

研究论文

锌转运体Zip2对心肌缺血再灌注小鼠心肌线粒体呼吸的调控作用

王丽艳, 程欣欣, 徐哲龙*

天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 天津 300070

摘要: 本研究旨在探讨锌转运体Zip2 (SLC39A2)在心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)过程中对线粒体呼吸的调控作用及其机制。通过冠状动脉左前降支结扎建立小鼠在体心肌I/R损伤模型, 用电感耦合离子发射光谱仪(inductively coupled plasma-optical emission spectrometer, ICP-OES)测量心肌组织的锌含量, 用高分辨呼吸测定系统(Oxygraph-2K)检测小鼠心肌线粒体呼吸功能和氧化磷酸化水平, 采用Western blot技术检测小鼠心肌组织STAT3和ERK的磷酸化水平。结果显示: (1)与假手术组相比, 野生型小鼠I/R心肌组织的锌含量明显降低, Zip2基因敲除小鼠I/R心肌组织的锌含量进一步降低; (2)与野生对照组相比, Zip2基因敲除组小鼠心肌线粒体呼吸控制率(respiratory control ratio, RCR)和氧化磷酸化水平降低, I/R后上述指标进一步降低; (3)与野生对照组相比, I/R后Zip2基因敲除组小鼠心肌组织STAT3 (Ser⁷²⁷)和ERK的蛋白磷酸化水平均明显降低; (4)与空载体感染组相比, I/R后STAT3感染组心肌线粒体呼吸功能明显提高, 而STAT3负突变体感染组心肌线粒体呼吸功能则降低。STAT3过表达可逆转Zip2基因敲除对线粒体呼吸的抑制作用。以上结果提示, 心肌I/R时Zip2通过STAT3来调控线粒体呼吸, 其机制可能与STAT3 (Ser⁷²⁷)的磷酸化有关, 这可能是Zip2保护心肌的分子机制之一。

关键词: 锌; 锌转运蛋白Zip2; 缺血再灌注损伤; STAT3; 线粒体呼吸

中图分类号: R363

Regulatory effect of the zinc transporter Zip2 on cardiomyocyte mitochondrial respiration function after cardiac ischemia-reperfusion injury in mice

WANG Li-Yan, CHENG Xin-Xin, XU Zhe-Long*

Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effect of zinc transporter Zip2 (SLC39A2) on mitochondrial respiration during myocardial ischemia/reperfusion (I/R) and the underlying mechanisms. An *in vivo* myocardial I/R model was established in mice by ligation of left anterior descending coronary artery. Cardiac zinc concentration was measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES), and the mitochondrial respiratory function and oxidative phosphorylation were determined by high-resolution respirometry (Oxygraph-2K). The phosphorylation levels of STAT3 and ERK in myocardial tissue were detected by Western blot. The results showed that, compared with the sham group, cardiac zinc concentration in myocardium was decreased in wild-type mice and further reduced in Zip2 knockout mice after I/R. Mitochondrial respiratory control rate (RCR) and oxidative phosphorylation were decreased in Zip2 knockout mice and worsened by I/R. Phosphorylation levels of STAT3 (Ser⁷²⁷) and ERK were significantly decreased in Zip2 knockout mice after I/R. In I/R myocardial tissue, STAT3 overexpression significantly improved the mitochondrial respiratory function, while STAT3 dominant negative mutant (STAT3 S727A) inhibited mitochondrial respiratory function. Moreover, the impairment of mitochondrial function by Zip2 knockout was reversed by STAT3 overexpression.

Received 2019-11-19 Accepted 2020-03-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81970255, 81802927), the Key Program of Tianjin Natural Science Foundation (No. 16JCZDJC35000), and the Science & Technology Development Fund of Tianjin Education Commission for Higher Education, China (No. 2017KJ228).

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336830; E-mail: zxu@tmu.edu.cn

These results suggest that Zip2 regulates mitochondrial respiration via phosphorylation of STAT3 during myocardial I/R, which may represent the underlying mechanism of Zip2 cardioprotection against I/R injury.

Key words: zinc; zinc transporter Zip2; ischemia/reperfusion injury; STAT3; mitochondrial respiration

心肌缺血再灌注损伤 (ischemia/reperfusion injury, I/RI) 在临床上较为常见, 指缺血心肌组织恢复血液供应后, 其结构损伤和功能障碍反而加重的病理生理过程。近年来的研究表明, 心肌 I/RI 与能量代谢障碍、氧自由基增多、钙超载、细胞自噬与凋亡、线粒体损伤等因素有着密切的关系^[1-3], 但其确切机制尚未完全阐明。进一步探讨心肌 I/RI 及其保护机制, 将有助于为临床上防治心肌 I/RI 提供新策略或新靶点。

锌稳态失衡是心肌 I/RI 的重要发病机制, 研究者在离体大鼠心脏灌流模型中发现, 再灌注后心肌组织锌离子含量明显降低, 再灌注时补充外源性锌可明显减小大鼠心肌梗死面积, 降低再灌注引起的心律失常发生率^[4-7]。本研究组前期研究显示, 缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 后, Zip2 过表达小鼠心肌梗死面积减小, 且血清心肌损伤标志物水平明显降低, 锌转运体 Zip2 通过维持再灌注心肌锌稳态发挥抗 I/RI 的心肌保护作用, 但其具体保护机制有待进一步阐明^[8]。研究表明, 锌可通过调控线粒体功能发挥心肌保护作用, 包括影响线粒体膜电位、线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP)、活性氧的产生以及线粒体呼吸功能等^[9, 10]。研究还表明, 锌可通过促进信号转导与转录因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 727 位点丝氨酸 (Ser⁷²⁷) 残基的磷酸化, 改善再灌注心肌线粒体呼吸功能, 发挥抗 I/RI 的心肌保护作用^[10]。Zip2 位于细胞膜, 是锌转运蛋白家族 Zip/SLC39A 的成员之一, 主要负责将细胞外的锌离子转运至细胞质中, 提高胞质中的锌浓度^[11, 12]。Zip2 对线粒体功能尤其呼吸功能的调控机制, 以及其对呼吸功能的调控作用是否参与了 Zip2 介导的心肌保护机制, 目前均不清楚。因此, 本研究拟探讨 Zip2 对线粒体呼吸的作用及其机制, 建立小鼠在体心肌 I/RI 模型, 测量心肌组织的锌含量, 检测心肌线粒体呼吸功能和氧化磷酸化水平, 用 Western blot 技术检测心肌组织相关信号通路蛋白表达水平, 以期进一步揭示 Zip2 的心肌保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 野生型 C57BL/6 品系小鼠由北京维通利华公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2017-0005。Zip2 基因敲除小鼠由广州赛业生物科技有限公司提供。所有小鼠均在 SPF 级动物房饲养繁殖。动物实验方案获得天津医科大学实验动物伦理委员会的批准, 相关动物实验严格按照国家实验动物管理及使用指南操作。

1.2 主要试剂 苹果酸、谷氨酸、琥珀酸以及 ADP 均购自美国 Sigma 公司; 抗 p-STAT3 抗体 (9134S)、p-ERK 抗体 (4377S)、STAT3 抗体 (9139S) 和 ERK 抗体 (4695S) 均购自美国 CST 公司; 抗 Tubulin 抗体 (B3001) 购自 Immunoway 公司; PVDF 膜购自德国 Millipore 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗购自 CST 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、组织线粒体分离试剂盒购自碧云天生物技术研究; 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.3 小鼠在体心脏 I/R 模型建立方法 小鼠经 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 待其进入深度麻醉后, 实时监测体温 (术中维持体温为 37 °C), 行气管插管; 开胸暴露心脏, 7-0 号带针线结扎左冠状动脉前降支 (left anterior descending coronary, LAD), 造成局部缺血, 可观察到心电图 S-T 段明显抬高; 30 min 后解除结扎线, 开放 LAD 进行再灌注, 所有小鼠心脏均接受 30 min 局部缺血和 20 min 再灌注; 假手术组在 LAD 位置过线但不结扎, 不进行 I/R 处理。

1.4 动物分组 随机选取雄性 8 周龄野生型和 Zip2 基因敲除小鼠, 体重 25~35 g, 分组方案如下 (每组 $n = 5$): (1) 野生对照组 (WT 组) 和 Zip2 基因敲除组 (Zip2 KO 组); (2) 假手术组 (Sham 组)、野生 I/R 组 (Zip2 WT+I/R 组) 和 Zip2 基因敲除 I/R 组 (Zip2 KO+I/R 组)。取 5 周龄小鼠做 AAV 在体转染实验, AAV 感染实验分组方案如下: (1) 空载体感染组 (Vector 组)、STAT3 感染组 (STAT3 WT 组)、STAT3 突变体感染组 (STAT3 S727A 组); (2) 空载体感染组 I/R 组 (Vector+I/R 组)、STAT3 感染 I/R 组 (STAT3 WT+I/R

组)、STAT3 突变体感染 I/R 组 (STAT3 S727A+I/R 组); (3) Zip2 KO 空载体感染 I/R 组 (Zip2 KO+Vector+I/R 组)、Zip2 KO STAT3 感染 I/R 组 (Zip2 KO+STAT3+I/R 组)。I/R 处理方法见 1.3 节, AAV (100 μ L/只) 通过尾静脉注射入小鼠体内, 转染 4 周后进行后续实验。

1.5 心肌组织线粒体的分离 参照组织线粒体分离试剂盒说明书提取心肌线粒体。取麻醉后处死的小鼠的心肌组织或缺血区心肌组织, 剪碎后加入 PBS 冰浴 3 min, 600 g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 20~30 s, 沉淀组织样品, 弃上清; 加入适量胰酶消化液, 冰浴 20 min; 600 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20~30 s, 沉淀组织样品, 弃上清; 加入线粒体分离试剂 A, 600 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20~30 s, 沉淀组织样品, 弃上清; 加入线粒体分离试剂 A, 在冰浴上进行匀浆, 将匀浆在 1 000 g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 5 min, 吸取上清至离心管, 3 500 g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min, 小心地去除上清, 沉淀即为分离得到的线粒体。最后采用 BCA 法对线粒体蛋白进行定量。

1.6 线粒体呼吸功能测定 取 130 μ g 的线粒体加入高分辨呼吸测定系统 (Oxygraph-2K) 检测舱内, 待呼吸速率平稳后, 测定以下反应: (1) 加入苹果酸 (2 mmol/L) 和谷氨酸 (10 mmol/L), 启动复合体 I 相关呼吸, 记录 State 2 呼吸; (2) 加入 ADP (2.5 mmol/L), 记录 State 3 呼吸 (复合体 I 的氧化磷酸化水平); (3) 随着 ADP 底物的消耗, 线粒体进入 IV 态呼吸, 测定线粒体的呼吸控制率 (respiratory control ratio, RCR), 即为 State 3 呼吸氧耗速率与 State 2 呼吸氧耗速率的比值; (4) 加入琥珀酸盐 (10 mmol/L), 记录线粒体的最大呼吸能力或氧化磷酸化水平 (CI+CI_{II})。

1.7 Western blot 再灌注 20 min 后取缺血区心肌组织或取麻醉后处死的小鼠的心肌组织, 提取心肌组织蛋白, 取等量的心肌组织蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离后将蛋白转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 根据标准分子量确定待测蛋白的条带位置, 加入抗 p-STAT3 (1:1 000)、p-ERK (1:2 000)、STAT3 (1:2 000)、ERK (1:1 000) 和 Tubulin (1:5 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次。采用 ECL 法进行显色, 凝胶成像系统采集图像, ImageJ 图像分析软件进行蛋白条带的灰度分析, 以 Tubulin 蛋白作为内参计算蛋白相对表达量。

1.8 心肌组织总锌含量的测定 再灌注 20 min 后取心肌组织, 剪碎, 加入 1 mL 浓 HNO₃, 120 $^{\circ}$ C 硝解 1~2 h, 最后用 13% 的 HNO₃ 定容。配制标准 Blank 液 (13% HNO₃) 和含锌的标准品溶液。用标准 Blank 液和标准品溶液吸光度绘制标准曲线。使用电感耦合离子发射光谱仪 (inductively coupled plasma-optical emission spectrometer, ICP-OES) 测量心肌组织中总锌含量, 发射波长设为测定 Zn 的波长 (206.200 nm), 心肌组织中锌含量表示为 μ g/g。

1.9 统计学分析 数据以 mean \pm SD 来表示, 采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行统计学处理, 采用 *t* 检验以及单因素方差分析 (one-way ANOVA), 有显著性差异时采用 Turkey 法进行两两比较。P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Zip2 基因敲除抑制心肌线粒体呼吸功能

与野生型小鼠相比, Zip2 基因敲除小鼠心肌线粒体的 RCR (图 1A、C), 线粒体复合体 I (图 1A、D) 和复合体 I+II (图 1A、E) 的氧化磷酸化水平均显著降低 (均 P < 0.05); Western blot 结果显示, 与野生型小鼠相比, Zip2 基因敲除小鼠心肌组织 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化水平降低 (P < 0.05) (图 1B)。这些结果提示, Zip2 基因敲除抑制心肌线粒体呼吸, 这可能与 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化有关。

2.2 Zip2 基因敲除抑制 I/R 心肌 ERK 和 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化, 并进一步抑制 I/R 心肌线粒体呼吸功能

与 Sham 组相比, Zip2 WT+I/R 组小鼠心肌线粒体 RCR (图 2A、C)、线粒体复合体 I (图 2A、D) 和复合体 I+II (图 2A、E) 的氧化磷酸化水平均显著降低 (P < 0.05 或 P < 0.01); Zip2 基因敲除 (Zip2 KO) 使 I/R 心肌线粒体 RCR (图 2A、C)、复合体 I (图 2A、D) 和复合体 I+II (图 2A、E) 氧化磷酸化水平进一步降低 (P < 0.05 或 P < 0.01)。Western blot 结果显示, 与 Sham 组相比, Zip2 WT+I/R 组 STAT3 (Ser⁷²⁷) 和 ERK 的磷酸化水平显著升高 (P < 0.01), 而总的 STAT3 和 ERK 表达没有明显变化; 当 Zip2 敲除后, Zip2 KO+I/R 组 STAT3 (Ser⁷²⁷) 和 ERK 的磷酸化水平则显著下降 (P < 0.01) (图 2B、F 和 G)。与 Sham 组相比, Zip2 WT+I/R 组小鼠心肌组织锌含量明显降低 (P < 0.01); Zip2 基因敲除后, 心肌组织锌含量则进一步降低 (P < 0.01)。以上结果提示, I/R 时

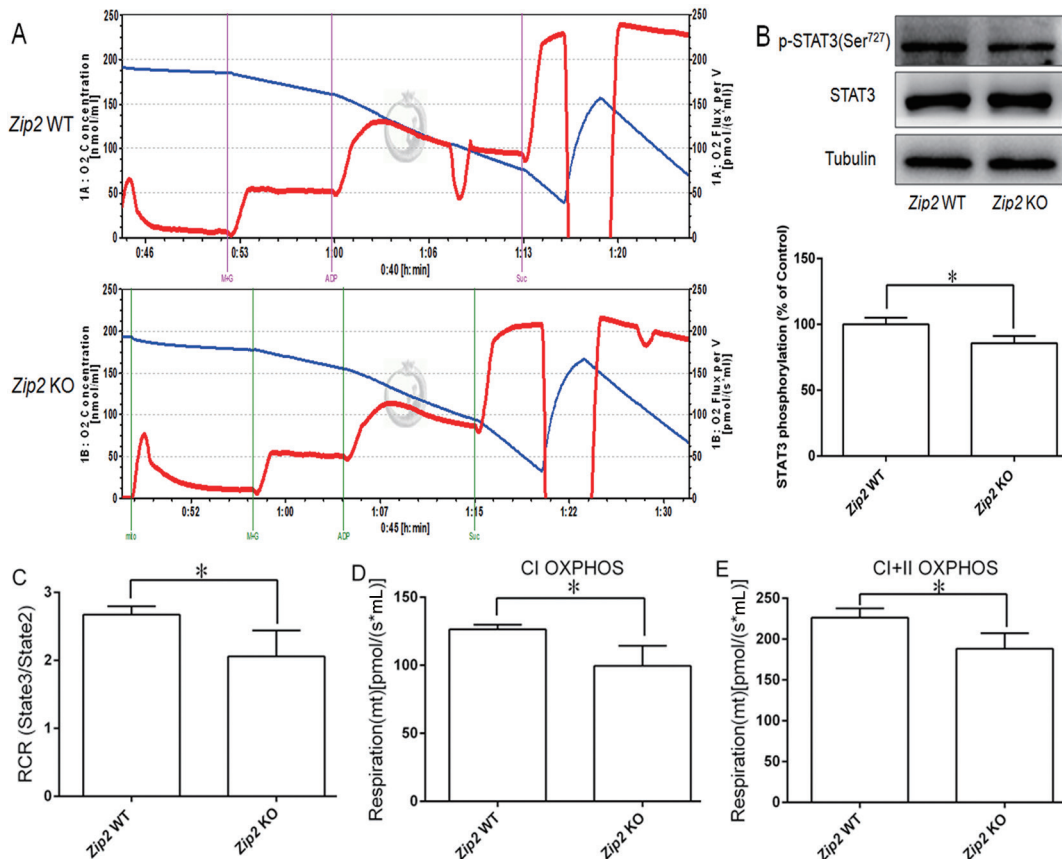


图 1. *Zip2*基因敲除抑制心肌线粒体呼吸

Fig. 1. The knockout of *Zip2* inhibits myocardial mitochondrial respiration. *A*: Mitochondrial respiration was measured by high-resolution respirometry (Oxygraph-2K). *B*: Effect of knockout of *Zip2* on STAT3 (Ser⁷²⁷) phosphorylation level detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. *C*: Mitochondrial respiratory control ratio (RCR). *D*: Mitochondrial complex I (CI) oxidative phosphorylation. *E*: Mitochondrial complex I and II (CI+II) oxidative phosphorylation. Mean \pm SD, $n = 5$. * $P < 0.05$. OXPHOS, oxidative phosphorylation.

Zip2 有助于维持心肌稳态，通过影响 ERK-STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化维持心肌线粒体呼吸。

2.3 STAT3过表达及STAT3突变体小鼠心肌组织相关蛋白水平的检测

如图 3A、B 所示，与 Vector 组相比，STAT3 WT 组小鼠心脏中总 STAT3 及 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化水平明显升高 ($P < 0.01$)，STAT3 S727A 组小鼠总 STAT3 表达水平也明显升高 ($P < 0.01$)；与 STAT3 WT 组相比，STAT3 S727A 组小鼠的 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$)。采用小鼠在体心脏 I/R 模型，再灌注结束时取心肌组织做蛋白水平检测，如图 3C、D 所示，与 Sham 组相比，Vector+I/R 组心肌组织总 STAT3 的表达没有明显变化，STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化水平明显升高 ($P < 0.05$)；与 Vector+I/R 组相比，STAT3 WT+I/R 组心肌组织总 STAT3 及 STAT3 (Ser⁷²⁷) 的磷酸化水平均明显升高 ($P < 0.01$)。以上这些结果表明，在体转染 STAT3 及显性阴性突

变体 S727A 腺相关病毒模型构建成功，可以用于后续实验。

2.4 STAT3 (Ser⁷²⁷)的磷酸化有助于改善I/R心肌线粒体呼吸，Zip2通过STAT3调控线粒体呼吸

采用小鼠在体心脏 I/R 模型，再灌注结束时采用高分辨呼吸测定系统检测小鼠心肌组织线粒体呼吸功能和氧化磷酸化水平。与 Vector+I/R 组相比，STAT3 WT+I/R 组的线粒体 RCR (图 4A、B)、线粒体复合体 I (图 4A、C) 和复合体 I+II (图 4A、D) 的氧化磷酸化水平均明显升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)；与 STAT3 WT+I/R 组相比，STAT3 S727A+I/R 组线粒体 RCR (图 4A、B)、线粒体复合体 I (图 4A、C) 和复合体 I+II (图 4A、D) 的氧化磷酸化水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与 *Zip2* KO+Vector+I/R 组相比，*Zip2* KO+STAT3+I/R 组线粒体 RCR (图 4A、E)、线粒体复合体 I (图 4A、F) 和复合体 I+II (图 4A、G) 的氧化磷酸化水平均显著提高 (均 $P < 0.01$)。以上这些

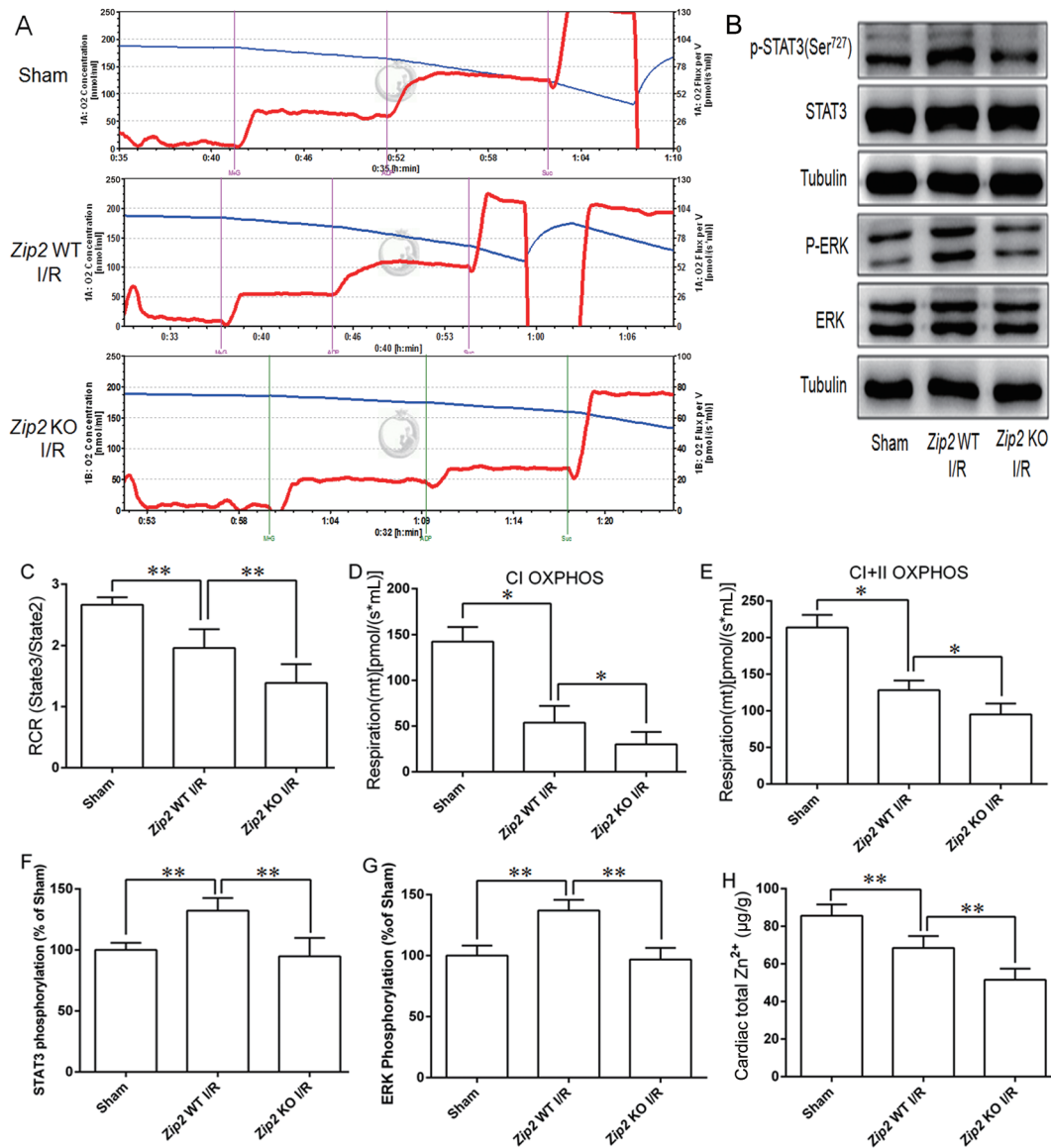


图 2. Zip2基因敲除抑制缺血再灌注心肌ERK和STAT3 (Ser⁷²⁷)的磷酸化, 并进一步抑制缺血再灌注心肌线粒体呼吸
 Fig. 2. The knockout of Zip2 inhibited the phosphorylation of ERK and STAT3 (Ser⁷²⁷) and further inhibited the mitochondrial respiration in mouse hearts subjected to ischemia/reperfusion (I/R). A: Mitochondrial respiration was measured by high-resolution respirometry (Oxygraph-2K). B: Effect of knockout of Zip2 on STAT3 (Ser⁷²⁷) and ERK phosphorylation levels detected by Western blot. C: Mitochondrial respiratory control ratio (RCR). D: Mitochondrial complex I (CI) oxidative phosphorylation. E: Mitochondrial complex I and II (CI+II) oxidative phosphorylation. F: Western blot result of STAT3 (Ser⁷²⁷) phosphorylation level. G: Western blot result of ERK phosphorylation level. H: Total cardiac zinc concentration in mouse hearts subjected to I/R. Mean ± SD, n = 5. *P < 0.05, **P < 0.01. OXPHOS, oxidative phosphorylation.

结果进一步提示, STAT3 Ser⁷²⁷ 残基的磷酸化有助于改善 I/R 心肌线粒体呼吸, Zip2 通过 STAT3 调控线粒体呼吸。

3 讨论

近年来, 锌及其转运蛋白在 I/RI 中的作用引起国内外研究者的广泛关注。机体锌稳态主要由锌转

运蛋白、金属硫蛋白和金属调节转录因子 1 共同参与调节, 其中锌转运蛋白起着关键作用^[13-15]。Zip2 是锌转运蛋白家族 Zip/SLC39A 成员之一, 位于细胞膜, 负责将胞外锌离子转运进细胞质中, 升高胞质中的锌含量^[12, 16]。本研究组前期研究表明 Zip2 通过维持再灌注心肌锌稳态发挥心肌保护作用^[8], 但具体机制有待进一步阐明。

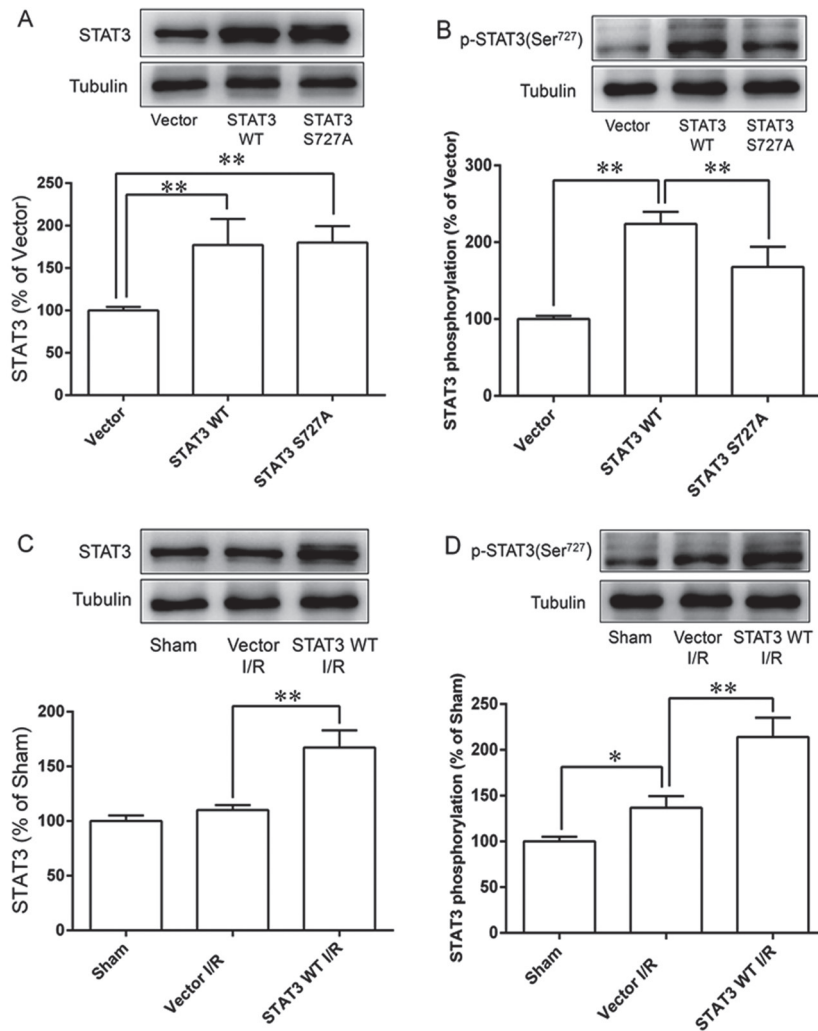


图 3. STAT3过表达及STAT3突变体小鼠心肌组织相关蛋白水平的检测

Fig. 3. Levels of STAT3 and p-STAT3 (Ser⁷²⁷) protein expression in STAT3 overexpression and STAT3 dominant negative mutant mouse hearts. AAVs were injected through the tail vein. A, B: Western blot results of STAT3 (A) and p-STAT3 (Ser⁷²⁷) (B). C, D: Western blot results of STAT3 (C) and p-STAT3 (Ser⁷²⁷) (D) in mouse hearts subjected to I/R. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

线粒体是心肌细胞能量代谢的中心，其结构完整与功能正常是心脏生理活动正常进行的前提和基础。心肌缺血缺氧或再灌注时均会造成线粒体损伤，导致能量产生障碍，从而加重心肌细胞损伤^[17, 18]。Paradies 等研究显示，大鼠离体心脏经 I/R 后，其线粒体呼吸链复合体 I 和 III 的活性均降低^[19]。本研究组在前期研究中也发现，锌离子可以通过提高 I/R 心肌线粒体复合体 I、复合体 II 的氧化磷酸化水平、最大电子传递能力、RCR 以及 ATP 的生成等来改善线粒体呼吸功能，发挥心肌保护作用^[10]。本研究结果显示，与 Sham 组相比，WT 组小鼠 I/R 心肌组织的锌含量明显降低，而 *Zip2* 基因敲除后，I/R 心肌组织的锌含量则进一步降低。与 WT 组小鼠相比，*Zip2* KO

小鼠心肌线粒体呼吸功能显著降低。进一步采用小鼠在体心肌 I/R 模型的研究显示，与 Sham 组相比，WT 组小鼠 I/R 心肌组织线粒体呼吸功能显著降低，而 *Zip2* KO 小鼠 I/R 心肌组织线粒体呼吸功能则进一步降低。多项研究证实，再灌注后心肌组织锌离子含量明显降低，I/R 导致心肌锌稳态失衡^[5, 8]，由于 *Zip2* 在调控心肌细胞锌稳态方面发挥着重要作用，*Zip2* 基因敲除后，I/R 心肌锌离子含量进一步降低，进而导致线粒体呼吸功能受到影响。以上结果进一步证实，*Zip2* 通过维持心肌细胞锌稳态来保证线粒体呼吸功能的正常运行，从而发挥其心肌保护作用。

STAT3 是一种信号转导和转录因子，STAT3 存在于心肌线粒体内，且线粒体 STAT3 727 位点丝氨

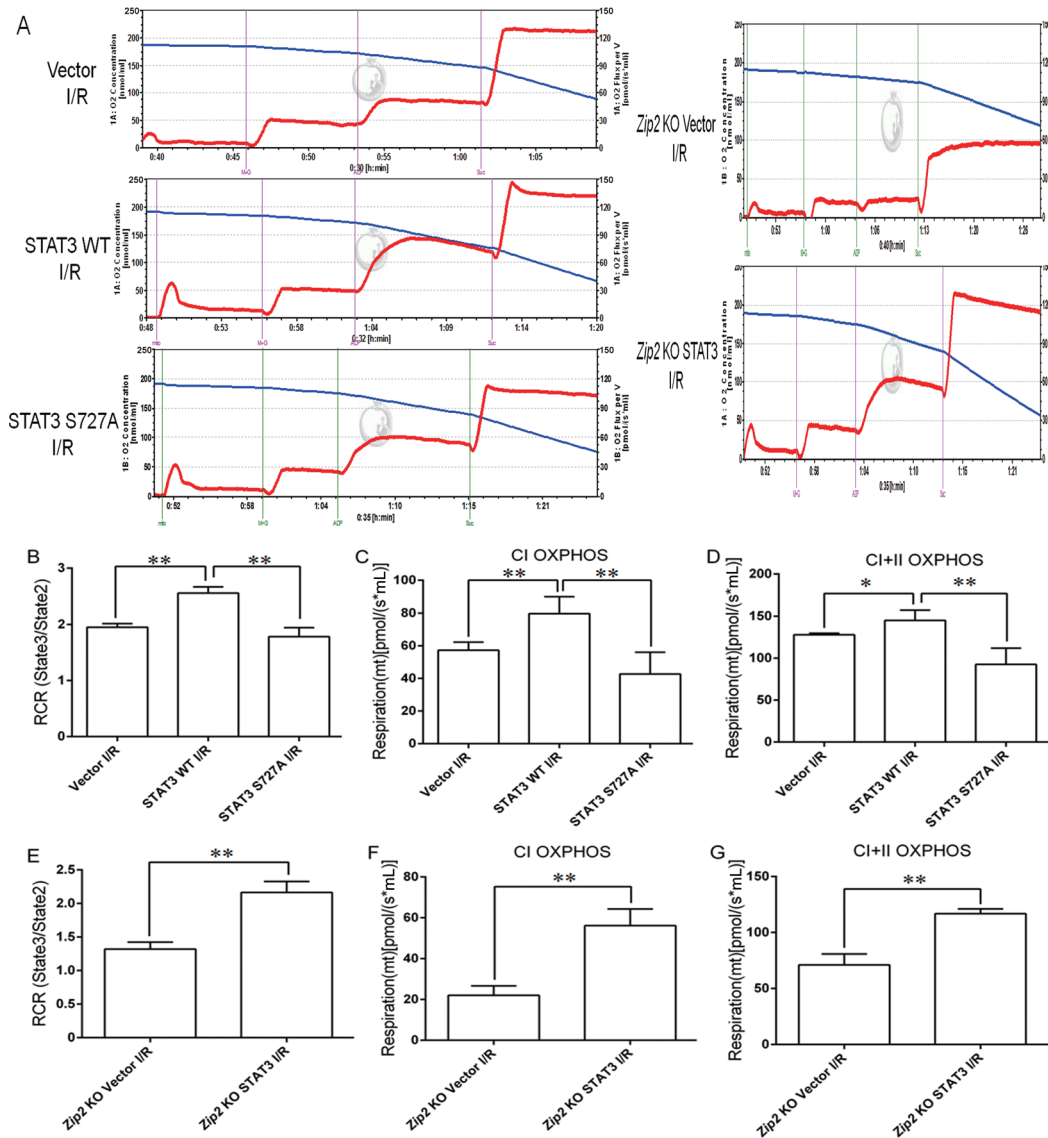


图 4. STAT3 (Ser⁷²⁷)的磷酸化有助于改善缺血再灌注心肌线粒体呼吸并逆转Zip2基因敲除对心肌线粒体呼吸的抑制作用
 Fig. 4. STAT3 (Ser⁷²⁷) phosphorylation improved mitochondrial respiration and reversed the effect of Zip2 knockout on mitochondrial respiration in mouse hearts subjected to I/R. AAVs were injected through the tail vein. A: Mitochondrial respiration was measured using high-resolution respirometry. B, E: Mitochondrial respiratory control ratio (RCR). C, F: Mitochondrial complex I (CI) oxidative phosphorylation. D, G: Mitochondrial complex I and II (CI+II) oxidative phosphorylation. Mean ± SD, n = 5. *P < 0.05, **P < 0.01. OXPHOS, oxidative phosphorylation.

酸残基的磷酸化通过维持呼吸链复合体 I 和 II 的活性、调节线粒体呼吸，发挥抗 I/RI 的心肌保护作用^[20, 21]。有研究报道，STAT3 蛋白 Ser⁷²⁷ 可以被 ERK1、ERK2、p38 和 MAPK 等激酶磷酸化^[22, 23]，从而维持线粒体电子传递链正常功能。本研究组在大鼠离体心脏 I/RI 模型上证实了 ZnCl₂ 通过 ERK 通路诱导心肌组织 STAT3 蛋白 Ser⁷²⁷ 的磷酸化，促进其从胞浆转移到线粒体内，并参与维持线粒体复合物的功能，发挥心肌保护作用^[10]。本研究在小鼠

在体心肌 I/R 模型上进一步证明了 Zip2 敲除明显降低 I/R 心肌组织 STAT3 蛋白 Ser⁷²⁷ 的磷酸化水平，STAT3 过表达显著改善 I/R 心肌线粒体呼吸功能，而与 STAT3 过表达 I/R 组相比，STAT3 显性负突变体 S727A 组 I/R 心肌线粒体呼吸功能则明显下降；STAT3 过表达可逆转 Zip2 基因敲除对线粒体呼吸的抑制作用。这些结果提示，Zip2 参与调控心肌线粒体呼吸，Zip2 可能通过 STAT3 Ser⁷²⁷ 的磷酸化来调控线粒体呼吸。

综上所述, 本研究明确了 Zip2 抗心肌 I/R 的线粒体机制。在心肌 I/R 过程中, Zip2 通过维持胞内锌稳态来促进 STAT3 蛋白 Ser⁷²⁷ 的磷酸化, 从而维持心肌线粒体呼吸功能并保护 I/R 心肌。然而, 本研究使用在体小鼠心脏分离得到的线粒体, 不能完全排除心肌细胞外的其他细胞参与的可能性, 这将有待进一步研究。

参考文献

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5): 1124–1136.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357(11): 1121–1135.
- Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(4): 1650–1667.
- Xu Z, Zhou J. Zinc and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biomaterials* 2013; 26(6): 863–878.
- Karagulova G, Yue Y, Moreyra A, Boutjdir M, Korichneva I. Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321(2): 517–525.
- Xu Z, Kim S, Huh J. Zinc plays a critical role in the cardioprotective effect of postconditioning by enhancing the activation of the RISK pathway in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 66: 12–17.
- McIntosh R, Lee S, Ghio A, Xi J, Zhu M, Shen X, Chanoit G, Zvara D, Xu Z. The critical role of intracellular zinc in adenosine A2 receptor activation induced cardioprotection against reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(1): 41–47.
- Du L, Zhang H, Zhao H, Cheng X, Qin J, Teng T, Yang Q, Xu Z. The critical role of the zinc transporter Zip2 (SLC39A2) in ischemia/reperfusion injury in mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2019; 132: 136–145.
- Kasi V, Bodiga S, Kommuquri UN, Sankuru S, Bodiga VL. Zinc pyrithione salvages reperfusion injury by inhibiting NADPH oxidase activation in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410(2): 270–275.
- Zhang G, Sheng M, Wang J, Teng T, Sun Y, Yang Q, Xu Z. Zinc improves mitochondrial respiratory function and prevents mitochondrial ROS generation at reperfusion by phosphorylating STAT3 at Ser 727. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 118: 169–182.
- Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001; 70(4): 559–566.
- Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med* 2013; 34(2–3): 612–619.
- Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* 2017; 67(2): 283–301.
- Tomoki K, Taiho K. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3): 336.
- Maret W. Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 2013; 4(1): 82–91.
- Gaither LA, Eide DJ. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* 2000; 275(8): 5560–5564.
- Shin B, Cowan DB, Emani SM, Del Nido PJ, McCully JD. Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol* 2017; 982: 595–619.
- Rousou AJ, Ericsson M, Federman M, Levitsky S, McCully JD. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels enhances cardioprotection through the modulation of mitochondrial matrix volume, calcium accumulation, and respiration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(5): H1967–H1976.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J* 2003; 17(6): 714–716.
- Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szlag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnfsky EJ, Larner AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 2009; 323(5915): 793–797.
- Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res* 2011; 109(11): 1302–1308.
- Cheng X, Peuckert C, Wöfl S. Essential role of mitochondrial Stat3 in p38(MAPK) mediated apoptosis under oxidative stress. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15388.
- Gough DJ, Koetz L, Levy DE. The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation. *PLoS One* 2013; 8(8): e83395.