DOI:10.16016/j.1000-5404.201409018

论著

MG53在下肢远程缺血预适应保护肺缺血再灌注损伤中的作用

李 郁,陈 垦,徐在成,曾春雨 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆市心血管病研究所)

[**摘要**] **目的** 研究MG53在下肢远程缺血预适应保护肺组织缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 肺缺血再灌注损伤模型通过开胸阻断左侧肺门进行缺血1 h后再灌注1 h建立。下肢远程缺血预适应模型是在进行肺缺血再灌注损伤前0.5 h阻断左侧股动脉血流5 min,然后再灌注5 min,重复3个循环来实现的。将60只10~12周龄SD大鼠[雌雄各半,体质量(235±15)g]采用完全随机分组方法分为3组(n=20):假手术组(sham组)、肺缺血再灌注损伤组(IR组)、下肢远程缺血预适应+肺缺血再灌注损伤组(RIP组)。将24只8~12周龄MG53敲除小鼠[雌雄各半,体质量(27.5±2.5)g]采用完全随机分组方法分为2组(n=12),即肺缺血再灌注损伤组(IR组)、下肢远程缺血预适应+肺缺血再灌注损伤组(RIP组)。在缺血及再灌注时间结束后,观察动脉氧分压、计算肺组织湿干比(W/D),通过Western blot检测3组之间肺组织上MG53蛋白表达量的改变,并记录其生存情况。**结果** 对SD大鼠,在进行肺缺血再灌注损伤后其血氧分压降低到(46.60±5.94)mmHg,而下肢远程缺血预适应能显著改善肺组织的缺血再灌注损伤,使其血氧分压恢复至(73.40±5.94)mmHg(P<0.05),同时对反映肺组织水肿程度的W/D值、生存情况都有显著的改善,通过Western blot方法检测到RIP组肺组织上MG53蛋白的表达量(2.03±0.53)较IR组(0.79±0.17)显著增加(P<0.05)。在MG53敲除小鼠上,下肢远程缺血预适应组的血氧分压(48.20±12.15)mmHg较肺缺血再灌注损伤组(45.60±10.53)mmHg并未得到改善,同时也不能改善肺组织的水肿情况。**结论** MG53参与了下肢远程缺血预适应对肺组织缺血再灌注损伤的保护作用。

[**关键词**] 远程缺血预适应;肺缺血再灌注损伤;MG53;大鼠;小鼠
[**中图法分类号**] R341; R364.12; R654.102 [**文献标志码**] A

Protective role of mitsugumin 53 in lung ischemic/reperfusion injury after limb remote ischemic preconditioning in rats

Li Yu, Chen Ken, Xu Zaicheng, Zeng Chunyu (Department of Cardiology, Chongqing Institution of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of mitsugumin 53 (MG53) in the protective effect of remote ischemic preconditioning (RIP) for lung ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Lung ischemic/reperfusion injury model was established in SD rats by left thoracotomy, clamped left hilum for 1 h, and then released for reperfusion for 1 h. For RIP, the left femoral artery was clamped for 5 min followed by being released for 5 min (this cycle was repeated for 3 times). This RIP procedure was done in 30 min before lung ischemic/reperfusion injury. SD rats (n=60) in both sexes (10 to 12 weeks old, weighting 235±15 g) were randomly divided into 3 groups, that is, sham group, IR group, and lung IR pretreated with RIP group.

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81400256)
[**通信作者**] 曾春雨,E-mail:chunyuzeng01@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1535.119.html(2014-12-05)

Male and female MG53 knockout mice ($n=24$) (8 to 12 weeks old, weighting 27.5 ± 2.5 g) were divided into 2 groups, IR and RIP groups. After I/R period, the arterial blood samples were collected for arterial blood gas analysis, the lung tissues were obtained for measurement of wet/dry (W/D) ratio, and Western blot analysis was used for the protein expression of MG53. The survival rate were recorded and compared among the groups. **Results** In SD rats, lung I/R injury lowered PaO_2 to 46.60 ± 5.94 mmHg, which was improved by pretreated with RIP, by increasing the value to 73.40 ± 5.94 mmHg ($P<0.05$). At the same time, the W/D ratio and survival condition were also improved in RIP group than IR group. The expression of MG53 in the lung tissue was markedly increased in the former than the latter group (2.03 ± 0.53 *vs* 0.79 ± 0.17, $P<0.05$). However, all the protective effects, including the effect on PaO_2, were lost in the MG53 knockout mice. **Conclusion** MG53 participates in the protective effect of RIP against the lung ischemic/reperfusion injury.

[**Key words**] remote ischemic preconditioning; lung ischemia/reperfusion injury; mitsugumin 53; rats; mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81400256). Corresponding author: Zeng Chunyu, E-mail: chunyuzeng01@163.com

缺血再灌注损伤是指当组织器官在缺血一段时间后恢复其血流的供应,组织器官的损伤出现加重甚至造成不可逆损伤的现象。肺缺血再灌注损伤是临床上很多疾病的一个共同的病理生理过程,常常发生在心肺移植手术、心脏动脉搭桥术、心肺脑复苏以及休克等情况之后[1-2]。正是由于其较高的临床发生率,因此如何减轻缺血再灌注对器官的损害一直都是临床医师和科研工作者的关注热点。1986年,Murry等[3]发现通过提前短暂、反复地阻断一支冠状动脉血管的血流,发现可以减少心肌缺血再灌注损伤的损伤面积、减轻其心律失常等损伤,这种处理方式被称为缺血预适应(ischemic preconditioning,IPC)。后续的研究发现,缺血预适应的保护作用在器官之间具有普遍性。因此缺血预适应被认为是一种具有强大内源性保护作用的措施。随后,Przyklenk等[4]提出了远程缺血预适应(remote ischemic preconditioning,RIP)的概念。随着研究的深入,人们发现远程缺血预适应可以显著地减轻肺组织的损伤情况[5-7]。目前对于远程缺血预适应机制的研究主要集中在体液机制、神经机制以及神经体液相互作用三个方面[8]。但是其具体的机制仍未完全阐明。MG53(Mitsugumin 53)是近来发现的在细胞膜修复方面具有显著作用的蛋白,它是由477个氨基酸所组成的具有心肌和骨骼肌特异性的TRIM家族成员之一,其氨基残端和羧基残端分别含有TRIM和SPRY结构域[9-10]。我们的前期研究发现,MG53对于肺的缺血再灌注损伤具有保护作用[11],但其是否参与了RIP的过程尚不清楚。因此,本研究将对MG53在RIP中的作用进行分析。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

HX-300动物呼吸机为成都泰盟科技有限公司生产。小鼠呼吸机为德国Hugo Sachs Elektronik公司生产。锂锌平衡低肝素动脉血气分析针由中美特新医疗用品有限公司生产。抗兔MG53抗体由美国俄亥俄州立大学麻建杰教授提供。抗体稀释液购于碧云天试剂公司。GAPDH抗体购于杭州贤至生物科技有限公司。其余常用化学试剂为国产分析纯。

1.2 动物分组及模型的建立

1.2.1 实验动物及分组 SPF级SD大鼠60只,雌雄各半,10~12周龄,体质量(235±15)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。MG53基因敲除小鼠30只,雌雄各半,8~12周龄,体质量(27.5±2.5)g,由美国俄亥俄州立大学麻建杰教授实验室提供。将SPF级SD大鼠60只采用完全随机分组方法分为3组($n=20$),即假手术组(sham组)、肺缺血再灌注损伤组(IR组)、下肢远程缺血预适应+肺缺血再灌注损伤组(RIP组)。MG53基因敲除小鼠24只采用完全随机分组方法分为2组($n=12$),即肺缺血再灌注损伤组(IR组)、下肢远程缺血预适应+肺缺血再灌注损伤组(RIP组)。

1.2.2 动物模型的建立 实验动物在称量后用2.5%的戊巴比妥钠按照50 mg/kg的剂量进行腹腔注射麻醉。待麻醉效果满意后,将SD大鼠取仰卧位固定于37 ℃恒温加热台上,以保证其体温的恒定。接通动物呼吸机,潮气量设定为6 mL/kg,呼吸频率为

60 次/min,吸呼比为 1∶2。假手术组于左侧第 4 肋间进行开胸手术,游离左侧肺门但是不结扎,并进行机械通气 2 h。肺缺血再灌注损伤组模型在机械通气下于大鼠左侧第 4 肋间进行开胸手术,在开胸器的辅助下暴露合适视野并充分游离左侧肺门,再用无创动脉夹阻断左侧肺门进行缺血 1 h,缺血时间结束后进行再灌注 1 h[12-13]。下肢远程缺血预适应组模型的建立是在进行肺缺血再灌注损伤模型建立前充分游离左侧股动脉,用无创动脉夹阻断股动脉血流 5 min,再松开动脉夹恢复血流供应 5 min(重复 3 个循环)以进行缺血预适应[14-16];缺血预适应结束后进行肺组织的缺血再灌注损伤。假手术组于机械通气 2 h 结束前 10 min,肺缺血再灌注损伤组以下肢远程缺血预适应组在再灌注时间结束前 10 min 于左侧股动脉进行动脉插管,当再灌注时间结束时立即取血送检,查动脉血气分析。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 动脉血氧分压 PaO_2 的检测 在再灌注时间结束时,于左侧股动脉插管处取动脉血 2 mL 于动脉血气分析针内,隔绝空气,于取血后 30 min 内送检进行动脉血气分析检测。

1.3.2 肺组织湿干(Wet/Dry,W/D)比值 再灌注时间结束后,小心取下左侧进行缺血再灌注损伤的肺组织,清洁肺组织表面的血液,称取质量,记为湿重。然后将肺组织放于 80 ℃鼓风箱内进行烘烤 24 h,再进行称取质量,记为干重。W/D 值即为两者之比。

1.3.3 生存情况的观察 在再灌注时间结束后,取随后的 1 h 作为观察时间。观察这 1 h 内,各分组中 SD 大鼠存活的分钟数。

1.4 免疫印迹

采用组织匀浆法提取肺组织蛋白(主要包括组织匀浆、超声破碎以及高速离心三步)。通过 Bradford 法于 Bio-Rad 分光光度仪测定蛋白浓度。根据蛋白浓度测定结果确定上样体积。采用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白,电泳结束后采用半干转法将蛋白转移到 NC 膜上,再用 5% 的脱脂奶粉进行封闭。MG53 抗体按照 1∶500 用抗体稀释液进行稀释,将 NC 膜漂洗后加入一抗中,4 ℃过夜。第 2 天,取出 NC 膜进行复温 0.5 h,再用 TBST 漂洗 3 次,每次 15 min。漂洗结束后用针对一抗来源的荧光二抗按照 1∶15 000 配制,并在室温下避光孵育 1.5 h。避光下,用 TBST 漂洗 NC 膜 3 次,每次 15 min。免疫印迹结果用 GAPDH 作为内参进行校正,用 ODYSSEY-红外凝胶扫描系统对条带进行灰度值的定量分析。

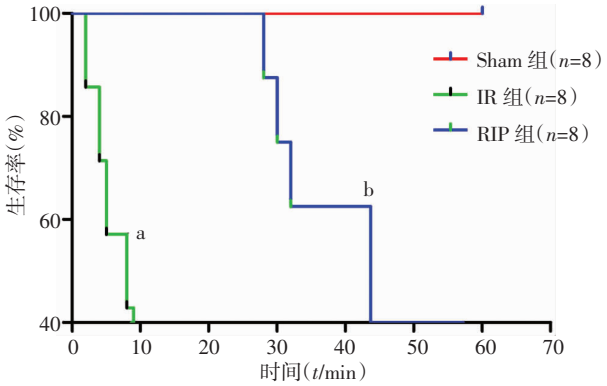
1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 RIP 对肺缺血再灌注损伤的保护作用

2.1.1 RIP 提高肺缺血再灌注大鼠的生存率 IR 组 11 只,在动物手术模型建立中死亡 3 只。RIP 组 10 只,在动物手术模型建立中死亡 2 只。Sham 组 8 只,未出现死亡。以再灌注时间结束后继续观察 1 h 作为生存分析的观察时间。肺缺血再灌注损伤组大鼠均于半小时内死亡,而远程缺血预适应处理组的大鼠生存时间显著延长和改善($P<0.05$,$n=8$)。见图 1。



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 IR 组比较

图 1 RIP 对肺缺血再灌注大鼠生存的影响

2.1.2 RIP 对肺缺血再灌注大鼠肺功能的保护作用

肺缺血再灌注损伤会导致大鼠的动脉血氧分压的显著降低[(46.60 ± 5.94) mmHg],而下肢远程缺血预适应处理可以改善肺组织缺血再灌注损伤后的动脉血氧分压,使得动脉氧分压恢复至(73.40 ± 5.94) mmHg ($P<0.05$)。

2.1.3 RIP 对肺缺血再灌注大鼠肺水肿的改善作用

大鼠肺水肿程度利用肺组织 W/D 值进行测量。肺缺血再灌注损伤后大鼠的 W/D 值为(6.49 ± 0.31),下肢远程缺血预适应处理可显著的降低肺缺血再灌注损伤后的 W/D 值(5.37 ± 0.35),明显改善肺缺血再灌注损伤后的组织充血水肿($P<0.05$)。

2.2 MG53 在 RIP 保护肺缺血再灌注损伤中的作用

2.2.1 RIP 改变肺组织上 MG53 蛋白的表达 肺缺血再灌注损伤组肺组织上 MG53 蛋白的表达量(0.79 ± 0.17)较假手术组(0.55 ± 0.13)有增加,下肢远程缺血预适应组肺组织上 MG53 蛋白的表达量

(2.03 ± 0.53)较假手术组也显著增加。同时下肢远程缺血预适应组肺组织上 MG53 蛋白的表达量比肺缺血再灌注损伤组增加得更显著($P < 0.05$)。见图2。

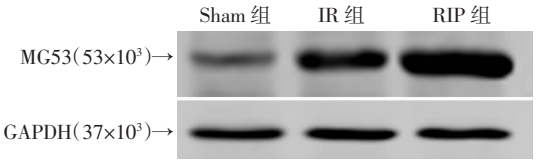


图2 Western blot 检测 RIP 对大鼠肺组织 MG53 蛋白的表达

2.2.2 MG53 敲除小鼠上 RIP 不能发挥对肺缺血再灌注的保护作用 在 MG53 基因敲除小鼠上,进行肺缺血再灌注损伤后血氧分压为(45.60 ± 10.53) mmHg,下肢远程缺血预适应不能改善其血氧分压(48.20 ± 12.15) mmHg($P > 0.05$)。同时,反映肺组织水肿情况的 W/D 值,在下肢缺血预适应组(5.47 ± 0.28)较肺缺血再灌注损伤组(5.36 ± 0.15)也未能得到改善($P > 0.05$)。因此,在 MG53 基因敲除小鼠上 RIP 不能发挥对肺缺血再灌注的保护作用。

3 讨论

远程缺血预适应由于其具有较强的保护作用而得到广泛的关注。远程缺血预适应被认为是一种简单、有效、易行的内源性保护措施,其保护作用在器官内和器官之间均能发挥。远程缺血预适应的保护作用可分为早期保护作用和晚期保护作用。其早期保护作用发生在远程缺血预适应处理后的1~3 h内,并且保护作用可以持续3~4 h;其晚期保护作用发生在远程缺血预适应处理后的12~24 h,其保护作用可以持续48~72 h[17]。我们的研究发现,远程缺血预适应可通过改善肺的血气交换、减轻肺组织水肿从而发挥对肺缺血再灌注损伤的保护作用。这一保护作用已得到较多的研究证实。其机制包括了 MAPK[18] 介导的信号转导、JAK-STAT 通路、PKC 和 PI3K[19]、GSK3-β[20] 等多个信号分子和信号通路。虽然对于远程缺血预适应机制的研究很多,但是其具体机制尚不完全清楚。而我们的研究发现,远程缺血预适应处理后会引起肺组织上 MG53 蛋白的表达量增加,并且敲除 MG53 后,远程缺血预适应的保护作用消失,提示 MG53 蛋白在远程缺血预适应发挥了重要的作用。

MG53 是一类在骨骼肌高表达的细胞骨架蛋白,主要分布于胞浆内的囊泡以及肌纤维膜上[21-22]。当细胞膜受到损伤时,在胞外钙离子的作用下,与 MG53 紧密结合的胞内修复囊泡会向胞膜转移,并迅速大量聚集在细胞膜受损伤处与损伤的细胞膜融合从而封闭损伤处的细胞膜缺口,发挥其对于细胞膜的保护作用。当肺组织遭受缺血再灌注损伤时,活性氧基团的生成会大量增加,并导致血管内皮细胞、肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞等的细胞膜发生损伤,MG53 可通过修复损伤的细胞膜而减轻组织器官的缺血再灌注损伤。我们前期的实验证实外源性给予 MG53 蛋白可以减轻肺组织的缺血再灌注损伤。在我们的研究中,远程缺血预适应通过短暂地、反复地阻断和恢复股动脉的血流供应所诱导,这一处理会造成骨骼肌细胞处于短暂的缺氧复氧状态,可能造成了骨骼肌细胞中的 MG53 大量的释放入血,而血液内游离的 MG53 蛋白可能会迅速向损伤处转移,并大量聚集在损伤处的细胞膜从而发挥对细胞膜的修复和保护作用。同时,我们还发现,在进行肺组织的缺血再灌注损伤前预先给予大鼠远程缺血预适应的处理,可以使缺血再灌注损伤后的肺组织上 MG53 蛋白的表达量显著增加,这提示远程缺血预适应处理后骨骼肌合成、释放的 MG53 蛋白参与了对肺组织的保护。但是,由下肢的远程缺血预适应所引起的 MG53 合成的增加是通过何种途径释放入血,并且是通过何种机制和形式“指令性”到达损伤的细胞膜的具体机制还需要进一步的研究。

本实验再次证实了远程缺血预适应可以发挥对肺缺血再灌注损伤的保护作用,同时提出骨骼肌分泌的 MG53 蛋白参与了下肢远程缺血预适应对肺缺血再灌注损伤保护作用的发挥,这可能是用下肢远程缺血预适应进行器官保护的一个新机制。

参考文献:

[1] Lv X, Tan J, Liu D, *et al*. Intratracheal administration of p38alpha short-hairpin RNA plasmid ameliorates lung ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Heart Lung Transplant, 2012, 31(6): 655-662.

[2] Chiang C H, Chuang C H, Liu S L. Apocynin attenuates ischemia-reperfusion lung injury in an isolated and perfused rat lung model[J]. Transl Res, 2011, 158(1): 17-29.

[3] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-1136.

[4] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, *et al*. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion[J]. Circulation, 1993, 87(3): 893-899.

[5] Zhou W, Zeng D, Chen R, *et al*. Limb ischemic preconditioning reduces heart and lung injury after an open heart operation in infants[J]. Pediatr Cardiol, 2010, 31(1): 22-29.

[6] Jan W C, Chen C H, Tsai P S, *et al*. Limb ischemic preconditioning mitigates lung injury induced by haemorrhagic shock/resuscitation in rats[J]. Resuscitation, 2011, 82(6): 760-766.

[7] Li C, Xu M, Wu Y, *et al*. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanil anesthesia: a randomized controlled study[J]. Anesthesiology, 2014, 121(2): 249-259.

[8] Lim S Y, Yellon D M, Hausenloy D J. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning[J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105(5): 651-655.

[9] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, *et al*. MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(5): 3314-3322.

[10] Cai C, Weisleder N, Ko J K, *et al*. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 15894-15902.

[11] Jia Y, Chen K, Lin P, *et al*. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4387.

[12] Forgiarini L A Jr, Grun G, Kretzmann N A, *et al*. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? [J]. J Surg Res, 2013, 179(1): 168-174.

[13] Karapanos N T, Wettstein P J, Li Z, *et al*. Does lung ischemia and reperfusion have an impact on coronary flow? A quantitative coronary blood-flow analysis with inflammatory cytokine profile[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2012, 41(1): 154-161.

[14] Cai Z, Luo W, Zhan H, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(43): 17462-17467.

[15] Hu X, Yang Z, Yang M, *et al*. Remote ischemic preconditioning mitigates myocardial and neurological dysfunction via K(ATP) channel activation in a rat model of hemorrhagic shock[J]. Shock, 2014, 42(3): 228-233.

[16] Shan L Y, Li J Z, Zu L Y, *et al*. Platelet-derived microparticles are implicated in remote ischemia conditioning in a rat model of cerebral infarction[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(12): 917-925.

[17] Tapuria N, Kumar Y, Habib M M, *et al*. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury—a review[J]. J Surg Res, 2008, 150(2): 304-330.

[18] Zare-Mehrjerdi F, Aboutaleb N, Habibey R, *et al*. Increased phosphorylation of mTOR is involved in remote ischemic preconditioning of hippocampus in mice[J]. Brain Res, 2013, 1526: 94-101.

[19] Yu Y, Jia X J, Zong Q F, *et al*. Remote ischemic postconditioning protects the heart by upregulating ALDH2 expression levels through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 536-542.

[20] Miura T, Miki T. GSK-3beta, a therapeutic target for cardiomyocyte protection[J]. Circ J, 2009, 73(7): 1184-1192.

[21] Weisleder N, Takeshima H, Ma J. Mitsugumin 53 (MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair[J]. Commun Integr Biol, 2009, 2(3): 225-226.

[22] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, *et al*. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery[J]. Nat Cell biol, 2009, 11(1): 56-64.

(**收稿**:2014-09-02;**修回**:2014-10-15)

(编辑 栗 嘉)