

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00776

• 研究快报 •

缺血再灌注损伤诱导心肌细胞自噬相关基因过表达

肖 健¹, 何 斌³, 朱晓燕², 张宇峰¹, 康 波¹, 王志农^{1*}

1. 第二军医大学长征医院胸心外科, 上海 200003
2. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433
3. 上海交通大学附属新华医院麻醉科, 上海 200092

[摘要] **目的** 探讨缺血再灌注(IR)损伤对心肌细胞自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)表达的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠随机分为2组:对照组(假手术组),于左前降支(left anterior descending, LAD)下方穿过5-0丝线,不结扎;缺血再灌注损伤组:结扎LAD,45 min后松结扎线再灌注120 min。利用RT-PCR方法,检测各组心肌Beclin 1和Atg5 mRNA表达;应用蛋白质印迹分析法检测心肌LC3蛋白表达变化。**结果** 缺血再灌注损伤后心肌Beclin 1和Atg5 mRNA表达较对照组升高,分别达到对照组的2.45和1.6倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$);LC3-II蛋白表达增加,IR后LC3-II/LC3-I比值较对照组升高(1.4 vs 0.2, $P < 0.01$)。**结论** 缺血再灌注损伤可以诱导心肌细胞Atg家族表达增加,促进自噬的发生,导致心肌损害。

[关键词] 心肌再灌注损伤;心肌细胞;自噬**[中图分类号]** R 654.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0776-03

Ischemia-reperfusion injury induced overexpression of autophagy-related genes in cardiomyocytes

XIAO Jian¹, HE Bin³, ZHU Xiao-yan², ZHANG Yu-feng¹, KANG Bo¹, WANG Zhi-nong^{1*}

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Anaesthesiology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ischemia-reperfusion (IR) injury on the expression of autophagy-related gene in cardiomyocytes. **Methods** Male adult SD rats, weighing 250-300 g, were randomly divided into 2 groups, namely, the control group, in which rats underwent thoracotomy without left anterior descending coronary (LAD) ligation, and IR group, in which the left anterior descending coronary arteries were ligated for 45 min, followed by reperfusion for 2 h. Beclin 1 and Atg5 mRNA expression levels were examined by RT-PCR in the myocardium, and the LC3 protein was determined by Western blotting analysis. **Results** Beclin 1 and Atg5 mRNA expression levels in IR group increased to 2.45 and 1.6 times those of the control group, respectively ($P < 0.05$). The expression of LC3-II protein was increased, which led to significant increase of LC3-II/LC3-I ratio in IR group (1.4 vs 0.2, $P < 0.01$). **Conclusion** Ischemia-reperfusion injury can induce expression of Atg family, promoting autophagy and causing cardiomyocyte damage.

[Key words] myocardial reperfusion injury; myocardiocytes; autophagy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7):776-778]

临床上应用的溶栓、介入以及搭桥手术能够有效治疗心肌梗死,但在血管化治疗后引起的缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤严重影响患者的预后^[1]。以往的研究大多集中在心肌IR后的细胞凋亡。有研究发现,抑制细胞凋亡的发生后,细胞还会通过自噬(autophagy,即II型程序性细胞死亡)而死亡,并且凋亡的发生可能还需要自噬的参与^[2]。

自噬能够被各种损伤及氧化应激等诱发,广泛参与心血管系统的各种生理和病理过程,如心肌肥厚、心力衰竭、扩张型心肌病及IR等^[3-4],但是其在心肌IR中的作用还存在争论。

自噬小体的发生、发展过程中受到多种自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)的调控,以往对于IR心肌细胞自噬相关基因的研究大多在离体

[收稿日期] 2010-12-07 **[接受日期]** 2011-06-22**[基金项目]** 国家自然科学基金(30901470)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30901470)。**[作者简介]** 肖 健, 博士生。E-mail: xiaojizard@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873327, E-mail: wangzn007@hotmail.com

心肌细胞水平进行研究^[5-6]。本研究采用在体心肌细胞 IR 模型,通过比较 IR 后自噬相关基因的变化,研究 IR 对心肌细胞自噬的影响,以期明确 IR 对自噬的调控,为临床的心肌保护提供新的思路和理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物 成年健康雄性 SD 大鼠 20 只,体质量为 250~300 g,由第二军医大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0003,使用许可证号:SCXK(沪)2007-0003]。

1.2 试剂及仪器 RNA 提取 TRIzol 试剂盒、二步法 RT-PCR 试剂盒均购自 Fermentas life sciences 公司,LC3 抗体购自 Sigma 公司,Rotor-Gene 3000 定量 PCR 仪购自 Corbett Research 公司,蛋白电泳仪购自 Bio-Rad 公司,ALC-V8 S 型小动物呼吸机购自上海奥尔科特生物科技有限公司。

1.3 引物扩增 扩增引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Beclin 1 (NM_001034117.1): 5'-GGC AGT GGC TCC TAT T-3', 5'-GGC GTG CTG TGC TCT GAA AA-3'。Atg5 (NM_001014250.1): 5'-AGT GGA GGC AAC AGA ACC-3', 5'-GAC ACG AAC TGG CAC ATT-3'。β-actin (NM_031144): 5'-ATG GTG GGT ATG GGT CAG AAG G-3', 5'-TGG CTG GGG TGT TGA AGG TC-3'。

1.4 心肌 IR 模型的制备 大鼠称质量后以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(350 mg/kg)。切开气管,插管接人工呼吸机作机械通气,潮气量 5~6 ml,频率 70 次/分。银针电极插于四肢皮下并固定,接奥尔科特 MS4000U 生物信号定量记录分析系统记录标准肢体 II 导联心电图。在胸骨左侧第 3~4 肋间开胸,暴露心脏,在左心耳及肺动脉圆锥间找到左前降支(left anterior descending, LAD),在距其起始部 2 mm 处用 5-0 带线缝合针穿过。于心肌上置一垫片,用单活结结扎 LAD,观察 45 min 后松线再灌注,逐层关胸,再灌注 120 min。制模成功标准:结扎 LAD 后心电图 II 导联 ST 段出现弓背向上抬高,T 波高耸等为缺血成功;放松结扎线后,抬高的 ST 段下降 1/2 以上为再灌注成功。

1.5 动物分组 动物适应性喂养 1 周后随机分为 2 组($n=10$)。对照组(假手术组):仅穿线不结扎;IR 组:阻断 LAD 45 min,再灌注 120 min。

1.6 标本采集 实验结束后,断头法处死实验大鼠,开胸摘取心脏,剪去心房及右心室,留取左室前

壁心肌,切成约 100 mg 的小块包于锡纸并立即放入液氮中保存。

1.7 RT-PCR 法测定大鼠心肌 Beclin 1、Atg5 mRNA 表达水平 TRIzol 法抽取总 RNA,依据 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书行 RT-PCR。

1.8 蛋白质印迹法检测大鼠心肌 LC3 蛋白表达水平 取大鼠左室前壁心肌组织,加入蛋白裂解液、PMSF、亮肽素,匀浆后,冰上静置 30 min,12 000×g 离心 10 min,取上清。BCA 法测总蛋白浓度后加入上样缓冲液和 DTT,100℃ 蛋白变性 10 min。各取 50 μl 样品,电泳、转膜及封闭后,一抗 4℃ 孵育过夜,漂洗后二抗(抗兔)摇床孵育 1 h,漂洗后荧光成像、拍照、分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 模型制备结果 结扎大鼠 LAD,导致大鼠心电图 ST 段明显抬高(图 1B),说明建立 IR 模型成功。

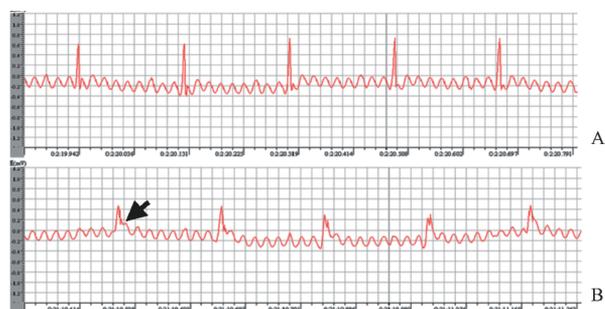


图 1 大鼠左前降支结扎前后心电图变化

Fig 1 Changes of rat ECG after left anterior descending (LAD) artery ligation

ECG: Electrocardiograph. A: Before LAD ligation; B: After LAD ligation. The ST segment was enhanced after LAD ligation (arrow)

2.2 IR 对 Beclin 1 mRNA 表达的影响 结果显示,IR 上调心肌细胞 Beclin 1 mRNA 的表达水平,是对照组的 2.45 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 IR 对 Atg5 mRNA 表达的影响 结果显示,IR 上调 Atg5 mRNA 的表达,为对照组的 1.6 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 IR 对 LC3 蛋白表达的影响 正常大鼠心肌 LC3 蛋白以 I 型为主,II 型含量极少;IR 后 LC3-II 增加,LC3-I 减少。因此,LC3-II / LC3-I 的比值由对照组的 0.2 ± 0.03 升高到 IR 组的 1.4 ± 0.36 ,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 2)。

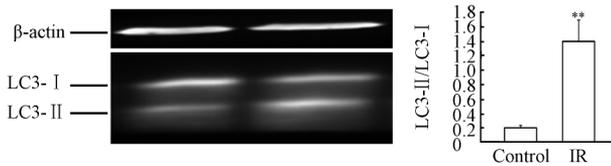


图2 IR后大鼠心肌LC3蛋白的表达

Fig 2 Expression of LC3 protein in rat cardiomyocytes after IR

R: Ischemia-reperfusion. * $P < 0.01$ vs control group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

长久以来,凋亡被认为是IR的主要病理表现。随着研究的深入,自噬作为新的程序性细胞死亡的方式,在心肌IR中的作用越来越得到重视^[7]。自噬分为3种类型:微自噬(microautophagy)、巨自噬(macroautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA),巨自噬即通常所指的自噬^[8]。自噬的发生首先是在胞质内形成分隔膜,包绕在受损的细胞器周围形成自噬体,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体并降解其包绕的成分,其中自噬体的形成是自噬发生的中心环节^[9]。

自噬的发生受到多种自噬相关基因的调控,如Beclin 1、Atg5和Atg8(LC3是酵母菌自噬基因Atg8在哺乳动物中的同源物)等^[10-11]。其中Beclin 1能与分隔膜结合,募集Atg家族蛋白Atg12-Atg5-Atg16复合物,形成前自噬泡,并进一步募集LC3-II结合到分隔膜,促进自噬体外膜的延展扩张,同时Atg12-Atg5-Atg16复合物脱落,形成成熟的自噬体^[12]。LC3具有2种亚型,自噬激活时LC3-I型迅速转化为II型,定位于前自噬体和自噬体,在其他Atg脱落后,成为自噬体形成的标志性分子^[6, 10]。一旦自噬体与溶酶体融合,自噬体内的LC3-II即被溶酶体中的水解酶降解。胞质可溶性LC3-I和膜结合型LC3-II的比例在不同组织和细胞类型中变化很大^[12-13],因此,大部分研究将LC3-II/LC3-I的比值作为定量比较自噬率的方法。

Beclin 1、Atg5以及LC3在自噬小体的形成过程中均发挥着不可或缺的重要作用,它们表达水平的上调可以促进自噬的发生,一旦自噬过度发生则导致细胞的死亡。以往的研究多采用体外培养乳鼠心肌细胞给予低糖和复糖培养,模拟体外IR或体外给予药物干预离体心肌细胞,进而研究心肌细胞自噬的变化^[5-6, 14]。本研究证实,在体IR亦可导致Beclin 1升高,进而诱导心肌细胞损伤,与Matsui等^[5]的结果一致。但与其不同的是,本研究发现IR不仅导致Beclin 1 mRNA表达升高,还促进其后续环节

中的Atg5以及LC3-II的表达上调,进一步促进自噬的发生,提示IR可以从多个环节诱导自噬的发生,导致IR后的心肌损伤。

总之,适度的自噬是细胞完成自身代谢和细胞器更新的重要方式,对维持机体内环境稳定以及调控细胞损伤和老化具有重要意义;而非生理性的、过度的自噬则会导致细胞过多死亡,从而引起组织器官产生病理性变化^[13]。如果能够早期、有效地抑制IR后细胞自噬的发生,将能够更好地减轻心肌再血管化治疗中的再灌注性损伤,改善患者预后。

[参考文献]

- [1] Cokkinos D V, Pantos C. Myocardial protection in man—from research concept to clinical practice [J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(3-4):345-362.
- [2] Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease [J]. *Circ Res*, 2008, 103:343-351.
- [3] 何 韬, 王海杰, 谭玉珍. 自噬在细胞存活和死亡中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2008, 39:37-40.
- [4] 钟春林, 陈 丽. 自噬在心脏疾病中的研究 [J]. *国际心血管病杂志*, 2009, 36:292-295.
- [5] 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.
- [6] Yuan H, Perry C N, Huang C, Iwai-Kanai E, Carreira R S, Glembotski C C, et al. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: H470-H479.
- [7] Lu L, Wu W, Yan J, Li X, Yu H, Yu X. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 134:82-90.
- [8] 李欣志, 刘建勋. 缺血/再灌注过程中心肌细胞自噬研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24:704-707.
- [9] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Recycle or die; the role of autophagy in cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44:654-661.
- [10] 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.
- [11] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19:5720-5728.
- [12] Alonso S, Pethe K, Russell D G, Purdy G E. Lysosomal killing of mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:6031-6036.
- [13] Rothermel B A, Hill J A. Autophagy in load-induced heart disease [J]. *Circ Res*, 2008, 103:1363-1369.
- [14] Kobayashi S, Volden P, Timm D, Mao K, Xu X, Liang Q. Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285:793-804.