

过表达 LONP1 调节线粒体氧化应激减轻小鼠脓毒症心肌损伤

罗溪^{1,2} 赵珊² 耿争光¹ 付豹¹ 傅小云^{1,2}

¹遵义医科大学附属医院重症医学科,遵义 563003; ²贵州省麻醉与器官保护教育部重点实验室(培育),遵义 563003

通信作者:傅小云,Email:fxycloudy@126.com

【摘要】 目的 探讨线粒体离子肽酶-1 (LONP1) 过表达对脓毒症心肌损伤小鼠线粒体氧化应激的影响。**方法** 将 24 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠按随机数字表法分为正常对照组 (Control 组)、脓毒症模型组 (LPS 组)、腺相关病毒对照组 (AAV+LPS 组) 和 LONP1 过表达组 (LONP1+LPS 组), 每组 6 只。采用腹腔注射脂多糖 (LPS) 10 mg/kg 的方法建立脓毒症心肌损伤模型; Control 组腹腔注射等量生理盐水。制模前 3 周, Control 组和 LPS 组均经尾静脉注射等量生理盐水 100 μ L 行假转染; AAV+LPS 组经尾静脉注射不含 Lonp1 基因的腺相关病毒 (AAV) 溶液 100 μ L; LONP1+LPS 组经尾静脉注射靶向心肌携带 Lonp1 基因片段的 AAV (病毒滴度 1×10^{12} vg/mL) 溶液 100 μ L。其中, LONP1+LPS 组在病毒转染 3 周后经冰冻切片和蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 评估 Lonp1 基因过表达, 明确过表达成功后制模。建模 24 h 后, 通过小鼠活动、分泌物、大小便等表现结合心脏超声心动图、心肌组织苏木素-伊红 (HE) 染色等评估脓毒症心肌损伤模型建立情况; 采用二氢乙锭 (DHE) 法检测活性氧 (ROS) 产生情况; 采用相关试剂盒检测三磷酸腺苷 (ATP) 产生和线粒体膜电位变化, 线粒体氧化应激指标 [4-羟基壬烯酸 (4-HNE)、丙二醛 (MDA)、线粒体顺乌头酸酶 2 (mt-ACO2)] 变化, 以及心功能指标 [左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS)、左室收缩期末容积 (LVESV)、左室舒张期末容积 (LVEDV)]。**结果** 建模 24 h 后, 与 Control 组相比, LPS 组小鼠表现为嗜睡、立毛、口角和眼角分泌物增多、脓尿和稀便, LVEF 和 LVFS 均下降; HE 染色显示, LPS 组部分心肌纤维变性坏死, 排列紊乱, 可见炎症细胞浸润。冰冻切片后荧光显微镜下可见 LONP1+LPS 组病毒转染成功; Western blotting 检测显示, 与 Control 组、LPS 组、AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组 LONP1 的蛋白表达均增加 (LONP1/GAPDH: 1.47 ± 0.01 比 1、 1.11 ± 0.01 、 1.12 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$)。荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白 (GFP) 信号集中定位于心肌细胞胞质, 沿心肌纤维长轴呈连续、条带状分布, 荧光强度高于周围间质, 提示 AAV9-心肌肌钙蛋白 T (cTnT)-LONP1-GFP 在心肌组织内广泛感染且表达产物富集于心肌细胞。与 Control 组比较, LPS 组及 AAV+LPS 组的 ROS 产生增加, ATP、线粒体膜电位水平、LVEF、LVFS 和 LVESV 均降低, LVEDV 和 4-HNE、MDA、mt-ACO2 含量均升高; 与 AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组的 ROS 产生减少 (荧光强度: 1.43 ± 0.10 比 2.95 ± 0.15), ATP、线粒体膜电位水平、LVEF、LVFS 和 LVESV 均升高 [ATP (nmol/g): 75.12 ± 6.20 比 58.03 ± 4.54 , 线粒体膜电位: 0.81 ± 0.15 比 0.75 ± 0.12 , LVEF: 0.69 ± 0.06 比 0.39 ± 0.05 , LVFS: 0.35 ± 0.04 比 0.18 ± 0.03 , LVESV (μ L): 38.26 ± 4.02 比 23.65 ± 5.39 , 均 $P < 0.05$], LVEDV 和 4-HNE、MDA、mt-ACO2 含量均降低 [LVEDV (μ L): 50.26 ± 4.02 比 62.82 ± 5.39 , 4-HNE (ng/L): 4.70 ± 0.55 比 6.01 ± 0.73 , MDA (mmol/L): 13.46 ± 1.68 比 19.88 ± 2.19 , mt-ACO2 (U/g): 528.26 ± 72.41 比 1286.82 ± 151.28 , 均 $P < 0.05$]。LPS 组与 AAV+LPS 组上述指标差异均无统计学意义。**结论** LONP1 过表达可减少脓毒症小鼠 ROS 产生, 促进 ATP 生成, 提高线粒体膜电位, 减轻线粒体氧化应激水平, 进而改善脓毒症小鼠心脏功能。

【关键词】 线粒体离子肽酶-1; 脓毒症; 线粒体氧化应激; 心肌保护

基金项目: 国家自然科学基金 (82160362, 82360375)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250224-00103

Overexpression of mitochondrial Lon protease 1 alleviates myocardial injury in septic mice by attenuating mitochondrial oxidative stress

Luo Xun^{1,2}, Zhao Shan², Geng Zhengguang¹, Fu Bao¹, Fu Xiaoyun^{1,2}

¹Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China; ²Key Laboratory of Anesthesiology and Organ Protection of Ministry of Education (In Cultivation) of Guizhou Province, Zunyi 563003, China

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

【Abstract】 Objective To investigate the effects of mitochondrial Lon protease 1 (LONP1) overexpression on mitochondrial oxidative stress in a mouse model of septic myocardial injury. **Methods** Twenty-four SPF-grade male C57BL/6J mice were randomly divided into a normal control group (Control group), a sepsis model group (LPS group), an adeno-associated virus control group (AAV+LPS group), and a LONP1 overexpression group (LONP1+LPS

group), with 6 mice in each group. A septic myocardial injury model was established by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) at 10 mg/kg; the Control group was intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. Three weeks before modeling, the Control group and LPS group were sham-transfected via tail vein injection with an equal volume (100 μ L) of normal saline; the AAV+LPS group was injected with adeno-associated virus (AAV) without the Lonp1 gene (100 μ L) via tail vein; the LONP1+LPS group was injected with AAV targeting the myocardium and carrying the Lonp1 gene fragment (viral titer: 1×10^{12} vg/mL, 100 μ L) via tail vein. In the LONP1+LPS group, Lonp1 gene overexpression was evaluated by frozen section and Western blotting 3 weeks after viral transfection, and modeling was performed after successful overexpression was confirmed. Twenty-four hours after modeling, the establishment of the septic myocardial injury model was assessed by mouse activity, secretions, urine and feces, combined with cardiac echocardiography, and hematoxylin-eosin (HE) staining of myocardial tissue; reactive oxygen species (ROS) production was detected by dihydroethidium (DHE) method; adenosine triphosphate (ATP) production and mitochondrial membrane potential changes were detected by relevant kits. Changes in mitochondrial oxidative stress indicators [4-hydroxynonenal (4-HNE), malondialdehyde (MDA), mitochondrial aconitase 2 (mt-ACO2)] and cardiac function indicators [left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV)] were also evaluated. **Results** Twenty-four hours after modeling, compared with the Control group, mice in the LPS group exhibited lethargy, piloerection, increased oral and ocular secretions, pyuria, and loose stools; LVEF and LVFS were significantly decreased; HE staining showed degeneration and necrosis of some myocardial fibers in the LPS group, with disordered arrangement and inflammatory cell infiltration. Under fluorescence microscopy after frozen section, successful viral transfection was observed in the LONP1+LPS group; Western blotting showed that, compared with the Control group, LPS group, and AAV+LPS group, protein expression of LONP1 was significantly increased in the LONP1+LPS group (LONP1/GAPDH: 1.47 ± 0.01 vs. 1, 1.11 ± 0.01 , 1.12 ± 0.01 , all $P < 0.05$). Under fluorescence microscopy, green fluorescent protein (GFP) signals were concentrated in the cytoplasm of cardiomyocytes, showing continuous and striped distribution along the long axis of myocardial fibers, with fluorescence intensity significantly higher than that in the surrounding interstitium, indicating widespread infection of AAV9-cardiac troponin T (cTnT)-LONP1-GFP in myocardial tissue and enrichment of expression products in cardiomyocytes. Compared with the Control group, ROS production was significantly increased in the LPS group and AAV+LPS group; ATP, mitochondrial membrane potential, LVEF, LVFS, and LVESV were significantly decreased; LVEDV, 4-HNE, MDA, and mt-ACO2 contents were significantly increased. Compared with the AAV+LPS group, ROS production was significantly decreased in the LONP1+LPS group (fluorescence intensity: 1.43 ± 0.10 vs. 2.95 ± 0.15); ATP, mitochondrial membrane potential, LVEF, LVFS, and LVESV were significantly increased [ATP (nmol/g): 75.12 ± 6.20 vs. 58.03 ± 4.54 , mitochondrial membrane potential: 0.81 ± 0.15 vs. 0.75 ± 0.12 , LVEF: 0.69 ± 0.06 vs. 0.39 ± 0.05 , LVFS: 0.35 ± 0.04 vs. 0.18 ± 0.03 , LVESV (μ L): 38.26 ± 4.02 vs. 23.65 ± 5.39 , all $P < 0.05$]; LVEDV, 4-HNE, MDA, and mt-ACO2 contents were significantly decreased [LVEDV (μ L): 50.26 ± 4.02 vs. 62.82 ± 5.39 , 4-HNE (ng/L): 4.70 ± 0.55 vs. 6.01 ± 0.73 , MDA (mmol/L): 13.46 ± 1.68 vs. 19.88 ± 2.19 , mt-ACO2 (U/g): 528.26 ± 72.41 vs. 1286.82 ± 151.28 , all $P < 0.05$]. No statistically significant differences were observed in the aforementioned indicators between the LPS and AAV+LPS groups. **Conclusion** LONP1 overexpression reduces ROS production, promote ATP generation, enhance mitochondrial membrane potential, and alleviate mitochondrial oxidative stress in septic mice, thereby improving cardiac function.

【Key words】 Mitochondrial Lon protease 1; Sepsis; Mitochondrial oxidative stress; Myocardial protection

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82160362, 82360375)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20250224-00103

脓毒症是一种机体对感染的反应失调而引起的危及生命的急性器官功能障碍综合征,是院内死亡最常见的原因,也是高住院费用的病种之一^[1]。尽管近年来在脓毒症的认知与临床管理方面已取得长足进步,但目前脓毒症仍是世界范围内的重大难题^[2]。心脏是脓毒症期间最脆弱、易导致机体严重不良预后的关键器官^[3]。脓毒性心肌病的主要临床表现包括心室扩张、心肌损伤和心脏射血功能障碍^[4],从机制上讲,脓毒症心肌损伤与炎症风暴和线粒体氧化应激密切相关^[3,5]。过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)会改变细胞内的级联反应、加强炎症反应的幅度和持续时间^[6]。因此,减轻线粒体氧化应激对于脓毒症心肌损伤的治疗有很大价值。

线粒体离子肽酶-1 (mitochondrial Lon protease 1, LONP1) 是一种保守的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖性蛋白酶,主要位于线粒体基质,作为蛋白质质量控制环节的重要部分,可以选择性降解异常(氧化修饰、聚集等)蛋白质^[7-9]。此外,包括错误折叠蛋白和 ROS 在内的各种线粒体氧化应激信号可激活 LONP1 的转录^[10],它的上调通过阻止蛋白质和脂质的氧化损伤以及维持线粒体氧化还原平衡来减轻心脏损伤,是一种重要的心脏保护蛋白^[11]。

课题组前期研究显示,脓毒症早期会伴随大量 ROS 的释放和线粒体氧化应激损伤的发生^[12]。作为线粒体抗氧化损伤机制, LONP1 能否作为

其干预靶点在脓毒症心肌损伤中发挥保护效应,目前鲜有研究。本实验通过腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)建立脓毒症小鼠心肌损伤模型,探讨 LONP1 过表达对心功能、ROS 产生、ATP 水平及线粒体氧化损伤等的影响及机制,旨在为脓毒症心肌损伤的保护提供新的思路,为干预靶标的临床转化提供理论依据和实验基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物:SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只,8 周龄,体质量 20~25 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[合格证编号:SCXK(湘)2019-0004]。饲养于室温 22~24 °C、湿度(55±5)% 的 SPF 级动物实验中心。所有动物适应性喂养 1 周后纳入实验。本研究中动物处理方法符合动物伦理学标准,并通过遵义医科大学动物实验伦理委员会审批(审批号:2020-2-145)。

1.2 实验试剂及仪器:LPS、兔抗 LONP1 抗体购自美国 Sigma 公司,小鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠和山羊抗兔的二抗购自湖北武汉三鹰生物技术公司,Lonp1 基因过表达腺相关病毒[腺相关病毒 9(adeno-associated virus 9, AAV9)-心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)-LONP1-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)]于上海恒生物有限公司合成,二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)超氧阴离子 ROS 检测试剂盒购自北京威格拉斯生物公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)探针、线粒体顺乌头酸酶 2(mitochondrium-aconitase 2, mt-ACO2)活性检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京索莱宝公司,组织线粒体分离试剂盒、ATP 检测试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 购自上海碧云天生物技术有限公司,丙二醛检测试剂盒购自南京建成生物公司,4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, 4-HNE)酶联免疫试剂盒购自南京森贝伽公司。高分辨率小动物超声影像系统购自日本富士 Visual Sonics 公司,荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,全波长多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司,电泳仪、垂直电泳槽、超高灵敏度化学发光成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验分组与处理:按照随机数字表法将实验用小鼠分为正常对照组(Control 组)、脓毒症模型组

(LPS 组)、腺相关病毒对照组(AAV+LPS 组)、LONP1 过表达组(LONP1+LPS 组)4 组,每组 6 只。Control 组经尾静脉注射与病毒溶液等量的生理盐水 100 μL 代替病毒行假转染,3 周后经腹腔注射与 LPS 等量的生理盐水;LPS 组经尾静脉注射与病毒溶液等量的生理盐水 100 μL 代替病毒行假转染,3 周后经腹腔注射 LPS 建立脓毒症心肌损伤模型;AAV+LPS 组经尾静脉注射不带 Lonp1 基因的 AAV 溶液 100 μL,3 周后经腹腔注射 LPS 建立脓毒症心肌损伤模型;LONP1+LPS 组经尾静脉注射带 Lonp1 基因的 AAV(adeno-associated virus-LONP1, AAV-LONP1)溶液 100 μL,3 周后经腹腔注射 LPS 建立脓毒症心肌损伤模型。

1.4 小鼠脓毒症心肌损伤模型建立:根据既往研究方法^[13],经小鼠腹腔注射 10 mg/kg LPS,24 h 后可成功建立脓毒症小鼠心肌损伤模型。建模后观察小鼠精神状态、活动情况、大小便、分泌物等一般情况,剖腹探查小鼠腹腔变化,行心脏超声并取心肌组织检测进一步评估脓毒症心肌损伤模型建立情况。

1.5 小鼠心肌转染模型建立:参考文献[14]报道的方法,通过尾静脉注射携带靶向 cTnT 启动子的 Lonp1 基因腺相关病毒(1×10^{12} vg/mL)溶液 100 μL,感染 3 周后心肌组织冰冻切片,行蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)评估转染效果。

1.6 指标检测与方 法

1.6.1 小鼠心脏超声检测心功能:取各组建模后的小鼠,行异氟烷(3%~4%)诱导麻醉,心前区备皮,用高分辨率小动物超声影像系统从乳头肌切面左心室的短轴视图行 M 型超声检查,获取左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室收缩期末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)及左室舒张期末容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)等心脏功能参数。

1.6.2 心肌组织冰冻切片评估 AAV 转染情况:取新鲜小鼠心肌组织经 4 °C 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗后用包埋剂包埋,于冰冻切片机中以 10 μm 厚度切片,置于荧光显微镜下观察并拍照,评估 AAV 转染情况。

1.6.3 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察心肌组织病理学改变:取新鲜小鼠心脏标本置于含有 10% 多聚甲醛的溶液中固定 24 h,经历乙醇脱水、修剪、石蜡包埋、切片、脱蜡、HE 染色、封片等

操作,封片后于光学显微镜下观察、拍照。

1.6.4 Western blotting 检测心肌组织 LONP1 的蛋白表达:取小鼠心脏组织加入含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液于冰上剪碎并匀浆,于 4 °C 12 000×*g* 离心 10 min,将上清液转移至新的离心管中。采用 BCA 试剂盒对总蛋白进行检测及定量。将蛋白在沸水浴(约 100 °C)中变性 5 min 后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、洗涤,最后于超高灵敏度化学发光成像系统采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)进行显影检测。使用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白与 GAPDH 的灰度值比值;将 Control 组的比值设为 1,其余各组表示为相对表达倍数。

1.6.5 心肌组织线粒体提取:根据组织线粒体提取试剂盒操作说明,取新鲜小鼠心脏组织 50 mg 于冰上剪碎、预冷的 PBS 冰浴、离心(4 °C, 600×*g*, 20 s)、胰酶冰浴消化沉淀组织(20 min)、离心(4 °C, 600×*g*, 20 s)、弃上清、用线粒体分离试剂重悬沉淀、离心(4 °C, 600×*g*, 20 s)并取沉淀、线粒体分离试剂重悬沉淀、冰浴匀浆、离心(4 °C, 600×*g*, 5 min)、取上清离心(4 °C, 11 000×*g*, 10 min)得沉淀即为分离得到的新鲜线粒体,于线粒体保存试剂中保存待用。

1.6.6 ROS 检测:根据 DHE 试剂盒检测 ROS 含量,结合相关操作说明,取新鲜心肌组织制成冰冻切片,用 PBS 清洗 3 次(每次 5 min)后,于暗盒中加入 10 μmol/L 的 DHE 染液,37 °C 环境下避光 30 min,再用 PBS 清洗 3 次(每次 5 min),加入含有 DAPI 的抗荧光衰减封片剂封片,于荧光显微镜下观察并摄像。使用 Image J 软件测定红色通道平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI),扣除背景后,以 Control 组 MFI 为 1,其余组表示以平均吸光度值表示。

1.6.7 ATP 检测:参照 ATP 检测试剂盒操作说明,取各组小鼠新鲜心脏组织 20 mg,分别进行冰上匀浆、离心(4 °C, 12 000×*g*, 5 min)、取上清液,使用 BCA 蛋白测定试剂盒对总蛋白均质化处理,结合 ATP 检测试剂盒操作说明配置标准品和 ATP 工作液,于多功能酶标仪中测定各组待检样品 ATP。

1.6.8 线粒体膜电位检测:采用 JC-1 染色试剂盒对线粒体膜电位进行检测。结合相关说明书操作步

骤,配置 JC-1 工作液,取适量 1.6.5 方法中提取的新鲜线粒体加入 JC-1 工作液中,使用多功能酶标仪选择 ECL 法检测各组 JC-1 聚合体和单体含量,根据操作说明书公式分析各组线粒体膜电位水平。

1.6.9 4-HNE、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测:取小鼠心腔血液经 3 000 r/min 离心 10 min 后得到血清标本,根据 4-HNE 和 MDA 相关测试试剂盒操作说明分别检测线粒体氧化应激指标 4-HNE 和 MDA 水平。

1.6.10 心肌 mt-ACO2 含量检测:根据 mt-ACO2 检测试剂盒操作说明,取各组建模后小鼠心肌组织 0.2 g,经历冰上匀浆器匀浆、4 °C 环境下分别于 600×*g* 离心后取上清液再行 11 000×*g* 离心、取沉淀再行超声波破碎等步骤,最后取上清液根据操作说明书公式对心肌线粒体 mt-ACO2 活性进行检测。

1.7 统计学处理:采用 SPSS 29.0 统计学软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计图绘制,采用 Image J 软件进行 Western blotting 蛋白条带灰度值检测和 ROS 染色图片相对荧光强度检测。所有计量资料均符合正态分布,以均数 ± 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),组内两两比较均服从方差齐性检验,采用 LSD 法。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 小鼠脓毒症心肌损伤模型建立与评价:通过腹腔注射 LPS(10 mg/kg)建立脓毒症模型,建模 24 h 后可见小鼠表现为嗜睡、活动减少、蜷缩、立毛、口角和眼角分泌物增多、出现脓尿及稀便等。将小鼠处死并开腹后可见建模小鼠的腹腔渗出增多,部分肠管与腹壁黏连。超声心动图检测显示(图 1),与 Control 组比较, LPS 组 LVEF 和 LVFS 均下降(LVEF: 0.87 ± 0.05 比 0.43 ± 0.06 , LVFS: 0.62 ± 0.08 比 0.19 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$)。心肌组织 HE 染色显示(图 2),与 Control 组相比, LPS 组部分心肌纤维轻度变性坏死,炎症细胞浸润,部分坏死区可见少量纤维组织增生。

2.2 小鼠心肌 LONP1 过表达转染情况:荧光显微镜下显示, LONP1+LPS 组小鼠 AAV 感染成功(图 3)。Western blotting 检测结果显示(图 4),与 Control 组、LPS 组和 AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组小鼠心肌组织的 LONP1 蛋白表达升高(均 $P < 0.05$),其中 LPS 组与 AAV+LPS 组 LONP1 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

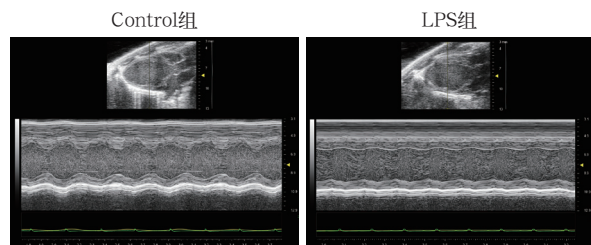


图 1 正常对照组 (Control 组) 与脓毒症模型组 (LPS 组) 小鼠心脏 M 型超声心动图代表性影像 LPS 为脂多糖; Control 组左心室运动协调, 舒张期与收缩期腔径变化幅度正常; LPS 组可见左心室收缩功能受损, 表现为室壁增厚幅度降低, 腔径变化减小

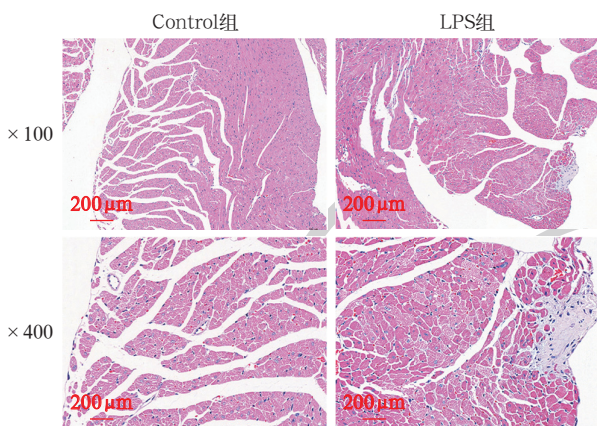


图 2 光镜下观察正常对照组 (Control 组) 与脓毒症模型组 (LPS 组) 小鼠心肌组织病理学改变 LPS 为脂多糖; Control 组心肌组织结构完整、肌纤维排列整齐、形态规则, 未见明显炎症细胞浸润; LPS 组部分心肌纤维轻度变性坏死, 排列紊乱, 可见断裂或萎缩, 间质中可见炎症细胞浸润, 部分区域伴纤维组织增生, 苏木素-伊红 (HE) 染色

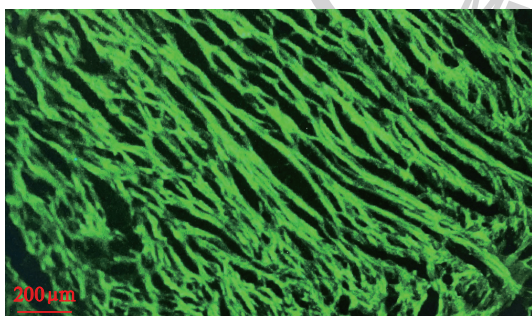
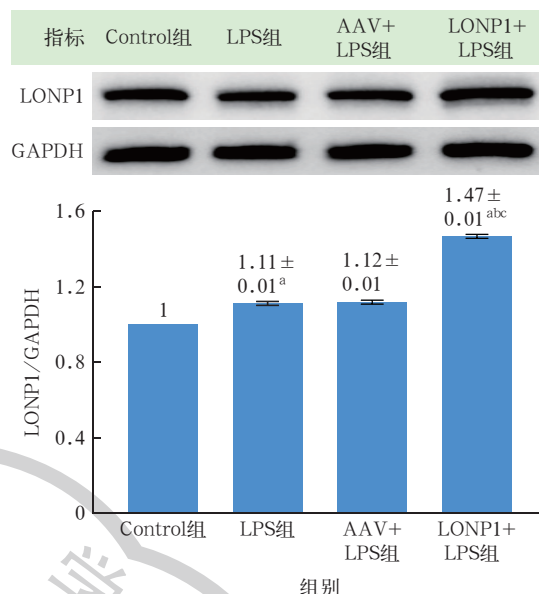


图 3 荧光显微镜下观察线粒体离子肽酶-1 (LONP1) 过表达组 (LONP1+LPS 组) 小鼠心肌组织 LONP1 转染情况 转染 3 周后, 冰冻切片可见绿色荧光蛋白 (GFP) 沿心肌纤维长轴连续、条带状分布于胞质呈绿色荧光, 表示腺相关病毒 (AAV)-LONP1 感染成功 免疫荧光染色 高倍放大

2.3 LONP1 过表达对小鼠心肌 ROS 产生情况的影响: 荧光显微镜下显示 (图 5), 经 DHE 探针标记 ROS 后染色成红色。与 Control 组比较, LPS 组和 AAV+LPS 组的 ROS 产生增加 (均 $P < 0.05$); 与 LPS 组和 AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组的 ROS 产生减少 (均 $P < 0.05$), LPS 组与 AAV+LPS 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 6)。



注: Control 组为正常对照组, LPS 组为脓毒症模型组, AAV+LPS 组为腺相关病毒 (AAV) 对照组, LONP1+LPS 组为线粒体离子肽酶-1 (LONP1) 过表达组; LPS 为脂多糖, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 AAV+LPS 组比较, ^c $P < 0.05$

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠心肌组织 LONP1 的蛋白表达

2.4 LONP1 过表达对小鼠心肌线粒体 ATP 产生情况和膜电位的影响 (图 7): 与 Control 组比较, LPS 组及 AAV+LPS 组 ATP 产生和膜电位水平均降低 (均 $P < 0.05$); 与 AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组 ATP 产生和膜电位水平均升高 (均 $P < 0.05$)。

2.5 LONP1 过表达对小鼠 4-HNE、MDA、mt-ACO2 的影响 (表 1): 与 Control 组比较, LPS 组和 AAV+LPS 组 4-HNE、MDA、mt-ACO2 含量均升高 (均 $P < 0.05$); 与 AAV+LPS 组比较, LONP1+LPS 组 4-HNE、MDA、mt-ACO2 含量均降低 (均 $P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠血清 4-HNE、MDA 及心肌 mt-ACO2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	4-HNE (ng/L)	MDA (mmol/L)	mt-ACO2 (U/g)
Control 组	6	4.51 ± 0.63	11.19 ± 1.38	498.14 ± 61.28
LPS 组	6	6.07 ± 0.89 ^a	20.67 ± 2.74 ^a	1 487.82 ± 175.32 ^a
AAV+LPS 组	6	6.01 ± 0.73 ^a	19.88 ± 2.19 ^a	1 286.82 ± 151.28 ^a
LONP1+LPS 组	6	4.70 ± 0.55 ^b	13.46 ± 1.68 ^b	528.26 ± 72.41 ^b

注: Control 组为正常对照组, LPS 组为脓毒症模型组, AAV+LPS 组为腺相关病毒 (AAV) 对照组, LONP1+LPS 组为线粒体离子肽酶-1 (LONP1) 过表达组; 4-HNE 为 4-羟基壬烯酸, MDA 为丙二醛, mt-ACO2 为线粒体顺乌头酸酶 2, LPS 为脂多糖; 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 AAV+LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.6 LONP1 过表达对小鼠心脏功能的影响 (表 2): 与 Control 组比较, LPS 组和 AAV+LPS 组 LVEF、LVFS、LVESV 均降低, LVEDV 升高 (均 $P < 0.05$)。与 AAV+LPS

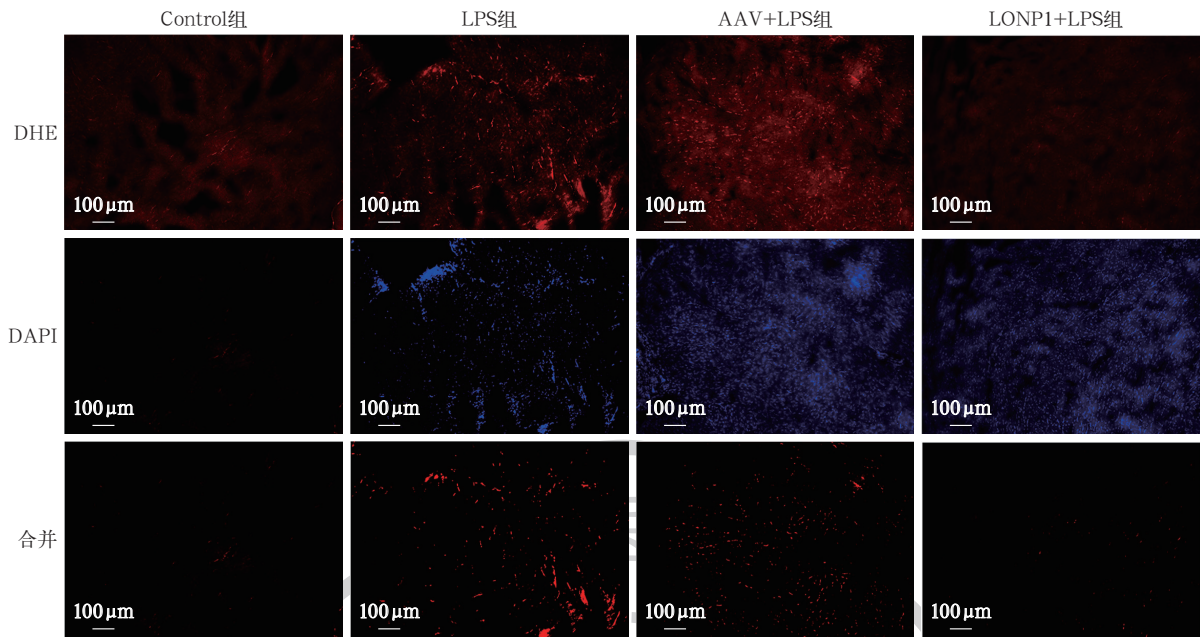
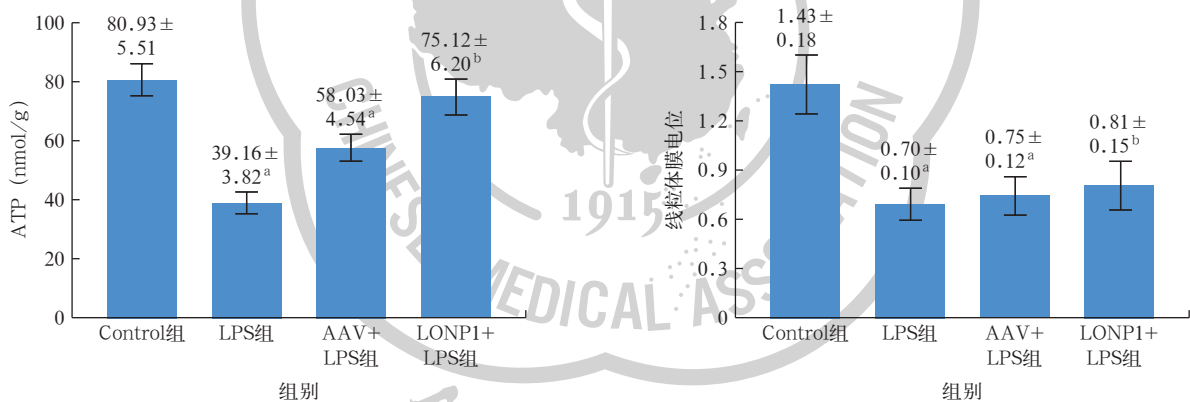
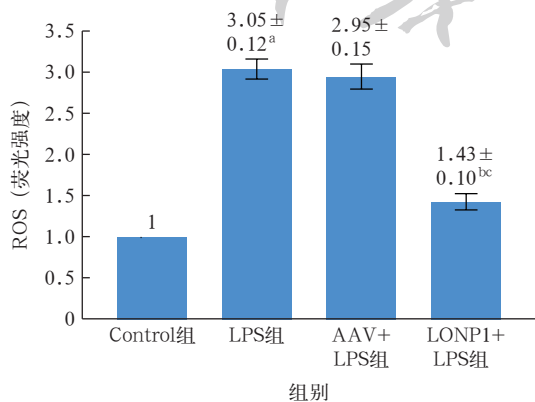


图 5 荧光显微镜下观察各组小鼠心肌组织活性氧(ROS)产生情况。二氢乙锭(DHE)为 ROS 探针,将其标记为红色;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)为细胞核探针,将其标记为蓝色。LPS 为脂多糖,LONP1 为线粒体离子肽酶-1;正常对照组(Control 组)仅见极弱红色荧光,ROS 基础水平低;脓毒症模型组(LPS 组)红色荧光显著增强,ROS 大量生成;腺相关病毒对照组(AAV+LPS 组)红色荧光强度与 LPS 组相近;LONP1 过表达组(LONP1+LPS 组)红色荧光明显减弱,ROS 生成显著减少。免疫荧光染色,中倍放大



注:Control 组为正常对照组,LPS 组为脓毒症模型组,AAV+LPS 组为腺相关病毒(AAV)对照组,LONP1+LPS 组为线粒体离子肽酶-1(LONP1)过表达组;ATP 为三磷酸腺苷,LPS 为脂多糖;与 Control 组比较,^a $P < 0.05$;与 AAV+LPS 组比较,^b $P < 0.05$

图 7 各组小鼠心肌组织 ATP 含量和线粒体膜电位比较



注:Control 组为正常对照组,LPS 组为脓毒症模型组,AAV+LPS 组为腺相关病毒(AAV)对照组,LONP1+LPS 组为线粒体离子肽酶-1(LONP1)过表达组;ROS 为活性氧,LPS 为脂多糖;与 Control 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 AAV+LPS 组比较,^c $P < 0.05$

图 6 各组小鼠心肌组织 ROS 水平比较

组比较,LONP1+LPS 组 LVEF、LVFS、LVESV 均升高,LVEDV 降低(均 $P < 0.05$),表明 LONP1 过表达可改善 LPS 导致的心功能损害。

表 2 各组小鼠心功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVEF	LVFS	LVESV (μL)	LVEDV (μL)
Control 组	6	0.79 ± 0.05	0.44 ± 0.04	41.94 ± 4.48	47.26 ± 3.71
LPS 组	6	0.32 ± 0.05 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	18.49 ± 5.87 ^a	63.82 ± 5.87 ^a
AAV+LPS 组	6	0.39 ± 0.05 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	23.65 ± 5.39 ^a	62.82 ± 5.39 ^a
LONP1+LPS 组	6	0.69 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.04 ^b	38.26 ± 4.02 ^b	50.26 ± 4.02 ^b

注:Control 组为正常对照组,LPS 组为脓毒症模型组,AAV+LPS 组为腺相关病毒(AAV)对照组,LONP1+LPS 组为线粒体离子肽酶-1(LONP1)过表达组;LPS 为脂多糖,LVEF 为左室射血分数,LVFS 为左室短轴缩短率,LVESV 为左室收缩期末容积,LVEDV 为左室舒张期末容积;与 Control 组比较,^a $P < 0.05$;与 AAV+LPS 组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

脓毒症引起的心脏功能障碍是导致脓毒症患者死亡的严重并发症^[15],尽管目前器官支持手段较前进步(包括体外膜肺氧合等)^[16],但住院花费巨大、治疗效果有限,仍是重症监护病房(intensive care unit, ICU)治疗的重大难题。探索创新和有效的分子干预靶点可以推进治疗研究并加深对脓毒性心肌病病理生理机制的理解。LONP1 是位于线粒体基质的蛋白酶,课题组前期在探究解耦联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2)的心肌保护作用时发现, LONP1 随 UCP2 的表达变化而改变,两者具有同向表达趋势^[17]。这表明 LONP1 作为 UCP2 的下游调控基因之一,对脓毒症引起的心功能障碍也具有潜在的保护效能。直接调控 LONP1 这一靶点,对心肌保护具有更好的靶向性,可能具有更加高效直接的调控优势。本研究主要通过建立小鼠脓毒症心肌损伤模型,过表达 LONP1 并探究其脓毒症心肌保护作用。

脓毒性心肌病的临床表现包括心室扩张和心脏射血功能障碍等^[5, 18]。本研究通过建立 LPS 诱导的小鼠脓毒症模型发现,与 Control 组比较, LPS 组 LVEF 和 LVFS 均明显下降, LVEDV 明显升高。这可能是在脓毒性休克的急性期,心室收缩力和心室扩张受损导致心室舒张末期容量增加,从而进一步导致射血分数降低^[19]。小鼠心肌组织切片 HE 染色提示,相比 Control 组, LPS 组小鼠心肌出现部分纤维变性坏死,排列紊乱,可见炎症细胞浸润,部分坏死区可见纤维组织增生。进一步说明脓毒症伴随着心肌结构和功能的损害。

脓毒症诱导的心功能不全的病理机制包括线粒体功能障碍、氧化应激、细胞凋亡和自噬等^[20]。在脓毒症期间,内毒素和炎症介质损害了线粒体的功能,从而诱导能量不足和 ROS 蓄积^[21],过量的自由基增加了脓毒症心肌中脂质、蛋白质(包括 4-HNE、MDA、mt-ACO2)等过氧化物水平^[15, 22],鉴于氧化应激的致病作用, Zhu 等^[23]近期研究显示,抑制炎症和 ROS 积累可减轻脓毒症诱导的细胞凋亡和心功能障碍。本研究同样表明, LPS 诱导脓毒症发生时,伴随着 ROS 的过量产生, ATP 减少,线粒体膜电位降低, 4-HNE、MDA、mt-ACO2 等过氧化物产生增加;当 LONP1 过表达后,降低了以上由脓毒症诱导的心肌细胞氧化应激产物水平,减轻了脓毒症心脏功能损伤。

近年来,研究证实 LONP1 可调节多种线粒体功能,并被认为是维持细胞器平衡、响应生理和病理应激源的关键因子之一^[11, 24]。在缺血再灌注损伤中,直接调控 LONP1 的保护效能已初显优势。Venkatesh 等^[25]通过建立小鼠心肌缺血再灌注损伤模型发现, LONP1 过表达通过减轻线粒体氧化损伤、调节线粒体电子传递链、降低复合物 I 的含量和活性来重新调整能量供应,从而减轻心脏损伤。Zhao 等^[7]进一步研究证实,小鼠心脏 LONP1 的特异性敲除会损害线粒体质量控制机制,导致心肌细胞代谢重编程异常和扩张型心肌病的发生,表明 LONP1 在心脏生理病理的诸多调控缓解中的重要性。尽管目前研究普遍认为 LONP1 在心脏受损或应激状态下表达量增加,但对于 LONP1 是否改善应激刺激下心脏功能的异常目前仍无定论。一项关于常氧和低氧条件下 LONP1 对心肌细胞存活情况的研究表明, LONP1 过表达在常氧条件下刺激 ROS 过度生成,引起细胞凋亡,但 LONP1 下调降低 ROS 水平,减轻缺氧诱导的细胞凋亡^[26]。与此相反,本实验通过构建小鼠脓毒症心肌损伤模型发现, LONP1 在心肌损伤时表达上调,同时伴随 ROS 产生增加;但当 LONP1 过表达后, ROS 产生减少,心脏收缩功能得到改善。这可能表明 LONP1 在不同病理条件刺激下发挥出复杂的调控效应。近年来关于 LONP1 的研究充分体现了其多样的功能和复杂的调节机制。Shin 等^[27]的研究发现, LONP1 作为一种分子伴侣,与线粒体热休克蛋白 70(mitochondrial heat shock protein 70, mtHSP70)协同作用,通过其 ATP 酶活性稳定线粒体蛋白折叠中间体,防止蛋白聚集,确保线粒体蛋白正确折叠和功能维持。具体来说, LONP1 不仅具有内在的分子伴侣活性,能够独立稳定线粒体蛋白折叠中间体,还能够与 mtHSP70 相互作用,增强其蛋白稳定性和折叠能力,共同促进线粒体蛋白的正确折叠。这种协同作用对于维持线粒体的正常功能至关重要,因为线粒体蛋白的错误折叠和聚集会导致线粒体功能障碍,进而影响整个细胞的代谢和生存^[27]。LONP1 还参与细胞器的交互,发挥重要调节作用。Li 等^[28]研究揭示了 LONP1 作为线粒体-内质网膜接触点(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)的系链蛋白,维持 MAM 的完整性和线粒体与内质网的相互作用,调节线粒体动态和未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。

LONP1 缺失会导致 MAM 形成减少, 线粒体碎片化, 并激活内质网和线粒体的 UPR, 其中内质网 UPR 的激活更为敏感。此外, LONP1 缺失还会引发代谢重编程, 增强糖异生和氨基酸代谢, 以应对线粒体功能障碍和氧化应激, 最终导致心脏功能障碍和病理性心脏重塑, 甚至进展为心力衰竭^[28]。

综上, 本研究通过建立 LPS 诱导脓毒症心肌损伤小鼠模型, 经尾静脉注射靶向心肌组织的 AAV-LONP1, 并通过免疫荧光和 Western blotting 等实验方法证实 LONP1 过表达成功, 线粒体氧化应激相关指标 (ROS、ATP、膜电位、4-HNE、MDA、mt-ACO2) 和超声心动图下心脏功能受损情况的检测结果显示, LONP1 过表达可改善线粒体氧化应激, 减轻小鼠脓毒症心肌损伤。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 罗澐: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 赵珊: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据; 耿争光: 采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 付豹: 行政、技术或材料支持, 指导、支持性贡献; 傅小云: 酝酿和设计实验, 分析/解释数据, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 获取研究经费, 行政、技术或材料支持, 指导、支持性贡献

参考文献

- [1] Meyer NJ, Prescott HC. Sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2024, 391(22): 2133–2146. DOI: 10.1056/NEJMra2403213.
- [2] Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodríguez M, et al. Sepsis: a review of advances in management[J]. *Adv Ther*, 2017, 34(11): 2393–2411. DOI: 10.1007/s12325-017-0622-8.
- [3] Wang DQ, Zhao HD, Deng C, et al. Sulfide-modified nanoscale zero-valent iron as a novel therapeutic remedy for septic myocardial injury[J]. *J Adv Res*, 2024, 55: 145–158. DOI: 10.1016/j.jare.2023.02.008.
- [4] Ehrman RR, Sullivan AN, Favot MJ, et al. Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 112. DOI: 10.1186/s13054-018-2043-8.
- [5] Wang JY, Pu XY, Zhuang HW, et al. Astragaloside IV alleviates septic myocardial injury through DUSP1-Prohibitin 2 mediated mitochondrial quality control and ER-autophagy[J]. *J Adv Res*, 2025, 75: 561–580. DOI: 10.1016/j.jare.2024.10.030.
- [6] Qiu Z, He YH, Ming H, et al. Lipopolysaccharide(LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 8151836. DOI: 10.1155/2019/8151836.
- [7] Zhao K, Huang XY, Zhao WK, et al. LONP1-mediated mitochondrial quality control safeguards metabolic shifts in heart development[J]. *Development*, 2022, 149(6): dev200458. DOI: 10.1242/dev.200458.
- [8] Guo QQ, Xu ZS, Zhou DX, et al. Mitochondrial proteostasis stress in muscle drives a long-range protective response to alleviate dietary obesity independently of ATF4[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(30): eabo0340. DOI: 10.1126/sciadv.abo0340.
- [9] Sheng XQ, Liu CM, Yan GJ, et al. The mitochondrial protease LONP1 maintains oocyte development and survival by suppressing nuclear translocation of AIFM1 in mammals[J]. *EBioMedicine*, 2022, 75: 103790. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103790.
- [10] Lin YF, Haynes CM. Metabolism and the UPR(mt)[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 677–682. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.004.
- [11] Zanini G, Sella V, Malerba M, et al. The role of Lonp1 on mitochondrial functions during cardiovascular and muscular diseases[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(3): 598. DOI: 10.3390/antiox12030598.
- [12] 耿争光, 罗诗雨, 李光素, 等. UCP2 过表达抑制活性氧产生和炎症反应以减轻脓毒性心肌损伤[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(11): 1346–1351. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200415-00298.
- [13] Qin S, Ren YC, Liu JY, et al. ANXA1sp attenuates sepsis-induced myocardial injury by promoting mitochondrial biosynthesis and inhibiting oxidative stress and autophagy via SIRT3 upregulation[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2024, 40(1): 35–45. DOI: 10.1002/kjm2.12767.
- [14] Li S, Chen JX, Liu MY, et al. Protective effect of HINT2 on mitochondrial function via repressing MCU complex activation attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 65. DOI: 10.1007/s00395-021-00905-4.
- [15] Jin Z, Li XQ, Liu HX, et al. MEGF9 prevents lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction through activating AMPK pathway[J]. *Redox Rep*, 2025, 30(1): 2435252. DOI: 10.1080/13510002.2024.2435252.
- [16] Chilletti R, Ihle J, Butt W. Mechanical circulatory support for septic shock in children and adults: different but similar[J]. *Can J Cardiol*, 2025, 41(4): 605–612. DOI: 10.1016/j.cjca.2024.12.031.
- [17] 唐小曲. UCP2 过表达激活 SIRT3 调控线粒体未折叠蛋白反应减轻 H9C2 心肌细胞缺氧复氧线粒体损伤研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2022.
- [18] Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock[J]. *Ann Intern Med*, 1984, 100(4): 483–90. DOI: 10.7326/0003-4819-100-4-483.
- [19] Fan DH, Wu RX. Mechanisms of the septic heart: from inflammatory response to myocardial edema[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2024, 195: 73–82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2024.08.003.
- [20] Wang RZ, Xu YR, Fang YX, et al. Pathogenetic mechanisms of septic cardiomyopathy[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1): 49–58. DOI: 10.1002/jcp.30527.
- [21] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis[J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107(1): 57–64. DOI: 10.1093/bja/aer093.
- [22] Bota DA, Davies KJ. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(9): 674–80. DOI: 10.1038/ncb836.
- [23] Zhu H, Dai Z, Liu XM, et al. Serine/threonine kinase 3 promotes oxidative stress and mitochondrial damage in septic cardiomyopathy through inducing Kelch-like ECH-associated protein 1 phosphorylation and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 degradation[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(5): 1369–1381. DOI: 10.7150/ijbs.80800.
- [24] Pinti M, Gibellini L, Nasi M, et al. Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8): 1300–1306. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.03.025.
- [25] Venkatesh S, Li M, Saito T, et al. Mitochondrial LonP1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury *in vivo*[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 128: 38–50. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.12.017.
- [26] Kuo CY, Chiu YC, Lee AY, et al. Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia[J]. *Mitochondrion*, 2015, 23: 7–16. DOI: 10.1016/j.mito.2015.04.004.
- [27] Shin CS, Meng SX, Garbis SD, et al. LONP1 and mtHSP70 cooperate to promote mitochondrial protein folding[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 265. DOI: 10.1038/s41467-020-20597-z.
- [28] Li YJ, Huang DW, Jia LQ, et al. LonP1 links mitochondria-ER interaction to regulate heart function[J]. *Research (Wash D C)*, 2023, 6: 0175. DOI: 10.34133/research.0175.

(收稿日期: 2025-02-24)

(本文编辑: 张耘菲)