doi:10.11659/jjssx.04E022035

·基础研究·

热休克蛋白 A12B 介导 COX-2 表达调控心肌缺血再灌注损伤中心肌细胞线粒体自噬的作用研究

王书君[1],谭慧琼[2],袁 杰[3] (1.海南医学院第一附属医院老年医学科,海南 海口 570102;2.中国医学科学院阜外医院心血管内科,北京 100037;3.新疆维吾尔自治区人民医院心内科,新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘 要] **目的** 探讨热休克蛋白 A12B(HSPA12B)对心肌缺血再灌注(MI/R)损伤中心肌细胞线粒体自噬的影响及可能的分子机制。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、pLVX-NC 组和 pLVX-HSPA12B 组,每组 10 只。其中,假手术组大鼠仅暴露心脏,不进行 MI/R 处理;模型组大鼠给予心肌内注射 0.9% 氯化钠注射液 20 μL,7 d 后构建 MI/R 模型;pLVX-NC 组大鼠给予心肌内注射 20 μL pLVX-NC 慢病毒液,7 d 后构建 MI/R 模型;pLVX-HSPA12B 组大鼠给予心肌内注射 20 μL pLVX-HSPA12B 慢病毒液,7 d 后构建 MI/R 模型。ELISA 检测各组大鼠血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)含量,HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理学形态,TUNEL 染色检测各组大鼠心肌组织内细胞凋亡情况,免疫组织化学染色检测各组大鼠心肌组织内环氧化酶-2(COX-2)和微管相关蛋白 1 轻链 3β(LC3β)表达,Western blot 检测各组大鼠心肌组织内 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 比值及 Parkin、PINK1 蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的含量均升高,心肌组织损伤较为严重,心肌组织内 TUNEL 阳性细胞率升高,COX-2 阳性表达率上升,而 LC3β 阳性表达率下降,LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 比值下降,Parkin、PINK1 蛋白的表达水平均下调($P<0.05$);与模型组和 pLVX-NC 组比较,pLVX-HSPA12B 组大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的含量均降低,心肌组织损伤现象明显减轻,心肌组织内 TUNEL 阳性细胞率降低,COX-2 阳性表达率下降,同时 LC3β 阳性表达率上升,LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ 比值升高,Parkin、PINK1 蛋白的表达水平均上调($P<0.05$)。**结论** HSPA12B 能够通过增加心肌细胞线粒体自噬途径来缓解 MI/R 模型大鼠心肌损伤,其作用机制可能与抑制 COX-2 表达有关。

[关键词] 心肌缺血再灌注;热休克蛋白 A12B;环氧化酶-2;线粒体;自噬

[中图分类号] R542.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-12

Study on the role of heat shock protein A12B mediated COX-2 expression in regulating mitochondrial autophagy of myocardial cells in myocardial ischemia-reperfusion injury

WANG Shu-jun[1],TAN Hui-qiong[2],YUAN Jie[3] (1. Department of Geriatric Medicine,First Affiliated Hospital of Hainan Medical College,Haikou Hainan 570102,China;2. Department of Cardiovascular Medicine,Fuwai Hospital,Chinese Academy of Medical Sciences,Beijing 100037,China;3. Department of Cardiology,People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region,Urumqi Xinjiang 830001,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of heat shock protein A12B (HSPA12B) on mitochondrial autophagy of myocardial cells in myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) injury and its possible molecular mechanism. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into the sham operation group,the model group,the pLVX-NC group and the pLVX-HSPA12B group,with 10 rats in each group. Among them,rats in the sham operation group only exposed the heart without MI/R treatment,rats in the model group were given intramyocardial injection of 20 μL of 0.9% sodium chloride injection and then the MI/R model was constructed after 7 days;rats in the pLVX-NC group were given intramyocardial injection of 20 μL pLVX-NC lentivirus and then the MI/R model was constructed after 7 days;rats in the pLVX-HSPA12B group were given intramyocardial injection of 20 μL pLVX-HSPA12B lentivirus and then the MI/R model was constructed after 7 days. ELISA was used to determine the levels of serum creatine kinase isoenzymes (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) of rats in each group,HE staining was used to observe the pathological morphology of myocardial tissues of rats in each group,TUNEL staining was used to detect the cell apoptosis in myocardial tissues of rats in each group,the immunohistochemical staining was used to detect the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3β) in myocardial tissues of rats in each group,Western blot was used to determine the ratio of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ and the expression levels of Parkin and PINK1 proteins in myocardial tissues of rats in each group. **Results** Compared with the sham operation group,the levels of serum CK-MB and LDH in the model group increased,the damage of myocardial tissues was more severe,the TUNEL positive cell rate in the myocardial tissues increased,and the COX-2 positive expression rate increased,while the LC3β positive expression rate decreased,the ratio of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ decreased,and the expression levels

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(20A200405)

[通信作者] 王书君,E-mail:fancytemp11@163.com

of Parkin and PINK1 proteins were down-regulated ($P<0.05$). Compared with the model group and the pLVX-NC group, the levels of serum CK-MB and LDH in the pLVX-HSPA12B group decreased, the damage of myocardial tissues was significantly reduced, the TUNEL positive cell rate in the myocardial tissues was reduced, the COX-2 postive expression rate decreased, at the same time, the LC3β positive expression rate increased, the ratio of LC3Ⅱ/LC3Ⅰ increased, and the expression levels of Parkin and PINK1 proteins were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** HSPA12B can alleviate the myocardial injury of MI/R model rats by increasing the mitochondrial autophagy pathway of myocardial cells, and its mechanism may be related to the inhibition of COX-2 expression.

Keywords: myocardial ischemia-reperfusion; heat shock protein A12B; cyclooxygenase-2; mitochondria; autophagy

急性心肌梗死是全球范围内常见的心血管疾病，及时开通梗死相关动脉，恢复缺血心肌的供血，是挽救垂死心肌及防止梗死范围再次扩大的关键。但有研究发现，心肌缺血一段时间后恢复血流灌注会加重心肌结构和功能的损伤，导致心功能下降和恶性心律失常，这一过程称为心肌缺血再灌注（myocardial ischemia-reperfusion，MI/R）损伤[1-2]。目前，MI/R 损伤仍是治疗心肌缺血所面临的主要难题。因此，如何在早期恢复冠脉血流的基础上减少甚至消除 MI/R 损伤的发生具有重要的临床意义。

热休克蛋白 A12B（heat shock protein A12B，HSPA12B）于 2003 年从动脉粥样硬化病变中克隆出来，归类为热休克蛋白 70（HSP70）家族的一员，包含非典型的 ATPase 结构域[3]。与 HSP70 家族其他成员的普遍性表达不同，HSPA12B 在内皮细胞中特异性表达，能够抵御多种有害因素。已有研究表明，HSPA12B 能够在心肌梗死和脑缺血后发挥对组织器官的保护作用[4-5]，还能够改善脓毒症引起的心脏功能障碍[6]，但相关的作用机制尚未明确。

为进一步确定 HSPA12B 在 MI/R 损伤中的具体作用及机制，本研究通过构建 MI/R 大鼠模型并给予含 HSPA12B 的慢病毒液预先处理，观察 HSPA12B 对 MI/R 心肌组织损伤及心肌组织内环氧化酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）表达的影响，并检测线粒体自噬途径的变化情况，旨在揭示 HSPA12B 调控 MI/R 损伤的作用机制，为 MI/R 损伤的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康 SD 大鼠，雄性，4 周龄，体质量（200 ± 20）g，购自海南药物研究所有限责任公司，饲养于无特定病原体屏障环境中，温度（23 ± 2）℃，相对湿度（50 ± 5）%，12 h/12 h 明暗周期交替，实验期间自由饮水、摄食。本实验获得中国科学院阜外医院动物伦理委员会审核批准（K20211021208）。

1.2 主要试剂

空白慢病毒载体 pLVX-NC 和含 HSPA12B 慢病毒载体 pLVX-HSPA12B 的合成和包装均由上海吉玛制药技术有限公司完成。血清肌酸激酶同工酶（creatine kinase isoenzymes，CK-MB）和乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）特异性 ELISA 试剂盒购自上海慧颖生物公司，HE 染色试剂盒购自北京索莱宝生物公司，TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翌圣生物公司，免疫组织化学染色试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司，DAB 显色液、RIPA 裂解液、考马斯亮蓝试剂盒和 ECL 发光试剂液购自上海碧云天生物研究所，兔抗人 COX-2 多克隆、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3β（microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta，LC3β）多克隆、兔抗人 Parkin 多克隆、兔抗人 PINK1 多克隆及兔抗鼠 GAPDH 多克隆等抗体均购自英国 Abcam 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 分组与处理

将 40 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为 4 组，每组 10 只。假手术组大鼠仅暴露心脏，不进行 MI/R 处理；模型组大鼠心肌内注射 0.9% 氯化钠注射液 20 μL，7 d 后构建 MI/R 模型；pLVX-NC 组大鼠心肌内注射 20 μL pLVX-NC 慢病毒液，7 d 后构建 MI/R 模型；pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌内注射 20 μL pLVX-HSPA12B慢病毒液，7 d 后构建 MI/R 模型。注射操作如下：将大鼠消毒后麻醉，仰卧位固定，气管插管并连接动物呼吸器进行机械通气；在大鼠左胸第 4 和第 5 肋骨之间剪开皮肤，使心脏完全暴露，采用微量注射器分 4 点在各组大鼠心肌中注射相应液体，留置注射针 2 min，闭合胸腔，肌内注射 1.5 mL/kg 硫酸庆大霉素抗感染，每日 1 次，持续 3 d。

1.4 动物造模

参考文献[7]方法构建 MI/R 大鼠模型。将大鼠消毒后，腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉，然后固定在动物实验台上，气管插管并连接动物呼吸器进行机械通气。在大鼠左胸第 4 和第 5 肋骨间剪开皮肤，使心脏完全暴露，用丝线在冠状动脉左前降支下约 2 mm处进行结扎，以阻塞左冠状动脉前降支，心电图观察 ST 段抬高 0.1 mV 左右，持续结扎 40 min 进行缺血处理，之后释放结扎丝线，再灌注 120 min，待 ST 段

下降到缺血时的 0.05 mV,即成功构建大鼠 MI/R 模型。随后立即闭合胸腔,缝合切口,消毒,肌内注射 1.5 mL/kg硫酸庆大霉素抗感染,每日 1 次,持续 3 d。

1.5 ELISA 检测心肌损伤指标

处理结束后,各组大鼠经尾静脉采血 2 mL,室温静置 2 h,4 ℃低温以 4 000 r/min 离心 20 min,制备血清。将样品加入各反应孔,使用大鼠特异性 ELISA 试剂盒测定各组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 含量。

1.6 HE 染色观察心肌组织病理学改变

采血后处死各组大鼠,无菌环境下解剖取各组大鼠心肌组织,清洗干净,在 4% 多聚甲醛中固定,然后经梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,制备厚度约为 5 μm 的切片。将切片脱蜡水化,苏木素染色 10 min,流水冲洗多余染液,1% 酒精—盐酸分化,水洗,反蓝,伊红染色 1 min,再次经梯度酒精脱水,二甲苯透明,随后中性树胶封固,光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理学变化,并摄取图片。

1.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况

取制备的各组大鼠心肌组织切片,以梯度酒精脱水,二甲苯透明,PBS 清洗,加入 20 μg 蛋白酶 K 溶液,室温水解 15 min,蒸馏水清洗;加入含 2% 过氧化氢的 PBS,室温反应 5 min,PBS 清洗,弃掉组织周围多余染液,滴加 TdT 试剂液,置于湿盒中 37 ℃孵育 60 min;终止反应后,PBS 清洗,使用新鲜配制的 DAB 溶液室温显色 5 min,脱水透明,随后中性树胶封固,光学显微镜下随机选择 5 个 200 倍镜视野进行观察。阳性细胞呈褐色,计数视野下 200 个细胞与其中的阳性细胞数,计算各组大鼠心肌组织内 TUNEL 染色阳性细胞率。

1.8 免疫组织化学染色检测心肌组织中 COX-2、LC3β 表达

各组大鼠心肌组织切片以二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,柠檬酸钠修复抗原,0.3% 过氧化氢液室温孵育 10 min,PBS 浸泡清洗,再以 10% 山羊血清进行封闭。结束后,分别滴加兔抗人 COX-2(1∶100)、LC3β(1∶200)多克隆抗体,4 ℃孵育过夜。次日,弃掉原液,PBS 清洗,滴加对应的二抗(1∶5 000),室温孵育 1 h 后采用 DAB 溶液室温显色,冲洗干净,随后苏木精复染,脱水透明,中性树胶封固,光学显微镜观察组织内着色情况。阳性染色为胞质或胞核呈棕色至深褐色,随机选择 5 个视野,利用 Image J 软件进行分析,计算各组大鼠心肌组织内 COX-2、LC3β 阳性表达率。

1.9 Western blot 检测相关蛋白的表达

将各组大鼠心肌组织在无菌环境下剪碎,加入液氮研磨,添加适量 RIPA 裂解液,置于冰上裂解,以提取组织总蛋白,考马斯亮蓝法测定。取各组蛋白样品,98 ℃水浴加热,并制备 10% SDS-PAGE,取等量的蛋白样品进行上样后,经电泳分离蛋白,80 V 恒压电泳 20 min,110 V 再电泳 60 min,恒压 100 V 处理 90 min,将分离的蛋白转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入相应一抗工作液,4 ℃孵育过夜。次日,弃掉原液,TBST 洗膜后加入相应的二抗,室温孵育 2 h,TBST 再次洗膜,ECL 显色,凝胶成像系统拍照,以 GAPDH 作为内参蛋白,Image J 软件分析蛋白条带灰度值,计算 LC3 Ⅰ、LC3 Ⅱ、Parkin 及 PINK1 蛋白的相对表达水平。

1.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.30 软件进行数据统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清心肌损伤标志物水平

与假手术组比较,模型组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 的含量均明显升高($P<0.05$);与模型组和 pLVX-NC 组比较,pLVX-HSPA12B 组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 的含量均明显降低($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清心肌损伤指标水平比较($\bar{x} \pm s$,$n=10$,U/L)

组别	CK-MB	LDH
假手术组	423.23 ± 40.02	160.39 ± 15.23
模型组	783.45 ± 72.37 *	331.67 ± 30.82 *
pLVX-NC 组	786.04 ± 72.49	329.85 ± 30.40
pLVX-HSPA12B 组	663.71 ± 62.76 #△	236.91 ± 21.73 #△

*:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 pLVX-NC组比较,$P<0.05$。

2.2 各组大鼠心肌组织病理变化

假手术组大鼠心肌组织结构正常,组织内细胞排列较为整齐,心肌纤维紧密,无明显的肿胀及紊乱现象;模型组和 pLVX-NC 组大鼠心肌纤维肿胀变大,出现断裂,并伴大量炎性细胞浸润;与模型组和 pLVX-NC 组比较,pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌组织病理损伤现象得到缓解,心肌纤维断裂现象减少,心肌细胞排列较为整齐(图 1)。

2.3 各组大鼠心肌组织细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示,模型组大鼠心肌组织内 TUNEL 阳性细胞率较假手术组明显升高($P<0.05$),表明凋亡细胞增加;pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌组织内 TUNEL 阳性细胞率较模型组和 pLVX-NC 组明显下降($P<0.05$),表明凋亡细胞减少(图 2)。

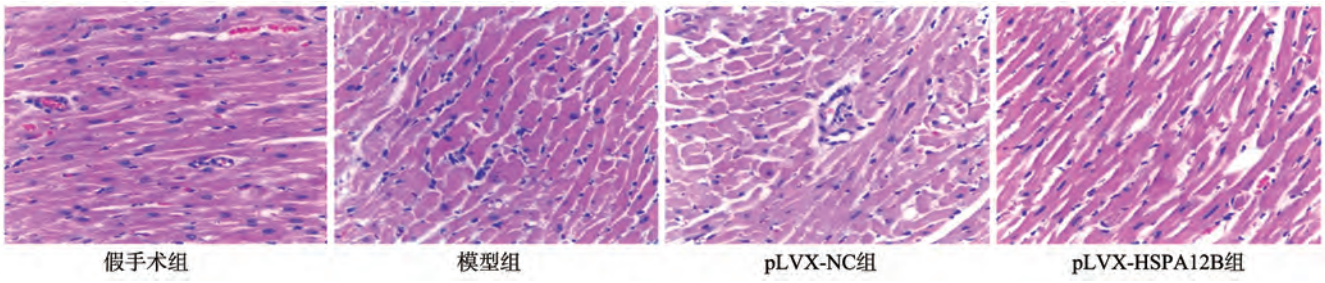
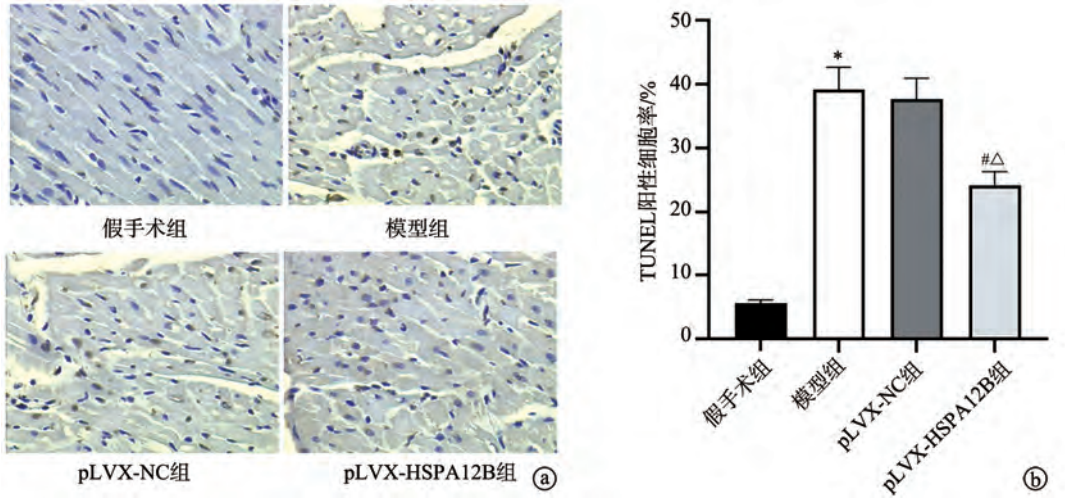


图 1 各组大鼠心肌组织病理学形态(HE 染色 ×100)

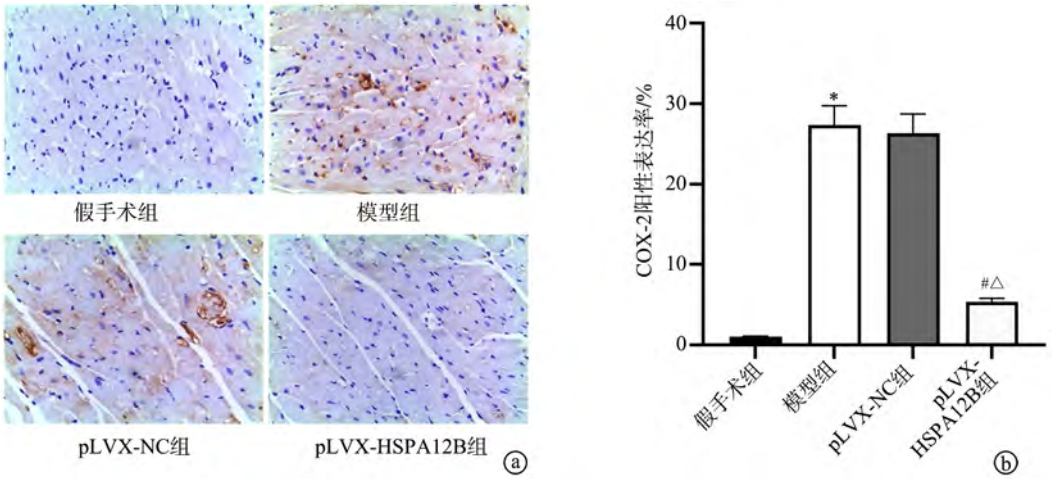


a:TUNEL 染色(×200);b:TUNEL 染色阳性细胞率 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 pLVX-NC 组比较,$P<0.05$

图 2 TUNEL 染色观察各组大鼠心肌细胞凋亡情况

2.4 各组大鼠心肌组织 COX-2 表达

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织内染色加深,COX-2 阳性表达率明显升高($P<0.05$);与模型组和 pLVX-NC 组比较,pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌组织内染色明显变浅,COX-2 阳性表达率明显降低($P<0.05$),见图 3。

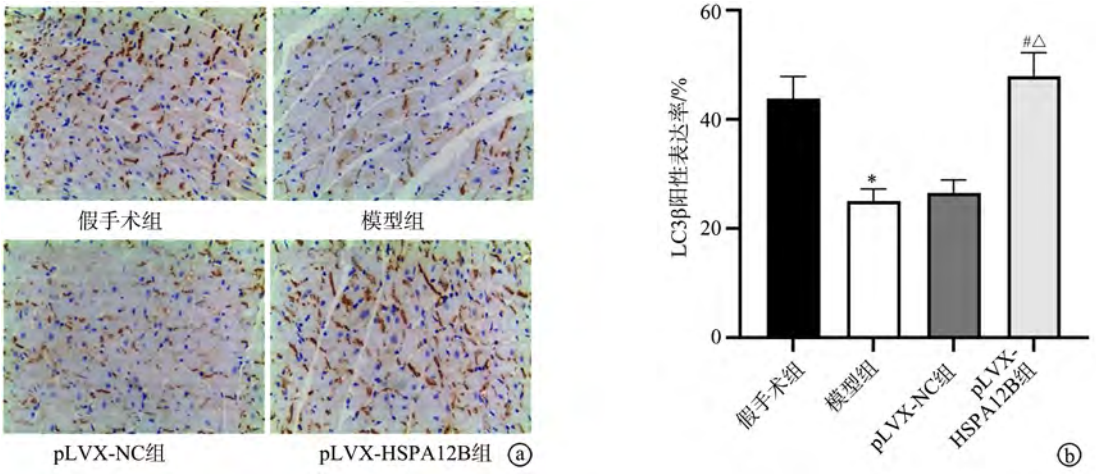


a:免疫组织化学染色(×100);b:COX-2 阳性表达率 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 pLVX-NC 组比较,$P<0.05$

图 3 免疫组织化学染色观察各组大鼠心肌组织 COX-2 表达

2.5 各组大鼠心肌细胞线粒体自噬水平

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织内染色较少,且颜色变浅,LC3β 阳性表达率明显下降($P<0.05$);而相较于模型组和 pLVX-NC 组,pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌组织内染色加深,LC3β 阳性表达率明显上升($P<0.05$),见图 4。

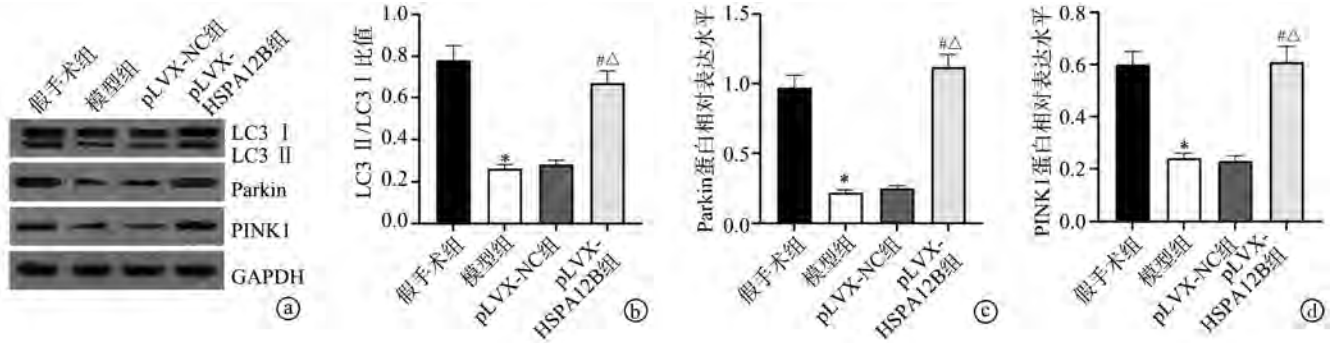


a:免疫组织化学染色(×100);b:LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值;c:Parkin 蛋白相对表达;d:PINK1 蛋白相对表达 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 pLVX-NC 组比较,$P<0.05$

图 4 免疫组织化学染色观察各组大鼠心肌组织 LC3B 表达

2.6 各组大鼠心肌组织自噬相关蛋白表达

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织内 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值下降($P<0.05$),Parkin、PINK1 蛋白的表达水平明显下调($P<0.05$);与模型组和 pLVX-NC 组比较,pLVX-HSPA12B 组大鼠心肌组织内 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值上升($P<0.05$),Parkin、PINK1 蛋白的表达水平明显上调($P<0.05$),见图 5。



a:各蛋白条带;b:LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值;c:Parkin 蛋白相对表达水平;d:PINK1 蛋白相对表达水平 *:与假手术组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$;△:与 pLVX-NC 组比较,$P<0.05$

图 5 Western blot 检测各组大鼠心肌组织内相关蛋白表达

3 讨论

MI/R 诱导的心肌细胞死亡是导致冠心病患者死亡的主要病理因素之一。MI/R 会引发一系列复杂的炎症反应及严重的组织损伤和心律失常,阻止心脏收缩功能恢复,并导致缺血组织中细胞死亡[2,8]。目前,MI/R 引发的一系列复杂性损伤已成为全球范围内致残和致死的主要因素,也是心血管疾病患者死亡的主要原因[9]。而且没有切实可行的解决方案能够彻底避免 MI/R 损伤,迫切需要制定出针对治疗 MI/R 损伤的新策略。因此,本研究通过使用含HSPA12B的慢病毒液预先处理大鼠后构建 MI/R 模型,了解其对 MI/R 损伤的潜在作用机制,以期为 MI/R 的治疗策略提供参考。

HSPA12B 作为内皮细胞中特异性表达的热休克蛋白,参与内皮细胞的增殖和迁移,能够促进血管生成,现已证明 HSPA12B 在一些疾病中发挥重要的治疗作用。Zhao 等[10]研究表明,HSPA12B 过表达可通过 eNOS 依赖性机制促进缺血性中风慢性期小鼠的神经功能恢复并提高其存活率;Zhang 等[6]研究发现,HSPA12B可通过调节靶向黏附分子的 miR-126 表达来预防败血症诱导的严重心肌病,从而减少心肌中免疫细胞的积累;Thirunavukkarasu 等[11]的研究指出,HSPA12B基因疗法可以改善后肢缺血小鼠的运动功能,促进新生血管形成,并减少组织纤维化。本研究结果显示,与模型组和 pLVX-NC 组比较,在经 HSPA12B 预处理的 MI/R 大鼠模型中,血清中损伤标志物 CK-MB和 LDH 的含量均下降,心肌组织损伤现象明显减轻,进一步说明了 HSPA12B 对 MI/R 损伤具有良好

的缓解作用。

COX 是前列腺素生物合成的限速酶,其有 COX-1 和 COX-2 两种异构体。COX-1 在许多组织中表达,主要在组织稳态中发挥作用;相比之下,COX-2 作为一种诱导性酶,是各种炎症过程的中心环节,负责在炎症和伤口愈合部位产生前列腺素[12]。COX-2 在炎症血管中表达上调,并在动脉粥样硬化、动脉瘤和动脉球囊损伤中对病程发展起到促进作用[13]。另外,Yin 等[14]通过将主动脉血管内皮细胞暴露在 PM2.5 环境中后发现,COX-2 的表达水平明显上调,而在暴露于 PM2.5 环境前用特定 COX-2 抑制剂处理血管内皮细胞后,不仅完全阻止了细胞凋亡,而且还减轻了炎症反应。越来越多的研究表明,COX-2 与心肌梗死疾病的进展有关,Abbate 等[15]研究表明,COX-2 在心肌梗死患者的心肌细胞中高表达,并与细胞凋亡呈正相关;贾丹等[16]指出,抑制 COX-2 活性能够降低体外缺氧/复氧实验模拟的 MI/R 中促炎因子的转录,并对 H9C2 心肌细胞具有保护作用。鉴于此,本研究通过检测各组MI/R大鼠心肌组织内 COX-2 表达发现,与模型组和 pLVX-NC 组比较,经 HSPA12B 预处理的 MI/R 大鼠心肌组织内 COX-2 阳性表达率明显降低。由此推测,HSPA12B可能通过介导 COX-2 在 MI/R 损伤中发挥作用。

终末分化心肌细胞的死亡是各种心脏疾病发生的主要原因,包括心力衰竭、心肌梗死及 MI/R 损伤。在心脏病发病过程中,细胞凋亡和坏死都能够导致心肌细胞死亡,而心肌细胞死亡是 MI/R 损伤中心脏功能衰竭的核心特征[17]。心肌细胞死亡是不可逆的,并伴细胞膜电位的快速丧失,从而导致细胞肿胀、破裂、溶解及后续炎症的发生。线粒体自噬指细胞降解自身线粒体的过程,该途径可以清除 MI/R 损伤下心脏中功能失调的线粒体,以减轻病理损伤[18]。研究表明,心肌细胞中线粒体自噬的机制是由胞质 E3 泛素连接酶 Parkin 和线粒体膜激酶 PTEN 诱导的推定激酶 PINK1 介导,PINK1 在线粒体中选择性稳定,其内膜上的电位降低,并将 Parkin 募集到线粒体以激活其 E3 泛素连接酶活性,导致线粒体自噬并通过自噬机制去除受损的线粒体[19]。此外,Parkin 非依赖性线粒体自噬途径由 Bcl-2、BNIP3 或 BNIP3L 介导,这些受体激活后可直接与 LC3β 结合,促进缺氧条件下的线粒体自噬发生。本研究经检测发现,与模型组和 pLVX-NC 组比较,经 HSPA12B 预处理的 MI/R 大鼠模型心肌组织内 LC3β 阳性表达率上升,Parkin、PINK1 蛋白的表达水平明显上调,LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比值也升高。由此推测,HSPA12B 作用下增加了 MI/R 大鼠心肌细胞线粒体自噬,从而发挥对心脏组织的保护作用。

综上,大鼠 MI/R 损伤会导致 COX-2 表达升高,线粒体自噬功能降低,心肌组织损伤,而 HSPA12B 能够抑制 COX-2 表达,并增加线粒体自噬,从而逆转 MI/R 损伤。本研究从线粒体自噬入手,为探究以 HSPA12B 为靶点改善 MI/R 损伤提供了实验依据。

[参考文献]

[1] de Lucia C, Piedepalumbo M, Wang L, et al. Effects of myocardial ischemia/reperfusion injury on plasma metabolomic profile during aging[J]. Aging Cell, 2021, 20(1): e13284. doi: 10.1111/acel.13284.

[2] Curran J, Burkhoff D, Kloner RA. Beyond reperfusion: acute ventricular unloading and cardioprotection during myocardial infarction[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2019, 12(2): 95-106. doi: 10.1007/s12265-019-9863-z.

[3] Han Z, Truong QA, Park S, et al. Two Hsp70 family members expressed in atherosclerotic lesions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 1256-1261. doi: 10.1073/pnas.252764399.

[4] Fan M, Yang K, Wang X, et al. Endothelial cell HSPA12B and yes-associated protein cooperatively regulate angiogenesis following myocardial infarction[J]. JCI Insight, 2020, 5(18): e139640. doi: 10.1172/jci.insight.139640.

[5] Liu K, Hao X, Wang Q, et al. Genome-wide identification and characterization of heat shock protein family 70 provides insight into its divergent functions on immune response and development of Paralichthys olivaceus[J]. Peer J, 2019, 7: e7781. doi: 10.7717/peerj.7781.

[6] Zhang X, Wang X, Fan M, et al. Endothelial HSPA12B exerts protection against sepsis-induced severe cardiomyopathy via suppression of adhesion molecule expression by miR-126[J]. Front Immunol, 2020, 11: 566. doi: 10.3389/fimmu.2020.00566.

[7] 钟 泽,罗秀英,相 鹏,等. 组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 对大鼠心肌缺血再灌注损伤介导的细胞焦亡调控作用[J]. 中华心血管病杂志(网络版),2020,3(1):13. doi:10.3760/cma.j.issn.2096-1588.2020.1000071.

[8] Mauler M, Herr N, Schoenichen C, et al. Platelet serotonin aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil degranulation[J]. Circulation, 2019, 139(7): 918-931. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033942.

[9] Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(7): 165768. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165768.

[10] Zhao Y, Liu C, Liu J, et al. HSPA12B promotes functional recovery after ischaemic stroke through an eNOS-dependent mechanism[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(4): 2252-2262. doi: 10.1111/jcmm.13507.

[11] Thirunavukkarasu M, Tipu Rishi M, Pradeep SR, et al. Heat shock protein A12B gene therapy improves perfusion, promote sneovascularization, and decreases fibrosis in a murine model of hind limb ischemia[J]. Surgery, 2021, 170(3): 969-977. doi: 10.1016/j.surg.2021.05.006.

[12] Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights[J]. J Lipid Res, 2009, 50 Suppl(Suppl): S29-S34. doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.

doi:10.11659/jjssx.03E022058

·基础研究·

THBS1 基因编辑 BMSCs 对变应性鼻炎模型小鼠鼻黏膜屏障功能及炎症反应的影响

王 丽,黄永阳,张 义,綦 彬,万 龙,杜炎平,陈才盛 (黄冈市中心医院耳鼻喉头颈外科,湖北 黄冈 438000)

[摘 要] **目的** 探究血小板反应蛋白 1(THBS1)基因编辑骨髓间充质干细胞(BMSCs)对变应性鼻炎(AR)小鼠的鼻黏膜屏障功能与炎症反应的影响。**方法** 分离培养小鼠 BMSCs,流式细胞仪测定细胞表面标记物表达,茜素红染色和油红 O 染色检测细胞成骨与成脂分化能力,鉴定分离的结果;使用含 THBS1 基因的慢病毒感染 BMSCs,荧光显微镜观察细胞内绿色荧光蛋白 EGFP 表达,并以实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞内 THBS1 mRNA 和蛋白表达情况,鉴定感染效果。实验分为对照组、模型组、BMSCs组、THBS1-BMSCs 组,每组 15 只,除对照组外的其余 3 组小鼠均构建 AR 模型,对照组和模型组小鼠均尾静脉注射 0.1 mL PBS,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠分别尾静脉注射 0.1 mL BMSCs、0.1 mL 经 THBS1 基因编辑的 BMSCs。处理结束后,对各组小鼠流涕、挠鼻及喷嚏情况进行统计,ELISA 法检测血清 IFN-γ、IgE、TNF-α、IL-4 及 IL-6 的含量,HE 染色和 PAS 染色观察鼻黏膜病理形态学变化,免疫荧光染色检测鼻黏膜内 CK-5 与 β-tubulin 表达情况,Western blot 检测鼻黏膜内紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 的水平。**结果** 分离的细胞表面 CD105、CD90 和 CD73 为阳性表达,CD34 和 CD45 为阴性表达,并具备良好的成骨与成脂分化能力,说明成功分离到 BMSCs。经含 THBS1 基因的慢病毒感染后的 BMSCs 出现明显绿色荧光蛋白 EGFP 表达,THBS1 mRNA 和蛋白相对表达均上调($P<0.05$)。与对照组比较,模型组小鼠精神萎靡,伴有连续性喷嚏和挠鼻次数增加($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量降低,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均升高($P<0.05$),鼻黏膜结构受损,有大量嗜酸性粒细胞浸润,且杯状细胞数目也明显增加($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度均减弱($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达均下调($P<0.05$);与模型组比较,BMSCs 组和 THBS1-BMSCs 组小鼠精神状态有所好转,喷嚏和挠鼻次数减少($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均降低($P<0.05$),鼻黏膜内嗜酸性粒细胞与杯状细胞数目均减少($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 的荧光强度增强($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达量均上调($P<0.05$);与 BMSCs 组比较,THBS1-BMSCs 组小鼠喷嚏和挠鼻次数减少($P<0.05$),血清 IFN-γ 含量升高,IgE、TNF-α、IL-4、IL-6 含量均降低($P<0.05$),鼻黏膜嗜酸性粒细胞与杯状细胞数目均进一步减少($P<0.05$),CK-5 与 β-tubulin 荧光强度显著增强($P<0.05$),Claudin-1、Occludin 的蛋白相对表达均上调($P<0.05$)。**结论** 经 THBS1基因编辑的 BMSCs 可明显增强 AR 小鼠的鼻黏膜屏障功能,降低炎症反应,从而减轻鼻部症状。

[关键词] 血小板反应蛋白 1;骨髓间充质干细胞;变应性鼻炎;鼻黏膜功能;炎症

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-03-11

Effects of THBS1 gene-edited BMSCs on nasal mucosal barrier function and inflammatory response in model mice with allergic rhinitis

WANG Li, HUANG Yong-yang, ZHANG Yi, QI Bin, WAN Long, DU Yan-ping, CHEN Cai-sheng (Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Huanggang Central Hospital, Huanggang Hubei 438000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of thrombospondin-1 (THBS1) gene-edited bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the nasal mucosal barrier function and inflammatory response in mice with allergic rhinitis (AR). **Methods** Mouse BMSCs

[基金项目] 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2018F087)

[13] Lee JS, Kim HS, Hahm KB, et al. Effects of genetic and pharmacologic inhibition of COX-2 on colitis-associated carcinogenesis in mice[J]. J Cancer Prev, 2020, 25(1): 27-37. doi: 10.15430/JCP.2020.25.1.27.

[14] Yin J, Xia W, Li Y, et al. COX-2 mediates PM2.5-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(9): 3967-3976.

[15] Abbate A, Santini D, Biondi-Zoccai GG, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? [J]. Heart, 2004, 90(4): 440-443. doi: 10.1136/hrt.2003.010280.

[16] 贾 丹,张 媛,连 鑫,等. 抑制 COX-2 表达对心肌缺血再灌注损伤过程中心肌细胞保护作用的研究[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(3): 495-498. doi: 10.3969/j.issn.1007-4287.2020.03.042.

[17] 王明亮,刘 敏,徐亚伟,等. 心肌缺血再灌注时内皮功能紊乱与心肌细胞凋亡的相关性研究[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(4): 501-505. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.04.020.

[18] Chen W, Lv L, Nong Z, et al. Hyperbaric oxygen protects against myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting mitochondria dysfunction and autophagy[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 4254-4264. doi: 10.3892/mmr.2020.11497.

[19] Yuan Y, Zheng Y, Zhang X, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1754-1766. doi: 10.1080/15548627.2017.1357792. doi: 10.1080/15548627.2017.1357792.

(编辑:龙小芬)