 PDE9A2 和 PDE9A9^[46]。

2015 年首次报道了 PDE9A 在心脏中的作用^[47]。在人类心肌组织, 研究证实了 PDE9A 的 mRNA 和蛋白质表达, 而在衰竭和肥大心脏发现了 PDE9A 的过表达。PDE9A 在心肌细胞的分布与 PDE5A 不同, 表现出与 SERCA2A 共定位, 而不是与 α -肌动蛋白共定位。PDE9A 不能调节由一氧化氮激活 GC-1 生成的 cGMP, 而是调节心肌细胞中与 NPs 信号耦联的 cGMP。缺乏 *Pde9a* 的小鼠可抵抗持续的压力超负荷, 表现为抑制心肌肥大、减少心肌纤维化和增强心脏功能的作用, 并且用 PDE9A 抑制剂 PF-00047943 干预后, 在 WT 小鼠也观察到类似的保护作用。此外, 无论 NOS 是否被 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 抑制, 都会发生上述心脏保护作用, 表明保护作用独立于一氧化氮-cGMP 依赖性信号通路。这与 PDE5A 抑制剂西地那非的作用形成鲜明对比, 西地那非只有在 NOS 信号通路完整的情况下才能有效对抗压力超负荷, 发挥心脏保护作用。

通过抑制心脏中的 PDE5A 或 PDE9A 调控 cGMP 与 cGK-1 具有一定的相似性和差异性。两者都对抑制心肌肥大和纤维化的相关基因表达产生影响, 这种影响可能与激活 TRPC6 和下游 CaN 耦联的信号通路有关^[38]。然而, 通过抑制 PDE5A 或 PDE9A 激活的 cGK-1 也表现出许多独特的靶标, 这与两种 PDE 之间的细胞

定位和底物偏好的差异一致。其中最显著的差异是 PDE5A 或 PDE9A 抑制剂通过何种机制影响因压力超负荷而发生改变的 miRNA 表达^[48]。超负荷应激励许多促肥大/促纤维化 miRNA (MiR34c、21a、199a、208b) 和抗肥大 miRNA (MiR1a、30b、133a) 的表达上调。在 111 个受压力超负荷显著影响的 miRNAs 中, PDE5A 抑制剂减少了大多数 miRNAs 的表达。相比之下, PDE9A 抑制剂对 miRNAs 分布的影响微乎其微。两种治疗方法在心功能、组织学和形态学方面都有几乎相同的表型改善。RNAseq 分析显示, 通过 PDE5A 或 PDE9A 抑制剂改变表达的基因中有 70%~90% 是不同的, 尽管它们集中在相似的信号通路。miRNAs 的差异表达主要发生在细胞质, 因为初级 miRNA (primary miRNA, pri-miRNA) 或 miRNA 前体 (precursors miRNAs, pre-miRNA) 在两种 PDEs 抑制剂干预后均未见到明显的差异表达。

除了心脏作用外, 最近的研究表明抑制 PDE9A 可能有助于 VSM 中 cGMP 的信号通路调节^[49]。与大脑类似, VSM 主要表达 PDE9A6 和 PDE9A13, 但是表达水平较低, 也可能表达 PDE9x-100。抑制 PDE9A 可促进大鼠动脉 VSM 细胞与激活一氧化氮耦联的 cGMP 表达上调, 但是一般不会促进 ANP 或 CNP 的激活^[49], 这与在心肌细胞和完整心脏发现的底物选择性相反^[42]。这种差异表达的原因尚不清楚, 可能与不同剪接变异体的表达有关, 并与尚未在 VSM 检测到 PDE9A 的细胞内定位有关。目前尚未发现抑制 PDE9A 在小鼠和人类体内会影响全身血压的波动。

近期实验报道了急性抑制 PDE9A 对心功能正常或衰竭的绵羊心脏和肾脏的影响^[47]。通过静脉注射不同剂量 PDE9A 抑制剂 PF-04749982, 可剂量依赖性增加血浆 cGMP/NPs 比率和尿 cGMP 水平; 在心力衰竭时, 可增加尿量、尿钠排泄和肌酐清除率。给予最高剂量后, 在心力衰竭动物模型观察到心输出量增加和动脉血管扩张, 反映了抑制 PDE9A 所介导的病理生理改变, 但是这种改变也可能通过抑制 PDE1 所介导。目前尚无研究探讨抑制 PDE9A 对人类血压变化的影响。大型哺乳动物实验研究支持在抑制 PDE9A 和 NPs 信号通路衍生的 cGMP 之间发生的交互作用, 并且表明抑制 PDE9A 对于心力衰竭的有益效应可能来自心脏和肾脏功能的改善^[50]。

目前发现了几种 PDE9A 的小分子抑制剂, 至少三种可用于治疗阿尔茨海默病、精神分裂症或前列腺增生, 然而抑制 PDE9A 治疗心血管疾病的临床探索尚处于早期阶段^[51]。专注于发现和开发心力衰竭和其他心血管疾病新疗法的 Cardurion 公司, 于 2018 年底开始研究 PDE9A 抑制剂 CRD-733 在心力衰竭患者的安

全性和治疗剂量,目前仍在进行中。另一种潜在的治疗途径是协同调节中性肽链内切酶奈普赖氨酸(Neprilysin)抑制所导致的NPs依赖性cGMP水平升高,以及PDE9A抑制剂所导致的cGMP水解。目前临床前研究仍在进行中。

6 总结与展望

PDE在心脏cGMP信号通路中的作用比较见表1。

表1 PDE在心脏cGMP信号通路中的作用

| PDE | 水解cAMP | 水解cGMP | 亚型 | 作用 |
|------|--------|--------|-------------|---|
| PDE1 | + | + | 1A、1B、1C | 病理性心肌肥厚 促心肌纤维化 心肌细胞凋亡 心脏收缩功能障碍 |
| PDE2 | + | + | 2A1、2A2、2A3 | 调节心肌细胞肥大 心肌纤维化和线粒体损伤 细胞凋亡 抑制β-AR失敏 降低心率 调节血管舒缩 |
| PDE3 | + | + | 3A1、3A2、3A3 | 致心室重构 线粒体损伤 细胞凋亡 心脏收缩功能障碍 |
| PDE5 | - | + | 5A1、5A2、5A3 | 病理性心肌细胞肥大 线粒体损伤 细胞凋亡 心脏收缩功能障碍 |
| PDE9 | - | + | 9A2、9A9 | 病理性心肌肥大 心肌纤维化 心脏收缩功能障碍 |

注:PDE为磷酸二酯酶;cGMP为环磷酸鸟苷;cAMP为环磷酸腺苷;β-AR为β-肾上腺素受体;+表示有;-表示无。

在过去数年,研究揭示了每种PDEs同工酶在心血管生理和病理生理改变中的作用,并通过选择性药物抑制或激活PDEs信号通路来发掘其在心脏疾病中的治疗潜力。研究发现,抑制PDE1C可保护心肌细胞存活并增强心脏收缩力,而抑制或激活PDE2可能在肥大或衰竭的心脏中发挥有益作用。PDE3抑制剂已在临床用于治疗ADHF,但是长期用药可增加死亡率,因此不建议长期应用。然而,亚型异构体的特异性变构调节可能会改变这一点。通过抑制PDE3A可改变药代动力学,可能会重新引起人们对于抑制PDE3A治疗心力衰竭的研究兴趣。此外,研究发现,抑制PDE5A和PDE9A可对抗心脏的病理性重构,但是二者对于心脏cGMP信号通路的影响,以及对于一氧化氮与NPs信号通路产生的cGMP区域化信号转导的差异性调控尚存争议,目前正在进行的系列研究将进一步揭示PDE5A和PDE9A对心脏疾病的潜在疗效。

参考文献

- [1] Kamel R, Leroy J, Vandecasteele G, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(2): 90-108.
- [2] Barthou A, Kamel R, Leroy J, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: therapeutic targets in cardiac hypertrophy and failure[J]. *Med Sci (Paris)*, 2024, 40(6/7): 534-543.
- [3] Preedy M. Cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterases: roles and therapeutic potential in heart failure[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(3): 401-417.
- [4] Hashimoto T, Kim GE, Tunin RS, et al. Acute enhancement of cardiac function by phosphodiesterase type 1 inhibition[J]. *Circulation*, 2018, 138(18): 1974-1987.
- [5] Leroy J, Fischmeister R. Inhibit a phosphodiesterase to treat heart failure?[J]. *Circulation*, 2018, 138(18): 2003-2006.
- [6] Zhang Y, Knight W, Chen S, et al. Multiprotein complex with TRPC (transient receptor potential-canonical) channel, PDE1C (phosphodiesterase 1C), and A2R (adenosine A2 receptor) plays a critical role in regulating cardiomyocyte cAMP and survival[J]. *Circulation*, 2018, 138(18): 1988-2002.
- [7] Gilotra NA, DeVore AD, Povsic TJ, et al. Acute hemodynamic effects and tolerability of phosphodiesterase-1 inhibition with ITI-214 in human systolic heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2021, 14(9): e008236.
- [8] Xi J, McIntosh R, Shen X, et al. Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(5): 684-690.
- [9] Schultz JE. Structural and biochemical aspects of tandem GAF domains[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): 93-109.
- [10] Castro LR, Verde I, Cooper DM, et al. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes[J]. *Circulation*, 2006, 113(18): 2221-2228.
- [11] Subramanian H, Froese A, Jönsson P, et al. Distinct submembrane localisation compartmentalises cardiac NPR1 and NPR2 signalling to cGMP[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2446.
- [12] Bubb KJ, Trinder SL, Baliga RS, et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 augments cGMP and cAMP signaling to ameliorate pulmonary hypertension[J]. *Circulation*, 2014, 130(6): 496-507.
- [13] Baliga RS, Preedy M, Dukinfield MS, et al. Phosphodiesterase 2 inhibition preferentially promotes NO/guanylyl cyclase/cGMP signaling to reverse the development of heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(31): E7428-E7437.
- [14] Vettel C, Lämmle S, Ewens S, et al. PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(8): H1246-1252.
- [15] Zoccarato A, Surdo NC, Aronsen JM, et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by a local pool of cAMP regulated by phosphodiesterase 2[J]. *Circ Res*, 2015, 117(8): 707-719.
- [16] Monterisi S, Lobo MJ, Livie C, et al. PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling[J]. *Elife*, 2017, 6: e21374.
- [17] Mehel H, Emons J, Vettel C, et al. Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts β-adrenergic responses in cardiomyocytes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(17): 1596-1606.
- [18] Wagner M, Sadek MS, Dybkova N, et al. Cellular mechanisms of the anti-arrhythmic effect of cardiac PDE2 overexpression[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4816.
- [19] Cachorro E, Günscht M, Schubert M, et al. CNP promotes

- antiarrhythmic effects via phosphodiesterase 2[J]. *Circ Res*, 2023, 132(4): 400-414.
- [20] Vettel C, Lindner M, Dewenter M, et al. Phosphodiesterase 2 protects against catecholamine-induced arrhythmia and preserves contractile function after myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2017, 120(1): 120-132.
- [21] Galindo-Tovar A, Vargas ML, Kaumann AJ. Phosphodiesterase PDE2 activity, increased by isoprenaline, does not reduce β -adrenoceptor-mediated chronotropic and inotropic effects in rat heart[J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2018, 391(6): 571-585.
- [22] Liu K, Li D, Hao G, et al. Phosphodiesterase 2A as a therapeutic target to restore cardiac neurotransmission during sympathetic hyperactivity[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(9): e98694.
- [23] Movsesian M, Ahmad F, Hirsch E. Functions of PDE3 isoforms in cardiac muscle[J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2018, 5(1): 10.
- [24] Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure[J]. *N Engl J Med*, 1991, 325(21): 1468-1475.
- [25] Cuffe MS, Califf RM, Adams KF, Jr, et al. Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2002, 287(12): 1541-1547.
- [26] Metra M, Eichhorn E, Abraham WT, et al. Effects of low-dose oral enoximone administration on mortality, morbidity, and exercise capacity in patients with advanced heart failure: the randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group ESSENTIAL trials[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(24): 3015-3026.
- [27] Sucharov CC, Nakano SJ, Slavov D, et al. A PDE3A promoter polymorphism regulates cAMP-induced transcriptional activity in failing human myocardium[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(10): 1173-1184.
- [28] Nanayakkara S, Mak V, Crannitch K, et al. Extended release oral milrinone, CRD-102, for advanced heart failure[J]. *Am J Cardiol*, 2018, 122(6): 1017-1020.
- [29] Dünnes S, Voussen B, Aue A, et al. Phosphodiesterase 3A expression and activity in the murine vasculature is influenced by NO-sensitive guanylyl cyclase[J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(4): 693-702.
- [30] Meier S, Andressen KW, Aronsen JM, et al. PDE3 inhibition by C-type natriuretic peptide-induced cGMP enhances cAMP-mediated signaling in both non-failing and failing hearts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 812: 174-183.
- [31] Polidovitch N, Yang S, Sun H, et al. Phosphodiesterase type 3A (PDE3A), but not type 3B(PDE3B), contributes to the adverse cardiac remodeling induced by pressure overload[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 132: 60-70.
- [32] Ercu M, Mücke MB, Pallien T, et al. Mutant phosphodiesterase 3A protects from hypertension-induced cardiac damage[J]. *Circulation*, 2022, 146(23): 1758-1778.
- [33] Subramaniam G, Schleicher K, Kovanich D, et al. Integrated proteomics unveils nuclear PDE3A2 as a regulator of cardiac myocyte hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2023, 132(7): 828-848.
- [34] Wilson LS, Baillie GS, Pritchard LM, et al. A phosphodiesterase 3B-based signaling complex integrates exchange protein activated by cAMP1 and phosphatidylinositol 3-kinase signals in human arterial endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 16285-16296.
- [35] Campolo F, Zevini A, Cardarelli S, et al. Identification of murine phosphodiesterase 5A isoforms and their functional characterization in HL-1 cardiac cell line[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 325-337.
- [36] Takimoto E, Champion HC, Belardi D, et al. cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism[J]. *Circ Res*, 2005, 96(1): 100-109.
- [37] Hutchings DC, Anderson SG, Caldwell JL, et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors and the heart: compound cardioprotection?[J]. *Heart*, 2018, 104(15): 1244-1250.
- [38] Korkmaz-Icöz S, Radovits T, Szabó G. Targeting phosphodiesterase 5 as a therapeutic option against myocardial ischaemia/reperfusion injury and for treating heart failure[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(2): 223-231.
- [39] Mátyás C, Németh BT, Oláh A, et al. Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes[J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(3): 326-336.
- [40] Ranek MJ, Kokkonen-Simon KM, Chen A, et al. PKG1-modified TSC2 regulates mTORC1 activity to counter adverse cardiac stress[J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 264-269.
- [41] Garcia AM, Nakano SJ, Karimpour-Fard A, et al. Phosphodiesterase-5 is elevated in failing single ventricle myocardium and affects cardiomyocyte remodeling in vitro[J]. *Circ Heart Fail*, 2018, 11(9): e004571.
- [42] Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2013, 309(12): 1268-1277.
- [43] Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, et al. Prevention of PKG-1 α oxidation suppresses antihypertrophic/antifibrotic effects from PDE5 inhibition but not sGC stimulation[J]. *Circ Heart Fail*, 2018, 11(3): e004740.
- [44] De Vecchis R, Cesaro A, Ariano C. Differential effects of the phosphodiesterase inhibition in chronic heart failure depending on the echocardiographic phenotype (HFREF or HFpEF): a meta-analysis[J]. *Minerva Cardioangiol*, 2018, 66(5): 659-670.
- [45] Cooper TJ, Cleland J, Guazzi M, et al. Effects of sildenafil on symptoms and exercise capacity for heart failure with reduced ejection fraction and pulmonary hypertension (the SiHF study): a randomized placebo-controlled multicentre trial[J]. *Eur J Heart Fail*, 2022, 24(7): 1239-1248.
- [46] Patel NS, Klett J, Pilarzyk K, et al. Identification of new PDE9A isoforms and how their expression and subcellular compartmentalization in the brain change across the life span[J]. *Neurobiol Aging*, 2018, 65: 217-234.
- [47] Lee DI, Zhu G, Sasaki T, et al. Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease[J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 472-476.
- [48] Kokkonen-Simon KM, Saberi A, Nakamura T, et al. Marked disparity of microRNA modulation by cGMP-selective PDE5 versus PDE9 inhibitors in heart disease[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(15): e121739.
- [49] Zhang L, Bouadjel K, Manoury B, et al. Cyclic nucleotide signalling compartmentation by PDEs in cultured vascular smooth muscle cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(11): 1780-1792.
- [50] Scott N, Rademaker MT, Charles CJ, et al. Hemodynamic, hormonal, and renal actions of phosphodiesterase-9 inhibition in experimental heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(7): 889-901.
- [51] Singh N, Patra S. Phosphodiesterase 9: insights from protein structure and role in therapeutics[J]. *Life Sci*, 2014, 106(1/2): 1-11.