

·论著·

自噬在 X 射线照射所致心肌线粒体损伤中的作用

陆克义 王洁 刘建中 李思进 李险峰

【摘要】目的 观察 X 射线照射对大鼠心肌线粒体功能的影响以及自噬在线粒体功能损伤中的作用。**方法** 将 135 只实验大鼠分成假照射组(10 只)、照射组(80 只)和照射+3-甲基腺嘌呤(3-MA)组(45 只),假照射组接受 0 Gy X 射线照射,照射组给予 20 Gy X 射线照射,照射+3-MA 组接受 20 Gy X 射线照射前 30 min 腹腔注射 2 μ l 3-MA。采用蛋白免疫印迹法和实时定量 PCR 法检测心肌细胞的 LC3 II 及 Beclin 1 蛋白表达及其 mRNA 水平变化,检测左心室舒张压及 \pm dP/dt_{max}(左心室压力上升及下降的最大速率)等离体心功能指标。**结果** 与假照射组相比,照射组大鼠经 20 Gy X 射线照射后离体心功能在 21 d 时出现降低;而在 1 d 时心肌组织线粒体功能便出现了损伤;同时,心肌细胞自噬水平在 3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d 及 7 d 时出现明显上升,与假照射组之间的差异显著,且在 6 h 达到最高值。与照射组相比,照射+3-MA 组大鼠心肌 LC3 II 及 Beclin 1 表达水平明显下降,且心功能出现异常的时间提前至 14 d。**结论** X 射线照射损伤大鼠心肌线粒体功能并诱导自噬发生,可能是心肌保护的重要因素。

【关键词】 线粒体,心脏;辐射损伤;自噬;X 线

Effects of autophagy in myocardial mitochondrial injury caused by X-ray irradiation LU Ke-yi*, WANG Jie, LIU Jian-zhong, LI Si-jin, LI Xian-feng. *Department of Nuclear Medicine, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: LI Xian-feng, Email: lixianfeng-lxf@263.net

【Abstract】 Objective To observed the effects of X-ray irradiation on myocardial mitochondrial function and role of autophagy in mitochondrial injury. **Methods** The rats were divided into sham-irradiation control group, irradiation group and irradiation+3-methyladenine(3-MA) group. Rat in sham-irradiation control group accepted no irradiation, while rat in irradiation group accepted local 20 Gy X-ray irradiation in the chest, the last group accepted 20 Gy X-ray irradiation prior to intraperitoneal injection 2 μ l 3-MA. Western blot and real time PCR were used to detect the expression of LC3 II and Beclin 1 in protein and their mRNA levels. In vitro cardiac function was used to detect the changes of the left ventricular diastolic pressure(LVDP), the maximal rate of rise of pressure in the isovolumetric systolic left ventricle (+dP/dt_{max}) and the maximal rate of rise of pressure in the isovolumetric diastolic left ventricle (-dP/dt_{max}). **Results** Compared with the sham-irradiation control group, there were the decreased of the LVDP, +dP/dt_{max} and -dP/dt_{max} at 21 d, and myocardial mitochondrial injury at 1 d after 20 Gy irradiation. The expression of LC3 and Beclin 1 in protein and mRNA levels increased significantly at 3 h, 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 4 d and 7 d after 20 Gy irradiation, up to peak at 6 h. Compared with irradiation group, intraperitoneal injection 2 μ l 3-MA 30 min before irradiation, the expression of LC3 II and Beclin 1 in protein decreased significantly at 6 h after irradiation, there were the decreased of the LVDP, +dP/dt_{max} and -dP/dt_{max} at 14 d, then the irradiation group for 21 days. **Conclusion** X-ray irradiation could injury myocardial mitochondrial function and induce autophagy in rat myocardial cell, which was an important factor of myocardial protection.

【Key words】 Mitochondria, heart; Radiation injury; Autophagy; X-rays

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.06.002

基金项目: 国家自然科学基金(81371600);山西医科大学科技创新基金(057279);山西医科大学博士启动基金(055217)

作者单位: 030001 太原,山西医科大学第一医院核医学科(陆克义,刘建中,李思进,李险峰),神经内科(王洁),放疗科(李险峰)

通信作者: 李险峰(Email:lixianfeng-lxf@263.net)

随着临床肿瘤放射治疗的广泛应用,胸部肿瘤患者生存时间明显延长,而在治疗过程中位于纵隔的心脏不可避免地要受到射线照射。大量临床资料显示,由放射治疗所导致的放射性心脏损伤(radiation-induced heart disease, RIHD)已成为患者非肿

瘤死亡的重要原因,这部分患者心血管疾病的发病率和病死率都明显升高,特别是心功能不全的患者^[1]。有研究者认为,能量代谢的改变在心功能不全的发病机制中起着重要作用,调节心肌能量代谢有望成为一种治疗心功能不全的新策略,而线粒体作为心肌能量供应的主要细胞器,其结构和功能的正常对于维持心肌细胞正常的能量代谢具有重要作用^[2]。因此,本研究旨在观察X射线照射对心肌细胞线粒体功能的影响以及自噬在线粒体功能改变中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠,雄性,135只,8周龄,体质量180~200 g,由山西医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

LC3 II(一种自噬蛋白)及Beclin 1(一种自噬标志物)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;LC3 II及Beclin 1引物购自日本TaKaRa公司;3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自美国Cell Signaling Technology公司;JC-1染料购自美国Genmed Scientifics公司。采用Varian IX直线加速器制备大鼠RIHD模型,6 mV X射线以2 cm×2 cm的照射野照射大鼠心脏,照射源靶距100 mm,吸收剂量为20 Gy。

1.3 方法

1.3.1 动物分组

将135只Wistar雄性大鼠随机分成3组:假照射组、照射组、照射+3-MA组,分别测定大鼠离体心功能、线粒体膜电位、LC3 II及Beclin 1水平。假照射组10只,5只用于离体心功能测定,5只用于后3项指标测定;照射组分为3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d、7 d、14 d和21 d等9个亚组,各亚组用于离体心功能测定各5只,前7个亚组用于后3项指标测定各5只;照射+3-MA组分为3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d、7 d和14 d等8个亚组,各亚组用于离体心功能测定各5只,6 h亚组用于后3项指标测定5只。假照射组接受0 Gy X射线照射,照射组进行20 Gy X射线一次性胸部心脏全野照射。照射+3-MA组大鼠在行20 Gy X射线照射前30 min腹腔注射2 μ l 3-MA。

1.3.2 离体心功能检测

猛击大鼠枕后部致昏,迅速开胸取出心脏,放入预冷的Krebs-Henseleit液(美国Sigma公司)中,

修剪后将主动脉悬挂于Langendorff灌流装置(ML870B2,澳大利亚埃德仪器有限公司)上,用充以95%氧气与5%二氧化碳混合气体的Krebs-Henseleit液灌流。将起搏电极置于离体心脏右室,刺激强度设置为2倍阈强度,频率为200次/min。将一乳胶水囊(直径约3~5 mm)经左心房插入左心室内,水囊内充有一定量的灌流液,水囊导管另一端与压力换能器(YP501,成都仪器厂)相连,待各项心功能指标稳定后对左心室内压进行采集、分析。采用BL-410生物信号记录分析系统(成都泰盟科技有限公司)记录大鼠左心室舒张压(left ventricular diastolic pressure, LVDP)、左心室压力上升的最大速率(+dP/dt_{max})和左心室压力下降的最大速率(-dP/dt_{max})。

1.3.3 线粒体膜电位检测

选用对线粒体膜电位敏感的JC-1染料,按照冰冻切片线粒体内膜功能(膜电位)荧光测定试剂盒(由Genmed Scientifics公司提供)流程进行实验。采用激光共聚焦显微镜(OLYMPUS, FV1000)观察。当线粒体膜电位正常时,JC-1发红色荧光;而当线粒体膜电位下降时,JC-1发绿色荧光。

1.3.4 蛋白免疫印迹法检测LC3 II、Beclin 1蛋白的表达

取心肌组织70 mg,经裂解、匀浆、离心10 min(3600 r/min,离心半径为10 cm)提取上清蛋白定量。各组上样量均为30 μ g,经15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 β -actin蛋白(北京中杉金桥公司)作为内参。采用SuperECL Plus超敏发光液(普利莱基因技术有限公司)发光,将膜置于Kodak Image Station 400系统(美国Kodak公司)成像并进行灰度值分析。

1.3.5 实时定量PCR检测LC3 II、Beclin1的mRNA水平

取心肌组织70 mg,裂解并提取总RNA。3 μ g总RNA反转录为cDNA,选用SYBR Green荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司)扩增cDNA产物,确定实时定量PCR的扩增曲线和溶解曲线。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(日本TaKaRa公司)作为内参。按照 $\Delta\Delta C_t$ 解析法来进行目的基因和管家基因的相对定量。

2 结果

2.1 20 Gy X射线照射对大鼠离体心功能的影响

照射组大鼠经20 Gy X射线照射后7 d、14 d

左心室各功能参数与假照射组比较无明显变化,而照射后 21 d 大鼠的 LVDP、 \pm dP/dt_{max} 均低于假照射组,且差异显著(表 1)。

2.2 20 Gy X 射线照射对大鼠心肌线粒体功能的影响

线粒体膜电位常作为评估线粒体功能的重要参数之一。本实验采用 JC-1 荧光染色来反映心肌细胞线粒体膜电位的变化。本实验中假照射组大鼠心肌组织呈高红荧光,而照射组大鼠经 20 Gy X 射线照射后 1 d 的心肌组织绝大部分呈绿色荧光,提示照射后大鼠线粒体功能损伤。

2.3 20 Gy X 射线照射对大鼠心肌细胞自噬水平的影响

本实验选用 LC3 II 和 Beclin 1 作为自噬形成的标志物。与假照射组比较,照射组大鼠经 X 射线照

射后 3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、4 d 和 7 d, LC3 II 及 Beclin 1 的蛋白表达水平和 mRNA 水平均明显升高,在照射后 6 h 达到最高值(图 1)。

2.4 下调自噬对大鼠 X 射线照射后离体心功能的影响

3-MA 是一种特异性的自噬抑制剂。与照射组相比,照射+3-MA 组经 X 射线照射 6 h 后,大鼠心肌细胞 LC3 II 及 Beclin 1 蛋白表达水平明显下降,大鼠离体心功能参数出现异常的时间提前至照射后 14 d: LVDP=(84.2 \pm 9.3) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa); +dP/dt_{max}=(1993.3 \pm 167.8) mmHg/s; -dP/dt_{max}=(−1599.0 \pm 185.4) mmHg/s。

3 讨论

RIHD 常处于亚临床状态,需经过相当长的潜

表 1 经 20 Gy X 射线照射后大鼠离体心功能参数的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	数量 (只)	0 d			7 d		
		LVDP (mmHg)	+dP/dt _{max} (mmHg/s)	-dP/dt _{max} (mmHg/s)	LVDP (mmHg)	+dP/dt _{max} (mmHg/s)	-dP/dt _{max} (mmHg/s)
假照射组	10	107.5 \pm 12.6	3060.0 \pm 280.1	-1999.0 \pm 241.4	108.5 \pm 10.8	3043.3 \pm 258.3	-2016.0 \pm 211.7
照射组	80	108.5 \pm 10.3	3060.0 \pm 304.9	-1999.0 \pm 222.2	102.5 \pm 8.7	2813.5 \pm 366.4	-2031.0 \pm 252.4

组别	14 d			21 d		
	LVDP (mmHg)	+dP/dt _{max} (mmHg/s)	-dP/dt _{max} (mmHg/s)	LVDP (mmHg)	+dP/dt _{max} (mmHg/s)	-dP/dt _{max} (mmHg/s)
假照射组	106.3 \pm 13.0	3093.3 \pm 225.7	-2033.0 \pm 236.8	105.5 \pm 11.7	3093.3 \pm 306.9	-2016.0 \pm 261.5
照射组	104.2 \pm 9.3	2893.3 \pm 252.5	-2066.0 \pm 297.1	87.5 \pm 11.6	2060.0 \pm 266.6	-1666.0 \pm 243.5

注:表中,1 mmHg=0.133 kPa; LVDP:左心室舒张压; +dP/dt_{max}:左心室压力上升的最大速率; -dP/dt_{max}:左心室压力下降的最大速率。20 Gy X 射线照射后 21 d,大鼠的 LVDP、 \pm dP/dt_{max} 均低于假照射组。

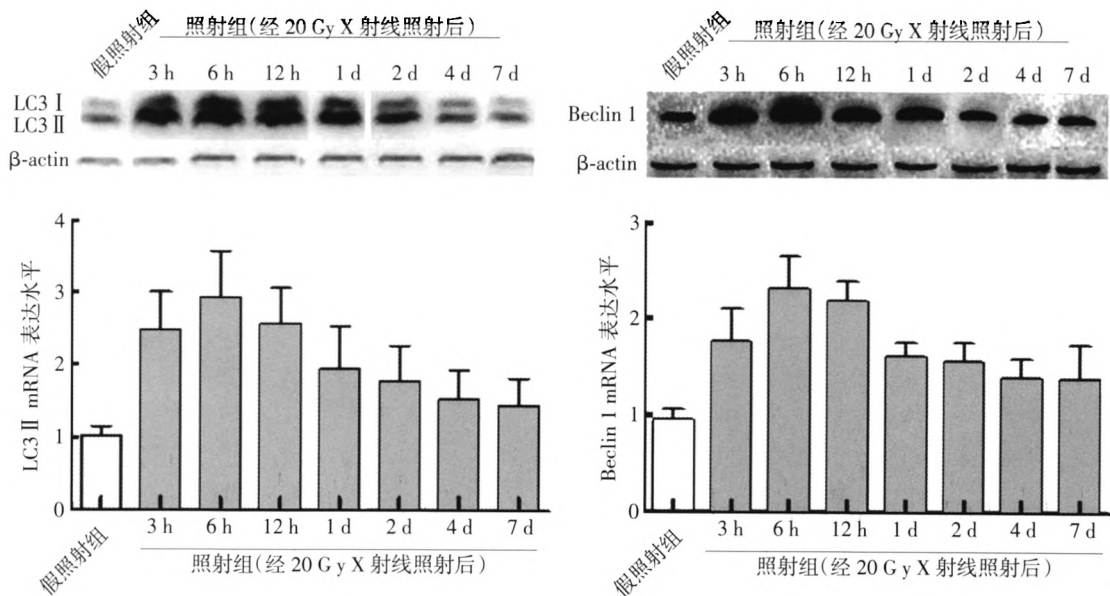


图 1 大鼠经 20 Gy X 射线照射后不同时间点心肌 LC3 II 及 Beclin 1 蛋白表达水平的变化

伏期才出现临床症状,多发生于放射治疗后数月甚至数年,放射治疗早期多因心肌纤维化导致心脏舒缩功能障碍^[3]。机体通过神经体液调节维持重要器官功能的稳定性,为排除神经体液的影响,我们选择检测大鼠 RIHD 后的离体心功能,因为心脏在无神经体液调节下,对损伤因素缺乏一定的代偿,能客观地反映放射性损伤后心脏早期的实际变化。参照 Kruse 等^[3]建立的 RIHD 模型,给予大鼠心脏单次局部照射剂量 20 Gy(近似临床常规分割照射 80 Gy),到照射后 21 d 才出现心脏离体功能的异常。Dogan 等^[4]的研究显示,大鼠 RIHD 后 4 个月出现心肌细胞的凋亡,6 个月后出现在体心功能的损伤。同时,本研究证实,线粒体膜电位的降低出现在大鼠 RIHD 后 1 d,明显早于离体心功能异常的出现,这一结果提示我们可能还有其他的机制参与了放射治疗后心肌线粒体功能障碍的过程。

自噬作为细胞保持稳定状态的“管家机制”,可调控线粒体等多种细胞器的更新,自噬在应激状态下可以被激活,以延长细胞的寿命^[5]。当自噬发生时,细胞胞浆可溶性 LC3 I 经加工修饰而形成 LC3 II,并定位于自噬体膜上。因此,LC3 II 的含量或 LC3 II 与 LC3 I 含量的比值变化在某种程度上反映了细胞的自噬活性^[6]。Beclin 1 基因参与调节前自噬体的形成及自噬蛋白在自噬体膜上的定位过程,具有调节细胞存活、分化和生长的作用,是检测自噬的常用指标之一^[7]。线粒体损伤或功能障碍可能导致一个或多个线粒体功能、形态、膜电位、ATP 以及 Ca^{2+} 稳态的变化。在正常情况下,自噬可以清除或降解细胞内损伤的线粒体,并利用降解产物提供能量并重建细胞结构,以维持能量代谢平衡和内环境稳态,是一个重要的细胞保护性反应^[8]。有研究表明,当自噬能力不足时,细胞对损伤线粒体的清除能力下降,线粒体途径的细胞凋亡启动,线粒体膜电位下降,线粒体功能受损,导致线粒体

外膜被破坏,凋亡诱导因子释放,导致细胞凋亡,进而引起心功能障碍^[9]。

本研究发现,在大鼠 RIHD 后 1 d,心肌细胞的 LC3 II 及 Beclin1 水平明显升高,提示线粒体功能下降激活了自噬水平的升高。那么,RIHD 后引起的线粒体功能损伤以及心功能下降的过程中是否存在自噬水平的改变呢?本实验选用 3-MA 来下调自噬水平,发现自噬水平的下调引起了离体心功能异常的提前出现。

综上所述,在大鼠 RIHD 模型中,线粒体膜电位的降低早于心功能异常的出现,并激活自噬水平的升高;下调自噬加剧了离体心功能的下降,提示自噬在心功能异常中起着一定的保护作用,为临床进一步减轻 RIHD 提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] Heidenreich PA, Kapoor JR. Radiation induced heart disease: systemic disorders in heart disease. *Heart*, 2009, 95(3): 252-258.
- [2] Neubauer S. The failing heart-an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 2007, 356(11): 1140-1151.
- [3] Kruse JJ, Strootman EG, Wondergem J. Effects of amifostine on radiation-induced cardiac damage. *Acta Oncol*, 2003, 42(1): 4-9.
- [4] Dogan I, Sezen O, Sonmez B, et al. Myocardial perfusion alterations observed months after radiotherapy are related to the cellular damage. *Nuklearmedizin*, 2010, 49(6): 209-215.
- [5] Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 2011, 333(6046): 1109-1112.
- [6] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [7] Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 2012, 8(1): 6-17.
- [8] Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*, 2011, 7(3): 297-300.
- [9] Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 45-59.

(收稿日期: 2012-11-30)