

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002442

PINK1/parkin 介导的线粒体自噬在机械通气导致的膈肌功能障碍中的作用

雍 辉, 刘 力, 魏继承

(西南医科大学附属医院麻醉科, 泸州 646000)

【摘要】目的:研究 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/parkin 介导的线粒体自噬在机械通气 (mechanical ventilation, MV) 导致的膈肌功能障碍和萎缩中的作用。**方法:**将 24 只成年雄性 SD 大鼠随机分成 Control 组 ($n=6$)、MV-6h 组 ($n=6$)、MV-12h 组 ($n=6$) 和 MV-24h 组 ($n=6$)。Control 组大鼠未经任何处理, MV-6h 组大鼠机械通气 6 h, MV-12h 组大鼠机械通气 12 h, MV-24h 组大鼠机械通气 24 h。采用 RM6240 生物信息采集系统测量膈肌复合肌动作电位 (compound muscle action potential, CMAP), HE 染色测量膈肌肌纤维横截面积 (cross-sectional area, CSA), Western blot 检测膈肌肌肉萎缩蛋白 (muscle atrophy F-box, MAFbx)、肌肉特异性环指蛋白 1 (muscle specific ring finger 1, MURF1)、线粒体裂解蛋白 1 (dynamin-related protein 1, drp1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin-2, mfn2)、线粒体自噬相关蛋白 PINK1、parkin、P62 及微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 水平。**结果:**MV-12h 组 [(3.15 ± 0.52) mV] 和 MV-24h 组 [(2.44 ± 1.26) mV] 膈肌的 CMAP 幅值明显下降 ($P=0.000$); MV-24h 组 [(7.05 ± 0.61) ms] 膈肌的 CMAP 时程明显延长 ($P=0.000$); 与 Control 组 [$(5\ 308.67 \pm 228.18)$ μm^2] 相比, MV-6h 组 [$(3\ 378.33 \pm 393.40)$ μm^2]、MV-12h 组 [$(2\ 969.67 \pm 35.16)$ μm^2] 和 MV-24h 组 [$(2\ 115.33 \pm 130.23)$ μm^2] 膈肌的 CSA 均明显减少 ($P=0.000$); 与 Control 组相比, MV-12h 组 (2.59 ± 0.19)、MV-24h 组 (4.11 ± 0.19) 的 MAFbx 明显升高 ($P=0.000$), MV-12h 组 (1.96 ± 0.26)、MV-24h 组 (2.88 ± 0.29) 的 MURF1 明显升高 ($P=0.000$); 与 Control 组相比, drp1 在 MV-24h 组 (5.55 ± 0.36) 明显上升 ($P=0.000$), mfn2 在 MV-12h 组 (0.47 ± 0.13)、MV-24h 组 (0.35 ± 0.10) 明显降低 ($P=0.002$); 与 Control 组相比, PINK1 在 MV-12h 组 (2.53 ± 0.25) 和 MV-24h 组 (4.78 ± 0.31) 明显上升 ($P=0.000$), parkin 在 MV-24h 组 (3.73 ± 0.16) 明显上升 ($P=0.000$), P62 在 MV-12h 组 (2.28 ± 0.06) 和 MV-24h 组 (3.69 ± 0.17) 明显上升 ($P=0.000$), LC3 II/I 比值在 MV-24h 组 (1.57 ± 1.32) 明显上升 ($P=0.002$)。**结论:**MV 可以引起 PINK1/parkin 介导的线粒体自噬发生改变, 并引起膈肌功能障碍和萎缩。

【关键词】机械通气; 膈肌功能障碍; 线粒体自噬**【中图分类号】**R565.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-08-05

Role of PINK1/parkin-mediated mitophagy in diaphragm dysfunction caused by mechanical ventilation

Yong Hui, Liu Li, Wei Jicheng

(Department of Anesthesia, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)/parkin-mediated mitophagy in diaphragm dysfunction caused by mechanical ventilation (MV). **Methods:** Twenty-four adult male SD rats were randomly divided into the Control group ($n=6$), the MV-6h group ($n=6$), the MV-12h group ($n=6$), and the MV-24h group ($n=6$). Rats in the Control group were without any treatment, in the MV-6h group were mechanically ventilated for 6 h, in the MV-12h group were mechanically ventilated for 12 h and in the MV-24h group were mechanically ventilated for 24 h. Using RM6240 multi-channel physiology signal collection and processing system was used to detect diaphragm compound action potential (CMAP), hematoxylin and eosin staining method was used to measure the cross-sectional area (CSA) of the diaphragm, and Western blot was used to detect levels of muscle atrophy F-box (MAFbx),

muscle specific ring finger 1 (MURF1), mitochondrial fission protein (drp1), mitofusin-2 (mfn2), autophagy-related protein of PINK1, parkin and P62, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3). **Results:** The amplitude of CMAP in the MV-12h group [(3.15 ± 0.52) mV] and the MV-24h group [$(2.44 \pm$

作者介绍: 雍 辉, Email: 1076021050@qq.com,

研究方向: 机械通气和脓毒症。

通信作者: 刘 力, Email: niuniudoctor@hotmail.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200413.1311.022.html>

(2020-04-14)

1.26) mV] was significantly decreased ($P=0.000$). The duration of CMAP in the MV-24h group [(7.05 ± 0.61) ms] was significantly longer ($P=0.000$). Compared with the Control group [$(5\ 308.67 \pm 228.18)$ μm^2], the CSA of diaphragm in the MV-6h group [$(3\ 378.33 \pm 393.40)$ μm^2], the MV-12h group [$(2\ 969.67 \pm 35.16)$ μm^2] and the MV-24h group [$(2\ 115.33 \pm 130.23)$ μm^2] was significantly decreased ($P=0.000$). Compared with the Control group, the level of MAFbx in the MV-12h group [(2.59 ± 0.19)] and the MV-24h group [(4.11 ± 0.19)] was significantly increased ($P=0.000$), the level of MURF1 in the MV-12h group [(1.96 ± 0.26)] and MV-24h group [(2.88 ± 0.29)] was significantly increased ($P=0.000$). drp1 in the MV-24h group (5.55 ± 0.36) ($P=0.000$) was significantly increased and mfn2 in the MV-12h group (0.47 ± 0.13) and the MV-24h group (0.35 ± 0.10) was significantly decreased ($P=0.002$). Compared with the Control group, PINK1 in the MV-12h group (2.53 ± 0.25) and the MV-24h group (4.78 ± 0.31) was significantly increased ($P=0.000$), parkin in MV-24h group (3.73 ± 0.16) was significantly increased ($P=0.000$), P62 in MV-12h group (2.28 ± 0.06) and MV-24h group (3.69 ± 0.17) was significantly increased ($P=0.000$), and LC3 II / I ratio in MV-24h group (1.57 ± 1.32) was increased significantly ($P=0.002$). **Conclusion:** MV can change the PINK1/parkin-mediated mitophagy, leading to diaphragm dysfunction and atrophy.

[Key words] mechanical ventilation; diaphragm dysfunction; mitophagy

危重患者相关膈肌功能障碍会导致较高的脱机失败率,增加患者的住院时间和死亡率^[1]。研究表明,长时间的机械通气(mechanical ventilation, MV)会导致膈肌出现肌肉萎缩、损伤和力量减弱,这被称为呼吸机诱导的膈肌功能障碍(ventilator-induced diaphragm dysfunction, VIDD)^[2-3]。VIDD 的发生与膈肌线粒体的功能障碍有关,但机制尚不清楚^[4]。PINK1/parkin 通路介导的线粒体自噬是细胞内对受损或老化线粒体进行选择清除的重要途径,对维持骨骼肌功能具有重要作用^[5]。本研究旨在探究 PINK1/parkin 介导的线粒体自噬在 MV 引起的膈肌功能障碍中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~12 周龄 SD 雄性大鼠,体质量 200~220 g,来自成都达硕实验动物有限公司,饲料、水源和垫料由西南医科大学提供。本实验经过西南医科大学动物伦理委员会伦理审核。

1.1.2 主要试剂 Anti-drp1 antibody (货号 ab56788)、Anti-mfn2 antibody (货号 ab56889)、Anti-LC3B antibody (货号 ab48394)、Anti-P62 antibody (货号 ab56416)均来于英国 Abcam 公司, Anti-parkin antibody (货号 4211)、Anti-PINK1 antibody (货号 6946)来于美国 Cell Signaling Technology 公司, Anti-MURF1 antibody 抗体 (货号 AF5366-SP)来于美国 Novus Biologicals 公司, Anti-MAFbx antibody 抗体 (货号 sc-166806)来于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 将 SD 大鼠随机分成 4 组: Control 组,禁食 30 h 后行相关检测; MV-6h 组,禁食 24 h 后 MV 6 h,再行相关检测; MV-12 h 组,禁食 18 h 后 MV 12 h,再行相关检测; MV-24 h 组,禁食 6 h 后 MV 24 h,再行相关检测。参照 Shanely RA 等^[6]建立的 MV 模型,即取禁食后大鼠给予 5%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后固定,备皮并消毒皮肤、铺巾,于大鼠颈部正中开放手术切口,钝性分离后找到气管,横向剪切口并将气管导管插入后用手术线结扎固定,呼吸机参数设置潮气量 10 mL/kg,呼吸频率 80 次/min,吸呼比 1:2,气道压力 4~6 cmH₂O,氧含量 21%,气体流量 0.2 L/min,湿度 40%~45%;钝性分离右侧颈外静脉,结扎远心端,提起远心端丝线,沿血管剪横形切口,置静脉导管后打结固定,持续颈外静脉泵注戊巴比妥钠 10 mg/(kg·h)。

1.2.2 复合肌动作电位检测 参照 Martin M 等^[7]测量 CMAP,即通过 RM6240 系统记录 CMAP,将电极片贴于同侧肋下缘,作为记录电极;将 2 根同心圆针电极垂直插入同侧锁骨上方,气管旁 0.5 cm,深度为 1 cm,2 根同心圆针电极距离 0.5 cm,作为刺激电极;刺激模式采用单刺激,方式为正电压刺激,刺激强度为 5 V,波宽 1 ms,延时 1 ms。此时显示屏显示的波形即为 CMAP,重复刺激 3 次,每次间隔 30 s。

1.2.3 肌纤维横截面积测定 常规 HE 染色横断面膈肌标本,所有的膈肌标本均在相同条件下和同一物镜下拍摄,每张切片在 400 倍光学显微镜下观察,随机选择 5 个视野拍照。采用 Image Pro Plus 测定肌纤维横截面积。

1.2.4 Western blot Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3、PINK1、parkin 及线粒体动力学、萎缩相关蛋白的表达水平,各组蛋白定量后加蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min、4 °C 离心 10 min 后保存。加入胶孔中进行电泳、转膜、封闭。最后加入稀释过

的小鼠抗 LC3 抗体(1:1 500)、小鼠抗 PINK1 抗体(1:1 500)、小鼠抗 parkin 抗体(1:1 500)等 4 ℃ 孵育过夜;第 2 天洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;洗涤,ECL 显影、曝光,观察各组膈肌组织中相关蛋白的变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。实验数据采用 Levene 检验方差齐性,方差齐下各组之间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 神经肌肉电生理

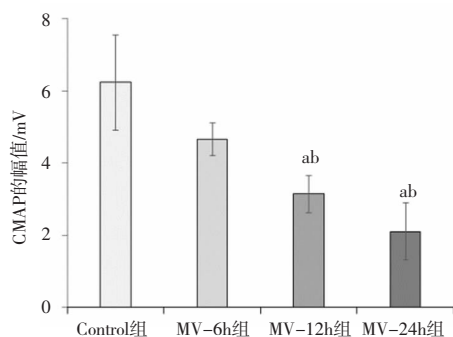
2.1.1 各组 CMAP 幅值 Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组的 CMAP 幅值分别是 (6.41 ± 1.32) mV、(4.67 ± 0.46) mV、(3.15 ± 0.52) mV、(2.44 ± 1.26) mV,4 组 CMAP 幅值差异有统计学意义 ($F=65.760, P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-24h 组的 CMAP 幅值较 Control 组明显减少 ($P=0.009$), MV-24h 组的 CMAP 幅值较 MV-6h 组明显减少 ($P=$

0.008), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异 ($P=0.263$) (图 1A)。

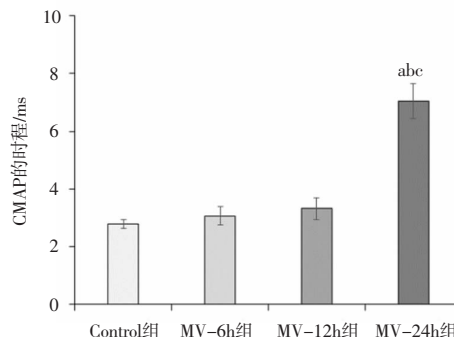
2.1.2 各组 CMAP 时程 Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组的 CMAP 时程分别是 (2.80 ± 0.15) ms、(3.07 ± 0.32) ms、(3.35 ± 0.22) ms、(7.38 ± 0.23) ms,4 组 CMAP 时程差异有统计学意义 ($F=98.270, P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-24h 组的 CMAP 时程较 Control 组、MV-6h 组和 MV-12h 组明显增加 ($P=0.000$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异 ($P=0.263$), MV-12h 组和 Control 组之间没有统计学差异 ($P=0.095$) (图 1B)。

2.2 肌纤维横截面积

本实验小组检测了膈肌纤维横截面积的变化 (图 2A)。Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组的 CSA 分别是 ($5\,308.67 \pm 228.18$) μm^2 、($3\,378.33 \pm 393.40$) μm^2 、($2\,969.67 \pm 35.16$) μm^2 、($2\,115.33 \pm 130.23$) μm^2 ,4 组 CSA 差异有统计学意义 ($F=98.270, P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-24h 组的 CSA 较 Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组明显减少 ($P=0.000$), MV-12h 组的 CSA 较 Control 组明显减少 ($P=0.000$) (图 2B)。



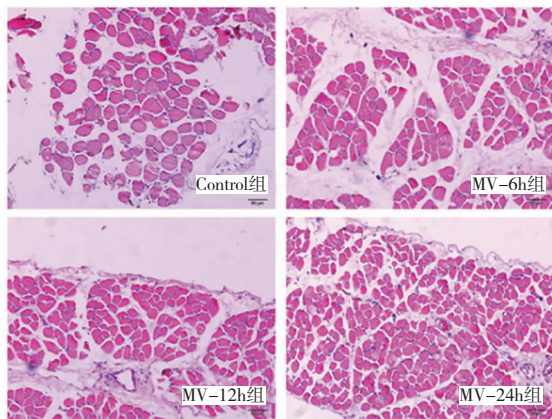
A. 各组大鼠膈肌 CMAP 幅值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)



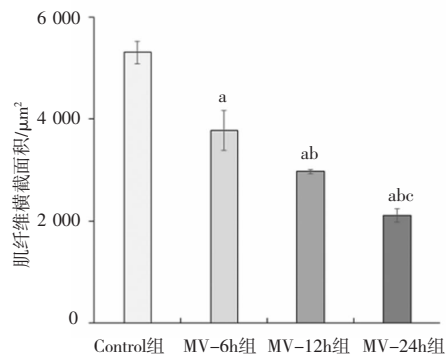
B. 各组大鼠膈肌 CMAP 时程 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:a,与 Control 组比较, $P < 0.05$;b,与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$;c,与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

图 1 各组 CMAP 检测



A. 各组大鼠膈肌 HE 染色 (标尺=50 μm)



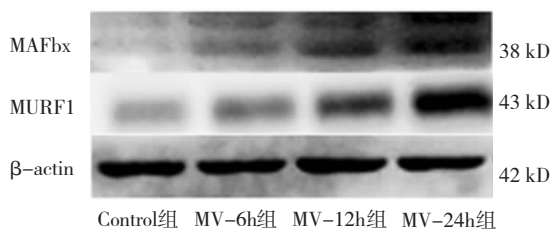
注:a,与 Control 组比较, $P < 0.05$;b,与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$;c,与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

B. 各组大鼠膈肌 HE 染色定量分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

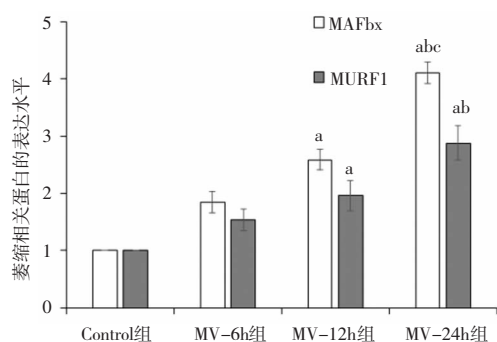
图 2 各组膈肌肌纤维横截面积

2.3 膈肌萎缩相关蛋白的变化

本实验小组检测了膈肌萎缩相关蛋白 MAFbx 和 MURF1 的表达水平(图 3A)。Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 MAFbx 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.85 ± 0.19 、 2.59 ± 0.19 、 4.11 ± 0.19 ，4 组 MAFbx 蛋白表达水平有统计学差异($F=129.670$, $P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-12h 组和 MV-24h 组的 MAFbx 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.000$), MV-24h 组的蛋白表达水平较 MV-6h 组明显增加($P=0.005$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.065$)。Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24 组 MURF1 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.53 ± 0.18 、 1.96 ± 0.26 、 2.88 ± 0.29 ，4 组 MURF1 蛋白表达水平有统计学差异($F=26.830$, $P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-12h 组 MURF1 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.006$), MV-24h 组 MURF1 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.008$), MV-24h 组蛋白表达水平较 MV-6h 组明显增加($P=0.003$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.058$) (图 3B)。



A. 各组模型膈肌萎缩相关蛋白 MAFbx 和 MURF1 的表达水平



注: a, 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b, 与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$; c, 与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

B. 各组模型膈肌萎缩相关蛋白 MAFbx 和 MURF1 相对定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

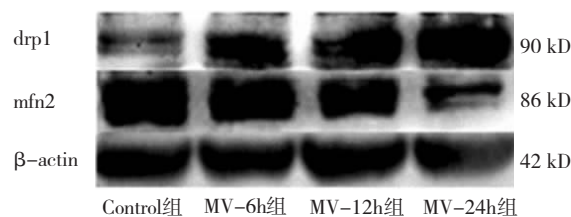
图 3 各组模型膈肌萎缩相关蛋白的表达

2.4 动力学相关蛋白的变化

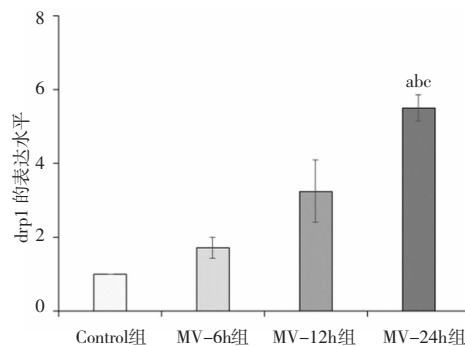
本实验小组检测了膈肌动力学相关蛋白 drp1 和 mfn2 的表达水平(图 4A)。Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24 组 drp1 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.71 ± 0.24 、 3.24 ± 0.28 、 5.55 ± 0.36 ，4 组 drp1 蛋白表达水平有统计学差

异($F=96.400$, $P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-24h 组的 drp1 蛋白表达水平较 Control 组、MV-6h 组明显增加($P=0.000$), MV-24h 组的蛋白表达水平较 MV-12h 组明显增加($P=0.011$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.058$) (图 4B)。

Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 mfn2 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 0.67 ± 0.14 、 0.47 ± 0.13 、 0.35 ± 0.10 ，4 组 mfn2 蛋白表达水平有统计学差异($F=13.270$, $P=0.002$)。两两比较结果显示, MV-12h 组 mfn2 蛋白表达水平较 Control 组明显减少($P=0.004$), MV-24h 组 mfn2 蛋白表达水平较 Control 组明显减少($P=0.000$), MV-24h 组蛋白表达水平较 MV-6h 组明显减少($P=0.003$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.059$) (图 4C)。

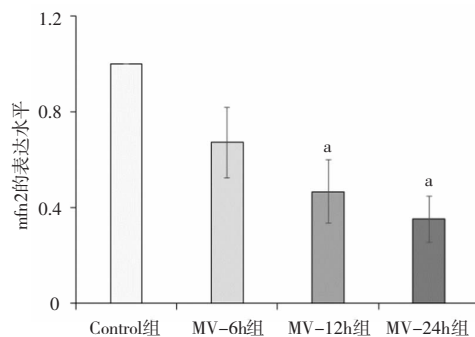


A. 各组模型膈肌动力学相关蛋白 drp1 和 mfn2 的表达水平



注: a, 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b, 与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$; c, 与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

B. 各组模型膈肌裂解蛋白 drp1 的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注: a, 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b, 与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$; c, 与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

C. 各组模型膈肌融合蛋白 mfn2 的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

图 4 各组模型膈肌动力学相关蛋白的表达

2.5 自噬相关蛋白的变化

本实验小组检测了膈肌自噬相关蛋白 PINK1、parkin、P62、LC3II/I 的表达水平(图 5A)。Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 PINK1 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.46 ± 0.14 、 2.53 ± 0.25 、 4.78 ± 0.31 , 4 组 PINK1 蛋白表达水平有统计学差异($F=128.240$, $P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-12h 组和 MV-24h 组的 PINK1 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.000$), MV-24h 组蛋白表达水平较 MV-6h 组明显增加($P=0.000$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.071$)(图 5B)。

Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 parkin 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.98 ± 0.09 、 2.59 ± 0.13 、 3.73 ± 0.16 , 4 组 parkin 蛋白表达水平有统计学差异($F=198.870$, $P=0.002$)。两两比较结果显示, MV-24h 组 parkin 蛋白表达水平较 Control 组、MV-6h 组明显增加($P=0.000$), MV-24h 组的蛋白表达水平较 MV-12h 组明显增加($P=0.018$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.080$)(图 5C)。

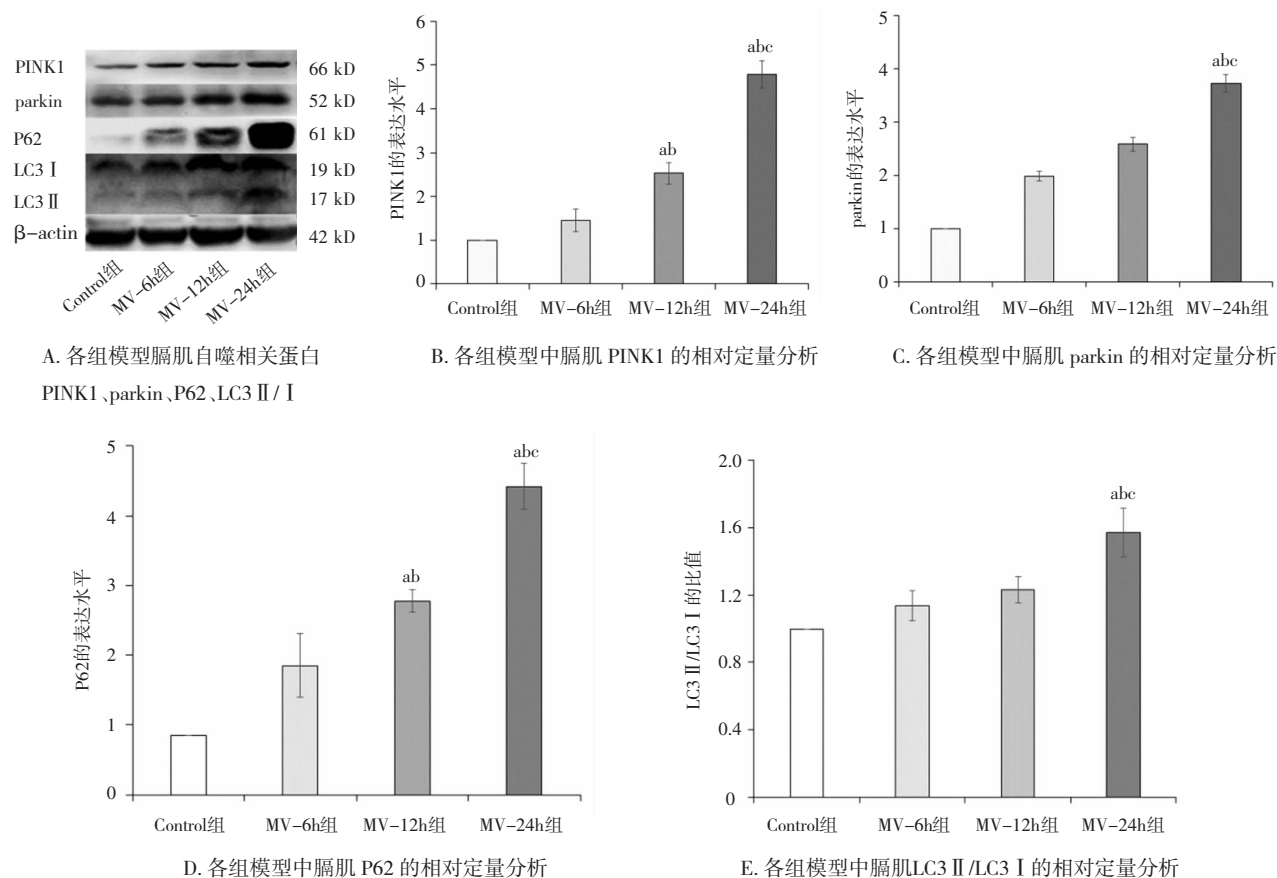
Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 P62 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.31 ± 0.10 、 2.28 ± 0.06 、 $3.69 \pm$

0.17 , 4 组 P62 蛋白表达水平有统计学差异($F=268.760$, $P=0.000$)。两两比较结果显示, MV-12h 组和 MV-24h 组的 P62 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.000$), MV-24h 组的蛋白表达水平较 MV-6h 组和 MV-12h 组明显增加($P=0.000$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.059$)(图 5D)。

Control 组、MV-6h 组、MV-12h 组、MV-24h 组 LC3 II / LC3 I 蛋白表达水平分别是 1.00 ± 0.00 、 1.14 ± 0.09 、 1.23 ± 0.08 、 1.57 ± 1.32 , 4 组 LC3 II / LC3 I 蛋白表达水平有统计学差异($F=13.710$, $P=0.002$)。两两比较结果显示, MV-24h 组 LC3 II / I 蛋白表达水平较 Control 组明显增加($P=0.004$), MV-24h 组蛋白表达水平较 MV-6h 组明显增加($P=0.014$), MV-6h 组和 Control 组之间没有统计学差异($P=0.074$)(图 5E)。

3 讨论

膈肌功能障碍是 MV 患者撤机失败的主要原因, 撤机失败严重影响患者预后及其生活质量^[8-9]。



注: a, 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b, 与 MV-6h 组比较, $P < 0.05$; c, 与 MV-12h 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组模型膈肌自噬相关蛋白的表达

大量动物研究报道,延长的 MV 导致膈肌发生功能障碍^[10-13]。因为大鼠和人类膈肌在解剖学上相似并且包含类似的纤维类型复合物^[14],所以大鼠已成为研究 MV 诱导膈肌纤维尺寸和功能变化的最常用动物模型。

VIDD 主要表现在膈肌功能学和组织学 2 方面的改变。本研究发现,与 Control 组相比,膈肌的 CMAP 幅值在 MV-12h 组和 MV-24h 组明显降低,CMAP 时程在 MV-24h 组明显升高,表示膈肌发生了功能学的改变;并且膈肌纤维的横截面积随着 MV 时间逐渐减少,表明膈肌的组织结构发生了改变。进一步检测萎缩相关蛋白 MAFbx 和 MURF1,发现随着 MV 时间延长,萎缩蛋白水平逐渐递增,说明 MV 可以引起膈肌的功能和组织学改变,并且随着 MV 时间延长,膈肌功能和萎缩进一步加重。

本实验除了 MV 时间不同,持续泵注戊巴比妥钠的时间也不同。Shanely RA 等^[6]通过对比持续泵注戊巴比妥钠并 MV18 h 与持续泵注戊巴比妥钠 18 h 但不 MV,测量了膈肌的质量、肌纤维横截面积、膈肌纤维中蛋白质和水含量,发现两者之间并没有统计学差异,表明持续泵注 18 h 戊巴比妥钠并不会导致膈肌萎缩,证明戊巴比妥钠与 MV 引起的膈肌蛋白水解和萎缩无关。本实验并没有测量戊巴比妥钠对膈肌的影响,后期将进一步探究戊巴比妥钠是否会对膈肌功能产生影响。

线粒体是动态细胞器,不断进行融合和裂变,并与邻近的细胞器相互作用,以重塑它们的形状和功能特性,这一过程统称为线粒体动力学^[4]。drp1 对于大多数类型的线粒体裂变是必需的。小鼠敲除研究明确证实,mfn 类蛋白质对线粒体融合至关重要^[15]。Romanello V 等^[16]研究表明,通过触发细胞器功能障碍和 AMPK 活化,裂变机制的表达足以引起成年动物的肌肉萎缩,并认为线粒体网络的破坏是肌肉萎缩程序所必需的放大循环过程。mfn 对维持线粒体 DNA 和膜的稳定性至关重要,其下调可能有利于线粒体分裂和随后的破碎,从而加速线粒体自噬降解^[17]。本研究显示,与 Control 组相比,线粒体裂解蛋白 drp1 在 MV-24h 组明显增高,融合蛋白 mfn2 在 MV-12h 组和 MV-24h 组明显减少,表明 MV 可以

引起线粒体动力学的变化。随着 MV 时间延长,线粒体裂解增加,融合减少,这可能通过加速线粒体自噬进而导致 VIDD 的发生。

VIDD 的发生与线粒体功能障碍有关,在 MV 启动后的短时间内,处于不活动状态的膈肌线粒体会发生功能障碍^[18]。线粒体自噬是一种被广泛研究的特异性自噬,介导受损的线粒体选择性清除^[19]。当线粒体受损时,PINK1 水解受抑制,从而堆积在线粒体外膜上。PINK1 招募胞质内的 parkin 转至受损的线粒体膜上,因 parkin 的 E3 活性,同时将泛素连接到位于线粒体的底物上,引起膜上蛋白泛素化^[20]。发生泛素化的线粒体可以被接头蛋白 P62(一种自噬受体蛋白)识别,P62 上带有与 LC3 相互作用的区域(LIR),与 LC3 结合连接到自噬小泡膜上,与线粒体形成线粒体自噬体,诱导线粒体自噬的发生^[21]。有研究表明,功能失调的线粒体触发分解代谢信号通路,这些信号通路前馈到细胞核,促进肌肉萎缩的激活^[22]。Lokireddy S 等^[23]报道,线粒体自噬引起骨骼肌萎缩是由地塞米松、肌肉生长抑制素和饥饿诱发的。本研究发现,与 Control 组相比,PINK1、P62 在 MV-12h 组和 MV-24h 组明显增加,parkin、LC3 II/LC3 I 在 MV-24h 组明显增加,表明 MV 会引起线粒体自噬水平改变。与 Kang C 等^[24]研究一致的是,P62 随着 MV 延长逐渐升高,表明形成自噬小体的过程中,消耗量更少的 P62 可能是防止线粒体过度清除的一种代偿机制。线粒体自噬与 VIDD 可能存在某种密切的联系,这可能是导致 VIDD 发生的重要触发因素。线粒体自噬与膈肌功能障碍是否有直接的因果关系?通过阻断线粒体自噬途径,膈肌功能障碍是否有所改善?这是进一步需要探究的问题。

综上所述,MV 可以引起 PINK1/parkin 通路介导的线粒体自噬发生改变,并引起线粒体裂解增加,融合减少,并引起膈肌功能学和组织学改变,线粒体自噬和 VIDD 之间或许存在密切的联系,而线粒体自噬途径可能成为防止 VIDD 发生的重要靶点。

参 考 文 献

- [1] Kim WY,Suh HJ,Hong SB,et al. Diaphragm dysfunction assessed by ultrasonography:influence on weaning from mechanical ventilation

- [J]. Crit Care Med, 2011, 39(12): 2627–2630.
- [2] Powers SK, Wiggs MP, Sollanek KJ, et al. Ventilator-induced diaphragm dysfunction: cause and effect[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 305(5): R464–477.
- [3] Zhu X, van Hees H, Heunks L, et al. The role of calpains in ventilator-induced diaphragm atrophy[J]. Intensive Care Med Exp, 2017, 5(1): 14.
- [4] Picard M, Azuelos I, Jung B, et al. Mechanical ventilation triggers abnormal mitochondrial dynamics and morphology in the diaphragm[J]. J Appl Physiol (1985), 2015, 118(9): 1161–1171.
- [5] Wang D, Sun H, Song G, et al. Resveratrol improves muscle atrophy by modulating mitochondrial quality control in STZ-induced diabetic mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(9): e1700941.
- [6] Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(10): 1369–1374.
- [7] Martin M, Li K, Wright MC, et al. Functional and morphological assessment of diaphragm innervation by phrenic motor neurons[J]. J Vis Exp, 2015(99): e52605.
- [8] Bruells CS, Marx G, Rossaint R. Ventilator-induced diaphragm dysfunction: clinically relevant problem[J]. Anaesthesist, 2014, 63(1): 47–53.
- [9] Schepens T, Verbrugghe W, Dams K, et al. The course of diaphragm atrophy in ventilated patients assessed with ultrasound: a longitudinal cohort study[J]. Crit Care, 2015, 19: 422.
- [10] Radell PJ, Remahl S, Nichols DG, et al. Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function[J]. Intensive Care Med, 2002, 28(3): 358–364.
- [11] Capdevila X, Lopez S, Bernard N, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(1): 103–110.
- [12] Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans[J]. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1327–1335.
- [13] Jung B, Constantin JM, Rossel N, et al. Adaptive support ventilation prevents ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in piglet: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Anesthesiology, 2010, 112(6): 1435–1443.
- [14] Powers SK, Demirel HA, Coombes JS, et al. Myosin phenotype and bioenergetic characteristics of rat respiratory muscles[J]. Med Sci Sports Exerc, 1997, 29(12): 1573–1579.
- [15] Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(6): 1725–1735.
- [16] Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy[J]. EMBO J, 2010, 29(10): 1774–1785.
- [17] Zhao J, Braut JJ, Schild A, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells[J]. Cell Metab, 2007, 6(6): 472–483.
- [18] Picard M, Jung B, Liang F, et al. Mitochondrial dysfunction and lipid accumulation in the human diaphragm during mechanical ventilation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(11): 1140–1149.
- [19] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(1): 9–14.
- [20] Mouton-Liger F, Jacoupy M, Corvol JC, et al. PINK1/Parkin-dependent mitochondrial surveillance: from pleiotropy to Parkinson's disease[J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 120.
- [21] Lan R, Wu JT, Wu T, et al. Mitophagy is activated in brain damage induced by cerebral ischemia and reperfusion via the PINK1/Parkin/p62 signalling pathway[J]. Brain Res Bull, 2018, 142: 63–77.
- [22] Romanello V, Sandri M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance[J]. Front Physiol, 2015, 6: 422.
- [23] Lokireddy S, Wijesoma IW, Teng S, et al. The ubiquitin ligase Mu1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli[J]. Cell Metab, 2012, 16(5): 613–624.
- [24] Kang C, Yeo D, Ji LL. Muscle immobilization activates mitophagy and disrupts mitochondrial dynamics in mice[J]. Acta Physiol (Oxf), 2016, 218(3): 188–197.

(责任编辑: 冉明会)