

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.003

大鼠肢体缺血再灌注急性肺损伤细胞自噬及其相关蛋白的表达

李跃兵^{1,2}, 康于庆¹, 叶靖¹, 赵振龙¹, 林春水¹, 秦再生¹, 古妙宁^{1△}

(1. 南方医科大学南方医院麻醉科, 广州 510515; 2. 浙江中医药大学附属第二医院麻醉科, 杭州 310005)

摘要:目的 研究大鼠双下肢缺血再灌注所致急性肺损伤(LIR-ALI)肺组织细胞早期自噬及其相关蛋白的表达。方法 采用 LIR-ALI 模型, 12 只雄性 SD 大鼠, 以随机数字表法分为假手术(Sham)组, 肢体缺血再灌注(I/R)组, 每组 6 只。采用 ELISA 检测血清白乳酸脱氢酶(LDH)和免疫荧光法检测肺组织病理变化, 利用 RT-PCR 检测各组肺组织 Beclin1 和 Atg5 mRNA 表达及 Western blot 检测 LC3 蛋白的表达。结果 与 Sham 组比较, I/R 组 LDH 值升高, 显示大鼠 LIR-ALI 模型造模成功且肺组织免疫荧光特异性标记抗体高表达($P < 0.01$)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析肺组织 Beclin1 和 Atg5 mRNA 相对表达量, 在 I/R 组较 Sham 组升高($P < 0.01$); Western blot 法检测显示, I/R 组较 Sham 组 LC3-I、LC3-II 高表达, LC3-II/GAPDH 亦明显升高($P < 0.01$)。结论 大鼠 LIR-ALI 后激活肺组织细胞自噬及其相关蛋白高表达。

关键词:呼吸窘迫综合征, 成人; 自噬; 肢体缺血再灌注; Beclin1; LC3

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)32-4280-03

Expression of autophagy associated proteins in acute lung injury induced by remote limb ischemia reperfusion in rats

Li Yuebing^{1,2}, Kang Yuqing¹, Ye Jing¹, Zhao Zhenlong¹, Lin Chunshui¹, Qin Zaisheng¹, Gu Miaoning^{1△}

(1. Department of Anesthesiology, Southern Hospital of Southern Medical University, Guangzhou,

Guangdong 510515, China; 2. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310005, China)

Abstract: Objective To explore the early expression of autophagy associated proteins in lung tissues in acute lung injury induced by remote limb ischemia reperfusion(LIR-ALI) in Rats. **Methods** Twelve adult male SD rats weighting 220—250 g were made LIR-ALI models and divided randomly into two groups(6 in each group); Sham operation group and ischemia-reperfusion(I/R)group. The rats were anesthetized and the tissues of lung were removed at the end of 4 hours of reperfusion after 3 hours of ischemia. The serum lactate dehydrogenase(LDH) were detected with ELISA and the pathological changes of lung tissues were observed by immunofluorescence techniques; the expression of Beclin1 protein and Atg5 mRNA in the lung tissues were detected by reverse transcription PCR(RT-PCR). Microtubules associated protein light chain 3(LC3)in the lung tissues were detected by Western blot test. **Results** Compared with Sham group, the level of serum LDH in I/R group were very higher than Sham group($P < 0.01$), which showed that the rats models of LIR-ALI were established. The expression of specific antibody, Beclin1 protein, Atg5 mRNA and LC3-I, LC3-II and the ratio of LC3-II/GAPDH in lung tissues were all very higher in I/R group than in Sham group ($P < 0.01$). **Conclusion** ALI can be induced by LIR and the expression of autophagy associated proteins in lung tissues in LIR-ALI model is very higher in rats.

Key words: respiratory distress syndrome, adult; autophagy; limb ischemia reperfusion; Beclin1; LC3

肢体缺血再灌注(limb ischemia-reperfusion, LIR)在临床外科中较常见, 如动脉损伤或栓塞后再通、断肢再植、肢体创伤及止血带的长时间应用等; 特别是在地震灾难中, 肢体缺血损伤的致死、致残率非常高, 值得关注。挽救缺血肢体的关键是尽快恢复血液循环, 但大量研究证明, LIR 不仅影响局部缺血组织的存活和功能, 还可造成全身炎症反应综合征(SIRS), 并可能导致多脏器功能衰竭(MODS), 其中肺是最易受损的器官之一, 易造成急性肺损伤(acute lung injury, ALI)^[1]。近年来人们对 LIR 所致 ALI 的机制研究多集中在损伤与氧化应激方面, 凋亡、坏死被认为是缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)组织细胞的病理结局^[2-5]。但随着研究的深入, 自噬被认为能够被各种损伤及氧化应激等诱发^[6-8]。本研究旨在观察大鼠

LIR-ALI 肺组织细胞早期自噬及其相关蛋白的表达。

1 材料与方

1.1 材料 选取健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 12 只, 体质量 220~250 g, 由南方医科大学实验动物中心提供[许可证号: SCXK(粤)2011-0015]。所有动物饲养和实验操作程序符合南方医科大学实验动物福利伦理委员会相关规定, 并经南方医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器 Trizol(Invitrogen 公司)、第 1 链 cDNA 的合成试剂盒(TaKaRa 公司)、SYBR 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒(TaKaRa 公司)、RT-PCR 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司产品)、GDS7600(DF-23B)凝胶扫描系统(英国 UVP 公司)、Stratagene Mx3000P Real time PCR 仪(美国 Agilent 公

司)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 采用大鼠双下肢缺血 3 h 再灌注 4 h 制备 LIR-ALI 模型。实验前大鼠在实验室适应性饲养 1 d,术前禁食 12 h,自由饮水,实验前 2 h 禁水。随机数字表法分为假手术(Sham)组及 I/R 组,每组 6 只。称质量后大鼠 3%戊巴比妥钠(首剂 40 mg/kg,维持剂量 20 mg/kg)腹腔注射麻醉后固定于动物手术台上。Sham 组仅双侧股三角处切开皮肤,分离出股动脉,丝线标记不结扎,缝合创口。I/R 组分离出股动脉后,于近腹股沟韧带处用无创微动脉夹夹闭股动脉使双下肢缺血,缝合创口再以适度松紧的橡皮带环绕结扎双下肢根部以防侧支循环,以扪不到足背动脉搏动、双足变暗变凉为缺血成功的标志;3 h 后打开原切口,去除动脉夹恢复双下肢血流再灌注 4 h,动脉搏动恢复及双足逐渐变红变暖为建立 LIR 模型成功。

1.3.2 观察指标 (1)再灌注 4 h 末即刻剖开胸腔,直视下经心尖部穿刺抽取 3~4 mL 全血,4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,置于一 70 ℃冻存待测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH),并放血处死大鼠。(2)取双肺组织,4 ℃的冰 0.9% NaCl 溶液浸泡,肺变白后取下左肺放置于 4%的多聚甲醛固定 24 h 以上,石蜡包埋后切片行免疫荧光染色测量,采用盲法由专科医师在倒置荧光显微镜下阅片,观察肺组织免疫荧光特异性标记抗体的表达,并利用 Image J2x 软件进行免疫荧光强度分析。(3)利用 RT-PCR 法检测各组肺组织 Beclin1 和自噬相关基因(autophagy related genes,ATG)5 mRNA 表达:取右侧肺组织 100 mg,采用 Trizol 试剂盒抽提总 RNA,逆转录反应合成 cDNA,然后采用 PCR 仪进行扩增。引物序列如下 GAPDH 正向引物:5'-CCT CGT CTC ATA GAC AAG ATG GT-3',反向引物:5'-GGG TAG AGT CAT ACT GGA ACA TG-3';Beclin1 正向引物:5'-GGG GCC TAA AGA ATG GAG GG-3',反向引物:5'-CGT GTC CAG TTT CAG AGG CT-3';ATG5 正向引物:5'-ACT GAA CGA GAA GCA GAG CC-3',反向引物:5'-TGT TCC AAG GCA GAG CTG AG-3',引物是由 Invitrogen 公司合成。PCR 反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环,用 Agilent Stratagene RT-PCR 仪 Mx3000P 进行 RT-PCR 实验,测定 Beclin1 和 ATG5 mRNA 的表达定量。(4)蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 LC3 蛋白表达:取下剩余右侧肺组织 100 mg,-80 ℃保存,Western blot 测量肺组织 LC3 蛋白含量,并计算 LC3-II/

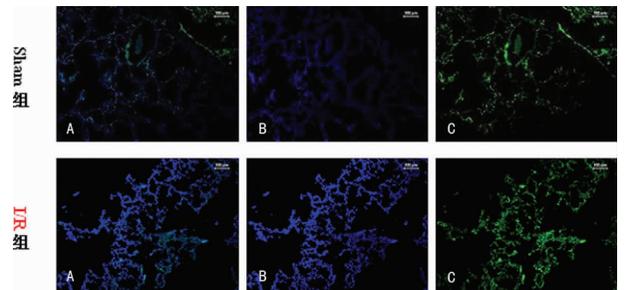
GAPDH 的蛋白含量比值。目的蛋白采用 SDS-PAGE,转膜结束后,取出 PVDF 膜和凝胶,将凝胶用靠马斯亮蓝染色观察转移效率;将 PVDF 膜分别放入装有 3 mL 抗 LC3-I、LC3-II 抗体中,洗膜后再放入含有 3 mL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,1% BSA-TBS 1:5 000 稀释;最后进行化学发光、显影及定影,将胶片进行扫描或拍照,用凝胶图像处理系统分析条带净光密度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,并做方差齐性检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠血清 LDH 测定 血清 LDH Sham 组为 (2.35 ± 0.01) U/L,I/R 组为 (6.66 ± 0.03) U/L,两组比较差异有统计学意义($t=119.242, P=0.000$);I/R 组血清 LDH 的活性显著升高,提示大鼠 LIR-ALI 模型制备成功。

2.2 肺组织免疫荧光病理变化及特异性标记抗体表达 免疫荧光染色镜下 Sham 组可见正常肺组织且结构清晰,而 I/R 组肺组织结构紊乱且肺泡壁增厚;免疫荧光强度值 Sham 组为 5.54 ± 0.09 ,I/R 组为 9.58 ± 0.21 ,两组比较差异有统计学意义($t=17.979, P=0.000$);I/R 组的肺组织免疫荧光特异性标记抗体高表达,见图 1。



两组 A:荧光 merge;两组 B、C:原色荧光,蓝色代表细胞核,绿色代表特异性标记抗体;Sham 组为正常肺组织且结构清晰;I/R 组为肺组织结构紊乱且肺泡壁增厚。

图 1 两组大鼠的肺组织免疫荧光图(×10)

2.3 肺组织 Beclin1 和 ATG5 mRNA 相对定量表达 I/R 组与 Sham 组 Beclin1 和 ATG5 mRNA $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比值分别为 $12.72 \pm 0.13, 18.34 \pm 0.08$,两组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 两组大鼠的肺组织 Beclin1 和 ATG5 mRNA 相对定量表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Beclin1 CT	GAPDH CT	$\Delta CT(Avg. Beclin1 CT - Avg. GAPDH CT)$	$\Delta\Delta CT(Avg. \Delta CT - Avg. \Delta CT mean)$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Sham 组	27.37 ± 0.09	18.32 ± 0.09	9.05 ± 0.16	0.00 ± 0.16	1.00 ± 0.16
I/R 组	24.15 ± 0.10	18.77 ± 0.16	5.38 ± 0.13	-3.67 ± 0.13	$12.72 \pm 0.13^{**}$

续表 1 两组大鼠的肺组织 Beclin1 和 ATG5 mRNA 相对定量表达结果($\bar{x} \pm s$)

组别	ATG5 CT	GAPDH CT	$\Delta CT(Avg. ATG5 CT - Avg. GAPDH CT)$	$\Delta\Delta CT(Avg. \Delta CT - Avg. \Delta CT mean)$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Sham 组	28.68 ± 0.06	18.96 ± 0.07	9.72 ± 0.09	0.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09
I/R 组	24.61 ± 0.05	19.08 ± 0.06	5.53 ± 0.08	-4.20 ± 0.08	$18.34 \pm 0.08^{**}$

$2^{-\Delta\Delta CT}$:I/R 组目的基因表达相对于 Sham 组的变化倍数;*: $P < 0.01$,与 Sham 组比较。

2.4 Western blot 法检测 LC3 蛋白含量及 LC3-II /GAPDH 比值 LC3-I 蛋白含量净光密度值 Sham 组 $1\ 699.646 \pm 20.761$, I/R 组 $6\ 707.375 \pm 42.641$, 两组比较差异有统计学意义 ($t=105.590, P<0.01$); LC3-II 蛋白含量净光密度值 Sham 组 $5\ 783.733 \pm 53.297$, I/R 组 $12\ 961.459 \pm 204.518$, 两组比较差异有统计学意义 ($t=33.962, P<0.01$); GAPDH 蛋白含量净光密度值 Sham 组 $7\ 631.270 \pm 45.566$, I/R 组 $7\ 531.818 \pm 8.651$, 两组比较差异无统计学意义 ($t=2.144, P>0.05$); LC3-II /GAPDH 比值, Sham 组 0.758 ± 0.007 , I/R 组 1.721 ± 0.027 , 两组比较差异有统计学意义 ($t=34.130, P<0.01$), 见图 2、3。

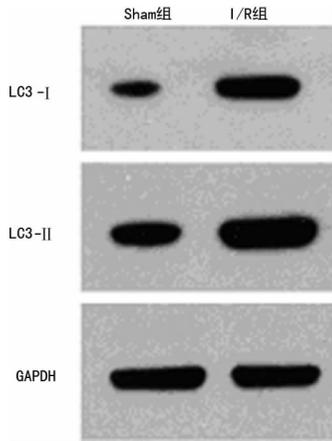
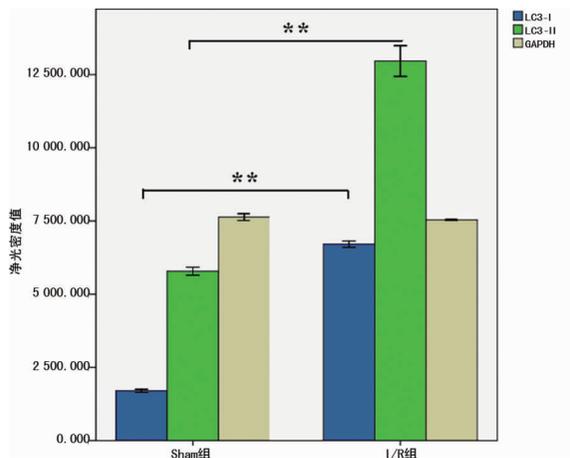


图 2 两组大鼠的肺组织 LC3 蛋白 Western blot 结果



** : $P<0.01$, 与 Sham 组比较。

图 3 两组大鼠的肺组织 LC3 蛋白水平

3 讨 论

自噬与凋亡的关系是生命科学的一个热点,虽然自噬在除肺组织以外的脏器系统中研究取得了较大进步,但有关 LIR-ALI 与自噬方面的相关研究甚少^[9]。自噬为真核细胞所特有,是细胞内的物质成分利用溶酶体被降解过程的统称。细胞对内外环境压力变化如发育、衰老、损伤、缺血缺氧等可诱发自噬,在某些情况下还可导致细胞死亡。自噬被认为是区别于细胞凋亡的另一种细胞程序性死亡形式,前者属 I 型,后者为 II 型^[10]。

有研究认为,常温下肌肉骨骼肌是肢体最易缺血的组织,仅可耐受缺血 4 h^[11]。肢体 I/R 可引起氧化应激导致肺血管细胞损伤,而自噬可能是该类损伤的一种可诱导的适应性反

应。自噬的发生需要众多关键 ATG 的参与,其中 ATG12 和 ATG5 结合形成自噬体前体,他们的高表达促进自噬的激活^[12]。本研究中,大鼠双下肢缺血 3 h 再灌注 4 h 引起了肺组织免疫荧光染色特异性标记抗体的高表达,而用半定量 RT-PCR 法测定 Beclin1 和 ATG5 mRNA 相对表达量亦增高,促进了自噬的激活。

目前测量自噬的作用途径大致分为 3 类:显微镜检查、静态生化测量(如 Western blot)、动态生化测量。其中,免疫荧光染色法能更好地检测各个时期的自噬小体,而自噬最多的检测方法是利用 Western blot 检测 LC3^[13]。

LC3-I / II 和 Beclin1 是两个重要的自噬相关分子,被广泛地用来研究自噬的发生、发展。LC3 是自噬体的标志性蛋白,当自噬被诱导,细胞质中的 LC3 前体通过蛋白水解转化成 LC3-I,再进一步转化成磷脂酰乙醇胺结合的 LC3-II,LC3-II 被认为是自噬性细胞死亡的特异性分子标志物^[13]。特别是 LC3-II 含量的多少与自噬泡数量的多少呈正比,因此可以根据 LC3 的水平来推测自噬作用的大小。在肺血管细胞中,炎症标志物高表达引发自噬,LC3-I 转化增加并聚集,自噬量进一步增加,从而引起肺支气管上皮细胞死亡及组织损伤^[14]。本研究中大鼠 LIR-ALI 模型 LC3-I、LC3-II、LC3-II /GAPDH 均增高,说明 LIR-ALI 导致肺组织自噬上调。

综上所述,LIR-ALI 可诱导自噬发生并促其相关蛋白高表达,本研究为进一步明确 LIR-ALI 与自噬的发病机制奠定了基础。笔者将利用该抑制剂和激活剂进一步研究 LIR-ALI 的作用机制及临床药物/技术对其干预效果。

参考文献:

- [1] 孙晓峰,王俊科,杨军,等. 辛伐他汀对肢体缺血再灌注肺损伤大鼠肺组织中 NF- κ B 及 ICAM-1 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2011,31(7):1150-1153.
- [2] Dorweiler B, Pruefer D, Andradi T, et al. Ischemia-reperfusion injury [J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2007, 33: 600-612.
- [3] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 581-609.
- [4] Men X, Han S, Gao J, et al. Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endo-plasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. Acta Orthop, 2010, 81(2): 265-269.
- [5] Iwata A, Morgan-Stevenson V, Schwartz B, et al. Extracellular BCL2 proteins are danger-associated molecular patterns that reduce tissue damage in murine models of ischemia-reperfusion injury [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9103.
- [6] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(1): 30-38.
- [7] Qin AP, Liu CF, Qin YY, et al. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and(下转第 4287 页)

- diation therapy with or without chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma: radiation therapy oncology group phase II trial 0225[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(22): 3684-3690.
- [4] Hareyama M, Sakasa K, Shirato H, et al. A prospective, randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94: 2217-2223.
- [5] Hui EP, Ma BB, Leung SF, et al. Randomized phase II trial of concurrent cisplatin-radiotherapy with or without neoadjuvant docetaxel and cisplatin in advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2): 242-249.
- [6] Komatsu M, Tsukuda M, Matsuda H, et al. Comparison of concurrent chemoradiotherapy versus induction chemotherapy followed by radiation in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(2): 681-686.
- [7] Ma J, Mai HQ, Hong MH, et al. Results of a prospective randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy plus radiotherapy with radiotherapy alone in patient with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(5): 1350-1357.
- [8] 马骏. 鼻咽癌治疗的研究进展[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(2): 179-185.
- [9] 马骏, 麦海超, 洪明晃, 等. 中晚期鼻咽癌新辅助化疗联合放疗前瞻性临床试验的长期结果[J]. *癌症*, 2001, 20(5): 505-510.
- [10] 孙瑞, 吴少雄, 赵充, 等. 评估新辅助化疗在局部晚期鼻咽癌放射治疗中的作用[J]. *肿瘤学杂志*, 2007, 13(5): 372-376.
- [11] Spivak L, Auerbach C, Vambutas A, et al. Electrical compound action potentials recorded with automated neural response telemetry: Threshold changes as a function of time and electrode position[J]. *Ear Hear*, 2011, 32(1): 104-113.
- [12] Van Diji B, Botros AM, Battmer RD, et al. Clinical results of AutoNRT, a completely automatic ECAP recording system for cochlear implants[J]. *Ear Hear*, 2007, 28(4): 558-570.
- [13] Baujat B, Audry H, Bourhis J, et al. Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 64(1): 47-56.
- [14] Caponigro F, Longo F, Ionna F, et al. Treatment approaches to nasopharyngeal carcinoma: a review [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2010, 21(5): 471-477.
- [15] 王荣光, 郭宝煌. 鼻咽癌[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002: 175-198.
- [16] Gene E, Hosal AS, Gedikoglu G, et al. Prognostic value of 53, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 expression, in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 122: 868-873.

(收稿日期: 2014-07-30 修回日期: 2014-09-15)

(上接第 4282 页)

- focal cerebral ischemia[J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 738-753.
- [8] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [9] Nakahira K, Choi AM. Autophagy: a potential therapeutic target in lung diseases [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(2): L93-107.
- [10] 王云, 沈健, 许永华, 等. 血红素加氧酶 1 诱导自噬减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(7): 538-543.
- [11] Pak O, Aldashev A, Welsh D, et al. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature[J]. *Eur Respir J*, 2007, 30(2): 364-372.
- [12] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. *Autophagy*, 2008, 8(4): 151-175.
- [13] Chen ZH, Kim HP, Sciarba FC, et al. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease[J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3316.
- [14] Kim HP, Wang X, Chen ZH, et al. Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: Protective role of heme oxygenase-1 [J]. *Autophagy*, 2008, 4(7): 887-895.

(收稿日期: 2014-02-20 修回日期: 2014-05-18)

更正说明

《重庆医学》2014 年第 43 卷第 29 期第 3864 页《不同亚型食管癌反流病患者胃组织白细胞介素-1 β 表达差异及临床意义》一文, 因题目和内容不符, 现将题目更改为《不同亚型非糜烂性反流病患者胃组织白介素-1 β 的表达差异及临床意义》。特此更正说明。

《重庆医学》编辑部

2014 年 11 月