·基础研究·

褪黑素通过介导线粒体自噬改善糖尿病心肌梗死后心肌损伤

焦阳[1,2],王继航[1,3],李影[1,2],沈建[1,2],侯小玲[2],沈明志[3],付振虹[2*]

([1]解放军医学院,北京 100853;[2]中国人民解放军总医院第六医学中心心血管病医学部,北京 100853;[3]中国人民解放军总医院海南医院心血管内科,海南 三亚 572013)

【摘 要】 目的 探讨褪黑素通过介导线粒体自噬对糖尿病(DM)心肌梗死(MI)后心肌损伤的保护作用及相关机制。**方法** 将32只C57BL/6J雄性小鼠按照随机数表法随机分为4组,每组8只:(1)假手术组(sham组);(2)糖尿病组(DM组);(3)糖尿病急性心肌梗死组(DMI组);(4)糖尿病急性心肌梗死+褪黑素组(DMI+Mel组)。4周后行超声心动图检测小鼠心脏功能。取心脏行切片染色,检测小鼠心肌间质纤维化程度和心肌细胞凋亡水平。培养H9c2细胞,分为以下4组:(1)对照组(CON组);(2)高糖高脂组(HG/HF组);(3)高糖高脂缺氧组(HG/HF+hypoxia组);(4)HG/HF+hypoxia+Mel组。行相应处理后,采用蛋白质印迹法检测B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3蛋白(Caspase-3)、Bcl-2关联X蛋白(Bax)和微管相关蛋白1轻链3-β(LC3)、死骨片蛋白1(P62)、帕金蛋白(Parkin)等线粒体自噬相关蛋白的表达,采用荧光素酶法检测细胞内三磷酸腺苷(ATP)浓度。采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。根据数据类型,分别采用方差分析和Dunnett法进行组间比较。**结果** 与sham组相比,DMI组和DMI+Mel组小鼠的左心室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)显著降低;左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD)、心肌细胞横截面积、间质纤维化程度和细胞凋亡率显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与DMI组相比,DMI+Mel组小鼠的心功能明显改善;LVESD、LVEDD、心肌细胞横截面积、间质纤维化程度和细胞凋亡率显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与CON组相比,HG/HF组和HG/HF+hypoxia组细胞Bax、Caspase-3、P62表达显著升高,Bcl-2、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ及Parkin水平显著降低,细胞内ATP含量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与HG/HF组和HG/HF+hypoxia组相比,HG/HF+hypoxia+Mel组细胞Bax、Caspase-3、P62表达显著降低,Bcl-2、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Parkin水平显著升高,细胞内ATP含量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 褪黑素可通过增强线粒体自噬减轻糖尿病心肌梗死后心肌细胞的损伤,从而改善心脏功能。

【关键词】 褪黑素;线粒体自噬;糖尿病;心肌梗死;心肌损伤

【中图分类号】 R541.4 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.03.045

Melatonin ameliorates myocardial injury after myocardial infarction with diabetes mellitus by mediating mitophagy

JIAO Yang[1,2], WANG Ji-Hang[1,3], LI Ying[1,2], SHEN Jian[1,2], HOU Xiao-Ling[2], SHEN Ming-Zhi[3], FU Zhen-Hong[2*]

([1]Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; [2]Senior Department of Cardiology, Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; [3]Department of Cardiology, Hainan Hospital, Chinese PLA General Hospital, Sanya 572000, Hainan Province, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of melatonin (Mel) on myocardial injury after myocardial infarction (MI) with diabetes mellitus(DM) by mediating mitophagy. **Methods** Thirty-two male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups, with eight mice in each group, that is, sham operation group (sham group), DM group, MI with DM group (DMI group), and DMI+Mel group. Echocardiography was performed after four weeks to detect the cardiac function, and hearts were removed and sectioned for staining to detect the degree of myocardial interstitial fibrosis and myocardial apoptosis. H9c2 cells were cultured and divided into four groups, that is, control group (CON group), high glucose and high fatty acid group (HG/HF group), HG/HF+hypoxia group (HG/HF+hypoxia group) and HG/HF+hypoxia+Mel group. The apoptosis-related protein levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-3), Bcl2-associated X (Bax) and the mitophapy-related protein levels of microtubules associated protein 1 light chain3-β (LC3), sequestosome-1 (P62), Parkin protein were detected

收稿日期:2021-12-01;**接受日期**:2022-01-13

基金项目:国家自然科学基金(81500269)

通信作者:付振虹,E-mail:fuzhenh@126.com

by Western blotting, and the intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration was detected by the luciferase enzyme. **Results** Compared with the sham group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of DMI group and DMI+Mel group were significantly decreased ($P<0.05$), and the left ventricular end-systolic dimension (LVESD), left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD), cardiomyocyte cross-sectional area, myocardial interstitial fibrosis area and myocardial apoptosis rates were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the DMI group, the cardiac function of the DMI+Mel group was significantly improved ($P<0.05$), and the LVESD, LVEDD, cardiomyocyte cross-sectional area, myocardial interstitial fibrosis area and myocardial apoptosis rates were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the CON group, the expression levels of Bax, Caspase-3, P62 of the HG/HF group and HG/HF+hypoxia group were significantly decreased ($P<0.05$), the expression levels of Bcl-2, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ, Parkin and the intracellular ATP concentration were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the HG/HF group and HG/HF+hypoxia group, Mel supplementation can reverse these results. **Conclusion** Melatonin is likely to reduce myocardial injury after MI with DM by enhancing mitophagy level, thereby improving cardiac function.

【Key words】 melatonin; mitophagy; diabetes mellitus; myocardial infarction; myocardial injury

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81500269).

Corresponding author: FU Zhen-Hong, E-mail: fuzhenh@126.com

《中国心血管病报告2020》显示我国心血管病人数3.3亿,死亡率居首位,其中冠心病(coronary heart disease, CHD)患者1139万人。虽然药物和介入手术治疗降低了心肌梗死(myocardial infarction, MI)相关死亡的发生率,但由于心肌细胞不可再生,急性缺血造成的不可逆心肌细胞凋亡和梗死灶的形成,成为急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)预后不佳的重要因素[1]。糖尿病(diabetes mellitus, DM)是CHD的独立危险因素,心肌梗死后28 d的死亡率是非糖尿病患者的2倍[2]。线粒体损伤是MI后心肌受损的关键信号机制,受损的线粒体通过自噬途径被清除,进而维持线粒体质量和数量的稳定[3]。DM患者心肌梗死后线粒体自噬作用减弱,线粒体结构和功能受损严重,加重心肌细胞凋亡。褪黑素(melatonin, Mel)是一种有效的抗氧化剂,对包括糖尿病、感染性疾病、代谢综合征等多种疾病均有益处[4]。Mel能有效减轻线粒体功能障碍,抑制心肌梗死后心肌细胞的损伤。然而,Mel是否通过增强线粒体自噬而发挥MI后心肌保护作用,其具体机制还有待进一步明确,特别是在合并DM的AMI中的作用,还未见确切报道。本研究通过构建小鼠糖尿病急性心肌梗死和细胞高糖高脂缺氧模型,观察Mel通过增强线粒体自噬减少心肌细胞损伤,从而改善心脏功能的潜在机制,旨在为合并DM的AMI患者提供新的临床治疗靶点提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

褪黑素、链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(默克公司, 美国);异氟烷(北京阳光英锐生物有限公司);棕榈酸(北京金鑫博达生物技术中心);一抗:B细胞淋巴瘤-2蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase-3)抗体、Bcl-2关联X蛋白(Bcl2-associated X, Bax)抗体和微管相关蛋白1轻链3-β(microtubules associated protein 1 light chain3-β, LC3)抗体、死骨片蛋白1(sequestosome 1, SQSTM1/P62)抗体、帕金蛋白(Parkin)抗体,β-肌动蛋白(β-actin)抗体和二抗(北京乾兆有限公司, 中国);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度检测试剂盒、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);其他由解放军总医院心内科和心外科基础实验室提供。

1.2 实验动物与分组

本实验中所使用的实验动物为雄性C57BL/6J小鼠(6~8周龄),体质量20 g左右,均购自斯贝福(北京)生物有限公司。本实验根据国家卫生研究院实验动物使用指南(No. 8523, revised 1996)实施,并由中国人民解放军总医院伦理委员会批准。根据随机数表法将小鼠随机分为4组:假手术组(sham组)、糖尿病组(DM组)、糖尿病心肌梗死组(DMI组)、糖尿病心肌梗死+褪黑素组(DMI+Mel组),每组8只。DMI+Mel组小鼠在心肌梗死术后经过腹腔注射方法补充Mel,剂量为50 mg/(kg·d),直到第4周实验结束。

1.3 建立小鼠模型

1.3.1 糖尿病模型 高脂饲料(脂肪含量60%, 北京斯贝福生物有限公司)连续喂养小鼠4周,禁食12 h后,经腹腔注射0.1 ml浓度为1%的链脲霉素

(streptozotocin, STZ)溶液,连续 5 d。STZ 溶液使用 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液配置。注药后 2 h 恢复饮食,第 6 天早上测尾静脉空腹血糖,空腹血糖>11.1 mmol/L 则建模成功。0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液配置方法如下。A 液:一水合柠檬酸 2.1 g 溶于 100 ml 双蒸水(double distilled water, ddH_2O);B 液:柠檬酸钠 2.94 g 溶于 100 ml ddH_2O,用时现配,A 液与 B 液按照体积 123∶77 混合使用,pH 值 4.2~4.5。

1.3.2 急性心肌梗死模型 术前将小鼠胸前区毛发褪去。小鼠置于小动物气体麻醉机中用 1.5%异氟烷(氧气气化混合)麻醉 2 min。麻醉好的小鼠置于手术台上,底部放加热垫保持体温,整个手术过程持续异氟烷气体麻醉。固定小鼠四肢于手术板,沿胸骨尖至左侧腋下剪开皮肤约 1.5 cm,5-0 手术缝线荷包缝合切口但不收紧,钝性分离胸前肌群,尖口钳于第 4 肋间打开肋间隙,左手手指将心脏推出体外,暴露左心耳,从左心耳下缘 2~3 mm 处进针,以 7-0 手术缝线结扎冠状动脉前降支,可见心脏前壁和心尖组织变白,将心脏还纳回胸腔,迅速关闭胸腔,挤压胸腔充分排气,防止气胸,收紧荷包打结。从挤出心脏到还纳心脏整个过程控制在 30 s 左右,不要超过 1 min。术后小鼠注意保暖,直至苏醒活动自如。Sham 组、DM 组与上述过程相同,只是不结扎冠状动脉。

1.4 细胞的培养与处理

在杜尔贝科改良培养基(Dulbecco′s modified eagle′s medium, DMEM)内加入 10%的胎牛血清、100 U/mL 的链霉素和 100 U/mL 的青霉素,以下简称完全培养基。完全培养基在 95%湿度的恒温培养箱(37℃,CO_2 含量为 5%)培养 H9c2 细胞。细胞实验与动物实验对应,分为以下 4 组。(1)对照组(CON 组):完全培养基培养;(2)高糖高脂组(HG/HF 组):在 HG/HF 培养基(完全培养基中添加 33 mmol/L 葡萄糖和 500 μmol/L 棕榈酸)中培养;(3)高糖高脂缺氧组(HG/HF+hypoxia 组):细胞在 HG/HF 培养基中培养 12 h 后在缺氧孵箱(孵箱内充满 94% N_2,5% CO_2 和 1% O_2 的气体,湿度为 95%)孵育 6 h;(4)高糖高脂缺氧+Mel 组(HG/HF+hypoxia+Mel 组):细胞在 HG/HF 培养基中培养 12 h,加入 100 μmol/L 褪黑素后缺氧处理 6 h。每组重复 5 遍。

1.5 检测指标

1.5.1 多普勒超声评价小鼠心功能 在术后第 4 周行超声心动图检查。小鼠经异氟烷麻醉后置于平台上利用小动物超声(西门子公司,美国)检测心脏功能。采集所有小鼠的 M 型超声心动图、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)和左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD),这些指标均通过连续测量 3 个心动周期后取平均值得出。

1.5.2 心脏组织病理学检测 将小鼠麻醉后处死,取出心脏,用磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)充分清洗血凝块后制成石蜡包块,切成 3~5 μm 的切片,然后分别进行 HE 染色观察组织形态学改变、Masson 染色评价心肌纤维化程度、原位末端标记法(terminal-deoxynucleoitidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)荧光染色观察心肌凋亡情况。(1)HE 染色。组织切片脱蜡后使用苏木素染液染细胞核、伊红染液染胞浆。无水乙醇脱水后,使用二甲苯透明。封片后在显微镜下观察。(2)Masson 染色。组织切片脱蜡后使用重铬酸钾染液染色。使用铁苏木素染液染细胞核,漂洗干净后使用丽春红酸性品红染液染色。冰醋酸漂洗后使用磷钼酸水溶液浸染,放入苯胺蓝染液中染色。分化、脱水、透明处理后封片,在显微镜下观察。图像中蓝色区域是胶原阳性染色,排除心内膜、心外膜和血管周围纤维化的蓝色区域,心肌间质纤维化的面积使用蓝染区域的面积占整个图像的百分比来计算。(3)TUNEL 染色。将组织切片脱蜡后滴加蛋白酶 K 处理。按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒使用说明配制 TUNEL 检测液。处理好的样品上加 TUNEL 检测液,37 ℃避光孵育后加入活细胞染色液(Hoechst 33342)染细胞核。封片后在荧光显微镜下观察。视野中绿色荧光代表凋亡细胞,蓝色荧光是使用 Hoechst 染液染的正常心肌细胞核,通过计算凋亡细胞百分比(视野中凋亡细胞/总细胞,%)评估细胞凋亡程度。

1.5.3 心肌细胞凋亡检测 通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞凋亡相关蛋白的含量。将 H9c2 细胞消化、匀浆、裂解,提取蛋白,用 BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度,然后电泳、转膜、封闭、洗膜。在摇床上室温封闭 1 h,TBST 缓冲液漂洗后,分别加入抗 Bax(1∶5000)、Bcl-2(1∶1 000)、Caspase-3(1∶1 000)和 β-actin(1∶5 000)一抗孵育,4 ℃过夜,加入兔抗鼠 IgG(1∶5 000)二抗,增强化学发光成像。使用 Image J 软件对条带进行灰度值分析,计算目标

蛋白表达量。

1.5.4 细胞内ATP浓度检测 吸去培养液,加入裂解液裂解细胞,4 ℃ 12 000 g离心5 min后取上清液用于检测,加100 μl ATP检测工作液到检测管,室温放置3~5 min后加入20 μl样品,至少间隔2 s后,用化学发光仪测定相对发光单位(relative light unit, RLU),根据标准曲线计算出样品中ATP的浓度。

1.5.5 线粒体自噬检测 Western blotting法检测线粒体自噬相关蛋白的含量,具体方法同上。电泳、转膜、封闭、洗膜,加入LC3抗体(1∶1 000)、P62抗体(1∶10 000)、Parkin抗体(1∶2 000)、β-actin抗体(1∶5 000)一抗孵育,4 ℃过夜,加入兔抗鼠IgG(1∶5 000)二抗,增强化学发光成像,对条带进行灰度值分析,计算目标蛋白表达量。

1.6 统计学处理

采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组内两两比较采用Dunnett法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4组小鼠心功能和心脏结构变化

在心肌梗死术后4周,使用小动物超声测量各组小鼠的LVEF、LVFS、LVESD和LVEDD评估心功能和心脏结构变化。与sham组相比,DM组小鼠LVEF、LVFS有所下降,LVESD和LVEDD指标升高,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。DMI组和DMI+Mel组小鼠LVEF、LVFS均较sham组明显下降,LVESD、LVEDD较sham组明显升高,DMI+Mel组这4项指标均优于DMI组,差异均有统计学意义($P<0.05$;图1,表1)。

2.2 4组小鼠心肌细胞形态、间质纤维化程度和心肌细胞凋亡情况比较

在心肌梗死术后4周,对小鼠心脏进行组织切片染色(HE染色),观察心肌细胞形态,测量心肌细胞横截面积大小。Masson染色评价心肌间质纤维化程度。结果显示,DM组心肌细胞横截面积和心肌间质纤维化程度较sham组,差异无统计学意义($P>0.05$);但DMI组和DMI+Mel组心肌细胞横截面积和心肌间质纤维化程度均显著增加,而Mel可以显著减轻心肌细胞横截面积的增大和心肌间质纤维化的程度,差异有统计学意义($P<0.05$)。

通过TUNEL荧光染色评估心肌细胞凋亡情况。Sham组和DM组心肌细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$);DMI组和DMI+Mel组细胞凋亡率均显著高于sham组和DM组,但DMI+Mel组细胞凋亡率低于DMI组,差异均有统计学意义($P<0.05$;图2,表2)。

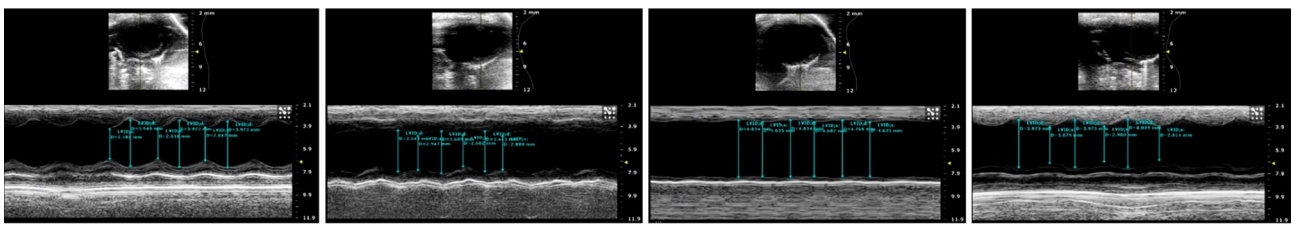


图1 心肌梗死术后4周4组小鼠心脏功能情况

Figure 1 Cardiac function of mice in four groups at four weeks after myocardial infarction

DM: diabetes mellitus; DMI: diabetes mellitus with myocardial infarction; Mel: melatonin.

表1 心肌梗死术后4周4组小鼠超声心动图指标情况比较

Table 1 Comparison of echocardiography indicators among four groups of mice at four weeks after myocardial infarction

($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	LVEF(%)	LVFS(%)	LVESD(mm)	LVEDD(mm)
Sham	56.29±1.29	28.31±1.15	3.06±0.21	3.75±0.19
DM	55.33±1.71	26.97±0.59	3.14±0.31	3.96±0.23
DMI	25.14±2.50$^{*\#}$	13.33±0.90$^{*\#}$	5.59±0.24$^{*\#}$	6.04±0.15$^{*\#}$
DMI+Mel	38.69±0.76$^{*\#\triangle}$	18.37±0.62$^{*\#\triangle}$	4.46±0.25$^{*\#\triangle}$	4.79±0.18$^{*\#\triangle}$

LVEF: left ventricular ejection fraction; LVFS: left ventricular fractional shortening; LVESD: left ventricular end-systolic dimension; LVEDD: left ventricular end-diastolic dimension; DM: diabetes mellitus; DMI: diabetes mellitus with myocardial infarction; Mel: melatonin. Compared with sham group, $^{*}P<0.05$; compared with DM group, $^{\#}P<0.05$; compared with DMI group, $^{\triangle}P<0.05$.

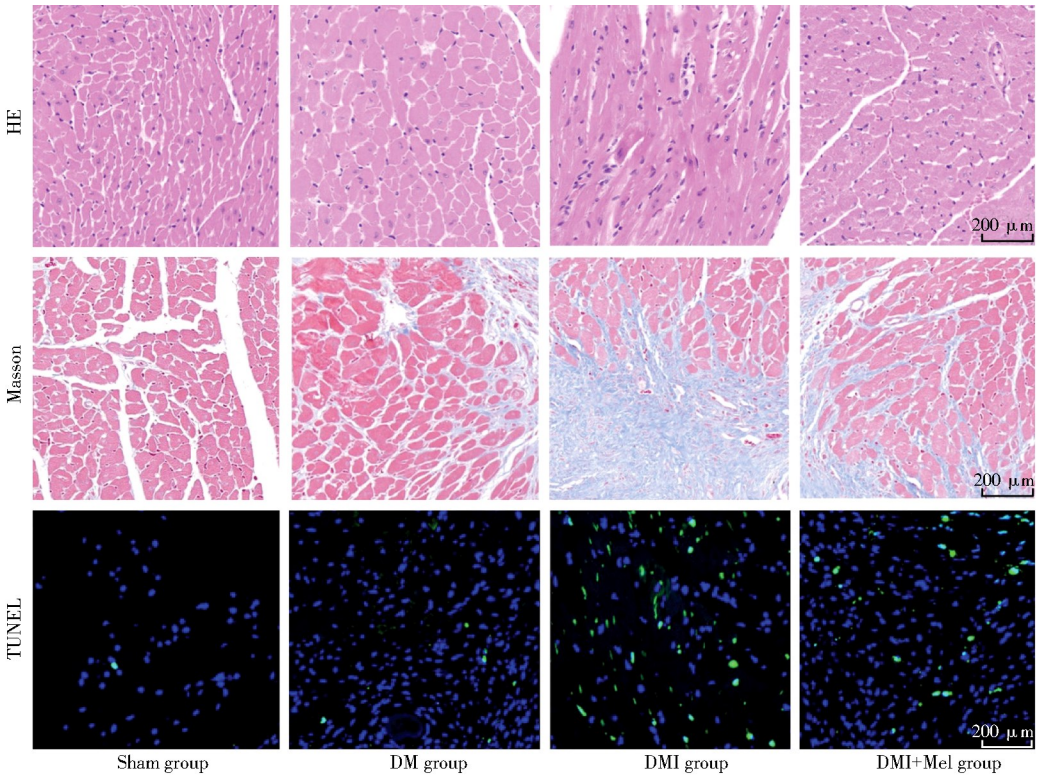


图 2 心脏组织切片染色评估心肌细胞横截面积、间质纤维化和心肌细胞凋亡情况

Figure 2 Cardiomyocyte cross-sectional area, myocardial interstitial fibrosis area and myocardial apoptosis assessed using stained cardiac tissue sections

DM: diabetes mellitus; DMI: diabetes mellitus with myocardial infarction; Mel: melatonin.

表 2 4 组小鼠心肌细胞横截面积、间质纤维化面积和细胞凋亡率比较

Figure 2 Comparison of cardiomyocyte cross-sectional area, interstitial fibrosis area and apoptosis rate among four groups of mice ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cardiomyocyte cross-sectional area(μm^2)	Interstitial fibrosis area(%)	Apoptosis rate(%)
Sham	151.84±14.53	3.71±0.69	1.33±0.09
DM	167.64±10.82	4.44±1.27	1.71±0.38
DMI	231.47±11.66 $^{*\#}$	48.36±4.43 $^{*\#}$	17.74±2.29 $^{*\#}$
DMI+Mel	202.15±8.19 $^{*\#\triangle}$	36.87±3.42 $^{*\#\triangle}$	12.85±1.39 $^{*\#\triangle}$

DM: diabetes mellitus; DMI: diabetes mellitus with myocardial infarction; Mel: melatonin. Compared with sham group, $^{*}P<0.05$; compared with DM group, $^{\#}P<0.05$; compared with DMI group, $^{\triangle}P<0.05$.

2.3 4 组小鼠 H9c2 细胞凋亡相关蛋白的表达情况

与 CON 组相比,HG/GF 组、HG/HF+hypoxia 组和 HG/HF+hypoxia+Mel 组 Bax 和 Caspase-3 表达显著上调,Bcl-2 表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 HG/GF 组和 HG/HF + hypoxia + Mel 组相比,HG/HF+hypoxia 组 Bax 和 Caspase-3 表达显著上调,Bcl-2 表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$;图 3)。与 TUNEL 染色结果相一致,Mel 在高糖高脂和缺氧加重心肌细胞凋亡的过程中起保护作用。

2.4 4 组小鼠 H9c2 细胞内 ATP 浓度比较

细胞内 ATP 含量是反映线粒体功能的一项敏感指标[5]。为了测定线粒体的功能,本研究检测了 4 组小鼠细胞中 ATP 的平均浓度。与 CON 组相比,HG/HF+hypoxia 组的 ATP 浓度从(7.92±0.29)μmol/L 下降至(0.35±0.12)μmol/L,而加入 Mel 后,细胞内 ATP 浓度升高至(3.78±0.27)μmol/L。因此,Mel 可以减轻高糖高脂和缺氧造成的 ATP 含量降低,有效改善线粒体因高糖高脂和缺氧所造成的损伤(图 4)。

2.5 4 组小鼠 H9c2 细胞线粒体自噬相关蛋白的表达情况

LC3 和 P62 是线粒体自噬相关蛋白,自噬小体形成时,胞浆型 LC3(即 LC3-Ⅰ)会被酶解掉一段多肽,形成膜型 LC3(即 LC3-Ⅱ),LC3-Ⅱ/Ⅰ比值升高、P62 表达下调[6]。Parkin 是线粒体自噬特异性蛋白,当线粒体自噬增强时,Parkin 表达升高[7]。本研究结果显示,高糖高脂和缺氧损伤显著降低了 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值和 Parkin 蛋白的表达,增加了 P62 的表达,表明线粒体自噬减弱,而 HG/HF+hypoxia+Mel 组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值和 Parkin 蛋白表达水平显著高于其余 3 组,P62 表达显著低于其余 3 组($P<0.05$;图 5),因此 Mel 可以增强线粒体自噬水平。

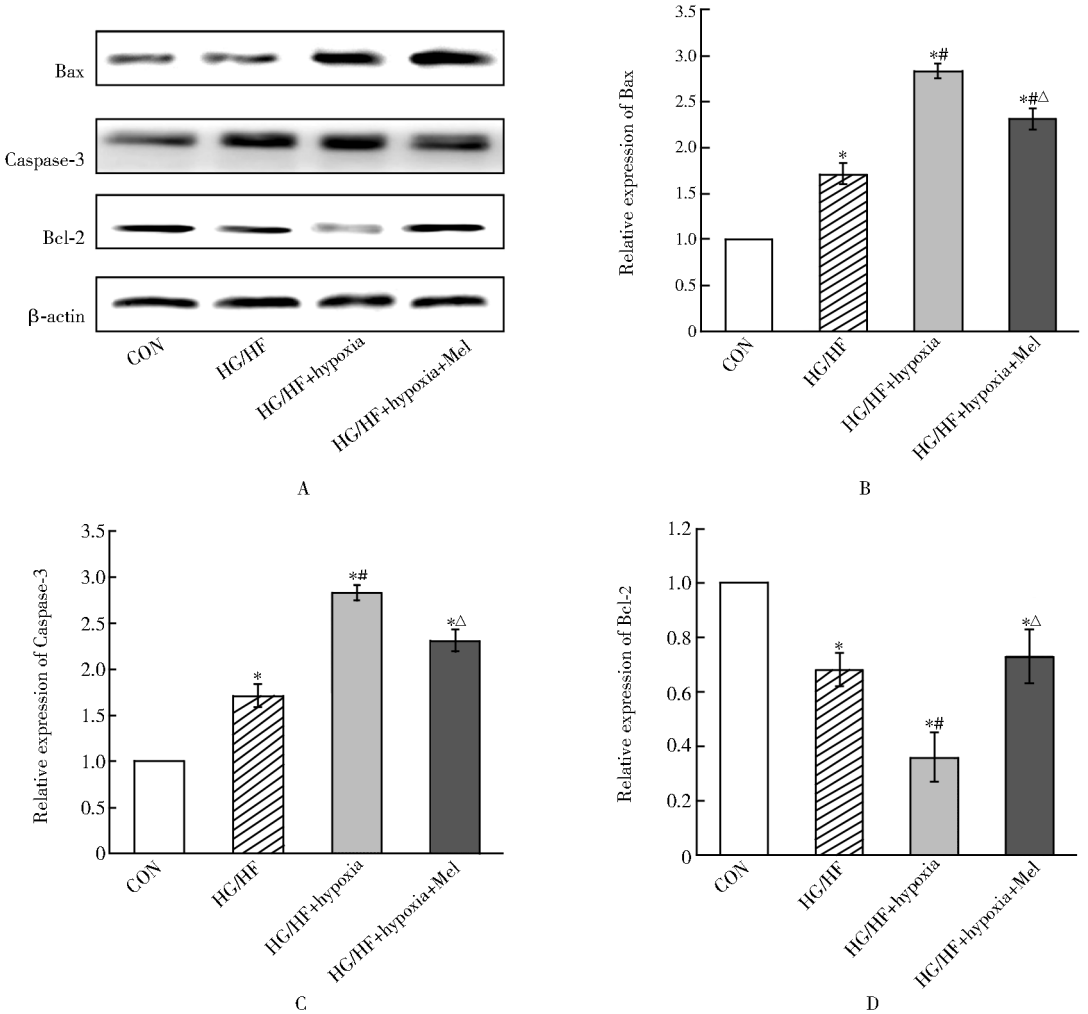


图3 4组小鼠H9c2细胞Bax、Caspase-3和Bcl-2蛋白的表达情况

Figure 3 Expression of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 proteins in four groups

A: Western blotting; B-D: quantitative analysis results. CON: control; HG: high glucose; HF: high fatty acid; Mel: melatonin. Compared with sham group, $^{*}P<0.05$; compared with DM group, $^{\#}P<0.05$; compared with DMI group, $^{\triangle}P<0.05$.

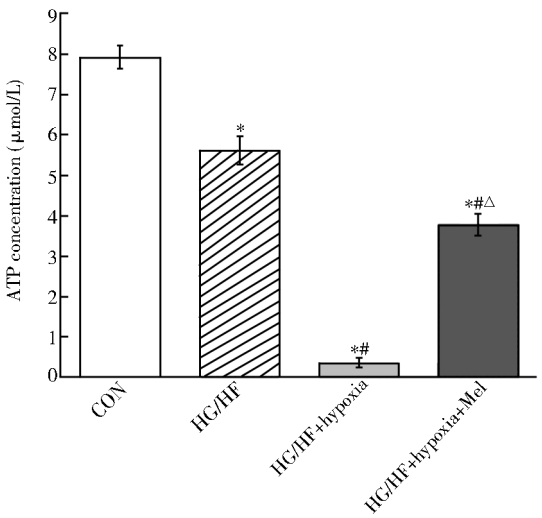


图4 4组小鼠H9c2细胞内ATP浓度情况

Figure 4 Intracellular ATP concentration in four groups

CON: control; HG: high glucose; HF: high fatty acid; Mel: melatonin. Compared with CON group, $^{*}P<0.05$; compared with HG/HF group, $^{\#}P<0.05$; compared with HG/HF+hypoxia group, $^{\triangle}P<0.05$.

3 讨 论

本研究结果显示,在DM状态下,给予Mel可以减轻MI导致的心肌细胞凋亡和间质纤维化,进而改善心脏功能。进一步完善细胞实验发现,Mel在糖尿病心肌梗死的益处在于Bax、Caspase-3、Bcl-2、LC3、P62、Parkin和细胞内ATP水平的改变。本研究结果显示,Mel可以通过增强线粒体自噬,减轻高糖高脂和缺氧导致的心肌细胞凋亡,从而改善糖尿病心肌梗死后的心脏功能,为合并糖尿病的急性心肌梗死患者的治疗提供新的靶点。

目前,我国DM患者人数超过1.4亿,持续位居世界首位。DM是CHD的等危症,研究显示,DM患者罹患心血管疾病的风险是非DM患者的2倍[8],其可能机制是由于DM加重心脏的微循环损伤和心肌细胞能量代谢障碍[9]。现有的糖尿病心肌梗死

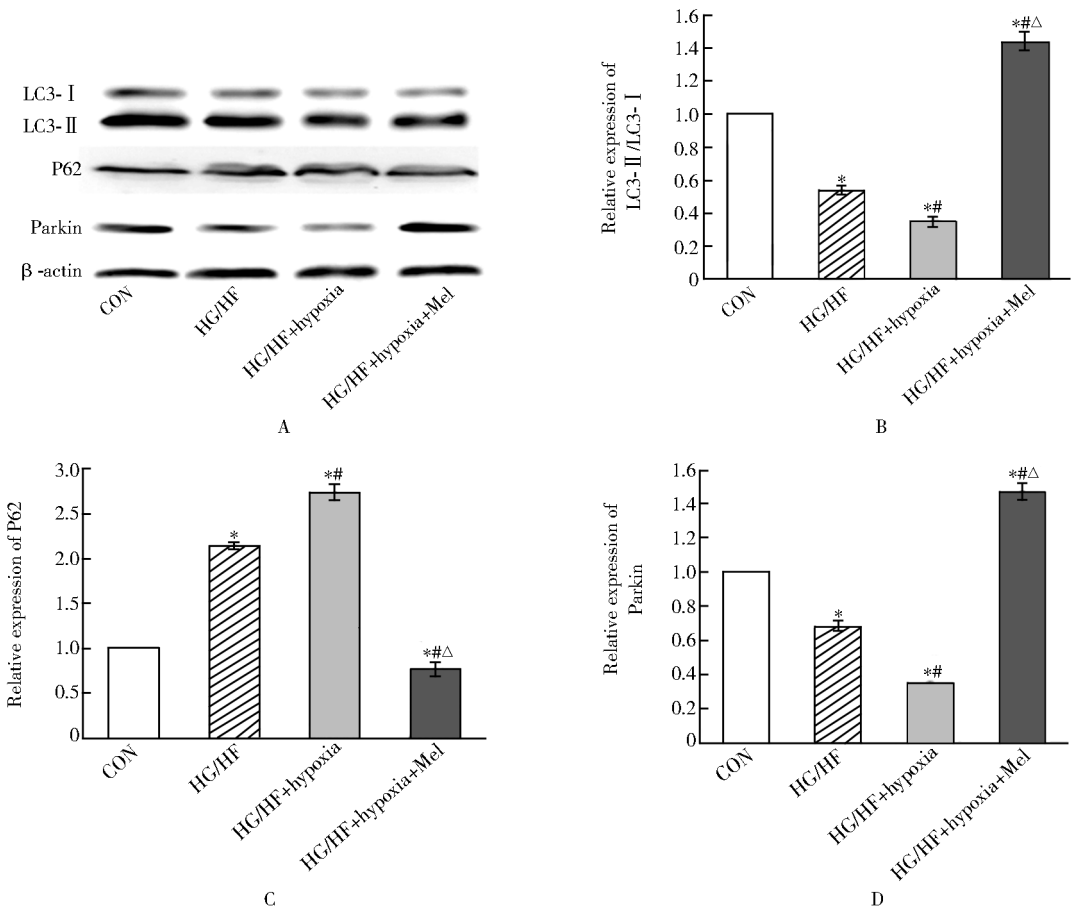


图 5 4 组小鼠 H9c2 细胞线粒体自噬相关蛋白表达情况

Figure 5 Expression of mitophagy proteins in four groups

A: Western blotting; B, C, D: quantitative analysis results. CON: control; HG: high glucose; HF: high fatty acid; Mel: melatonin. Compared with CON group, $^{*}P<0.05$; compared with HG/HF group, $^{\#}P<0.05$; compared with HG/HF+hypoxia group, $^{\triangle}P<0.05$.

治疗策略中,缺乏发病早期心肌细胞保护药物的相关研究。减轻梗死后缺血所诱发的心肌损伤是提高糖尿病心肌梗死患者临床获益、改善长期预后的关键手段。

线粒体是真核生物产生能量的细胞器,是细胞的“动力工厂”,在调节代谢、氧化应激和细胞凋亡等方面的作用十分重要[10,11]。研究发现,线粒体损伤和凋亡是心肌梗死后心肌受损的关键信号机制,在心肌梗死的发病过程中,缺血的心肌细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多、Ca^{2+}紊乱、细胞能量代谢受损,导致线粒体结构和功能异常,而高血糖加重线粒体的损伤[12,13]。因此,寻找保护线粒体结构和功能的治疗靶点可能是减轻糖尿病心肌梗死后心肌损伤的核心。线粒体自噬是一个细胞识别并清除受损细胞器的过程,线粒体发生去极化损伤后通过溶酶体介导降解,对结构和功能异常的线粒体进行清除和溶解,进而维持线粒体质量和数量的稳定[14]。国内外多项研究显示,上调线粒体自噬可以减轻靶细胞凋亡[15-17]。本研究中,在高糖高脂和缺氧的状态下,线粒体自噬水平明显降低,这与相关报道显示的在糖尿病患者中线粒体自噬的细胞保护作用被显著抑制这一结果一致[18]。

研究表明,Mel 分泌不良会增加罹患 DM 和 AMI 的风险,这也意味着 Mel 在预防代谢性疾病的发生方面存在潜在益处[19,20]。在多种疾病模型中,褪黑素受体激动剂参与调节线粒体自噬,发挥对疾病的保护作用。例如在神经细胞中,Mel 上调线粒体自噬相关的蛋白质 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、自噬相关 5 蛋白(autophagy related 5, Atg5)、线粒体自噬标记 Parkin 和同源性磷酸酶诱导激酶 1(phosphatase and tensin homolog induced putative kinase 1, PINK-1)的表达,抑制核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症体激活,发挥神经系统保护作用[21]。然而,在合并糖尿病的心

肌梗死模型中,Mel是否通过增强线粒体自噬发挥心肌细胞保护作用,还未见相关报道。

本研究通过构建小鼠糖尿病心肌梗死模型和细胞高糖高脂缺氧模型,探讨Mel对糖尿病心肌梗死后心肌损伤的保护机制。研究结果表明:(1)Mel可以减轻糖尿病心肌梗死小鼠的心肌细胞凋亡和间质纤维化,改善心脏功能;(2)在高糖高脂缺氧状态下,心肌细胞ATP水平降低,细胞凋亡增加,而Mel可以逆转这种不良结局;(3)在高糖高脂缺氧状态下,线粒体自噬水平显著降低,加入Mel后线粒体自噬的水平显著升高。综上所述,糖尿病心肌梗死后,心肌细胞内线粒体自噬水平降低,心肌细胞凋亡加剧,补充Mel可以增强线粒体自噬,减轻心肌细胞损伤,从而改善糖尿病心肌梗死后的心脏功能。本研究的结果将有助于更好地探索糖尿病心肌梗死治疗的新靶点及Mel在其中潜在的临床应用价值。

【参考文献】

[1] Khodayari S, Khodayari H, Amiri AZ, *et al*. Inflammatory microenvironment of acute myocardial infarction prevents regeneration of heart with stem cells therapy[J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 53(5): 887-909. DOI: 10.33594/000000180.

[2] Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, *et al*. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group[J]. Diabetes Care, 1998, 21(1): 69-75. DOI: 10.2337/diacare.21.1.69.

[3] Zhu P, Wan K, Yin M, *et al*. RIPK3 induces cardiomyocyte necroptosis *via* inhibition of AMPK-Parkin-Mitophagy in cardiac remodelling after myocardial infarction[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:6635955. DOI: 10.1155/2021/6635955.

[4] Fu Z, Jiao Y, Wang J, *et al*. Cardioprotective role of melatonin in acute myocardial infarction[J]. Front Physiol, 2020, 11:366. DOI: 10.3389/fphys.2020.00366.

[5] Chen K, Zhang Q, Wang J, *et al*. Taurine protects transformed rat retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction[J]. Brain Res, 2009, 1279:131-138. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.04.054.

[6] Le Guerroue F, Eck F, Jung J, *et al*. Autophagosomal content profiling reveals an LC3C-dependent piecemeal mitophagy pathway[J]. Mol Cell, 2017, 68(4): 786-796.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.10.029.

[7] Shao D, Kolwicz SC Jr, Wang P, *et al*. Increasing fatty acid oxidation prevents high-fat diet-induced cardiomyopathy through regulating Parkin-mediated mitophagy[J]. Circulation, 2020, 142(10): 983-997. 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043319.

[8] Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, *et al*. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies[J]. Lancet, 2010, 375(9733): 2215-2222. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.

[9] Lu L, Ma J, Sun M, *et al*. Melatonin ameliorates MI-induced cardiac remodeling and apoptosis through a JNK/p53-dependent mechanism in diabetes mellitus[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:1535201. DOI: 10.1155/2020/1535201.

[10] Hall AM, Schuh CD. Mitochondria as therapeutic targets in acute kidney injury[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016, 25(4): 355-362. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000228.

[11] Zhang Z, Wang X, Ma C, *et al*. Genipin protects rats against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reinforcing autophagy[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72: 21-30. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.03.052.

[12] Mizuno M, Kuno A, Yano T, *et al*. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts[J]. Physiol Rep, 2018, 6(12): e13741. DOI: 10.14814/phy2.13741.

[13] Ramachandra CJA, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, *et al*. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection[J]. EbioMedicine, 2020, 57:102884. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102884.

[14] Tahrir FG, Langford D, Amini S, *et al*. Mitochondrial quality control in cardiac cells: mechanisms and role in cardiac cell injury and disease[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8122-8133. DOI: 10.1002/jcp.27597.

[15] Lei Q, Tan J, Yi S, *et al*. Mitochonic acid 5 activates the MAPK-ERK-yap signaling pathways to protect mouse microglial BV-2 cells against TNFα-induced apoptosis *via* increased Bnip3-related mitophagy[J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23:14. DOI: 10.1186/s11658-018-0081-5.

[16] Tang C, Han H, Yan M, *et al*. PINK1-PRKN/PARK2 pathway of mitophagy is activated to protect against renal ischemia-reperfusion injury[J]. Autophagy, 2018, 14(5): 880-897. DOI: 10.1080/15548627.2017.1405880.

[17] 曹媛媛, 李桂成, 邓加雄,等. 虎杖苷改善氧化应激介导的肺泡上皮细胞线粒体损伤的机制[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2020, 19(2): 141-145. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.02.033.
Cao YY, Li GC, Deng JX, *et al*. Mechanism of polydatin in promoting oxidative stress-mediated mitochondrial damage in alveolar epithelial cells[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2020, 19(2): 141-145. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.02.033.

[18] Sidarala V, Pearson GL, Parekh VS, *et al*. Mitophagy protects beta cells from inflammatory damage in diabetes[J]. JCI Insight, 2020, 5(24): e141138. DOI: 10.1172/jci.insight.141138.

[19] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, *et al*. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction[J]. J Pineal Res, 2002, 33(4): 248-252. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2002.02938.x.

[20] McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, *et al*. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes[J]. JAMA, 2013, 309(13): 1388-1396. DOI: 10.1001/jama.2013.2710.

[21] Cao S, Shrestha S, Li J, *et al*. Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2417. DOI: 10.1038/s41598-017-02679-z.

(编辑:郑真真)