

· 论 著 ·

MG53 对重度烫伤小鼠肾脏保护作用的研究*

武艳军, 刘岱松, 谭江玲, 崔艳艳, 贺伟峰, 罗高兴, 吴 军[△]

(第三军医大学附属西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨 Mitsugumin 53(MG53)对重度烫伤小鼠内脏器官的保护作用。方法 通过向 30%Ⅲ度烫伤小鼠的尾静脉注射外源性重组的人 MG53(rhMG53)蛋白,观察小鼠病死率和各脏器组织改变,并用免疫组织化学法检测外源性 rhMG53 蛋白的分布。结果 与对照组比较,注射 rhMG53 的小鼠病死率较低,差异无统计学意义($P>0.05$)。组织病理学观察,实验组静脉注射 MG53 后肾脏损伤情况较轻,肾小管损伤病理评分较低,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组织化学发现外源性 rhMG53 分布于部分肾小管上皮细胞胞质内以及部分肺小静脉内皮细胞胞质内。其他脏器组织学未见明显的 rhMG53 阳性染色。结论 MG53 对重度烫伤小鼠的肾脏有一定的保护作用。

关键词: 烫伤;死亡率;肾;rhMG53

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2320-04

Protection of MG53 on kidney in mice with severe burn injury*

Wu Yanjun, Liu Daisong, Tan Jiangling, Cui Yanyan, He Weifeng, Luo Gaoxing, Wu Jun[△]

(Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To understand the possible roles of Mitsugumin53 (MG53) in protection of internal organs after severe burn injury. **Methods** A burn model of 30% of total body surface area (TBSA) was set up as reported. Recombinant human MG53 (rhMG53) protein was intravenously injected via tail vein. The mortality, histological alteration and immunohistochemical staining were observed and recorded. **Results** The mortality in rhMG53 protein injection group was lower than that in control group. However, there was no statistically significant difference ($P>0.05$). rhMG53 administration could apparently alleviate histological alteration of renal tubular epithelial cells after burn injury. The renal tubular injury scores of MG53 treated group were lower than that of control group ($P<0.05$). Immunohistochemical staining found that exogenous rhMG53 was located in renal tubular epithelial cells and pulmonary intravenous endothelial cells. **Conclusion** MG53 could protect kidney from severe burn injury.

Key words: burn injury; mortality; kidney; rhMG53

内脏器官是机体各项生命活动的参与者和维持者。严重烧伤会造成机体内脏器官的损伤。加强重要内脏损伤的防治和促进受损脏器早日修复与重建是提高救治成功率 and 大幅度降低病死率的关键^[1]。既往采取的各种措施,常常仅是针对发病机制的某一环节,并不直接作用于修复细胞本身,缺乏对脏器的主动修复。因此,如何加速与促进受损内脏细胞的主动修复有可能为治疗提供新的有效途径,具体重要的理论意义和临床应用价值。MG53,一种肌肉特有的 TRIM 家族蛋白,是细胞膜损伤修复的一个必不可少的组分。有研究表明,重组的人 MG53(rhMG53)能够治疗肌营养不良症以及以细胞膜损伤为发病机制的其他人类疾病。小鼠动物实验研究表明,通过各种途径给予 rhMG53,都能够提高骨骼肌细胞膜修复能力,同样也能一定程度上改善肌营养不良症的组织病理变化^[2]。本研究以 30%的Ⅲ度烫伤小鼠为模型,观察静脉注射 rhMG53 对重度烧伤小鼠生存率和脏器组织的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 清洁级 Bal b/c 小鼠,雄性,体质量 19~21 g,由第三军医大学动物中心提供。自由进食和饮水。动物饲养在洁净动物室,经适应性饲养 1 周。

1.2 方 法

1.2.1 Ⅲ度小鼠烫伤模型的建立 实验前 24 h,每只小鼠背部脱毛,然后用脱毛膏(婷脱毛膏购自利洁时家化中国有限公司)涂在小鼠背部至两侧腋中线,5~10 min 后用清水冲净,观察 24 h,确定脱毛部位无红肿、炎症和破损等异常情况。24 h 后,1%异戊巴比妥浅麻醉小鼠,采用恒温恒压电烫伤仪,分别以 90℃,8 s,0.5 kg 为致伤条件,在小鼠背部制造约占小鼠体表面积的 30%的Ⅲ度烫伤创面(病理学证实)^[3]。伤后立即予以腹腔注射乳酸钠林格液补液(参照 Parkland 公式)^[4]。

1.2.2 实验分组及给药方式 制作严重烧伤模型小鼠 16 只,随机分成清蛋白(BSA)对照组、MG53 治疗组,每组 8 只。实验组按照 3 mg/kg,经尾静脉注射给予 rhMG53,分别于伤后 0.5、6.5 h 分 2 次给药^[2];对照组给予同等剂量的 BSA。

1.2.3 伤后 48 h 内动物死亡的观察 实验动物烧伤后每 6 小时记录 1 次,至烧伤 48 h。实验重复 5 次。

1.2.4 组织样本准备与组织病理学观察 伤后 48 h,存活的实验动物在 1%异戊巴比妥麻醉后经左心室用 4℃的 4%多聚甲醛 20 mL 灌注固定。取出小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、结肠、皮肤、肌肉、脑固定于 4%多聚甲醛液。取出的各组

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81027004,30571922);国家重点实验室资金资助项目(SKLZZ200808,SKLZZ200820)。作者简介:武艳军(1986~),在读硕士,主要从事组织重建与修复工作。△ 通讯作者,Tel:(023)65461667;E-mail:junwuprol@yahoo.com.cn。

织,按常规石蜡切片制作方法进行脱水透明、石蜡包埋、切片、切片厚度为 5 μm,苏木精-伊红(HE)染色,显微镜观察并照相。

1.2.5 肾小管坏死程度病理评分^[5] 随机选取每只小鼠肾脏切片 1 张,并在显微镜下随机选取 20 个视野观察,根据肾小管的坏死程度,采用 Erdogan 等的半定量病理评估法评分。评分越高说明肾小管坏死越严重,0 分:正常肾脏;1 分:最少坏死(<5%肾小管坏死);2 分:轻度坏死(5%~25%肾小管坏死);3 分:中度坏死(25%~75%肾小管坏死);4 分:重度坏死(>75%的肾小管坏死)。

1.2.6 免疫组织化学^[6] 石蜡切片经过常规的脱蜡、水化,用 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化酶,抗原修复液 I (购自武汉博士德生物工程有限公司)进行抗原修复,封闭用正常山羊血清(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)进行封闭,然后依次加入 1:100 的兔抗人 MG53 一抗(由 UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School 麻建杰教授实验室提供^[7])、山羊抗兔二抗(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)及辣根过氧化物标记的链霉卵白素(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)孵育。DAB 显色,HE 复染,显微镜下观察。MG53 以细胞质内出现棕褐色颗粒为阳性信号。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验和 Kaplan-Meier 进行统计分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MG53 对烧伤小鼠病死率的影响 根据 MG53 在体内的半衰期^[2],本研究小鼠烫伤后 0.5、6.5 h;2 次将 MG53 蛋白静脉注射入实验小鼠体内。结果发现 MG53 治疗组伤后 48 h 的病死率为 25%,BSA 组伤后 48 h 的病死率为 37.5%,MG53 治疗组病死率低于 BSA 对照组,但两者比较差异无统计学意义(*P*>0.05),见图 1。

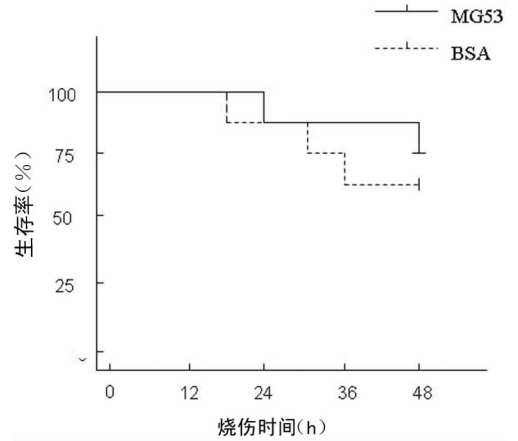


图 1 小鼠严重烧伤后 48 h 内, MG53 实验组和 BSA 对照组生存曲线

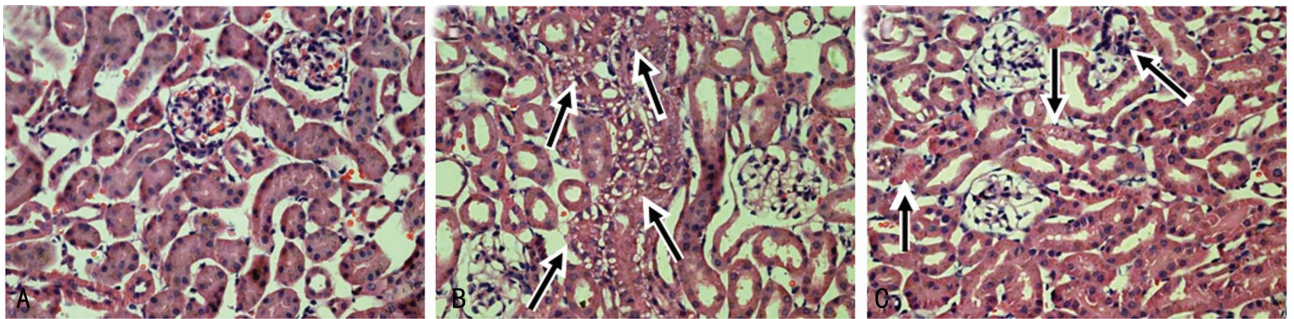


图 2 各组肾脏的组织学变化(HE×400) A:正常肾脏组织;B:BSA 对照组肾脏组织,肾小管空泡变性和坏死普遍存在(箭头);C:MG53 实验组的肾脏组织,与 BSA 对照组相比,病理损伤较轻(箭头)。

图 2 各组肾脏的组织学变化(HE×400)

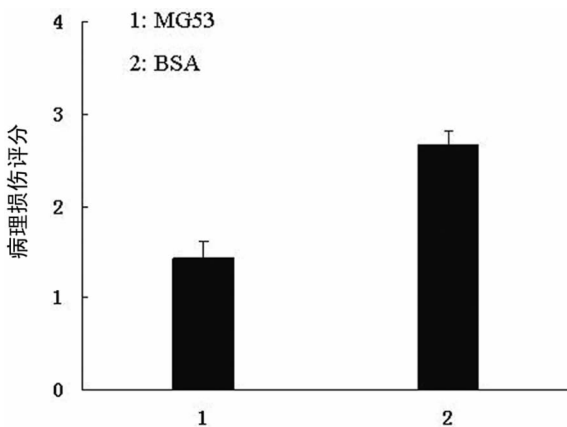


图 3 各组的肾小管病理损伤评分

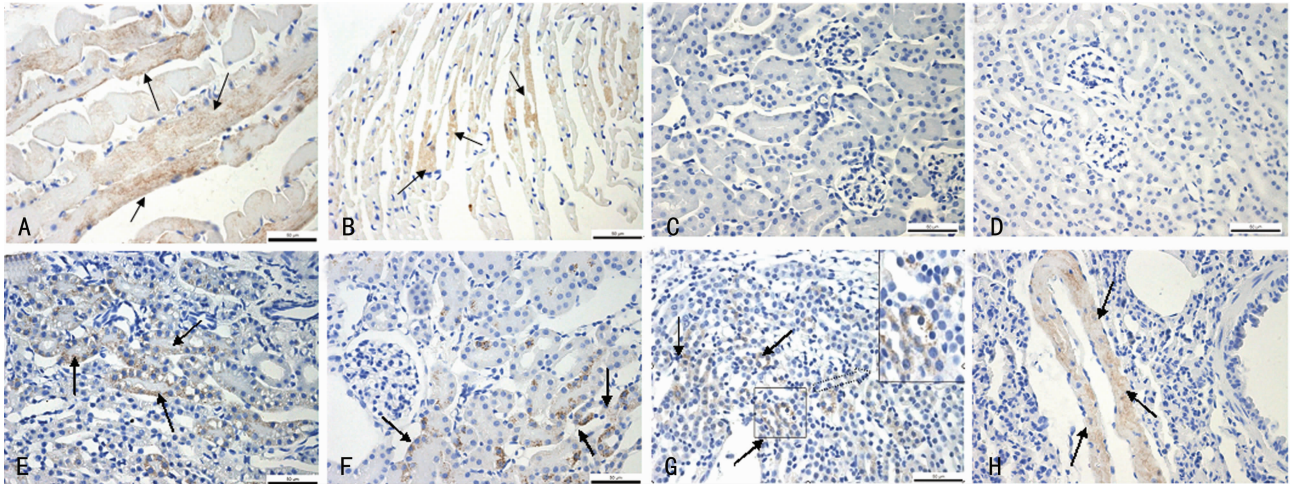
2.2 MG53 对烧伤小鼠各脏器组织学变化的影响 HE 染色结果显示,严重烧伤后小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、结肠、

皮肤、肌肉、脑组织等脏器均有不同程度的组织学变化,但 MG53 治疗组和 BSA 对照组在上述多数组织中无明显的差别。有明显差别的脏器是肾脏。组织切片显示 MG53 治疗组的肾脏近曲小管和远曲小管上皮细胞浊肿变性、坏死脱落以及肾间质炎症细胞浸润方面较对照组有明显改善(图 2)。肾小球无明显变化。烫伤后 48 h, MG53 治疗组的 Erdogan 半定量病理评分显著低于 BSA 对照组肾小管病理损伤评分,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 3。

2.3 外源性 rhMG53 在烧伤小鼠体内分布 免疫组化结果显示,没有给予 rhMG53 的小鼠体内,内源性 MG53 主要分布在心肌和骨骼肌,可见骨骼肌细胞胞质和心肌细胞呈强阳性染色(图 4A、4B)。除心肌和骨骼肌外,其他组织均为阴性。在 MG53 治疗组,小鼠的 rhMG53 主要分布于部分肾皮质肾小管上皮细胞(图 4F)和部分肾髓质肾小管上皮细胞(图 4G),并且强阳性染色主要集中于肾小管损伤严重的区域(图 4E),另外,

rhMG53 还分布于肺脏部分小静脉内皮细胞胞质中(图 4H),

而对照组在这些部位未见阳性细胞。



A: 正常肌肉组织中内源性 MG53 的表达; B: 正常心肌细胞中内源性 MG53 的表达; C: 正常肾脏组织中无 MG53 的表达; D: BSA 对照组的肾脏组织中没有外源性 MG53 的分布; E: 并且强阳性染色主要集中于肾小管损伤严重的区域; F: MG53 实验组中, 外源性 MG53 主要分布于部分肾皮质肾小管上皮细胞; G: 部分肾髓质肾小管上皮细胞; H: 外源性 MG53 还分布于肺脏部分小静脉内皮细胞胞浆中。(箭头指示的位置为阳性信号, 比例尺 = 100 μm)。

图 4 各组小鼠脏器组织的免疫组织化学染色($\times 400$)

3 讨论

烧伤不仅是局部组织的损伤, 而且在一定程度上, 可引起全身性的反应或损伤, 尤其是大面积烧伤。肾脏为高灌注器官, 对缺血缺氧较敏感。严重烧伤后, 机体体液的快速丢失, 导致急性的肾缺血缺氧, 肾脏发生一系列显著的形态改变, 这些改变与肾功能障碍的发生、发展密切相关。肾小管上皮细胞对缺血缺氧十分敏感, 细胞内代谢障碍, ATP 生成减少, 进而细胞膜破坏, 终可导致细胞进入不可逆转的损伤而死亡。然而, 对于烧伤引起的各种脏器的损伤, 目前的治疗措施主要为被动防治, 鲜有主动的干预措施。

研究表明, 质膜的损伤修复是一个由 MG53 介导的复杂的多步反应过程。MG53, 是只表达于心肌和骨骼肌的 TRIM 家族蛋白之一, 是膜损伤修复机制中一个必需的组分^[7-8]。MG53 介导的膜修复过程, 膜受到损伤后, 膜损伤信号膜脂质分子的暴露, 被 MG53 感受^[7-9]。之后, MG53 与细胞内囊泡关联, 转运至损伤膜附近, 聚合酶 I 和转录释放因子(PTRF), 作为中介, 绑定 MG53 于细胞内囊泡和质膜内部的膜脂质分子, 一个氧化依赖 MG53 寡聚体形成一个修复复合体^[10-11]。然后在 Ca^{2+} 依赖的 dysferlin 的作用下, 使得囊泡与质膜融合, 形成修复过程^[12-13]。在细胞外环境中存在 rhMG53 的情况下, 细胞膜受损的信号可以被这些 MG53 蛋白检测到, 进而起到修复损伤细胞膜的作用^[2]。

MG53 在急性膜损伤修复中起重要的作用, 但是 MG53 本身不能绑定于膜脂质分子, PTRF 作为 MG53 膜修复过程中的一个停靠蛋白, 绑定 MG53 于暴露的膜脂质。PTRF 大量表达于小鼠的肾脏、肺脏、心脏和骨骼肌, 缺乏表达内源性的 PTRF 的细胞表现出向膜损伤部位转运 MG53 的缺陷^[10]。

本研究发现, 注射外源性的 rhMG53 后 48 h, MG53 治疗组与 BSA 对照组比较, 肾组织病理损伤较轻, 肾小管病理损伤评分较低。免疫组化结果显示, 外源性的 rhMG53 能够选择性的到达肾脏损伤部位和肺脏部分小静脉内皮细胞, 尤其是肾小管上皮, 提示 MG53 可能参与肾脏损伤的修复。有趣的是 MG53 治疗组对肝、脾、肺、胃、小肠、结肠、皮肤、脑组织的病理

改变均无显著影响。这是否与这些部位缺乏 PTRF 有关尚需进一步研究。

小鼠的肾脏中发现, 外源性 rhMG53 蛋白的分布, 主要集中于被膜下区和皮髓交界处的小管上皮细胞内, 组织病理也较对照组有明显的改善, 这种外源性 MG53 的选择性分布和修复作用, 与膜修复重要的辅助因子 PTRF 在肾脏的大量表达密切相关。严重烧伤造成肾脏的急性损伤, 通过尾静脉给予外源性的 rhMG53 蛋白, 在肾脏内源性 PTRF 等修复辅助因子的介导下, 表现出外源性的 rhMG53 蛋白向肾脏损伤部位的积聚, 进而完成修复损伤的效应。

本研究还发现, 除了在肾脏发现外源性的 rhMG53 蛋白外, 小鼠的肺脏部分小静脉内皮细胞也可见明显的外源性的 rhMG53 蛋白的分布。这种外源性 MG53 的选择性分布和修复作用, 与膜修复重要的辅助因子 PTRF 的表达密切相关。通过尾静脉注射外源性 rhMG53 蛋白, 在 PTRF 大量表达的肾脏和肺脏中, 作者检测到较多的 rhMG53 蛋白的积聚, 然而, 在 PTRF 表达较少或者无表达的脏器中, 很少发现 rhMG53 蛋白的分布。这些结果都表明, rhMG53 蛋白选择性的分布及选择性修复作用, 与修复辅助因子 PTRF 的表达密切相关。

内源性的 MG53 蛋白只表达于骨骼肌和心肌。众所周知, 严重烧伤后患者的心肌和骨骼肌的病理学变化较轻微。本研究所烧伤尸检未发现显著的心肌组织学变化。心肌细胞如此强的自我保护可能与心肌细胞表达丰富的 MG53 有关。同样, 小鼠的心肌、骨骼肌中本身存在内源性的 MG53, 本烫伤模型小鼠心肌、骨骼肌的损伤不是十分明显, 所以治疗组和对照组的心肌、骨骼肌的组织病理并没有明显的差别。另外, 肝、脾、肺、胃、小肠、结肠、皮肤、脑组织的病理改变均无显著变化, 同样, 这些脏器中亦没有检测到外源性 rhMG53 蛋白的分布, 与脏器中缺乏 PTRF 的表达密切相关。

综上所述, 给予外源性 rhMG53 蛋白可显著改善小鼠严重烧伤后肾脏的病理变化, 提示 MG53 有可能成为预防烧伤后肾脏损伤的新药物, 此修复作用可能只局限于有 PTRF 表达的组织。促进表达 PTRF 并同时给予 MG53 可能成为防治严

重烧伤内脏并发症的新策略。

参考文献:

- [1] 付小兵, 盛志勇. 进一步重视和加强对严重创伤后内脏缺血性损伤修复的研究[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(6): 327.
- [2] Weisleder N, Takizawa N, Tan T, et al. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(139): 139.
- [3] 刘毅, 薛晓东, 贾赤宇, 等. 恒温恒压电烫伤仪建立小鼠烫伤模型的实验研究[J]. 兰州医学院学报, 2001, 27(1): 6.
- [4] Hermes M, Hanaa S, Chinkes D, et al. Gastric and small bowel ileus after severe burn in rats: The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Burns*, 2009, 35(8): 1180-1184.
- [5] Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, et al. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine[J]. *Urol Res*, 2006, 34(1): 41-46.
- [6] 石艳, 任立群, 孙波, 等. KIM-1 在 UUO 大鼠肾脏表达的研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(10): 1545.
- [7] Wang X, Xie W, Zhang Y, et al. Cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by cholesterol-dependent MG53-mediated membrane repair[J]. *Circ Res*, 2010, 107(1): 76-83.
- [8] 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.
- [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] Zhu H, Lin P, De G, et al. Polymerase transcriptase release factor(PTRF) anchors MG53 protein to cell injury site for initiation of membrane repair[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12820-12824.
- [11] Hwang M, Ko JK, Weisleder N, et al. Redox-dependent oligomerization through a leucine zipper motif is essential for MG53-mediated cell membrane repair[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(1): C106-114.
- [12] Cai C, Weisleder N, Ko JK, 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.
- [13] Waddell LB, Lemckert FA, Zheng XF, et al. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4): 302-313.
- (收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-19)
-
- (上接第 2319 页)
- [6] Shimizu-sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, et al. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein(BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(8): 5459-5466.
- [7] Samato H, Shimizu E, Matsuda-honjo Y, et al. Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and FGF2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28659-28667.
- [8] Wu JJ, Huang DB, Pang KR, et al. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153(2): 254-273.
- [9] Perri AJ 3rd, Hsu S. A review of thalidomides history and current dermatological applications[J]. *Dermatol Online J*, 2003, 9(3): 5.
- [10] 顾爱琴, 张雪艳, 包国良, 等. 沙利度胺对肺癌患者血清 VEGF、bFGF 和 TNF- α 水平的影响及临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(5): 376-379.
- [11] Zand MS, Vo T, Pelleqrin T, et al. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2895-2903.
- [12] 袁宁宁, 张星星, 朱绮文. 沙利度胺联合 VAD 方案治疗多发性骨髓瘤的临床研究[J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(4): 209-211.
- [13] 徐泽锋, 秦铁军, 张悦, 等. 环孢素联合沙利度胺治疗骨髓增生异常综合征[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(7): 451-455.
- [14] 聂富祥, 陈根元. 转移性骨肿瘤中 COX-2, VEGF 及微血管的关系[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(9): 846-848.
- [15] 周锐, 王平, 王建祥. COX-2, VEGF 和 β -catenin 表达及其与乳腺癌的相关性研究[J]. 临床外科杂志, 2009, 17(2): 122-124.
- [16] 郭琳, 张丹丹, 王强. VEGF-C 与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(7): 113-114.
- [17] Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism[J]. *J Periodont Res*, 2008, 43(2): 127-135.
- [18] Edwards LA, Woo J, Huxham LA, et al. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK)[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(1): 59-70.
- [19] 彭远远, 王捷. 骨唾液酸蛋白通过整合素 $\nu\beta 3$ 调控 ILK 信号通路[J]. 生物技术通报, 2012, 27(1): 172-176.
- [20] 刘国珍, 王春波, 李光耀. 沙利度胺抗肿瘤作用机制研究进展及在骨髓增生异常综合征治疗中的应用[J]. 山东医药, 2009, 49(11): 117-118.
- (收稿日期: 2013-01-15 修回日期: 2013-03-21)