

网络出版时间:2024-11-18 15:59:24 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1542.013

重组鼠 MANF 通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路参与脓毒症诱导心肌损伤的保护作用

何浩,李成,胡赛,夏凤强,张弛,王静

[长沙市第四医院(湖南师范大学附属长沙医院)重症医学科,长沙 410006]

摘要 目的 探讨中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子(MANF)通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路在脓毒症诱导心肌损伤中的保护作用。方法 48 只小鼠随机分为 4 组:对照组、重组鼠 MANF(rmMANF)组、盲肠结扎穿刺(CLP)组和 CLP + rmMANF 组,每组 12 只。CLP 后 8 h 检测存活率、脓毒症评分、肛温、血生化指标、心肌损伤病理指标及内质网应激(ERS)相关蛋白表达。将 H9C2 细胞分为对照(Con)组、脂多糖(LPS)组、LPS + rmMANF 组、LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组。LPS 处理 24 h,收集细胞,分析细胞中 ERS 蛋白表达和凋亡情况。结果 与 CLP 组比较,CLP + rmMANF 组脓毒症评分及血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血尿素氮(BUN)水平降低($P < 0.01$),肛温、血清白蛋白(ALB)水平升高($P < 0.05$);CLP + rmMANF 组心脏组织中 MANF 表达显著增加($P < 0.01$),葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)表达及 TUNEL 阳性细胞百分比显著降低($P < 0.05$)。体外实验中,LPS 刺激下调了 H9C2 细胞中 SIRT1 和 AMPK 的表达,而 rmMANF 进一步增加了 SIRT1 和 AMPK 的表达水平。与 LPS + rmMANF 组比较,LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组 H9C2 细胞中 GRP78、CHOP 蛋白表达和细胞凋亡率增加($P < 0.05$)。结论 rmMANF 通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路抑制脓毒症诱导心肌损伤相关 ERS,进而保护心肌损伤。

关键词 内质网应激;中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子;脓毒症;心肌损伤

中图分类号 R 459.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1981-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.013

2024-08-31 接收

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:2021JJ70156)

作者简介:何浩,男,副主任医师;

李成,男,副主任医师,通信作者, E-mail: 13064937@

qq.com

脓毒症诱导的心肌损伤(sepsis-induced myocardial injury, SIMI)无特效疗法,治疗策略主要是支持性治疗,包括血液动力学支持、液体复苏、血管升压治疗和变力药物治疗等^[1-4]。然而,这些疗法并不能解决疾病的潜在病理生理学问题。虽然 SIMI 损

STING, p-TBK1, p-IRF3, p-STING. The polarization of macrophage RAW264.7 cells treated with diABZI was analyzed by flow cytometry. Co-culture of diABZI-treated RAW264.7 macrophage and T cells was applied to evaluate the change of T cell response. **Results** STING signaling related proteins were upregulated in macrophage RAW264.7 cells treated with diABZI for 3 hours. The expression of CD86 was upregulated on the surface of macrophages after 12 hours of diABZI treatment, and the CD86/CD206 ratio was elevated, which presented the M1 polarization phenotype. When coculturing diABZI-treated macrophage RAW264.7 cells with T cells, the cytokine secretion ability of T cells including CD4⁺T and CD8⁺T cells was enhanced and the expression of CD107a in CD8⁺T cells was upregulated. **Conclusion** STING signaling induces M1 polarization of macrophages which enhance the function of T cells, especially CD8⁺T cell immune response.

Key words macrophage; STING signaling; polarization of macrophage; T cell immune response; CD4⁺T cells; CD8⁺T cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 81902056); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053169)

Corresponding author Wang Qin, E-mail: qinwang1025@163.com

伤的机制尚未阐明,但研究^[5]已确定氧化应激和 Ca^{2+} 超载是心肌损伤的主要原因。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)可由缺血、低氧、氧化应激、 Ca^{2+} 稳态紊乱以及其他生理和病理因素诱导,其中一些因素可触发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[6]。研究^[7]显示,ERS相关的凋亡在SIMI的发病机制中起重要作用。因此,研究ERS与蛋白降解的相互作用对SIMI的治疗具有重要意义。中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF)定位在内质网,是一种典型的ERS反应蛋白,其表达和分泌被证实受不同ERS状态调节^[8]。研究^[9]显示,MANF预处理可以通过抑制ERS诱导的铁死亡来预防脓毒症小鼠相关的肺损伤。然而,MANF是否通过调节ERS来改善SIMI仍不清楚。该研究通过建立盲肠结扎穿刺(cecal ligation and puncture, CLP)小鼠模型和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的H9C2细胞损伤模型,分析重组鼠MANF(recombinant murine MANF, rmMANF)预处理对SIMI进展的预防作用,并探讨这种作用是否与调节ERS介导的心肌细胞凋亡有关。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物 H9C2细胞取自中国科学院上海细胞库,在DMEM(美国Gibco公司)中培养,其中含10%胎牛血清(美国Invitrogen公司)和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青-链霉素(苏州新赛美生物科技有限公司)。96只雄性C57BL/6J小鼠(6~8周龄)购自成都达硕生物科技有限公司,在温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度(55 ± 10)%标准环境下,12 h/12 h昼夜循环,适应性饲养1周。所有动物实验方案均经长沙市第四医院伦理委员会批准同意(审批号:20220611-5),并按照院动物护理和使用委员会的指导原则进行。

1.2 CLP模型建立与实验分组 通过CLP诱导小鼠脓毒症模型,3%异氟烷吸入麻醉小鼠^[10]。腹部皮毛剃光,腹部皮肤用75%乙醇消毒,使用1~2 cm的中线剖腹术暴露盲肠和相邻的肠组织,使用4-0尼龙缝线在距盲肠末端1/3处结扎盲肠,并使用25 G针头对盲肠壁进行2次穿刺。从穿透孔挤出少量粪便以确保通畅。将盲肠放回腹腔内,缝合腹膜、筋膜、腹部肌肉组织和皮肤的切口。通过皮下注射预热的0.9%氯化钠溶液(1 ml/100 g, 37 $^{\circ}\text{C}$)使所有手术的小鼠复苏。对于存活实验,构建了重症CLP模型,在盲肠末端2/3处紧紧结扎,其他步骤同

上。2名研究人员计算了术后8 h的脓毒症评分。使用动物温度计(南京卡尔文生物科技有限公司)在CLP后8 h测定肛门温度。

在存活实验中,48只小鼠随机分为4组:对照组、rmMANF组、CLP组和CLP + rmMANF组,每组12只。参照文献报道剂量^[9],rmMANF组和CLP + rmMANF组的小鼠通过尾静脉注射给予rmMANF(750 $\mu\text{g}/\text{kg}$,北京义翘神州科技股份有限公司),每天1次,而对照组和CLP组的小鼠通过尾静脉注射给予相同体积的0.9%氯化钠溶液,持续2 d。在第3天,CLP组和CLP + rmMANF组小鼠构建了重症CLP模型,观察各组小鼠72 h内存活率。

在疗效考察实验中,48只小鼠随机分为4组:对照组、rmMANF组、CLP组和CLP + rmMANF组,每组12只。rmMANF组和CLP + rmMANF组的小鼠通过尾静脉注射给予rmMANF(750 $\mu\text{g}/\text{kg}$,北京义翘神州科技股份有限公司),每天1次,而对照组和CLP组的小鼠通过尾静脉注射给予相同体积的0.9%氯化钠溶液,持续2 d。在第3天,CLP组和CLP + rmMANF组小鼠构建了CLP模型。CLP后8 h进行后续分析。

1.3 ELISA试验和常规血液参数、血液生化试验

CLP后8 h,从小鼠左眼球收集至少1 ml血液至肝素包被的试管中,3 000 r/min离心10 min从全血中分离血清150 μl 。采用XR210全自动血液生化分析仪(中山市新锐医疗设备科技有限公司)检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatinase, CK)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartateaminotransferase, AST)、白蛋白(albumin, ALB)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。

1.4 超声心动图检查 CLP后8 h,使用动物特异性超声心动图仪器(VisualSonics Vevo3100,加拿大VisualSonics公司)评估心脏功能。使用Vevo LAB 3.0.0软件获得一系列左心室参数的M-模式,包括射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左心室收缩末期内径(left ventricle internal diameter in diastole, LVIDd)、补心输出量(cardiac output, CO)、每搏输出量(stroke volume, SV)、左心室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume, LVESV)、左心室收缩期前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness in systole, LVAWs)和左心室舒张期前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness in diastole, LVAWd)。

1.5 组织学分析 将心肌固定在4%多聚甲醛中,切片厚度4~5 μm 。使用HE染色观察心肌的形态学变化。对于免疫染色,石蜡包埋切片用抗MANF、葡萄糖调节蛋白78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)的第一抗体染色,与第二生物素化抗兔IgG一起孵育,用DAB染色,并使用显微镜成像(Invitrogen EVOS M5000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),抗体均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.6 细胞分组与处理 在体外试验中,为了考察LPS对ERS相关蛋白表达的影响,将H9C2细胞接种在6孔板中,并在处理前使其达到70%汇合。H9C2细胞暴露于不同浓度(0、2、4、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)LPS中24 h,收集细胞,采用Western blot分析细胞中MANF、GRP78、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)蛋白表达情况。

为了考察rmMANF对LPS诱导的H9C2细胞损伤的影响,将细胞分为对照(Con)组、rmMANF组、LPS组和LPS+rmMANF组。rmMANF组和LPS+rmMANF组H9C2细胞在LPS处理前1 h,用rmMANF(10 ng/ml)处理。随后,LPS组和LPS+rmMANF组H9C2细胞暴露于4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 24 h。收集细胞,采用Western blot分析细胞中GRP78、CHOP蛋白和SIRT1/AMPK信号通路表达情况。

为了进一步考察rmMANF通过激活SIRT1/AMPK途径抑制ERS,分别采用EX527和化合物C(Cpd C)处理H9C2细胞,其中EX527和Cpd C分别是SIRT1和AMPK的抑制剂(美国Sigma公司)。将细胞分为对照(Con)组、LPS组、LPS+rmMANF组、LPS+rmMANF+EX527组和LPS+rmMANF+Cpd C组。LPS+rmMANF组、LPS+rmMANF+EX527组和LPS+rmMANF+Cpd C组在LPS处理前1 h,分别用rmMANF(10 ng/ml)、rmMANF(10 ng/ml)+EX527(1 mmol/L)、rmMANF(10 ng/ml)+Cpd C(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)处理。随后,除Con组外,其他组H9C2细胞暴露于4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 24 h。收集细胞,分析细胞中GRP78、CHOP蛋白表达和凋亡情况。

1.7 Western blot分析 使用RIPA裂解缓冲液(上海碧云天生物技术股份有限公司)获得细胞、心脏样品裂解物。使用BCA试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)测定蛋白质含量。将等量的蛋白质进行SDS-PAGE并转移至PVDF膜(美国Millipore Corporation公司)。用5%脱脂乳封闭膜,并用初级抗体(MANF、GRP78、CHOP、SIRT1、AMPK、

GAPDH,均购自武汉赛维尔生物科技有限公司)孵育过夜。然后用辣根过氧化物酶偶联的二级抗兔或小鼠抗体(1:10 000)孵育20 min。用增强化学发光检测试剂在凝胶成像系统(美国Protein Simple公司)上检测免疫反应性。

1.8 TdT介导的dUTP缺口末端标记法(TdT mediated-dUTP nick end labeling, TUNEL)评估 通过TUNEL试验评估心脏组织和细胞凋亡。计数每个视野中TUNEL阳性细胞的数量,并计算凋亡率。凋亡率=阳性凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。所有数据和图像均进行盲法分析。

1.9 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行统计分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,随后通过Bonferroni校正进行两两比较测试。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rmMANF预处理对小鼠脓毒症和脓毒性心肌损伤的作用 CLP组在72 h内的存活率约为20%,而CLP+rmMANF组的存活率增加至近80%,见图1A。与对照组比较,CLP组脓毒症评分升高($P < 0.001$),肛门温度及血清ALB水平降低($P < 0.001$)。与CLP组比较,CLP+rmMANF组脓毒症评分及血清LDH、CK、AST、BUN水平降低($P < 0.01$),肛门温度及血清ALB水平升高($P < 0.05$),见图1B-H。用超声心动图观察小鼠心功能水平和心脏结构。与对照组比较,CLP组的左室EF、左室FS、LVIDd、LVEDV和SV均降低($P < 0.05$)。此外,与CLP组比较,CLP+rmMANF组左室EF、左室FS、LVIDd、LVEDV、SV均增加($P < 0.05$)。见表1。

2.2 rmMANF在体内对CLP诱导的心脏组织损伤的影响 HE染色显示,CLP可引起显著的心肌损伤,表现出紊乱或空泡化和断裂的肌纤维。rmMANF预处理减轻了损伤。TUNEL染色结果显示,与对照组比较,CLP组TUNEL阳性细胞百分比增加($P < 0.001$);与CLP组比较,CLP+rmMANF组TUNEL阳性细胞百分比降低($P < 0.01$)。见图2。

2.3 rmMANF预处理对CLP诱导ERS的影响 与对照组比较,CLP组心脏组织中MANF表达降低($P < 0.001$),GRP78、CHOP表达增加($P < 0.01$)。与CLP组比较,CLP+rmMANF组心脏组织中MANF表达增加($P < 0.001$),GRP78、CHOP表达降低($P < 0.05$)。见图3。

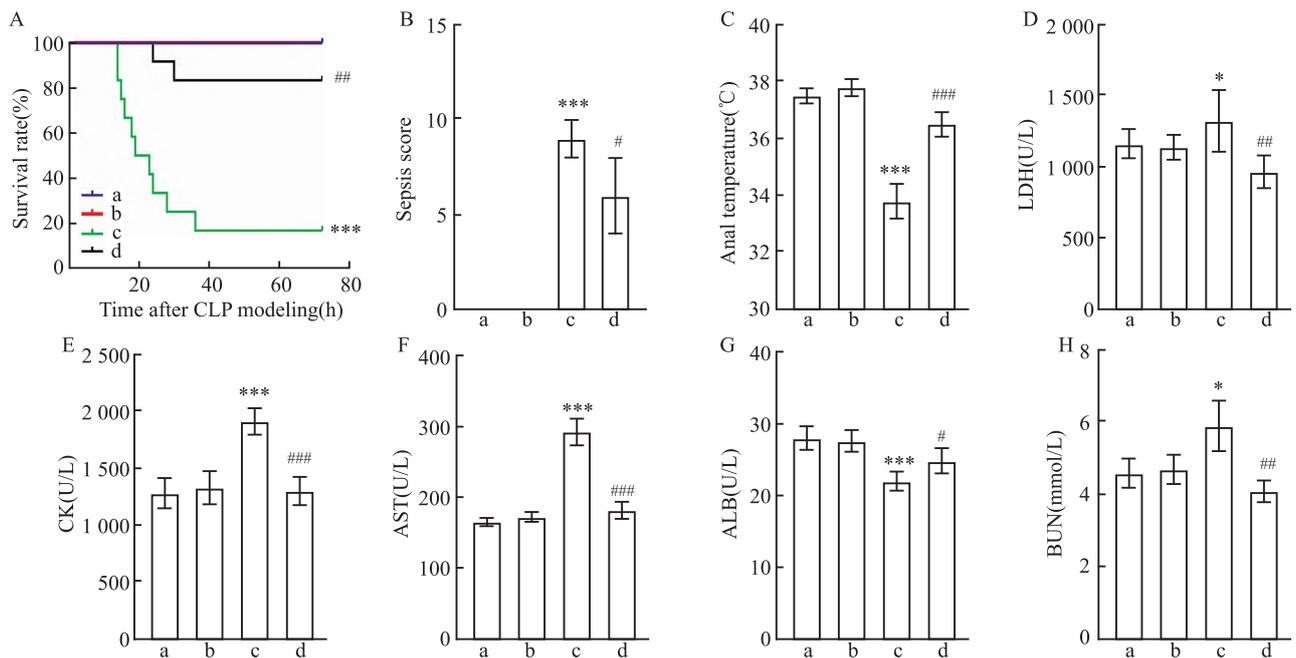


图1 rmMANF 预处理对脓毒症小鼠的作用

Fig. 1 Effect of rmMANF pretreatment on sepsis mice

A: survivorship curve; B: Sepsis score; C: Anal temperature; D - H: LDH, CK, AST, ALB, BUN content; a: Control group; b: rmMANF group; c: CLP group; d: CLP + rmMANF group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs CLP group.

表1 小鼠的超声心动图分析($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Echocardiographic analysis of mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	EF (%)	FS (%)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	LVEDV (ml)	LVESV (ml)	Heart rate (beat/min)	SV (ml)
Control	72.86 ± 5.23	38.90 ± 4.90	3.720 ± 0.301	2.523 ± 0.251	0.059 ± 0.011	0.023 ± 0.005	408.3 ± 40.3	0.037 ± 0.008
rmMANF	71.52 ± 5.36	38.20 ± 4.62	3.743 ± 0.318	2.503 ± 0.257	0.060 ± 0.010	0.024 ± 0.005	405.0 ± 39.6	0.036 ± 0.008
CLP	43.23 ± 7.78 **	21.65 ± 3.74 **	3.013 ± 0.365 *	2.380 ± 0.379	0.036 ± 0.011 **	0.020 ± 0.008	397.8 ± 34.9	0.019 ± 0.008 *
CLP + rmMANF	55.28 ± 4.98 #	26.59 ± 3.37 #	3.410 ± 0.458 #	2.374 ± 0.375	0.049 ± 0.015 #	0.020 ± 0.008	401.0 ± 36.7	0.025 ± 0.008 #

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs CLP group.

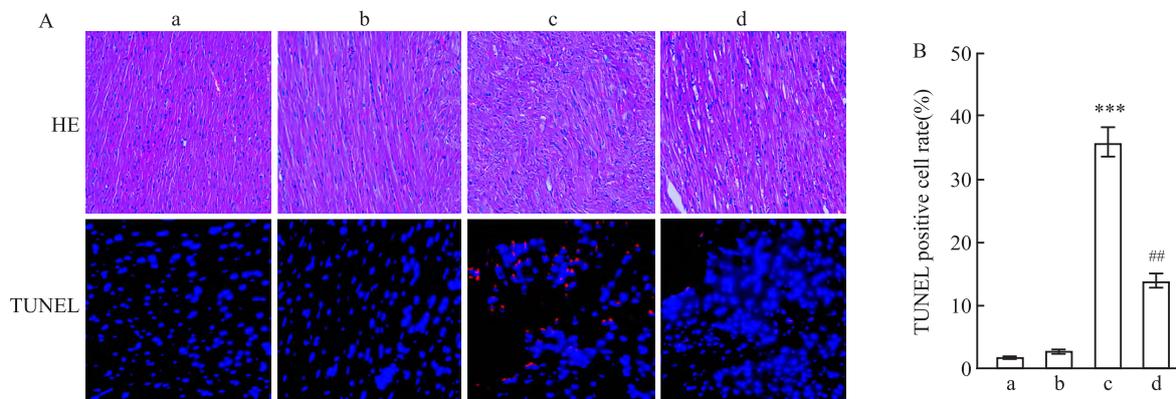


图2 rmMANF 在体内对 CLP 诱导的心脏组织损伤的影响

Fig. 2 Effect of rmMANF on CLP - induced cardiac tissue damage *in vivo*

A: HE and TUNEL staining showed the degree of myocardial injury $\times 200$; B: Quantitative analysis of TUNEL positive cell percentage in each group; a: Control group; b: rmMANF group; c: CLP group; d: CLP + rmMANF group; ** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.01$ vs CLP group.

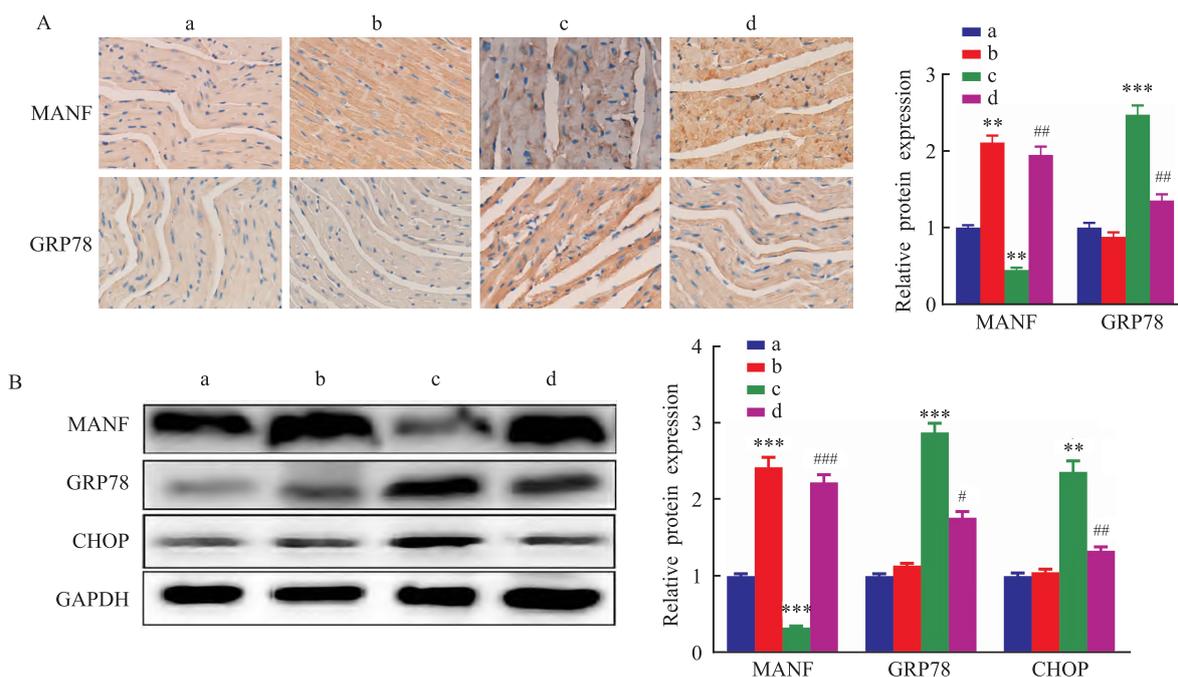


图3 rmMANF 预处理对 CLP 诱导 ERS 的影响

Fig.3 Effects of rmMANF pretreatment on ERS induced by CLP

A: Immunohistochemical analysis and quantitative analysis of ERS protein expression in heart tissue ×200; B: Western blot analysis of ERS protein expression and quantitative analysis in heart tissue; a: Control group; b: rmMANF group; c: CLP group; d: CLP + rmMANF group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs CLP group.

2.4 rmMANF 对 LPS 诱导的 H9C2 细胞 ERS 的影响

为了研究 LPS 暴露和 ERS 的关系,用指定剂量的 LPS 刺激 H9C2 以量化 ERS 蛋白的表达。当用不同剂量 LPS 刺激 H9C2 细胞 24 h 时,MANF 蛋白以剂量依赖性方式下调 ($P < 0.05$), GRP78、CHOP 以剂量依赖性方式上调 ($P < 0.01$),见图 4。为了阐明 rmMANF 对 H9C2 的保护作用是否与 ERS 的调节有关,对 ERS 蛋白表达进行了评估。与体内实验结果一致,与 Con 组比较,LPS 组 H9C2 细胞中 GRP78、CHOP 表达增加 ($P < 0.001$);与 LPS 组比较,rmMANF + LPS 组 H9C2 细胞中 GRP78、CHOP 表达降低 ($P < 0.01$)。见图 5。上述结果表明 rmMANF 的保护作用涉及 ERS 的调节。

2.5 rmMANF 对 SIRT1/AMPK 信号通路的影响

Western blot 试验表明,LPS 刺激下调了 H9C2 细胞中 SIRT1 和 AMPK 的表达,而 rmMANF 进一步增加了 SIRT1 和 AMPK 的表达水平,见图 6A。为了进一步探索 rmMANF 通过激活 SIRT1/AMPK 途径抑制 ERS,分别采用 EX527 和 Cpd C 处理 H9C2 细胞,结果表明,与 LPS + rmMANF 组比较,LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组 H9C2 细胞中 GRP78、CHOP 蛋白表达增加 ($P < 0.05$),见图

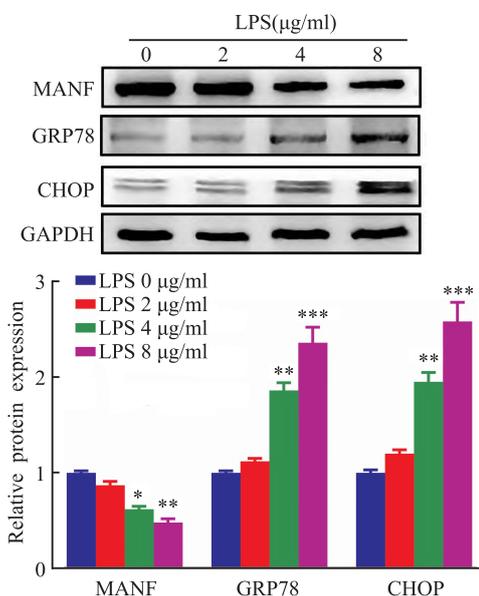


图4 不同剂量 LPS 刺激对 H9C2 细胞中 ERS 的影响

Fig.4 Effects of LPS stimulation at different doses on ERS in H9C2 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs LPS 0 μg/ml.

6B。再使用 TUNEL 分析不同处理对细胞凋亡的影响,结果表明:与 Con 组比较,LPS 组 H9C2 细胞凋亡率增加 ($P < 0.001$);与 LPS 组比较,LPS + rm-

MANF 组 H9C2 细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$), 而 LPS + rmMANF 组比较, LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组 H9C2 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$), 见图 6C。因此, rmMANF 可能通过激活

SIRT1/AMPK 信号通路抑制 ERS。

3 讨论

MANF 是一种维持蛋白质折叠稳态的进化保守

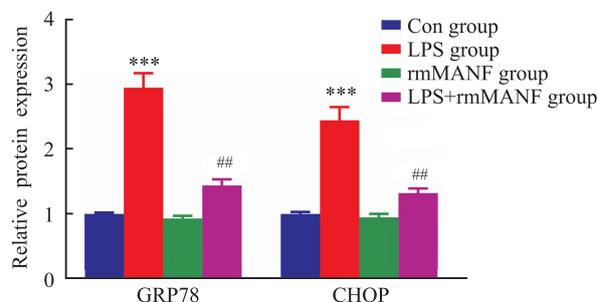
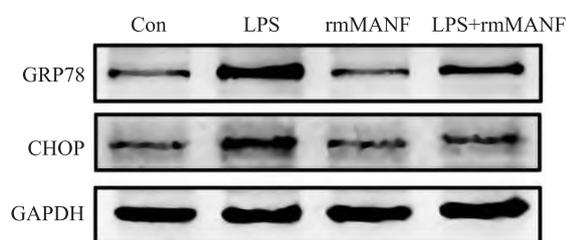


图 5 rmMANF 对 LPS 诱导的 H9C2 细胞 ERS 的影响

Fig. 5 Effects of rmMANF on H9C2 cells' ERS induced by LPS

*** $P < 0.001$ vs Con group; ** $P < 0.01$ vs LPS group

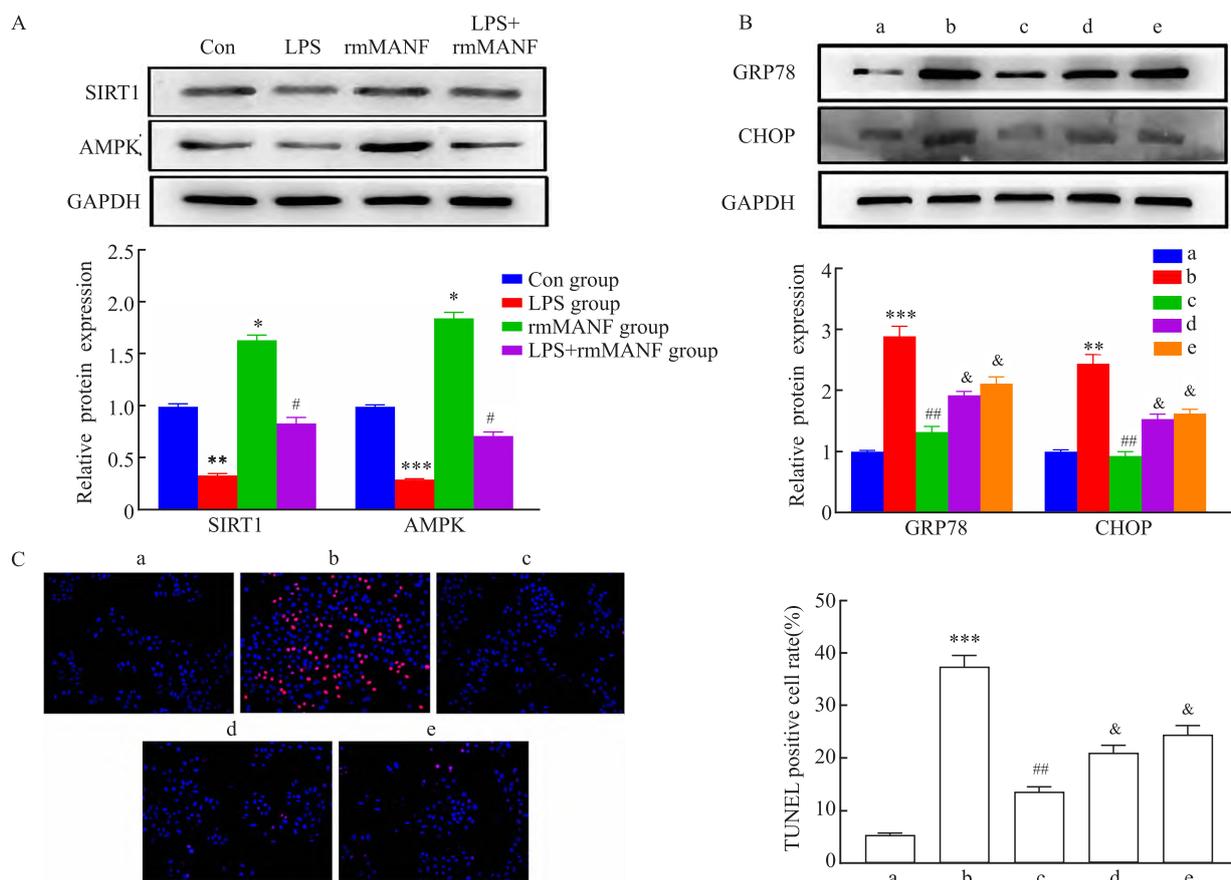


图 6 rmMANF 对 SIRT1/AMPK 信号通路的影响

Fig. 6 The influence of rmMANF on SIRT1/AMPK signal pathway

A: Western blot analysis of the effect of rmMANF on the expression of SIRT1/AMPK signaling pathway protein in LPS-induced H9C2 cells; B: Western blot analysis of the effects of EX527 and Cpd C treatment on the expression of GRP78 and CHOP proteins in H9C2 cells; C: The effects of EX527 and Cpd C treatment on apoptosis of H9C2 cells were analyzed by TUNEL staining $\times 50$; a: Con group; b: LPS group; c: LPS + rmMANF group; d: LPS + rmMANF + EX527 group; e: LPS + rmMANF + Cpd C group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs LPS group; & $P < 0.05$ vs LPS + rmMANF group.

蛋白^[9]。研究^[11]显示,单核巨噬细胞来源的 MANF 通过抑制 NF- κ B 活化减轻心肌炎症。与既往报道一致^[12],本研究显示 rmMANF 预处理增加了 CLP 小鼠的存活率,并降低了脓毒症评分。rmMANF 预处理降低了 CLP 小鼠血清生物标志物(LDH、CK、AST 和 BUN)的水平,改善心脏功能指标(SV、CO、LVEDV 和 LVESV),显示了 rmMANF 对脓毒症和脓毒性心肌损伤的保护作用。

脓毒症引起的炎症和活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生可能会诱导适应性 ERS 和细胞死亡^[13]。ERS 和氧化应激是脓毒症的重要病理生理特征,这些应激源之间存在相互联系。在脓毒症期间,产生了大量的 ROS,超过了内源性抗氧化机制的清除能力,随后 ROS 干扰 ER 蛋白的折叠,激活 UPR,并诱导 ERS,最终导致细胞凋亡和坏死^[14]。在稳态条件下,ERS 跨膜蛋白与 GRP78 结合,当 GRP78 与这些分子的分离促进了蛋白质的正确折叠,而 UPR 的延长激活可能引发凋亡细胞死亡信号(如 Bcl2 和 Bax)^[7]。Li et al^[15]结果显示 CLP 损伤小鼠的心肌细胞中 ERS 相关蛋白(GRP78、ATF6 等)的表达水平明显高于正常对照组,并且心肌细胞凋亡率增加。本研究中,CLP 小鼠的心脏组织和 LPS 诱导的 H9C2 细胞中 ERS 相关蛋白(GRP78、CHOP)表达增加,并且心脏组织和 H9C2 细胞中凋亡百分比增加,通过 rmMANF 给药逆转了上述变化。这些数据证明 rmMANF 的心脏保护作用可能依赖于 ERS 的调节。

目前已证实 SIRT1/AMPK 信号通路参与 ERS 的调节^[16]。研究^[17]表明,SIRT1 在氧化应激、凋亡和衰老的心肌保护中起着关键作用,同时 SIRT1 的过度表达减轻了心肌梗死。Sang et al^[18]研究显示,激活 SIRT1/AMPK 通路可以有效抑制脓毒症诱导的急性肺损伤大鼠模型中的 ERS。根据这些研究,激活 SIRT1/AMPK 信号通路可能是抑制 SIM1 相关 ERS 的一种新策略。本研究通过 Western blot 分析表明 rmMANF 在 LPS 刺激的 H9C2 细胞中可能激活 SIRT1/AMPK 信号通路。此外,本研究针对同一途径的 2 个独立成员分别选择了抑制剂作为相互独立的阳性对照,即 SIRT1 抑制剂(EX527)和 AMPK 抑制剂(Cpd C),由于不同结构的化合物可能具有不同的脱靶效应,2 种抑制剂均观察到可逆转 rmMANF 对 ERS 的抑制作用。

参考文献

[1] Yan X, Zhang Y L, Han X, et al. Time series transcriptomic a-

nalysing by RNA sequencing reveals a key role of PI3K in sepsis-induced myocardial injury in mice [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 903164. doi:10.3389/fphys.2022.903164.

- [2] Shen H, Xie K, Li M, et al. N6-methyladenosine (m6A) methyltransferase METTL3 regulates sepsis-induced myocardial injury through IGF2BP1/HDAC4 dependent manner [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 322. doi:10.1038/s41420-022-01099-x.
- [3] Daulasim A, Vieillard-Baron A, Geri G. Hemodynamic clinical phenotyping in septic shock [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2021, 27(3): 290-7. doi:10.1097/MCC.0000000000000834.
- [4] Ling R R, Ramanathan K, Poon W H, et al. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation as mechanical circulatory support in adult septic shock: a systematic review and meta-analysis with individual participant data meta-regression analysis [J]. *Crit Care*, 2021, 25(1): 246. doi:10.1186/s13054-021-03668-5.
- [5] Chen Z, Cao Z, Gui F, et al. TMEM43 protects against sepsis-induced cardiac injury via inhibiting ferroptosis in mice [J]. *Cells*, 2022, 11(19): 2992. doi:10.3390/cells11192992.
- [6] Luo N, Chen G B, Zhang T, et al. Genipin attenuates sepsis-induced splenocyte apoptosis via the inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46(2): 187-93. doi:10.1248/bpb.b22-00563.
- [7] Li T, Chen Y, Li Y, et al. FAM134B-mediated endoplasmic reticulum autophagy protects against sepsis myocardial injury in mice [J]. *Aging*, 2021, 13(10): 13535-47. doi:10.18632/aging.202786.
- [8] Cheng D, Zhou T, Liu H, et al. MANF inhibits Sjögren's syndrome salivary gland epithelial cell apoptosis and antigen expression of Ro52/SSA through endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110582. doi:10.1016/j.intimp.2023.110582.
- [9] Zeng T, Zhou Y, Yu Y, et al. rmMANF prevents sepsis-associated lung injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced ferroptosis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109608. doi:10.1016/j.intimp.2022.109608.
- [10] Liu Y, Zhang Y, Liu Q, et al. Inhibition of DDX3X ameliorated CD4⁺ T cells pyroptosis and improves survival in septic mice [J]. *Mol Immunol*, 2023, 154: 54-60. doi:10.1016/j.molimm.2022.12.014.
- [11] Wang C, Bao Q, Hou C, et al. Mono-macrophage-Derived manf alleviates bacterial myocarditis by inhibiting NF- κ B activation and myocardial inflammation [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1916-26. doi:10.1007/s10753-021-01469-0.
- [12] Kim H G, Lee C, Yoon J H, et al. BN82002 alleviated tissue damage of septic mice by reducing inflammatory response through inhibiting AKT2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 148: 112740. doi:10.1016/j.biopha.2022.112740.
- [13] Gong T, Liu Y, Tian Z, et al. Identification of immune-related endoplasmic reticulum stress genes in sepsis using bioinformatics and machine learning [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 995974. doi:10.3389/fimmu.2022.995974.

- [14] Ma Y, Liu J, Liu H, et al. Podocyte protection by Angptl3 knock-out *via* inhibiting ROS/GRP78 pathway in LPS-induced acute kidney injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 105: 108549. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108549.
- [15] Li L, Peng X, Guo L, et al. Sepsis causes heart injury through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 964–71.
- [16] Shafiei B, Afgar A, Nematollahi M H, et al. Effect of trehalose on miR-132 and SIRT1 in the hippocampus of aged rats[J]. *Neurosci Lett*, 2023, 813: 137418. doi:10.1016/j.neulet.2023.137418.
- [17] Potenza M A, Sgarra L, Nacci C, et al. Activation of AMPK/SIRT1 axis is required for adiponectin-mediated preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210654. doi:10.1371/journal.pone.0210654.
- [18] Sang A, Wang Y, Wang S, et al. Quercetin attenuates sepsis-induced acute lung injury *via* suppressing oxidative stress-mediated ER stress through activation of SIRT1/AMPK pathways[J]. *Cell Signal*, 2022, 96: 110363. doi:10.1016/j.cellsig.2022.110363.

Recombinant mouse MANF participates in the protection of myocardial injury induced by sepsis by activating SIRT1/AMPK signaling pathway

He Hao, Li Cheng, Hu Sai, Xia Fengqiang, Zhang Chi, Wang Jing

[Dept of Critical Care Medicine, Changsha Fourth Hospital (Changsha Hospital Affiliated to Hunan Normal University), Changsha 410006]

Abstract *Objective* To investigate the protective effect of neurotrophic factor (MANF) derived from midbrain astrocytes on myocardial injury induced by sepsis by activating SIRT1/AMPK signaling pathway. *Methods* 48 mice were randomly divided into 4 groups: control group, recombinant mouse MANF (rmMANF) group, cecal ligation and puncture (CLP) group and CLP + rmMANF group, with 12 mice in each group. The survival rate, sepsis score, anal temperature, blood biochemical indexes, pathological indexes of myocardial injury and the expression of endoplasmic reticulum stress (ERS) related proteins were detected 8 h after CLP. H9C2 cells were divided into control group (Con), LPS group, LPS + rmMANF group, LPS + rmMANF + EX527 group and LPS + rmMANF + Cpd C group. The cells were collected after 24 h treatment with LPS, and the expression of ERS protein and apoptosis in cells were analyzed. *Results* Compared with CLP group, the sepsis score and serum Lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), aspartateaminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN) levels in CLP + rmMANF group decreased significantly ($P < 0.01$), and the anal temperature and serum albumin (ALB) levels increased significantly ($P < 0.05$). Compared with CLP group, the expression of MANF in CLP + rmMANF group increased significantly ($P < 0.01$), and the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP) and the percentage of TUNEL positive cells decreased significantly ($P < 0.05$). In vitro, LPS stimulation down-regulated the expression of SIRT1 and AMPK in H9C2 cells, while rmMANF further increased the expression level of SIRT1 and AMPK. Compared with LPS + rmMANF group, the expression of GRP78 and CHOP protein and the apoptosis rate of H9C2 cells in LPS + rmMANF + EX527 group and LPS + rmMANF + Cpd C group increased significantly ($P < 0.05$). *Conclusion* rmMANF inhibits ERS related to sepsis-induced myocardial injury by activating SIRT1/AMPK signaling pathway, thereby protecting myocardial injury.

Key words endoplasmic reticulum stress; mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; sepsis; myocardial injury

Fund program Natural Science Fund of Hunan Province (No. 2021JJ70156)

Corresponding author Li Cheng, E-mail: 13064937@qq.com