

基于 MAMs 探究 RVD1 对衰老大鼠心肌细胞自噬与凋亡的影响

郑 扬, 黄玉冰, 黄文霞, 李海涛

摘要 **目的** 探究消退素 D1 (RVD1) 对衰老大鼠心肌细胞自噬与凋亡的调控作用以及对心肌组织线粒体-内质网偶联(MAMs)的影响。**方法** 将30只18月龄SD大鼠按数字随机表法分为模型组、低剂量RVD1组、高剂量RVD1组,每组10只,另取10只6月龄SD大鼠作为对照组,低剂量RVD1组和高剂量RVD1组分别尾静脉注射50、100 ng/ml RVD1,对照组和模型组同时注射等量磷酸盐缓冲液(PBS),持续干预21 d;对-硝基苯酚法测定大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性,苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠心肌组织病理形态学变化,Masson染色观察大鼠心肌组织内胶原沉积情况,末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP原位末端标记(TUNEL)染色检测大鼠心肌细胞凋亡情况,免疫组化S-P法检测大鼠心肌组织自噬标志物微管相关蛋白3(LC3)表达,蛋白质免疫印迹(Western blot)测定大鼠心肌组织中LC3-II/LC3-I比值、自噬效应蛋白(Beclin-1、p62)表达水平,透射电镜观察大鼠心肌组织内MAMs结构变化,Western blot测定大鼠心肌组织中葡萄糖调节蛋白75(GRP75)、电压依赖性阴离子通道1(VDAC1)及线粒体融合蛋白2(Mfn2)表达水平。**结果** 与模型组比较,低剂量RVD1组与高剂量RVD1组的大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性降低($P < 0.05$),心肌纤维断裂与心肌细胞损伤明显减轻,胶原纤维沉积明显减少,心肌组织内TUNEL阳性细胞比例减少($P < 0.05$),LC3蛋白阳性率增加($P < 0.05$),LC3-II/LC3-I比值升高,Beclin-1蛋白相对表达量上调而p62蛋白相对表达量下调($P < 0.05$),MAMs结构较为紧密,占线粒体周长百分比也增加($P < 0.05$),GRP75、VDAC1及Mfn2蛋白相对表达量均上调($P < 0.05$);与低剂量RVD1组比较,高剂量RVD1组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性进一步降低($P < 0.05$),心肌组织未见明显损伤,胶原纤维沉积进一步减少,心肌组织内TUNEL阳性细胞比例减少($P < 0.05$),LC3蛋白阳性率增加($P < 0.05$),LC3-II/LC3-I比值升高且Beclin-1蛋白相对表达量上调、p62蛋白相对表达量下调($P < 0.05$),MAMs结构更加紧密,其占线粒体周长百分比进一步增加($P <$

0.05),同时,GRP75、VDAC1及Mfn2蛋白相对表达量均进一步上调($P < 0.05$)。**结论** RVD1能够激活衰老大鼠心肌细胞自噬,减轻心肌细胞凋亡与胶原纤维沉积,并促进线粒体-内质网偶联。

关键词 衰老;ResolvinD1;线粒体-内质网偶联;心肌细胞;自噬;凋亡

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1890-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.015

衰老是一种常见且不可避免的自然现象。临床资料^[1]显示,衰老过程中心脏病的易感性增加,心脏主要出现左心室肥厚、心肌纤维化增加、心功能不全等变化,并引起一系列心血管疾病^[2-3]。线粒体-内质网偶联(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes, MAMs)是内质网和线粒体外膜之间的物理连接位点,密切参与从内质网到线粒体的应激信号转导。研究^[4]表明,在衰老过程中心脏和骨骼肌中MAMs结构发生变化,其完整性遭到破坏,MAMs相关蛋白表达减少。由此推测,MAMs可能是衰老相关心肌损伤的一个关键靶点。

消退素D1(ResolvinD1, RVD1)是一种源自 ω -3多不饱和脂肪酸的脂质介质。研究^[5]表明,RVD1能够减少血管紧张素II引发的中性粒细胞和巨噬细胞浸润,抑制心脏肥大、间质和血管周围纤维化以及高血压的发生。然而,RVD1能否在衰老中对心肌组织起到保护作用目前尚不明确。因此,该研究通过观察RVD1对自然衰老大鼠心肌组织的影响,探讨衰老所致心肌受损的相关机制,以期对衰老相关心肌损伤的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料 实验动物选用30只18月龄SD大鼠和10只6月龄SD大鼠,均为雄性,由海南药物研究有限责任公司提供[生产合格证号:SCXK(琼)2020-0007]。实验期间将大鼠饲养于SPF级饲养室[使用合格证号:SYXK(琼)2022-0013],定期更换垫料,给予充足水源与饲料,温度为22~24℃,相对

2023-06-20 接收

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(编号:22A200204)

作者单位:海南省人民医院心血管内科,海口 570311

作者简介:郑 扬,男,主治医师;

李海涛,男,副主任医师,责任作者, E-mail:478854958@

qq.com

湿度为 45% ~ 55%, 光照/黑暗各 12 h 交替模拟正常昼夜。RVD1 (美国 ChemeGen 公司, 批号: CY10936, 纯度: 98%), 心肌组织 β -半乳糖苷酶活性检测试剂盒(北京索莱宝生物公司), Masson 试剂盒与 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(北京百奥博莱生物公司), HE 染色试剂盒、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染料、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜及电化学发光分析 (electrochemiluminescence, ECL) 显影液(上海碧云天生物研究所), 免疫组化 S-P 法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物公司), 环氧树脂 812 (Epon812, Epon812) (美国 Ted Pella 公司), 醋酸双氧铀与枸橼酸铅(北京海德创业生物公司), 放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 蛋白裂解液(上海贝博生物公司), 兔抗大鼠微管相关蛋白 3 (microtubule associated protein 3, LC3) 多克隆抗体、兔抗大鼠 Beclin-1 多克隆抗体、兔抗人 p62 多克隆抗体、兔抗人葡萄糖调节蛋白 75 (glucose-regulated proteins 75, GRP75) 多克隆抗体、兔抗人电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 多克隆抗体、兔抗人线粒体融合蛋白 2 (mitochondrial fusion protein 2, Mfn2) 多克隆抗体、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(英国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、给药与处理 将 30 只 18 月龄 SD 大鼠按数字随机表法分为模型组、低剂量 RVD1 组、高剂量 RVD1 组, 每组 10 只, 另取 10 只 6 月龄 SD 大鼠作为对照组。参考文献^[6]中的给药剂量, 低剂量 RVD1 组和高剂量 RVD1 组大鼠分别尾静脉注射 50、100 ng/ml RVD1, 剂量为 2 μ l, 每日 1 次, 对照组和模型组同时注射等量 PBS, 持续干预 21 d。末次给药 12 h 后, 处死各组大鼠并快速取出心脏组织, 预冷的生理盐水洗涤后, 一部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 另一部分置于液氮中冷冻后存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.2 对-硝基苯酚法测定大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性 取适量各组大鼠的心肌组织, 按照组织质量 (g): 提取液体积 (ml) 为 1:10 的比例加入提取液, 置于冰上裂解 30 min, 离心机 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 使用 β -半乳糖苷酶

活性检测试剂盒测定各组样本内 β -半乳糖苷酶活性, 建立标准曲线, 按照样本蛋白浓度计算酶活性。

1.2.3 HE 染色检测大鼠心肌组织病理形态学变化 将置于 4% 多聚甲醛固定好的各组大鼠心肌组织取出, 浸入梯度乙醇中脱水, 二甲苯中透明, 并包埋在融化的石蜡中。将包埋好的蜡块切成 5 μ m 厚的组织切片, 放于 60 $^{\circ}$ C 烤箱烤干 30 min, 脱蜡水化, 进行 HE 染色。染色结束后, 滴加中性树胶封固, 室温晾干, 光学显微镜下观察心肌组织变化并拍照。

1.2.4 Masson 染色观察大鼠心肌组织内胶原沉积

取制备好的各组大鼠心肌组织切片, 常规脱水透明, 按照 Masson 染色试剂盒说明书步骤, 加入 Masson 染色工作液室温染色, 浸洗干净, 滴加中性树胶封固, 室温晾干, 光学显微镜下观察心肌组织胶原纤维沉积情况并拍照, 镜下蓝染为胶原纤维沉积区域。Image J 软件分析胶原纤维沉积情况, 计算心肌组织胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF), $CVF = \text{胶原蓝染面积} / \text{组织总面积} \times 100\%$ 。

1.2.5 TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡 取制备好的各组大鼠心肌组织切片, 常规脱水透明, 加入蛋白酶 K 修复, 破膜处理, 采用 TUNEL 试剂盒检测心肌细胞凋亡, 加入 TUNEL 工作液染色, PBS 清洗后, 加入 DAPI 染细胞核, 滴加抗荧光淬灭封片剂封固, 室温晾干, 置于荧光显微镜下观察心肌细胞凋亡情况并拍照, 镜下绿色荧光标记的细胞为 TUNEL 阳性, 代表细胞凋亡, 蓝色荧光标记的为细胞核, 随机选择 6 个视野计数, 以 TUNEL 阳性细胞数目与总细胞数目之比记为 TUNEL 阳性细胞比例。

1.2.6 免疫组化 S-P 法检测大鼠心肌组织自噬标志物 LC3 表达 各组大鼠心肌组织切片经脱水透明后, 浸入修复液中微波炉加热原修复, 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 破膜处理后, 双蒸水清洗切片, 以山羊血清室温封闭 30 min, 加入稀释后的兔抗大鼠 LC3 多克隆抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃一抗液, PBS 清洗后甩干切片, 加入稀释后的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:200), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 清洗, 使用即用型 DAB 显色, 苏木精复染, 再次脱水透明, 滴加中性树胶封固, 室温晾干, 光学显微镜下观察心肌组织染色情况并拍照, 镜下棕色至棕褐色染色为 LC3 蛋白阳性表达, Image-Pro Plus 软件分析蛋白阳性表达区域占总区域比例, 记为 LC3 蛋白阳性率。

1.2.7 透射电镜观察大鼠心肌组织内 MAMs 形成 收集的各组大鼠心肌组织用 3% 戊二醛固定, 1%

钨酸再固定,使用梯度酒精和丙酮对样品进行脱水,Epon812包埋,切成超薄切片,固定至铜网,进行醋酸双氧铀与枸橼酸铅染色,室温下干燥过夜,透射电镜下进行成像并拍照,Image-Pro Plus 软件测量线粒体-内质网偶联与线粒体周长,分析线粒体-内质网偶联长度占线粒体周长比例。

1.2.8 Western blot 法测定大鼠心肌组织自噬相关蛋白与 MAMs 相关蛋白表达 从 -80°C 冰箱中取出各组大鼠心肌组织样品,加入 RIPA 蛋白裂解液,研磨匀浆后,冰上静置 30 min,离心机 4°C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液即为样本总蛋白,BCA 法蛋白定量,获得蛋白浓度。将蛋白煮沸变性,制备 10% SDS-PAGE 凝胶并待其凝固后,取等量 30 μg 蛋白加样,电泳分离后切下目的条带,电转至 PVDF 膜。浸入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,以减少非特异性结合。加入稀释后的各一抗(1:1 000), 4°C 孵育过夜。弃一抗液,TBST 洗膜,加入稀释后的对应二抗(1:5 000),室温孵育 1 h。TBST 再次洗膜,采用 ECL 显影,凝胶成像显影仪中成像并保存图像,Image-Pro Plus 软件分析目的条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的灰度比值来表示目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.30 软件进行数据分析并绘制统计图。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析法进行多组间数据统计分析,采用 LSD-*t* 检验进行组间两两数据比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性比较

各组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性之间差异有统计学意义($F = 264.127, P < 0.001$)。与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性升高($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量

RVD1 组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性降低($P < 0.05$),且高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性低于低剂量 RVD1 组($P < 0.05$)。见图 1。

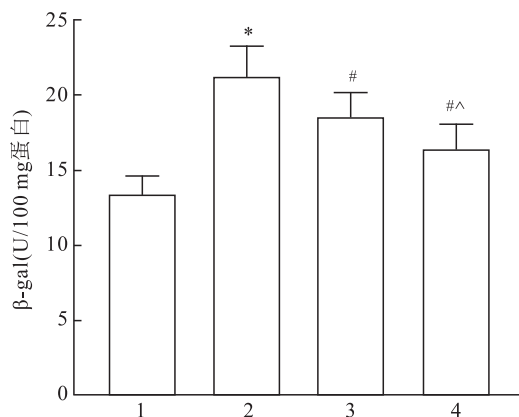


图1 各组大鼠心肌组织 β -半乳糖苷酶活性检测结果

1:对照组;2:模型组;3:低剂量 RVD1 组;4:高剂量 RVD1 组;与对照组比较;* $P < 0.05$;与模型组比较;# $P < 0.05$;与低剂量 RVD1 组比较;#^ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠心肌组织病理形态学变化情况比较

HE 染色结果显示,对照组大鼠心肌组织结构清晰,心肌细胞整齐排列,染色均匀;模型组大鼠心肌组织发生明显损伤,心肌纤维排列紊乱且有断裂,心肌细胞出现坏死、水肿现象;与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌纤维与心肌细胞形态明显得到改善,此外,高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织趋于对照组,未见明显损伤。见图 2。

2.3 各组大鼠心肌组织胶原纤维沉积情况比较

Masson 染色结果显示,各组大鼠心肌组织 CVF 之间差异有统计学意义($F = 314.259, P < 0.001$)。对照组大鼠心肌组织内未见明显蓝染的胶原纤维沉积,而模型组大鼠心肌组织内有大量蓝染的胶原纤维沉积,CVF 升高($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内蓝染的

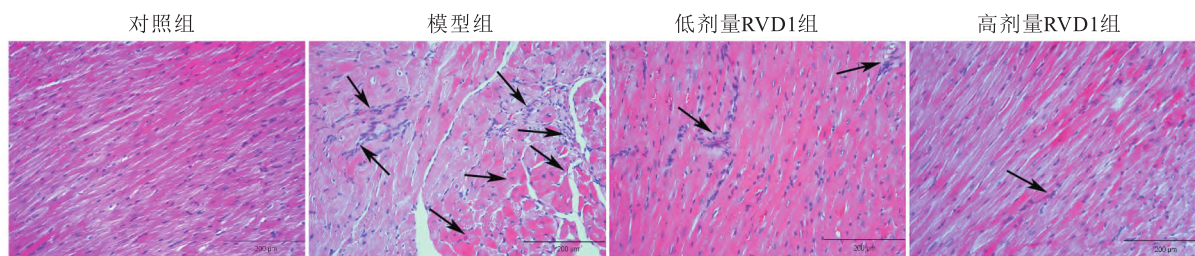


图2 各组大鼠心肌组织病理形态学变化 HE $\times 100$

黑色箭头:坏死、肿胀心肌细胞

胶原纤维沉积均明显减少, CVF 降低 ($P < 0.05$), 且高剂量 RVD1 组要 CVF 低于低剂量 RVD1 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 各组大鼠心肌细胞凋亡比较 TUNEL 染色结果显示, 各组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性细胞比例之间差异有统计学意义 ($F = 478.841, P < 0.001$)。模型组大鼠心肌组织内 TUNEL 阳性细胞比例 (64.28 ± 6.04)% 多于对照组 (2.16 ± 0.22)% ($P < 0.05$),

心肌细胞凋亡明显; 与模型组比较, 低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 TUNEL 阳性细胞比例 (19.87 ± 1.79)%、(12.30 ± 1.16)% 均减少 ($P < 0.05$), 心肌细胞凋亡受到抑制; 与低剂量 RVD1 组比较, 高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 TUNEL 阳性细胞比例进一步减少 ($P < 0.05$), 心肌细胞凋亡更少。见图 4。

2.5 各组大鼠心肌组织内自噬水平比较 免疫组

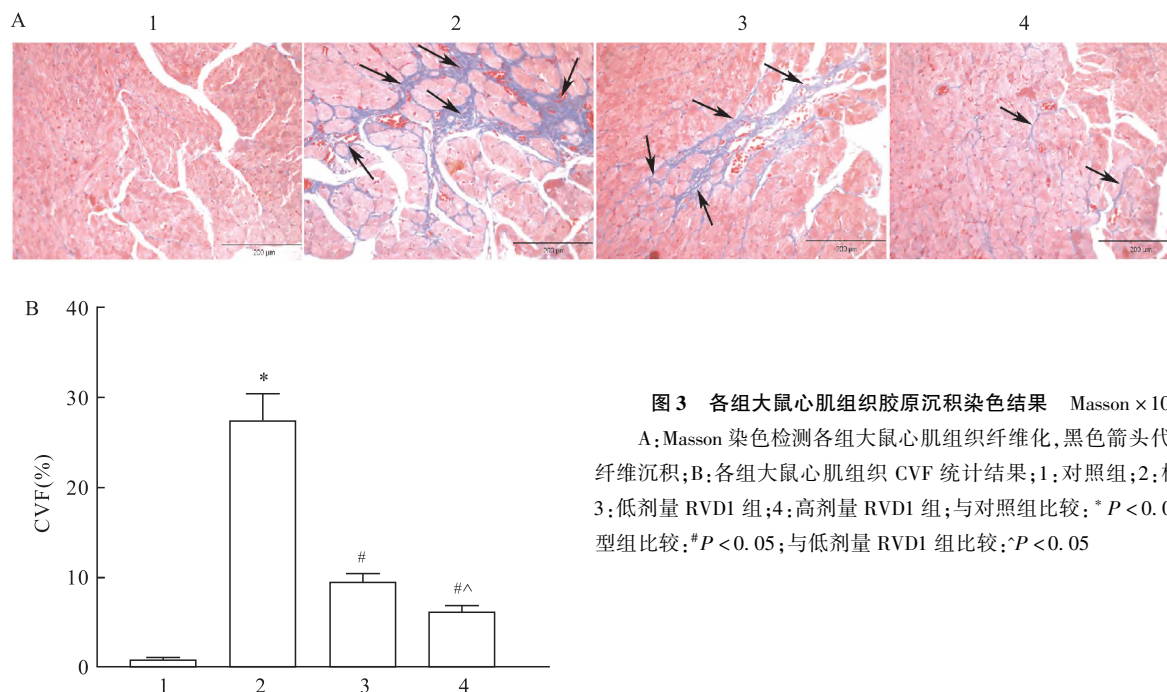


图3 各组大鼠心肌组织胶原沉积染色结果 Masson × 100

A: Masson 染色检测各组大鼠心肌组织纤维化, 黑色箭头代表胶原纤维沉积; B: 各组大鼠心肌组织 CVF 统计结果; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量 RVD1 组; 4: 高剂量 RVD1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与低剂量 RVD1 组比较: ^ $P < 0.05$

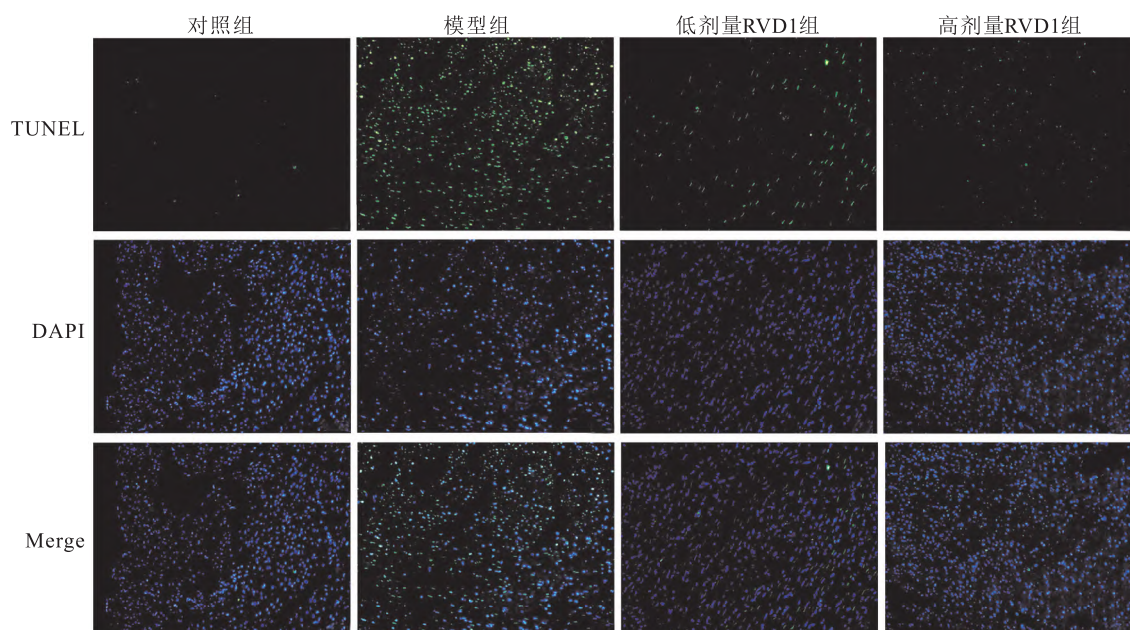


图4 各组大鼠心肌细胞凋亡检测结果 TUNEL × 100

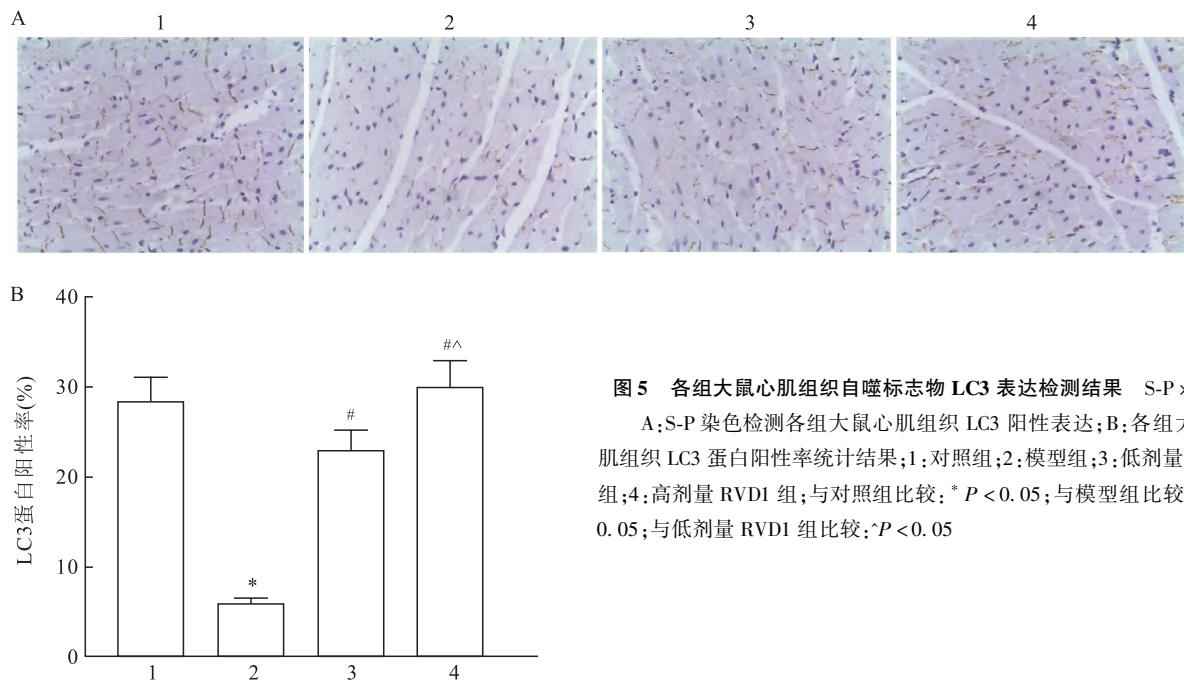


图5 各组大鼠心肌组织自噬标志物 LC3 表达检测结果 S-P×100

A:S-P 染色检测各组大鼠心肌组织 LC3 阳性表达;B:各组大鼠心肌组织 LC3 蛋白阳性率统计结果;1:对照组;2:模型组;3:低剂量 RVD1 组;4:高剂量 RVD1 组;与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$;与低剂量 RVD1 组比较: ^ $P < 0.05$

化 S-P 法结果显示,各组大鼠心肌组织内自噬标志物 LC3 蛋白阳性率之间差异有统计学意义 ($F = 288.645, P < 0.001$)。与对照组比较,模型组大鼠心肌组织内 LC3 蛋白阳性率下降 ($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 LC3 蛋白阳性率增加 ($P < 0.05$),且高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 LC3 蛋白阳性率高于低剂量 RVD1 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

Western blot 检测结果显示,各组大鼠心肌组织内 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值、Beclin-1 和 p62 蛋白相对表达量之间差异有统计学意义 ($F = 56.241、89.472、132.418$,均 $P < 0.001$)。与对照组比较,模型组大鼠心肌组织内 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值下降,Beclin-1 蛋白相对表达量下调而 p62 蛋白相对表达量上调 ($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值升高,Beclin-1 蛋白相对表达量上调而 p62 蛋白相对表达量下调 ($P < 0.05$);与低剂量 RVD1 组比较,高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织内 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值进一步升高,且 Beclin-1 蛋白相对表达量上调、p62 蛋白相对表达量下调 ($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 各组大鼠心肌组织内 MAMs 变化情况比较

透射电镜观察结果显示,与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 MAMs 结构疏松,占线粒体周长百分比减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组 MAMs 结构较为紧密,占线粒体周长

百分比增加 ($P < 0.05$);与低剂量 RVD1 组比较,高剂量 RVD1 组 MAMs 结构更加紧密,占线粒体周长百分比也增加 ($P < 0.05$)。见图 7。

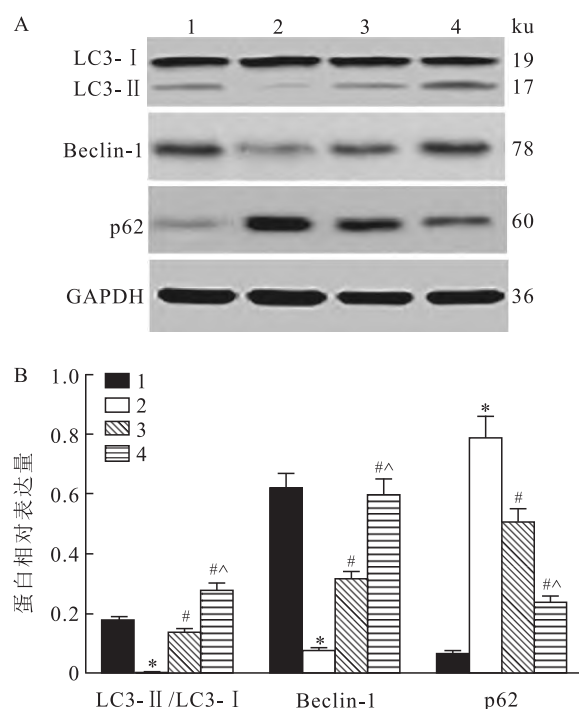


图6 各组大鼠心肌组织内自噬相关蛋白表达检测结果

A:各组大鼠心肌组织中 LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ、Beclin-1 和 p62 蛋白电泳条带;B:各组大鼠心肌组织 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值、Beclin-1 和 p62 蛋白相对表达量统计结果;1:对照组;2:模型组;3:低剂量 RVD1 组;4:高剂量 RVD1 组;与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$;与低剂量 RVD1 组比较: ^ $P < 0.05$

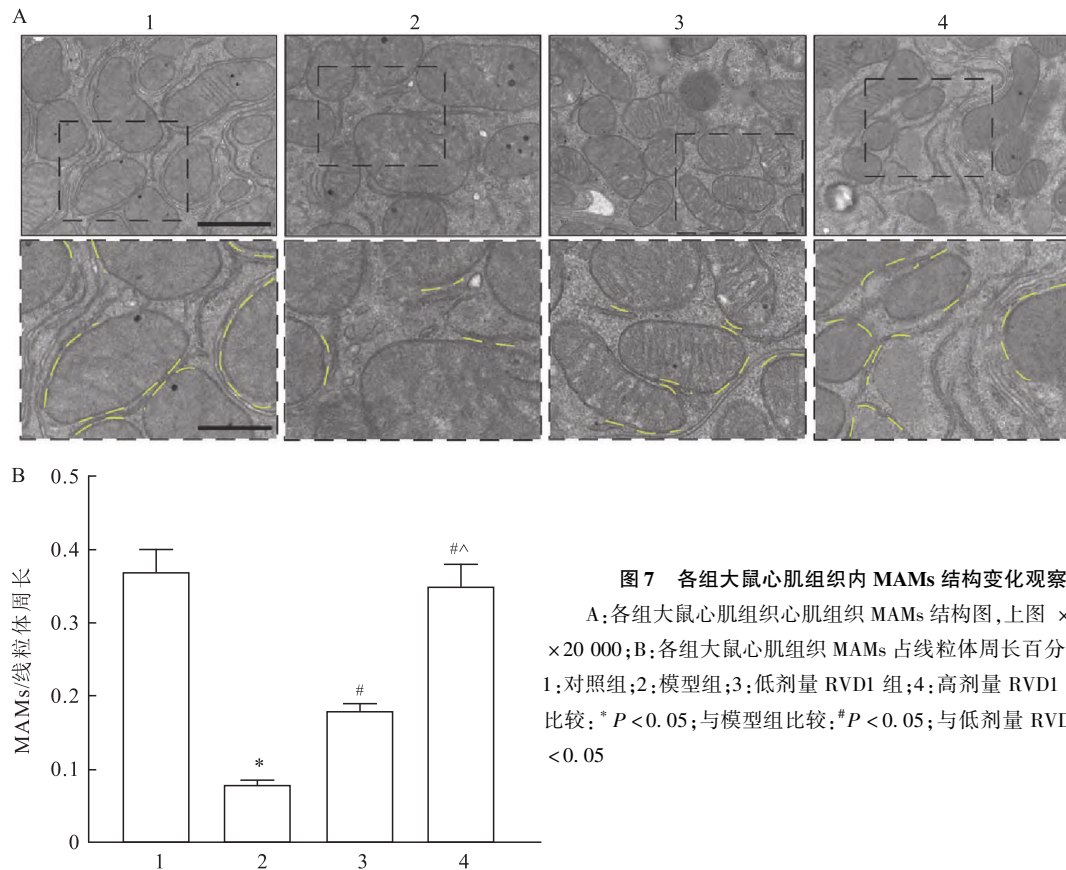


图7 各组大鼠心肌组织内 MAMs 结构变化观察结果

A: 各组大鼠心肌组织心肌组织 MAMs 结构图, 上图 $\times 10\ 000$, 下图 $\times 20\ 000$; B: 各组大鼠心肌组织 MAMs 占线粒体周长百分比统计结果; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量 RVD1 组; 4: 高剂量 RVD1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与低剂量 RVD1 组比较: ^ $P < 0.05$

Western blot 检测结果显示, 各组大鼠心肌组织内 GRP75、VDAC1、Mfn2 蛋白相对表达量之间差异有统计学意义 ($F = 112.457/64.193/45.208$, 均 $P < 0.001$)。与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 GRP75、VDAC1 及 Mfn2 蛋白相对表达量下调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量 RVD1 组与高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织中 GRP75、VDAC1 及 Mfn2 蛋白相对表达量上调 ($P < 0.05$); 高剂量 RVD1 组大鼠心肌组织中 GRP75、VDAC1 及 Mfn2 蛋白相对表达量均要高于低剂量 RVD1 组 ($P < 0.05$)。见图 8。

3 讨论

关于 RVD1 在心血管疾病中的保护作用已有报道, 例如, Wang et al^[7] 研究表明 RVD1 改善了阿霉素诱导的小鼠心脏毒性, 减少心肌细胞凋亡, 其机制可能与抑制炎症、氧化应激和内质网应激有关; Salas-Hernández et al^[8] 指出 RVD1 能够抑制血管紧张素 II 诱导的心脏成纤维细胞分泌细胞炎症因子与细胞黏附蛋白, 减轻心脏组织重塑, 并有助于受损心脏组织的修复。该研究通过使用 RVD1 处理衰老大鼠后, 检测结果显示, 心肌组织内 β -半乳糖苷酶活

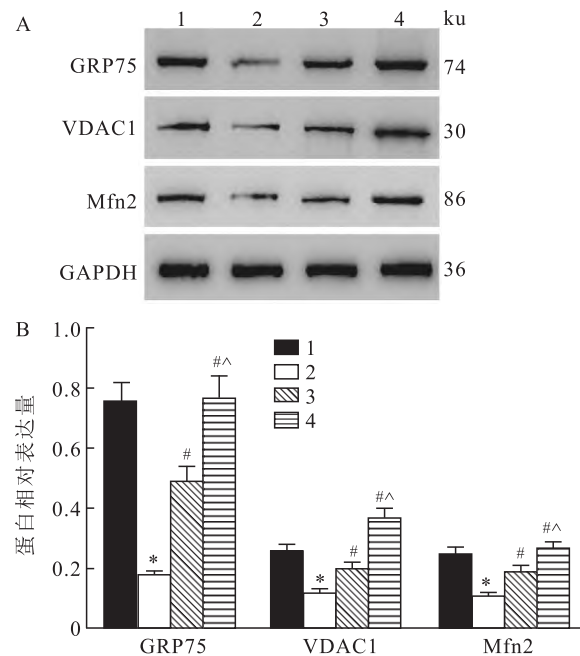


图8 各组大鼠心肌组织内 MAMs 相关蛋白表达检测结果

A: 各组大鼠心肌组织中 GRP75、VDAC1、Mfn2 蛋白电泳条带; B: 各组大鼠心肌组织 GRP75、VDAC1、Mfn2 蛋白相对表达量统计结果; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量 RVD1 组; 4: 高剂量 RVD1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与低剂量 RVD1 组比较: ^ $P < 0.05$

性降低,心肌纤维与心肌细胞受损得到改善,蓝染的胶原纤维沉积减少,由此说明,RVD1 能够有效改善衰老大鼠心肌受损现象。

自噬是一种广泛存在于真核细胞中的代谢途径,通过溶酶体机制降解受损的细胞器和蛋白质。已知自噬在衰老的心肌组织中受到抑制,会导致心肌细胞稳态降低,促使心肌细胞凋亡,相反,增强自噬有助于减缓衰老相关心肌细胞凋亡、心脏肥大及纤维化,延缓心脏衰老^[9]。一旦自噬被激活,可溶性 LC3- I 蛋白通过磷脂酰乙醇胺的共价偶联形成 LC3- II,这对于自噬体的生成和伸长至关重要,因此,LC3- II/LC3- I 比值降低则表明自噬受限^[10]。该研究通过对衰老大鼠心肌组织进行检测显示,LC3 蛋白阳性率下降,LC3- II/LC3- I 比值下降,Becn-1 蛋白相对表达量下调,p62 蛋白相对表达量上调,TUNEL 标记的心肌细胞凋亡增加,以上结果说明衰老大鼠心肌组织内自噬功能障碍,增加了心肌细胞凋亡。而 RVD1 处理的衰老大鼠心肌组织中 LC3 蛋白阳性率增加,LC3- II/LC3- I 比值升高,Becn-1 蛋白相对表达量上调而 p62 蛋白相对表达量下调,TUNEL 标记的心肌细胞凋亡明显减少,该结果显示 RVD1 能够提高衰老大鼠心肌组织内自噬水平,抑制心肌细胞凋亡。

MAMs 介导多种细胞功能,包括钙稳态调节、脂质代谢、未折叠蛋白反应、线粒体动力学、自噬等,这些都是心血管疾病的关键危险因素。此外,MAMs 与衰老或衰老过程密切相关,已知衰老性肌萎缩的发生与 MAMs 处钙离子转移异常、内质网应激等有关,通过运动调节 MAMs 能够缓解衰老性肌萎缩^[11]。有研究^[12]表明,HIV-1 病毒 TAT 蛋白诱导神经元细胞会破坏 MAMs 结构,引起活性氧(reactive oxygen species,ROS)积累及线粒体应激,并改变 MAMs 相关蛋白表达,从而导致大脑过早衰老。MAMs 的形成依赖于内质网和线粒体上的互补膜蛋白将两个细胞器在特定位置连接在一起。因此,MAMs 上某些蛋白质的缺失或某些蛋白之间相互作用的中断会导致 MAMs 结构和功能的破坏。VDAC1 通过 GRP75 与内质网上的肌醇 1,4,5-三磷酸 1 型受体相互作用,介导钙离子从内质网转移到线粒体上,这对于维持 MAMs 结构与功能至关重要^[13]。Mfn2 在 MAMs 有定位,通过形成同源或异源二聚体将 2 个相邻的线粒体与 Mfn1 连接起来介导外线粒体膜融合,其功能丧失会降低线粒体融合效率并诱导线粒体碎裂,破坏 MAMs^[14]。该研究

经检测显示,衰老大鼠心肌组织 MAMs 结构疏松,占线粒体周长百分比减少,GRP75、VDAC1 及 Mfn2 蛋白相对表达量也下调,说明心肌组织内 MAMs 结构与功能受损。此外,经过 RVD1 处理的衰老大鼠心肌组织 MAMs 结构较为紧密,占线粒体周长百分比增加,同时,GRP75、VDAC1 及 Mfn2 蛋白相对表达量也上调,由此推测,RVD1 能够调节衰老大鼠心肌组织内 MAMs,从而对心肌组织起到保护作用。

参考文献

- [1] Moturi S, Ghosh-Choudhary S K, Finkel T. Cardiovascular disease and the biology of aging[J]. J Mol Cell Cardiol, 2022, 167: 109–17.
- [2] Chen M S, Lee R T, Garbern J C. Senescence mechanisms and targets in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(5):1173–87.
- [3] Mehdizadeh M, Aguilar M, Thorin E, et al. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance[J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(4):250–64.
- [4] Lu X, Gong Y, Hu W, et al. Ultrastructural and proteomic profiling of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes reveal aging signatures in striated muscle[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4):296.
- [5] Olivares-Silva F, De Gregorio N, Espitia-Corredor J, et al. Resolvin-D1 attenuation of angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(12):166241.
- [6] 马飞, 唐彩金, 方梅飞, 等. 消退素 D1 对牙周炎大鼠牙龈组织中 IL-1 β 、IL-6 表达的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2018,28(10):571–4, 604.
- [7] Wang M, Zhang J, Zhao M, et al. Resolvin D1 attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting inflammation, oxidative and endoplasmic reticulum stress[J]. Front Pharmacol, 2022, 12:749899.
- [8] Salas-Hernández A, Ruz-Cortés F, Bruggendieck F, et al. Resolvin D1 reduces expression and secretion of cytokines and monocyte adhesion triggered by Angiotensin II, in rat cardiac fibroblasts[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141:111947.
- [9] Kaludercic N, Maiuri M C, Kaushik S, et al. Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models[J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(3):483–504.
- [10] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi F H, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):10147.
- [11] 高久翔, 于亮. 运动调节线粒体-内质网结构偶联缓解衰老性肌萎缩的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2023,39(1): 157–69.
- [12] Arjona S P, Allen C N S, Santerre M, et al. Disruption of mitochondrial-associated ER membranes by HIV-1 tat protein contrib-

- utes to premature brain aging[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29 (1):365–77.
- [13] Liu Y, Ma X, Fujioka H, et al. DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-Grp75-VDAC1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (50):25322–8.
- [14] Gottschalk B, Koshenov Z, Bachkoenig O A, et al. MFN2 mediates ER-mitochondrial coupling during ER stress through specialized stable contact sites[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 918691.

To investigate the effects of RVD1 on autophagy and apoptosis of aging rat cardiomyocytes based on MAMs

Zheng Yang, Huang Yubing, Huang Wenxia, Li Haitao

(Dept of Cardiovascular Medicine, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311)

Abstract Objective To explore the regulatory effects of ResolvinD1 (RVD1) on autophagy and apoptosis of cardiomyocytes in aging rats, and the effects of RVD1 on mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) of myocardial tissue. **Methods** Thirty 18-month-old SD rats were randomly divided into model group, low-dose RVD1 group and high-dose RVD1 group, with 10 rats in each group, and another 10 6-month-old SD rats were selected as control group. The low-dose RVD1 group and high-dose RVD1 group were injected with 50 ng/ml and 100 ng/ml RVD1 through the tail vein, respectively, control group and model group were injected with the same amount of phosphate buffered saline (PBS) for 21 days. The β -galactosidase activity of rat myocardial tissue was determined by p-nitrophenol method, the histopathological changes of rat myocardial tissue were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the collagen deposition in rat myocardial tissue was observed by Masson staining, apoptosis of rat myocardial cells was detected by dUTP in situ end labeling mediated by terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL), the expression of autophagy marker microtubule-associated protein 3 (LC3) was detected by immunohistochemical S-P method, the ratio of LC3-II/LC3-I and the expression of Beclin-1, p62 in rat myocardial tissue were determined by Western blot, the structure of MAMs in rat myocardial tissue was observed by transmission electron microscopy, the expression levels of glucose-regulatory protein 75 (GRP75), volt-dependent anion channel 1 (VDAC1) and mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2) in rat myocardial tissue were determined by Western blot. **Results** Compared with model group, β -galactosidase activity of myocardial tissue decreased in low-dose RVD1 group and high-dose RVD1 group ($P < 0.05$), myocardial fiber breakage and myocardial cell damage were significantly alleviated, collagen fiber deposition was significantly reduced, and the proportion of TUNEL positive cells in myocardial tissue decreased ($P < 0.05$), the positive rate of LC3 protein increased ($P < 0.05$), the ratio of LC3-II/LC3-I increased, the relative expression level of Beclin-1 protein was up-regulated and the relative expression level of p62 protein was down-regulated ($P < 0.05$), the structure of MAMs was tighter, and the percentage of MAMs in mitochondrial circumference also increased ($P < 0.05$), the relative protein expressions of GRP75, VDAC1 and Mfn2 were up-regulated ($P < 0.05$). Compared with low-dose RVD1 group, β -galactosidase activity in high-dose RVD1 group further decreased ($P < 0.05$), no obvious damage was observed in myocardial tissue, collagen fiber deposition was further decreased, the proportion of TUNEL positive cells in myocardial tissue decreased ($P < 0.05$), and the positive rate of LC3 protein increased ($P < 0.05$), LC3-II/LC3-I ratio increased, Beclin-1 relative expression level was up-regulated and p62 relative expression level was down-regulated ($P < 0.05$), the structure of MAMs was more compact, and their percentage in mitochondrial circumference further increased ($P < 0.05$), the relative expressions of GRP75, VDAC1 and Mfn2 were further up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** RVD1 can activate autophagy, alleviate myocardial apoptosis and collagen fiber deposition, and promote mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in aging rats.

Key words aging; ResolvinD1; mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes; cardiomyocytes; autophagy; apoptosis