

·基础研究·

MG53蛋白对小鼠阿霉素急性心肌毒性的影响及机制

卢维哲¹, 刘海琼², 杨涵滢¹, 宋旭东¹, 陈爱华¹

(1. 南方医科大学珠江医院心脏中心实验室心血管内科, 广东广州 510220; 2. 南方医科大学珠江医院健康管理科, 广东广州 510220)

摘要:【目的】本研究拟探究MG53蛋白对小鼠阿霉素心肌毒性的影响及机制。【方法】体内实验选择C57BL/6小鼠腹腔注射阿霉素20 mg/kg 1周诱导急性阿霉素心肌毒性模型;体外实验使用1 μmol/L阿霉素处理大鼠原代心肌细胞构建DIC模型。采用小动物心脏超声分析小鼠心脏功能,观察左室射血分数、缩短分数的变化;通过qPCR技术分析心脏重构相关基因ANP、BNP、α-MHC,自噬相关基因Beclin1、LC3及凋亡基因CASPASE3的表达改变;采用免疫印迹技术检测自噬相关蛋白Beclin1、LC3及凋亡相关蛋白caspase3的表达水平;采用透射电镜观察心肌组织中的自噬小体;采用TUNEL试剂盒检测原代心肌细胞的凋亡水平。【结果】心脏超声结果显示:与假手术组(Sham)相比,阿霉素组(DOX)及心肌原位注射对照腺相关病毒组(DOX+AAV9-NC)小鼠心脏功能显著下降(EF:Sham:86.06 ± 2.08 vs. DOX:58.97 ± 1.62, $P < 0.0001$; Sham:86.06 ± 2.08 vs. DOX+AAV9-NC:59.00 ± 1.86, $P < 0.0001$ 。FS:Sham:45.47 ± 1.95 vs. DOX:30.68 ± 1.21, $P < 0.0001$; Sham:45.47 ± 1.95 vs. DOX+AAV9-NC:30.79 ± 1.13, $P < 0.0001$),而心肌原位注射腺相关病毒过表达MG53组(DOX+AAV9-MG53)小鼠的心脏功能障碍得到显著改善(EF:DOX+AAV9-MG53:66.93 ± 1.78 vs. DOX+AAV9-NC:59.00 ± 1.86, $P < 0.0001$ 。FS:DOX+AAV9-MG53:36.35 ± 1.33 vs. DOX+AAV9-NC:30.79 ± 1.13, $P < 0.0001$);电镜结果显示,过表达MG53后心肌细胞的自噬小体增加;qPCR结果表明过表达MG53显著下调心脏重构相关基因的表达;此外,western blot结果进一步明确过表达MG53可显著下调caspase3蛋白表达,并上调Beclin1、LC3蛋白表达(caspase:DOX+AAV9-MG53:1.49 ± 0.13 vs. DOX+AAV9-NC:2.49 ± 0.46, $P = 0.0002$; Beclin-1:DOX+AAV9-MG53:0.82 ± 0.02 vs. DOX+AAV9-NC:0.62 ± 0.05, $P < 0.0001$; LC3:DOX+AAV9-MG53:0.83 ± 0.04 vs. DOX+AAV9-NC:0.40 ± 0.05, $P < 0.0001$),而敲低MG53可显著上调caspase3蛋白表达,下调Beclin1、LC3蛋白表达(caspase:DOX+si-MG53:4.52 ± 0.28 vs. DOX+si-NC:3.37 ± 0.08, $P < 0.0001$; Beclin-1:DOX+si-MG53:0.34 ± 0.06 vs. DOX+si-NC:0.54 ± 0.07, $P = 0.0262$; LC3:DOX+si-MG53:0.41 ± 0.12 vs. DOX+si-NC:0.70 ± 0.07, $P = 0.0015$);TUNEL检测结果提示过表达MG53可显著抑制心肌细胞凋亡(DOX+Ad-MG53:9.41 ± 0.53 vs. DOX+Ad-NC:29.34 ± 7.29, $P < 0.0001$),敲低MG53可显著促进心肌细胞凋亡(DOX+si-MG53:71.34 ± 5.90 vs. DOX+si-NC:32.19 ± 9.91, $P < 0.0001$)【结论】MG53可抑制心肌细胞凋亡,并促进自噬,改善小鼠DIC心脏重构进程,减轻心脏功能障碍。

关键词:MG53;阿霉素心肌毒性;心脏功能;凋亡;自噬

中图分类号:R541 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)01-0034-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20221208.001

Effect of MG53 on Cardiac Function Affected by Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Mice and Its Mechanism

LU Wei-zhe¹, LIU Hai-qiong², YANG Han-yan¹, SONG Xu-dong¹, CHEN Ai-hua¹

(1. Department of Cardiology, Laboratory of Heart Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou)

收稿日期:2022-10-10

基金项目:国家自然科学基金(81873460);广东省自然科学基金(2021A1515012568,2021A1515011097)

作者简介:卢维哲,硕士生,研究方向:心血管疾病,E-mail:787815810@qq.com;陈爱华,通信作者,教授,博士生导师,研究方向:心血管疾病,E-mail:chenaih@smu.edu.cn;宋旭东,共同通信作者,副主任医师,研究方向:心血管疾病, songxudong@126.com

510220, China; 2. Department of Health Management, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510220, China)

Correspondence to: CHEN Ai-hua; E-mail: chenaih@smu.edu.cn; SONG Xu-dong; E-mail: songxudong@126.com

Abstract: 【Objective】 This study was designed to explore the effect of MG53 on cardiac function affected by acute doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity (DIC) in mice and its possible mechanism. 【Methods】 *In vivo*, C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with twenty mg/kg DOX for one week to induce the acute DIC. *In vitro*, neonatal rat cardiomyocytes (NRCs) were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX to induce DIC. A small animal ultrasound imaging system was used to evaluate cardiac function, and the left ventricular changes in ejection fraction (EF) and fraction shortening (FS) were measured. qPCR technology was used to evaluate cardiac remodeling related factors *ANP*, *BNP* and $\alpha\text{-MHC}$, autophagy-related factors *Beclin1* and *LC3*, and apoptosis-related factor *CASPASE3*. Autophagy-related protein levels of *Beclin1*, *LC3* and apoptosis-related protein levels of *caspase3* were assessed by Western Blot. Transmission electron microscopy (TEM) was used to detect autophagosomes in heart tissues. TUNEL assay kit was used to detect apoptosis in neonatal murine cardiomyocytes. 【Results】 The small animal ultrasound imaging revealed cardiac function was significantly reduced by doxorubicin in the DOX group and DOX+AAV9-NC group compared with the sham group (EF: Sham: 86.06 ± 2.08 vs. DOX: 58.97 ± 1.62 , $P < 0.0001$; Sham: 86.06 ± 2.08 vs. DOX+AAV9-NC: 59.00 ± 1.86 , $P < 0.0001$. FS: Sham: 45.47 ± 1.95 vs. DOX: 30.68 ± 1.21 , $P < 0.0001$; Sham: 45.47 ± 1.95 vs. DOX+AAV9-NC: 30.79 ± 1.13 , $P < 0.0001$). However, the overexpression of MG53 with adeno-associated virus9 (AAV9) ameliorated cardiac dysfunction (EF: DOX+AAV9-MG53: 66.93 ± 1.78 vs. DOX+AAV9-NC: 59.00 ± 1.86 , $P < 0.0001$. FS: DOX+AAV9-MG53: 36.35 ± 1.33 vs. DOX+AAV9-NC: 30.79 ± 1.13 , $P < 0.0001$). TEM showed autophagosomes were increased in the DOX+AAV9-MG53 group compared with the DOX group and DOX+AAV9-NC. qPCR results suggested that MG53 down-regulated the mRNA expression of cardiac remodeling related genes. Additionally, Western blot results confirmed that the protein level of *caspase3* was decreased and *Beclin1* and *LC3* expression was increased in the DOX+AAV9-MG53 group compared with those in the DOX group and DOX+AAV9-NC group (*caspase3*: DOX+AAV9-MG53: 1.49 ± 0.13 vs. DOX+AAV9-NC: 2.49 ± 0.46 , $P = 0.0002$; *Beclin1*: DOX+AAV9-MG53: 0.82 ± 0.02 vs. DOX+AAV9-NC: 0.62 ± 0.05 , $P < 0.0001$; *LC3*: DOX+AAV9-MG53: 0.83 ± 0.04 vs. DOX+AAV9-NC: 0.40 ± 0.05 , $P < 0.0001$). In contrast, knockdown of MG53 significantly up-regulated the protein level of *Caspase3* and significantly down-regulated the protein level of *Beclin1* and *LC3* (*caspase3*: DOX+si-MG53: 4.52 ± 0.28 vs. DOX+si-NC: 3.37 ± 0.08 , $P < 0.0001$; *Beclin1*: DOX+si-MG53: 0.34 ± 0.06 vs. DOX+si-NC: 0.54 ± 0.07 , $P = 0.0262$; *LC3*: DOX+si-MG53: 0.41 ± 0.12 vs. DOX+si-NC: 0.70 ± 0.07 , $P = 0.0015$). TUNEL analysis showed overexpression of MG53 significantly inhibited the apoptosis of cardiomyocytes (DOX+Ad-MG53: 9.41 ± 0.53 vs. DOX+Ad-NC: 29.34 ± 7.29 , $P < 0.0001$), and knockdown of MG53 significantly facilitate the apoptosis of cardiomyocytes (DOX+si-MG53: 71.34 ± 5.90 vs. DOX+si-NC: 32.19 ± 9.91 , $P < 0.0001$). 【Conclusion】 MG53 inhibits cardiac apoptosis and enhances autophagy, which delays cardiac remodeling and ameliorates cardiac dysfunction.

Key words: MG53; doxorubicin-induced cardiotoxicity; cardiac function; apoptosis; autophagy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(1):34-43]

阿霉素是蒽环类化疗药物的代表之一,属于细胞周期非特异性药物,广泛应用于淋巴瘤、白血病、肉瘤等多种癌症的治疗^[1]。阿霉素对非靶组织的剂量限制性不良反应主要是心脏毒性作用,以体重减轻、心肌细胞凋亡、心肌损伤为主要病理标志^[2]。既往研究表明传统的心力衰竭药物无法完全逆转阿霉素引起的心脏毒性(doxorubicin-induced cardiotoxicity, DIC)^[3],因此,针对阿霉素所致心肌损伤的分子机制是目前急需探讨和解决的重要课题,探究这一机制有望为临床上减轻阿霉素所致心肌损伤提供新的治疗靶

点。阿霉素对细胞的作用机制主要基于以下两方面:阿霉素可直接嵌入细胞中相邻DNA碱基对之间,干扰了拓扑异构酶II(TOP II)的催化循环,阻止了DNA双螺旋的重新定位,从而阻止了DNA复制和RNA转录^[4]。此外,线粒体通过醌基的单电子还原将阿霉素转化为半醌,产生大量活性氧(ROS),对蛋白质和DNA均产生了一定程度的破坏^[5]。然而,阿霉素所致心脏毒性的确切机制尚未阐明^[6]。既往研究表明,阿霉素的心脏毒性与其参与超氧自由基的形成密切相关^[7]。心肌组织缺乏足够的抗氧化能力,且心肌细

胞几乎不具备再生的能力^[8],大量的超氧阴离子自由基对心肌细胞的存活构成了巨大的威胁。越来越多的研究表明,阿霉素的心脏毒性与多种机制有关,主要包括氧化应激、细胞坏死和细胞凋亡^[9]。MG53(Mitsugumin53),是一种具有细胞膜修复功能的TRIM家族蛋白,特异性表达于骨骼肌及心肌中,在心肌保护方面具有重要作用^[10]。研究证明,MG53可抑制心肌细胞坏死和凋亡,并减轻小鼠心肌缺血及再灌注损伤^[11]。此外,研究者在心梗小鼠模型中还观察到了MG53可显著减轻小鼠心肌梗死面积和肌钙蛋白I的释放,改善心脏结构与功能^[12]。新近研究表明,在慢性肾脏病引起的骨骼肌萎缩中,MG53可上调C2C12成纤维细胞的线粒体自噬水平,改善骨骼肌萎缩^[13]。以上研究提示MG53在心脏疾病治疗方面有很大的应用潜力。而关于MG53在阿霉素所致心肌病中的作用如何,目前仍未可知。结合既往研究提示MG53对多种心脏疾病具有保护作用,且对调控凋亡和自噬等发挥重要作用。我们推测,MG53可能对阿霉素诱导的急性心肌损伤具有一定的保护作用,这一研究有望为阿霉素所致心肌损伤的防治提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 动物

本研究的所有动物实验均经南方医科大学珠江医院动物伦理委员会批准(批准号:LAEC-2021-016),并按照《国际动物生物医学研究指导原则》进行相关实验。6周龄SPF级C57BL/6小鼠及出生1~3 d的SD乳鼠均购自广东药康生物科技有限公司,许可证号SYXK(粤2020-0054),本研究中所有小鼠均为雄性,质量匹配。所有小鼠均饲养于南方医科大学珠江医院实验动物中心。饲养条件为:SPF级动物房,每笼5只小鼠,专人喂养。室温(23±2)℃,相对湿度(60±10)%,模拟正常昼夜生物节律。小鼠给予普通饮食适应性饲喂1周后进行实验。

1.2 试剂

阿霉素(美国MCE公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo公司);caspases3抗体(美国CST公司);LC3抗体(美国CST公司);Beclin1抗体(万类生物);GAPDH抗体(博士德生物);TUNEL试剂盒(碧云天生物);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(雅酶生物);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG、化学发光检测试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;腺相关病毒血清型9(adeno-associated virus9, AAV9)购自上海和元生物公司;腺病毒购自山东维真公司;siRNA购自广州锐博生物公司。

1.3 实验所用仪器

倒置荧光显微镜(型号DMI6000B,德国Leica公司);透射电子显微镜(型号H-7500,日本Hitachi公司);超低温高速离心机(型号micro17R,离心机半径为8 cm,美国Thermo

公司);小动物超声仪(型号Vevo2100,加拿大Fujifilm公司)。

1.4 心脏原位注射血清型9腺相关病毒

通过心脏原位注射AAV9使小鼠心肌特异性过表达MG53,方法简述如下:6周龄小鼠麻醉后在气管插管下,开胸暴露整个心脏,撕开心包后使用30 G胰岛素针分3个点注射总量为30 μL的AAV9病毒液。注射完毕后关胸,将自然复苏的小鼠移入手术观察室中,并注意小鼠保暖,在观察室内观察足1 d,若小鼠没有出现感染或死亡等情况,就将小鼠返回动物房内继续饲养4周待MG53表达水平上升。

1.5 造模及分组

配置阿霉素注射液,按20 mg/kg的剂量,称量适量阿霉素药剂粉末,并使用适量生理盐水溶解(具体比例为每25 g小鼠注射150 μL的注射液)。

小鼠阿霉素心肌毒性模型构建:腹腔注射阿霉素法诱导急性阿霉素心肌损伤模型,剂量为20 mg/kg,单剂腹腔注射,一周期间观察小鼠体质量及进食量变化,后进行心脏超声各项检测及取材。体内实验中,雄性C57小鼠将随机被分为下列4组:Sham(假手术组)、DOX(急性阿霉素心肌毒性小鼠模型组)、DOX+AAV9-NC(腺相关病毒对照组)、DOX+AAV9-MG53(腺相关病毒过表达MG53组)。

1.6 左心室功能评估

11周龄造模结束后通过心脏超声技术行左心功能检测。小鼠使用2%异氟醚麻醉后,固定于超声操作板上,使用小动物剃毛器剃去小鼠左胸部毛,剩余的残毛再由脱毛膏彻底脱去,暴露出左胸部皮肤,涂抹适量超声耦合剂,然后操作超声探头充分接触耦合剂,使用M型超声测量超声短轴数据,分别计算出左室射血分数(LVEF)、左室缩短分数(LVFS)等。

1.7 左心室重构的检测

造模结束后心脏取材,进行HE和WGA染色,检测心肌细胞重构情况。取各组心脏组织制成组织匀浆,提取RNA,利用qPCR分析仪检测各组ANP、BNP、 α -MHC等重构基因的mRNA水平,各基因引物信息见表1。

1.8 大鼠原代心肌细胞提取及造模分组

通过胶原酶消化法,从1~3 d的SD大鼠乳鼠心脏中分离出新生大鼠心肌细胞(NRCs)。在37℃和体积分数5%CO₂中与含有10 g/L胎牛血清的DMEM一起孵育72 h。然后,为了模拟体内阿霉素诱导的细胞毒性模型,将心肌细胞在含有1 μmol/L阿霉素的完全培养基中孵育24 h。分为control组(对照组)、DOX造模组、DOX+Ad-NC(腺病毒对照组)、DOX+Ad-MG53(腺病毒过表达MG53组)、DOX+si-NC(小干扰RNA对照组)、DOX+si-MG53(小干扰RNA敲低MG53组)。

1.9 心肌细胞自噬水平及凋亡水平的检测

取各组细胞固定后,应用TUNEL试剂盒检测,在荧光

表1 荧光定量PCR引物序列
Table1 Primer sequences for qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
ANP	F: TCGTCTTGGCCTTTTGGCT
	R: TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCT
BNP	F: AAGTCTAGCCAGTCTCCAGA
	R: GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC
α -MHC	F: GGATCCACTTTGGAGCTACT
	R: TCAGCATCTTCTGTGCCATC
LC3	F: TTCGGGTTGCTCTTTTGGGT
	R: GACAGGCAAGGGCCTAACAA
BECLIN1	F: GTCAGCTCTCGTCAAGGCG
	R: CGCCTTAGACCCCTCCATTC
CASPASE3	F: GAGCTTGAACGGTACGCTA
	R: CCGTACCAGAGCGAGATGAC
GAPDH	F: ATCATCCCTGCATCCACT
	R: ATCCAGGACGGACACATT

显微镜下观察凋亡的细胞;提取新鲜心脏组织制成组织匀浆,提取蛋白,利用Western blot技术检测 caspase3、LC3、Beclin1 蛋白的表达水平;提取匀浆RNA,利用qPCR检测各组自噬相关基因mRNA水平,各基因引物信息见表1。

1.10 透射电子显微镜拍摄

制样流程与上机流程由技术员操作。图像采集观察不同组别小鼠心肌细胞自噬小体数量、形态变化以及肌原纤维形态变化。

1.11 统计学处理

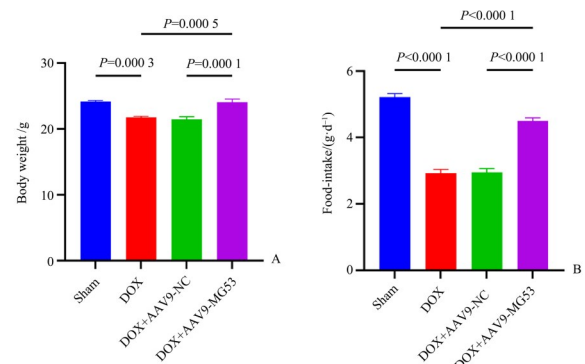
所有实验数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用Graphpad 9.0软件进行统计学分析,数据均采用单因素方差分析,组间两两比较采用bonferroni法, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MG53改善DIC小鼠体质量及进食量

4组小鼠体质量及进食量比较,经单因素方差分析,4组间差异有统计学意义(方差分析统计量分别为 $F = 19.05, P < 0.0001; F = 115.3, P < 0.0001$),两两比较采用bonferroni法,发现与假手术组相比,阿霉素模型(DOX)组及腺相关病毒对照(DOX+AAV9-NC)组小鼠产生进食量下降(Sham: 5.22 ± 0.26 vs. DOX: $2.92 \pm 0.28, P < 0.0001$; Sham: 5.22 ± 0.26 vs. DOX+AAV9-NC: $2.95 \pm 0.27, P < 0.0001$),差异有统计学意义、体质量下降(Sham: 24.17 ± 0.39 vs. DOX: $21.77 \pm 0.44, P = 0.0003$; Sham: 24.17 ± 0.39

vs. DOX+AAV9-NC: $21.48 \pm 0.94, P < 0.0001$),差异有统计学意义、小鼠活动量减少等阿霉素注射后的典型毒副作用,且该症状在注射后第一天开始出现持续至研究终末。而使用腺相关病毒过表达MG53(DOX+AAV9-MG53)后,可以增加小鼠体质量(DOX+AAV9-MG53: 24.05 ± 1.17 vs. DOX+AAV9-NC: $21.48 \pm 0.94, P = 0.0001$),差异有统计学意义,并改善小鼠进食量(DOX+AAV9-MG53: 4.50 ± 0.21 vs. DOX+AAV9-NC: $2.95 \pm 0.27, P < 0.0001$),差异有统计学意义(图1A,B)。



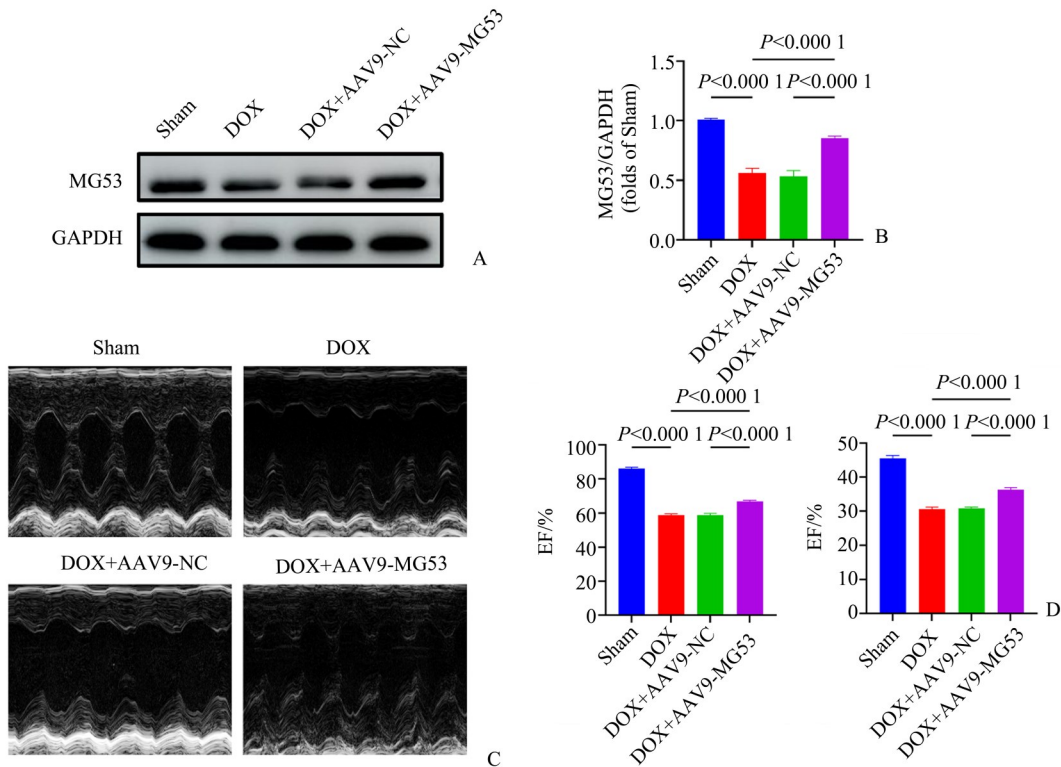
A: Analysis of body weight in each group was shown, $n = 6$; B: Analysis of intake in each group was shown, $n = 6$.

图1 MG53改善DIC小鼠体质量及进食量
Fig. 1 Body weight and intake of DIC mice improved by MG53

2.2 过表达MG53改善DIC小鼠心脏功能

首先对4组小鼠MG53蛋白表达水平进行Western Blot检测比较,经单因素方差分析,4组间差异具有统计学意义($F = 49.07, P < 0.0001$),结果如图2A、B所示,与假手术组相比,阿霉素模型组及腺相关病毒对照组的MG53蛋白表达水平下降,差异有统计学意义, P 值均 < 0.0001 ,过表达MG53后MG53蛋白水平上升,差异有统计学意义, $P < 0.0001$ 。对4组小鼠进行心脏超声检测射血分数及缩短率,经单因素方差分析,4组间差异具有统计学意义,射血分数及缩短率的方差分析统计量分别为 $F = 289.4, P < 0.0001$ 和 $F = 140.2, P < 0.0001$,如图2C、D所示,与假手术组相比,阿霉素模型组及腺相关病毒对照组左心室的射血分数和缩短率下降,差异有统计学意义(EF: Sham: 86.06 ± 2.08 vs. DOX: $58.97 \pm 1.62, P < 0.0001$; Sham: 86.06 ± 2.08 vs. DOX+AAV9-NC: $59.00 \pm 1.86, P < 0.0001$ 。FS: Sham: 45.47 ± 1.95 vs. DOX: $30.68 \pm 1.21, P < 0.0001$; Sham: 45.47 ± 1.95 vs. DOX+AAV9-NC: $30.79 \pm 1.13, P < 0.0001$),提示心脏功能降低,而过表达MG53后可改善阿霉素急性心肌毒性小鼠的心脏功能,差异有统计学意义(EF: DOX+AAV9-MG53: 66.93 ± 1.78 vs. DOX+AAV9-NC: $59.00 \pm 1.86, P < 0.0001$ 。FS: DOX+AAV9-MG53: 36.35 ± 1.33 vs. DOX+

AAV9-NC: $30.79 \pm 1.13, P < 0.0001$)。



A and B: Western blot analysis of MG53 protein expression, $n = 6$; C and D: Representative echocardiograms and measurements of cardiac function changes in mice with different treatments, and the quantitative analysis of the panel was shown, $n = 6$.

图2 过表达MG53改善DIC小鼠心脏功能

Fig. 2 Cardiac function in DIC mice improved by overexpression of MG53

2.3 过表达MG53减轻DIC小鼠心室重构

如图3A所示, HE及WGA染色结果提示, 与假手术组相比心肌组织出现间隙增大、心肌细胞面积缩小等重构现象, 且对4组小鼠心脏重构基因 ANP 、 BNP 、 α -MHC表达水平进行检测比较, 经单因素方差分析, 3种基因表达水平在4组间的差异均有统计学意义(方差分析统计量分别为 $F = 130.9, P < 0.0001$; $F = 82.98, P < 0.0001$; $F = 455.9, P < 0.0001$), 两两比较采用bonferroni法, 发现DOX组及DOX+NC组小鼠的心脏重构基因表达水平上调(ANP : Sham: 1.01 ± 0.12 vs. DOX: $2.22 \pm 0.03, P < 0.0001$; Sham: 1.01 ± 0.12 vs. DOX+AAV9-NC: $2.34 \pm 0.09, P < 0.0001$). BNP : Sham: 1.01 ± 0.15 vs. DOX: $3.32 \pm 0.04, P < 0.0001$; Sham: 1.01 ± 0.15 vs. DOX+AAV9-NC: $3.44 \pm 0.17, P < 0.0001$). α -MHC: Sham: 1.02 ± 0.06 vs. DOX: $1.87 \pm 0.15, P < 0.0001$; Sham: 1.02 ± 0.06 vs. DOX+AAV9-NC: $1.76 \pm 0.13, P < 0.0001$), 差异有统计学意义(图3B)。而过表达MG53组可以改善心脏重构(ANP : DOX+AAV9-MG53: 1.63 ± 0.21 vs. DOX+AAV9-NC: $2.34 \pm 0.09, P < 0.0001$). BNP : DOX+AAV9-MG53: 2.73 ± 0.12 vs. DOX+AAV9-NC: $3.44 \pm 0.17, P < 0.0001$. α -MHC: DOX+AAV9-MG53: 1.29 ± 0.07 vs. DOX+AAV9-NC:

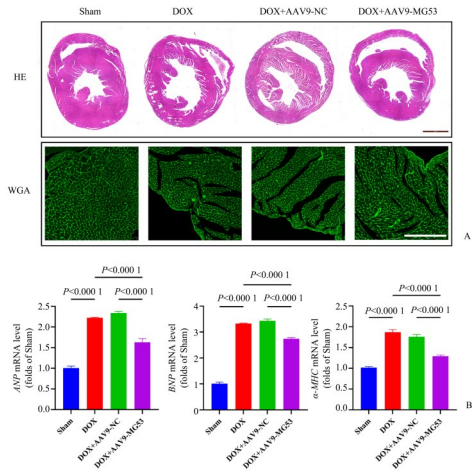
$1.76 \pm 0.13, P < 0.0001$), 差异有统计学意义。

2.4 过表达MG53促进DIC小鼠心肌细胞自噬水平

对4组小鼠MG53蛋白表达水平及自噬相关分子Beclin1、LC3在蛋白、mRNA表达水平进行检测比较, 经单因素方差分析, 4组间差异有统计学意义(F 值分别为54.97、94.54、251.1、60.51、35.36, P 值均 < 0.0001)。如图4所示, 与假手术组相比, 阿霉素模型组及腺相关病毒对照组小鼠Beclin1、LC3蛋白及mRNA表达水平均下调, 差异有统计学意义, P 值均 < 0.0001 (图4A-C), 电镜结果显示自噬小体减少(图4D), 提示DIC小鼠的心肌细胞中自噬水平受到抑制。而过表达MG53后Beclin1及LC3蛋白水平均上调(Beclin1: DOX+AAV9-MG53: 0.82 ± 0.02 vs. DOX+AAV9-NC: $0.62 \pm 0.05, P < 0.0001$; LC3: DOX+AAV9-MG53: 0.83 ± 0.04 vs. DOX+AAV9-NC: $0.40 \pm 0.05, P < 0.0001$), 差异有统计学意义, 且自噬小体增多, 肌原纤维损伤也得到改善。

2.5 过表达MG53可抑制DIC小鼠心肌细胞的凋亡

首先我们通过Western Blot检测4组小鼠caspase3的蛋白表达水平, 经单因素方法分析, 4组间差异具有统计学意义($F = 26.53, P < 0.0001$)。如图5A、B所示, 与假手术组相比, 阿霉素模型组及腺相关病毒对照组小鼠caspase3蛋白



A: Representative images of HE and WGA staining in different treatment groups were shown, $n = 6$; Scale bar of HE = 1mm. Scale bar of WGA = 150 μ m. B: Real-time PCR analysis of ANP, BNP and α -MHC gene expression, $n = 6$.

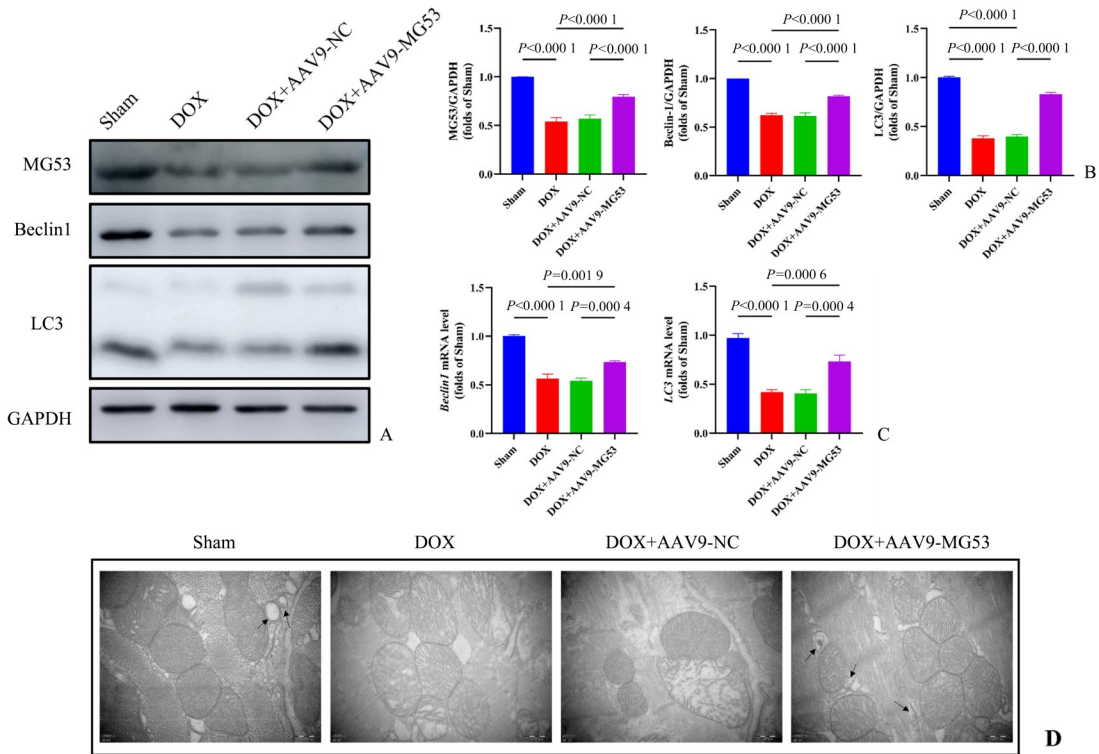
图3 过表达MG53改善DIC小鼠心脏重构
Fig. 3 Cardiac remodeling in DIC mice improved overexpression of MG53

表达水平上升(Sham: 1.00 ± 0.03 vs. DOX: 2.29 ± 0.46 , $P <$

0.0001 ; Sham: 1.00 ± 0.03 vs. DOX+AAV9-NC: 2.49 ± 0.46 , $P < 0.0001$), 差异有统计学意义,提示心肌细胞凋亡增加;而过表达MG53下调了caspase3蛋白水(DOX+AAV9-MG53: 1.49 ± 0.13 vs. DOX+AAV9-NC: 2.49 ± 0.46 , $P = 0.0002$), 差异有统计学意义。其次我们在体外实验中通过TUNEL荧光染色检测心肌细胞中凋亡水平,经单因素方法分析,4组间差异具有统计学意义($F = 57.06$, $P < 0.0001$),如图5C、D所示,与对照组相比,阿霉素模型组及腺病毒对照组心肌细胞的TUNEL阳性荧光比例上升,差异有统计学意义, P 值均 < 0.0001 ,也提示了阿霉素诱导了心肌细胞的凋亡发生,而使用腺病毒过表达MG53后,心肌细胞的凋亡得到改善(DOX+Ad-MG53: 9.41 ± 0.53 vs. DOX+Ad-NC: 29.34 ± 7.29 , $P < 0.0001$), 差异有统计学意义。以上结果提示MG53过表达后可抑制心肌细胞凋亡。

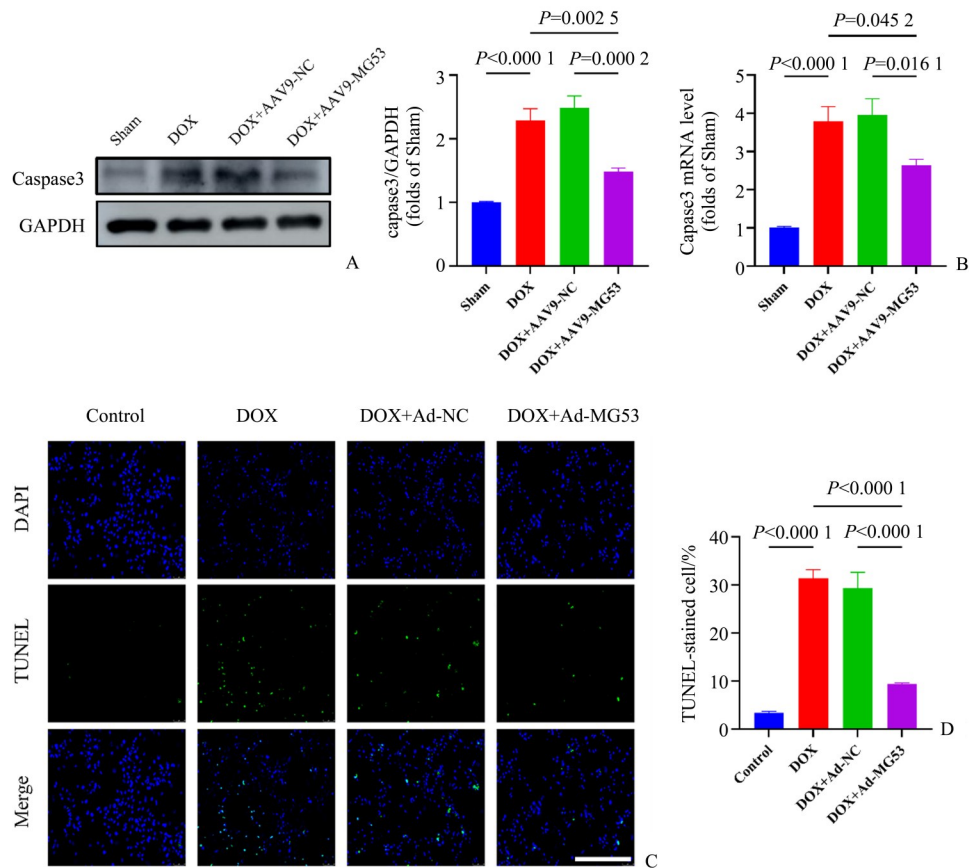
2.6 敲低MG53表达可抑制DIC大鼠原代心肌细胞自噬水平并促进其凋亡

在体外实验中我们通过Western Blot检测细胞中MG53、Beclin1、LC3以及caspase3的蛋白表达水平,并对其表达量进行灰度分析,经单因素方差分析,4组间差异具有统计学意义(F 分别为99.75、41.94、31.46、217.2, P 值均 < 0.0001)。如图6A、B所示,与对照组相比,阿霉素模型组及



A and B: Western blot analysis of MG53, Beclin1, LC3 protein expression, $n = 6$; C: Real-time PCR analysis of Beclin1 and LC3 gene expression, $n = 6$. D: Representative pictures of a transmission electron microscope were shown. Scale bar = 500 nm.

图4 过表达MG53可促进DIC小鼠心肌细胞自噬水平
Fig. 4 Cardiomyocyte autophagy in DIC mice enhanced by overexpression of MG53



A: Western blot analysis of caspase3 protein expression, $n = 6$; B: The quantification of caspase3 protein and mRNA levels was shown, $n = 6$; C: Intracellular apoptosis levels were detected by TUNEL staining, $n = 6$, Scale bar = 100 μm ; D: The quantification of TUNEL was shown, $n = 6$.

图5 过表达MG53可抑制DIC小鼠心肌细胞的凋亡

Fig. 5 Doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes inhibited by overexpression of MG53

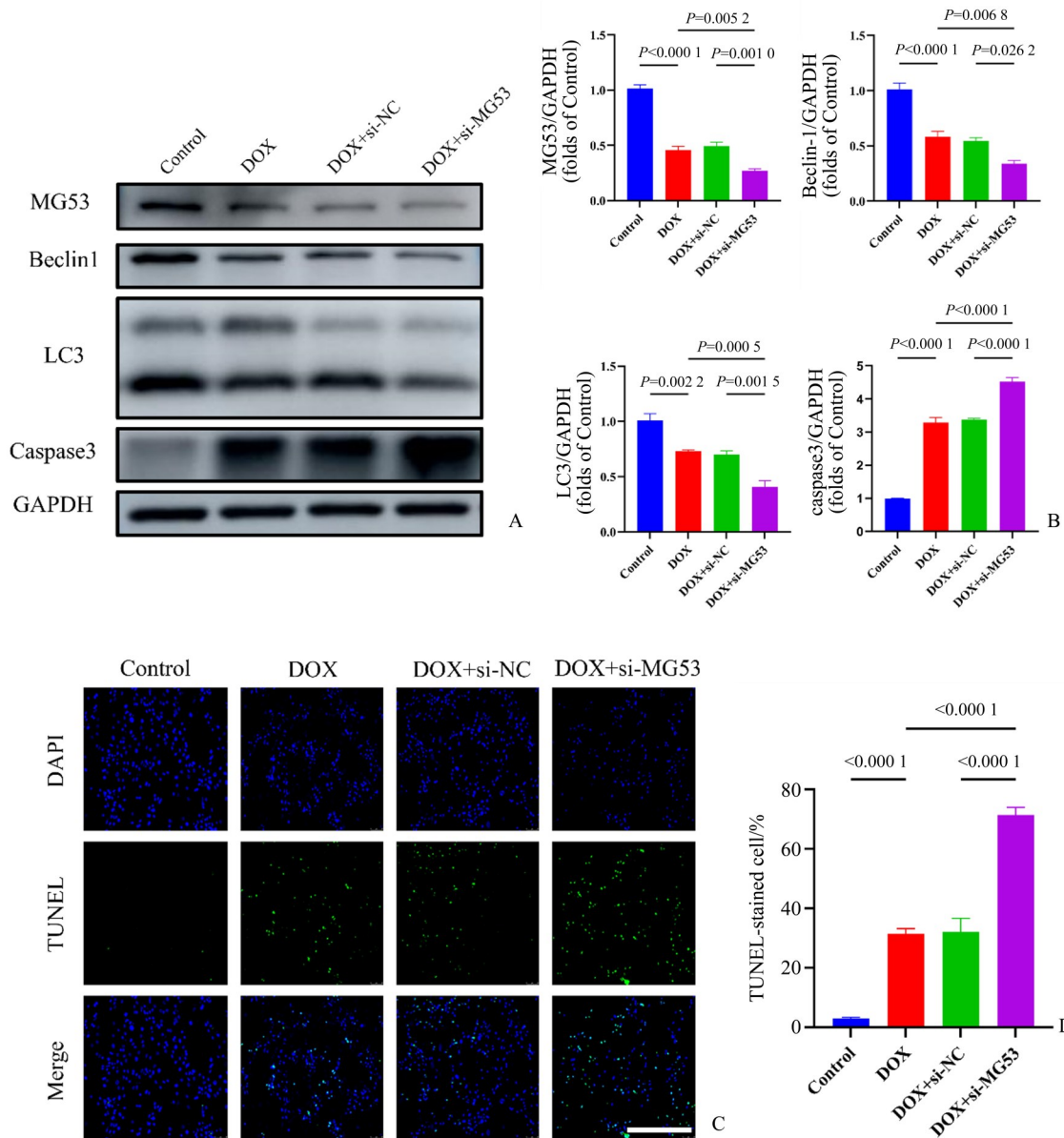
小干扰RNA对照组心肌细胞的Beclin1、LC3蛋白表达水平下降,差异有统计学意义, P 值均 $< 0.000 1$ 。而使用小干扰RNA敲低MG53后,与DOX+si-NC组相比,DOX+si-MG53组的Beclin1、LC3蛋白表达水平下降(Beclin-1: DOX+si-MG53: 0.34 ± 0.06 vs. DOX+si-NC: 0.54 ± 0.07 , $P = 0.026 2$; LC3: DOX+si-MG53: 0.41 ± 0.12 vs. DOX+si-NC: 0.70 ± 0.07 , $P = 0.001 5$),差异有统计学意义,提示敲低MG53进一步抑制心肌细胞自噬。同时,与对照组相比,阿霉素模型组及小干扰RNA对照组心肌细胞的caspase3蛋白表达水平上升(Control: 0.99 ± 0.05 vs. DOX: 3.29 ± 0.33 , $P < 0.000 1$; Control: 0.99 ± 0.05 vs. DOX+si-NC: 3.37 ± 0.08 , $P < 0.000 1$),差异有统计学意义(P 值均 $< 0.000 1$),而DOX+si-MG53组的caspase3蛋白表达水平上升(DOX+si-MG53: 4.52 ± 0.28 vs. DOX+si-NC: 3.37 ± 0.08 , $P < 0.000 1$),差异有统计学意义,促进心肌细胞的凋亡。如图6C、D所示,与阿霉素模型组及小干扰RNA对照组心肌细胞的TUNEL阳性荧光比例相比(方差分析统计量 $F = 105.6$, $P < 0.0001$),DOX+si-MG53组的TUNEL阳性荧光比例上升(DOX+si-MG53: 71.34 ± 5.90 vs. DOX+si-NC: 32.19 ± 9.91 , $P < 0.000 1$),差

异有统计学意义,进一步提示了MG53可抑制心肌细胞凋亡,并促进自噬,从而改善阿霉素所诱导的心肌毒性。

3 讨论

本实验采用腹腔注射阿霉素诱导急性心肌毒性的造模方法来模拟临床上阿霉素治疗引起的心脏副作用,初步探究MG53蛋白对阿霉素急性心肌毒性小鼠心脏功能的影响及可能机制。结果表明,MG53蛋白可减轻阿霉素所致心肌损伤,可能与促进心肌细胞自噬水平并抑制凋亡有关。

既往研究指出,阿霉素可引起代谢及营养系统功能紊乱,导致患者体质量减轻、进食量下降等化疗后衰弱症状^[14],本研究中,我们的小鼠模型也证实了上述报道结果。我们给予小鼠腹腔注射阿霉素后,DOX组以及DOX+AAV9-NC组左心室EF与FS显著下降,进一步病理观察及qPCR验证显示模型组心肌组织发生重构,而MG53蛋白水平显著下降。MG53是一种与急性细胞膜修复相关的肌肉特异蛋白,其在细胞增殖与凋亡等多种生理以及病理过程中都发挥着重要的作用。研究表明,敲除MG53会破坏心肌



A: Western blot analysis of MG53, Beclin1, LC3 and caspase3 protein expression, $n = 6$; B: The quantification of western blot analysis was shown, $n = 6$; C: Intracellular apoptosis levels were detected by TUNEL staining, $n = 6$, Scale bar = 100 μm ; D: The quantification of TUNEL was shown, $n = 6$.

图6 敲低MG53表达可抑制DIC大鼠原代心肌细胞自噬水平并促进其凋亡

Fig. 6 Knockdown of MG53 inhibited autophagy and facilitated apoptosis in NRCs exposed to DOX

T管完整性,增加心肌T管对损伤的敏感性,显著促进细胞炎症反应,加剧心肌肥厚和心功能障碍^[15]。有文献报道, MG53在心脏I/R损伤中,可通过RISK通路和SAFE通路抑制心肌ROS引起的氧化应激及炎症反应,同时伴随MG53表达显著下调^[16]。另一方面,在主动脉弓缩窄术(TAC)诱导的心肌肥厚模型中,过表达MG53可抑制NF- κ B信号传导并上调KChIP2表达,从而发挥抑制心室重构的作用^[17]。越来越多的研究表明, MG53表达水平与临床心肌梗患者的心功能以及预后密切相关^[18-19]。由此可见, MG53在心脏损伤过程中可能发挥重要作用。本研究通过体内使用腺相关病毒过表达MG53发现,阿霉素处理的小鼠体质量以及进食量

显著升高,左心室EF与FS值显著上升,同时心室重构指标ANP、BNP以及 α -MHC等mRNA水平显著下降。这一现象表明MG53可减轻阿霉素诱导的心功能障碍。

既往有文献报道, MG53可上调骨骼肌萎缩中C2C12成纤维细胞的线粒体自噬水平^[13],但在心肌细胞中, MG53对自噬水平的影响尚不明确。本研究中通过电镜分析,结果表明小鼠DIC模型中心肌细胞自噬小体生成受到抑制,而MG53过表达可显著上调DIC小鼠心肌自噬水平。而有文献报道,自噬可通过降解蛋白聚集物和错误折叠蛋白维护细胞正常功能,减轻细胞内应激诱发的细胞凋亡^[20]。因此本研究进一步检测了凋亡相关的关键分子,结果表明阿

霉素可促进心肌细胞的凋亡,而过表达 MG53 可抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡。关于这种现象,解释可能是由于阿霉素诱导细胞内 ROS 增加,抑制心肌细胞自噬水平,导致细胞自身无法及时清除异常的 ROS 以及炎症因子,从而促进了心肌细胞的凋亡,加剧心肌损伤,导致心室重构以及心功能下降,而过表达 MG53 后显著上调了心肌细胞自噬水平,使心肌细胞可及时清除受损的线粒体及 ROS,减轻心肌细胞损伤。

为了在细胞层面验证 MG53 对于阿霉素心肌毒性的影响,我们构建了 siRNA 以及过表达腺病毒双向验证 MG53 对于心肌细胞凋亡的作用。结果显示过表达 MG53 可显著减轻细胞凋亡;而敲低 MG53 蛋白可显著增加心肌细胞凋亡。有文献报道, MG53 可通过降解 IRS-1, 从而抑制 PI3K-AKT-mTOR 通路^[21], 而 PI3K-AKT-mTOR 信号通路是负性调控自噬的一个重要途径^[22]。因此我们同时检测了自噬相关水平,结果提示过表达 MG53 可显著增强心肌细胞自噬相关蛋白表达,而敲低 MG53 则可导致自噬水平下调。但相关具体机制未深入探究。据报道, mTORC1 通过磷酸化使形成的 ULK1 自噬调节复合体失活,从而抑制自噬小体的生物生成^[23]。此外, mTORC1 还可通过抑制 p300 乙酰转移酶,促进 LC3 乙酰化,抑制 LC3 脂化,最终抑制 LC3 与自噬体膜结合^[24]。因此我们猜测 MG53 对 mTOR 可能有着间接或者直接的调控作用,但具体的分子机制需要进一步地深入研究。

另一方面,在某些病理情况下,自噬和凋亡可通过共同作用引发细胞死亡。有研究表明 3-甲基腺苷(3-MA)可抑制自噬,减轻大鼠阿霉素心肌细胞损伤^[25]。但也有文献提出,适当促进细胞自噬,可增加细胞能量供应和维持线粒体功能,减轻阿霉素诱导的心脏毒性^[26]。近年来对于自噬水平在细胞内的作用,提出了一个新的观点:认为自噬是一个动态过程,在整个过程中,细胞将损伤的细胞器或蛋白质吞噬后形成自噬小体,接着自噬小体与溶酶体结合成自噬溶酶体,最终降解自噬内容物,这个过程被称为自噬流(autophagic flux)。自噬流中的任一环节出现障碍,自噬都无法完成其生物学功能^[27-28],而单纯检测自噬水平的升高或者降低亦难以完整反映心肌细胞自噬流是否通畅。有文章报道阿霉素可通过抑制溶酶体酸化,从而抑制自噬溶酶体降解,导致心肌细胞自噬流阻断,自噬水平上升,最终促进阿霉素心肌毒性^[29]。因此我们猜测 MG53 对于心肌细胞可能存在促进自噬流通畅的作用,但仍需要进一步地深入研究。

综上所述,我们的研究结果提示, MG53 可显著减轻阿霉素心肌损伤,改善心脏重构,并可促进心肌细胞自噬,减轻心肌细胞凋亡,可能是阿霉素心肌毒性治疗的新靶点。但本研究仅阐述了 MG53 对于心肌细胞自噬水平及凋亡的调控作用,并未深入研究 MG53 与自噬、凋亡以及自噬流的分子机制,后续需要进一步探究,这将为阿霉素心肌毒性的临床治疗提供新的靶点和思路。

参考文献

- [1] Gao L, Wu ZX, Assaraf YG, et al. Overcoming anti-cancer drug resistance via restoration of tumor suppressor gene function [J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 57: 100770.
- [2] Levis BE, Binkley PF, Shapiro CL. Cardiotoxic effects of anthracycline-based therapy: what is the evidence and what are the potential harms [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(8): 445-456
- [3] Unverferth DV, Magorien RD, Leier CV, et al. Doxorubicin cardiotoxicity [J]. *Cancer Treat Rev*, 1982, 9(2): 149-164.
- [4] Deidda M, Madonna R, Mango R, et al. Novel insights in pathophysiology of antineoplastic drugs-induced cardiotoxicity and cardioprotection [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2016, 17 Suppl 1: S76-S83.
- [5] Farias JG, Molina VM, Carrasco RA, et al. Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): 966.
- [6] Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: Overview of the roles of oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 795602.
- [7] Li D, Yang Y, Wang S, et al. Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102089.
- [8] Morikawa Y, Heallen T, Leach J, et al. Dystrophin-glycoprotein complex sequesters Yap to inhibit cardiomyocyte proliferation [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 227-231.
- [9] Sawicki KT, Sala V, Prever L, et al. Preventing and treating anthracycline cardiotoxicity: new insights [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 309-332.
- [10] Zhang Y, Wu HK, Lv F, et al. MG53: Biological function and potential as a therapeutic target [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92(3): 211-218.
- [11] Cao CM, Zhang Y, Weisleder N, et al. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic pre-

- conditioning[J]. *Circulation*, 2010, 121(23): 2565–2574.
- [12] Shan D, Guo S, Wu HK, et al. Cardiac ischemic preconditioning promotes MG53 secretion through H₂O₂-activated protein kinase C- δ signaling [J]. *Circulation*, 2020, 142(11): 1077–1091.
- [13] Gu LJ, Zhang YY, Zhu N, et al. Mitsugumin 53 promotes mitochondrial autophagy through regulating Ambra1 expression in C2C12 myoblast cells[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(3): 290–298.
- [14] Tokarska-schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin [J]. *C R Biol*, 2006, 329(9): 657–668.
- [15] Zhang C, Chen B, Wang Y, et al. MG53 is dispensable for T-tubule maturation but critical for maintaining T-tubule integrity following cardiac stress [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 112: 123–130.
- [16] Zhang Y, Lv F, Jin L, et al. MG53 participates in ischaemic postconditioning through the RISK signaling pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(1): 108–115.
- [17] Liu W, Wang G, Zhang C, et al. MG53, a novel regulator of KChIP2 and Ito, f, plays a critical role in electrophysiological remodeling in cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2019, 139(18): 2142–2156.
- [18] Zhong W, Benissan-messan DZ, Ma J, et al. Cardiac effects and clinical applications of MG53 [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 115.
- [19] Xie H, Yan Z, Feng S, et al. Prognostic value of circulating MG53 levels in acute myocardial infarction [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 596107.
- [20] Shan R, Liu N, Yan Y, et al. Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: relationships and the role of Hsp27[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105169.
- [21] Ham YM, Mahoney SJ. Compensation of the AKT signaling by ERK signaling in transgenic mice hearts overexpressing TRIM72[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(10): 1451–1462.
- [22] Barnes PJ. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(3): 790–806.
- [23] Dossou AS, Basu A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10): 1422.
- [24] Paquette M, El-houjeiri L, Pause A. mTOR pathways in cancer and autophagy [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(1): 18.
- [25] Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 134(1): 82–90.
- [26] He H, Wang L, Qiao Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment alleviates doxorubicin-induced ferroptosis and cardiotoxicity by upregulating AMPK α 2 and activating adaptive autophagy [J]. *Redox Biol*, 2021, 48: 102185.
- [27] Nowosad A, Jeannot P, Callot C, et al. p27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy-lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1076–1090.
- [28] 蒋玉坤,胡芝爱,关禹哲,等. 应力诱导自噬的机械转导过程研究进展[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(6): 929–935.
- Jiang YK, Hu ZA, Guan YZ, et al. Research progress in mechanotransduction process of mechanical-stress-induced autophagy [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2021, 52(6): 929–935.
- [29] Li DL, Wang ZV, Ding G, et al. Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification [J]. *Circulation*, 2016, 133(17): 1668–1687.

(编辑 孙慧兰)