

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.13.010

大鼠心肌缺血再灌注损伤模型线粒体自噬变化的研究*

王艳¹ 宗媛¹ 赵品² 姜静² 姚立农^{2Δ} 陶蕾^{3Δ}

(1 陕西省人民医院重症医学科 陕西 西安 710068; 2 第四军医大学唐都医院重症监护中心 陕西 西安 710038;

3 第四军医大学唐都医院麻醉科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:观察大鼠心肌缺血再灌注损伤模型不同时间点线粒体及线粒体自噬的变化。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为假手术对照组(sham 组):开胸不进行冠状动脉左前降支(Left anterior descending coronary artery, LAD)血流阻断;缺血再灌注组 2 h 组(I/R 2 h 组)、24 h 组(I/R 24 h 组)及 48 h 组(I/R 48 h 组),以上 3 组均阻断 LAD 30 min,分别于再灌注后 2 h、24 h、48 h 观察心肌 ATP 含量,线粒体膜电位水平变化,透射电镜下观察线粒体及线粒体自噬超微结构变化,western blot 法测定线粒体自噬蛋白 PINK1、Parkin、p62、LC3B 及线粒体膜蛋白 Tom20 表达水平。**结果:**与对照组相比,线粒体膜电位水平及心肌组织 ATP 含量于再灌注 2 h 开始下降,24 h 下降最显著,48 h 有所改善,线粒体超微结构损伤再灌注 24 h 最为明显,48 h 有所改善。PINK1、Parkin、p62 蛋白表达于损伤后 2 h 增强,于再灌注后 24 h 升高最显著,持续至 48 h,LC3B II 表达于损伤后 24 h 增强,同样持续至 48 h。透射电镜下可见线粒体自噬体于再灌注后 24 h 明显增多,并持续至 48 h。**结论:**大鼠心肌缺血再灌注损伤后,线粒体功能与形态损伤以损伤后 24 h 最为显著,至损伤后 48 h 后好转;线粒体自噬水平升高以损伤后 24 h 最为显著,且维持至损伤后 48 h,提示两者之间可能存在关联。

关键词:缺血-再灌注;线粒体;线粒体自噬;微管相关蛋白轻链 3(LC3);PINK1;Parkin

中图分类号:R-33;R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)13-2452-05

Mitophagy Changes in Rat Model during Myocardial Ischemia-reperfusion Injury*

WANG Yan¹, ZONG Yuan¹, ZHAO Pin², JIANG Jing², YAO Li-nong^{2Δ}, TAO Le^{3Δ}

(1 Intensive Care Unit, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Intensive Care Unit, The Fourth Military Medical University, Tang Du Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate mitochondria and mitophagy changes at different indicated time during myocardial ischemia reperfusion in rat model. **Methods:** Forty male SD rats were randomly divided into sham operation group, 2 h after ischemia reperfusion injury group (I/R 2h), 24 h after ischemia reperfusion injury group (I/R 24h), 48 h after ischemia reperfusion injury group (I/R 48 h). Myocardial ischemia reperfusion injury model was induced by ligating anterior descending branch of coronary artery. Sham operation group was treated identically except left anterior descending was not tied. The other three groups were treated with 30 min of occlusion and reperfusion of 2 h, 24 h, or 48 h, respectively. The level of myocardium ATP and transmembrane potential of mitochondrion were detected. Ultra-structure changes of mitochondria and mitophagy were observed under electron microscope. The expression of mitophagy related proteins such as PINK1, Parkin, p62 and LC3B were measured by western blotting, as well as the expression of mitochondrial membrane protein Tom20. **Results:** Compared with sham group, the content of myocardium ATP and transmembrane potential of mitochondrion decreased in I/R 2 h group, the lowest value of which were in I/R 24 h group ($P<0.05$). However, the ATP and the transmembrane potential of mitochondrion were elevated in I/R 48 h group ($P<0.05$). The level of mitophagy related proteins such as PINK1, Parkin, p62 increased in I/R 2h group and last till 48 h after I/R ($P<0.05$). The expression of LC3B II protein enhanced in 24 h group and last till 48 h after I/R ($P<0.05$). Obviously ultra-structure changes of mitochondria and mitophagy were observed under electron microscope. **Conclusion:** The damages of mitochondrial was observed at 24 h after myocardial ischemia reperfusion injury, while elevated levels of mitophagy were detected from 24 h to 48 h after myocardial ischemia reperfusion injury, suggesting a relationship between to the changes of mitochondria and autophagy.

Key words: Ischemia-reperfusion; Mitophagy; Mitochondria; LC3; PINK1; Parkin

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)13-2452-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470414)

作者简介:王艳(1981-),主治医师,硕士研究生,研究方向:危重病诊治及脏器保护,电话:13572426908, E-mail: annie9500@21cn.com

Δ 通讯作者:姚立农(1968-),主任医师,博士生导师,研究方向:围术期器官保护,电话:13571837529, E-mail: yaolin@fmmu.edu.cn

陶蕾(1979-),主治医师,博士研究生,研究方向:围术期器官保护,电话:13572532335, E-mail: tltdmzk@163.com

(收稿日期:2017-10-24 接受日期:2017-11-19)

前言

线粒体形态及功能障碍是心肌缺血再灌注损伤的重要机制之一,是决定细胞存活或死亡最重要的细胞器^[1]。大量研究提出以线粒体为目标的靶向性治疗方案已成为心脏保护的新方法^[2,3]。自噬是生物体生长发育中关键的自救行为。其中,线粒体自噬能够特异性识别、选择性清除细胞内损伤线粒体,在维持线粒体正常形态及功能、调控细胞内环境的稳定中发挥重要作用。心肌缺血再灌注损伤的研究表明,缺血阶段心肌自噬水平明显升高,再灌注阶段自噬进一步激活。自噬通过吞噬并清除损伤蛋白或细胞器从而实现代谢产物的再利用以及维持细胞正常结构及功能。然而,过度激活的自噬可能因为过度清除细胞器加重心肌损伤^[4]。目前,自噬在缺血再灌注损伤中产生的作用已有广泛研究,在很大程度上决定细胞存亡。本实验旨在通过观察大鼠心肌缺血再灌注损伤后不同时间点心肌细胞、线粒体形态及功能以及线粒体自噬变化,明确线粒体及其自噬在心肌缺血再灌注损伤中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只, 体重 250-300 g, 由第四军医大学实验动物中心提供。适应性喂养 1 周, 心电图检查及体温正常。随机分为假手术组(sham 组, n=10): 开胸不进行冠状动脉左前降支(Left anterior descending coronary artery, LAD)血流阻断; 缺血再灌注损伤 2 h 组(I/R 2 h 组, n=10): 阻断 LAD 30 min, 再灌注 2 h; 缺血再灌注损伤 24 h 组(I/R 24 h 组, n=10): 阻断 LAD 30 min, 再灌注 24 h; 缺血再灌注损伤 48 h 组(I/R 48 h 组, n=10): 阻断 LAD 30 min, 再灌注 48 h。

1.2 主要仪器及药品

小动物呼吸机(成都泰盟软件有限公司); 心电监护仪(上海奥尔科特科技有限公司); 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司); 组织线粒体分离试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、ATP 检测试剂盒均来自自碧云天生物技术公司; LC3B、p62、Tom20 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; PINK1、Parkin 购自 abcam 公司, GAPDH 购自北京康为公。

1.3 动物模型建立

经第四军医大学动物伦理委员会审核批准, 参照文献^[5], 各组大鼠术前 12 h 禁食过夜, 自由饮水。腹腔注射 1%戊巴比妥 40 mg/kg 麻醉后气管插管, 正压通气, 参数: 吸氧浓度 33%, 呼吸比 1:1, 频率 75-80 次/min, 潮气量 2-3 mL/kg。常规记录肢体 II 导联心电图, 胸骨左缘第 3、4 肋间隙处切口开胸, 打开心包膜, 于左心耳下缘 3~4 mm 处穿线结扎阻断左冠状动脉前降支(LAD)血流 30 min 后松开丝线恢复血管再灌注, 关胸后逐层缝合。于再灌注 2 h、24 h、48 h 后不同时间点取材检测相关指标。

1.4 观察指标

1.4.1 线粒体膜电位检测 取新鲜左室心肌组织, 预冷 PBS 清洗后剪碎匀浆(0℃-4℃下), 采用组织线粒体分离试剂盒制备流程提取高纯度线粒体(1 h 内完成), 全程操作于冰上进行。按线粒体膜电位检测试剂盒说明书用荧光酶标仪扫描检测聚

合体(激发波长 525 nm, 发射波长 590 nm)与单体(激发波长 490 nm, 发射波长 530 nm), 以红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的程度^[7]。

1.4.2 心肌组织 ATP 含量测定 取新鲜左室心肌组织, 按每 20 mg 组织加入约 100-200 微升裂解液的比例加入裂解液, 匀浆裂解后 4℃离心机 12000×g 离心 5 min, 取上清, 按 ATP 检测试剂盒说明应用荧光分光光度计检测心肌组织 ATP 浓度。

1.4.3 心肌细胞及线粒体超微结构的观察 取大小约 1 mm×1 mm×1 mm 左心室组织, 2%戊二醛中固定, 经磷酸盐缓冲液漂洗后 1%锇酸将组织继续固定、丙酮逐级脱水、包埋、超薄切片机切片、室温下醋酸铀、柠檬酸铅染色后, 采用日本日立 HT7700 型透射电子显微镜观察心肌细胞及线粒体超微结构。盲法统计自噬小体数量。每组选取 5 只大鼠, 每个标本连续选取 10 个视野(100 μm²)进行统计。

1.4.4 Western blot 法检测心肌细胞线粒体自噬蛋白表达 取各组左心室组织, 称重, 解液并剪碎组织, 匀浆, 提取高纯度线粒体, BCA 蛋白质定量试剂盒对线粒体蛋白进行定量测定, 根据蛋白浓度, 每组取 50 μg 总蛋白上样。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 半干法转膜, 漂洗, 室温封闭, 再次漂洗, 加入一抗 LC3B(1:800)、p62(1:1000)、Tom20(1:1000)、PINK1(1:800)、Parkin(1:800), 4℃过夜, 再次洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 1:5000 室温反应 2 h, 充分漂洗后加入化学发光剂。采用 Image J 软件测定条带灰度值, 线粒体蛋白 Tom20 为内参, 以目的条带与 Tom20 灰度值的比值反映线粒体自噬蛋白表达水平。

1.5 统计学处理

计量资料以均数±标准差表示, 采用 SPSS 13 统计软件进行数据分析。行单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间比较采用 SNK-q 检验。对不满足正态和方差齐性条件的, 组内及组间采用 Kruskal-Wallis H 检验。P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤后线粒体膜电位及心肌细胞 ATP 水平降低

如图 1、图 2 所示, 分别以 sham 组的线粒体膜电位及 ATP 值作为参照 100, 缺血再灌注损伤后 2 h 组, 24 h 组, 48 h 组 ATP 值(I/R 2 h vs. I/R 24 h vs. I/R 48 h: 70.09±14.43 vs. 49.33±13.34 vs. 60.46±9.60)及 JC-1 值(I/R 2 h vs. I/R 24 h vs. I/R 48 h: 59.72±9.78 vs. 44.86±7.71 vs. 57.54±7.87) 均较 sham 组明显降低(P<0.05), 且以 I/R 后 24 h 下降最为明显(I/R 2 h vs. I/R 24 h, P<0.05), I/R 48 h 后有所回升(I/R 24 h vs. I/R 48 h, P<0.05), 提示线粒体功能损伤于 I/R 后 24 h 损伤最为显著, 并随之改善(I/R 48 h vs. I/R 24 h, P<0.05)。

2.2 大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞与线粒体形态破坏

如图 3 可见, sham 组心肌细胞肌原纤维规整, 细胞结构完整; 线粒体排列整齐, 膜完整, 基质密度适中, 偶可见线粒体肿胀及嵴突紊乱; I/R 2 h 组肌束基本完整, H 带清晰可见, 线粒体轻度肿胀, 大小不一, 排列紊乱, 基质基本完整, 颗粒部分消失(白色箭头标记); I/R 24 h 组可见肌原纤维紊乱、断裂, 线粒体严重肿胀, 基质密度降低, 嵴突紊乱(黑色箭头标记), 可见大量

空泡化线粒体;I/R 48 h 组可见肌原纤维紊乱、断裂,线粒体数量减少,排列紊乱,形态大小不一,存在肿胀,基质密度降低,可

见散在线粒体空泡化分布。

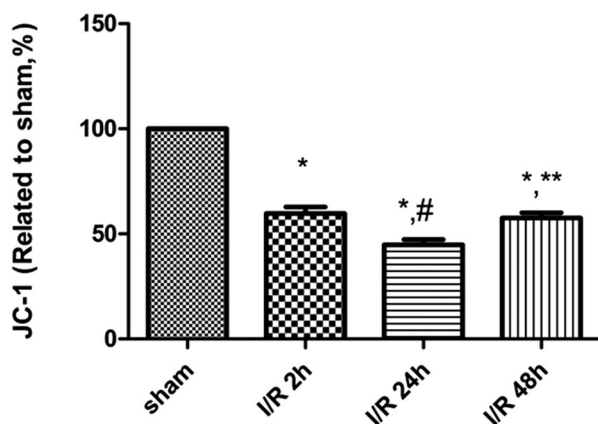


图1 大鼠心肌缺血再灌注损伤后不同时间点线粒体膜电位水平
Fig.1 Mitochondrial membrane potential at indicated time points after myocardial ischemia reperfusion injury in rats

* $P < 0.05$ versus sham; # $P < 0.05$ versus I/R 2 h; ** $P < 0.05$ versus I/R 24 h (n=10 per group).

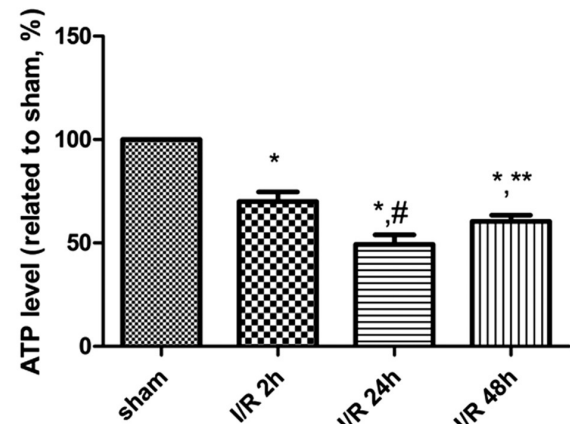


图2 大鼠心肌缺血再灌注损伤后不同时间点心肌细胞 ATP 水平
Fig.2 ATP levels of myocardial cytes at indicated time points after myocardial ischemia reperfusion injury in rats

* $P < 0.05$ versus sham; # $P < 0.05$ versus I/R 2 h; ** $P < 0.05$ versus I/R 24 h (n=10 per group).

2.3 大鼠心肌缺血再灌注损伤后线粒体自噬小体增多

电镜下可见双层膜结构包裹线粒体或单层膜结构包裹含有降解线粒体的囊性结构。sham 组心肌细胞偶可见自噬体, I/R 2 h 组可见散在自噬体, 双层膜结构内包裹线粒体样细胞器; I/R 24 h 心肌细胞可见较多典型线粒体自噬体形成, 较 I/R 2 h 组明显增多, 部分降解; I/R 48 h 组同样可见大量双层膜结构包裹的线粒体自噬体(黑色箭头标记), 伴部分线粒体降解。电镜下计算 $100 \mu\text{m}^2$ 内线粒体自噬体的数目, 结果显示: sham 组自噬小体数目是 4.80 ± 1.48 ; I/R 2 h 组自噬小体的数目有所较增加 7.40 ± 2.30 , 但无明显统计学差异 ($P > 0.05$); I/R 24 h 组自噬小体的数目明显增加 19.6 ± 2.51 , 表明再灌注损伤后 24 h 线粒体自噬明显增强, I/R 48 h 组自噬小体的数目仍高达 18.4 ± 1.67 , 较 sham 组有统计学差异 ($P < 0.05$)。

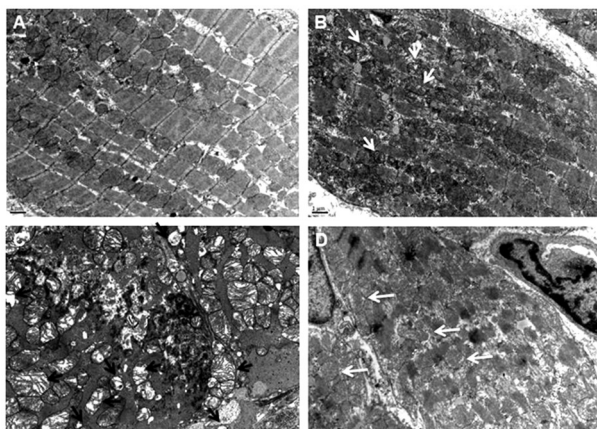


图3 透射电镜下心肌细胞及线粒体超微结构改变

Fig.3 Ultrastructural changes of myocardial cytes and mitochondria under transmission electron microscope

A sham group B I/R 2 h group C I/R 24 h group D I/R 48 h group (n=3 per group)

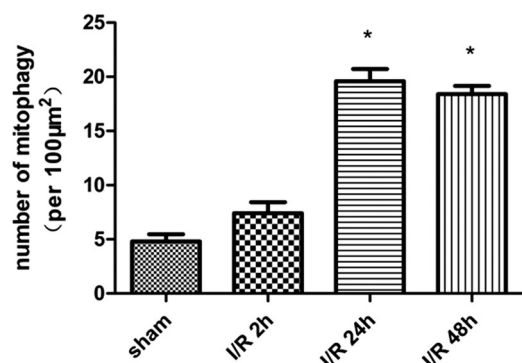
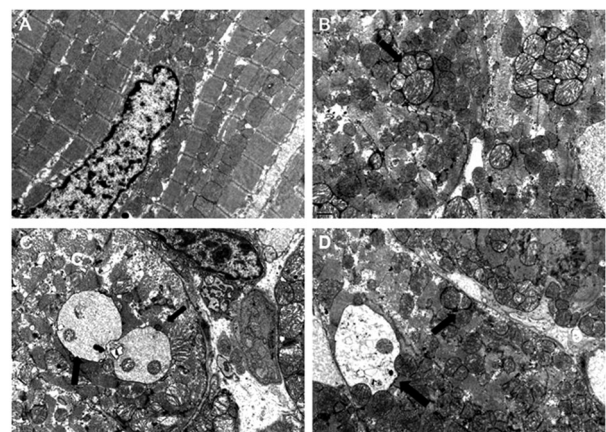


图4 透射电镜下线粒体自噬体及自噬小体数目

Fig.4 Mitophagy observed under transmission electron microscopy in different group

A sham group B I/R 2 h group C I/R 24 h group D I/R 48 h group
The black arrow indicates mitophagy.

* $P < 0.05$ versus sham (n=5 per group)

2.4 大鼠心肌缺血再灌注损伤后线粒体自噬蛋白表达增强

如图5 结果显示:与 sham 组相比,线粒体 PINK1、Parkin、p62 蛋白表达在 I/R 2 h 开始升高, 分别升高 2.65 ± 0.71 倍、 2.68 ± 1.15 倍、 2.53 ± 0.47 倍,并随时间逐渐升高,以损伤后 24

h 升高最为明显 (分别升高 7.30 ± 0.97 倍、 5.56 ± 1.27 倍、 5.34 ± 1.12 倍), 维持至损伤后 48 h, 各组比较有显著性差异 ($P < 0.05$); 而 LC3B II 蛋白表达结果提示: 与 sham 组相比, I/R 2 h 组尽管有所升高 (升高 1.47 ± 0.58 倍), 但无统计学差异 ($P > 0.05$), I/R 24 h 开始上调蛋白表达增强 (升高 4.47 ± 0.38 倍) ($P < 0.05$), 且维持至 I/R 48 h 未见明显下降 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 缺血再灌注损伤上调了大鼠心肌内线粒体自噬水平, 以 I/R 24 h 表达最为显著, 并持续至 I/R 48 h (图 5)。

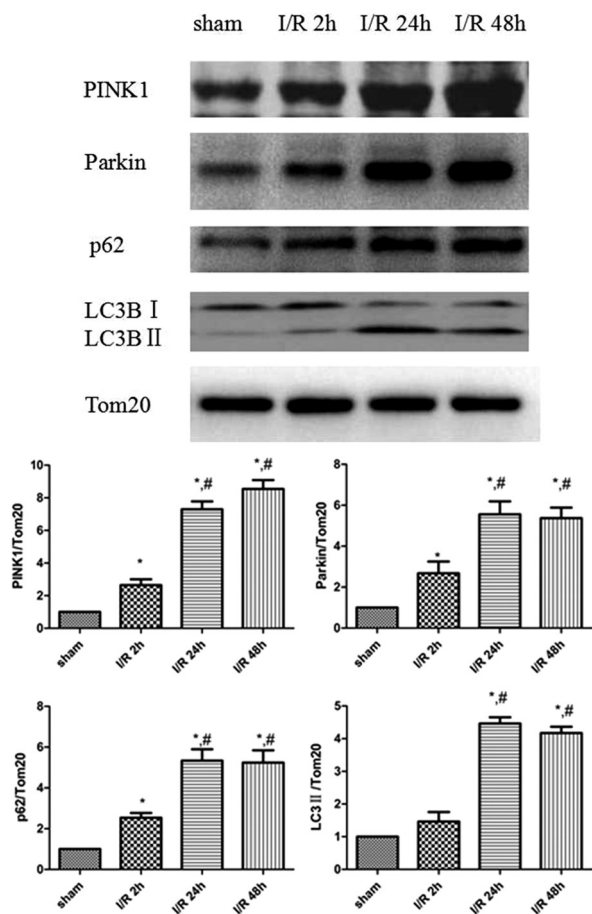


图 5 缺血再灌注损伤后心肌线粒体 PINK1、Parkin、p62、LC3B II 蛋白表达

Fig.5 The typical images and expression of PINK1, Parkin, p62 and LC3B II proteins at indicated time after myocardial ischemia reperfusion injury

* $P < 0.05$ versus sham; # $P < 0.05$ versus I/R 2 h; (n=4 per group).

3 讨论

目前, 以开通血管再灌注为基础的方案已成为治疗急性 ST 抬高型心肌梗塞的基石。然而, 血管恢复灌注本身会进一步导致心肌细胞损伤甚至坏死, 称作心肌缺血再灌注损伤。研究发现, 再灌注损伤可导致高达 50 % 的心肌梗死面积^[8]。如何维持再灌注后心肌细胞活性是改善缺血再灌注损伤预后的重点。细胞存活需要能量, 线粒体是真核生物合成 ATP 最重要的场所。研究发现, 改善心肌线粒体功能与形态能够促进心肌细胞存活, 改善心肌缺血再灌注损伤^[4]。

心肌缺血再灌注损伤会导致线粒体膜电位下降、钙稳态失衡、物质代谢异常、通透性转化孔开放, 损伤线粒体功能, ATP 合成障碍; 损伤的线粒体进一步释放大量的 ROS 导致线粒体膜

通透性转化孔开放, 凋亡蛋白释放, 细胞凋亡或坏死。由此可见, 线粒体的损伤程度直接决定了细胞的存亡。本实验观察到再灌注损伤 2 小时后, 线粒体即开始出现膜电位水平下降, ATP 合成不足等功能紊乱, 同时线粒体出现肿胀、排列紊乱、基质密度降低等形态改变。损伤后 24 小时, 线粒体出现大量空泡化等不可逆损伤。损伤后 48 小时, 线粒体膜电位水平及 ATP 含量逐渐恢复, 空泡化现象减少。提示缺血再灌注后 24 小时, 线粒体损伤达到高峰, 随后至 48 小时逐渐改善。自噬是生物体生长发育中关键的自救行为。大致分为两种类型: 当机体处于能量缺乏时诱导细胞发生非选择性的自噬以维持基本的物质能量代谢。目前, 自噬在缺血再灌注损伤中产生的作用已有广泛研究, 在很大程度上决定细胞存亡。自噬分为两种形式, 一种为非选择性自噬。当细胞处于缺血、缺氧等应激状态下, ATP 缺乏激活 AMPK-mTORC1-ULK1 信号通路, 细胞启动自噬机制清除损伤细胞器, 降解的游离脂肪酸及氨基酸被重新利用通过三羧酸循环缓解能量危机, 维持细胞生存^[10]。大量的实验证明, 缺血预处理^[21]、调节 AMP/ATP 比例激活 AMPK 通路^[22,23], 缺血前 mTOR 过表达或药物预处理激活 PI3K-Akt-mTORC1 通路^[24,25]均能够诱导自噬增强, 抵抗心肌缺血再灌注损伤。然而, 在再灌注阶段, 实验表明, 通过自噬抑制剂或沉默自噬相关蛋白 Belin1 来抑制增强的自噬可降低心肌细胞 I/R 后死亡率, 其机制可能为自噬过度清除细胞生存所必要的细胞器或蛋白, 导致细胞出现 II 型凋亡^[9,10]。由此可见, 自噬在心肌缺血再灌注损伤中起到双刃剑作用。利用自噬的不同作用机制来促进心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞存活成为研究新热点。另一种是自噬形式为选择性自噬, 以线粒体自噬为代表, 其作用为在能量充足的条件下发生的特异性自噬, 主要作用是清除受损的细胞器和代谢产物, 防止其对细胞造成进一步的损伤^[16]。线粒体自噬对维持细胞内稳态极为重要, 是线粒体质量控制体系中重要的调节机制。

在 ROS、能量缺乏或感染等刺激下, 损伤线粒体被特异性识别并包裹进双层膜结构自噬体中, 继而与溶酶体结合并降解。既往实验表明, 心肌缺血阶段能量缺乏及线粒体膜电位水平降低能够诱导自噬水平升高; 而在再灌注损伤后, 尽管能量恢复, 但损伤的线粒体会产生大量 ROS, 诱导自噬被进一步激活^[17,20]。然而, 这种自噬现象是损伤后继发适应性改变还是过度应激所导致的不良反应? 线粒体形态及功能会随之发生如何变化, 由此对细胞造成结果如何? 因此, 研究线粒体形态、功能与自噬随时间变化趋势具有重要意义。

本实验发现, 随着损伤时间变化, 线粒体上 PINK1、Parkin、p62 蛋白表达增强, 这与既往文献研究结果一致^[13,14], 其可能机制为线粒体膜电位水平下降, 线粒体外膜 PINK1 降解被抑制, 堆积的 PINK1 招募胞浆内 Parkin 转位至线粒体, 促进线粒体基质蛋白泛素化, 募集 p62 于线粒体基质, p62 作为信号接头蛋白进一步结合 LC3, 介导线粒体自噬与溶酶体结合并促进线粒体降解^[13]。然而, 也有文献表明^[12], 缺血应激本身能够促进胞质中 Parkin 表达增强, Parkin-/- 导致自噬不足, 心肌损伤加重。本实验发现, LC3B II 蛋白表达尽管于损伤后逐渐增加, 却在损伤早期 (2 h) 与对照组无明显统计学差异, 在损伤后 24 小时表明明显升高。LC3B 分为 I 型和 II 型, 通常认为 LC3B I 向

LC3B II 转化反映自噬增强。因此,实验结果表明,缺血再灌注损伤后 24 小时,线粒体自噬增强且持续至损伤后 48 小时。既往研究发现,PINK1 及 Parkin 缺乏会增强心肌细胞对缺血再灌注损伤的敏感性^[11,12]。缺血预处理等干预措施能够通过募集线粒体膜 Parkin,增强 p62 蛋白表达,促进线粒体自噬,进一步增强心肌保护作用^[13]。诱导线粒体自噬增强可以改善线粒体功能,降低心肌细胞凋亡率^[18]。也有研究者报道抗氧化剂白藜芦醇能够诱导增强线粒体自噬,促进心肌细胞存活,其机制在于清除损伤线粒体所过度释放的 ROS,减轻氧化应激损伤^[15]。由此可见,以调节线粒体自噬作为心脏保护的新靶点已在广泛研究中^[19]。本实验发现在损伤后 48 小时,线粒体自噬水平未见明显下降,但线粒体损伤形态及功能有所改善。其具体机制可能为线粒体损伤后去极化及释放 ROS 增强线粒体自噬水平,加强清除损伤线粒体,减少对 ROS 过度释放,打断 ROS 对线粒体氧化应激损伤这一恶性循环;同时降解的物质被再利用,ATP 合成增加,一定程度上缓解细胞能量危机,改善线粒体形态及功能。然而,这仍需进一步实验通过使用自噬调控剂处理来进一步明确线粒体自噬在心肌缺血再灌注损伤中的具体作用及机制。

综上所述,本实验通过分子生物及透射电镜技术综合评价大鼠心肌缺血再灌注损伤模型不同时间点心肌细胞、线粒体形态及功能、线粒体自噬蛋白水平变化趋势,提示明确两者关系在心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞损伤中具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Tsu-Kung Lin, Ching-Hsiao Cheng, Shang-Der Chen, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress promote apoptotic cell death in the striatum via cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following chronic rotenone intoxication in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 8722-8739
- [2] 范宗静,吴旻,谢连娣,等.从保护线粒体角度谈心肌缺血再灌注损伤[J].*世界中医药*, 2015, 10(7): 1124-1127
Fan Zong-jing, Wu Yang, Xie Lian-di, et al. Study on Myocardial ischemia reperfusion injury from the perspective of mitochondria protection[J]. *World chinese medicine*, 2015, 10(7): 1124-1127
- [3] 丁士鸷,梅举.线粒体与心肌缺血/再灌注损伤的研究进展[J].*医学综述*, 2016, 22(1): 37-41
Ding Shi-ao, Mei Ju. Research progress in mitochondria and myocardial ischemia / reperfusion injury [J]. *Medical Recapitulate*, 2016, 22(1): 37-41
- [4] 曾萍,杨简.线粒体相关性药物在冠心病治疗中的研究进展[J].*实用医学杂志*, 2015, 31: 4139-4140
Zeng Ping, Yang Jian. Research progress of mitochondrial related drugs in the treatment of coronary heart disease [J]. *The journal of practical medicine*, 2015, 31: 4139-4140
- [5] Dieter A. Kubli, Åsa B. Gustafsson. Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control [J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1208-1221
- [6] Garrett J. Gross, Anna Hsu, Kasem Nithipatikom, et al. Acute and chronic cardioprotection by the enkephalin analogue, Eribis Peptide 94, is mediated via activation of ntric oxide synthase and adenosine triphosphate-regulated potassium channels [J]. *Pharmacology*, 2012, 90(1-2): 110-116
- [7] 赵品,高金鉴,姚立农,等.脂多糖诱导脓毒症小鼠心肌细胞及线粒体自噬[J].*细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(2): 177-181
Zhao Pin, Gao Jin-jian, Yao Li-nong, et al. Myocardial cells and mitochondrial autophagy in sepsis mice induced by Lipopolysaccharide[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32(2): 177-181
- [8] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 1121-1135
- [9] Karin Przyklenk, Yi Dong, Vishnu V. Undyala1, et al. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia/reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges [J]. *Cardiovascular Research*, 2012, 94: 197-205
- [10] Ma S, Wang Y, Chen Y, et al. The role of the autophagy in myocardial isehemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 271-276
- [11] Siddall HK, Yellon DM, Ong S-B, et al. Loss of PINK1 Increases the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e62400
- [12] Dieter A. Kubli, Xiaoxue Zhang, Youngil Lee, et al. Parkin Protein Deficiency Exacerbates Cardiac Injury and Reduces Survival following Myocardial Infarction [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2013, 288(2): 915-926
- [13] Chengqun Huang, Allen M Andres, Eric P Ratliff, et al. Preconditioning Involves Selective Mitophagy Mediated by Parkin and p62/SQSTM1[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e20975
- [14] 张静,乔世刚,殷明,等.七氟醚后处理对大鼠心肌缺血再灌注时线粒体自噬的影响[J].*中华麻醉学杂志*, 2015, 35(8): 944-947
Zhang Jing, Qiao Shi-gang, Yin Ming, et al. Effects of sevoflurane postconditioning on m itophagy during ischemia-reperfusion in rats [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2015, 35(8): 944-947
- [15] Somak Das, Goran Mitrovsky, Hannah R Vasanthi, et al. Antiaging Properties of a Grape-Derived Antioxidant Are Regulated by Mitochondrial Balance of Fusion and Fission Leading to Mitophagy Triggered by a Signaling Network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 345105: 1-13
- [16] Anne Hamacher-Brady, Nathan Ryan Brady. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 775-795
- [17] Carol Chen-Scarabelli, Pratik R. Agrawal, Louis Saravolatz, et al. The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Journal of Geriatric Cardiology*, 2014, 11: 338-348
- [18] 张国勇,高蓓蕾,余文军,等.动力相关蛋白 1 通过诱导线粒体自噬对高糖导致心肌细胞损伤的影响[J].*心脏杂志*, 2016, 5: 506-511
Zhang Guo-yong, Gao Bei-lei, Yu Wen-jun, et al. Drp1 acts as a safe-guard mechanism against cardiomyocyte dysfunction induced by high glucose via mitophagy[J]. *Chin Heart J*, 2017, 5: 506-511
- [19] Rebecca E Jimenez, Dieter A Kubli, Åsa B Gustafsson. Autophagy and mitophagy in the myocardium: therapeutic potential and concerns [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171: 1907-1916
- [20] Jisun LEE, Samantha GIORANO, Jianhua ZHANG. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox Signaling[J]. *Biochem J*, 2012, 441: 523-540

- immunology and immunopathology, 2014, 158(3-4): 221-232
- [11] Hui Zhang, Jian Gong, Di Kong, et al. Anti-proliferation effects of Twist gene silencing in gastric cancer SGC7901 cells [J]. World journal of gastro enterology: WJG, 2015, 21(10): 2926-2936
- [12] Meng X, Feng Y, Ouyang T, et al. Specific gene expression in mouse cortical astrocytes is mediated by a 1740bp-GFAP promoter-driven combined adeno-associated virus 2 /5 /7 /8 /9 [J]. Neurosci Lett, 2015, 593: 45-50
- [13] Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(7): 445-446
- [14] Dalkara D, Sahel JA. Gene therapy for inherited retinal degenerations [J]. CR Biol, 2014, 337(3): 185-186
- [15] Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, et al. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13 Suppl1: S133
- [16] Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. Genotoxicity in Mice Following AAV Gene Delivery: A Safety Concern for Human Gene Therapy[J]. Mol Ther, 2016, 24(2): 198
- [17] Calcedo R, Morizono H, Wang L, et al. Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children and adolescents [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(9): 1586
- [18] Mingozzi F, Chen Y, Edmonson SC, et al. Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue[J]. Gene Ther, 2013, 20(4): 417
- [19] Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(6): 704
- [20] Zhi-Jie Hou, Xi Luo, Wei Zhang, et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells [J]. Oncotarget, 2015, 6(8): 6326-6340
- [21] Mratin Lange, Tatsuya Fujikawa, Anna Koulova, et al. Arterial territory-specific phosphorylated retinoblastoma protein species and CDK2 promote differences in the vascular smooth muscle cell response to mitogens[J]. Cell cycle(Georgetown, Tex.), 2014, 13(2): 315-323
- [22] Zhang H, Gao X, Yang Y, et al. New construction of an animal model for the orthotopic transplantation of an ovarian tumor [J]. Ovarian Res, 2014, 7(3): 64-65
- [23] Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical mouse cancer models; a maze of opportunities and challenges[J]. Cell, 2015, 163(1): 39-53
- [24] Lee YY, Cho YJ, Chai JJ, et al. The effect of high-intensity focused ultrasound in combination with cisplatin using a Xenograft model of cervical cancer[J]. Anticancer Res, 2012, 32(12): 5285-5289
- [25] Decaudin D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer [J]. Anticancer Drugs, 2011, 22(9): 827-841
- [26] 曾扬,吴小红,胡靓雅.重组8型腺相关病毒介导HBV急性感染树鼯模型建立[J].中国实验动物学报, 2013, 21(3): 36-41
- Zeng Yang, Wu Xiao-hong, Hu Liang-ya. Recombinant adeno-associated virus type 8 mediated acute HBV infection model of tree shrew [J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 2013, 21(3): 36-41
- [27] 董小岩,尉迟捷,王刚.高嗜肝性8型重组腺相关病毒体内转导法制备乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型[J].病毒学报, 2010, 26(6): 425-431
- Dong Xiao-yan, Wei Chi-jie, Wang Gang. High hepatophilic type 8 recombinant adeno-associated virus in vivo transduction of preparation of hepatitis B virus persistent infection model in mice[J]. Journal of virus, 2010, 26(6): 425-431
- [28] 王国靖,王刚,董小岩.用重组型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型评价核苷类似物的抗病毒效果[J].生物工程学报, 2013, 29(1): 95-106
- Wang Guo-jing, Wang Gang, Dong Xiao-yan. A mouse model of evaluation of nucleoside analogues of persistent infection of hepatitis B virus using recombinant adeno-associated virus vector mediated antiviral effect type [J]. Journal of bioengineering, 2013, 29(1): 95-106
- [29] Nakai H, Fuess S, Storm TA, et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice [J]. J Virol, 2005, 79(1): 214-224
- [30] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV8 serotype [J]. Blood, 2004, 103(4): 1253-1260

(上接第 2456 页)

- [21] Chengqun Huang, Smadar Yitzhaki, Cynthia N. Perry, et al. Autophagy Induced by Ischemic Preconditioning is Essential for Cardio-protection[J]. J of Cardiovasc Trans Res, 2010, 3: 365-373
- [22] M Zhao, L Sun, X J Yu, et al. Acetylcholine mediates AMPK-dependent autophagic cytoprotection in H9c2 cells during hypoxia/reoxygenation injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32: 601-613
- [23] K Yang, C Xu, X Li, et al. Combination of D942 with curcumin protects cardiomyocytes from ischemic damage through promoting autophagy[J]. J. Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013, 18: 570-581
- [24] Toshinori Aoyagi, Yoichiro Kusakari, Chun-Yang Xiao, et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303: H75-H85
- [25] X Wu, L He, Y Cai, et al. Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Med Rep, 2013, 8: 1824-1830