

· 药理 ·

线粒体动力学介导冠心病血瘀证心肌能量代谢

周曼丽¹, 俞贇丰¹, 罗晓欣¹, 兰晓栋¹, 金梦雨¹, 张宜帆¹, 简维雄^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学 中医学院, 长沙 410208;

2. 中医诊断学湖南省重点实验室, 中医心肺病证辨证与药膳食疗重点研究室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:以冠心病血瘀证形成过程中3个阶段大鼠模型为切入点,从线粒体融合-分裂动态变化的角度探索冠心病血瘀证形成过程能量变化的机制。方法:30只大鼠随机分为空白组6只和模型组24只。空白组给予普通饲料喂养,模型组大鼠高脂饲料适应性喂养7d后进行维生素D₃(VitD₃,30万U·kg⁻¹)灌胃,14d后再予以VitD₃灌胃(20万U·kg⁻¹),继续高脂饲料喂养21d后,随机选择6只大鼠为血瘀证前期组,进行模型验证并同时取材;其余大鼠继续高脂饲养30d后随机选择6只为亚血瘀证期组;剩下的大鼠为心血瘀阻证期组,继续高脂饲养的同时予以皮下多点注射异丙肾上腺素(ISO,5mg·kg⁻¹)连续3d,1周后记录心电图。采用透射电镜观察线粒体形态、数量变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测线粒体动力学蛋白表达量,免疫荧光技术检测相关蛋白的细胞定位。结果:与空白组比较,血瘀证前期组、亚血瘀证期组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平明显上调($P<0.05$);与空白组比较,血瘀证前期组血液流变学指标明显上调($P<0.05$)。空白组主动脉三层膜结构完整;血瘀证前期组中膜开始出现明显的钙化现象,内膜少量炎性细胞附着;亚血瘀证期组动脉内膜下及中膜平滑肌出现空腔结构;心血瘀阻证期组动脉管壁三层结构均严重破坏。空白组心电图提示P波规律出现,QRS波波形成规律,无宽大畸形,S-T段未见明显压低及抬高;血瘀证前期组心电图与空白组心电图对比未见明显异常;亚血瘀证期组心电图出现J点上抬趋势,S-T段有稍许抬高,但抬高程度 ≤ 0.1 mV;心血瘀阻证期心电图提示S-T段明显压低,压低程度 >0.1 mV,J点压低 >0.1 mV。空白组线粒体大小、形态正常,嵴清晰致密;血瘀证前期组线粒体呈梭形,嵴稀疏;亚血瘀证期组部分线粒体形态上显著拉长,甚至出现空泡样改变;心血瘀阻证期组线粒体呈现破碎状态。与空白组比较,模型组线粒体融合蛋白2(Mfn2),动力学相关蛋白1(Drp1),分裂蛋白1(Fis1)表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与血瘀证前期组比较,心血瘀阻证组Mfn2表达下调($P<0.05$);与空白组及血瘀证前期组比较,亚血瘀证期组、心血瘀阻证期组视神经萎缩症蛋白1(OPA1)表达下调($P<0.05$, $P<0.01$);与血瘀证前期组比较,亚血瘀证期组Drp1,Fis1蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);与亚血瘀证期组比较,心血瘀阻证组Mfn2,Drp1表达下调($P<0.01$)。与空白组比较,血瘀证前期组及亚血瘀证期组Mfn2及OPA1在线粒体中广泛聚集,而在心血瘀阻证期Mfn2红染明显变少;Drp1/Fis1在空白组及血瘀证前期组荧光表现微弱,而在亚血瘀证期组及心血瘀阻证期组荧光强度明显。结论:心肌细胞线粒体动力学随着心肌细胞能量需求的变化而变化。Mfn2在冠心病血瘀证形成过程早期阶段以融合效应为主,随着病程的逐渐发展,Mfn2开始介导线粒体自噬过程;OPA1在内膜融合及嵴的完整性中发挥作用,OPA1表达量下降与冠心病血瘀证加速发展密切相关;Drp1与Fis1将受损的线粒体分离出来为线粒体自噬作准备的过程有利于缓解机体能量需求和供应失衡的状态。

[关键词] 线粒体动力学;冠心病血瘀证;线粒体融合蛋白2(Mfn2);视神经萎缩相关蛋白1(OPA1);动力学相关蛋白1(Drp1);分裂蛋白1(Fis1);能量代谢

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0080-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212197

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210922.1932.005.html>

[网络出版日期] 2021-09-24 8:54

Mitochondrial Dynamics Mediates Myocardial Energy Metabolism in Coronary Heart Disease due to Blood Stasis

ZHOU Man-li¹, YU Yun-feng¹, LUO Xiao-xin¹, LAN Xiao-dong¹,
JIN Meng-yu¹, ZHANG Yi-fan¹, JIAN Wei-xiong^{1,2*}

[收稿日期] 20201216(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973753);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2291);研究生质量工程项目(2018CX28,2020CX57)

[第一作者] 周曼丽,在读博士,从事中医心病证治机制研究工作,E-mail:1378327198@qq.com

[通信作者] * 简维雄,博士,教授,从事中医心病证治机制研究工作,E-mail:daxiong20001977@163.com

- (1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;
2. Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Key Laboratory of TCM Heart and Lung Syndrome Differentiation & Medicated Diet and Dietotherapy, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of energy changes in the three stages of the formation of coronary heart disease due to blood stasis in rat model from the perspective of mitochondrial fusion-fission dynamic changes. **Method:** Thirty healthy male rats were divided into the blank control group ($n=6$) and model group ($n=24$) using SPSS 21.0 simple random sampling method. The rats in the blank control group were fed an ordinary diet, while those in the model group a high-fat diet. After seven days of adaptive feeding, the rats were treated with intragastric administration of vitamin D₃ (VitD₃) at 300 000 U·kg⁻¹ and then at 200 000 U·kg⁻¹ 14 d later. The high-fat diet continued for 21 d, and six rats were randomly selected as samples for the pre-stage blood stasis syndrome group, followed by model verification and sampling. The remaining rats continued to receive the high-fat diet for 30 d, and six were randomly selected and categorized into the sub-stage blood stasis syndrome group, followed by model verification and sampling. The rest of rats were classified into the heart blood stasis syndrome group. While continuing the high-fat diet, they were also treated with multipoint subcutaneous injection of isoproterenol (ISO, 5 mg·kg⁻¹) for three consecutive days. One week later, the electrocardiogram (ECG) was recorded for determining whether the modeling was successful and the samples were taken at the same time. The changes in mitochondrial morphology and quantity were observed under a transmission electron microscope. The expression of mitochondrial dynamics-related proteins was measured by Western blot and the cellular localization of related proteins by immunofluorescence assay. **Result:** The levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in the pre-stage and sub-stage blood stasis syndrome groups were significantly increased as compared with those in the blank control group ($P<0.05$). The blood rheology index in the pre-stage blood stasis syndrome group was significantly elevated in contrast to that in the blank control group ($P<0.05$). The three-layered membrane of the aorta in the blank group was intact. However, the tunica media of the pre-stage blood stasis syndrome group began to show obvious calcification, with a small number of inflammatory cells adhering to the intima. The subintima and media smooth muscles in the sub-stage blood stasis syndrome group exhibited cavity structures. The three-layered structure of the arterial wall in the heart blood stasis syndrome group was severely damaged. The ECG of the blank control group revealed the regular appearance of P wave, regular QRS waveform (no broadening or deformity), and no obvious ST-segment depression or elevation. The ECG of the pre-stage blood stasis syndrome group showed no obvious abnormalities as compared with that of the blank control group. In the sub-stage blood stasis syndrome group, the ECG showed an upward trend of the J point and slight ST-segment elevation, with the elevation ≤ 0.1 mV. The ECG in the heart blood stasis syndrome group displayed significant ST-segment depression (>0.1 mV) and J point depression >0.1 mV. The mitochondria in the blank control group were normal in size and morphology, with clear and dense cristae, whereas those in the pre-stage blood stasis syndrome group were fusiform with sparse cristae. Some mitochondria in the sub-stage blood stasis syndrome group were significantly elongated, and even vacuole-like changes were present. In the heart blood stasis syndrome group, the mitochondria were ruptured. As demonstrated by comparison with the blank control group, the expression levels of mitofusin 2 (Mfn2), dynamin-related protein 1 (Drp1), and fission protein 1 (Fis1) in the model group were significantly up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the pre-stage blood stasis syndrome group, the heart blood stasis syndrome group exhibited down-regulated Mfn2 ($P<0.05$). Compared with the blank control group and the pre-stage blood stasis syndrome group, the sub-stage blood stasis syndrome group and the heart blood stasis syndrome group displayed down-regulated optic atrophy 1 (OPA1) ($P<0.05$, $P<0.01$). The Drp1 and Fis1 protein expression declined significantly in the sub-stage blood stasis syndrome group in comparison with that in the pre-stage blood stasis syndrome

group ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression levels of Mfn2 and Drp1 in the heart blood stasis syndrome group were lower than those in the sub-stage blood stasis syndrome group ($P<0.01$). The comparison with the blank control group showed that Mfn2 and OPA1 were extensively accumulated in mitochondria of both the pre-stage and sub-stage blood stasis syndrome groups, while the red-stained Mfn2 was significantly reduced in the heart blood stasis syndrome group. The Drp1/Fis1 fluorescence was weak in the blank group and the pre-stage blood stasis syndrome group but strong in the sub-stage blood stasis syndrome group and heart blood stasis syndrome group.

Conclusion: The cardiomyocyte mitochondria dynamics changes with the change in energy demand of cardiomyocytes. Mfn2 is dominated by fusion effect in the early stage of the formation of coronary heart disease due to blood stasis. With the gradual development of this disease, Mfn2 begins to mediate mitochondrial autophagy. OPA1 plays a role in intimal fusion and cristae integrity. The decreased OPA1 expression is closely related to the accelerated progression of coronary heart disease differentiated into blood stasis syndrome. The process by which Drp1 and Fis1 separate damaged mitochondria to prepare for mitochondrial autophagy contributes to alleviating the imbalance between the energy demand and supply of human body.

[Keywords] mitochondrial dynamics; coronary heart disease due to blood stasis; mitofusin 2 (Mfn2); optic atrophy 1(OPA1); dynamin-related protein 1 (Drp1); fission protein 1 (Fis1); energy metabolism

冠心病是严重危害人类健康的慢性非传染性疾病^[1],是心血管疾病中致残致死的主要原因^[2]。中医古籍中并无“冠心病”之称,当属中医“胸痹”“真心痛”的范畴,血瘀证是冠心病中最常见的证型之一^[3]。瘀滞是冠心病的基本病机,贯穿冠心病病程的始终^[4]。当冠状动脉管腔见脂质点或脂质条纹时,说明机体已经存在“滞”的病机;当动脉发生粥样硬化使管腔狭窄,血流量减少,说明机体已经存在“瘀”的病机^[4]。课题组已经进行过的前期研究证实,冠心病血瘀证是一个从“血瘀证前期”逐渐发展至“亚血瘀证期”“心血瘀阻证期”的流动过程^[5],这与冠心病的病理基础是由脂质代谢紊乱-斑块形成-心肌缺血动态变化过程具有相通之处^[6]。冠心病发生发展形成的过程包括心肌细胞能量底物的减少,葡萄糖/脂肪酸氧化失衡,腺苷三磷酸(ATP)合成减少和心肌细胞形态的损害,这些病理过程引起心肌细胞功能异常,严重危害着心脏功能。课题组前期研究应用代谢组学技术发现在3个不同阶段血浆中能量代谢底物不同,呈现出不同的能量代谢规律^[7]。

线粒体是细胞能量代谢的中心,机体所需的主要能源物质——ATP大部分都是在线粒体中合成的,与此相关的三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化过程也均在线粒体中进行^[8]。线粒体结构-功能关系主要受调控线粒体间分裂和融合事件的分子调控^[9]。线粒体融合和分裂的动态过程被称为线粒体动力学^[7]。在哺乳动物体内,介导线粒体融合的主要分子是线粒体融合蛋白2(Mfn2),视神经萎缩相关蛋白1(OPA1);介导线粒体分裂的分子主要是

动力学相关蛋白1(Drp1),分裂蛋白1(Fis1)^[8]。研究发现在心肌细胞中,Mfn2不仅调控线粒体外膜融合,还参与调节细胞代谢。Mfn2缺失导致的线粒体膜融合不足会使心肌细胞对缺血损伤更为敏感^[10]。Mfn2的激活被证实可以逆转线粒体的损伤^[11-12]。胎儿心肌细胞中的线粒体经过磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶1(PINK1)/Mfn2/Parkin介导的线粒体自噬,在围产期发生从碳水化合物到脂肪酸的代谢转变,以便其被成熟的线粒体替代,而不是转录重编程,这在心肌代谢转变中起着核心作用^[13]。定位于面向线粒体膜间隙的OPA1除了介导相邻线粒体内膜的融合,还控制着内膜嵴的完整性^[14],并且通过嵴内可溶性细胞色素C(Cyt C)的区域化来调节细胞凋亡^[15-16]。Drp1被认为是选择性移除受损线粒体的潜在上游效应因子^[17]。大鼠心肌梗死模型中心肌细胞线粒体呈现碎片化,这取决于线粒体分裂蛋白Drp1的调控。Drp1无法直接结合线粒体外膜分裂线粒体,需同时联合Fis1才能发挥其功能。Drp1敲除会破坏线粒体分裂,形成延长的线粒体并抑制线粒体自噬^[18]。可见,心肌细胞线粒体融合-分裂的动态平衡对维持正常线粒体群体和功能起着至关重要的作用,线粒体动力学随着心肌细胞能量需求的改变而变化。因此,本研究以冠心病血瘀证形成过程中3个阶段大鼠模型为切入点,在动物模型建立成功的基础上,从线粒体融合-分裂动态变化的角度探索冠心病血瘀证形成过程能量变化的机制,为进一步动态分析心血瘀阻证形成的过程及其机制提供实验室依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠30只,体质量200~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2019-0009。饲养于湖南中医药大学屏障环境动物室,在人工调控的环境中饲养(温度22~26℃,湿度50%~70%),自由饮水和进食饲养1周后用于实验。本动物实验经湖南中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准,批准号LL2018041002。

1.2 试剂 辐照高脂饲料(湖南斯莱克景达公司,编号201911000116);0.2%丙基硫氧嘧啶(南通精华制药股份有限公司,批号H32020795);维生素D₃(VitD₃)粉剂(湖北楚米生物科技有限公司,批号2018012202);异丙肾上腺素(ISO),苏木素(美国Sigma公司,批号分别为BSF190725,517-28-2);水合氯醛,无水乙醇,丙酮(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为30037516,2018082088,20201202);多聚甲醛组织固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1101);2.5%戊二醛,伊红(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为P1126,15086-94-9);二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号10023418);812包埋剂(SPI公司,批号90529-77-4);兔抗Drp1抗体,双标一抗(兔抗)Drp1,单标一抗Mfn2,单标一抗OPA1(英国Abcam公司,货号分别为Ab184247,Ab36199,Ab124773,Ab42364;稀释比分别为1:1 000,1:700,1:200,1:100);兔抗Fis1抗体,兔抗Mfn2抗体,兔抗OPA1抗体,山羊抗兔二抗(美国Proteintech,货号分别为10956-1-AP,12186-1-AP,27733-1-AP,SA00001-2;稀释比分别为1:1 000,1:2 000,1:2000,1:6 000);双标一抗(小鼠抗)Fis1(美国Santa Cruz公司,货号SC-376469,稀释比1:25);荧光二抗488山羊抗小鼠,CY3-山羊抗小鼠,CY3-山羊抗兔(谷歌生物,货号分别为GB25303,GB21301,GB21303;稀释比分别为1:400,1:300,1:300)。

1.3 仪器 MP150型16导联生理记录仪(美国Biopac公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);KD-BM II型生物组织包埋机(中国浙江金华科迪仪器设备有限公司);HM325型病理切片机,75002455型高速冷冻离心机[中国赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];NIKON ECLIPSE C1型正置荧光显微镜(日本尼康公司);DYY-6C型小型电泳仪,DYCZ-40D型转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司);脱TSY-B型色摇床(中国谷歌生物公

司);721BR08666型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 取30只SPF级SD健康雄性大鼠,运用SPSS 21.0简单随机抽样法分为空白对照组6只大鼠,其余24只大鼠用于制备动物模型。造模方式及模型评价体系借鉴课题组前期的研究基础及以往心血管研究领域的实验研究^[19],分3个阶段复制大鼠模型。

第一阶段:“血瘀证前期”大鼠模型的建立。运用高脂饲料进行喂养,饲料配方为3%胆固醇,0.5%胆酸钠,0.2%丙基硫氧嘧啶,5%白糖,10%猪油,81.3%基础饲料(辐照饲料配制由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供)。饲养7 d后使用VitD₃粉剂灌胃(30万U·kg⁻¹),14 d后再予以VitD₃粉剂灌胃(20万U·kg⁻¹)。造模大鼠随机选取6只作为血瘀证前期组模型鼠,分别采集动脉血与空白组比较,血脂、血液流变学的血浆黏度和全血黏度中的一项高于正常值,作为“血瘀证前期”模型成功的标志,并取腹主动脉固定进行苏木素-伊红(HE)染色检测,采集大鼠心电图及左心室心肌(第一阶段造模4只大鼠死亡)。

第二阶段:“亚血瘀证期”大鼠模型的建立。将第一阶段成模大鼠继续高脂饲养30 d后,随机抽取6只大鼠作为亚血瘀证期组模型鼠,取主动脉进行HE染色检测,以大鼠主动脉斑块形成为模型成功标志,并采集大鼠心电图、动脉血及左心室心肌(第二阶段造模未见大鼠死亡)。

第三阶段:“心血瘀阻证期”大鼠模型的建立。在第二阶段的基础上,将剩下的大鼠予以皮下多点注射ISO 5 mg·kg⁻¹连续3 d,记录注射ISO前后大鼠心电图,以心电图ST段抬高或压低≥0.1 mV为成模标准(第三阶段造模未见大鼠死亡),并将剩下的8只大鼠随机选择6只作为造模成功的心血瘀阻证组模型鼠,分别采集动脉血、腹主动脉血管及左心室心肌。

2.2 透射电镜(TEM)观察线粒体形态、数量变化 新鲜组织确定取材部位,迅速投入电镜固定液4℃固定2~4 h,组织进行梯度乙醇脱水,每次15 min。丙酮-812包埋剂1:1渗透2~4 h。将纯812包埋剂倒入包埋板,使样品插入包埋板后37℃烤箱过夜,60℃烤箱聚合48 h。超薄切片机切片60~80 nm超薄切片。2%醋酸铀饱和乙醇溶液,枸橼酸铅,各染色15 min,切片室温干燥过夜。最后TEM

下观察,采集图像分析。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白相关表达 称取组织质量,加入适量RIPA裂解液将心肌组织裂解,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。将样品稀释到一定的浓度,并计算上样体积。根据所要检测的蛋白分子量大小选择所要配制的分离胶与浓缩胶的浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电泳结束后,切胶制备“转膜三明治”,倒入5%的脱脂奶粉室温摇床封闭1h。加入一抗室温孵育2h(一抗稀释比例Drp1与Fis1均为1:1 000,Mfn2为1:2 000)。TBST洗涤3次后加入相应二抗室温孵育1h,稀释比例均为1:6 000。TBST洗涤3次后滴加ECL发光液于膜上,避光反应1min后曝光显影,依据灰度值进行半定量分析。

2.4 免疫荧光(IF)法检测相关蛋白的细胞定位 对所取心肌组织进行梯度蔗糖溶液脱水1~2d用于冰冻切片。滴上包埋剂,速放于冷冻台上切片10 μm,用防脱玻片烤干备用。放入TBS液中清洗过后,滴加蛋白酶K。根据抗体说明书推荐的稀释比配制双标组合蛋白一抗(一抗稀释比例Drp1, Fis1, Mfn2分别为1:700,1:25,1:200),孵育条件为2h,37℃。TBS清洗后配制双标二抗(二抗稀释比例488山羊抗小鼠为1:400,CY3-山羊抗小鼠与CY3-山羊抗兔均为1:300),室温孵育1h。TBS洗涤后滴加DAPI,随后加入抗荧光淬灭剂封片,使用适当的激发波长检测样本。

2.5 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,经正态性、方差齐性检验后,方差齐时多组间样本比较采用单因素方差分析最小显著性差异(LSD)检验,方差不齐时用Tamhane's T2检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 动物模型构建指标变化 血脂、血液流变指标变化,与空白组比较,血瘀证前期组、亚血瘀证期组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平明显上调($P<0.05$)。血瘀证前期血液流变学指标较空白水平明显上调($P<0.05$)。见表1,2。

HE染色结果,空白组主动脉内膜、中膜和外膜结构完整,层次分明,弹性纤维层结构清晰,走向基本一致,排列较整齐;血瘀证前期组中膜开始出现明显的钙化现象,平滑肌受压萎缩,弹力纤维破坏,由于斑块脱落导致大量的裂隙状结构存在。内膜出现轻微损伤,少量炎性细胞附着;亚血瘀证组动脉内膜结构破坏,内弹力膜崩解断裂,内膜下及中

表1 造模后各组大鼠血脂指标比较($\bar{x}\pm s, n=24$)

Table 1 Comparison of blood lipids of rats in each group after modeling ($\bar{x}\pm s, n=24$) mmol·L⁻¹

组别	总胆固醇	甘油三酯	高密度脂蛋白胆固醇	低密度脂蛋白胆固醇
空白	1.64±0.21	1.68±0.74	1.29±0.21	0.26±0.08
血瘀证前期	4.05±0.99 ¹⁾	0.51±0.15	1.65±0.27 ¹⁾	2.91±1.01 ¹⁾
亚血瘀证期	6.81±1.45 ¹⁾	0.65±0.28	2.01±0.25 ¹⁾	5.36±1.45 ¹⁾
心血瘀阻证期	1.37±0.23	1.53±0.53	1.10±0.15	0.42±0.90 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ (表2同)。

表2 造模后各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x}\pm s, n=24$)

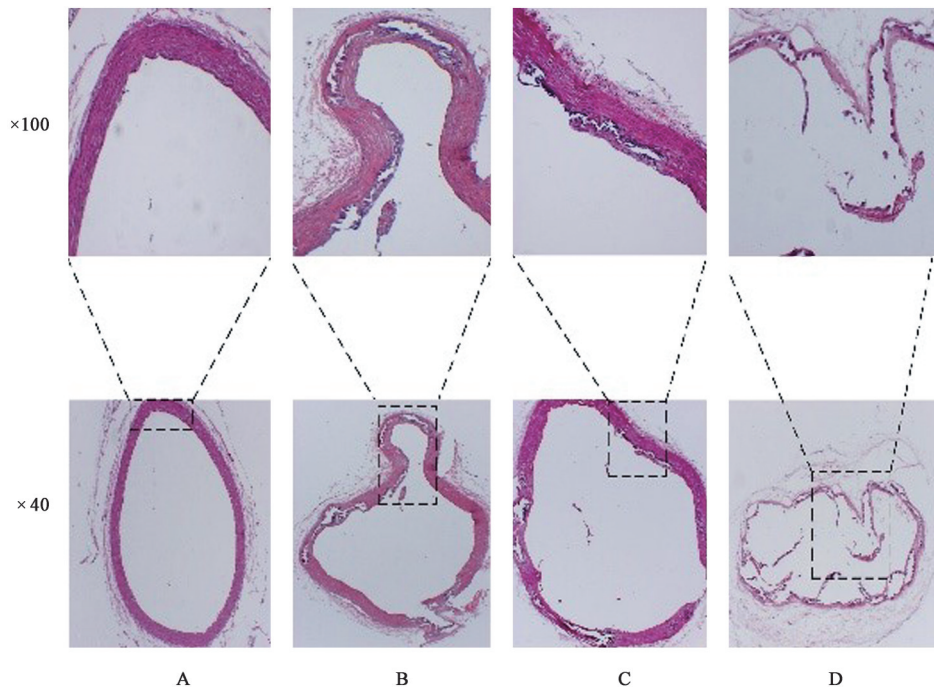
Table 2 Comparison of hemorheology of rats in each group after modeling ($\bar{x}\pm s, n=24$) mPa·s

组别	血浆黏度	全血黏度		
		低切	中切	高切
空白	1.21±0.61	9.26±0.52	5.12±0.44	4.08±0.29
血瘀证前期	1.44±0.00 ¹⁾	22.35±6.89 ¹⁾	12.26±5.34 ¹⁾	7.83±1.51 ¹⁾
亚血瘀证期	1.52±0.17	13.74±3.70	7.23±1.10	5.53±0.66
心血瘀阻证期	1.02±0.20	11.56±3.90	6.44±1.58	4.96±1.07

膜平滑肌由于严重的钙化现象出现典型的空腔结构,内中外3层结构不清晰;心血瘀阻证组动脉管壁3层结构均破坏,内膜多处断裂且结构排列紊乱。钙化的斑块基本上全部脱落,中膜结构几乎消失。外膜破坏及管壁塌陷、狭窄、变细。见图1。

心电图检测结果,空白组心电图提示P波规律出现,P-R间期及R-R间期大致相同,QRS波波形规律,无宽大畸形,S-T段未见明显压低及抬高;血瘀证前期组与正常心电图对比提示心率为窦性心律,P波规律出现,P-R间期及R-R间期大致相同,QRS波波形规律,无宽大畸形,J点无明显抬高及压低,S-T段未见明显压低及抬高;亚血瘀证期组心电图提示窦性心律,P波规律出现,P-R间期及R-R间期大致相同,QRS波波形规律,无宽大畸形,出现J点抬高的趋势。与正常组心电图相比可见S-T段有稍许抬高,但抬高程度 ≤ 0.1 mV;心血瘀阻证期组心电图提示窦性心律,P波规律出现,P-R间期及R-R间期大致相同,QRS波波形规律,无宽大畸形,与正常组心电图相比,S-T段明显压低,压低程度 >0.1 mV,J点压低 >0.1 mV。

3.2 超微结构下线粒体形态、数量变化 空白组心肌肌节排列整齐,横纹清楚,Z线结构清晰;线粒体呈带状分布,与肌节方向平行;线粒体大小、形态正常,呈圆形、椭圆形;线粒体嵴清晰且致密,基质清楚。血瘀证前期组心肌纤维排列较为整齐,局部肌



A. 空白组; B. 血瘀证前期组; C. 亚血瘀证期组; D. 心血瘀阻证期(图2-6同)

图1 造模后四组大鼠主动脉病理组织切片图(HE)

Fig. 1 Pathological tissue slices of rat aortas in four groups after modeling (HE)

丝破坏、溶解。线粒体轻微肿胀变长,呈梭形,嵴稀疏、模糊不清,排列紊乱,基质颜色稍淡,外层膜结构较完整。亚血瘀证期组肌丝走向不规则,典型肌小节结构消失;线粒体无序排列,呈攒簇现象,部分线粒体形态上显著拉长;大部分线粒体超微结构发生了明显的破坏,表现为线粒体嵴模糊、断裂,甚至基质消失,出现空泡样改变。心血瘀阻证期组线粒体呈现破碎状态,大部分线粒体已溶解破裂,膜消失,存留线粒体形态不规则,小且破碎。见图2。

3.3 线粒体动力学相关蛋白表达变化 与空白组比较,模型组线粒体动力学蛋白 Mfn2, Drp1, Fis1 表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与血瘀证前期组比较,心血瘀阻证组 Mfn2 蛋白表达下调($P<0.05$)。与空白组及血瘀证前期组比较,亚血瘀证组和心血瘀阻证组 OPA1 蛋白表达下调($P<0.05$, $P<0.01$), OPA1 蛋白表达在心血瘀阻证组较亚血瘀证组稍上调,但差异无统计学意义。与血瘀证前期组比较,亚血瘀证组 Drp1, Fis1 蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);与亚血瘀证组比较,心血瘀阻证组 Mfn2, Drp1 表达下调($P<0.01$), Fis1 具有下调的趋势,但差异无统计学意义。见表3,图3。

3.4 线粒体动力学蛋白的定位变化 与空白组比较,血瘀证前期组及亚血瘀证组 Mfn2 蛋白在线粒体中广泛聚集。目的蛋白为红染,绿染,细胞

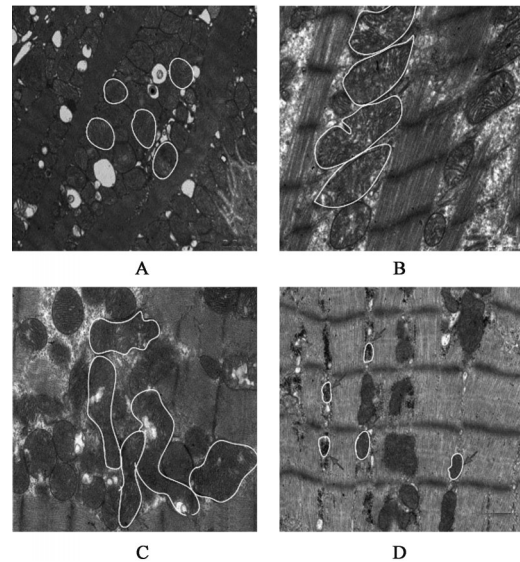


图2 造模后超微结构下各组大鼠心肌线粒体超微结构形态学改变(透射电镜,×5 000)

Fig. 2 Morphological changes of rat myocardial mitochondria under transmission electron microscope after modeling(TEM, ×5 000)

核为蓝染,红色荧光点明显增多,荧光强度增加且线粒体形态延长,而在心血瘀阻证期 Mfn2 蛋白红染明显变少,荧光强度降低。与空白组比较,血瘀证前期组 OPA1 蛋白的线粒体分布未见明显增加,荧光强度变化不明显,但线粒体形态仍较空白组显著延长,荧光强度在亚血瘀证组及心血瘀阻证组降低,以心血瘀阻证组表现最显著。

表3 造模后各组大鼠心肌Mfn2,OPA1,Drp1,Fis1蛋白的表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Expression levels of Mfn2,OPA1,Drp1,Fis1 proteins in each group after modeling ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Mfn2/GAPDH	OPA1/GAPDH	Drp1/GAPDH	Fis1/GAPDH
空白	0.08±0.03	0.30±0.07	0.13±0.03	0.14±0.06
血瘀证前期	0.42±0.02 ²⁾	0.40±0.06	0.26±0.01 ¹⁾	0.14±0.05
亚血瘀证期	0.44±0.02 ²⁾	0.08±0.04 ^{2,4)}	0.47±0.06 ^{2,4)}	0.49±0.10 ^{2,4)}
心血瘀阻证期	0.35±0.05 ^{2,3,5)}	0.18±0.06 ^{1,4)}	0.28±0.09 ^{2,5)}	0.33±0.14 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与血瘀证前期组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与亚血瘀证组比较⁵⁾ $P<0.01$ 。

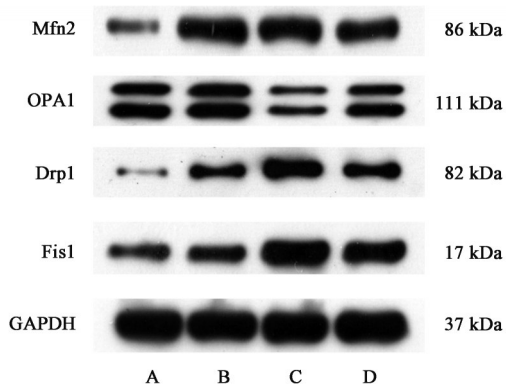


图3 造模后各组大鼠心肌Mfn2,OPA1,Drp1,Fis1蛋白电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Mfn2,OPA1,Drp1 and Fis1 protein in the myocardium of rats in each group after modeling

Drp1/Fis1蛋白在空白组及血瘀证前期组未表现出明显的细胞共定位现象,且荧光表现微弱。而在亚血瘀证组及心血瘀阻证组呈现出很好的共定位现象(红色和绿色荧光信号的共存证明了这一

点),尤以亚血瘀证期荧光强度最为明显。见图4~6。

4 讨论

冠心病是冠状动脉病变导致的缺血、缺氧后能量底物减少,ATP合成的减少和细胞内乳酸的堆积,损害心肌细胞形态,引起心肌功能异常严重危害人类健康的疾病。线粒体是一种高度动态变化的细胞器,通过不断地融合-分裂维持线粒体网络的稳态。心肌细胞具有高密度的线粒体分布,有研究发现线粒体ATP的合成随着心肌细胞能量需求变化而发生适应性改变^[20]。线粒体动力学在心血管疾病中的作用机制尚不明确,越来越多的证据表明,线粒体动力学变化参与扩张型心肌病、缺血-再灌注损伤、心力衰竭等心血管疾病发生发展的病理过程^[21]。为此,本课题组以线粒体动力学为切入点,开展了冠心病血瘀证动态演变状态下心肌细胞

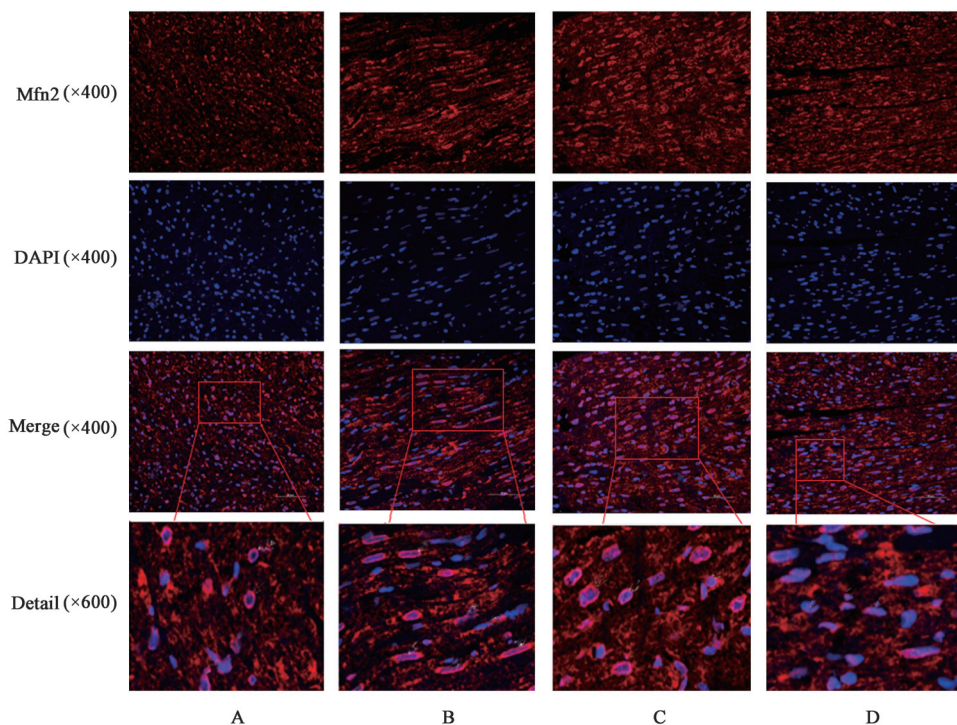


图4 造模后激光共聚焦观察各组线粒体蛋白Mfn2细胞分布(激光共聚焦显微镜)

Fig. 4 Confocal laser observation of distribution of mitochondrial proteins Mfn2 in each group after modeling (LSCM)

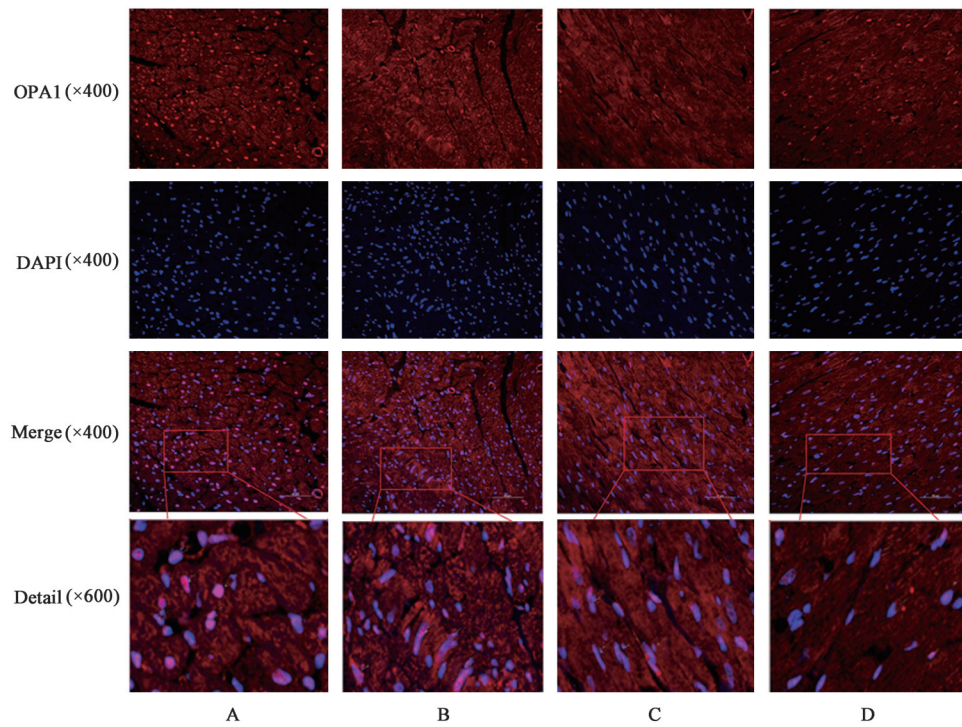


图5 造模后激光共聚焦观察各组线粒体蛋白OPA1细胞分布(激光共聚焦显微镜)

Fig. 5 Confocal laser observation of distribution of mitochondrial proteins OPA1 in each group after modeling (LSCM)

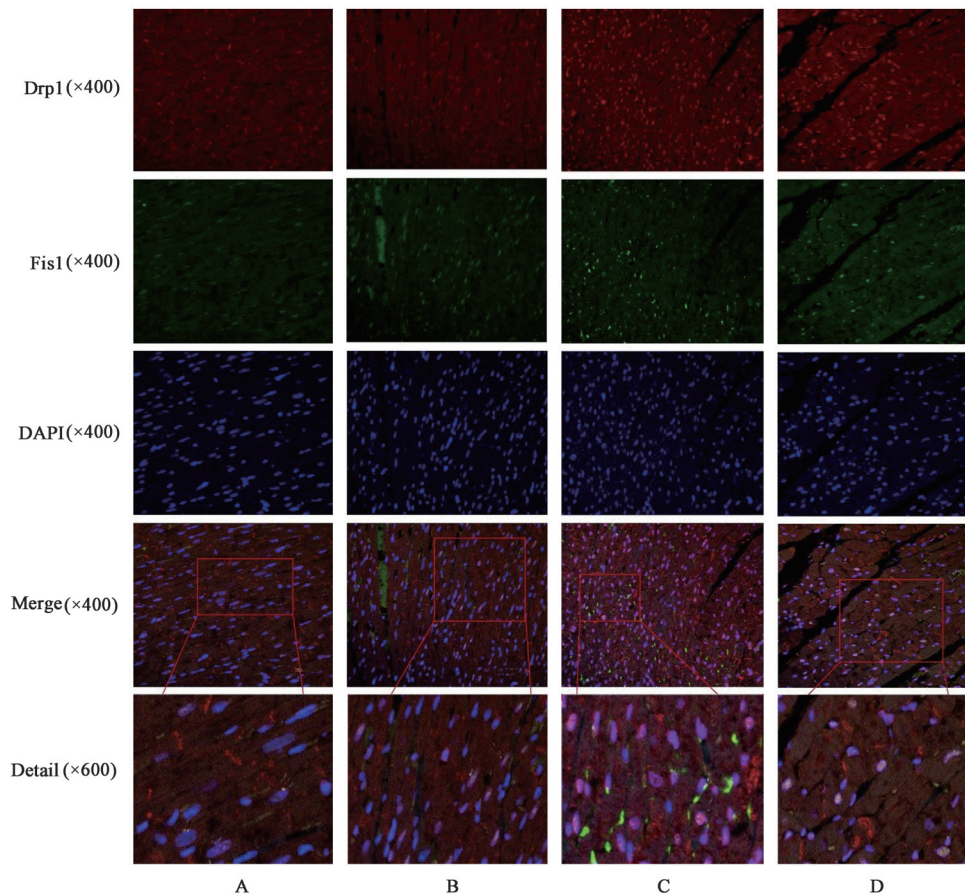


图6 造模后激光共聚焦观察各组线粒体蛋白Drp1,Fis1细胞分布(激光共聚焦显微镜)

Fig. 6 Confocal laser observation of distribution of mitochondrial proteins Drp1, Fis1 in each group after modeling (LSCM)

能量代谢规律的研究。

冠心病血瘀证的形成是一个漫长而又复杂的过程,本研究通过高脂饲料联合 VitD₃灌胃,ISO皮下注射进行模型建立,分3个阶段证明了模型是成功的。从空白组—血瘀证前期组—亚血瘀证期组,血脂及血流变指标(总胆固醇、低密度脂蛋白、血浆黏度)呈明显上升。由于大鼠代谢能力强,具有较高的胆固醇抗性,导致心血瘀阻证组大鼠血脂及血流变指标下降明显。结合动脉病理切片,大鼠动脉在血瘀证形成过程当中出现明显改变,并在心血瘀阻证期出现动脉管壁三层结构均破坏,内膜多处断裂且结构排列紊乱的现象。由于本实验中使用了 VitD₃促进脂质及钙对血管壁的侵入和沉积,动脉血管钙化明显,中膜结构几乎消失。心电图是评价心肌缺血的重要辅助检查,本实验中通过注射 ISO造成冠状动脉供血不足引起慢性心肌缺血,在心电图上的表现为 S-T 段明显压低,压低程度 >0.1 mV。

在冠心病血瘀证大鼠动物模型成功建立的基础上,分别进行了电镜检测,Western blot 半定量分析及免疫荧光细胞定位观察。电镜结果显示,血瘀证前期组,线粒体开始肿胀变长,嵴模糊不清,排列紊乱,提示机体在应激早期阶段开始通过调节线粒体的形态,促进线粒体功能的发挥,调节细胞能量水平,从而在短时间范围内抵御压力损伤;亚血瘀证期组,线粒体呈攒簇现象,部分线粒体形态上显著拉长,提示机体在能量代谢危机发生时,受损线粒体会相互靠近,融合,实现功能互补,从而满足细胞的能量需求;心血瘀阻证期组,大部分线粒体已溶解破裂,小且破碎,提示心肌细胞面临缺血缺氧损伤时,线粒体动力学蛋白合成受阻,以致线粒体几乎不能够再形成新的嵴,同时线粒体可能正在发生分裂,线粒体自噬被激活,从而缓解细胞内能量失衡的压力。线粒体被认为是在生理和病理条件下控制心脏功能和心肌细胞活性的主要调节器^[22],线粒体动态平衡是由线粒体动力学和线粒体自噬来维持的。当细胞暴露在各种压力下时,线粒体经常发生过度融合而延长,这被认为是一种适应性过程^[23]。与破碎的线粒体相比,细长的线粒体对氧化应激诱导的心肌细胞损伤具有更强的抵抗力^[24]。Mfn2 过表达可阻止冠心病血瘀证形成过程中缺血缺氧诱导的线粒体碎片化、膜通透性增加及细胞凋亡的发生。Mfn2 蛋白表达量在血瘀证前期、亚血瘀证期两个不同阶段皆上调。心血瘀阻证期 Mfn2 仍然维持在较高的表达水平。一方面,这种增加可能

是限制线粒体碎裂的一种代偿机制;另一方面,是为启动线粒体自噬做好底物泛素化的准备,增强心肌细胞线粒体自噬的能力。线粒体外膜蛋白 2 以 Parkin 依赖的方式被泛素化。通过自噬被标记为降解的线粒体,从而调节线粒体的数量以适应细胞的生存环境^[25],避免线粒体继续发生不必要的分裂和融合,这对冠心病血瘀证发生发展过程中所造成的心肌细胞损伤具有一定的补偿和保护作用。线粒体内膜融合是由 OPA1 介导的。OPA1 除了在内膜融合中发挥作用外,还维持着嵴的完整性^[26]。亚血瘀证期和心血瘀阻证期 OPA1 的表达减少会使融合/分裂的平衡转向更多的分裂。OPA1 表达量的改变,与肌丝间线粒体紊乱、嵴结构受损及细胞色素 C (Cyt C) 的释放有关。与空白组及血瘀证前期组比较,OPA1 表达量明显下降。这进一步加重了心肌损伤,加速了冠心病血瘀证发展的进程。Drp1 从胞浆移位到线粒体外膜,与线粒体中的受体蛋白 Fis1 相互作用,启动分裂^[27]。Drp1 的表达或激活可能是线粒体碎片化的主要原因^[28]。Drp1 执行的线粒体分裂对于将受损的线粒体从正常线粒体中分离出来是必要的^[29],这既能够促进线粒体的重新分布,还是有效自噬所必需的。作为 Drp1 的受体, Fis1 相应地发生了上调,尤其是亚血瘀证组和心血瘀阻证组的表达水平较空白组及血瘀证前期组明显增加。然而,线粒体的过度碎裂会导致线粒体功能降低以及对细胞凋亡的易感性增加^[30]。与亚血瘀证组相比,心血瘀阻证期 Drp1 表达水平降低,这有利于纠正线粒体过度分裂,阻断内源性细胞凋亡程序。为了更好地可视化冠心病血瘀证形成期间的线粒体形态,本课题组对线粒体动力学相关蛋白进行了荧光标记染色。脂质过载是心脏功能障碍的关键触发因素^[31]。本课题组在造模过程中进行了高脂饲料的持续喂养,血液胆固醇水平的增加导致动脉粥样硬化负担加重。由于机体在脂质超负荷期间经历了氧化磷酸化的急性上调,心肌细胞需要更高水平的线粒体融合允许健康和受损的线粒体之间进行物质交换,修复线粒体损伤^[32]。在血瘀证前期组(高脂阶段)及亚血瘀证组(动脉粥样硬化阶段),Mfn2 及 OPA1 蛋白在线粒体中广泛聚集。结果表明,红色斑点明显增多且线粒体形态延长,超融合成“葡萄状”簇,双核聚集为一体。但是随着缺血缺氧的发生,能量需求和供应失去平衡之后,线粒体融合蛋白的表达逐渐下降,荧光强度明显减弱。过多的脂质会导致活性氧过量产生,并使线粒体容易

受损。在高水平的脂肪酸孵育的心肌细胞中,Drp1募集水平趋于增加,Drp1 GTP酶活性更高,线粒体分裂加剧^[33]。HU等^[31]最新一项实验研究结果表明,脂质过载创造了氧化还原环境,通过乙酰化激活Drp1,增加了Drp1的活性和线粒体易位。Fis1是一种与Drp1相互作用的线粒体外膜蛋白,为Drp1的募集提供支架^[30]。从图中可以看到,Drp1与Fis1存在很好的共定位(红色和绿色荧光信号的共存证明了这一点),尤以亚血瘀证期(动脉粥样硬化阶段)荧光强度最为明显。课题组通过显示Drp1与Fis1的共存以及对蛋白的Western印迹分析证明了机体在应激状态下,Drp1与Fis1共同调控线粒体分裂促使受损的线粒体分离,调节线粒体的数量以适应细胞的生存环境^[25]。

综上所述,心肌细胞线粒体融合-分裂的动态平衡对维持正常线粒体群体和功能起着至关重要的作用,线粒体动力学随着心肌细胞能量需求的变化而变化。线粒体融合蛋白Mfn2在冠心病血瘀证形成过程早期阶段以融合效应为主,随着病程的逐渐发展,Mfn2开始介导线粒体自噬过程,从而调节线粒体的数量以适应细胞的生存环境。OPA1除了在内膜融合中发挥作用外,还维持着嵴的完整性^[30],OPA1表达量下降与冠心病血瘀证加速发展密切相关。线粒体外膜蛋白Drp1与受体Fis1发挥分裂作用,尤其是在机体持续暴露在能量危机的情况下,通过将受损的线粒体从正常线粒体中分离出来为线粒体自噬做好准备,同时缓解机体能量需求和供应失衡的状态。从高脂阶段逐渐发展到心肌缺血缺氧的阶段,这是一个漫长而逐步加重的病变过程。通过研究线粒体动力学相关蛋白在其中扮演的“角色”,为冠心病早期干预,早期治疗提供了理论依据,这可能成为心脏病治疗的新靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 胡彬文. 冠心病PCI术后健康管理系统构建研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.

[2] 中华医学会全科医学分会慢病管理专业学组. 中国成人动脉粥样硬化性心血管疾病基层管理路径专家共识(建议稿)[J]. 中国全科医学,2017,20(3):251-261.

[3] 王庆国. 以血瘀证为切入点进行中医证候规范及其生物学基础的研究[J]. 江西中医药大学学报,2004,16(5):5-10.

[4] 王阶,陈光. 基于复杂系统的冠心病痰瘀滞虚理论与

临证应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):11-15.

[5] 简维雄,左和宁,袁肇凯,等. 心血瘀阻证动态演变过程大鼠模型的建立及方证验证评价[J]. 中医杂志,2015,56(16):1420-1424.

[6] 简维雄,袁肇凯,胡志希,等. 冠心病血瘀证病理演变过程的探索[J]. 中华中医药学刊,2015,33(7):1551-1554.

[7] 简维雄,左和宁,刘韶,等. 基于代谢组学的心血瘀阻证动态演变过程研究[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(12):1496-1503.

[8] 刘文臣. 心肌缺血心肌细胞线粒体动力学Mfn2和Drp1蛋白变化及益气活血方对其影响的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.

[9] PARKER D J, MORAN A, MITRA K. Studying mitochondrial structure and function in drosophila ovaries[J]. J Vis Exp,2017(119):54989.

[10] HALL A R, BURKE N, DONGWORTH R K, et al. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction[J]. Cell Death Dis,2016,7(5):e2238.

[11] ENZMANN G, KARGARAN S, ENGELHARDT B. Ischemia-reperfusion injury in stroke: impact of the brain barriers and brain immune privilege on neutrophil function[J]. Ther Adv Neurol Disord,2018,doi: 10.1177/1756286418794184.

[12] ROCHA A G, FRANCO A, KREZEL A M, et al. MFN2 agonists reverse mitochondrial defects in preclinical models of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A[J]. Science,2018,360(6386):336-341.

[13] GONG G, SONG M, CSORDAS G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. Science, 2015, 350 (6265) : aad2459.

[14] PERNAS L, SCORRANO L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function [J]. Annu Rev Physiol,2016,78:505-531.

[15] OLICHON A, BARICAULT L, GAS N, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis[J]. J Biol Chem,2003,278(10):7743-7746.

[16] FREZZA C, CIPOLAT S, MARTINS DE BRITO O, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion [J]. Cell,2006,126(1):177-189.

[17] LEE Y, LEE H Y, HANNA R A, et al. Mitochondrial

- autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5):H1924-H1931.
- [18] IKEDA Y, SHIRAKABE A, MAEJIMA Y, et al. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress [J]. *Circ Res*, 2015, 116(2):264-278.
- [19] 彭峰林, 黄丽丽, 郭艳菊. 运动性心肌缺血损伤模型大鼠的制备[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(40):6007-6013.
- [20] KULKARNI S S, CANTÓ C. Mitochondrial post-translational modifications and metabolic control: sirtuins and beyond [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2017, 13(4):338-351.
- [21] HOM J, SHEU S S. Morphological dynamics of mitochondria—a special emphasis on cardiac muscle cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(6):811-820.
- [22] ZHANG Y, WANG Y, XU J, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(2):e12542.
- [23] OANH N T K, PARK Y Y, CHO H. Mitochondria elongation is mediated through SIRT1-mediated MFN1 stabilization [J]. *Cell Signal*, 2017, 38:67-75.
- [24] MA C, BEYER A M, DURAND M, et al. Hyperoxia causes mitochondrial fragmentation in pulmonary endothelial cells by increasing expression of pro-fission proteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3):622-635.
- [25] LI J, SHI W, ZHANG J, et al. To explore the protective mechanism of PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin mitophagy-mediated extract of *Periplaneta americana* on lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte injury [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:1383-1391.
- [26] 毛颖. Omi/HtrA2 裂解线粒体融合蛋白 OPA1 诱导脑缺血再灌注细胞凋亡的机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [27] NI H M, WILLIAMS J A, DING W X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control [J]. *Redox Biol*, 2015, 4:6-13.
- [28] FERREIRA-DA-SILVA A, VALACCA C, RIOS E, et al. Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncocytic thyroid tumors and regulates cancer cell migration [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0122308.
- [29] CHO H M, SUN W. The coordinated regulation of mitochondrial structure and function by Drp1 for mitochondrial quality surveillance [J]. *BMB Rep*. 2019. 52(2):109-110.
- [30] SERASINGHE M N, CHIPUK J E. Mitochondrial fission in human diseases [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 240:159-188.
- [31] HU Q, ZHANG H, GUTIÉRREZ CORTÉS N, et al. Increased Drp1 acetylation by lipid overload induces cardiomyocyte death and heart dysfunction [J]. *Circ Res*, 2020, 126(4):456-470.
- [32] VARUZHANYAN G, ROJANSKY R, SWEREDOSKI M J, et al. Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis [J]. *Elife*, 2019, 8:e51601.
- [33] KUZMICIC J, PARRA V, VERDEJO H E, et al. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(3):323-336.

[责任编辑 王鑫]