

UCP2 过表达对脓毒症大鼠心肌线粒体动力学的的影响

罗诗雨^{1,2} 李光素^{1,3} 耿争光¹ 陆钦菊⁴ 付豹⁴ 傅小云⁴

¹遵义医科大学 563000; ²贵阳市妇幼保健院 PICU 550003; ³贵州医科大学附属医院重症医学科, 贵阳 550025; ⁴遵义医科大学附属医院重症医学科 563003

通信作者: 傅小云, Email: fxycloudy@126.com

【摘要】 **目的** 探讨解耦联蛋白 2 (UCP2) 过表达对脓毒症大鼠心肌损伤线粒体动力学(线粒体分裂与融合)的影响。**方法** 按随机数字表法将 40 只雄性 SD 大鼠分为 4 组 ($n=10$): 假手术组 (Sham 组) 用生理盐水代替转染, 模拟盲肠结扎穿孔术 (CLP), 不予盲肠结扎、穿孔; CLP 组用生理盐水代替转染, 用 CLP 制备脓毒症模型; 单纯腺相关病毒转染组 (AAV 组) 经空病毒心肌转染后行 CLP; UCP2 过表达组 (UCP2 组) 经 AAV-UCP2 (1×10^{15} vg/L, 共 60 μ L) 心肌转染 3 周后行 CLP。术后 24 h 各组大鼠进行超声心动图检测; 随后立即处死大鼠取心肌组织, 电镜下观察心肌超微结构改变, 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测心肌线粒体动力学相关调控蛋白视神经萎缩因子 1 (Opa1)、动力素相关蛋白 1 (Drp1) 和分裂因子 1 (Fis1) 的表达, 用化学发光法检测心肌组织三磷酸腺苷 (ATP) 含量。**结果** ① 超声心动图结果显示: 4 组左心室质量 (LVM)、每搏量 (SV) 差异均无统计学意义。与 Sham 组比较, CLP 组和 AAV 组左室舒张期末前壁厚度 (LVAWd)、左室收缩期末前壁厚度 (LVAWs)、左室舒张期末后壁厚度 (LVPWd)、左室收缩期末后壁厚度 (LVPWs)、左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS) 明显升高, 左室收缩期末内径 (LVEDs)、左室舒张期末内径 (LVEDd)、左室收缩期末容积 (LVESV)、左室舒张期末容积 (LVEDV) 明显降低。与 CLP 组和 AAV 组比较, UCP2 组 LVAWs、LVEF、LVFS 明显降低, LVEDs、LVEDV、LVESV 明显升高 [LVAWs (mm): 3.82 ± 0.42 比 4.34 ± 0.30 、 4.44 ± 0.12 , LVEF: 0.921 ± 0.038 比 0.979 ± 0.019 、 0.991 ± 0.010 , LVFS: (65.33 \pm 6.56)% 比 (80.11 \pm 8.23)%、(85.31 \pm 6.11)%, LVEDs (mm): 1.81 ± 0.36 比 0.89 ± 0.54 、 0.60 ± 0.17 , LVEDV (μ L): 137.09 ± 50.05 比 89.72 ± 53.04 、 85.42 ± 40.99 , LVESV (μ L): 10.48 ± 4.59 比 2.48 ± 3.52 、 2.58 ± 2.50 , 均 $P < 0.05$]。② 电镜下观察: Sham 组心肌纤维结构清晰, 排列整齐, 闰盘完整, 线粒体结构完整, 双膜无破损, 嵴排列紧密; CLP 组和 AAV 组心肌纤维断裂, 肌浆网扩张, 线粒体肿胀严重, 嵴结构紊乱; UCP2 组仅见心肌纤维水肿, 肌纤维结构较 CLP 组和 AAV 组完整, 线粒体轻肿胀, 嵴结构完整。③ Western Blot 结果显示: 4 组心肌组织中 Opa1、Fis1 蛋白表达水平差异均无统计学意义。与 Sham 组比较, CLP 组和 AAV 组 Drp1 蛋白表达水平明显升高; UCP2 组 Drp1 蛋白表达水平明显低于 CLP 组和 AAV 组 (Drp1/ β -actin: 1.01 ± 0.03 比 1.39 ± 0.03 、 1.49 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$)。④ 免疫荧光染色显示: CLP 组和 AAV 组心肌组织 ATP 含量较 Sham 组显著减少; UCP2 组心肌组织 ATP 含量明显高于 CLP 组和 AAV 组 (μ mol/L: 1.99 ± 0.15 比 1.10 ± 0.17 、 1.13 ± 0.19 , 均 $P < 0.05$)。**结论** UCP2 过表达可明显改善脓毒症大鼠心肌收缩功能, 保护心肌线粒体超微结构, 抑制线粒体分裂, 改善心肌线粒体 ATP 合成。

【关键词】 脓毒症; 心肌损伤; 线粒体动力学; 解耦联蛋白 2; 过表达

基金项目: 国家自然科学基金 (81560308)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.018

Effects of uncoupling protein 2 overexpression on myocardial mitochondrial dynamics in sepsis rats

Luo Shiyu^{1,2}, Li Guangsu^{1,3}, Geng Zhengguang¹, Lu Qinju⁴, Fu Bao⁴, Fu Xiaoyun⁴

¹Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; ²Department of PICU, Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China; ³Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; ⁴Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China

Corresponding author: Fu Xiaoyun, Email: fxycloudy@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of uncoupling protein 2 (UCP2) overexpression on mitochondrial dynamics (mitochondrial division and fusion) of sepsis myocardial injury in rats. **Methods** Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups ($n = 10$): sham operation group (Sham group) using normal saline instead of transfection and simulating cecal ligation and perforation (CLP); CLP group using normal saline instead of transfection, performing CLP to induce sepsis; adeno-associated virus (AAV) group using CLP after myocardial transfection with empty virus; UCP2 overexpression group (UCP2 group) CLP was performed 3 weeks after AAV-UCP2 (1×10^{15} vg/L, a total of 60 μ L) myocardial transfection. The rats in each group were examined by echocardiography at 24 hours after the CLP, and then the rats were sacrificed immediately to harvest myocardial tissue. Myocardial ultrastructural changes were observed under the electron microscope, the expression of regulatory

proteins related to myocardial mitochondrial dynamics [optic atrophy 1 (Opa1), dynamin-related protein 1 (Drp1) and fission 1 (Fis1)] were detected by Western Blot, and the level of mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) production was detected by chemiluminescence. **Results** ① The echocardiographic results showed that there was no significant difference in left ventricular mass (LVM) and stroke volume (SV). Compared with Sham group, left ventricular diastolic anterior wall thickness (LVAWd), left ventricular systolic anterior wall thickness (LVAWs), left ventricular diastolic posterior wall thickness (LVPWd), left ventricular systolic posterior wall thickness (LVPWs), left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) were significantly increased in CLP group and AAV group, while left ventricular systolic diameter (LVEDs), left ventricular diastolic diameter (LVEDd), left ventricular end-systolic volume (LVESV), and left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) were significantly decreased. Compared with CLP group and AAV group, LVAWs, LVEF, LVFS were significantly decreased in UCP2 group, and LVEDs, LVEDV and LVESV were significantly increased [LVAWs (mm): 3.82 ± 0.42 vs. 4.34 ± 0.30 , 4.44 ± 0.12 ; LVEF: 0.921 ± 0.038 vs. 0.979 ± 0.019 , 0.991 ± 0.010 ; LVFS: $(65.33 \pm 6.56)\%$ vs. $(80.11 \pm 8.23)\%$, $(85.31 \pm 6.11)\%$; LVEDs (mm): 1.81 ± 0.36 vs. 0.89 ± 0.54 , 0.60 ± 0.17 ; LVEDV (μL): 137.09 ± 50.05 vs. 89.72 ± 53.04 , 85.42 ± 40.99 ; LVESV (μL): 10.48 ± 4.59 vs. 2.48 ± 3.52 , 2.58 ± 2.50 , all $P < 0.05$]. ② Electron microscope showed that the structure of myocardial fibers in the Sham group was clear and aligned with complete intervertebral disc and mitochondrial structure, no damage to mitochondrial membranes, and tight arrangement of cristae. In CLP group and AAV group, muscle fiber breakage, sarcoplasmic reticulum expansion, severe mitochondrial swelling and even cristae structure disorder were observed. In the UCP2 group, only myocardial fiber edema was observed, and the muscle fiber structure was more complete than that of Sham group and AAV group. The mitochondria were slightly swollen and the cristae were intact. ③ Western Blot showed that there was no significant difference in the expression of Opa1 and Fis1 in the four groups. The expression of Drp1 in CLP group and AAV group were significantly higher than that in Sham group. The expression of Drp1 in UCP2 group was significantly lower than that in CLP group and AAV group (Drp1/ β -actin: 1.01 ± 0.03 vs. 1.39 ± 0.03 , 1.49 ± 0.03 , both $P < 0.05$). ④ The results of immunofluorescence showed that the ATP content of CLP group and AAV group were significantly lower than that of Sham group; the ATP content of UCP2 group was significantly higher than that of CLP group and AAV group ($\mu\text{mol/L}$: 1.99 ± 0.15 vs. 1.10 ± 0.17 , 1.13 ± 0.19 , both $P < 0.05$). **Conclusion** UCP2 overexpression can significantly improve the systemic systolic function of myocardium in sepsis rats, protect myocardial mitochondrial ultrastructure, inhibit mitochondrial division, and improve mitochondrial ATP synthesis.

【Key words】 Sepsis; Myocardial injury; Mitochondrial dynamics; Uncoupling protein 2; Overexpression

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560308)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.018

脓毒症是机体对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍,是重症医学科(ICU)患者最常见的死亡原因之一^[1],其中60%的脓毒症患者会出现心肌功能障碍^[2-3]。心肌细胞线粒体超微结构改变及功能损伤参与了脓毒症心肌损伤的机制^[4],因此,脓毒症时保存心肌线粒体结构和功能对改善心肌损伤有重要意义。本课题组前期研究显示,线粒体内膜的解耦联蛋白2(UCP2)过表达可通过减少心肌细胞线粒体超氧炫减轻脂多糖(LPS)诱导的心肌细胞损伤^[5]。本研究拟探讨UCP2过表达对脓毒症心肌线粒体动力学(线粒体分裂与融合)的影响,以进一步阐明UCP2过表达对脓毒症心肌损伤时线粒体功能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物:健康雄性SD大鼠,体重100~120g,由长沙天勤生物技术公司提供,动物合格证号:SCXK(湘)2007-0005。

1.2 实验动物分组及处理:按随机数字表法将大鼠分为4组,每组10只。①假手术组(Sham组):行转染手术,转染以等量生理盐水代替,模拟盲肠结扎

盲肠穿孔术(CLP),不予盲肠结扎及穿孔,术毕还纳盲肠,关腹。②CLP组:转染手术,转染以等量生理盐水代替,建立CLP致脓毒症模型。③单纯腺相关病毒转染组(AAV组):行空病毒心肌转染,无目的基因表达,建立CLP致脓毒症模型。④UCP2过表达组(UCP2组):行AAV-UCP2心肌转染,3周后建立CLP致脓毒症模型。

1.2.1 大鼠心肌转染模型建立^[6]:以10%水合氯醛(30mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,气管插管连接呼吸机;开胸暴露心脏,在心尖部选择6个位点,用30号针头注射AAV-UCP2(滴度为 1×10^{15} vg/L),各10 μL ,共60 μL 。撤除开胸器,充分膨胀肺,排尽胸腔积血积气,缝合肌肉后缝皮。肌肉注射100kU青霉素,连续3d,预防感染。观察呼吸、心跳,稳定后拔管。于3周冰冻切片,荧光显微镜下观察UCP2阳性表达,以蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)验证UCP2的表达水平,获得最佳心脏转染模型。

1.2.2 CLP致脓毒症大鼠模型建立^[7]:大鼠禁食12h,不禁饮。以10%水合氯醛(30mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,沿中下腹正中线作1.5cm切口以暴露

盲肠, 尽量避开肠系膜血管, 并在盲肠末端用 4-0 丝线结扎(约占盲肠总长的 50% 肠段), 然后用 18 G 无菌针头贯穿结扎段盲肠 2 次, 轻轻挤出少量肠内容物, 还纳盲肠, 逐层缝合后腹腔注射生理盐水 (30 mg/kg)。术后自由进食水。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并经遵义医科大学附属医院伦理委员会审批(审批号: 201601)。

1.3 检测指标及方法: CLP 制模后 24 h 行超声心动图观察各组大鼠心功能变化; 随后立即处死大鼠取心肌备检。

1.3.1 超声心动图检查脓毒症大鼠心功能: 使用 VisualSonics Vevo 2100 成像系统心动超声仪, MS400 探头, 频率 18~38 MHz。取胸骨旁左室长轴切面和胸骨旁左室短轴切面行 M 型超声检查。记录左室收缩期末前壁厚度(LVAWs)、左室舒张期末前壁厚度(LVAWd)、左室收缩期末内径(LVEDs)、左室舒张期末内径(LVEDd)、左室收缩期末后壁厚度(LVPWs)、左室舒张期末后壁厚度(LVPWd)、左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、左心室质量(LVM)、左室收缩期末容积(LVESV)、左室舒张期末容积(LVEDV); 计算每搏量(SV), $SV = LVEDV - LVESV$ 。

1.3.2 心肌线粒体超微结构观察: 取心肌组织, 切成约 1 mm×1 mm×1 mm 的组织块, 于 3% 戊二醛溶液中固定, 4℃ 储存。1% 四氧化锇后固定, 醋酸铀块染、包埋、切片, 电镜下观察超微结构改变。

1.3.3 Western Blot 检测心肌组织 UCP2 以及心肌线粒体动力学相关调控蛋白表达: 分离、纯化心肌

组织后, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性后, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜; 封闭后加入 UCP2、视神经萎缩因子 1(Opa1)、动力素相关蛋白 1(Drp1) 及分裂因子 1(Fis1) 一抗工作液(均购自美国 Abcam 公司) 4℃ 孵育过夜; 加入荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗工作液室温避光孵育 1 h, 上机检测。使用 Image J 图像软件测定各条带灰度值, 以目的条带与内参 β -肌动蛋白(β -actin)的灰度值比值作为蛋白表达量。

1.3.4 心肌组织三磷酸腺苷(ATP)含量检测: 采用化学发光法, 使用多功能酶标仪检测心肌组织 ATP 含量。

1.4 统计学分析: 用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行统计分析。所有数据均呈正态分布, 以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心肌 UCP2 转染情况(图 1): 行 AAV-UCP2 心肌转染后 3 周, 观察到心肌组织呈绿色荧光的 UCP2 阳性表达。Western Blot 结果显示, CLP 组、AAV 组 UCP2 蛋白表达量高于 Sham 组(均 $P < 0.05$); UCP2 组 UCP2 蛋白表达量显著高于其余 3 组(均 $P < 0.05$)。说明 UCP2 过表达模型成功建立。

2.2 UCP2 过表达对脓毒症大鼠心功能的影响(表 1): 超声心动图结果显示, 4 组大鼠 LVM、SV 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与 Sham 组相比, CLP 组和 AAV 组 LVAWd、LVAWs、LVPWd、LVPWs、LVEF、LVFS 均明显升高, LVEDd、LVEDs、LVEDV、LVESV

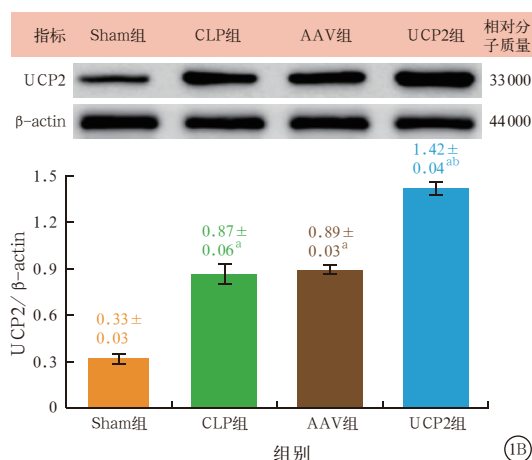
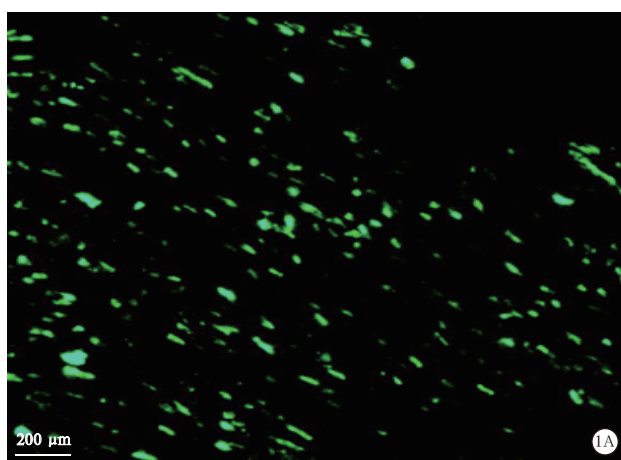


图 1 大鼠心肌解耦联蛋白 2(UCP2)腺相关病毒转染情况 A 为荧光显微镜下观察 UCP2 转染成功, 绿色荧光代表 UCP2 阳性表达。B 为蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌组织 UCP2 蛋白表达, Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组, AAV 组为单纯腺相关病毒转染组, UCP2 组为 UCP2 过表达组, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CLP 组和 AAV 组比较, ^b $P < 0.05$

表1 各组大鼠超声心动图各指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVAWd(mm)	LVAWs(mm)	LVPWd(mm)	LVPWs(mm)	LVEDd(mm)	LVEDs(mm)
Sham组	10	2.16±0.22	3.14±0.13	2.51±0.36	3.43±0.49	5.84±0.49	2.83±0.38
CLP组	10	2.83±0.34 ^a	4.34±0.30 ^a	3.26±0.45 ^a	4.41±0.23 ^a	4.33±1.03 ^a	0.89±0.54 ^a
AAV组	10	2.86±0.18 ^a	4.44±0.12 ^a	3.19±0.27 ^a	4.68±0.39 ^a	4.27±0.89 ^a	0.60±0.17 ^a
UCP2组	10	2.54±0.46	3.82±0.42 ^{ab}	2.92±0.36	4.38±0.20	5.26±0.86	1.81±0.36 ^{ab}

组别	动物数(只)	LVEF	LVFS(%)	LVM(mg)	LVEDV(μL)	LVESV(μL)	SV(μL)
Sham组	10	0.852±0.028	55.31±3.36	851.61±151.02	177.90±27.66	26.66±8.12	151.24±21.50
CLP组	10	0.979±0.019 ^a	80.11±8.23 ^a	878.85±74.48	89.72±53.04 ^a	2.48±3.52 ^a	87.24±49.73
AAV组	10	0.991±0.010 ^a	85.31±6.11 ^a	861.20±112.02	85.42±40.99 ^a	2.58±2.50 ^a	84.85±41.22
UCP2组	10	0.921±0.038 ^{ab}	65.33±6.56 ^{ab}	909.03±87.10	137.09±50.05 ^b	10.48±4.59 ^{ab}	126.62±47.86

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组,AAV组为单纯腺相关病毒转染组,UCP2组为解耦联蛋白2过表达组;LVAWd为左室舒张期末前壁厚度,LVAWs为左室收缩期末前壁厚度,LVPWd为左室舒张期末后壁厚度,LVPWs为左室收缩期末后壁厚度,LVEDd为左室舒张期末内径,LVEDs为左室收缩期末内径,LVEF为左室射血分数,LVFS为左室短轴缩短率,LVM为左心室质量,LVEDV为左室舒张期末容积,LVESV为左室收缩期末容积,SV为每搏量;与Sham组比较,^a*P*<0.05;与CLP组和AAV组比较,^b*P*<0.05

均明显降低(均*P*<0.05);与CLP组和AAV组相比,UCP2组LVAWs、LVEF、LVFS均显著降低,LVEDs、LVEDV、LVESV均明显升高(均*P*<0.05)。说明脓毒症能导致大鼠心脏功能损伤;而过表达UCP2能在一定程度上改善脓毒症大鼠心脏收缩功能,并部分缓解LVEDV的降低。

2.3 各组心肌线粒体超微结构改变(图2):Sham组心肌结构清晰,心肌纤维排列整齐,闰盘完整,线粒体结构完整,双膜无破损,嵴排列紧密。CLP组和AAV组肌纤维断裂,肌浆网扩张,线粒体肿胀严重,可见嵴结构紊乱。UCP2组仅观察到心肌纤维水肿,肌纤维结构较CLP组和AAV组完整,线粒体轻度肿胀,嵴结构完整。

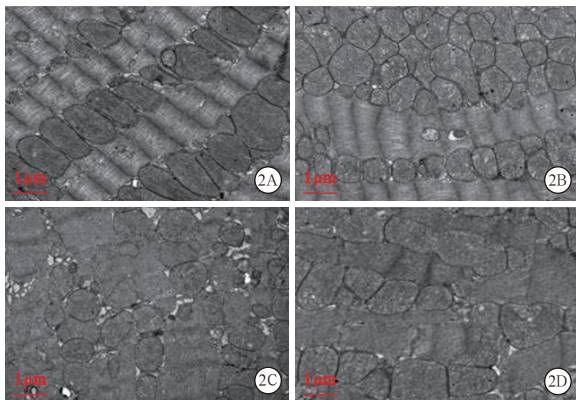
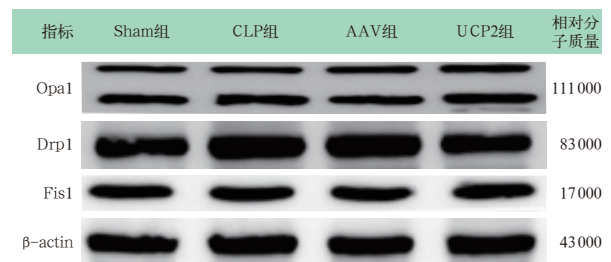


图2 电镜下观察各组大鼠心肌线粒体超微结构改变 假手术组(Sham组,A)心肌线粒体排列紧密,结构完整;盲肠结扎穿孔术致脓毒症组(CLP组,B)心肌线粒体严重肿胀;单纯腺相关病毒转染组(AAV组,C)肌浆网扩张,线粒体肿胀严重;解耦联蛋白2过表达组(UCP2组,D)线粒体轻度肿胀 醋酸铀块染 ×15000

2.4 UCP2过表达对脓毒症大鼠心肌线粒体动力学相关调控蛋白表达的影响(图3;表2):4组大鼠心肌组织中Opa1、Fis1蛋白表达水平差异无统计学意义(均*P*>0.05)。CLP组和AAV组Drp1蛋白表

达水平较Sham组明显升高(均*P*<0.05);UCP2组Drp1蛋白表达水平较CLP组和AAV组明显降低(均*P*<0.05)。说明UCP2过表达能通过降低心肌组织Drp1的表达,进而调控线粒体动力学。



Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组,AAV组为单纯腺相关病毒转染组,UCP2组为解耦联蛋白2过表达组;Opa1为视神经萎缩因子1,Drp1为动力素相关蛋白1,Fis1为分裂因子1,β-actin为β-肌动蛋白

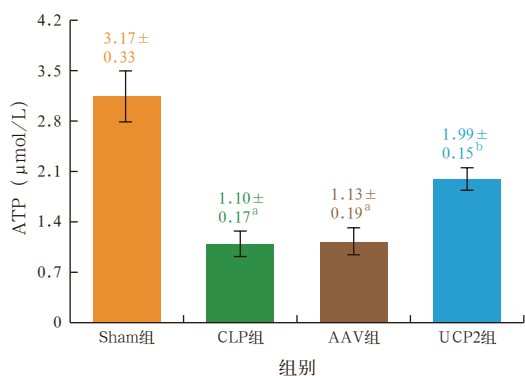
图3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌线粒体动力学相关调控蛋白表达

表2 各组大鼠心肌线粒体动力学相关调控蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Opa1/ β-actin	Drp1/ β-actin	Fis1/ β-actin
Sham组	10	0.22±0.15	1.07±0.02	0.89±0.12
CLP组	10	0.23±0.11	1.39±0.03 ^a	0.88±0.11
AAV组	10	0.24±0.05	1.49±0.03 ^a	0.87±0.12
UCP2组	10	0.25±0.05	1.01±0.03 ^b	0.89±0.14

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组,AAV组为单纯腺相关病毒转染组,UCP2组为解耦联蛋白2过表达组;Opa1为视神经萎缩因子1,β-actin为β-肌动蛋白,Drp1为动力素相关蛋白1,Fis1为分裂因子1;与Sham组比较,^a*P*<0.05;与CLP组和AAV组比较,^b*P*<0.05

2.5 UCP2过表达对脓毒症大鼠心肌组织ATP含量的影响(图4):与Sham组相比,CLP组和AAV组心肌组织ATP含量显著减少(均*P*<0.05);UCP2组心肌组织ATP含量较Sham组和AAV组明显增多(均*P*<0.05)。



注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症组, AAV 组为单纯腺相关病毒转染组, UCP2 组为解耦联蛋白 2 过表达组; ATP 为三磷酸腺苷; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CLP 组和 AAV 组比较, ^b $P < 0.05$

图4 各组大鼠心肌组织 ATP 水平比较

3 讨论

脓毒症继发心肌损伤在宏观上表现为心肌作能力下降,微观上则以心肌线粒体功能障碍导致能量供应不足为其底层病理生理机制之一。线粒体功能障碍和活性氧(ROS)产生增加已被认为是脓毒症心肌损伤的关键因素^[8]。线粒体功能障碍涉及线粒体结构、功能和数量的变化,改变电子传递链,并导致线粒体 ATP 减少,最终导致细胞凋亡^[9]。而且,当线粒体功能障碍持续时能产生过量的 ROS, ROS 诱导的氧化应激加速线粒体功能障碍,形成线粒体损伤—ROS—线粒体损伤的恶性循环,从而加重脓毒症心肌损伤^[10]。UCP2 是线粒体内膜的解耦联蛋白,本课题组前期研究显示,其适度过表达可通过减少线粒体呼吸链的电子漏从而减少超氧自由基的产生,维护线粒体的功能^[5]。本研究进一步探讨 UCP2 过表达的下游保护机制,观察 UCP2 过表达对脓毒症心肌损伤线粒体动力学的改变及影响。

本研究显示,脓毒症大鼠早期心肌损伤表现为 LVEF、LVFS 升高,与大多文献报道的建立脓毒症模型后 LVEF 降低不一致^[11-12]。目前, LVEF 下降多作为评估脓毒症心肌抑制的标准,但在脓毒症早期,由于外周阻力的下降, LVEF 可以正常或者轻度增加^[13-14]。诸多研究表明, CLP 致脓毒症早期心肌损伤后可出现 LVEF 显著上升^[15],与本研究结果一致,即制模后 LVEF 增加, LVEDV 下降。

电镜结果也支持脓毒症心肌损伤在 LVEF 增加时已经发生,电镜下观察显示: CLP 组和 AAV 组肌纤维断裂,肌浆网扩张,线粒体肿胀严重,甚至可观察到嵴结构紊乱; UCP2 过表达组也可见肌纤维水肿及线粒体肿胀,但形态及结构的完整性得到了较

好的保护。表明在脓毒症初期,心肌细胞超微结构已开始损伤;而 UCP2 过表达可对脓毒症时心肌线粒体形态结构完整性发挥保护效应。脓症患者可能会出现“低动力”循环状态,伴随左心室扩张和 LVEF 降低;也可出现“高动力”循环状态,其特征是动脉张力降低、心动过速、LVEF 增加^[16]。本研究中心脏超声结果显示,脓毒症心肌损伤模型大鼠可能处于“高动力”循环状态,代偿性地收缩功能增强,进而保证心排量,而此时心肌损伤已开始出现。

本研究结果显示,脓毒症心肌损伤大鼠心室壁厚度明显增加,这可能与炎症反应、毛细血管渗漏导致心肌水肿有关,可继发左心室的顺应性下降、心脏舒张功能减退;而在 UCP2 过表达后, LVEDs、LVESV 得到一定程度的改善,进而 LVEF 得到一定程度的恢复。这种效应可能归因于 UCP2 过表达,减少 ROS 的产生,同时维持线粒体 ATP 合成及生物修复功能,为心肌提供足够的能量,使处于高氧耗状态下的心脏功能得以恢复^[17]。

线粒体是高度活跃的细胞器,通过不断发生的分裂和融合形成细胞内管泡状网络,这种分裂和融合相辅相成,线粒体的形态和功能通过分裂与融合得到精细的调节,这种动态变化称为线粒体动力学。线粒体动力学是在线粒体中持续发生且极为重要的病理生理学事件,线粒体的分裂和融合可调节线粒体的能量合成以应对不同应激状态下心肌细胞的能量需求,从而在宏观上维持心脏收缩功能的能量需求。脓毒症时心肌细胞线粒体动力学的动态变化规律及调节机制目前还不清楚。既往研究表明,在哺乳动物体内介导线粒体融合分子包括:线粒体融合蛋白 1(Mfn1)、线粒体融合蛋白 2(Mfn2)、Opa1;介导线粒体分裂的分子主要有 Drp1、Fis1 和线粒体分裂因子(Mff)^[18]。本研究显示,脓毒症大鼠心肌 Drp1 蛋白表达水平明显增加,但 Opa1、Fis1 蛋白表达水平无明显变化。Drp1 是一类三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白,经磷酸化、S-亚硝基化、泛素化及小分子泛素样修饰体翻译后调节,以对不同的应激产生响应。Drp1 表达增强可产生碎片化线粒体,影响线粒体电子传递链功能及三羧酸循环,从而导致 ATP 合成障碍^[19]。这可能表明,在脓毒症早期心肌损伤时线粒体分裂异常在线粒体功能障碍中发挥重要的作用。在 LPS 诱导的脓毒症心肌损伤中 Drp1 表达增加,引发线粒体分裂,甚至碎片化,最终使线粒体能量合成功能和激活线粒体凋亡;而

抑制线粒体分裂不仅能改善线粒体功能,而且有利于心肌细胞的存活^[20]。UCP2 过表达组心肌线粒体 Drp1 表达较 CLP 组和 AAV 组明显下降,这表明过表达 UCP2 可以调控线粒体动力学,减轻脓毒症时心肌线粒体的分裂和碎片化,促进心肌线粒体 ATP 能量合成,从而保护脓毒症损伤的心肌。通过检测各组心肌 ATP 含量,也间接证实了 UCP2 过表达通过减少线粒体分裂改善了线粒体能量合成。

综上,脓毒症在“高动力”循环状态,心肌损伤可能就已经发生,UCP2 过表达可明显改善脓毒症大鼠心肌整体收缩功能,保护心肌线粒体超微结构,抑制线粒体分裂,改善线粒体 ATP 合成。目前认为 UCP2 调控线粒体动力学机制可能与降低 ROS 产生有关,其详尽机制还有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, et al. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock [J]. Crit Care Med, 2008, 36 (6): 1701-1706. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318174db05.

[3] Tsolaki V, Makris D, Mantzarlis K, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: oxidative implications in the initiation and resolution of the damage [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 7393525. DOI: 10.1155/2017/7393525.

[4] 方翔,王锦权.脓毒性心肌病的线粒体机制[J].中华危重病急救医学,2018,30(2):189-192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.019.
Fang X, Wang JQ. Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of septic cardiomyopathy [J]. Chin Crit Care Med, 2018, 30 (2): 189-192. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.019.

[5] Chen W, Luo S, Xie P, et al. Overexpressed UCP2 regulates mitochondrial flashes and reverses lipopolysaccharide-induced cardiomyocytes injury [J]. Am J Transl Res, 2018, 10 (5): 1347-1356.

[6] Bryson TD, Gu X, Khalil RM, et al. Overexpression of prostaglandin

E2 EP4 receptor improves cardiac function after myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 118: 1-12. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.005.

[7] Li H, Xing Y, Yang D, et al. Alpha-1 adrenergic receptor agonist phenylephrine inhibits sepsis-induced cardiomyocyte apoptosis and cardiac dysfunction via activating ERK1/2 signal pathway [J]. Shock, 2019, 52 (1): 122-133. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001205.

[8] Palmieri V, Innocenti F, Guzzo A, et al. Left ventricular systolic longitudinal function as predictor of outcome in patients with sepsis [J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2015, 8 (11): e003865; discussion e003865. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003865.

[9] Lv X, Wang H. Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. Mil Med Res, 2016, 3: 30. DOI: 10.1186/s40779-016-0099-9.

[10] Liu YC, Yu MM, Shou ST, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1021. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01021.

[11] Xu X, Liu Q, He S, et al. Qiang-Xin 1 formula prevents sepsis-induced apoptosis in murine cardiomyocytes by suppressing endoplasmic reticulum- and mitochondria-associated pathways [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 818. DOI: 10.3389/fphar.2018.00818.

[12] Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. J Intensive Care, 2015, 3: 48. DOI: 10.1186/s40560-015-0112-5.

[13] Boissier F, Razazi K, Seemann A, et al. Left ventricular systolic dysfunction during septic shock: the role of loading conditions [J]. Intensive Care Med, 2017, 43 (5): 633-642. DOI: 10.1007/s00134-017-4698-z.

[14] Repessé X, Charron C, Vieillard-Baron A. Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock [J]. Crit Care, 2013, 17 (4): 164. DOI: 10.1186/cc12755.

[15] Fattahi F, Russell MW, Malan EA, et al. Harmful roles of TLR3 and TLR9 in cardiac dysfunction developing during polymicrobial sepsis [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 4302726. DOI: 10.1155/2018/4302726.

[16] Matkovich SJ, Al Khiami B, Efimov IR, et al. Widespread down-regulation of cardiac mitochondrial and sarcomeric genes in patients with sepsis [J]. Crit Care Med, 2017, 45 (3): 407-414. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002207.

[17] Tian XY, Ma S, Tse G, et al. Uncoupling protein 2 in cardiovascular health and disease [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1060. DOI: 10.3389/fphys.2018.01060.

[18] Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44 (6): 1725-1735. DOI: 10.1042/BST20160129.

[19] Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1201: 34-39. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x.

[20] Shirihai OS, Song M, Dorn GW 2nd. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy [J]. Circ Res, 2015, 116 (11): 1835-1849. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306374.

(收稿日期: 2019-09-19)

• 科研新闻速递 •

在严重创伤后早期预防性放置下腔静脉滤器：一项多中心随机对照试验

对于严重创伤且有抗凝禁忌的患者,发生肺栓塞或死亡的风险较高,目前尚不清楚在早期放置下腔静脉滤器能否降低此类患者发生肺栓塞或死亡的风险,为此,有学者进行了一项多中心随机对照试验。研究人员将 240 例严重创伤(损伤严重程度评分>15 分;评分范围 0~75 分,评分越高表明创伤越严重)且有抗凝禁忌的患者随机分为两组,一组在入院 72 h 内放置下腔静脉滤器(滤器组),另一组则不放置滤器(对照组)。主要评价指标为复合终点事件的发生率(入组 90 d 内出现有症状的肺栓塞或死亡);其他评价指标包括伤后 7 d 内没有接受过抗凝治疗且存活 7 d 以上的患者在 8~90 d 内有症状的肺栓塞发生率。所有患者在 2 周时均进行超声检查;对于符合预先设定标准的患者,还会进行肺动脉 CT 血管造影(CTA)检查。结果显示:患者中位年龄为 39 岁,损伤严重程度评分中位数为 27 分。早期置入下腔静脉滤器并不能降低症状性肺栓塞或死亡的风险[滤器组 13.9%,对照组 14.4%;风险比(HR)=0.99,95% 可信区间(95%CI)为 0.51~1.94,P=0.98]。滤器组和对照组分别有 46 例和 34 例患者在伤后 7 d 内未接受过抗凝治疗,其中滤器组无患者发生肺栓塞;对照组有 5 例患者发生肺栓塞(14.7%),其中 1 例患者死亡[肺栓塞的相对危险度(RR)=0,95%CI 为 0.00~0.55]。研究人员据此得出结论:在严重创伤后早期预防性放置下腔静脉滤器并不会降低患者 90 d 内症状性肺栓塞或死亡的风险。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》,2019,381(4):328-337