

网络出版时间: 2023-12-28 11:40:15 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0757.014>

二甲双胍诱导心肌细胞自噬对脓毒症小鼠心肌损伤的保护机制

田 勇^{1,2}, 周 颖¹, 古雍翔¹, 杨国辉³

摘要 目的 探讨二甲双胍(Met)诱导心肌细胞自噬对脓毒症小鼠心肌损伤保护作用的可能机制。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)构建脓毒症小鼠心肌损伤模型。将60只昆明小鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(CLP)组、模型+二甲基亚砜(DMSO)(CLP+DMSO)组、模型+Met(Met)组、模型+Met+3-甲基腺嘌呤(3-MA)(Met+3-MA)组、模型+Met+复合物C(CC)(Met+CC)组,每组10只。Met、Met+3-MA及Met+CC组在建模前2周每日予Met(200 mg/kg)腹腔注射1次, Met+3-MA组术前1 h腹腔注射3-MA(10 mg/kg), Met+CC组术前30 min腹腔注射CC(20 mg/kg), 末次注射Met 24 h后建模, 所有小鼠在术后24 h留取心脏及血液。Western blot检测微管相关蛋白1轻链3(LC3) I与LC3 II、自噬效应蛋白1(Beclin-1)、泛素结合蛋白62(p62)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、腺苷单磷酸(AMP)激酶(AMPK)和磷酸化AMPK(p-AMPK)的蛋白相对表达量;苏木精-伊红(HE)染色观察心肌病理改变;电镜观察心肌线粒体及自噬小体变化。结果与Sham组比较,CLP及CLP+DMSO组Beclin-1、p62、p-AMPK/AMPK的蛋白相对表达量及LC3 II/LC3 I差异无统计学意义,但CLP组Bax升高且Bcl-2降低($P < 0.01$);与CLP组比较, Met组Beclin-1的蛋白相对表达量及LC3 II/LC3 I升高且p62降低($P < 0.01$), Bax降低且Bcl-2升高($P < 0.01$);与Met组比较, Met+3-MA组Beclin-1的蛋白相对表达量及LC3 II/LC3 I降低且p62升高($P < 0.05$), Bax升高且Bcl-2降低($P < 0.05$), Met+CC组p-AMPK/AMPK的蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。HE染色见Sham组心肌纤维无紊乱, CLP组心肌纤维明显紊乱且见大量炎症细胞浸润, Met组心肌见空泡状改变, Met+3-MA组心肌纤维排列紊乱且见少量炎症细胞浸润。电镜见Sham组心肌线粒体形态正常;CLP组线粒体嵴排列紊乱且见空泡状改变, 偶

见自噬小体; Met组线粒体稍肿胀, 见大量自噬体; Met+3-MA组线粒体明显肿胀, 见少量自噬小体。结论 二甲双胍对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用, 可通过激活AMPK信号通路诱导自噬减轻心肌细胞凋亡、改善线粒体损伤。

关键词 二甲双胍; 自噬; 脓毒症; 心肌损伤; 线粒体; 凋亡

中图分类号 R 459.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0092-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.015

心脏是脓毒症常见并发的功能障碍器官之一, 研究^[1]报道约一半的脓症患者并发有心肌损伤, 脓毒症并发心肌功能障碍(sepsis-induced myocardial dysfunction, SIMD)患者的病死率高达70%~90%, 目前尚无治疗SIMD的理想药物。引起SIMD的因素多、病理机制复杂, 近年来研究^[2]表明其与微循环障碍、心肌细胞凋亡、线粒体损伤及自噬紊乱等因素有关。腺苷单磷酸(adenosine monophosphate, AMP)激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是二甲双胍发挥药理作用的主要靶点, 二甲双胍可通过激活AMPK信号通路诱导自噬^[3]。自噬与凋亡是细胞死亡的两种方式, 但两者之间的关系是复杂的, 维持它们的平衡是决定细胞存亡的关键^[4]。该研究拟应用脓毒症小鼠心肌损伤模型初步探讨二甲双胍预处理调控自噬对脓毒症小鼠心肌损伤保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60只雄性昆明小鼠, SPF级, 6周龄, 体质量(25±2)g, 购自贵州医科大学实验动物中心。所有小鼠分别在12 h/12 h明暗交替的环境下适应性喂养1周后进行药物干预。采用盲肠结扎穿孔术(cecum ligation and puncture, CLP)构建脓毒症小鼠心肌损伤模型。实验动物均由贵州医科大学实验动物伦理委员会审查和批准(编号: 2201507)。

1.2 主要试剂与仪器 盐酸二甲双胍(metformin, Met)(5 g, 批号: D150959, 纯度≥97%)购自美国Sigma公司; 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(50 mg, 批号: HY-19312, 纯度≥99.91%)、复合物

2023-10-05 接收

基金项目: 贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(编号: gyfyns-fc-2021-54); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(编号: gzwjkj2020-1-026); 铜仁市科技计划项目(编号: 铜市科研(2023)30号)

作者单位: ¹ 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550004² 铜仁市人民医院重症医学科, 铜仁 554300³ 贵州医科大学附属医院内科重症监护室, 贵阳 550004

作者简介: 田 勇, 男, 硕士研究生;

杨国辉, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Guohuiy2006@126.com

C(compound C , CC) (10 mg ,批号: HY-13418A ,纯度 $\geq 99.91\%$) 购自美国 MCE 公司; 兔源单克隆微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 , LC3) B 抗体(货号: T55992) 、兔源单克隆自噬效应蛋白 1(Beclin-1) 抗体(货号: T55092) 、兔源单克隆泛素结合蛋白 62(protein 62 , p62) 抗体(货号: T55546) 、兔源单克隆 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2 , Bcl-2) 抗体(货号: T40056) 及兔源单克隆 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein , Bax) 抗体(货号: T40051) 均购自上海 abmart 公司; 兔源单克隆二抗(货号: T55546) 购自美国 Signalway Antibody 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis , SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 电泳及转膜仪(型号: DYC-ZY2) 购自北京东方瑞利科技有限公司; 化学发光及凝胶成像(型号: GeneGnome) 购自斯戴普(北京) 科技有限公司; 透射电子显微镜(型号: JEM-1400FLASH) 购自日本电子株式会社。

1.3 实验方案

1.3.1 分组 将 60 只小鼠随机分为假手术(Sham) 组、模型(CLP) 组、模型 + 二甲基亚砜(dimethyls sulfoxide , DMSO) (CLP + DMSO) 组、模型 + Met(Met) 组、模型 + Met + 3-MA(Met + 3-MA) 组、模型 + Met + CC(Met + CC) 组, 每组 10 只。Met 组、Met + 3-MA 组及 Met + CC 组, 腹腔注射 Met 溶液, 剂量 200 mg/(kg · d) , 持续 2 周, 余下组注射同等量的生理盐水, 末次注射 Met 24 h 后进行建模, 其中 Met + 3-MA 组于术前 1 h 腹腔注射 10 mg/kg 的 3-MA, Met + CC 组于术前 30 min 腹腔注射 20 mg/kg 的 CC。

1.3.2 脓毒症小鼠心肌损伤模型的构建 小鼠禁食 12 h, 自由饮水, 各组小鼠术前给予 2% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 腹腔注射, 麻醉满意后固定, 常规备皮、消毒及铺洞巾, 在腹正中线偏左 0.5 cm 处作长约 1 cm 纵行切口, 有齿镊提起腹膜剪开后钝性分离至合适大小, 找到盲肠测量长度并选距盲端 1/2 处结扎, 在结扎端中段用 22 号针头避开血管来回穿刺 2 次, 轻柔挤出少许肠内容物后将盲肠放回腹腔并逐层缝合, 术后在颈背部皮下注射 1 ml 37 °C 生理盐水补液, 分笼放回动物房, 苏醒后自由进食饮水。假手术组小鼠除未进行盲肠结扎穿孔外, 余操作同 CLP 组。所有小鼠在术后 24 h 麻醉后用摘眼采血法采血, 采血完成后用颈椎脱臼法处死小鼠并留取

心脏, 进行后续的 Western blot、苏木精 - 伊红(hematoxylin-eosin staining , HE) 染色及电镜等实验。

1.3.3 Western blot 实验 从 -80 °C 冰箱取出小鼠心脏, 每组样本称取约 40 mg 的心肌组织, 将高效 RIPA 组织裂解液与蛋白磷酸酶抑制剂混合物按 (100 : 1) 的比例混匀后再向每组心肌组织中加入 350 μ l 的混匀液, 用眼科剪剪碎心肌组织并用超声碎裂组织, 冰上裂解 25 min, 随后置于预冷高速离心机中离心, 收集上清液并行聚氰基丙烯酸正丁酯定量, 最后于恒温干浴锅煮沸变性。通过 Western blot 检测凋亡蛋白(Bax、Bcl-2) 、自噬蛋白(LC3、p62、Beclin-1) 及 AMPK 信号通路。根据分子量大小制备不同浓度的 SDS-PAGE 电泳凝胶, 电泳条件为 80 V 30 min 后改为 120 V, 当上样缓冲液距凝胶底部约 1 cm 时终止, 通过湿转法将目标蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF) 膜上, 转膜结束后将膜放入 5% 脱脂牛奶中常温封闭 2 h, 一抗于 4 °C 冰箱过夜, 二抗室温孵 2 h (1 : 6 000) , 增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence , ECL) 显影, Image J 软件对条带灰度值进行分析。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative polymerase chain reaction , RT-qPCR) 按总核糖核酸提取试剂(total ribonucleic acid extraction reagent , TRIzol) 说明书操作, 提取心肌组织中总核糖核酸(ribonucleic acid , RNA) , 测定浓度, 吸光度(absorbance , A) 比值(A_{260}/A_{280}) 在 1.8 ~ 2.0 之间, 将提取的 mRNA 逆转录成与 RNA 互补的单链脱氧核糖核酸。RT-qPCR: 预变性 95 °C、30 s 循环 1 次, 变性 95 °C、15 s, 退火/延伸 60 °C、30 s 循环 40 次; 熔解曲线 95 °C、10 s 65 °C、5 s 95 °C、0.5 s 进行扩增。每组设 3 个复孔, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算心肌组织 p62、LC3 的 mRNA 相对表达量。实验中以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(polyvinylidene fluoride glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , GAPDH) 基因为内参, 各基因引物序见表 1。

表 1 实时定量 PCR 目的基因

目的基因	引物序列(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: GGTGTCTCTCTCGCACTCA R: TGGTCCAGG GTTCTTACTCC
<i>p62</i>	F: GGACCATCTACAGAGGCTG R: TTCTGACTGCTGGTCAAT
<i>LC3B</i>	F: CCAGGACAAGCAGGCAGATGAAG R: CAGGCTTTCTCTCTCCACCATC

1.3.5 HE 染色 取小鼠左室最大横径冠状面的

心肌组织 放于 10 倍体积的中性福尔马林固定液中固定 24 h, 固定成功后将心肌组织修剪规则, 放置包埋盒中用清水冲洗, 乙醇进行梯度脱水(从低到高浓度) , 将处理后的心肌组织块放置于二甲苯中透明处理; 再经石蜡包埋与切片、脱蜡等过程后将心肌组织切片放入苏木精染液中 6 min, 自来水冲洗 5 ~ 10 min, 盐酸乙醇冲洗 3 s 后伊红染色液染色 1 ~ 2 min; 再次使用梯度乙醇进行脱水; 再用二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min 进行透化, 中性树脂胶封片, 最后用正置白光显微镜观察及拍照。

1.3.6 电镜 切取心尖组织约米粒大小, 快速修剪成 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 大小后立即放入电镜固定液中, 将固定好的心肌组织分别置入丙酮中进行逐级脱水(从低到高浓度) , 在 4 °C 冰箱进行, 每步骤浸泡约 20 min, 然后 100% 的丙酮室温浸泡 20 min, 重复更换 3 次, 将上述心肌组织经丙酮 + 812 环氧树脂包埋之后渗透, 将样品放置 37 °C 恒温烤箱过夜, 45 °C 恒温烤箱 12 h, 60 °C 恒温烤箱 24 h, 使用超薄切片器将心肌组织切为约 50 ~ 70 nm 的超薄切片, 采用 2% 醋酸铀饱和乙醇溶液染色, 再用枸橼酸铅染色, 最后用电镜观察, 寻找线粒体及自噬小体等。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据之间采用单因素方差分析, 采用 Tukey 检验分析差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的一般情况分析 Sham 组 10 只小鼠全部存活, 精神、进食及活动正常; CLP 组及 CLP + DMSO 组小鼠均死亡 5 只, 存活小鼠出现嗜睡、竖毛、呼吸急促、眼眶处有较多分泌物; Met 组小鼠仅死亡 2 只, 存活小鼠精神稍萎靡、活动基本正常、无明显腹泻及畏寒; Met + 3-MA 组小鼠死亡 4 只, 存活小鼠精神较差、活动明显减少, 出现畏寒、腹泻; Met + CC 组小鼠死亡 5 只, 存活小鼠出现嗜睡、呼吸急促、腹泻。

2.2 Western blot 检测 各组小鼠心肌组织自噬蛋白的表达。与 Sham 组比较, CLP 组 LC3 II /LC3 I、Beclin-1、p62 均差异无统计学意义; 与 CLP 组比较, Met 组自噬蛋白 LC3 II /LC3 I、Beclin-1 升高且 p62 降低($P < 0.01$); 与 Met 组比较, Met + 3-MA 组 LC3 II /LC3 I、Beclin-1 降低而 p62 升高($P < 0.05$)。见图 1。

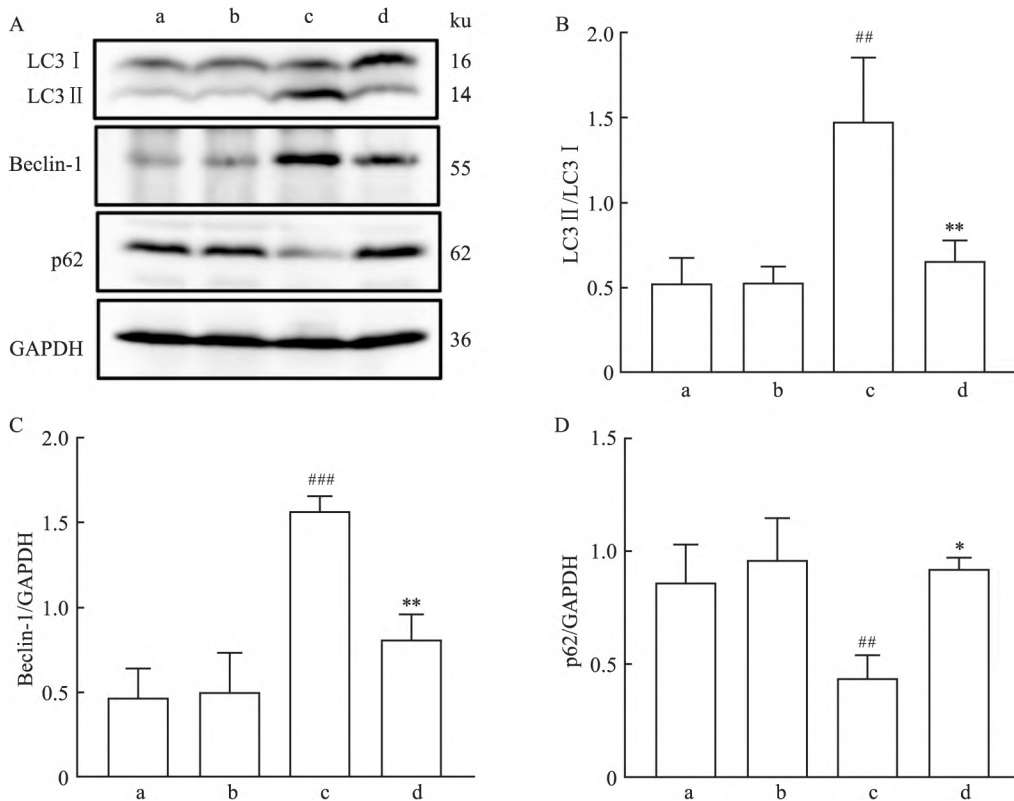


图 1 各组小鼠心肌组织中自噬蛋白 LC3 II /LC3 I、p62、Beclin-1 的相对表达量

A: 灰带图; B: LC3 II /LC3 I 的相对表达量; C: Beclin-1 的相对表达量; D: p62 的相对表达量; a: Sham 组; b: CLP 组; c: Met 组; d: Met + 3-MA 组; 与 CLP 组比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$; 与 Met 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 TR-qPCR 检测各组小鼠心肌组织中自噬基因 p62、LC3B 的 mRNA 表达 与 CLP 组比较, Met 组 p62 降低且 LC3B 升高 ($P < 0.0001$); 与 Met 组比较, Met + 3-MA 组 p62 升高且 LC3B 降低 ($P < 0.0001$)。见表 2。

2.4 各组小鼠心肌组织 HE 染色变化 Sham 组显微镜下心肌纤维无紊乱, 未见炎症细胞浸润; CLP 组心肌纤维明显紊乱, 间质水肿, 少量红细胞渗出, 可见大量炎症细胞浸润; Met 组心肌纤维稍水肿, 心肌见空泡状改变, 未见明显炎症细胞浸润; Met + 3-MA 组心肌纤维排列紊乱, 间质水肿, 见少量的炎症细胞浸润。见图 2。

2.5 Western blot 检测各组小鼠心肌组织凋亡蛋

白的表达 与 Sham 相比, CLP 组促凋亡蛋白 Bax 表达升高 ($P < 0.0001$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低 ($P < 0.01$); 与 CLP 组比较, Met 组促凋亡蛋白 Bax 表达降低 ($P < 0.001$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高 ($P < 0.01$); 与 Met 组比较, Met + 3-MA 组促凋亡蛋白 Bax 表达升高 ($P < 0.001$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.6 自噬诱导减轻脓毒症小鼠心肌线粒体损伤 透射电镜观察见 Sham 组小鼠心肌线粒体形态正常, 未见水肿; CLP 组线粒体嵴排列排列紊乱, 见空泡状改变, 偶见自噬体; Met 组线粒体稍肿胀, 见大量的自噬小体; Met + 3-MA 组线粒体明显肿胀, 见少量的自噬小体。见图 4。

表 2 各组小鼠心肌组织自噬基因 p62、LC3B 的 mRNA 表达比较 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

基因	Sham 组	CLP 组	Met 组	Met + 3-MA 组	F 值	P 值
p62	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.00	0.48 ± 0.03 ^{####}	0.82 ± 0.20 ^{****}	337.1	<0.0001
LC3B	1.02 ± 0.01	1.00 ± 0.17	3.21 ± 0.13 ^{####}	1.73 ± 0.11 ^{****}	206.7	<0.0001

与 CLP 组比: ^{####} $P < 0.0001$; 与 Met 组比: ^{****} $P < 0.0001$

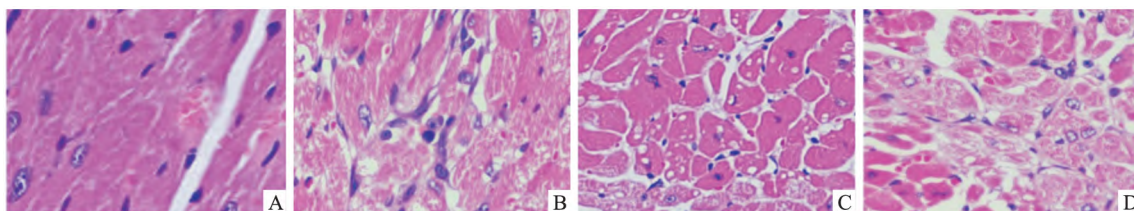


图 2 各组小鼠心肌组织的病理改变 HE 染色 ×400
A: Sham 组; B: CLP 组; C: Met 组; D: Met + 3-MA 组

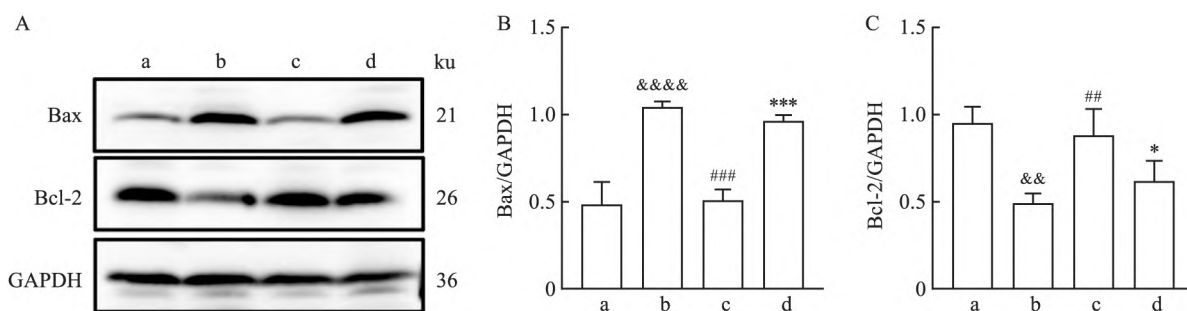


图 3 各组小鼠心肌组织凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 的相对表达量

A: 灰带图; B: Bax 的相对表达量; C: Bcl-2 的相对表达量; a: Sham 组; b: CLP 组; c: Met 组; d: Met + 3-MA 组; 与 Sham 组比较: ^{&&} $P < 0.01$, ^{&&&&} $P < 0.0001$; 与 CLP 组比较: ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; 与 Met 组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$

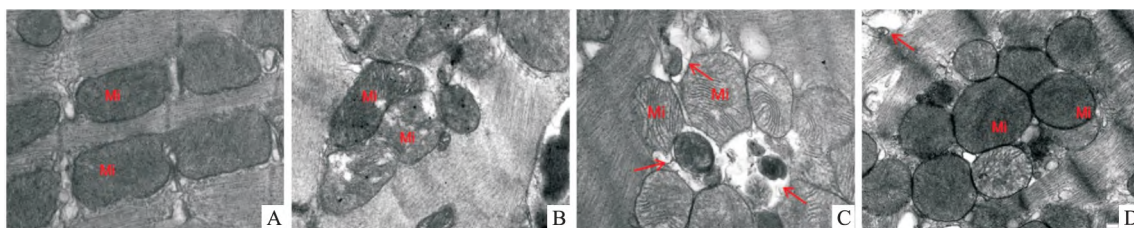


图 4 各组小鼠心肌组织线粒体及自噬小体的变化 ×30 000

A: Sham 组; B: CLP 组; C: Met 组; D: Met + 3-MA 组; Mi: 线粒体; 红色箭头: 自噬小体

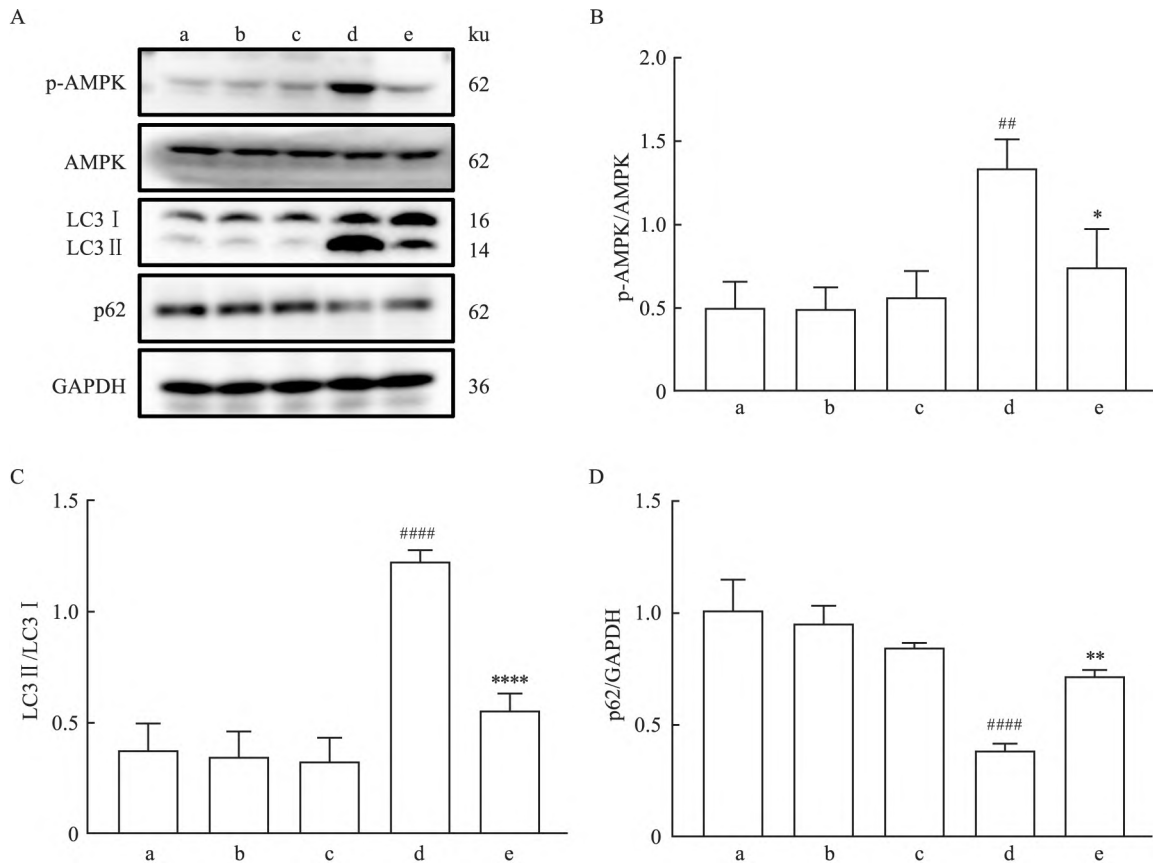


图5 各组小鼠心肌组织 AMPK 信号通路及自噬蛋白 LC3、p62 的相对表达量

A: 灰带图; B: p-AMPK 与总 AMPK 的比值; C: LC3 II 与 LC3 I 的比值; D: p62 的表达量; a: Sham 组; b: CLP 组; c: CLP + DMSO 组; d: Met 组; e: Met + CC 组; 与 CLP 组比较: ^{##} $P < 0.01$, ^{####} $P < 0.0001$; 与 Met 组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{****} $P < 0.0001$

2.7 小鼠心肌中 AMPK 信号通路的激活与自噬蛋白的表达关系 与 Sham 组相比,CLP 组和 CLP + DMSO 组的磷酸化 AMPK (p-AMPK) /AMPK、p62 及 LC3 II /LC3 I 差异无统计学意义; 与 CLP 组相比, Met 组 p-AMPK/AMPK、LC3 II /LC3 I 升高 ($P < 0.01$) 且 p62 降低 ($P < 0.01$); 与 Met 组相比, Met + CC 组 p-AMPK/AMPK、LC3 II /LC3 I 降低 ($P < 0.05$) 且 p62 升高 ($P < 0.01$)。见图 5。

3 讨论

脓毒症并发心肌损伤是危重症患者常见的死亡原因之一,但脓毒症并发心肌损伤的机制尚未完全清楚,自噬作为脓毒症心肌损伤的重要保护机制之一^[2-5]。该研究采用脓毒症模型研究的“金标准”CLP 来构建脓毒症小鼠心肌损伤模型,与 Sham 组比较,CLP 组小鼠出现精神萎靡、腹泻、竖毛,心肌 HE 染色提示 CLP 组心肌纤维明显紊乱,间质水肿,可见大量炎症细胞浸润,这提示脓毒症小鼠心肌损

伤模型的成功构建。与 CLP 组比较, Met 组自噬表达显著升高且心肌组织损伤减轻, 加用自噬抑制剂 3-MA 对自噬进行抑制后,二甲双胍的保护作用被部分逆转, 这表明诱导自噬可减轻脓毒症小鼠的心肌损伤。该结果与既往的研究^[6]结果一致。

细胞凋亡在心血管疾病的发生发展中起着至关重要的作用,细胞凋亡的严重程度决定了心肌的损伤程度,减轻心肌细胞凋亡是治疗脓毒症心肌损伤的潜在方法^[7-8]。自噬与凋亡的关系复杂且存在争议,在不同的模型中自噬对细胞凋亡调控的结局并不一致,在脓毒症小鼠心肌损伤模型中,二甲双胍所诱导的自噬对心肌细胞凋亡的调控结局尚不清楚。该研究表明,与 Sham 组比较,CLP 组心肌细胞凋亡显著增加,加用二甲双胍干预后心肌细胞凋亡显著改善。为进一步探究二甲双胍所诱导的自噬在改善脓毒症小鼠心肌细胞凋亡中是否扮演重要的角色,加用自噬抑制剂 3-MA 对自噬进行抑制后显示,与 Met 组比较, Met + 3-MA 组心肌细胞凋亡加重,这些

结果表明二甲双胍所诱导的自噬对改善脓毒症小鼠心肌细胞凋亡起着重要的作用。既往多个研究^[9-10]也表明激活自噬可改善细胞凋亡,在器官功能障碍中起到重要的保护作用。因此,适当的自噬水平有利于改善脓毒症小鼠心肌细胞的凋亡。

线粒体是一种重要的细胞器,其占心肌细胞体积的 20% ~ 40%,它既是心肌细胞的主要供能场所,也是心肌细胞凋亡的调节中心。线粒体形态和功能的异常在 SIMO 中起着重要的作用^[9,11]。该研究中电镜观察显示,与 Sham 组相比,CLP 组心肌中线粒体出现肿胀、空泡、脊消失等异常;与 CLP 组比较,Met 组线粒体形态明显改善,自噬小体显著增多。为验证二甲双胍所诱导的自噬在减轻脓毒症线粒体损伤中起到重要的作用,加用 3-MA 对自噬进行抑制后二甲双胍对脓毒症小鼠心肌线粒体的保护作用被部分消除,这些结果表明二甲双胍所诱导的自噬对脓毒症小鼠心肌中线粒体损伤起到重要的保护作用。Sun et al^[12]研究表明在脓毒症小鼠心肌损伤中增强自噬可减轻心肌线粒体损伤。Xin et al^[13]的研究也表明减轻心肌线粒体损伤有益于改善脓症患者并发的心肌损伤。该研究仅从微观上观察线粒体形态改变并未对线粒体功能进行检测,这是该研究的不足之处,需在后期的研究中进一步探讨。

AMPK 通路作为自噬的经典信号通路,它在自噬起始的最上游发挥作用,其可激活自噬的关键启动因子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ULK1、Beclin-1 而诱导自噬^[14]。虽然 AMPK 作为二甲双胍发挥对心血管保护药理学作用的主要靶点,但二甲双胍对 AMPK 的调控在不同模型中结果并不一致^[15]。该研究结果显示,与 CLP 组比较,Met 组 p-AMPK/AMPK 显著升高,自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 升高、自噬底物 p62 降低;经加用复合物 C 对 AMPK 进行抑制后 p-AMPK/AMPK 及 LC3 II/LC3 I 降低且 p62 升高。这些结果表明二甲双胍可通过激活 AMPK 信号通路增强脓毒症小鼠心肌损伤中的自噬水平。

综上所述,二甲双胍预处理诱导自噬减轻脓毒症小鼠心肌损伤的机制可能是通过激活 AMPK 信号通路增强自噬,从而减轻心肌细胞凋亡,改善线粒体损伤,达到保护受损心肌的作用。

参考文献

- [1] Li Y, Zhang L, Zhang P, et al. Dehydrocorydaline protects against sepsis-induced myocardial injury through modulating the TRAF6/NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 709604.
- [2] Bi C F, Liu J, Yang L S, et al. Research progress on the mechanism of sepsis induced myocardial injury [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 4275-90.
- [3] Li Q, Wang L, Ji D, et al. Metformin attenuates cadmium-induced degeneration of spiral ganglion neuron *via* restoring autophagic flux in primary culture [J]. *J Inorg Biochem*, 2022, 234: 111901.
- [4] Wang X, Guo Z, Ding Z, et al. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(9): e008024.
- [5] Liu C, Zou Q, Tang H, et al. Melanin nanoparticles alleviate sepsis-induced myocardial injury by suppressing ferroptosis and inflammation [J]. *Bioact Mater*, 2023, 24: 313-21.
- [6] Tang R, Jia L, Li Y, et al. Narciclasine attenuates sepsis-induced myocardial injury by modulating autophagy [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(11): 15151-63.
- [7] Zhang G, Dong D, Wan X, et al. Cardiomyocyte death in sepsis: mechanisms and regulation (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(2): 257.
- [8] Xu P, Zhang W Q, Xie J, et al. Shenfu injection prevents sepsis-induced myocardial injury by inhibiting mitochondrial apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113068.
- [9] 梅静, 喇宏玲, 徐桂萍. 自噬激活在抑制丙泊酚诱导的神经元凋亡中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1552-8.
- [10] Zhang W X, He B M, Wu Y, et al. Melatonin protects against sepsis-induced cardiac dysfunction by regulating apoptosis and autophagy *via* activation of SIRT1 in mice [J]. *Life Sci*, 2019, 217: 8-15.
- [11] Zou R, Tao J, Qiu J, et al. DNA-PKcs promotes sepsis-induced multiple organ failure by triggering mitochondrial dysfunction [J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 39-48.
- [12] Sun Y, Yao X, Zhang Q J, et al. Beclin-1-dependent autophagy protects the heart during sepsis [J]. *Circulation*, 2018, 138(20): 2247-62.
- [13] Xin T, Lu C. Sirt3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(16): 16224-37.
- [14] Turco E, Fracchiolla D, Martens S. Recruitment and activation of the ULK1/Atg1 kinase complex in selective autophagy [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(1): 123-34.
- [15] Lu G, Wu Z, Shang J, et al. The effects of metformin on autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111286.

Protective mechanism of metformin-induced cardiomyocyte autophagy on myocardial injury in septic mice

Tian Yong^{1,2}, Zhou Ying¹, Gu Yongxiang¹, Yang Guohui³

(¹Clinical Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²Dept of Critical Care Medicine, Tongren People's Hospital, Tongren 554300; ³Dept of Internal Medicine Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the possible mechanism of metformin (Met)-induced cardiomyocyte autophagy in protecting myocardial injury in septic mice. **Methods** The model of myocardial injury in septic mice was established by cecal ligation and puncture (CLP). Sixty Kunming mice were randomly divided into sham operation group (Sham group), model group (CLP group), model + dimethyl sulfoxide (DMSO) group (CLP + DMSO group), model + metformin (Met) group (Met group), model + Met + 3-methyladenine (3-MA) group (Met + 3-MA group), model + Met + compound C (CC) group (Met + CC group), with 10 mice in each group. The Met, Met + 3-MA and Met + CC groups were intraperitoneally injected with Met (200 mg/kg) once a day for 2 weeks before modeling. The Met + 3-MA group was intraperitoneally injected with 3-MA (10 mg/kg) 1 h before surgery. The Met + CC group was intraperitoneally injected with CC (20 mg/kg) 30 min before surgery. The model was established 24 h after the last injection of Met. The heart and blood of all mice were collected 24 h after surgery. The Western blot technique was employed to assess the relative expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) isoforms, namely LC3 I and LC3 II, autophagy effector protein 1 (Beclin-1), ubiquitin-binding protein 62 (p62), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), adenosine monophosphate (AMP) kinase (AMPK) and phosphorylated AMPK (p-AMPK). Myocardial pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The changes of myocardial mitochondria and autophagosomes were observed by electron microscopy. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of myocardium. Electron microscopy was used to observe the changes of myocardial mitochondria and autophagosomes. **Results** Compared with Sham group, the relative protein expression of Beclin-1, p62, p-AMPK/AMPK and LC3 II/LC3 I in CLP and CLP + DMSO groups had no statistical significance, but Bax increased and Bcl-2 decreased in CLP group ($P < 0.01$). Compared with CLP group, the relative expression of Beclin-1 protein and LC3 II/LC3 I in Met group increased and p62 decreased ($P < 0.01$), Bax decreased and Bcl-2 increased ($P < 0.01$). Compared with Met group, the relative protein expression of Beclin-1 and LC3 II/LC3 I in Met + 3-MA group decreased and p62 increased ($P < 0.05$), Bax increased and Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). Besides, the relative protein expression of p-AMPK/AMPK in Met + CC group decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that there was no disorder in myocardial fibers in Sham group, and a large number of inflammatory cells infiltrated the myocardial fibers of CLP group in a clear disorder. The Met group showed vacuolar changes in the myocardium, while the Met + 3-MA group showed disordered arrangement of myocardial fibers and a small amount of inflammatory cell infiltration. Under electron microscopy, the morphology of myocardial mitochondria in the Sham group was normal, while in the CLP group, the arrangement of mitochondrial cristae was disordered with vacuolar changes, and occasional autophagosomes were observed. Mitochondria in Met group showed slight swelling and a large number of autophagosomes. The mitochondria in the Met + 3-MA group showed significant swelling with a small amount of autophagosomes. **Conclusion** The protective effect of metformin on myocardial injury in septic mice can reduce cardiomyocyte apoptosis and improve mitochondrial damage by activating AMPK signaling pathway to induce autophagy.

Key words metformin; autophagy; sepsis; myocardial injury; mitochondria; apoptosis