

黄芪多糖通过调节 Drp1 介导的线粒体分裂改善感染性心肌病

陈旭红^{1,3} 纪桢^{1,3} 苑雅茹¹ 边希云^{2,3} 刘晓智^{2,3} 袁俐^{1,3}

天津市第五中心医院,¹ 妇产科,² 中心实验室,³ 天津市早产儿器官发育表观遗传重点实验室,
天津 300450

通信作者: 袁俐, Email: tougaocxh@163.com

【摘要】 目的 从线粒体动力相关蛋白 1(Drp1)介导线粒体分裂平衡角度,解读黄芪多糖(APS)对感染性心肌病小鼠的心功能保护作用及机制。**方法** 按随机数字表法将 18 只成年雄性 C57BL/6J 小鼠分为对照组、脂多糖(LPS)组和 LPS+APS 组,每组 6 只。采用 LPS 诱导制备感染性心肌病模型。各组均于术后 6 h 经尾静脉取外周血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清炎症因子水平;LPS 处理后 24 h 行超声心动图检查心室功能,包括左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、左室舒张期末内径(LVEDD)和左室收缩期末内径(LVESD);检查后立即处死小鼠取心肌组织,采用蛋白质印迹试验(Western blotting)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、C3a、Drp1、线粒体分裂蛋白 1(Fis1)、线粒体融合蛋白 2(Mfn2)、视神经萎缩蛋白 1(Opa1)蛋白表达。将购买的小鼠心房肌细胞株 HL-1 分为对照组、LPS 组、LPS+APS 组和 LPS+APS+线粒体氧化磷酸化解偶联剂(FCCP)组。采用活性氧(ROS)检测试剂盒检测分离线粒体及 HL-1 细胞内的 ROS 含量;采用线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)检测线粒体膜电位(MMP);采用三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒检测 HL-1 细胞内 ATP 含量。**结果** 与对照组比较,LPS 组小鼠心脏的 LVEF、LVFS、LVEDD 和 LVESD 均明显降低,线粒体内 ROS 含量明显升高,MMP 和 ATP 含量均明显下降;而 APS 可改善感染性心肌病小鼠的心功能指标[LVEF: 0.571 ± 0.026 比 0.287 ± 0.045 , LVFS(%): 33.13 ± 2.11 比 21.22 ± 0.99 , LVEDD(mm): 3.74 ± 0.10 比 2.77 ± 0.05 , LVESD(mm): 2.74 ± 0.09 比 1.99 ± 0.04 , 均 $P < 0.05$],明显降低心肌内 ROS 含量[ROS(%): 138.39 ± 9.28 比 260.97 ± 19.22 , $P < 0.05$],明显抑制 MMP 和 ATP 含量下降[MMP(红色/绿色荧光强度比值): 0.91 ± 0.05 比 0.55 ± 0.01 , ATP(%): 94.22 ± 10.11 比 58.74 ± 5.39 , 均 $P < 0.05$],且 APS 可明显抑制 LPS 处理后的 Drp1 和 Fis1 蛋白过表达以及 Mfn2 和 Opa1 蛋白低表达[Drp1/GAPDH(%): 126.33 ± 11.70 比 218.75 ± 19.44 , Fis1/GAPDH(%): 105.71 ± 15.77 比 194.39 ± 5.27 , Mfn2/GAPDH(%): 92.75 ± 10.44 比 41.88 ± 3.95 , Opa1/GAPDH(%): 98.14 ± 3.71 比 55.94 ± 7.30 , 均 $P < 0.05$]。故进一步采用 HL-1 细胞构建感染性心肌病模型,HL-1 细胞经 FCCP 处理后可明显抑制 APS 的保护效应。**结论** APS 通过抑制 Drp1 过表达,抑制线粒体的过度分裂,减轻感染性心肌细胞的氧化应激和线粒体损伤,最终改善心脏功能,该机制的发现可为感染性心肌病的治疗提供新的理论依据和临床参考。

【关键词】 黄芪多糖; 感染性心肌病; 线粒体动力相关蛋白 1; 氧化应激; 线粒体分裂

基金项目: 天津市滨海新区卫生和计划生育委员会科技项目(2018BWKY013)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.04.016

Amelioration of mice septic cardiomyopathy after treatment with Astragalus polysaccharide via regulating mitochondrial fission mediated by Drp1 Chen Xuhong^{1,3}, Ji Zhen^{1,3}, Yuan Yaru¹, Bian Xiyun^{2,3}, Liu Xiaozhi^{2,3}, Yuan Li^{1,3}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China; ²Central Laboratory, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China; ³Tianjin Key Laboratory of Epigenetics for Organ Development of Premature Infants, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

Corresponding author: Yuan Li, Email: tougaocxh@163.com

【Abstract】 Objective From the point of view of mitochondrial fissure balance mediated by mitochondrial dynamic related protein 1(Drp1) to probe the protective effect and mechanism of Astragalus polysaccharide (APS) on cardiac function of mice with septic cardiomyopathy. **Methods** Eighteen adult male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: control, lipopolysaccharide (LPS) and LPS+APS groups, with 6 mice in each group. LPS was used to induce the mice model of septic cardiomyopathy. After 6 hours, the peripheral blood was taken from the mouse caudal vein of each group, and the levels of serum inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); 24 hours after LPS treatment, ventricular function was examined by echocardiography, including left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end systolic diameter (LVESD); the mice were sacrificed immediately after examinations to obtain cardiac tissue. The protein expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), C3a, Drp1, mitochondrial mitotic protein 1 (Fis1), mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2) and optic atrophy protein 1 (Opa1) were detected by Western blotting. The purchased mouse atrial muscle cell line HL-1 was divided into 4 groups: control, LPS, LPS+APS and LPS+APS+carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) groups. Reactive oxygen species (ROS) assay kit was used to detect the content of ROS in isolated mitochondria and HL-1 cells; mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by mitochondrial membrane potential detection kit (JC-1); the

content of ATP in HL-1 cells was detected by adenosine triphosphate (ATP) detection kit. **Results** Compared with those of the control group, the levels of LVEF, LVFS, LVEDD and LVESD were significantly decreased, the content of ROS in mitochondria was significantly increased, and the contents of MMP and ATP were significantly decreased in the hearts of LPS mice group; while APS could improve the indexes of cardiac function in mice with infectious cardiomyopathy [LVEF: 0.571 ± 0.026 vs. 0.287 ± 0.045 , LVFS (%): 33.13 ± 2.11 vs. 21.22 ± 0.99 , LVEDD (mm): 3.74 ± 0.10 vs. 2.77 ± 0.05 , LVESD (mm): 2.74 ± 0.09 vs. 1.99 ± 0.04 , all $P < 0.05$], and obviously reduce the content of ROS in myocardium [ROS (%): 138.39 ± 9.28 vs. 260.97 ± 19.22 , $P < 0.05$], significantly inhibit the decrease of MMP and ATP contents [MMP (red/green fluorescence intensity ratio): 0.91 ± 0.05 vs. 0.55 ± 0.01 , ATP (%): 94.22 ± 10.11 vs. 58.74 ± 5.39 , all $P < 0.05$], and APS could significantly inhibit the over expression of Drp1 and Fis1 protein and the lower expression of Mfn2 and Opa1 protein after LPS treatment [Drp1/GAPDH (%): 126.33 ± 11.70 vs. 218.75 ± 19.44 , Fis1/GAPDH (%): 105.71 ± 15.77 vs. 194.39 ± 5.27 , Mfn2/GAPDH (%): 92.75 ± 10.44 vs. 41.88 ± 3.95 , Opa1/GAPDH (%): 98.14 ± 3.71 vs. 55.94 ± 7.30 , all $P < 0.05$]. Therefore, HL-1 cells were further used to construct the model of infectious cardiomyopathy, and after the HL-1 cells were treated with FCCP could significantly inhibit the protective effect of APS on the model. **Conclusions** APS can inhibit the overexpression of Drp1, inhibit the excessive division of mitochondria, reduce the oxidative stress and mitochondrial damage of infectious cardiomyocytes, and finally improve cardiac function. The discovery of this mechanism can provide a new theoretical basis and clinical reference for the treatment of patients with infectious cardiomyopathy.

[Key words] Astragalus polysaccharide; Septic cardiomyopathy; Dynamin-related protein 1; Oxidative stress; Mitochondrial fission

Fund program: Science and Technology Foundation Project of Health and Family Planning Commission of Tianjin Binhai New Area (2018BWKY013)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.04.016

脓毒症是机体对感染反应失调引起的多器官功能障碍综合征,病情危急,致死率高。其中心脏是脓毒症发展过程中最易受影响的器官之一,感染性心肌病的发病率约为 13.8%。感染性心肌病的表现包括心室扩张、左室射血分数(LVEF)降低和大量心肌细胞死亡^[1]。虽然临床在及时诊断和有效治疗上述疾病方面取得了一定的进展,但脓毒症及感染性心肌病的发病率和病死率仍不断上升^[2]。因此,研究脓毒性心肌病的分子机制和减轻心肌细胞损伤的保护策略具有重要的临床意义。

在中国、日本等亚洲国家,传统中草药被广泛用于治疗各种疾病。黄芪是一种常用的中药材,含有多糖、皂苷、黄酮类化合物、氨基酸等成分,可促进抗体生成和免疫应答^[3]。黄芪多糖(APS)是从黄芪中提取的有效成分之一。据报道,其可促进抗肿瘤免疫反应,增加肿瘤细胞对化疗的敏感性,减少不良反应^[4]。此外,APS还可增加磷酸化蛋白激酶B(AKT)的表达,抵抗骨骼肌萎缩。越来越多的证据表明,APS可通过促进免疫反应发挥抗病毒和抗菌作用^[5]。多项研究表明,APS还可以抑制炎症因子的表达和炎症损伤^[6]。例如,Guo等^[7]研究表明,APS通过AMP激活AMP活化蛋白激酶(AMPK)活性,有效改善棕榈酸诱导的促炎反应。Li等^[8]的研究表明,APS可减轻脂多糖(LPS)诱导的人结肠腺癌细胞(Caco-2)的炎症反应。然而,APS对LPS诱导的心肌细胞炎症损伤的作用及其机制尚不清楚。

研究表明,线粒体功能障碍是脓毒症发展期间心肌细胞死亡和机体发生心衰的主要原因^[9],多种

机制参与线粒体功能障碍的调控,如线粒体呼吸障碍、钙超载、线粒体自噬抑制、线粒体膜损伤、线粒体分裂异常等^[10]。本研究主要从线粒体分裂方面来研究APS对LPS诱导的小鼠心肌损伤的保护作用及其机制。通过腹腔注射LPS建立小鼠脓毒症模型,利用分子生物学方法在建模后观察小鼠心脏功能、心肌细胞炎症指标、心肌线粒体氧化应激、线粒体膜电位(MMP)、三磷酸腺苷(ATP)含量及线粒体分离和融合相关蛋白在小鼠心肌组织中的表达,揭示细胞及线粒体分离可能在脓毒性心肌损伤进程中发挥重要作用,为未来基于线粒体分裂的感染性心肌病治疗提供了新的理论依据和临床诊疗参考。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂: LPS、APS和线粒体氧化磷酸化解偶联剂(FCCP)以及Claycomb培养基、青霉素、链霉素、谷氨酰胺(200 mmol/L)购自美国Sigma公司;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、过敏毒素C3a、线粒体动力相关蛋白1(Drp1)、线粒体分裂蛋白1(Fis1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)、视神经萎缩蛋白1(Opa1)及三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购自美国CST公司,二抗购自美国Jackson公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、组织线粒体分离试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验动物及分组: 18只成年雄性C57BL/6J小鼠,体质量24~26 g,购自斯贝福(北京)生物技术

有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2019-0010。按照随机数字表法将小鼠分为对照组、LPS 组和 LPS+APS 组,每组 6 只。LPS 组小鼠给予腹腔注射 10 mg/kg LPS 1 次;LPS+APS 组小鼠先给予 APS 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射 7 d 预处理,第 7 天在注射 APS 1 h 后注射 8 mg/kg LPS 1 次;对照组给予生理盐水腹腔注射。3 组小鼠均于术后 6 h 经尾静脉取外周血,LPS 处理后 24 h 行心脏超声检查,检查后即刻处死小鼠,然后取小鼠心肌组织行蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测以及线粒体分离。本实验中动物处置过程中所有操作符合动物伦理学标准,动物实验相关方案通过天津市第五中心医院动物伦理委员会批准(审批号:TJWZX2019073)。

1.3 细胞培养及分组:小鼠心房肌细胞株 HL-1 购自美国 ATCC 公司。细胞在特定的培养皿中培养,使用杜尔贝科改良的 Eagle's 培养基(DMEM,美国 Invitrogen 公司),在 37 ℃、5% CO₂、95% 的湿润空气中添加 10% FBS、100 U 青霉素或链霉素以及 2 mmol/L 谷氨酰胺。将细胞分为对照组、LPS 组、LPS+APS 组和 LPS+APS+FCCP 组。LPS 组给予 4 mg/L LPS 处理 24 h;LPS+APS 组先给予 200 mg/L APS 预处理 24 h,再给予 4 mg/L LPS 处理 24 h;LPS+APS+FCCP 组先给予 200 mg/L APS+5 μmol/L FCCP 预处理 24 h,再给予 4 mg/L LPS 处理 24 h;对照组给予同等剂量的 APS 溶剂二甲基亚砜(DMSO)处理。实验结束后进行 MMP、ATP 及 ROS 的检测。

1.4 超声心动图检测:用 1% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉小鼠,置于热垫上。采用 Vevo770 超声成像系统和 716 探针动态评估小鼠心功能。M 型示踪获得左室收缩期末内径(LVESD)和左室舒张期末内径(LVEDD);高分辨率心电图自动获得 LVEF 和左室短轴缩短率(LVFS)。

1.5 ELISA 法检测炎症因子水平:采用 ELISA 法检测小鼠心肌组织 TNF-α、IL-6 和 C3a 水平。

1.6 Western blotting 检测蛋白表达:将等量的蛋白裂解物在十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶上电泳并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。5% 牛奶室温封闭 1 h,4 ℃ 下用不同的一抗对膜进行过夜孵育,然后用二抗在室温孵育 1 h,最后用增强化学发光法进行显色。以 GAPDH 为内参进行分析,以对照组为 1。

1.7 心肌线粒体分离:将小鼠左心室组织进行线粒体分离。使用组织线粒体分离试剂盒通过差异离心分离线粒体和细胞质,并按照试剂盒说明书分离。

1.8 ROS 检测:将分离的线粒体或 HL-1 细胞与荧光探针 DCFH-DA 10 μmol/L 孵育 20 min。线粒体通过荧光读板机检测,HL-1 细胞用激光扫描共聚焦显微镜(Olympus FV 1200)检测细胞荧光变化。DCFH-DA 的激发光和发射光分别为 488 nm 和 525 nm,各组的荧光强度变化以对照组的百分比表示。在整个实验过程中温度保持在 37 ℃。

1.9 MMP 测量:将分离的线粒体或 HL-1 细胞与 10 mg/L JC-1 孵育 20 min。线粒体通过荧光读板机检测,HL-1 细胞用激光扫描共聚焦显微镜(Olympus FV 1200)检测细胞荧光变化。JC-1 单体绿色荧光的激发光和发射光分别为 488 nm 和 525 nm,JC-1 聚合体红色荧光的激发光和发射光分别为 543 nm 和 590 nm。各组的荧光强度变化以聚合体或单体表示,温度维持在 37 ℃。

1.10 ATP 检测:使用基于萤火虫荧光素的 ATP 检测试剂盒,根据说明书检测细胞内 ATP 水平。将心肌细胞裂解,4 ℃ 下以 10 000 g 离心 10 min,每组取等体积上清液,与等体积荧光素或荧光素酶试剂混合,催化 ATP 和荧光素发光。用荧光微板读板机测定化学发光。

1.11 统计学方法:应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。采用 Kolmogorov-Smirnov 法对计量资料进行正态性检验,正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane T2 检验;非正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[$M(Q_L, Q_U)$]表示,多组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的心功能指标(表 1):超声心动图结果显示,LPS 可显著降低小鼠 LVEF、LVFS、LVEDD 和 LVESD,经 APS 预处理后,LPS 诱导的小鼠心功能障碍程度明显减轻(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠的心功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	LVEF	LVFS (%)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)
对照组	6	0.671 ± 0.071	40.21 ± 1.25	4.11 ± 0.21	2.68 ± 0.11
LPS 组	6	0.287 ± 0.045 ^a	21.22 ± 0.99 ^a	2.77 ± 0.05 ^a	1.99 ± 0.04 ^a
LPS+APS 组	6	0.571 ± 0.026 ^b	33.13 ± 2.11 ^b	3.74 ± 0.10 ^b	2.74 ± 0.09 ^b

注:LPS 为脂多糖,APS 为黄芪多糖,LVEF 为左室射血分数,LVFS 为左室短轴缩短率,LVEDD 为左室舒张期末内径,LVESD 为左室收缩期末内径;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 各组小鼠心肌组织血清炎症因子水平及蛋白表达(表 2~3; 图 1): 与对照组相比, 经 LPS 处理后小鼠 TNF- α 、IL-6 和 C3a 水平均明显升高, 而 APS 预处理可明显减轻 LPS 诱导的炎症反应(均 $P < 0.05$)。3 组小鼠心肌组织 TNF- α 、IL-6 和 C3a 的蛋白表达情况与上述结果类似。

表 2 各组小鼠心肌组织 TNF- α 、IL-6 和 C3a 水平比较($\bar{x} \pm s$)

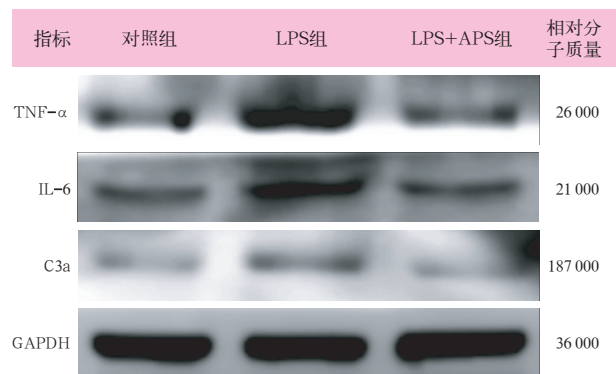
组别	动物数(只)	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	C3a(ng/L)
对照组	6	98.33 $\pm$ 4.71	74.70 $\pm$ 14.39	39.13 $\pm$ 3.71
LPS 组	6	210.73 $\pm$ 12.38 ^a	225.32 $\pm$ 5.42 ^a	104.42 $\pm$ 10.80 ^a
LPS+APS 组	6	137.50 $\pm$ 9.44 ^b	90.22 $\pm$ 10.44 ^b	53.92 $\pm$ 7.22 ^b

注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

表 3 各组小鼠心肌组织 TNF- α 、IL-6 和 C3a 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TNF- α /GAPDH(%)	IL-6/GAPDH(%)	C3a/GAPDH(%)
对照组	6	100.00 $\pm$ 5.09	100.00 $\pm$ 4.32	100.00 $\pm$ 9.30
LPS 组	6	173.21 $\pm$ 12.43 ^a	185.72 $\pm$ 15.77 ^a	208.11 $\pm$ 15.38 ^a
LPS+APS 组	6	102.73 $\pm$ 18.61 ^b	114.61 $\pm$ 12.41 ^b	138.27 $\pm$ 7.21 ^b

注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$



LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠心肌组织 TNF- α 、IL-6 和 C3a 蛋白表达

2.3 各组小鼠心肌组织的 ROS、MMP 和 ATP 含量(表 4): DCFH-DA 检测结果显示, LPS 处理可促进线粒体 ROS 生成, 而 APS 预处理抑制 LPS 诱导的 ROS 产生。进一步通过 JC-1 探针检测发现, LPS 处理使 MMP 显著降低, 红色荧光减少, 绿色荧光增加, 而 APS 预处理可改善 MMP。由于 LPS 介导的 MMP 降低, LPS 组的 ATP 含量也受到抑制, 而 APS 处理则可显著改善这种影响(均 $P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠心肌组织的 ROS、MMP 和 ATP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ROS(%)	MMP(红色/绿色荧光强度比值)	ATP(%)
对照组	6	100.00 $\pm$ 0.00	1.08 $\pm$ 0.08	100.00 $\pm$ 0.00
LPS 组	6	260.97 $\pm$ 19.22 ^a	0.55 $\pm$ 0.01 ^a	58.74 $\pm$ 5.39 ^a
LPS+APS 组	6	138.39 $\pm$ 9.28 ^b	0.91 $\pm$ 0.05 ^b	94.22 $\pm$ 10.11 ^b

注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, ROS 为活性氧, MMP 为线粒体膜电位, ATP 为三磷酸腺苷; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

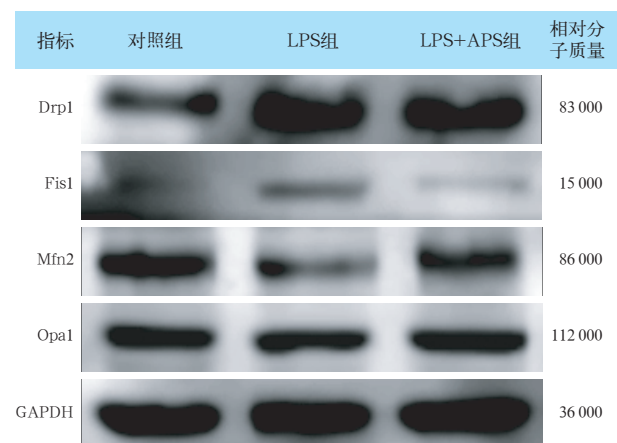
2.4 各组小鼠心肌组织线粒体相关蛋白表达(表 5; 图 2): LPS 可促进 Drp1 和 Fis1 蛋白表达, 抑制 Mfn2 和 Opa1 蛋白表达, 而 APS 处理可明显抑制 LPS 对线粒体分裂和融合相关蛋白的影响(均 $P < 0.05$)。

表 5 各组小鼠心肌组织的线粒体分裂和融合相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Drp1/GAPDH(%)	Fis1/GAPDH(%)
对照组	6	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
LPS 组	6	218.75 $\pm$ 19.44 ^a	194.39 $\pm$ 5.27 ^a
LPS+APS 组	6	126.33 $\pm$ 11.70 ^b	105.71 $\pm$ 15.77 ^b

组别	动物数(只)	Mfn2/GAPDH(%)	Opa1/GAPDH(%)
对照组	6	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
LPS 组	6	41.88 $\pm$ 3.95 ^a	55.94 $\pm$ 7.30 ^a
LPS+APS 组	6	92.75 $\pm$ 10.44 ^b	98.14 $\pm$ 3.71 ^b

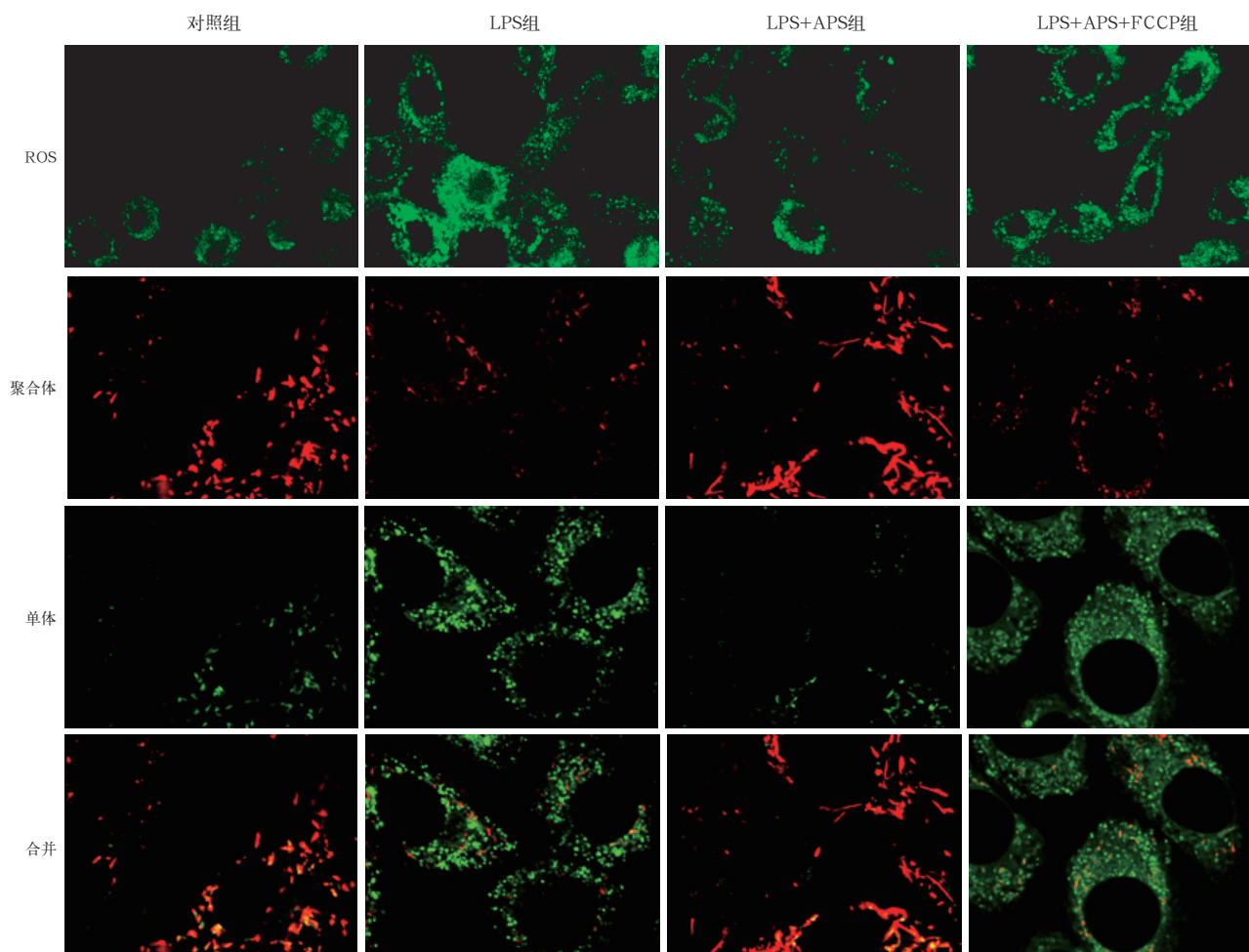
注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, Drp1 为线粒体动力相关蛋白 1, Fis1 为线粒体分裂蛋白 1, Mfn2 为线粒体融合蛋白 2, Opa1 为视神经萎缩蛋白 1; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$



LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, Drp1 为线粒体动力相关蛋白 1, Fis1 为线粒体分裂蛋白 1, Mfn2 为线粒体融合蛋白 2, Opa1 为视神经萎缩蛋白 1, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠心肌组织的线粒体分裂和融合相关蛋白表达

2.5 小鼠心房肌 HL-1 细胞株 ROS、MMP 和 ATP 含量(图 3; 表 6): LPS 可明显促进心肌细胞氧化应激, 降低 MMP 及 ATP 含量; 而 APS 处理后, 上述损伤效应恢复至接近正常水平(均 $P < 0.05$); FCCP 处理



注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, FCCP 为线粒体氧化磷酸化解偶联剂, ROS 为活性氧, MMP 为线粒体膜电位

图 3 共聚焦显微镜下观察各组小鼠心房肌 HL-1 细胞株 ROS 和 MMP 变化

可明显抑制 APS 对心肌细胞氧化应激和线粒体功能的保护作用(均 $P < 0.05$)。

表 6 各组小鼠心房肌 HL-1 细胞株的 ROS、MMP 和 ATP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	ROS (%)	MMP(红色/绿色 荧光强度比值)	ATP (%)
对照组	6	100.00 ± 0.00	0.99 ± 0.08	100.00 ± 0.00
LPS 组	6	293.14 ± 20.79 ^a	0.45 ± 0.06 ^a	52.14 ± 3.39 ^a
LPS+APS 组	6	128.43 ± 7.28 ^b	0.89 ± 0.09 ^b	96.28 ± 11.10 ^b
LPS+APS+ FCCP 组	6	251.39 ± 9.40 ^c	0.50 ± 0.01 ^c	59.79 ± 5.41 ^c

注: LPS 为脂多糖, APS 为黄芪多糖, FCCP 为线粒体氧化磷酸化解偶联剂, ROS 为活性氧, MMP 为线粒体膜电位, ATP 为三磷酸腺苷;与对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$;与 LPS+APS 组比较, ^c $P < 0.05$

3 讨论

流行病学调查结果显示,近二十年来脓毒症的发病率和病死率逐年上升,给全球带来重大的经济负担。研究表明,脓毒症患者的病死率与心功能障碍有一定相关性^[11]。因此,寻找一种抑制脓毒性心

肌病发生发展的有效药物具有重要意义。在疾病治疗中,由于植物及其衍生物的功能多样且不良反应小,应用日益增多^[12]。例如,白桑种子的提取物具有显著的抗氧化和抗癌特性^[13]。多种植物中的多糖是由单糖及其衍生物构成,如葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖等^[14]。从枸杞、灵芝、羊肚等植物中分离得到的丹参多糖通过改善氧化应激和抑制心肌细胞凋亡,从而发挥抗大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的作用^[15]。APS 是从黄芪中提取的一种多糖,黄芪是一种具有 3 000 多年临床应用历史的中草药,分布于我国内蒙古、山西、甘肃等省份。研究表明,APS 具有免疫调节、抑制炎症反应、减轻心肌损伤、保护心血管内皮细胞、抗糖尿病、抗心肌肥厚、抗病毒、抗辐射等作用^[4, 16]。APS 在治疗感染性心肌病过程中也发挥着重要作用,但其确切的分子机制尚不清楚。本研究通过超声心动图、荧光染色和 Western blotting 等方法探讨 APS 对感染性心肌病所致炎症反应的影响,并探讨其抗炎机制。

线粒体功能障碍是脓毒症发展期间机体心肌细胞死亡和发生心衰的主要原因之一。研究表明,在心肌炎症反应和心肌细胞死亡之前就已经出现线粒体功能障碍^[17]。目前,关于脓毒性心肌病发展过程中线粒体功能障碍的机制可能包括以下几个方面^[18]:线粒体呼吸障碍、钙超载、线粒体自噬抑制、线粒体分裂异常和线粒体膜损伤。其中线粒体分裂增加促进线粒体碎片的形成,从而导致线粒体损伤^[19]。在心肌 I/R 损伤、脂肪肝、糖尿病肾病和癌症中,线粒体分裂过度活化引起线粒体损伤,促进功能性细胞死亡^[20]。近期研究表明,线粒体分裂在脓毒性心肌损伤进展中同样发挥着重要作用^[21-22]。

多项研究表明,APS 对心血管疾病有一定保护作用。在豚鼠 I/R 损伤模型中,APS 通过增强超氧化物歧化酶(SOD)活性和降低线粒体损伤,从而减轻离体豚鼠心脏 I/R 损伤^[23]。在肥胖小鼠中,APS 抑制过氧化物酶体增殖物激活受体活化,从而抑制脂肪细胞分化,提高胰岛素敏感性^[24]。分子水平的相关研究表明,APS 可调控线粒体氧化应激、凋亡和代谢等^[25],但在脓毒性心肌病中对线粒体分裂的影响尚未进一步探索。

本研究显示,APS 对感染性心肌损伤的保护作用与 Drp1 相关线粒体分裂密切相关,APS 预处理可改善 LPS 对小鼠心脏功能的影响(如降低 LVEF、LVFS、LVEDD 和 LVESD),抑制 LPS 诱导的炎症反应。相关机制方面,APS 预处理可抑制 Drp1 的表达,进而抑制线粒体分裂。由于鸢尾素对线粒体分裂有抑制作用,在 LPS 诱导的感染性心肌病中,APS 预处理可维持线粒体功能,保持心肌细胞活性,改善心功能。

综上所述,虽然多项研究表明,APS 对线粒体和再灌注心脏有保护作用,但本研究显示,APS 预处理通过调控 Drp1 蛋白表达抑制线粒体过度分裂,增强感染性心肌细胞活性。一方面,线粒体分裂相关因子参与感染性心肌病的发生发展过程;另一方面,APS 在临床上或许可作为一种纠正线粒体过度分裂的药物,抑制感染性心肌病的发展,为治疗感染性心肌病提供了新的理论依据和临床诊疗参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 卢年芳,席修明.感染性心肌病的研究进展[J/CD].中华重症医学电子杂志(网络版),2016,2(3):199-204. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-1537.2016.03.013.
- [2] Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, et al. Pathology and pathogenesis of chagas heart disease[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 421-447. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
- [3] Shan H, Zheng XP, Li M. The effects of astragalus membranaceus

- active extracts on autophagy-related diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1904. DOI: 10.3390/ijms20081904.
- [4] Zheng YJ, Ren WY, Zhang LN, et al. A review of the pharmacological action of astragalus polysaccharide[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 349. DOI: 10.3389/fphar.2020.00349.
- [5] Lu L, Huang YF, Chen DX, et al. Astragalus polysaccharides decrease muscle wasting through Akt/mTOR, ubiquitin proteasome and autophagy signalling in 5/6 nephrectomised rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 186: 125-135. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.068.
- [6] Liu TL, Zhang MJ, Niu HY, et al. Astragalus polysaccharide from Astragalus Melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway and protects mice from CVB3-induced virus myocarditis[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 179-186. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.207.
- [7] Guo SQ, Ma BJ, Jiang XK, et al. Astragalus polysaccharides inhibits tumorigenesis and lipid metabolism through miR-138-5p/SIRT1/SREBP1 pathway in prostate cancer[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 598. DOI: 10.3389/fphar.2020.00598.
- [8] Li YL, Xu YJ, Pan C, et al. TRIF is essential for the anti-inflammatory effects of Astragalus polysaccharides on LPS-infected Caco2 cells[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 159: 832-838. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.005.
- [9] 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.
- [10] Kumar AA, Kelly DP, Chirinos JA. Mitochondrial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction[J]. Circulation, 2019, 139(11): 1435-1450. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036259.
- [11] 张晓凡,李莉.脓毒症心肌损伤机制研究及治疗进展[J].中华急诊医学杂志,2015,24(3):339-341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.03.027.
- [12] Xu HY, Zhang YQ, Liu ZM, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D976-D982. DOI: 10.1093/nar/gky987.
- [13] Dabili S, Fallah S, Aein M, et al. Survey of the effect of doxorubicin and flavonoid extract of white Morus alba leaf on apoptosis induction in a-172 GBM cell line[J]. Arch Physiol Biochem, 2019, 125(2): 136-141. DOI: 10.1080/13813455.2018.1441871.
- [14] Yu Y, Shen MY, Song QQ, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: a review[J]. Carbohydr Polym, 2018, 183: 91-101. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.
- [15] Song MB, Huang L, Zhao G, et al. Beneficial effects of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2): 1631-1636. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.020.
- [16] 王承娟,祝益民.黄芩及其有效成分对脓毒症心肌保护作用的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2016,23(3):325-327. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.029.
- [17] Ward PA, Fattahi F. New strategies for treatment of infectious sepsis[J]. J Leukoc Biol, 2019, 106(1): 187-192. DOI: 10.1002/JLB.4MIR1118-425R.
- [18] 李昕原,吴彩军,郭楠,等.脓毒性心肌病的研究进展[J].中国中西医结合急救杂志,2019,26(3):373-378. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.03.030.
- [19] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75-87. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
- [20] Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 235-259. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711.
- [21] Haileselassie B, Mukherjee R, Joshi AU, et al. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 130: 160-169. DOI: 10.1016/j.yjmec.2019.04.006.
- [22] 罗诗雨,李光素,耿争光,等.UCP2 过表达对脓毒症大鼠心肌线粒体动力学的影响[J].中华危重病急救医学,2019,31(10):1275-1280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.018.
- [23] 张海宁,闵冬雨,傅明玉,等.黄芩及其活性成分对离体豚鼠心脏的作用[J].中华心血管病杂志,2014,42(9):759-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2014.09.011.
- [24] Chen W, Chen WJ, Xia YP, et al. Therapy with Astragalus polysaccharides rescues lipotoxic cardiomyopathy in MHC-PPAR α mice[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2449-2459. DOI: 10.1007/s11033-012-2325-1.
- [25] Yu J, Ji HY, Dong XD, et al. Apoptosis of human gastric carcinoma MGC-803 cells induced by a novel *Astragalus membranaceus* polysaccharide via intrinsic mitochondrial pathways[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 126: 811-819. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.268.

(收稿日期:2020-11-18)