

脂联素对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及其机制

刘鲁倩^{1,2},陈玲¹,秦叙青^{1,3},何文君^{1,2},杨瑞^{1,3},单莉娅^{1,3},李新芝^{1,2},马克涛^{1,3}

摘要 目的 探讨脂联素(APN)是否对脓毒症所导致的心肌损伤有保护作用及其可能的机制。方法 选取30只健康的C57BL/6J雄性小鼠,质量控制在(25±5)g,随机分成3组,每组10只,分别为假手术组(sham组)、脓毒症心肌损伤组(LPS组)、脂联素干预组(APN+LPS组)。应用HE染色观察小鼠心肌组织损伤情况,免疫组织化学染色和Western blot观察连接蛋白43(Cx43)、半胱氨酸蛋白酶3(Caspase3)、Bcl-2-associated X(Bax)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)等相关蛋白的表达水平。结果 与sham组相比,LPS组小鼠心脏损伤表现明显,Bax、活化的Caspase3(cleaved-caspase3)蛋白表达增高,Bcl-2蛋白表达降低,与LPS组比较,APN+LPS组损伤明显减轻,且Bax、cleaved-caspase3蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高,且与sham组相比,LPS组Cx43表达升高,LPS+APN组Cx43表达降低。结论 脂联素可以减轻LPS诱导的脓毒症小鼠心脏损伤,其机制可能是通过抑制凋亡信号通路以及Cx43的表达来实现的。

关键词 凋亡;脂联素;连接蛋白43;脂多糖;脓毒症心肌损伤

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)01-0036-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.008

脓毒症是危害人类健康的一大疾病,尽管抗感染的水平有了很大的提高,但是脓毒症病死率依然居高不下^[1-2]。其中,脓毒症心肌损伤是脓毒症及多器官功能衰竭的重要表现,其发病率较高,预后较差,涉及多种信号分子机制,如细胞凋亡、钙离子转运障碍等。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)是一种内毒素,由革兰阴性细菌产生,可以引起炎症和心肌细胞凋亡。因此,抑制LPS引起的心肌损伤可能会

成为脓毒症治疗的突破口。脂联素(adiponectin,APN)是一种细胞因子,由脂肪细胞合成和分泌,大约占血浆总蛋白的0.01%^[3]。APN具有抗炎,抗动脉粥样硬化的作用^[4],对心脑血管疾病的发生发展亦起着调控作用^[5]。但是APN对LPS诱导的小鼠脓毒症心肌损伤的保护作用以及可能的机制,目前尚不明确。该研究旨在通过LPS诱导小鼠脓毒症心肌损伤,探讨APN是否有保护作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型制备 选取体质量控制在(25±5)g的健康雄性C57BL/6J小鼠30只,该小鼠购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK(京)2016-0006。将所有的小鼠置于石河子大学动物实验饲养中心,并按照石河子大学动物实验伦理委员会的要求进行整个实验。所有小鼠在适宜温度下饲养,湿度和光线良好。所有的小鼠适应性喂养1周后,将30只小鼠随机分为3组,10只/组,分为假手术组(sham组)、脓毒症心肌损伤组(LPS组)、脂联素干预组(LPS+APN组)。参考前期文献^[6]的方法每只小鼠腹腔注射10 mg/kg的革兰阴性细菌LPS以制备脓毒症心肌损伤模型,同时sham组予以等量的0.9%氯化钠溶液进行腹腔注射,LPS+APN组于注射LPS前12 h给予腹腔注射6 mg/kg^[7]的脂联素,12 h后小鼠处死,并进行实验检测。

1.2 主要试剂 APN(美国PeproTech公司);脂多糖(美国sigma公司);凋亡相关蛋白如兔抗Bax抗体(货号ab199677)、兔抗Bcl2抗体(货号ab196495)、兔抗Caspase3抗体(货号ab13847)以及兔抗连接蛋白43(Cx43)抗体(货号ab11370)均购于美国Abcam公司;小鼠抗β-actin抗体、小鼠抗GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG均购于北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

2021-09-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860286);兵团财政科技计划项目(编号:2020BC004)

作者单位:石河子大学医学院¹新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室、²病理生理学教研室、³生理学教研室,石河子832000

作者简介:刘鲁倩,女,硕士;

马克涛,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: maketao@hotmail.com;

李新芝,女,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:lixinzh@shzu.edu.cn

1.3.1 心肌 HE 染色 将每组心肌组织置于 10% 甲醛中过夜,然后脱水并包埋在石蜡中。将所有心肌组织切成 5 μm 厚的切片,固定在载玻片上并烘烤干燥,然后染色。根据使用说明书,将切片分别浸入二甲苯、浓度梯度的乙醇和苏木精中,并用中性树胶密封。使用光学显微镜观察心肌细胞、心脏基质和肌丝形态。

1.3.2 Western blot 法检测各组凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Bcl-2 以及 Cx43 的表达 各组造模结束后,迅速取出小鼠心肌组织,用研磨机将心肌组织打碎,加入裂解液在冰上裂解至少 20 min,每隔 10 min 摇匀一下,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心组织并用 BCA 法测蛋白浓度并配平,待蛋白冷却后分装储存。用 SDS-PAGE 分离,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上电转,电转结束后,用 TBST 洗去多余的电转液,并用 50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 2 h,封闭结束后,加入以下抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜:兔抗 Bax 抗体(1 : 1 000)、兔抗 Bcl-2 抗体(1 : 1 000)、兔抗 Caspase3 抗体(1 : 1 000)、兔抗 Cx43 抗体(1 : 1 000)、小鼠抗 β -actin 抗体(1 : 1 000)和小鼠抗 GAPDH 抗体(1 : 1 000)。次日,用 TBST 洗膜 3 次,10 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1 : 5 000)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1 : 10 000)室温孵育 2 h,用 TBST 洗去二抗,于暗室中滴加发光试剂,压片、显影、定影,使用 Quantity One 软件(Bio-Rad 公司)获取图像并分析。

1.3.3 免疫组织化学染色 将心肌组织切片在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱中烘烤 2 h,分别用二甲苯脱蜡 3 次,5 min/次,100%、90%、80%、70% 乙醇脱水,5 min/次,自来水冲洗干净,枸橼酸钠修复并用 3% 的过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性,用山羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,随后,加入相应的一抗(Bax,1 : 100;Bcl-2,1

: 100;Caspase3,1 : 100;Cx43,1 : 100)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日,洗净一抗后加入二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,加入 DAB 显色,待标本抗体标记的阳性部位显色后,立即用自来水冲洗掉,接着,用苏木精复染 3 min,自来水洗 3 次,1% 盐酸酒精分化 6~7 s,自来水冲洗 3 次,然后自来水蓝化 3 min,并在 70%、80%、90%、100% 乙醇脱水,烘干后中性树胶封片。随机选择 6 个样本/组,并在每个样本中随机选择 5 个视野,然后在光学显微镜下拍照。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌组织病理学观察 sham 组心肌纤维排列整齐且胞质丰富均匀,细胞间隙正常,边界清晰,无病理变化;LPS 组可见多数炎性细胞浸润,且伴有心肌细胞坏死情况;LPS + APN 组心肌细胞坏死情况改善,心肌纤维数量增多,心肌损伤情况降低,炎性细胞浸润减少。见图 1。

2.2 各组凋亡蛋白指标 Caspase3、Bcl-2、Bax 表达

通过 Western blot 检测 sham、LPS、LPS + APN 组各指标蛋白相对表达量。与 sham 组比,LPS 组促凋亡蛋白 cleaved caspase3、Bax 表达增高,然而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达低于 sham 组,LPS + APN 组 cleaved caspase3、Bax 蛋白表达低于 LPS 组,Bcl-2 蛋白表达高于 LPS 组($P < 0.05$)。同时进行免疫组织化学染色检测各组心肌组织 Caspase、Bcl-2、Bax 蛋白表达,Caspase3 及 Bax 的表达情况:sham 组中偶见棕黄色颗粒,LPS 组的表达明显高于 sham 组,LPS + APN 中棕黄色颗粒明显降低。Bcl-2 的表达情况:

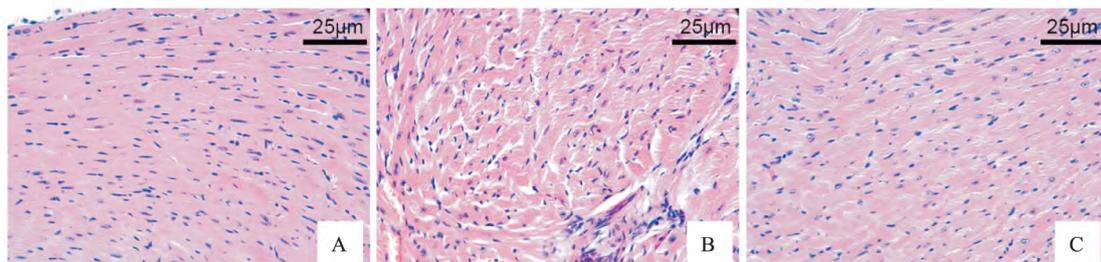


图1 各组小鼠心肌组织的 HE $\times 400$
A: sham 组;B: LPS 组;C: LPS + APN 组

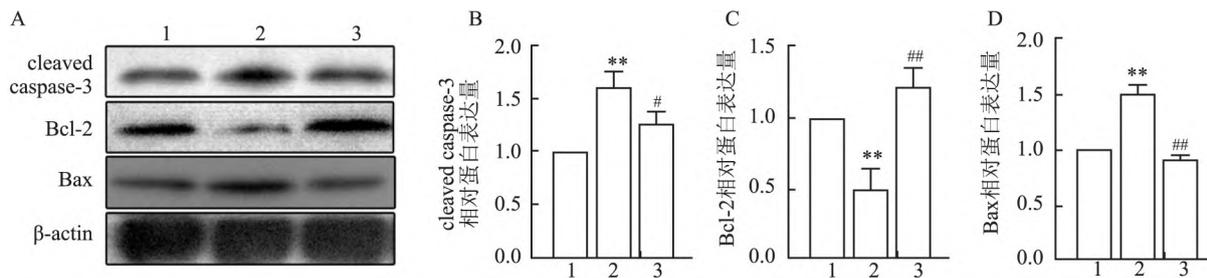


图2 Western blot 法检测各组小鼠心肌组织中凋亡蛋白

A: Western blot 法检测心肌组织内凋亡蛋白 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达;B: 心肌组织内凋亡蛋白 cleaved caspase-3 蛋白水平的半定量分析;C: 心肌组织内凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白水平的半定量分析;D: 心肌组织内凋亡蛋白 Bax 蛋白水平的半定量分析;1: sham 组;2: LPS 组;3: LPS + APN 组;与 sham 组比较: ** $P < 0.01$;与 LPS 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

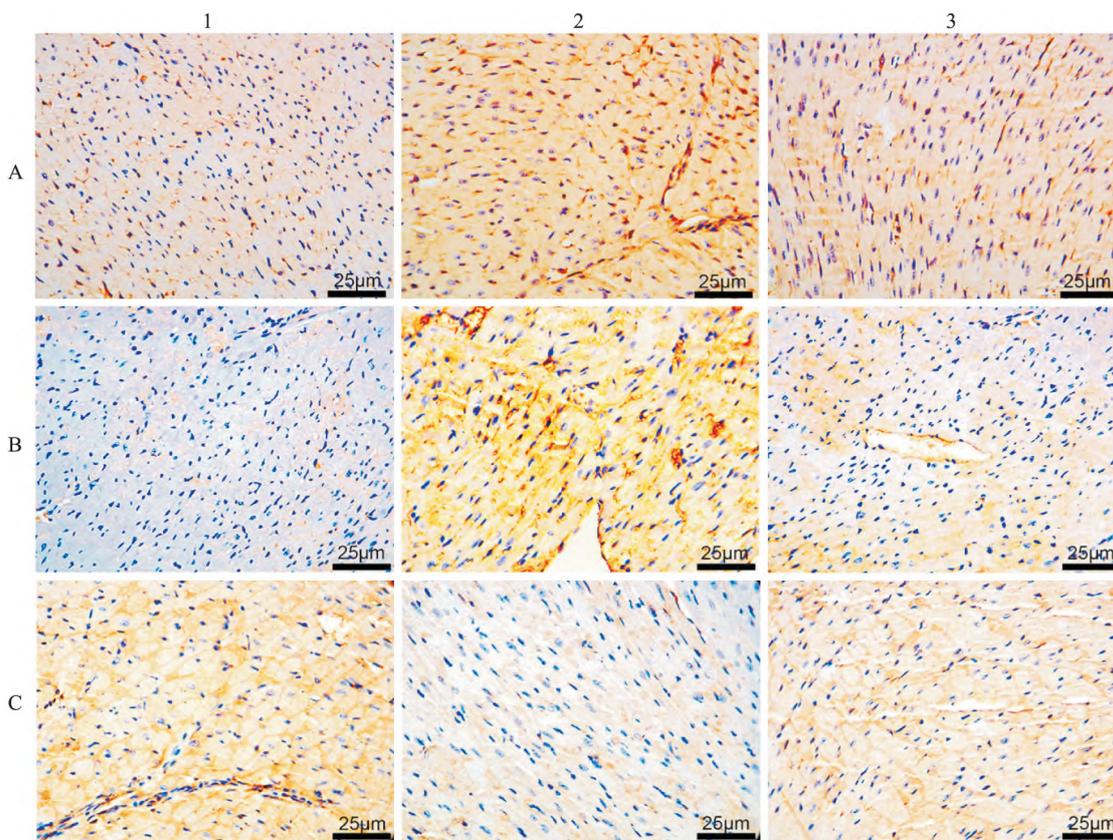


图3 免疫组织化学染色检测心肌组织中 Caspase3、Bax、Bcl2 蛋白表达 ×400

A: 心肌组织内凋亡蛋白 Caspase3 蛋白表达;B: 心肌组织内凋亡蛋白 Bax 蛋白表达;C: 心肌组织内凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达;1: sham 组;2: LPS 组;3: LPS + APN 组

sham 组中可见棕黄色颗粒表达, LPS 组的表达明显低于 sham 组, LPS + APN 中棕黄色颗粒表达明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、3。

2.3 各组 Cx43 的表达 通过 Western blot 检测 sham 组、LPS 组、LPS + APN 组 Cx43 相对表达量。与 sham 组比较, LPS 组 Cx43 的表达增高, 然而 LPS + APN 组 Cx43 的表达低于 LPS 组 ($P < 0.05$)。免

疫组织化学染色检测各组心肌组织中 Cx43 的表达: sham 组中可见棕黄色颗粒, LPS 组的表达高于 sham 组, LPS + APN 中棕黄色颗粒明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4、5。

3 讨论

临床上, 脓毒症具有起病快、发病急、病死率高

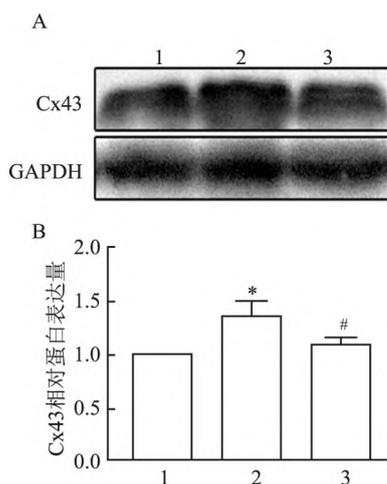


图4 Western blot法检测各组小鼠心肌组织中Cx43

A: Western blot法检测心肌组织Cx43的表达; B: 心肌组织内Cx43水平的半定量分析; 1: sham组; 2: LPS组; 3: LPS + APN组; 与sham组比较: * $P < 0.05$; 与LPS组比较: # $P < 0.05$

等特点,发生脓毒症时,炎症、氧化应激、线粒体损伤、微循环障碍、免疫紊乱、自噬损伤、凋亡等病理机制使全身各种组织和器官损伤,最终导致多器官功能衰竭。其中,脓毒症心肌损伤是脓毒症多器官功能衰竭的一个重要环节,越来越多的研究^[8]表明,因脓毒症感染性休克的患者多表现为心功能不全。因此,保护心脏功能是治疗脓毒症的一个重要环节。目前已经有研究^[9]报道腹腔注射脂多糖可以诱发脓毒症且导致心脏损伤,该研究使用LPS诱导脓毒症心肌损伤,与前期的研究结果一致,实验显示,注射LPS可使小鼠诱发脓毒症,且会发生脓毒症心肌损伤,具体表现为心肌组织有少数炎性细胞浸润,且伴有心肌细胞坏死情况。APN具有多种作用,如抗炎、抗凋亡和抗动脉粥样硬化。既往的研究^[10]表明APN有心脏保护作用。该研究提示,APN可保护LPS所致的脓毒症心肌损伤,APN预处理后,心肌组

织中炎性细胞浸润及心肌细胞坏死情况明显缓解,心肌纤维数量增多,心肌损伤获得改善。

许多调节因子在脓毒症心肌损伤的发病机制中起着至关重要的作用^[11]。细胞凋亡已被证明是心脏功能下降的主要原因之一^[12]。有研究^[13]表明脓毒症休克大鼠心肌细胞会发生凋亡,并证实凋亡在脓毒症诱导的儿童心肌抑制中起着更重要的作用。本研究中,也出现了类似的结果,与假手术组相比,脓毒症心肌损伤组凋亡蛋白Caspase3、Bax表达水平明显增多,抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调,使用脂联素干预后,脓毒症心肌损伤的凋亡蛋白指标明显改变,与脓毒症心肌损伤组相比,凋亡蛋白Caspase3、Bax表达水平明显降低,抗凋亡蛋白Bcl-2表达增高。实验表明,APN可以通过调节细胞凋亡来保护脓毒症心肌损伤。

缝隙连接是一种膜通道结构,介导细胞间的通讯,存在于两个细胞之间,具有重要的生物学功能。Cx43是最主要的缝隙连接蛋白,尤其在心室肌中,对于电传导发挥着不可或缺的作用。有学者发现在肥厚型心肌病、心力衰竭、缺血性心肌病等多种心脏病中,Cx43的分布和表达均发生改变^[14]。Cx43在细胞生长、增殖和凋亡中起重要作用。林俊敏等^[15]研究证明,在心力衰竭大鼠心脏中Cx43表达明显增加,且分布紊乱。该实验显示,与假手术组相比,脓毒症心肌损伤组Cx43的蛋白表达明显增高,使用APN预处理后,Cx43的水平有所降低,提示APN可能通过调节Cx43的表达来保护脓毒症心肌损伤。

综上所述,该研究表明,APN可有效地保护脓毒症心肌损伤,其机制可能是调节细胞凋亡途径以及Cx43的表达。因此,APN为临床上治疗脓毒症心肌损伤成为了一种新的可能。



图5 免疫组织化学染色检测心肌组织中Cx43的表达 ×400

A: sham组; B: LPS组; C: LPS + APN组

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801–10.
- [2] 魏 啸,付 林,博庆丽,等. 罗格列酮对细菌脂多糖所致急性肾损伤和炎症反应的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(3): 368–73.
- [3] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(1): 79–83.
- [4] 叶 帅,季 华,赵晓彤,等. 全长脂联素在高糖环境下对结肠癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12): 1879–83.
- [5] 边云飞,郭晓夏,肖传实. 脂联素对小鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *生理学报*, 2010, 62(2): 49–55.
- [6] 聂 取,李梦非,王洪新. 黄芪甲苷对脂多糖诱导的小鼠脓毒症心肌病及过氧化物酶体增殖物激活受 α 的影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2020, 38(2): 73–7.
- [7] Xu L, Bao H G, Si Y N, et al. Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats [J]. *J Surg Res*, 2013, 183(2): 752–9.
- [8] You W, Min X, Zhang X, et al. Cardiac-specific expression of heat shock protein 27 attenuated endotoxin-induced cardiac dysfunction and mortality in mice through a PI3K/Akt-dependent mechanism [J]. *Shock*, 2009, 32(1): 108.
- [9] 雷 磊,赵 鹏,杨昌伟,等. miR-21-5p 通过靶向 TGF- β 1 改善 LPS 诱导的脓毒症实验研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32(7): 5–10.
- [10] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress [J]. *Circulation*, 2007, 115(11): 1408–16.
- [11] Sharma, Avadhesh C. Sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. *Shock*, 2007, 28(3): 265–9.
- [12] Ma X Q, Fu R F, Feng G Q, et al. Hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes and the protective effect of prostaglandin E [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 32(12): 1124–30.
- [13] Zhang T N, Goodwin J E, Liu B, et al. Characterization of long noncoding RNA and mRNA profiles in sepsis-induced myocardial depression sciencedirect [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 852–66.
- [14] Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs [J]. *Semin Oncol*, 1992, 19(5): 529–42.
- [15] 林俊敏,梁 庆,邝素华,等. 美托洛尔对心力衰竭大鼠连接蛋白 43 表达及分布模式影响的研究 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(2): 175–9.

Protective effect and mechanism of adiponectin on myocardial injury in septic mice

Liu Luqian^{1,2}, Chen Ling¹, Qin Xuqing^{1,3}, He Wenjun^{1,2}, Yang Rui^{1,3}, Shan Liya^{1,3}, Li Xinzhi^{1,2}, Ma Ketao^{1,3}

(¹Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, ²Dept of Pathophysiology,

³Dept of Physiology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the protective effect of adiponectin APN on myocardial injury caused by sepsis and its possible mechanism. **Methods** According to the experimental design, 30 healthy C57BL/6 male mice were randomly divided into 3 groups: sham operation group (sham group), lipopolysaccharide treatment group (LPS group), adiponectin treatment group (APN + LPS group). HE staining was used to observe the injury of mouse heart. Immunohistochemical staining and Western blot were used to observe the expression of connexin 43 (Cx43), Caspase3, Bax, Bcl-2 proteins. **Results** Compared with sham group, the expression of Bax, cleaved Caspase3 protein increased and the expression of Bcl-2 protein decreased in LPS group. Compared with LPS group, the injury in APN + LPS group was significantly alleviated, showing that the expression of Bax, cleaved caspase3 protein decreased and the expression of Bcl-2 protein increased. Meanwhile, compared with sham group, the expression of Cx43 increased in LPS group and decreased in APN + LPS group. **Conclusion** Adiponectin can attenuate LPS-induced cardiac injury in septic mice. The mechanism may be through the inhibition of apoptotic signal pathway and the expression of Cx43.

Key words apoptosis; adiponectin; connexin43; lipopolysaccharide; septic myocardial injury