

·基础研究·

## E3泛素-蛋白连接酶Parkin介导线粒体自噬参与荷瘤小鼠心肌损伤

邓世杰<sup>1,2</sup>, 李兴会<sup>1,2</sup>, 蔡卫斌<sup>1,2</sup>

(1. 广东省疾病模式动物工程技术研究中心//中山大学实验动物中心, 广东广州 510006; 2. 中山大学中山医学院生物化学教研室, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】观察荷瘤状态下小鼠心肌损伤情况,探讨*park2*基因编码的E3泛素-蛋白连接酶Parkin介导线粒体自噬在荷瘤小鼠心肌损伤中的作用及机制。【方法】通过PCR和蛋白质免疫印迹筛选和鉴定*park2*<sup>-/-</sup>小鼠;通过皮下移植瘤技术构建荷瘤动物模型,采用小动物心脏超声分析小鼠心脏结构与功能,观察心室内径、心室容积、射血分数、缩短分数以及心室壁厚度的变化;采用病理学方法分析小鼠心脏的形态学特征;使用Fluo-3、Rhod-2、DHE-ROS及JC-1探针进行线粒体损伤指标检测;通过qPCR技术分析线粒体生成相关因子*tfam*, *nrf1*, 线粒体融合相关因子*opa1*, *mfn2*, 线粒体分裂相关因子*fis1*, 线粒体自噬相关因子*park2*表达改变;通过Western Blot技术检测关键蛋白LC3 II、LC3 I、Parkin表达水平。【结果】心脏超声检测结果显示, B16黑色素瘤荷瘤小鼠心脏功能下降明显( $P<0.01$ );电镜结果显示, 荷瘤状态下小鼠心肌细胞线粒体数量增多, 出现空泡化改变( $P=0.032$ );进一步分析显示荷瘤状态可引起心肌细胞线粒体损伤, 并激活线粒体自噬; *park2*<sup>-/-</sup>小鼠荷瘤后, 其死亡率明显增加( $P<0.05$ );对*park2*<sup>-/-</sup>小鼠进行上述荧光探针、病理学观察及关键分子检测, 结果显示*park2*<sup>-/-</sup>小鼠线粒体损伤较WT小鼠严重, 线粒体自噬过程受到抑制( $P<0.01$ )。【结论】E3泛素-蛋白连接酶Parkin在荷瘤状态心肌损伤过程中具有一定的保护作用, 这与其介导的线粒体自噬有关。

**关键词:** Parkin; 荷瘤状态; 心肌损伤; 线粒体自噬

中图分类号: R332 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)02-0181-11

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0203

## E3 Ubiquitin Ligase Parkin-Mediated Mitophagy in Cardiomyocyte Injury at Tumor-Bearing State

DENG Shi-jie<sup>1,2</sup>, LI Xing-hui<sup>1,2</sup>, CAI Wei-bin<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center for Disease-Model Animals//Laboratory Animal Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: CAI Wei-bin; E-mail: caiwb@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To observe the myocardial injury in tumor-bearing mice, and to explore the role and mechanism of *park2* gene-encoded E3 ubiquitin protein ligase Parkin-mediated mitophagy in myocardial injury of tumor-bearing mice. 【Methods】 PCR and Western Blot were used to verify *park2*<sup>-/-</sup> mice, the tumor-bearing animal models were constructed by subcutaneous transplantation, small animal ultrasound imaging system was used to monitor cardiac structure and

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0801403); 国家自然科学基金(82170261, 81970219, 82000250); 广东省自然科学基金(2021A151011005, 2021B1212040006); 中国博士后基金(2020M672976)

作者简介: 邓世杰, 硕士生, 研究方向: 心血管疾病, E-mail: dengshj6@mail2.sysu.edu.cn; 蔡卫斌, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: caiwb@mail.sysu.edu.cn

function, the changes in left ventricular internal dimensions (LVD), left ventricular volume (LVV), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and left ventricular wall thickness (LVW) were measured. Morphological changes of hearts were analyzed by pathological techniques. Fluo-3, Rhod-2, DHE-ROS and JC-1 probes were used for the detection of mitochondrial damage indicators. qPCR technology was used to evaluate mitochondriogenesis related factors *tfam* and *nrf1*, mitochondrial fusion related factors *opa1* and *mfn2*, mitochondrial fission related factor *fn1*, and mitophagy related gene *park2*. Expression of LC3 II, LC3 I and Parkin was assessed by Western Blot.【Results】The small animal ultrasound imaging revealed that B16 melanoma-bearing mice had a significant reduction in cardiac function ( $P<0.01$ ). Transmission electron microscopy (TEM) showed increased numbers of mitochondria and mitochondria vacuolization in tumor-bearing mice ( $P=0.023$ ). Further molecular analysis indicated that tumor-bearing state could cause mitochondrial damage in cardiomyocytes and activate mitophagy. There was significantly increased mortality in tumor-bearing *park2*<sup>-/-</sup> mice ( $P<0.05$ ). Mitophagy was inhibited in *park2*<sup>-/-</sup> mice and more severe mitochondrial damage was noted ( $P<0.05$ ).【Conclusion】E3 ubiquitin protein ligase Parkin plays a protective role in cardiomyocyte injury at a tumor-bearing state, which is associated with E3 ubiquitin protein ligase Parkin-mediated mitophagy.

**Key words:** Parkin; tumor-bearing state; cardiomyocyte injury; mitophagy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(2): 181-191]

癌症患者生存率的提高往往伴随其他系统损伤。癌后心血管病是幸存癌症患者中易发和致死原因之一<sup>[1]</sup>。癌后心血管损伤不仅可由癌症治疗手段引起,肿瘤本身也能直接导致<sup>[2-4]</sup>。在抗癌治疗前,癌症患者心肌损伤标志物如NT-proBNP, MR-proANP水平升高与死亡率密切相关<sup>[5-6]</sup>。因此,研究荷瘤状态下心肌损伤的原因显得尤为重要。心脏是高耗能器官,富含线粒体,心肌细胞线粒体通过氧化磷酸化生成ATP为心脏提供能量。线粒体自噬是一种特异性清除受损线粒体的自噬现象,在正常情况下,心肌细胞通过线粒体自噬途径清除受损线粒体,是机体控制线粒体质量的重要途径。E3泛素-蛋白连接酶Parkin(E3 ubiquitin ligase Parkin)是由*park2*基因编码的蛋白质,最初的研究发现*park2*基因缺失能够引起帕金森病。Parkin含有465个氨基酸残基、相对分子质量为52 000,其N端与泛素同源,称为泛素样结构域。Parkin广泛表达于脑、心脏等组织器官,主要游离在胞质。当细胞受刺激时,Parkin会在线粒体外膜上大量聚集,并与泛素激活酶E1、泛素结合酶E2和泛素分子一起泛素化修饰受损线粒体外膜蛋白,启动自噬清除异常的线粒体。Parkin转移到线粒体上是启动线粒体自噬的关键。Parkin在心脏中表达水平较高,其介导的线粒体自噬对于心脏功能维持有重要作用<sup>[7,8]</sup>。许多研究阐述了Parkin蛋白在各器官的功能,包括证明PINK1-Mfn2-Parkin途

径是线粒体质量控制的最佳通路之一<sup>[9]</sup>,Parkin缺失使得其对心肌损伤敏感性增加<sup>[10]</sup>。此外,Parkin介导的线粒体自噬途径是完成围产期心脏发育的基础<sup>[11]</sup>。这些研究均提示,Parkin与维持心脏生理稳态密切相关。Parkin介导的线粒体自噬是否参与荷瘤状态下心肌损伤是值得探讨的重要科学问题。基于此,本研究将使用移植瘤模型小鼠研究荷瘤状态心肌损伤特征与线粒体损伤特征,并使用*park2*<sup>-/-</sup>小鼠研究Parkin与荷瘤状态心肌损伤之间的关系及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 Masson染色试剂盒购自SolarBio公司,ECL化学发光检测试剂盒与BCA蛋白浓度测定试剂盒购于Millipore公司,辣根过氧化物酶标记(HRP)的抗鼠二抗与抗兔二抗购于Cell Signaling Technology公司,Parkin抗体、LC3抗体购于Abcam公司,内参GAPDH抗体为BioTech公司,Fluo-3探针、Rhod-2探针购于翊圣生物,DHE-ROS探针购于南京建成,JC-1探针购于碧云天,B16黑色素瘤购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,普通小鼠饲料购自广东省医学实验动物中心,戊巴比妥钠购自Sigma公司。其余试剂均为分析纯。

1.1.2 设备 小动物超声实时影像系统型号为

Vevo®3100, qPCR 仪型号为 ABI QuantStudio 6, 显影仪型号为 Bio-Rad Chemidoc MP, 透射电子显微镜型号为 Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Twin。

1.1.3 实验动物 野生型 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 购于中山大学实验动物中心(许可证号: SCXK(粤)2016-0029), SPF 级 *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠(B6.129S4-Prkntm1Shn/J, Strain #006582) 购于 Jax 实验室。本研究对实验动物的使用和处理严格遵守中山大学实验动物中心管理要求。动物实验及相关操作获得中山大学实验动物管理与使用委员会(IACUC) 批准(批准编号: SYSU-IACUC-2021-000574)。

## 1.2 方法

1.2.1 *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠筛选与鉴定 3 周龄小鼠鼠尾酚氯仿法抽提基因组 DNA 用于 PCR 鉴定。通过 PCR 鉴定小鼠基因型, 引物序列使用 JAX LAB 中 B6.129S4-Prkntm1Shn/J (Strain #006582) 小鼠的鉴定方法条目。Western Blot 检测 Parkin 蛋白表达水平, 筛选出 *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠子代进行后续实验。

1.2.2 实验动物的分组与饲养 动物房严格按照《GB14925-2010 动物实验间的环境技术指标》执行昼夜明暗交替时间为 12/12 h, 室内温度(22±2)℃, 湿度(55±5)%, 小鼠自由采食和饮水。将 12 只 C57BL/6J 小鼠和 12 只 *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠适应性喂养 1 周后, 分别随机分为 2 组(group control, group TB), 饲养普通饲料(chow diet, CD) 直至观察终点。

1.2.3 小鼠皮下移植瘤模型建立 选取 6~8 周龄小鼠进行荷瘤前适应性喂养。B16 黑色素瘤细胞复苏后稳定传代 2 代, 待生长稳定后使用浓度为 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化, 离心后弃去上层液体后使用生理盐水重悬, 调整密度为每毫升 5.0 × 10<sup>6</sup> 个细胞。将小鼠用左手大拇指和食指捏住颈部皮肤, 然后将鼠尾用左手无名指和小指固定于左手大鱼际。将右侧腋窝用体积分数 75% 酒精消毒 3 次。右手持吸有肿瘤细胞和生理盐水混合液的注射器, 在右侧腋窝的位置进针, 注意不要突破腹膜, 将针头保持于皮下位置。然后近水平位置将针头几乎完全插入皮下, 将混有肿瘤细胞注入皮下(肿瘤细胞量约 1 × 10<sup>6</sup> 个), 快速退针, 左手食指轻压针孔约 1 min 后将小鼠放回饲养笼中。皮下移植瘤操作完成后计为荷瘤第 0 天(Day 0)。对照组小鼠在相同部位进行等体积生理盐水皮下注射操作。

1.2.4 小鼠心脏超声检查操作 喂养至观察时间

点(Day 14)后, 对各组进行小动物心脏超声检测其功能学数据分析。使用异氟烷气体麻醉小鼠后, 呈仰卧位固定于超声动物区, 带上异氟烷面罩。对探测区域涂抹脱毛膏进行脱毛处理并暴露皮肤, 在动物皮肤或探头上涂抹兽用专用耦合剂。调整动物平板角度与地面呈 10°, 使小鼠头高脚低位, 小鼠心率保持 450 次/min 以上。垂直探头使声束垂直进入小鼠胸壁, 调整获得小鼠心脏超声图像, 将探头带标记段左右旋转 5°~10°, 并旋动物平板旋钮移动动物 x 轴, 找到使探头长轴与小鼠左室长轴平行的位置, 取得满意的左心室长轴图像。选取左心室长轴图像标准为流出道与心尖部清晰且呈直线联通、可见开闭的二尖瓣。保持上述体位及动物心率, 探头带标记端向左旋转 90° 再次进行探测, 调整动物平板旋钮移动 y 轴, 获得满意的左心室短轴图像。选取左心室短轴图像的标准为: 心腔最大位、可见清晰的运动状态的乳头肌。

1.2.5 小鼠组织取样操作 处死前禁食不禁水 8 h, 称重, 使用浓度为 30 g/L 的戊巴比妥钠麻醉。分离心脏组织, 剪开右心耳, 于心尖处使用 PBS 灌注至流出液清澈。将心脏剪下后置于 PBS 中洗净擦干, 部分置于 40 g/L 多聚甲醛固定进行后续实验, 部分剪块置于 -80 °C 保存。

1.2.6 蛋白质免疫印迹分析 用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液裂解组织, 提取心脏组织总蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。各组蛋白样品上样量均为 40 μg, SDS-PAGE 电泳分离样品, 240 V 恒流冰上电转 120 min, 将 PVDF 膜置于质量分数 5% BSA 封闭液中室温封闭 1 h。使用相应的一抗按照说明书稀释后 4 °C 孵育过夜。室温孵育二抗 2 h, ECL 发光法显影, 显影条带用 Image J 软件进行灰度分析。

1.2.7 心脏冰冻切片染色 使用 40 g/L 多聚甲醛固定心脏组织, 梯度蔗糖脱水后使用 OCT 包埋。切成厚度为 5~6 μm 的切片放入 -80 °C 保存。HE 染色前取出切片室温复温 30 min, PBS 洗去 OCT 后使用苏木素染色 3~10 min。流水冲洗后使用盐酸乙醇分化 3 s, 流水冲洗后使用伊红染色 5 min。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后封片观察。Masson 染色步骤参照试剂盒说明书。免疫荧光染色前复温 30 min, 洗去 OCT, 0.1% 曲拉通破膜 5 min, 质量分数 5% BSA 封闭 1 h, 配置相应一抗 4 °C 孵育过夜, 室温孵育二抗 1 h, hoechst 封片剂封片观察。

1.2.8 免疫荧光染色 Fluo-3探针、Rhod-2探针、DHE-ROS探针及JC-1探针使用方法均参照试剂盒说明书操作。

1.2.9 原代心肌细胞提取及共培养 使用2.5 g/L的胰蛋白酶过夜消化新鲜收集的乳鼠心脏,轻柔吹打分离新鲜心肌细胞后六孔板中培养至70%满,随即使用孔径为0.04  $\mu\text{m}$ 的共培养小室架于板孔上方,小室内提前培养1 mL复苏后稳定传代2代的B16黑色素瘤细胞,培养密度为 $2.0 \times 10^6$ 个/mL。共培养24 h后收获心肌细胞样本进行后续实验。

### 1.3 实验观察指标

1.3.1 PCR分析基因型 3周龄小鼠鼠尾酚氯仿法抽提基因组DNA用于PCR鉴定小鼠基因型。*park2*引物序列使用JAX LAB中B6.129S4-Prkntm1Shn/J (Strain #006582)小鼠的鉴定方法条目。具体引物序列如下: Common: 5'-GCAGAATTACAGCAGT-TACCTGG-3', WT: 5'-CCTACACAGAAGTGT-GACCTGG-3', KO: 5'-ATGTTGCCGTCCTCCTT-GAAGTCG-3'。若*park2*被完全敲除即纯合子,PCR仅扩增出500 bp条带;若为杂合子,PCR扩增出500 bp和250 bp两条带;野生型小鼠,PCR仅扩增出250 bp条带。

1.3.2 心脏超声数据分析指标 检测方法参照1.2.3步骤。采集心脏长轴左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimensions, LVDs)、左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimensions, LVDd)、左心室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVVs)、左心室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVVd)、射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)、左心室前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness, LVAW)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPW)。

1.3.3 蛋白质免疫印迹分析 ECL发光法显影,显影条带用Image J软件进行灰度分析,计算不同组别样品中Parkin和LC3 II/LC3 I的相对表达量。

1.3.4 心脏冰冻切片染色 镜下拍摄不同组别小鼠心脏HE染色图像与Masson染色图像。

1.3.5 免疫荧光染色 Fluo-3探针、Rhod-2探针、DHE-ROS探针及JC-1探针使用方法均参照试剂盒说明书操作。使用荧光显微镜对荧光强度进行拍摄,使用Image J软件进行荧光强度分析。

1.3.6 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线粒体数量、形态变化。

### 1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行统计分析,所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

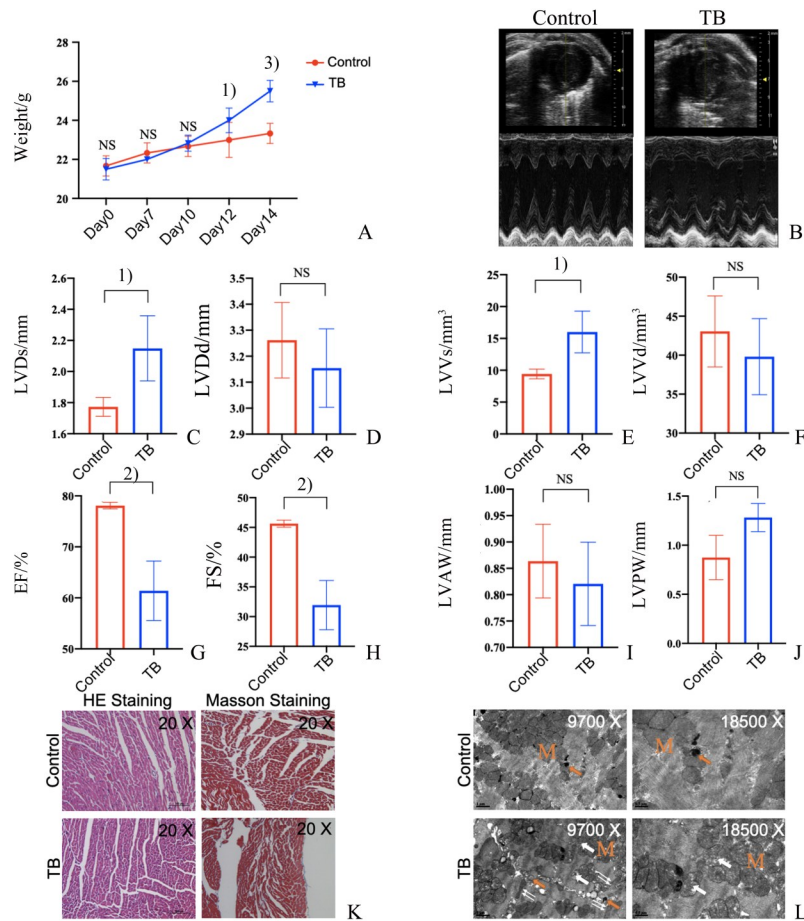
## 2 结果

### 2.1 荷瘤小鼠心功能损伤和心肌细胞线粒体异常

皮下移植瘤Day12后荷瘤状态小鼠及对照组小鼠体质量出现差异,荷瘤组体质量高于对照组,说明肿瘤组织生长明显,小鼠总体质量增加(12 d:  $t = 2.236$ ,  $P = 0.049$ ; 14 d:  $t = 7.050$ ,  $P = 0.000\ 035$ ;图1 A);对荷瘤状态小鼠及对照组小鼠进行心脏功能检测,结果显示荷瘤Day14小鼠LVDs与LVVs较对照组增大(LVDs:  $t = 2.985$ ,  $P = 0.041$ ; LVVs:  $t = 3.391$ ;  $P = 0.028$ ;图1 C、E),EF与FS较对照组降低(EF:  $t = 4.934$ ,  $P = 0.007\ 9$ ; FS:  $t = 5.677$ ;  $P = 0.004\ 8$ ;图1 G、H),而LVAW及LVPW改变无明显差异(图1 I、J),表明荷瘤状态引起心脏射血功能下降、心脏收缩功能损伤,而心室壁结构的改变并不明显;采集心脏组织进行病理学观察,镜下HE染色及Masson染色显示荷瘤Day14小鼠较对照组小鼠心脏组织形态无明显改变(图1 K),透射电镜结果显示荷瘤Day14小鼠心肌细胞线粒体出现空泡化,空泡化线粒体数量增多( $t = 3.240$ ;  $P = 0.032$ ),线粒体大小差异较大,可见新生的长条状线粒体(图1 L)。以上数据提示在荷瘤状态下,心肌细胞线粒体发生损伤,并激活机体代偿性生成线粒体。

### 2.2 荷瘤诱发心肌细胞线粒体损伤

JC-1用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,  $\Delta\Psi_m$ )的荧光探针。在线粒体膜电位较高时,JC-1聚集在线粒体的基质中,形成可发生红色荧光的聚合物(polymer);在线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集在线粒体基质,此时JC-1为可发生绿色荧光的单体(monomer),通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。羰基氰化物间氯苯腈(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP)是一种氧化磷酸化抑制剂,可使电子传递链的质子浓度梯度解偶联,消除线粒体膜电位,损伤线粒体。原代心肌细胞JC-1染色结果



A: Body weight changes in Control mice and TB mice,  $n=6$ ; B: Representative echocardiography from Control mice and TB mice; C-D: LVD changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; E-F: LVV changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; G: EF changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; H: FS changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; I: LVAW changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; J: LVPW changes in Control mice and TB mice,  $n=3$ ; K: Representative HE staining and Masson staining picture of hearts from Control mice and TB mice; L: Representative transmission electron microscopy (TEM) pictures of hearts from Control mice and TB mice. Orange M: mitochondria, orange arrow: mitophagosome, white arrow: mitochondria with vacuolation, double white arrow: newly formed mitochondria. Data from individual animals, as well as mean  $\pm$  SD. NS:  $P>0.05$ , 1):  $P<0.05$ , 2):  $P<0.01$ , 3):  $P<0.001$  compared with Control group.

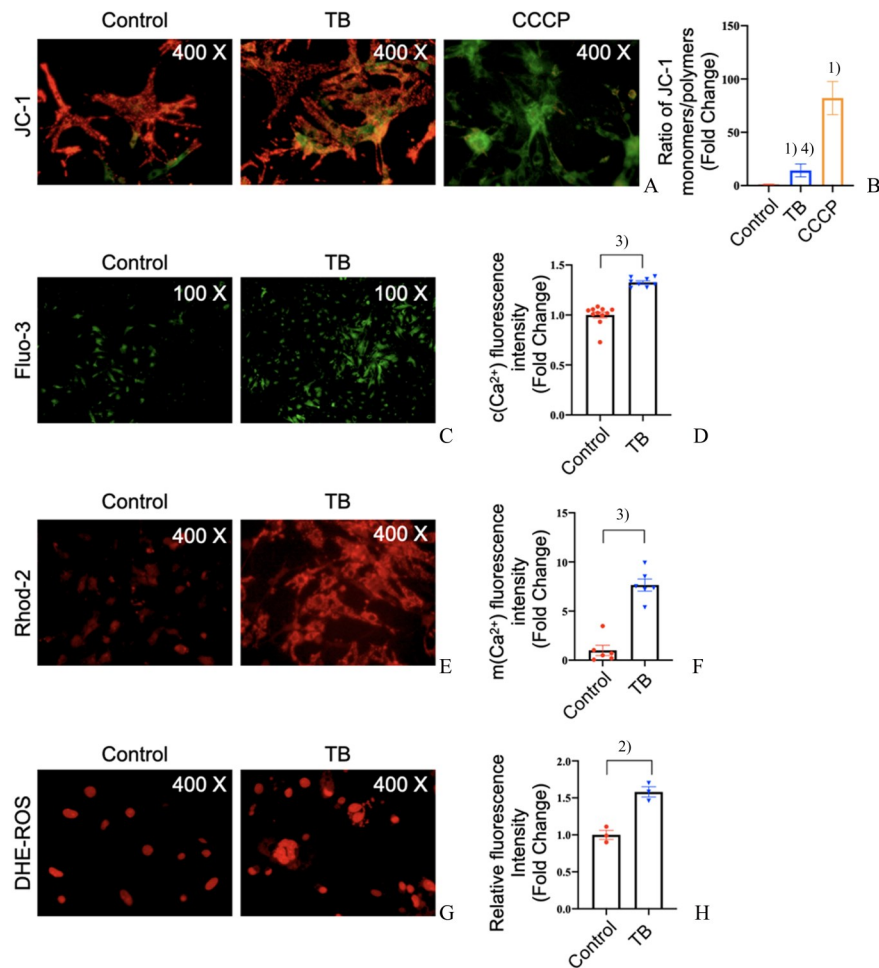
图1 荷瘤小鼠心功能损伤并随心肌线粒体改变

Fig. 1 Impaired function and mitochondrial alterations of cardiomyocyte in tumor-bearing mice

显示,荷瘤共培养心肌细胞线粒体膜电位下降( $t=5.028$ ;  $P=0.0073$ ;图2 A-B),膜电位稳态失衡,线粒体出现损伤;心肌细胞细胞质游离钙离子[ $c(\text{Ca}^{2+})$ ]浓度(图2 C-D)与心肌细胞线粒体钙离子浓度[ $m(\text{Ca}^{2+})$ ]浓度(图2 E-F)较对照组升高[ $c(\text{Ca}^{2+})$  :  $t=8.705$ ;  $P<0.0001$ ;  $m(\text{Ca}^{2+})$  :  $t=8.269$ ;  $P<0.0001$ ],荷瘤共培养心肌细胞出现了钙超载与线粒体钙超载现象,提示线粒体出现不可逆损伤;荷瘤状态心肌细胞DHE平均荧光密度较对照组升高( $t=6.329$ ;  $P=0.0032$ ;图2 G-H),荷瘤状态下细胞内ROS含量升高,可能心肌细胞线粒体损伤有关。

### 2.3 荷瘤状态下心肌细胞线粒体相关因子表达改变

检测荷瘤Day14小鼠及对照组心脏组织线粒体生成相关因子tfam和nrf1、线粒体融合相关因子opa1和mfn2、线粒体分裂相关因子fis1、线粒体自噬相关因子park2等。数据显示,荷瘤小鼠心脏组织中nrf1、opa1、mfn2及tfam表达水平较对照组上调(nrf1:  $t=3.210$ ;  $P=0.0326$ ; opa1:  $t=9.860$ ;  $P=0.0006$ ; mfn2:  $t=5.447$ ;  $P=0.0055$ ; tfam:  $t=29.48$ ;  $P<0.0001$ ;图3 A-C, F),提示荷瘤可刺激线粒体融合过程,并增加了线粒体合成;此外,荷瘤状态下park2表达水平上调( $t=6.868$ ;  $P=0.0024$ ;图3 E),心肌细胞线粒体自噬增强。结合上述结果,提示荷



A: Representative JC-1 immunofluorescent pictures of cardiomyocytes from Control group and TB group; B: Densitometric analysis of JC-1 immunofluorescent results,  $n=3$ ; C: Representative Fluo-3 immunofluorescent pictures of cardiomyocytes from Control group and TB group; D: Densitometric analysis of Fluo-3 immunofluorescent results,  $n=6$ ; E: Representative Rhod-2 immunofluorescent pictures of cardiomyocytes from Control group and TB group; F: Densitometric analysis of Rhod-2 immunofluorescent results,  $n=3$ ; G: Representative DHE-ROS immunofluorescent pictures of cardiomyocytes from Control group and TB group; H: Densitometric analysis of DHE-ROS immunofluorescent results,  $n=3$ . CCCP: Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, positive control of mitochondria damage. 1)  $P<0.05$ , 2)  $P<0.01$ , 3)  $P<0.001$  compared with Control group. 4)  $P<0.05$  compared with CCCP group.

图2 荷瘤状态心肌细胞线粒体损伤

Fig. 2 Mitochondrial damage in cardiomyocytes with tumor-bearing

瘤可引起心肌损伤激活机体线粒体自噬进程,促进线粒体的生成以及受损线粒体的清除。

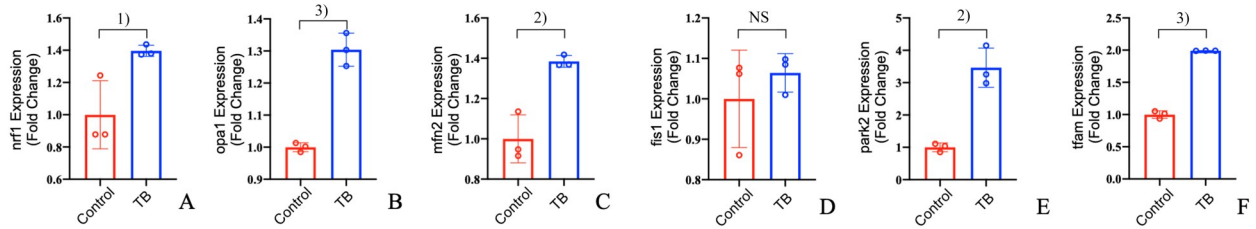
#### 2.4 荷瘤诱导心肌细胞线粒体自噬增强

进一步分析细胞线粒体自噬相关分子 Parkin 及 LC3-II、LC3-I 表达水平。数据显示,与对照组相比,荷瘤 Day 14 小鼠心脏组织 Parkin 蛋白表达水平明显上调。同时,在自噬形成时,胞浆型 LC3 水解形成 LC3-I,LC3-I 跟磷脂酰乙醇胺结合转变膜型 LC3-II,LC3-II/I 比值的大小可估计自噬水平的高低。利用 Western Blot 检测荷瘤小鼠心脏组织 LC3-I 和 LC3-II 的表达,并分析 LC3-II/I 比

值。数据显示,与对照组相比,荷瘤小鼠心脏中 Parkin 表达水平升高( $t=6.223$ ;  $P=0.0008$ ;图 4 A-B),同时 LC3-II/LC3-I 比值明显升高( $t=6.063$ ;  $P=0.0009$ ;图 4 A, C),提示荷瘤状态可激活机体线粒体自噬途径,促进受损线粒体清除,维持细胞内部线粒体稳定性。Parkin 介导的线粒体自噬与荷瘤状态心肌损伤之间存在相关性。

#### 2.5 $Park2^{-/-}$ 小鼠荷瘤后心功能下降显著

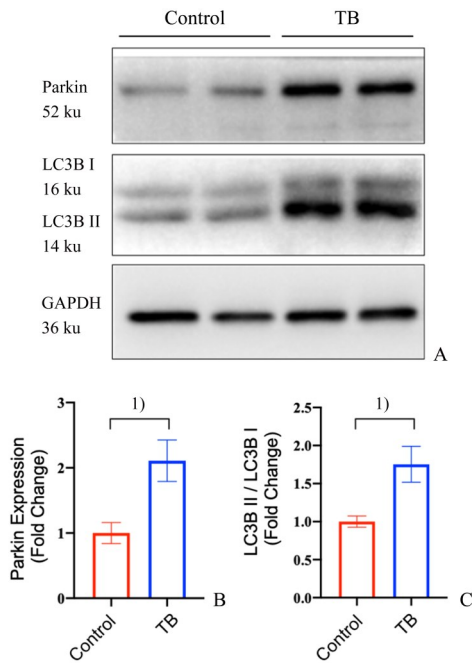
为了研究 Parkin 与荷瘤心肌损伤之间的关系,我们建立了  $park2^{-/-}$ 小鼠荷瘤模型。采用 PCR 鉴定和筛选  $park2^{-/-}$ 小鼠,PCR 产物鉴定方法参照 JAX



A: nrf1 expression changes in Control mice and TB mice; B: opa1 expression changes in Control mice and TB mice; C: mfn2 expression changes in Control mice and TB mice; D: fis1 expression changes in Control mice and TB mice; E: park2 expression changes in Control mice and TB mice; F: tfam expression changes in Control mice and TB mice.  $n=3$  per group, 2 replicates were provided for each sample. NS:  $P>0.05$ , 1):  $P<0.05$ , 2):  $P<0.01$ , 3):  $P<0.001$  compared with Control group.

图3 荷瘤状态心肌细胞线粒体相关因子改变

Fig. 3 Alterations of mitochondria-related factors in cardiomyocytes with tumor bearing



A: Representative picture of Western Blotting results of heart tissues from control mice and tumor-bearing mice; B: Expression levels of LC3B II/LC3B I in control mice and tumor-bearing mice; C: Expression levels of Parkin in control mice and tumor-bearing mice.  $n=4$  per group. 2 parallel experiments for each group. 1)  $P<0.01$  compared with Control group.

图4 荷瘤状态心肌细胞线粒体自噬增强

Fig. 4 Enhanced mitophagy in cardiomyocytes with tumor bearing

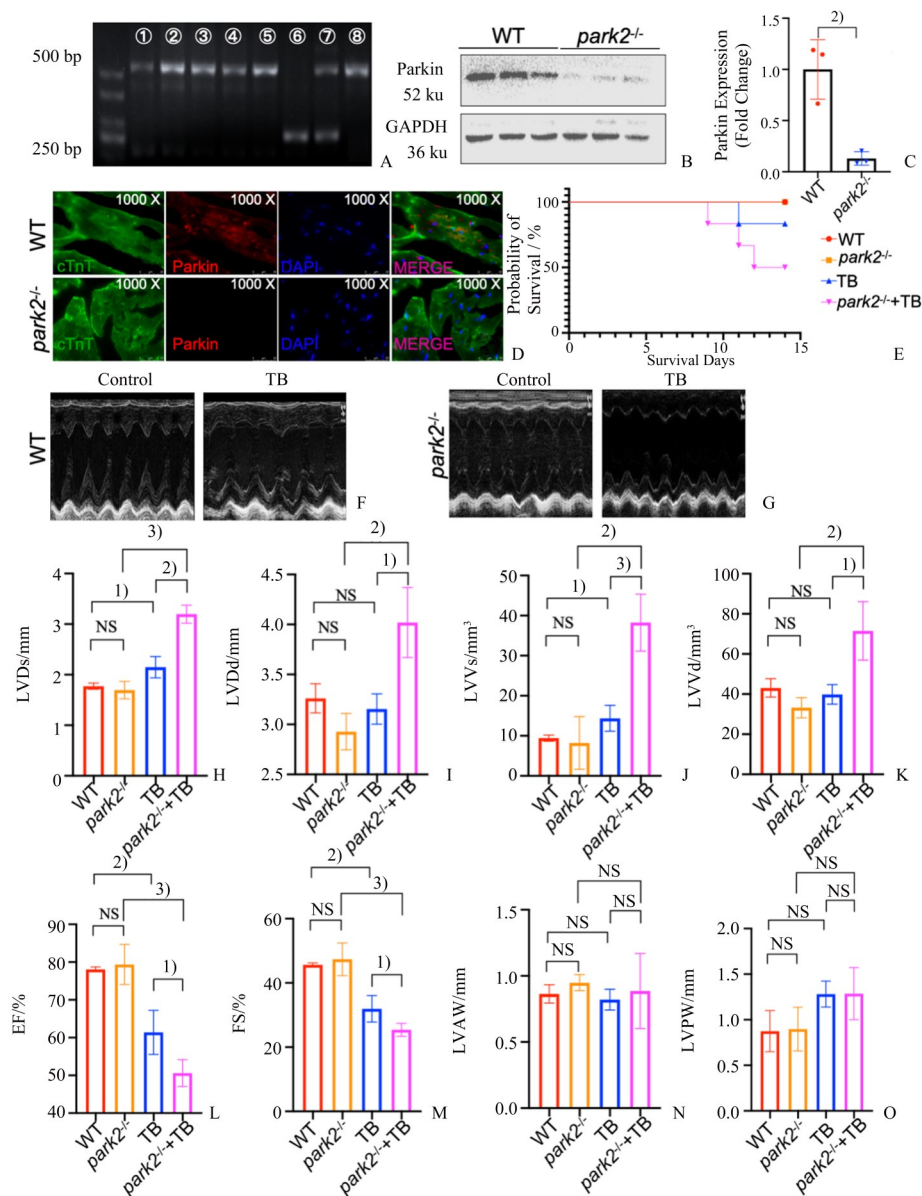
LAB 中 B6.129S4-Prkntm1Shn/J (Strain #006582) 小鼠的鉴定方法条目,具体如下:纯合子为 500 bp 条带,杂合子同时有 500 bp 和 250 bp 的条带,野生型小鼠只有 250 bp 条带(图 5 A)。Western Blot 检测数据显示, $park2^{-/-}$ 小鼠心脏组织 Parkin 蛋白水平明显低于野生型小鼠( $t=5.056$ ;  $P=0.0072$ ;图 5 B)。免疫荧光共定位结果显示  $park2^{-/-}$ 小鼠心肌细胞中

Parkin 蛋白表达水平低于野生型小鼠(图 5 C-D)。

$Park2^{-/-}$ 小鼠荷瘤后( $park2^{-/-}$  +TB)死亡率增加(图 5 E)。对存活小鼠进行小动物心脏超声功能检测,结果显示正常生理情况下  $park2^{-/-}$ 小鼠心脏射血功能无明显差异(图 5 L-M); $park2^{-/-}$  +TB 组小鼠 LVD 及 LVV 均上升(LVDs:  $t=10.43$ ,  $P=0.0005$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=6.572$ ,  $P=0.0028$  vs. TB mice; LVVd:  $t=4.857$ ,  $P=0.0046$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=3.945$ ,  $P=0.0109$  vs. TB mice; LVVs:  $t=5.705$ ,  $P=0.0023$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=6.784$ ,  $P=0.0003$  vs. TB mice; LVVd:  $t=4.265$ ,  $P=0.0080$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=3.536$ ,  $P=0.0166$  vs. TB mice;图 5 H-K),EF 与 FS 显著降低(EF:  $t=8.650$ ,  $P=0.0003$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=3.063$ ,  $P=0.0280$  vs. TB mice; FS:  $t=8.032$ ,  $P=0.0005$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=2.805$ ,  $P=0.0378$  vs. TB mice;图 5 L-M),提示  $park2^{-/-}$ 小鼠在荷瘤状态下心脏功能受损更明显。Parkin 通过介导线粒体自噬参与对细胞内受损线粒体的清除,敲除 Parkin 加剧了荷瘤状态心肌损伤。

### 2.6 $Park2^{-/-}$ 小鼠荷瘤后线粒体损伤加剧

对 WT,  $park2^{-/-}$ , TB 以及  $park2^{-/-}$  +TB 四组使用 JC-1 探针进行电位检测及电镜观察。JC-1 探针荧光计算方法见 2.2 项。原代心肌细胞 JC-1 探针染色结果显示  $park2^{-/-}$ 组生理情况下线粒体膜电位出现下降( $t=12.24$ ;  $P=0.0003$  vs. WT-Control mice),  $park2^{-/-}$  +TB 组小鼠膜电位下降更加显著( $t=5.080$ ,  $P=0.0071$  vs.  $park2^{-/-}$  mice,  $t=6.479$ ,  $P=0.0029$  vs. TB mice;图 6 A-B);组织电镜结果显示  $park2^{-/-}$ 小鼠生理情况下线粒体出现明显空泡化,嵴断裂等损伤特征,荷瘤后  $park2^{-/-}$ 小鼠线粒体损伤程度更明显,可见线粒体空泡化加剧(图 6 C)。



A: PCR results of WT mice and *park2*<sup>-/-</sup> mice. Lane ①-⑤, ⑧: *park2*<sup>-/-</sup> homozygote, lane ⑥: WT, lane ⑦: *park2*<sup>+/-</sup>, n=3; B: Parkin expression fold changes of WT mice and *park2*<sup>-/-</sup> mice, n=3; C: Densitometric analysis of Western Blot results of Parkin, n=3; D: Representative immunofluorescent picture from WT mice and *park2*<sup>-/-</sup> mice. E: Survival curve of WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice; F: Representative echocardiography from WT mice and TB mice; G: Representative echocardiography from *park2*<sup>-/-</sup> mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice; H-I: LVD changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4; J-K: LVV changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4; L: EF changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4; M: FS changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4; N: LVAW changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4; O: LVPW changes in WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice, n=4. Data from individual animals, as well as mean ± SD. Green: cTnT, Red: Parkin, Blue: DAPI. NS: P>0.05, 1)P<0.05, 2)P<0.01, 3)P<0.001.

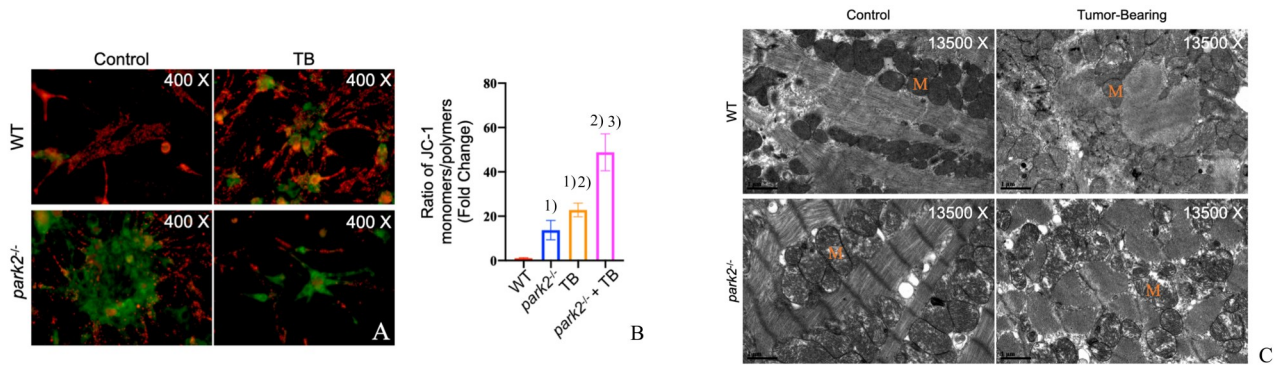
图5 *Park2*<sup>-/-</sup>小鼠荷瘤后心功能损伤加重

Fig. 5 Aggravation of cardiac functional impairment in *park2*<sup>-/-</sup> mice with tumor bearing

### 2.7 *Park2*<sup>-/-</sup>小鼠线粒体自噬受到抑制

Western Blot 分析数据显示,与 Tumor Bearing 相比,*park2*<sup>-/-</sup> +TB 小鼠心脏组织中 Parkin 蛋白缺失 ( $t=10.07$ ;  $P<0.0001$ ; 图 7 A-B)。进一步分析 LC3B II 和 LC3B I 表达水平,数据显示,与 TB 组相

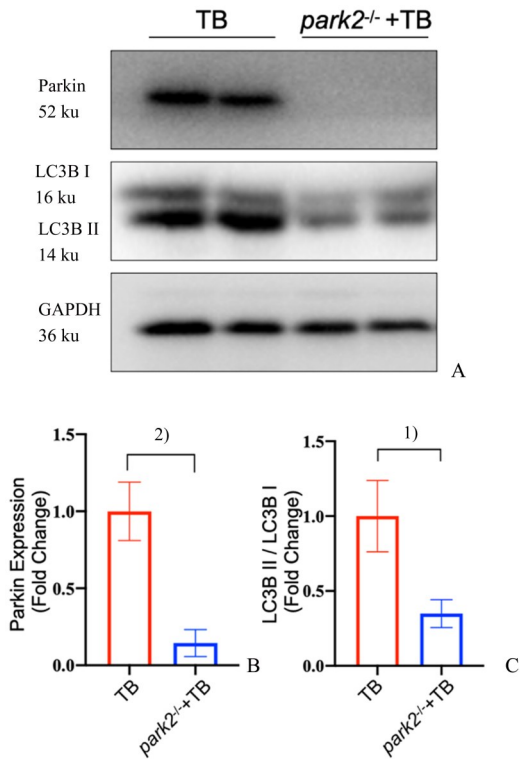
比,*park2*<sup>-/-</sup> +TB 小鼠心脏 LC3 II/LC3 I 比值明显下降 ( $t=5.082$ ;  $P=0.0023$ ; 图 7 A, C),敲除 Parkin,线粒体自噬途径受抑制,进一步提示线粒体自噬参与了荷瘤心肌损伤的病理生理过程。



A: Representative JC-1 immunofluorescent pictures of cardiomyocytes from WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice; B: Densitometric analysis of JC-1 immunofluorescent results, n=3; C: Representative TEM pictures of hearts from WT mice, *park2*<sup>-/-</sup> mice, TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> + TB mice. orange M: mitochondria. 1) P<0.05 compared with group WT; 2) P<0.05 compared with *park2*<sup>-/-</sup> group; 3) P<0.05 compared with TB group.

图6 *Park2*<sup>-/-</sup>小鼠荷瘤后线粒体损伤加剧

Fig. 6 Exacerbated mitochondrial damage in *park2*<sup>-/-</sup> mice with tumor bearing



A: Western Blotting results of heart tissues from TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice; B: Expression levels of Parkin in TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice; C: Expression levels of LC3B II / LC3B I in TB mice and *park2*<sup>-/-</sup> +TB mice. n = 4 per group. 2 parallel experiments for each group. 1) P<0.01 compared with group TB; 2) P<0.001 compared with group TB.

图7 *park2*<sup>-/-</sup>小鼠线粒体自噬受到抑制

Fig. 7 Reduced mitophagy in *park2*<sup>-/-</sup> mice

### 3 讨论

E3泛素-蛋白连接酶Parkin通过其介导线粒体自噬的途径参与多种病理过程<sup>[12, 13]</sup>。由于心脏是个高耗能器官,富含线粒体,因此当线粒体损伤或功能异常,会影响心功能发生改变,这种改变与心血管损伤的发生发展密切相关。线粒体自噬是一种特异性清除损伤线粒体的自噬现象,在正常情况下,心肌细胞通过线粒体自噬途径清除受损线粒体,是机体控制线粒体质量的重要途径。目前已有许多研究阐述Parkin蛋白对机体发育、特别是心脏发育过程中的作用,并有研究指出Parkin通过其PINK1-Mfn2-Parkin途径介导的线粒体自噬完成心肌细胞线粒体的转换,使其能量利用由葡萄糖转变为脂肪酸<sup>[11]</sup>。但对于Parkin蛋白对心脏功能的影响目前尚未完全确定,部分研究指出Parkin缺失在正常成年小鼠中不引起疾病表型,但是在MI模型中*park2*<sup>-/-</sup>小鼠对损伤的敏感性更强,心功能受损程度更重<sup>[14]</sup>;另一方面,有研究发现*park2*<sup>-/-</sup>小鼠在围产期心脏发育具有调控意义,*park2*<sup>-/-</sup>或导致致死性的心肌病发生<sup>[11]</sup>,由此可见,Parkin蛋白在心脏损伤过程中具有一定的作用。本研究以荷瘤状态下出现的心功能下降为切入点<sup>[3]</sup>,验证前述报道中荷瘤状态能够引起心功能下降,移植瘤模型小鼠LVDs与LVVs上升,心功能EF与FS下降,出现了心功能减退表型,进一步病理观察显示心肌细胞线粒体发生损伤,同时通过关键分子分析,发现以Parkin介导的线粒体自噬为主的线粒体质量控制

系统与荷瘤状态心肌损伤过程之间具有明显相关性,因此使用 *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠进一步研究 Parkin 与荷瘤状态心肌损伤的相互作用。研究发现当 Parkin 蛋白缺失时,荷瘤小鼠死亡率升高,心功能受损更严重,镜下线粒体损伤加重。出现这种现象的原因可能是在荷瘤状态下,由于包括 ROS 增加在内的多种原因,心肌细胞线粒体受损,心功能下降,激活以线粒体自噬为主的线粒体质量控制系统,对受损线粒体进行清除与新生线粒体补充来抑制损伤进一步加重;在 Parkin 蛋白缺失时, *park2*<sup>-/-</sup> 小鼠心肌细胞内线粒体自噬受到抑制,无法及时清除受损线粒体,引起受损线粒体逐渐增多,外加异常的活性氧(ROS)<sup>[2, 10, 15]</sup> 产生等多种原因引起心肌细胞损伤加重,从而引起心功能受损加剧。

此外,尽管部分研究提出 Parkin 蛋白的缺失在成年小鼠中不引起疾病表型,但 PINK1-Mfn2-Parkin 途径在介导线粒体自噬的过程中起着非常重要的作用<sup>[16]</sup>,并且在 *park2*<sup>-/-</sup> 成年小鼠中,线粒体表现得更为小而排列混乱,并且随着时间推移会出现异常的密集电子包裹体<sup>[11, 14]</sup>。结合先前对 Parkin 的研究, Parkin 蛋白在维持正常的线粒体形态以及防止异常的活性氧(ROS)产生中具有重要作用<sup>[2]</sup>。并

且在成熟个体内,即使 Parkin 蛋白的表达缺失,也能通过其他的补偿机制进行更复杂的线粒体质量控制。而在发育期内, Parkin 作为线粒体转换的关键分子,对于心脏发育具有重要调控意义<sup>[11]</sup>。胚胎期心脏对生物能的要求较低,因此与成年期心脏以脂肪酸和氨基酸为能量底物不同,胚胎期心脏通过保留这些脂肪酸和氨基酸成分,用以提供发育所需的细胞膜和蛋白质成分。因此,在胎儿心脏中, ATP 主要是通过代谢葡萄糖产生的。出生后的心肌细胞代谢模式转变对游离脂肪酸的倾向性<sup>[17]</sup>,在此时期,心脏基因表达的特征性变化促成了使用葡萄糖的胎儿线粒体被“重新编程”为可代谢脂肪酸的成熟线粒体<sup>[11, 18, 19]</sup>。结合肿瘤本身特殊的代谢模式(Warburg 效应),我们不能否认肿瘤特殊的代谢模式会对心肌细胞产生影响,引起心肌细胞代谢改变。因此,特殊的代谢模式可能引起心肌细胞内功能受损的结构肿胀的线粒体大量堆积无法清除,无法负担大量用于心脏搏动的能量消耗,引起心功能损害。但荷瘤状态心肌损伤、Parkin 介导的线粒体自噬与心肌细胞代谢改变三者之间的关系仍有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Ward E, Thun M. Declining death rates reflect progress against cancer [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9584.
- [2] Catanzaro MP, Weiner A, Kaminaris A, et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy [J]. Faseb J, 2019, 33(10): 11096-11108.
- [3] Berent TE, Dorschner JM, Meyer T, et al. Impaired cardiac performance, protein synthesis, and mitochondrial function in tumor-bearing mice [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226440.
- [4] Venneri L, Caliccio F, Manivarmane R, et al. Subclinical myocardial dysfunction in cancer patients: Is there a direct effect of tumour growth [C]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2015.
- [5] Fabiani I, Panichella G, Aimò A, et al. Subclinical cardiac damage in cancer patients before chemotherapy [J]. Heart Failure Reviews, 2021. doi: 10.1007/s10741-021-10151-4.
- [6] Pavo N, Raderer M, Hülsmann M, et al. Cardiovascular biomarkers in patients with cancer and their association with all-cause mortality [J]. Heart, 2015, 101(23): 1874-1880.
- [7] Dorn GW 2ND. Parkin-dependent mitophagy in the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 95: 42-49.
- [8] Tong M, Saito T, Zhai P, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2019, 124(9): 1360-1371.
- [9] Chen Y, Dorn GW 2ND. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria [J]. Science, 2013, 340(6131): 471-475.
- [10] Zhu P, Wan K, Yin M, et al. RIPK3 induces cardiomyocyte necroptosis via inhibition of AMPK-Parkin-Mitophagy in cardiac remodelling after myocardial infarction [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:

- 6635955.
- [11] Gong G, Song M, Csordas G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350 (6265) : aad2459.
- [12] Song M, Gong G, Burelle Y, et al. Interdependence of Parkin-mediated mitophagy and mitochondrial fission in adult mouse hearts [J]. *Circ Res*, 2015, 117 (4) : 346-351.
- [13] Woodall BP, Orogo AM, Najor RH, et al. Parkin does not prevent accelerated cardiac aging in mitochondrial DNA mutator mice [J]. *JCI Insight*, 2019, 5 (10) : e127713.
- [14] Kubli DA, Quinsay MN, Gustafsson AB. Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes [J]. *Commun Integr Biol*, 2013, 6(4) : e24511.
- [15] Bhandari P, Song M, Chen Y, et al. Mitochondrial contagion induced by Parkin deficiency in *Drosophila* hearts and its containment by suppressing mitofusins [J]. *Circ Res*, 2014, 114(2) : 257-265.
- [16] Li J, Shi W, Zhang J, et al. To explore the protective mechanism of PTEN-induced kinase 1 (pink1)/parkin mitophagy-mediated extract of *periplaneta americana* on lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte injury [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25 : 1383-1391.
- [17] Bartelds B, Knoester H, Smid GB, et al. Perinatal changes in myocardial metabolism in lambs [J]. *Circulation*, 2000, 102(8) : 926-931.
- [18] Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1188 : 191-198.
- [19] Dorn GW 2ND, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart [J]. *Genes Dev*, 2015, 29 (19) : 1981-1991.

(编辑 余菁)