



梁浚哲,段续接,杜晓悦,张良,李慧萍,刘淑英.自然感染绵羊肺腺瘤病毒羊肺组织线粒体自噬分子表达分析[J].中国农业大学学报,2024,29(08):147-156.
LIANG Junzhe, DUAN Xujie, DU Xiaoyue, ZHANG Liang, LI Huiping, LIU Shuying. Expression analysis of mitochondrial autophagy factor in lung tissues of sheep naturally infected with Jaagsiekte sheep retrovirus[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(08): 147-156.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.08.12

自然感染绵羊肺腺瘤病毒羊肺组织线粒体自噬分子表达分析

梁浚哲 段续接 杜晓悦 张良 李慧萍 刘淑英*

(内蒙古农业大学 兽医学院/农业农村部动物临床诊疗技术重点实验室/内蒙古自治区基础兽医学重点实验室,呼和浩特 010018)

摘要 为分析自然感染绵羊肺腺瘤病毒(Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV)羊肺组织中线粒体的质量及自噬相关蛋白表达的变化,本研究将自然感染 JSRV 羊的肺组织作为研究对象,利用病理组织学、PCR和免疫组化法对自然感染 JSRV 羊肺组织进行鉴定。利用透射电镜技术观察病羊肺组织中线粒体形态结构变化,分别采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(WB)检测感染组羊肺组织中线粒体相关因子线粒体外膜蛋白 20(Outer membrane translocase 20, TOMM20)、线粒体内膜蛋白 (Inner membrane translocase 23, TIMM23)、热休克蛋白 60 (Heat shock proteins 60, HSP60)的 mRNA 和蛋白水平的相对表达量,利用 WB 检测病羊肺组织线粒体蛋白中自噬相关因子 Beclin1、LC3 和选择性自噬受体 p62 蛋白水平的相对表达量。结果表明:1)PCR 扩增的目的条带与 JSRV *env* 预期扩增片段大小一致。光镜下可见肺组织中肺泡 II 型上皮细胞呈乳头状生长,且伸入肺泡中,同时免疫组化结果显示在增生的肺泡 II 型细胞中检测到 JSRV Env 大量表达,而阴性对照组未检出。2)与健康对照组相比,透射电镜观察到感染组羊组线粒体大量损伤,并且出现双层膜结构的线粒体自噬体包裹损伤的线粒体, TOMM20、TIMM23 和 HSP60 的 mRNA 相对表达水平和蛋白相对表达水平 ($P < 0.01$) 均极显著下降。3)自噬因子 Beclin1 ($P < 0.05$) 和 LC3 ($P < 0.01$) 蛋白相对表达水平显著升高, p62 相对表达显著下降 ($P < 0.001$)。综上,本研究发现自然感染 JSRV 羊肺组织中线粒体损伤严重并出现线粒体自噬现象,为 JSRV 的致病机制提供新的研究方向。

关键词 绵羊肺腺瘤病毒; 绵羊肺组织; 线粒体损伤; 线粒体自噬

中图分类号 S852.3

文章编号 1007-4333(2024)08-0147-10

文献标志码 A

Expression analysis of mitochondrial autophagy factor in lung tissues of sheep naturally infected with Jaagsiekte sheep retrovirus

LIANG Junzhe, DUAN Xujie, DU Xiaoyue, ZHANG Liang, LI Huiping, LIU Shuying*

(Key Laboratory of Animal Clinical Diagnosis and Treatment of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Inner Mongolia Key Laboratory of Basic Veterinary Medicine/College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract The purpose of this study was to analyze the quality of mitochondria and the expression of autophagy-related proteins in the mitochondria in the lung tissues of sheep naturally infected with Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV). In this study, the lung tissues of sheep naturally infected with JSRV were taken as

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072819, 32360863); 内蒙古科技重大专项(2021ZD0010); 内蒙古草原英才创新团队项目(20151031); 内蒙古教育厅创新团队项目(NMGIRT2412); 牛羊疫病防控与发育工程创新团队资助项目(RZ2200001130); 研究生科研创新资助项目(B202310722)

第一作者: 梁浚哲(ORCID:0009-0000-4560-384X), 硕士研究生, E-mail:ljz88683466@126.com

通讯作者: 刘淑英(ORCID:0000-0002-5502-9578), 教授, 主要从事动物生殖内分泌与病毒病理学研究, E-mail:liushuying_ima@126.com

the object of study. Histopathology, PCR and immunohistochemistry were used to identify naturally infected JSRV lung tissues. The morphological and structural changes of mitochondria in diseased sheep lung tissues were observed by transmission electron microscopy (TEM). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot (WB) were used to detect the relative expression of mitochondrial related factors outer membrane protein 20 (TOMM20), inner membrane protein 23 (TIMM23) and heat shock protein 60 (HSP60) in sheep lung tissues of healthy and naturally infected JSRV diseased sheep. WB was used to detect the relative expression of autophagy-related factors Beclin1, LC3 and selective autophagy receptor p62 in lung mitochondrial proteins of diseased sheep. The results showed that: 1) The PCR results showed that the target band was consistent with the expected fragments of JSRV *env*. Alveolar type II cells in the diseased tissues showed mastoid hyperplasia and extended into the alveolar cavity under the light microscope, and the immunohistochemical results showed a large amount of JSRV Env expression was detected in the proliferative alveolar type II cells, but not in the negative control group. 2) Compared with the healthy control group, the transmission electron microscope showed a large number of mitochondrial damage in the diseased sheep group, and the damaged mitochondria were wrapped by mitochondrial autophagosomes with double membrane structure. The relative expression levels of mRNA and protein of TOMM20, TIMM23 and HSP60 were extremely significantly decreased ($P < 0.01$). 3) The relative expression of autophagy factors Beclin1 ($P < 0.05$) and LC3 ($P < 0.01$) were increased significantly, while the relative expression of p62 was significantly decreased ($P < 0.001$). In summary, we found there was severe mitochondrial damage and mitochondrial autophagy in the lung tissues of diseased sheep, providing a new research direction for the pathogenesis of JSRV.

Keywords Jaagsiekte sheep retrovirus; sheep lung tissues; mitochondrial damage; mitophagy

绵羊肺腺瘤(Ovine pulmonary adenocarcinoma, OPA)是一种由 β 反转录病毒属的绵羊肺腺瘤病毒(Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV)引起的慢性、进行性、接触性、传染性的肺部肿瘤疾病。OPA主要病理组织学特征为肺泡II型上皮细胞和细支气管上皮细胞增生,呈乳头状向肺泡腔内延伸,形成“花椰菜样”腺瘤灶,导致肺泡严重塌陷^[1]。研究表明,OPA的超微病理学结构表现为细胞核明显变大,与细胞质比例失调,染色质聚集、边移,线粒体肿胀变圆,嵴溶解或消失形成空泡样线粒体,粗面内质网明显增宽^[2]。OPA约占绵羊肿瘤的70%,在全球多个养羊业发达地区普遍存在,严重影响了养羊业的发展。此外,OPA与人鳞状上皮腺癌(Lepidic predominant adenocarcinoma, LPA)在临床症状、病理组织学特征及超微病理学变化等方面极为相似,也被认为是研究LPA的最佳动物模型,在人医肺癌研究领域被广泛关注^[3]。

线粒体自噬是细胞应对内部压力和维持稳态的关键途径。在正常情况下,线粒体通过其动态平衡的双膜结构,支持细胞的能量产生和代谢调节。然而,当线粒体受损或功能失调时,线粒体自噬便被激活以维持细胞内环境的稳定。这一过程涉及

多种分子标志物,包括线粒体外膜蛋白20(Outer membrane translocase 20, TOMM20)、线粒体内膜蛋白(Inner membrane translocase 23, TIMM23)、热休克蛋白60(Heat shock proteins 60, HSP60)等线粒体蛋白,它们在维持线粒体完整性和功能中扮演着重要角色。TOMM20和TIMM23作为线粒体膜上的转位酶,参与蛋白质的传输和线粒体内外物质交换,而HSP60则作为分子伴侣,协助线粒体蛋白质的折叠和组装,所以研究者们把它们作为评判线粒体数量及损伤状态的依据^[4]。这些蛋白的异常表达或功能失调可能导致线粒体损伤,进而触发线粒体自噬。自噬过程中涉及到一系列关键因子,如Beclin1、微管相关蛋白1轻链3(Light chain 3, LC3)和p62。Beclin1是自噬的核心调节蛋白,参与自噬泡的形成和成熟。

线粒体自噬在调节肿瘤细胞代谢中扮演着重要角色^[5]。在某些情况下,线粒体自噬的激活有助于肿瘤细胞的生存,通过去除损坏的线粒体来防止细胞凋亡。然而,在其他情况下,过度的线粒体自噬可能导致细胞死亡,从而抑制肿瘤的生长。这种双重作用使得线粒体自噬在肿瘤生物学中的角色变得复杂且多面^[6]。近年来的研究表明^[7],线粒体

自噬在肺腺瘤发展中扮演着双重角色。一方面,它通过去除受损的线粒体,阻止细胞死亡和肿瘤的进一步发展;另一方面,过度的线粒体自噬可能导致肺腺瘤细胞对能量危机的过度反应,从而促进肿瘤生长^[7-9]。

尽管前人在乳腺癌、卵巢癌和肺癌等多种癌症的研究中普遍观察到线粒体自噬受到抑制,但对于线粒体自噬在腺癌中的致病机制相关研究较为有限。由于 LPA 与 OPA 在形态学和组织学特征上的相似性,使得 OPA 成为研究人类 LPA 发生机理的理想动物模型,研究线粒体自噬对 OPA 发生发展的影响可以为探究 LPA 的致病机制提供研究思路。在此背景下,本课题组针对 JSRV 对细胞自噬的影响进行了深入研究,然而在线粒体自噬方面,关于 JSRV 的研究仍显不足。鉴于 JSRV 尚未建立有效的体外培养体系,本研究为分析自然感染 JSRV 羊肺组织中线粒体形态、数量变化以及自噬因子表达情况,旨在深入了解自然感染 JSRV 病羊肺组织中线粒体自噬的状态,及其与 OPA 发展之间的联系,这不仅有助于了解 OPA 的病理过程,还为探索 JSRV 的致病机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 组织样品

绵羊肺组织采自内蒙古自治区乌兰察布市某养殖场的 3 只自然感染绵羊肺腺瘤病毒羊和 3 只疑

似感染健康羊,病羊均出现呼吸困难、咳嗽、被驱赶时呼吸急促等慢性呼吸道疾病症状。用于制作病理组织切片的肺组织置于 10% 福尔马林溶液中固定;用于提取线粒体蛋白的肺组织置于 PBS 缓冲液中带回实验室 4℃ 保存,48 h 内进行试验;用于提取核酸和蛋白的样本放入冻存管中保存在液氮中,后转至-80℃ 保存。

1.1.2 主要试剂

TRIzol 购自 Takara 公司;JSRV Env 多克隆抗体由所在课题组制备; β -actin、TOMM20、TIMM23、HSP60、GAPDH、LC3、p62、Beclin1 等一抗,HRP 标记的山羊抗兔、山羊抗鼠 IgG 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)制备试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2 $\times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.1.3 引物设计及合成

参照 NCBI 数据库中收录的 JSRV *env* 和 β -actin、TOMM20、TIMM23、HSP60 的基因序列进行综合分析,Primer Premier 6.0 设计普通 PCR 扩增引物和定量 PCR 检测引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 The sequence of PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	长度/bp Length	登录号 Accession
JSRV <i>env</i>	F:ATGCCGAAGCGCCGCGCT	1 848	JQ837489
	R:TCACGGGTCGTCCCCCGCATCTCCCCT		
β -actin	F:GTCACCAACTGGGACGACA	208	NM_001101
	R:AGGCGTACAGGGACAGCA		
TOMM20	F:GAAGGGCGTAGACCATCTGACA	116	NC_056078.1
	R:CTGGAACACTGGTGGTGGGAAGA		
TIMM23	F:GGATAGCACGAGGTGGTCTGAC	102	NM_006327
	R:AGAGTGACTGTTGGAGCAAGGA		
HSP60	F:GGTCTTCAGGTTGTGGCAGTCA	193	NC_056055.1
	R:AGAGCATGGCATCGTCTTTGGT		

1.2 试验方法

1.2.1 JSRV *env* 目的基因检测

TRIzol 法提取各肺组织样品总 RNA,并测定其浓度和纯度,吸光光度值 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0。使用表 1 中的 JSRV *env* 引物,参照反转录试剂盒说明书加入 1 μ g RNA 样品,补齐 ddH₂O 到 8 μ L 混合,65 $^{\circ}$ C 5 min 后迅速冰浴 2 min 以变性 RNA 模板;在上一步液体中加入 2 μ L 5 $\times$ gRNA wiper Mix 混合后 42 $^{\circ}$ C 温育 2 min,以去除基因组 DNA;再在上一步的反应液中各加入 2 μ L 10 $\times$ RT Mix 和 HiScript III Enzyme Mix、1 μ L Oligo(dT) 20VN、5 μ L ddH₂O,混合后 37 $^{\circ}$ C 温育 45 min,85 $^{\circ}$ C 加热 5 s 进行反转录,并对获得的 cDNA 进行浓度和纯度检测,吸光光度值 OD_{260}/OD_{280} 为 1.7~1.9;最后将 12.5 μ L 2 $\times$ Phanta Flash Master Mix(Dye Plus),1 μ g cDNA、2 μ L 上下游引物(10 μ mol/L)及加入 ddH₂O 补齐 25 μ L 混合后进行 PCR 扩增,反应程序为:98 $^{\circ}$ C 30 s;98 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 5 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 1 min。扩增产物进行电泳分析。

1.2.2 病理组织切片制作与 HE 染色

肺组织样品置于 10% 福尔马林溶液中固定 48 h 后,对组织块进行修整至两端平整,在新的 10% 福尔马林溶液继续固定 24 h,固定后的组织块用流动的自来水过夜冲洗。经不同浓度乙醇梯度脱水处理,二甲苯透明,浸蜡和包埋后,按 4 μ m 厚度制作石蜡切片,经苏木素-伊红染色后进行封片处理,在光学显微镜下观察病理组织学变化。

1.2.3 免疫组织化学检测

对 1.2.2 制成的组织石蜡块按 4 μ m 厚度进行切片,经过二甲苯脱蜡、不同浓度乙醇梯度复水后,柠檬酸钠抗原修复液进行抗原修复,内源性过氧化物酶阻断剂处理,PBST 清洗、山羊血清室温封闭,结束后放入 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育 JSRV Env 抗体(1:700),阴性对照使用正常山羊血清代替。PBST 清洗后,避光孵育生物素标记山羊抗兔 IgG,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,PBST 清洗后,DAPI 避光孵育 10 min。PBST 清洗后复染、反蓝、脱水、透明后中性树胶封片后镜下观察。

1.2.4 透射电镜观察绵羊肺组织线粒体微观变化

肺组织经 2.5% 电镜专用戊二醛溶液固定 3 h,用 0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗 3 次后,经过 0.1 mol/L PBS 配制的 1% 锇酸避光室温固定 2 h,再次漂洗 3 次。再经脱水漂洗、渗透、包埋、聚合、超

薄片切片后使用 2% 醋酸铀-枸橼酸铅进行双染色。透射电子显微镜下观察,采集图像进行分析。

1.2.5 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)检测

按照动物全蛋白提取试剂盒和胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒,分别制备 6 只绵羊肺组织总蛋白和线粒体蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,各取 20 μ g 蛋白于 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,完毕后湿转至 PVDF 膜,电泳恒流 380 mA 50 min,然后用含 5% 脱脂乳的 TBST 室温封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜 5 次,每次 10 min;加入 β -actin(1:20 000)、TOMM20(1:2 000)、TIMM23(1:1 000)、HSP60(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)、Beclin1(1:1 000)、p62(1:5 000)、LC3(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 5 次,每次 10 min, β -actin 用 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:5 000),其余抗体均用 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 5 次,每次 10 min,使用 ECL 发光液对条带进行显色。重复 3 次后使用 Image-ProPlus 6.0 软件对条带进行光密度分析并保存。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测线粒体基因表达量

按 1.2.1 方法提取细胞总 RNA 后,使用表 1 中 β -actin、TOMM20、TIMM23、HSP60 定量检测引物,反应体系:模板 cDNA 2 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,荧光染料 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L,ddH₂O 补至 20 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,组内设 2 个重复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 解析法进行基因相对含量的计算,具体计算公式如下: $\Delta\Delta Ct = (\text{待测样本 Ct 值} - \text{对照样本 Ct 值}) - (\text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值})$ 。

2 结果与分析

2.1 自然感染 JSRV 羊肺组织的病理学观察

2.1.1 绵羊肺组织 JSRV *env* PCR 鉴定

JSRV *env* 基因 PCR 扩增产物的凝胶电泳检测结果如图 1 所示。从绵羊肺组织中提取 RNA,经反转录成 cDNA 后,对 JSRV *env* 基因进行 PCR 扩增,阳性对照和 4、5、6 号待测样品在 1 848 bp 处可见特异性条带,而阴性对照、空白对照和 1、2、3 号待测样品未出现任何条带。此结果表明采集的 6 份绵羊肺组织中,3 份为自然感染 JSRV 组织,3 份为未感染

JSRV 的健康组织。

2.1.2 自然感染 JSRV 羊肺组织病理学检测

如图 2 所示,肺组织病理组织切片 HE 染色结果显示,健康组肺泡上皮细胞排列均匀,肺泡边缘

整齐、结构完整。自然感染 JSRV 组患羊肺泡 II 型上皮细胞肿瘤化增殖,主要以立方或柱状排列,呈乳头状生长伸入肺泡腔内(黑色箭头),大量肺泡塌陷、融合,并形成弥漫性增生性腺瘤灶。

2.1.3 自然感染 JSRV 羊肺免疫组织化学检测

如图 3 所示,免疫组织化学结果显示,JSRV Env 在自然感染 JSRV 羊肺组织的肿瘤细胞中大量表达,棕黄色的阳性信号主要定位于靠近肺泡腔增生的肺泡 II 型上皮细胞中,而使用正常山羊血清替代一抗的阴性对照未显示任何阳性信号。

2.2 肺组织超微结构观察

透射电镜观察可见,自然感染 JSRV 羊肺组织与健康组相比,线粒体数量显著减少($P<0.05$)(图 4);健康组线粒体形态和结构都较为正常,而自然感染 JSRV 组线粒体出现空泡、肿胀、嵴变少现象(图 5);自然感染 JSRV 组内质网可见明显增宽,出现包裹受损线粒体的双层膜线粒体自噬体结构(图 6)。

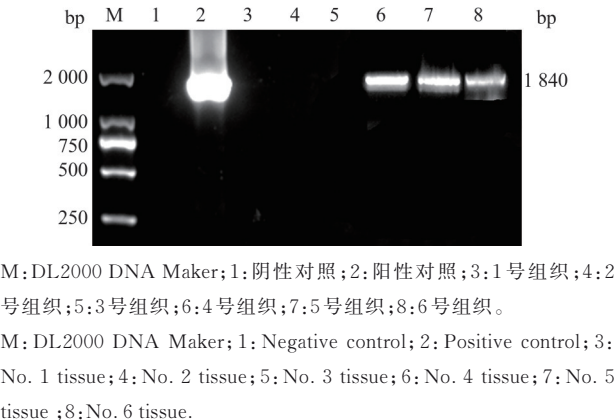
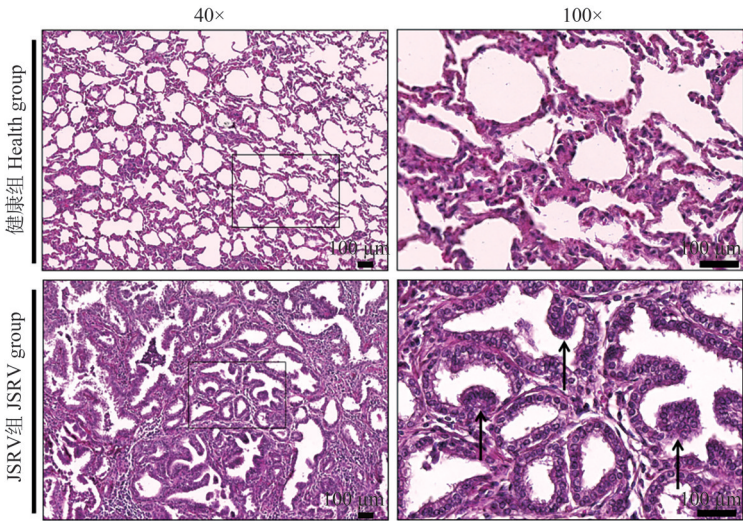


图 1 绵羊肺组织 JSRV env PCR 鉴定
Fig. 1 JSRV env PCR identification of sheep lung tissues



箭头指示为腺瘤灶内增生的肺泡 II 型上皮细胞。
Arrows indicate the proliferation of type II alveolar epithelial cells in the adenoma.

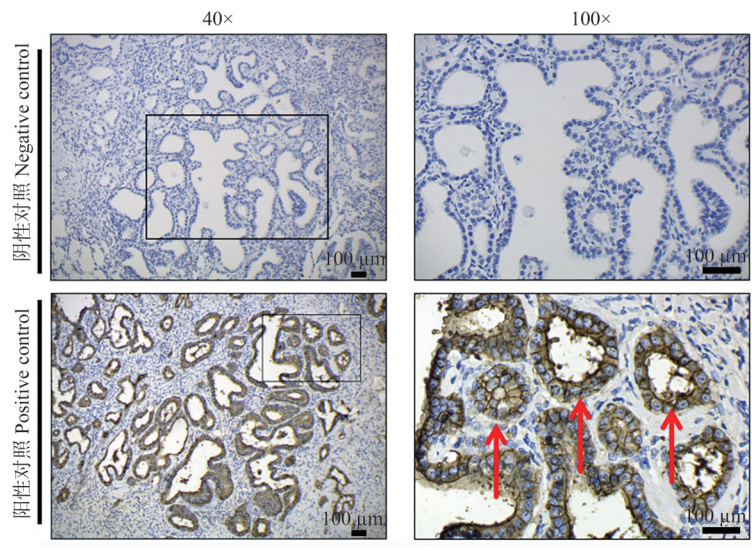
图 2 绵羊肺组织病理组织学变化
Fig. 2 Histopathological change of sheep lung tissues

2.3 自然感染 JSRV 患羊肺组织中线粒体相关因子相对表达量

如图 7 所示,与健康组相比,自然感染 JSRV 组肺组织中线粒体相关因子 TOMM20、TIMM23 和 HSP60 的 mRNA 和蛋白相对表达水平均极显著下调($P<0.01$),表明自然感染 JSRV 患羊肺组织中线粒体数量减少。

2.4 自然感染 JSRV 患羊肺组织中线粒体自噬相关因子蛋白相对表达量

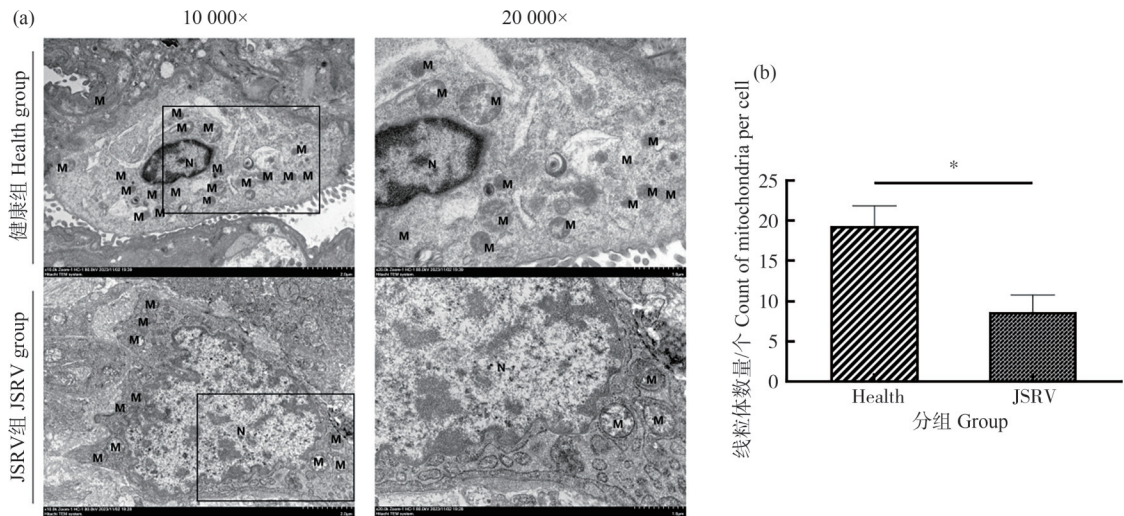
如图 8 所示,与健康组相比,自然感染 JSRV 组肺组织中线粒体自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 相对表达水平均显著上调($P<0.05$),p62 相对表达水平显著下调($P<0.05$),表明自然感染 JSRV 患羊肺组织中存在的线粒体自噬现象。



箭头指示为腺瘤灶内增生的肺泡II型上皮细胞
Arrows indicate the proliferation of type II alveolar epithelial cells in the adenoma

图3 自然感染JSRV绵羊肺组织JSRV Env表达定位

Fig. 3 Location of JSRV Env expression in lung tissues of naturally infected sheep with JSRV



(a)透射电镜下绵羊肺组织线粒体;(b)透射电镜视野下线粒体数量统计分析柱状图;N:细胞核;M:线粒体;** $P<0.01$

(a)Mitochondrias of sheep lung tissues under transmission electron microscope; (b)Histogram of quantitative statistical analysis of mitochondria in the field of transmission electron microscope; N: Cell nucleus; M: Mitochondria; ** $P<0.01$

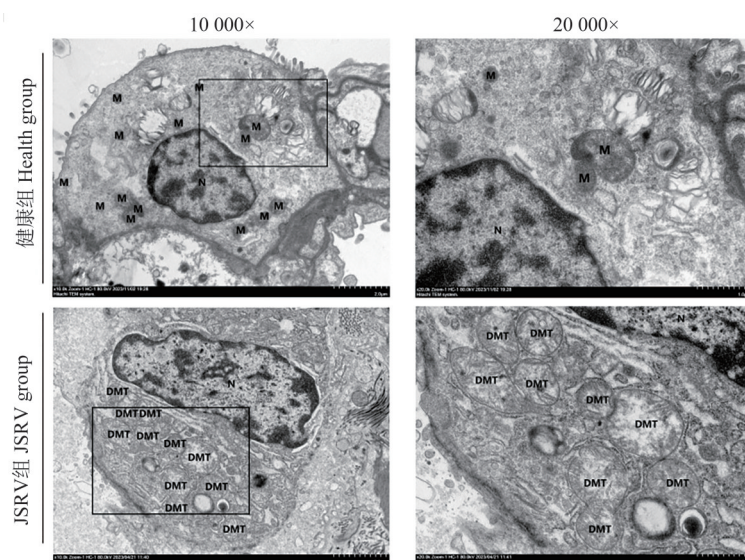
图4 透射电镜下绵羊肺组织线粒体数量观察

Fig. 4 Observation of mitochondrial quantity in sheep lung tissues under the transmission electron microscope

3 讨论

线粒体作为一种功能丰富的双膜细胞器,是真核细胞有氧呼吸的主要部位和细胞的能量供应站,包括三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)的产生、钙离子(Ca^{2+})的调节、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生和清除以及凋亡细胞的调节等。而细胞为了维持其内线粒体数量和质量的稳定,在生理条件下,损伤的线粒体可以与邻近的、完整的线粒

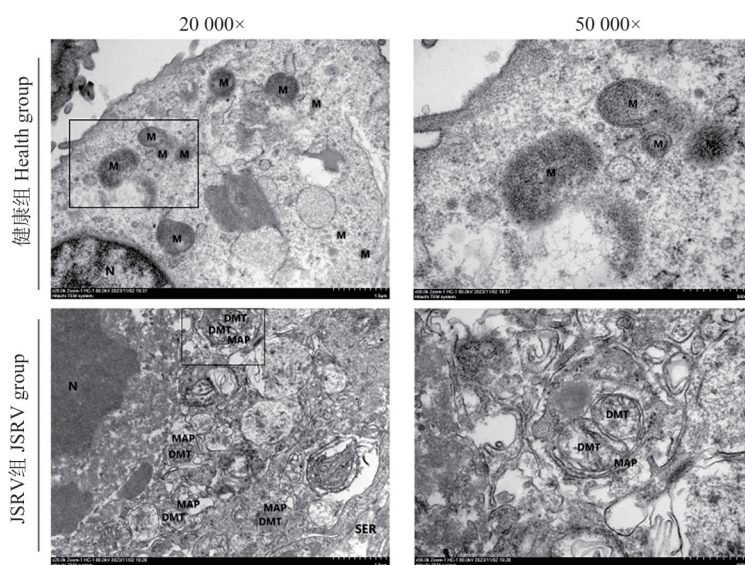
体进行融合,从而恢复其正常功能,而当线粒体受到营养缺乏、缺氧、DNA损伤、炎症、线粒体膜去极化等应激刺激导致线粒体损伤程度超过修复能力的时候,线粒体自噬被激活,受损的线粒体可通过线粒体自噬途径被细胞选择性清除,从而实现细胞内线粒体系统的更新与内环境的稳定^[10-11]。近年来线粒体功能相关研究表明^[12],线粒体对细胞内 Ca^{2+} 、ROS及自由基相对平衡也起着极其关键的调控作用。此外,线粒体还参与细胞其他生理过



N:细胞核;M:线粒体;DMT:受损线粒体
N:Cell nucleus; M:Mitochondria; DMT:Damaged mitochondria

图 5 透射电镜下绵羊肺组织线粒体形态观察

Fig. 5 Observation of mitochondrial morphology in sheep lung tissues under the transmission electron microscope



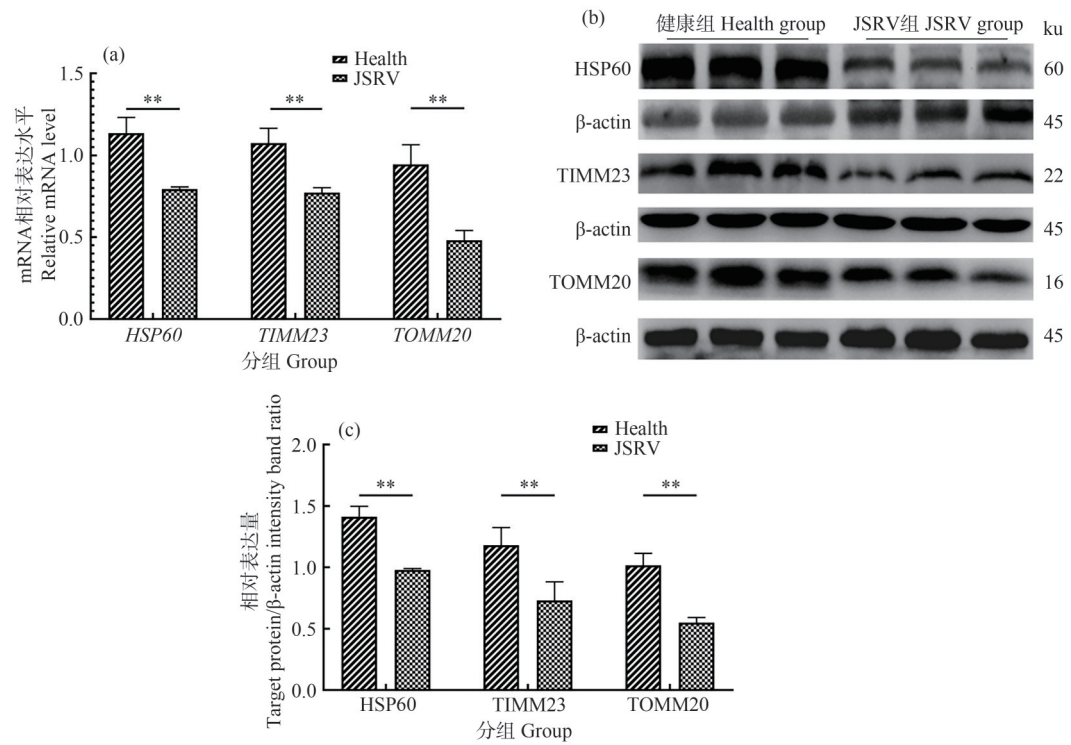
N:细胞核;DMT:受损线粒体;MAP:线粒体自噬体;RER:粗面内质网
N:Cell nucleus; DMT:Damaged mitochondria; MAP:Mitochondria autophagosome; RER:Rough endoplasmic reticulum

图 6 透射电镜下绵羊肺组织中线粒体自噬观察

Fig. 6 Observation of mitochondrial autophagy in lung tissues of sheep under the transmission electron microscope

程,例如信号传递、细胞分化和细胞死亡,调控细胞周期稳定和细胞生长。线粒体在产生 ATP 的同时产生了副产物 ROS,范智博等^[13]通过研究 ROS 在饥饿条件下诱导人牙周膜细胞线粒体自噬增强,并发现线粒体相关因子(TOMM20、TIMM23)转录和蛋白相对表达水平的差异。然而,不同类型、不同分期的肿瘤组织中 HSP60 的表达水平和作用有差异,例如在大肠癌^[14]中 HSP60 表达水平上调且与肿瘤分期呈正

相关,在支气管肺癌中 HSP60 表达下调与肿瘤分期呈负相关^[14]。本研究发现与健康样本相比,透射电镜下观察到自然感染 JSRV 病肺组织中线粒体形态结构损伤严重,线粒体相关因子 TOMM20、TIMM23 和 HSP60 的 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著下调。这些因子在正常细胞中负责线粒体膜蛋白运输和线粒体蛋白的正确折叠,下调可导致线粒体功能障碍,反映线粒体功能受损,进而触发线粒体自噬这种

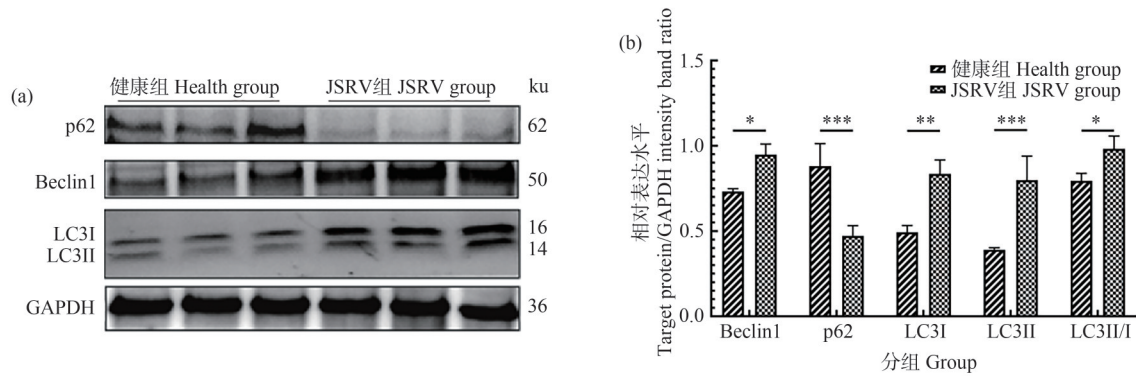


(a) 绵羊肺组织中线粒体相关因子 mRNA 相对表达量; (b) 绵羊肺组织中线粒体相关因子蛋白表达; (c) 绵羊肺组织中线粒体相关因子蛋白的相对表达分析。 ** $P < 0.01$ 。

(a) The relative expression of mitochondrial related factors mRNA in sheep lung tissues; (b) Mitochondrial related factors protein expression in sheep lung tissues; (c) Relative expression analysis of mitochondrial related factors protein in sheep lung tissues . ** $P < 0.01$ 。

图7 肺组织中的线粒体相关因子相对表达量检测

Fig. 7 Detection of relative expression of mitochondrial related factors in lung tissues



(a) 绵羊肺组织线粒体中自噬相关因子蛋白表达; (b) 绵羊肺组织线粒体中自噬相关因子蛋白的相对表达分析; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

(a) Autophagy relative factors protein expression in mitochondria of sheep lung tissues; (b) Relative expression analysis of autophagy relative factor protein in mitochondria of sheep lung tissues * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

图8 自噬相关因子在肺组织线粒体蛋白中的相对表达分析

Fig. 8 Analysis of relative expression of autophagy related factors in mitochondrial protein of lung tissues

补偿机制。

Beclin1 和 LC3 是自噬过程中的 2 个重要蛋白。Beclin1 作为自噬起始复合体中的组成部分,参与了自噬的启动和调控过程。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 *Atg8* 基因的同源物,LC3 定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,常作为自噬的特异性标志物,LC3 存在 I 型与 II 型 2 种不同分子质量形式;自噬未发生时,LC3 经过加工形成胞质可溶性 LC3I,而在发生自噬时,被修饰和加工的 LC3I 与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 共轭结合形成 LC3II; LC3II 定位在胞内自噬体膜上,作为哺乳动物自噬体的标记蛋白^[15]。LC3II/I 的比值与自噬强度成正比。

以上2种蛋白的共同作用是维持自噬的平衡,促进细胞内生物的降解和回收,而p62/SQSTM1作为一种选择性自噬受体,能够识别并将聚集的蛋白质和受损的细胞器运送至自噬体进行降解^[16]。Wu等^[17]研究发现在结、直肠癌组织中Beclin1和LC3的相对表达水平显著高于正常组织。本研究在透射电镜下观察到自然感染JSRV羊肺组织中出现线粒体自噬体,并对其肺组织线粒体蛋白利用WB对自噬相关因子Beclin1、LC3和p62检测发现其自噬水平上调。

在肿瘤细胞中,线粒体的功能和结构往往受到影响,出现线粒体功能障碍、线粒体DNA突变等损伤。这些损伤会引起细胞内的线粒体自噬,即将受损的线粒体通过自噬途径降解清除。研究表明,在肝癌、乳腺癌和直肠癌等常见的癌症中均发现线粒体功能障碍,线粒体自噬在肿瘤发生和发展过程中发挥重要作用^[18]。一方面,线粒体自噬可以促进肿瘤细胞的生存和增殖,因为通过清除受损的线粒体可以维持能量代谢和细胞呼吸;另一方面,线粒体自噬也可以抑制肿瘤发展,因为过多的受损线粒体可能会引发细胞凋亡、氧化应激等反应,从而增加肿瘤细胞损伤和死亡的风险。20世纪中期,线粒体相关研究取得了重大突破,特别是在肿瘤方面的研究。Warburg^[10]发现线粒体功能障碍是癌细胞的起源,线粒体的能源供应能力使它与肿瘤的发生发展以及其他生物学活性密切相关,这一发现对癌症代谢有了新的见解。此外,癌基因和肿瘤抑制基因中的突变,通过改变线粒体代谢途径促进癌症代谢重编程,而代谢重编程被认为是癌症的标志之一^[19]。肿瘤细胞的代谢活动与正常细胞显著不同,这种代谢重编程与肿瘤的生长、扩散以及对治疗的反应密切相关。

值得注意的是,病毒介导的肿瘤发生涉及多种细胞过程,包括细胞周期紊乱、炎症反应、遗传不稳定性和自噬等。特别是病毒感染对宿主细胞线粒体自噬的显著影响不容忽视^[20],由于病毒入侵机体导致细胞自我防御机制如线粒体自噬的启动,对功能失调的线粒体起到清除作用来维持细胞内环境的稳态。研究表明,不同病毒诱导线粒体自噬的机制各不相同。例如,某些病毒能通过激活线粒体自噬促进其生命周期中的关键步骤,如流感病毒能诱导线粒体自噬以帮助病毒的复制和传播^[21]。与其相对,如人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)^[22]可能通过抑制线粒体自噬来延缓宿主细胞的早期死亡,从而保证病毒颗粒的存活。与癌症发展直接相关的病毒,如人乳头瘤病毒(Human papilloma virus, HPV)、丙型

肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)、疱疹病毒(Epstein-barr virus, EBV)等,分别通过抑制或刺激自噬来实现病毒的免疫逃避,其中HBV和HCV已被发现可通过破坏线粒体动力学来促进线粒体自噬,调节线粒体稳态,导致感染的细胞凋亡减少。线粒体自噬通过靶向降解受损线粒体来维持细胞稳态,减弱病毒诱导的细胞凋亡,促进细胞存活,从而促进病毒持续存在,维持病毒致癌能力,促进肿瘤发生发展^[23-24]。

本研究发现自然感染JSRV羊肺组织中线粒体数量显著减少,且存在明显的损伤,伴随着线粒体自噬的现象,这表明线粒体自噬可能在绵羊肺腺瘤的发生发展中扮演者复杂的角色。这些发现为分析JSRV致病机制的研究提供了新的方向,例如探索线粒体自噬在肺腺瘤发生和发展中的具体作用,以及它如何与肿瘤细胞的代谢和生存机制相互作用。

4 结 论

JSRV感染绵羊肺组织后,引起线粒体数量显著减少且存在明显的损伤现象,线粒体中自噬因子活动增强,线粒体自噬被激活,可能以此达到保护病毒粒子不被消除的目的,具体作用机制还需深入研究。本研究为JSRV致病机制在线粒体自噬领域的研究奠定基础。

参考文献 References

- [1] Liu S L, Miller A D. Oncogenic transformation by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein[J]. *Oncogene*, 2007, 26(6): 789-801
- [2] 么宏强, 其木格, 马学恩. 绵羊肺腺瘤病自然病例肺组织的超微结构观察[J]. *电子显微学报*, 2006, 25(S1): 226
Yao H Q, Qi M G, Ma X E. Ultrastructural observation of lung tissue in natural cases of sheep lung adenomatosis[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2006, 25(S1): 226 (in Chinese)
- [3] Wootton S K, Halbert C L, Miller A D. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours[J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 904-907
- [4] Altomare D A, Testa J R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7455-7464
- [5] Degtyarev M, De Mazière A, Orr C, Lin J, Lee B B, Tien J Y, Prior W W, van Dijk S, Wu H, Gray D C, Davis D P, Stern H M, Murray L J, Hoeflich K P, Klumperman J, Friedman L S, Lin K. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 183(1): 101-116
- [6] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42
- [7] Obenaus J C, Cantley L C, Yaffe M B. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3635-3641
- [8] Xue Y, Ren J, Gao X J, Jin C J, Wen L P, Yao X B. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy[J]. *Molecular &*

- Cellular Proteomics*, 2008, 7(9):1598-1608
- [9] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: Navigating downstream[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-1274
- [10] Warbury O. The chemical construction of respiration ferment [J]. *Science*, 1928, 68(1767): 437-443
- [11] Chan D C. Mitochondrial fusion and fission in mammals [J]. *Annual review of cell and developmental biology*, 2006, 22:79 - 99
- [12] Paraiso K H T, Xiang Y, Rebecca V W, Abel E V, Chen Y A, Munko A C, Wood E, Fedorenko I V, Sondak V K, Anderson A R A, Ribas A, Palma M D, Nathanson K L, Koomen J M, Messina J L, Smalley K S M. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(7): 2750-2760
- [13] 范智博, 金珂, 李胜鸿, 徐洁, 徐晓梅. 饥饿条件下活性氧通过PINK1/Parkin 通路调控人牙周膜细胞的线粒体自噬[J]. *华西口腔医学杂志*, 2022, 40(6): 645-653
- Fan Z B, Jin K, Li S H, Xu J, Xu X M. Regulation of reactive oxygen species on the mitophagy autophagy of human periodontal ligament cells through the PINK1/Parkin pathway under starvation [J]. *West China Journal of Stomatology*, 2022, 40(6): 645-653 (in Chinese)
- [14] Wu J M, Liu T, Rios Z, Mei Q B, Lin X K, Cao S S. Heat shock proteins and cancer[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38(3), 226-256
- [15] 何韬, 王海杰, 谭玉珍. 自噬在细胞存活和死亡中的作用[J]. *生理科学进展*, 2008, 39(1): 37-40
- He T, Wang H J, Tan Y Z. The roles of autophagy in cell survival and cell death[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2008, 39(1): 37-40 (in Chinese)
- [16] Engelman J A, Luo J, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [J]. *Nature reviews. Genetics*, 7(8), 606-619
- [17] Wu S H, Sun C B, Tian D, Li Y Y, Gao X Q, He S, Li T Y. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(4): 3882-3891
- [18] 楚魏, 马洪月, 朴钟源, 宋琳, 何梓桦. 线粒体动力学对肿瘤、神经、心血管系统疾病的影响及中药干预[J]. *中医学报*, 2023, 9(11): 2274-2281
- Chu W, Ma H Y, Piao Z Y, Song L, He Z H. Effects of mitochondrial dynamics on tumors, neurological and cardiovascular diseases and research progress of Chinese medicine intervention [J]. *Acta Chinese Medicine*, 2023, 9(11): 2274-2281 (in Chinese)
- [19] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 144(5), 646-674
- [20] Boehm J S, Zhao J J, Yao J, Kim S Y, Firestein R, Dunn I F, Sjöström S K, Garraway L A, Weremowicz S, Richardson A L, Greulich H, Stewart C J, Mulvey L A, Shen R R, Ambrogio L, Hirozane-Kishikawa T, Hill D E, Vidal M, Meyerson M, Grenier J K, Hahn W C. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene[J]. *Cell*, 2007, 129(6): 1065-1079
- [21] Thoreen C C, Kang S A, Chang J W, Liu Q S, Zhang J M, Gao Y, Reichling L J, Sim T, Sabatini D M, Gray N S. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(12): 8023-8032
- [22] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326
- [23] Huang X Y, Li Dan, Chen Z X, Huang Y H, Gao W Y, Zheng B Y, Wang X Z. Hepatitis B virus X protein elevates Parkin-mediated mitophagy through lon peptidase in starvation [J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 368(1): 75-83
- [24] Vescovo T, Pagni B, Piacentini M, Fimia G M, Antonioli M. Regulation of autophagy in cells infected with oncogenic human viruses and its impact on cancer development[J]. *Frontiers In Cell and Developmental Biology*, 2020, 8(47): 1-16

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 梁浚哲, 内蒙古农业大学兽医学院硕士研究生, 主要从事动物生殖内分泌与病毒病理学研究, 获得内蒙古农业大学 2021—2022、2022—2023 学年硕士一等学业奖学金。



通讯作者简介: 刘淑英, 教授, 现任草原英才团队“羊疫病防控关键技术的集成创新与应用创新人才团队”和教育厅“牛羊疫病防控与发育工程创新团队”首席专家。兼任中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会和兽医病理生理专业委员会常务理事, 中国病理生理学会动物病理生理专业委员会委员。研究工作针对严重威胁我国种羊生产和养羊业发展的慢性呼吸道病毒性疫病-绵羊肺腺瘤病和梅迪-维斯纳病, 从流行病学、病原学、发病机理和特异性检测技术研发等方面展开系统的研究。作为主持人先后主持国家自然科学基金项目 8 项(面上 1 项、地区基金 7 项)以及主持其他项目共 16 项, 以第一作者或通讯作者共发表学术论文 85 篇。以第一作者完成发布 1 项检测技术的国家标准、1 项地方标准、授权 1 项国家发明专利, 作为主持人获首届内蒙古自然科学三等奖, 获第八届内蒙古青年科技奖; 参与编写“十三五”和“十二五”全国高等院校教材和专著共 8 部。