

线粒体靶向小分子 IR-61 改善大鼠力竭性运动心脏损伤的实验研究*

李姣姣^{1,2}, 平政², 王子文², 汪一波², 史春梦^{3△}, 曹雪滨^{2△}

(1. 河北大学附属医院/临床医学院, 保定 071000; 2. 中国人民解放军陆军第82集团军医院, 河北保定 071000;
3. 陆军军医大学军事预防医学系火箭军医学教研室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

【摘要】 目的: 研究线粒体靶向七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 对力竭性运动大鼠心脏损伤的影响。**方法:** 清洁级成年雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分为 3 组 ($n=12$): 对照组 (Ctrl 组)、力竭组 (EE 组)、IR-61+力竭组 (IR-61+EE 组)。IR-61+EE 组在第 1、4、7 日同一时间腹腔注射 2 mg/kg IR-61; 最后一次给药结束 1 h 后, 两个力竭运动组进行力竭造模, 在坡度为 0° 的动物跑步机上, 先以 10~15 m/min 的速度令大鼠协调四肢跑步姿势, 约 15 min 后以 25~30 m/min 的速度一次性跑步至力竭。以生理记录仪描记大鼠心电图, 取大鼠的心肌样品, 光镜观察心肌细胞损伤、透射电镜观察线粒体损伤, TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况, ELISA 法检测心肌损伤标志物, 高分辨率线粒体呼吸仪测定心肌线粒体呼吸速率。**结果:** ① 与 Ctrl 组相比, EE 组的心率增加、PR 间期缩短、QRS 间期延长、QTc 延长、ST 段明显压低 ($P<0.05$); 心肌纤维断裂明显, 线粒体内室肿胀明显, 线粒体嵴模糊, 线粒体外膜不完整, 可见大量线粒体破裂及融合; 可见 TUNEL 染色细胞较多, 呈现染色质浓缩、边缘化, 核膜裂解, 染色质分割成块状凋亡小体, 凋亡评分增加 ($P<0.05$); CK-MB 升高、cTn-I 升高、NT-proBNP 升高 ($P<0.05$); 基础呼吸速率、脂肪酸氧化呼吸速率、复合物 I、II、IV 呼吸速率均有下降 ($P<0.05$)。② 与 EE 组相比, IR-61+EE 组的心率增加、PR 间期延长、QRS 间期缩短、QTc 缩短、ST 段未见明显压低 ($P<0.05$), 心肌纤维排列疏松, 未见明显断裂, 线粒体内室肿胀, 线粒体外膜完整, 可见 TUNEL 染色细胞与未染色细胞, 整体形态更接近 Ctrl 组, 凋亡评分下降 ($P<0.05$), CK-MB 下降, cTn-I 下降 ($P<0.05$); 脂肪酸氧化呼吸速率及复合物 II、IV 呼吸速率均有提高 ($P<0.05$)。**结论:** 线粒体靶向七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 可改善力竭运动大鼠的心电活动, 减轻心肌细胞及线粒体损伤, 减少心肌细胞凋亡, 提高心肌线粒体能量代谢水平。

【关键词】 七甲川花菁; 荧光小分子 IR-61; 力竭性运动; 心脏损伤; 心肌线粒体能量代谢; 大鼠

【中图分类号】 R339.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-113-007

【DOI】 10.12047/j.cjap.6260.2022.093

Experimental study of mitochondrion-targeted small molecule IR-61 ameliorated exhaustive exercise-induced cardiac injury in rats

LI Jiao-jiao^{1,2}, PING Zheng², WANG Zi-wen², WANG Yi-bo², SHI Chun-meng^{3△}, CAO Xue-bin^{2△}

(1. Affiliated Hospital/Clinical Medical College of Hebei University, Baoding 071000; 2. The 82nd Group Army Hospital of PLA, Baoding 071000;
3. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Rocket Force Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of mitochondrion-targeted cyanine fluorescent small molecule IR-61 on cardiac injury induced by exhaustive exercise in rats. **Methods:** Thirty-six adult male SD rats were randomly divided into 3 groups ($n=12$), control group (Ctrl), exhaustive exercise group (EE) and IR-61+ exhaustive exercise group (IR-61+EE). IR-61+EE group were intraperitoneally injected with 2 mg/kg IR-61 at the same time on day 1, 4 and 7. One hour after the end of the last drug administration, the two exhaustive exercise groups were subjected to exhaustive exercise modeling. The rats were placed on an animal treadmill with a slope of 0° at a speed of 10~15 m/min to coordinate their limbs running posture, and then ran at a speed of 25~30 m/min until exhaustion about 15 minutes later. After the animal models established, ECG was recorded by physiological recorder, myocardial injury was observed by light microscope, mitochondrial injury was observed by transmission electron microscope, myocardial cell apoptosis was detected by TUNEL method, markers of myocardial injury were detected by ELISA, and myocardial mitochondrial respiration rate was measured by high-resolution Oxygraph-2K mitochondrial instrument. **Results:** ① Compared with Ctrl group, heart rate was increased, PR interval was shortened, QRS interval was prolonged, QTc was prolonged and ST segment was depressed significantly in EE group ($P<0.05$). In EE group, myocardial fiber fracture and mitochondrial inner chamber swelling were obvious, mitochondrial crest was fuzzy, mitochondrial outer membrane was incomplete, and a large number of mitochondrial rupture and fusion were visible. In EE group, TUNEL staining cells were abundant, chromatin concentration and marginalization, nuclear membrane lysis, chromatin fragmentation into massive apoptotic bodies, apoptosis score increased ($P<0.05$). The levels of creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB), cardiac troponin I (cTn-I) and N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were increased in EE group ($P<0.05$).

Basal respiration rate, oxidative respiration rate of fatty acids and respiration rate of complex I, II and IV were all decreased ($P < 0.05$). ② Compared with EE group, the heart rate in IR-61+EE group was increased, PR interval was prolonged, QRS interval was shortened, QTc was shortened, ST segment was not significantly depressed ($P < 0.05$). In IR-61+EE group, myocardial fiber arrangement was loose, no obvious fracture was observed, mitochondrial inner ventricle was swelling, mitochondrial outer membrane was intact, TUNEL stained cells and unstained cells were observed, the overall morphology was more similar to Ctrl group. Apoptosis index was decreased ($P < 0.05$), the levels of CK-MB and cTn-I were decreased in IR-61+EE group ($P < 0.05$). The oxidative respiration rate of fatty acids and the respiration rate of complex II and IV were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Mitochondrion-targeted cyanine fluorescent small molecule IR-61 can improve cardiac electrical activity, reduce myocardial cell injury and mitochondrial injury, reduce myocardial cell apoptosis, and improve the myocardial mitochondrial energy metabolism condition in exhausted rats.

[KEY WORDS] cyanine; fluorescent small molecule IR-61; exhaustive exercise; cardiac injury; myocardial mitochondrial energy metabolism; rats

力竭运动是指机体进行大强度超负荷运动,作为一种急性应激性刺激,易出现心肌缺血缺氧损伤^[1],防治运动所致心脏损伤、探寻其机制具有重要的临床意义。线粒体靶向七甲川花菁类荧光小分子 IR-61^[2](以下简称 IR-61)来源于陆军军医大学火箭军医学教研室史春梦教授课题组,是对七甲川花菁类近红外荧光小分子的侧链进行化学修饰合成的新型线粒体靶向荧光小分子,是第一款同时满足细胞追踪和细胞保护要求的近红外荧光试剂。IR-61 (Ex 782 nm, Em 805 nm)具有亲脂性,带正电荷,可以在水溶液中自动组装并形成直径为(90±5) nm 的球形纳米颗粒。研究表明^[3], IR-61 除具备良好的标记效率和较好的生物相容性外,在 IR-61 标记的第 6 日仍能在细胞内检测到近红外荧光,证实其荧光稳定性,适合于一定时间范围内的细胞标记示踪成像。同时,IR-61 的近红外荧光与线粒体探针 rhodamine 123 或 Mito-Tracker green 的绿色荧光完全重合,充分证明 IR-61 与细胞结合是靶向到细胞的线粒体之中。

在前期研究中发现,IR-61 可以特异性靶向至线粒体,改善线粒体能量代谢,在多种损伤模型中发挥保护作用^[4-7]。然而,IR-61 对力竭运动所致心肌损伤是否也有保护作用,其可能机制如何,尚不明确。本研究拟观察 IR-61 对一次性力竭运动大鼠心脏损伤的保护作用,进而探讨其发挥心脏保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验设备、试剂

高分辨线粒体呼吸 Oxygraph-2K (奥地利

Oroboros 公司)、8 通道生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司)、生物放大器(澳大利亚 AD Instruments 公司)、动物跑步机(中国成都泰盟科技有限公司)、切片机(德国莱卡 LEICA 公司)、自动包埋机(德国莱卡 LEICA 公司)、纯水仪(美国 HITECH 公司)、光学显微镜(日本 Olympus 公司)、透射电镜(日本 Olympus 公司)。IR-61(中国重庆陆军军医大学火箭军医学教研室合成),线粒体呼吸功能测定试剂均购自美国 Sigma 公司,肌酸激酶 MB 同工酶(creatine kinase isoenzyme-MB,CKMB)检测试剂盒(武汉云克隆公司 SEA479Ra),心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)检测试剂盒(武汉云克隆公司 SEA478Ra),氨基端前脑钠素(N-terminal B-type natriuretic peptide, NT-ProBNP)检测试剂盒(武汉云克隆公司 CEA485Ra)。其余实验室常用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物分组及模型建立

根据《实验动物的护理和使用指南》设计实验,获得陆军第八十二集团军医院实验动物伦理委员会批准。清洁级成年雄性 SD 大鼠 36 只,体重(220±20)g,由北京中科达盛实验动物有限公司提供,实验动物许可证编号 SCXK(京)2019-0008。本单位鼠房饲养条件:温度(24±2)℃,相对湿度 40%~70%,噪音小于 40 dB,按 12 h 明/12 h 暗昼夜交替,大鼠自由进食、自由饮用纯净水。适应性喂养 1 周后,所有大鼠被随机分入对照组(Ctrl 组, $n = 12$)、力竭组(EE 组, $n = 12$)、IR-61+力竭组(IR-61+EE 组, $n = 12$)。IR-61+EE 组大鼠腹腔注射 IR-61(2 mg/kg, 分别于第 1、4、7 日同一时间)。末次腹腔注射结束 1 h 后,IR-61+EE 组、EE 组大鼠进行力竭运动造模。造模方式综合 Bedford^[8] 等人标准及本课题组前期研究^[9],将大鼠放置在坡度为 0° 的动物跑步机上,先以 10~15 m/min 的速度令大鼠协调四肢跑步姿势,约 15 min 后以 25~30 m/min 的速度一次性跑

*【收稿日期】2022-01-21【修回日期】2022-07-01

△【通讯作者】Tel: 023-68752880, 18931258090; E-mail: shicm@sina.com, caoxb252@163.com

步至力竭。跑步机皮带后端配备有电网,提供 0.2 mA 的电脉冲,电脉冲引起不适,但疼痛小,并且可以精确控制运动强度。力竭判定标准:大鼠跑台运动姿势状态变化由原来的蹬地变为伏地式,停留在跑道末端不能继续运动,在声波和光、电刺激下亦不能促使大鼠继续跑动,并出现翻正反射迟钝、呼吸急促、眼动迟缓、眼神黯淡、四肢无力等反应,此时视为力竭造模成功。Ctrl 组作为安静对照。

1.3 取材

IR-61+EE 组、EE 组大鼠力竭后即刻取材,取材方式:腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg),以大鼠无自主活动,镊子轻夹脚趾无反应为麻醉适宜。立即打开胸腔、找到下腔静脉取血后 3 000 r/min 离心 10 min,上层血清保存至 -80℃ 冰箱备用;分离心脏,取心室肌 2 mm×3 mm×3 mm 于 10% 中性福尔马林中固定,放置室内常温不避光 1 h 后转移至 4℃ 冰箱避光备用;取心室肌 1 mm×1 mm×1 mm 于 4% 戊二醛电镜固定液中固定,放置室内常温不避光 1 h 后转移至 4℃ 冰箱避光备用;取心室肌 5 mm×2 mm×2 mm 用于即刻线粒体呼吸功能测定。Ctrl 组大鼠无力竭步骤,取材方式同上。

1.4 大鼠心肌线粒体呼吸功能测定

取各组大鼠 5 mm×2 mm×2 mm 新鲜心室肌转移至盛有 10 ml 冰冷活检保存液 (biopsy preservation solution, BIOPS) 的平皿中,在冰上分离心肌,用尖锐眼科镊去除结缔组织、脂肪组织等,分离肌束使其由红色变为苍白色,但仍保持相互连接的网状结构;将肌束放入 2 ml Saponin 透化液中,在冰上轻柔震荡 20 min,随后将样本快速转运至 3 ml 呼吸介质 MIR05,在冰上轻柔震荡 10 min,重复 3 次,以去除 Saponin 透化液及其他代谢物;用分析天平称量心室肌组织湿重;在高分辨线粒体呼吸仪 Oxygraph-2k 反应仓内加入 2 ml 呼吸介质 MIR05,对仪器进行空气矫正;将称好湿重的样本转移至仓内,将反应仓密封后充入纯氧,至仓内氧浓度 390 nmol/ml;等待耗氧量曲线走行平稳,得到心肌线粒体基础呼吸速率,依次加入棕榈酰肉碱盐酸盐 4 μl (Palmitoyl-DL-carnitine-HCl, Pal)、苹果酸 5 μl (Malate, Mal)、辛酰基肉碱盐酸盐 4 μl (DL-Octanoyl-carnitine-HCl, Oct)、细胞色素 C 5 μl (Cytochrome C, Cyt-C)、二磷酸腺苷 10 μl (ADP),得到脂肪酸氧化途径线粒体呼吸速率,加入谷氨酸钠 10 μl (Glutamate, Glu) 可得到复合物 I 的 state3 呼吸速率,加入鱼藤酮 1 μl (Rotenone, Rot) 抑制复合物 I,加入琥珀酸 20 μl (Succinate, Suc) 得到复合物 II 的呼吸速率,加入抗

霉素 A 1 μl (AntimycinA, Ama) 抑制复合物 III 活性;加入复合物 IV 的底物四甲基对苯二胺 5 μl (tetramethyl-para-phenylene diamine, TMPD) 以及抗坏血酸盐 5 μl (Ascorbate, Asc),得到复合物 IV 的呼吸速率。记录实验结果,清洗反应仓。

1.5 大鼠心电图描记

IR-61+EE 组、EE 组大鼠力竭后即刻腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg),以大鼠无自主活动,镊子轻夹脚趾无反应为麻醉适宜。大鼠仰卧位于手术台上,充分暴露四肢,将电极针消毒后刺入大鼠右上肢、双下肢皮下 (右上肢接负极、左下肢接正极、右下肢接地),打开生理记录仪,获取大鼠 II 导联心电图。Ctrl 组无力竭过程,获取心电图方式同上。

1.6 大鼠心肌组织结构的光镜观察

将 2 mm×3 mm×3 mm 各组大鼠心室肌样本于 10% 中性福尔马林中固定后进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后将蜡块进行横纵连续切片 5 μm,切片经二甲苯脱蜡后,梯度酒精脱水;苏木素染液染 1~2 min;盐酸酒精分化液分化 5~10 s;流水冲洗;返蓝液返蓝 5~10 s 至细胞核呈蓝色;流水冲洗;入伊红染色液 10 min 进行染色;流水冲洗;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固;将 HE 染色后的切片置于 Olympus 光学显微镜下,在 10×10 倍视野下观察标本确定位置,在 40×10 倍视野下观察心肌纤维及心肌细胞。

1.7 大鼠心肌细胞超微结构透射电镜观察

将 1 mm×1 mm×1 mm 各组大鼠心室肌样本于 4% 戊二醛电镜固定液中固定后以 PBS 缓冲液漂洗 3 次,以四氧化锇固定 2 h,再以 PBS 缓冲液漂洗 3 次,梯度丙酮脱水,室温下包埋剂浸透 3 h,待包埋聚合结束后,切片机作超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅对切片双重染色,将染色后切片置于 Olympus 透射电镜下观察心肌细胞超微结构,着重观察线粒体损伤情况。

1.8 大鼠心肌 TUNEL 法检测心肌凋亡

将 2 mm×3 mm×3 mm 各组大鼠心室肌样本于 10% 中性福尔马林中固定后进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后将蜡块进行横纵连续切片 5 μm,烤片 65℃ 4.5 h;二甲苯脱蜡浸洗切片 2 次;梯度酒精各浸洗 1 次;用 32℃ Proteinase K 工作液处理组织 20 min;PBS 漂洗;制备 TUNEL 反应混合液,用 50 μl TdT+450 μl 荧光素标记的 dUTP 液混匀;玻片干后,加 50 μl TUNEL 反应混合液 (阴性对照组仅加 50 μl 荧光素标记的 dUTP 液) 于标本上,加封口膜在暗湿盒中反应 37℃ 1 h;PBS 漂洗后加 50

μl converter-POD 于标本上,加封口膜在暗湿盒中反应 37°C , 30 min; PBS 漂洗;在玻片组织上加 $100\ \mu\text{l}$ DAB 显色液,反应 1 min,显微镜观察至有阳性显色,立即终止显色;PBS 漂洗;苏木素复染 5 s 后立即用自来水冲洗;梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片;光镜下观察凋亡细胞。

1.9 ELISA 法检测大鼠心肌损伤标志物

以肌酸激酶 MB 同工酶为例。使用前将肌酸激酶 MB 同工酶(CK-MB)检测试剂盒,相应试剂和大鼠血清缓慢解冻至室温。分别设标准孔、血清待测样品孔、空白孔。设标准孔 7 孔,依次加入 $100\ \mu\text{l}$ 不同浓度的标准品。空白孔加 $100\ \mu\text{l}$ 标准品稀释液,余孔加大鼠血清 $100\ \mu\text{l}$,酶标板加上覆膜, 37°C 温育 1 h。弃去液体,甩干,每孔加检测溶液 A 工作液 $100\ \mu\text{l}$,酶标板覆膜, 37°C 温育 1 h。弃去孔内液体,每孔用 $350\ \mu\text{l}$ 的洗涤液洗涤,浸泡 1~2 min,在吸水纸上轻拍酶标板来移除孔内所有液体。重复洗板 3 次。最后一次洗涤后,吸取或倒出剩余的洗涤缓冲液,将酶标板倒扣在吸水纸上,将残留在孔内的液体全部吸干。每孔加检测溶液 B 工作液 $100\ \mu\text{l}$,酶标板覆膜, 37°C 温育 30 min,弃去孔内液体,甩干,洗板 5 次;每孔加 TMB 底物溶液 $90\ \mu\text{l}$,酶标板覆膜, 37°C 温育避光显色(当标准孔的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色,后 3~4 孔梯度不明显时,即可终止)。每孔加终止溶液 $50\ \mu\text{l}$,终止反应,此时蓝色立转黄色。在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在 $450\ \text{nm}$ 波长测量各孔的光密度值。

1.10 统计学处理

实验结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用统计学软件 SPSS 25.0 分析实验数据,组间比较采用 AVONA 单因素方差分析,进行方差齐性检验,若方差齐采用 LSD 法组内两两比较,方差不齐采用 DunnettT3 法组内两两比较。

2 结果

2.1 IR-61 对力竭大鼠心肌细胞病理影响

如图 1 所示,各组心肌组织着色均匀,Ctrl 组心肌纤维排列紧密有序,未见心肌间质水肿,心肌细胞结构完整,未见细胞膜破裂,细胞核大致居中、清晰可见。EE 组心肌纤维断裂明显,可见心肌间质水肿及间质纤维增生,心肌细胞肿胀,结构不完整,细胞膜破裂,细胞核不完整。另可见炎性细胞浸润。IR-61+EE 组心肌纤维排列疏松,未见明显断裂,可见心肌间质水肿,心肌细胞未见明显肿胀,结构尚完

整,细胞核清晰可见,整体形态与 Ctrl 组更接近。

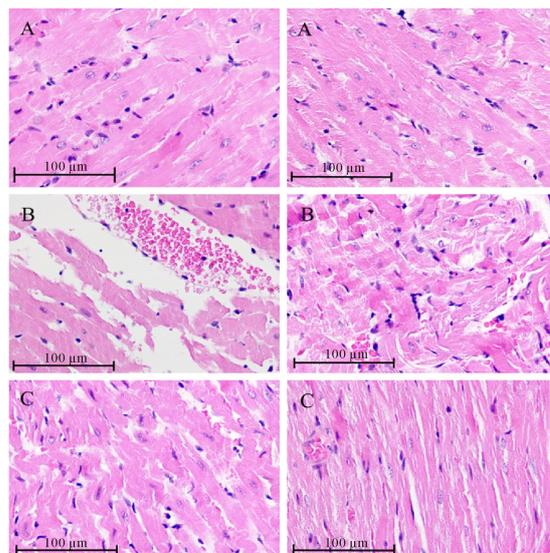


Fig. 1 The myocardium of rats in each group under light microscope ($\times 400$)

A: Control group (Ctrl); B: Exhaustive exercise group (EE); C: IR-61+ exhaustive exercise group (IR-61+EE)

2.2 IR-61 对力竭大鼠心肌超微结构影响

如图 2 所示,各组心肌线粒体形态结构清晰可见。Ctrl 组线粒体结构完整,线粒体嵴完整,线粒体外膜清晰,未见线粒体变形肿胀、融合、破裂。EE 组线粒体内室肿胀明显,线粒体嵴模糊,线粒体外膜不完整,可见大量线粒体破裂、少量线粒体融合。IR-61+EE 组线粒体内室肿胀,线粒体嵴稍模糊,线粒体外膜完整,未见明显线粒体破裂,可见少量线粒体融合。

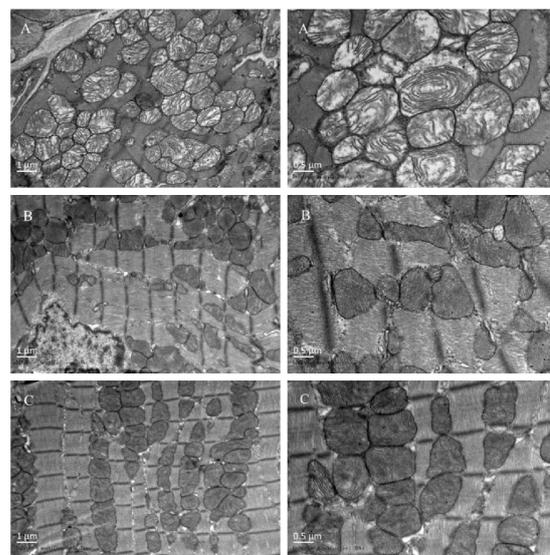


Fig. 2 Myocardial mitochondria of rats under electron microscope ($\times 15\ 000$, $\times 30\ 000$)

A: Ctrl; B: EE; C: IR-61+EE

2.3 IR-61 对力竭大鼠心肌凋亡的影响

由图 3 可见, Ctrl 组多数为未染色细胞, 细胞较小, 胞膜完整但出现发泡现象, 未见明显凋亡小体; EE 组可见染色细胞较多, 呈现染色质浓缩、边缘化, 核膜裂解, 染色质分割成块状凋亡小体; IR-61+EE 组可见染色细胞与未染色细胞, 整体形态更接近 Ctrl 组。与 Ctrl 组相比, EE 组凋亡评分增加 ($51.17\% \pm 2.33\%$ vs $14.17\% \pm 6.78\%$, $P < 0.05$); 与 EE 组相比, IR-61+EE 组凋亡评分下降 ($16.12\% \pm 5.12\%$ vs $51.17\% \pm 2.33\%$, $P < 0.05$)。

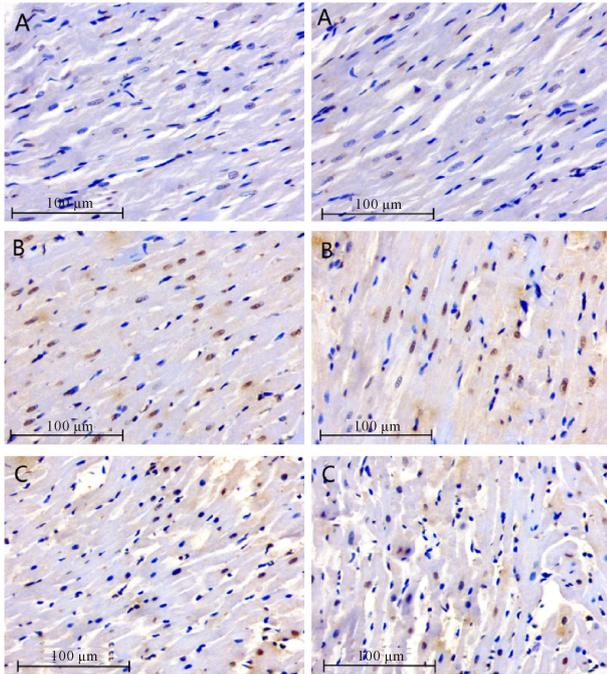


Fig. 3 Myocardial apoptosis of rats detected by TUNEL ($\times 400$)

A: Ctrl; B: EE; C: IR-61+EE

2.4 IR-61 对力竭大鼠心肌损伤标志物的影响

由表 1 可知, 与 Ctrl 组相比, EE 组 CK-MB 升高, cTn-I 升高, NT-proBNP 升高 ($P < 0.05$), 与 EE 组相比, IR61+EE 组 CK-MB 下降, cTn-I 下降 ($P <$

0.05), NT-proBNP 无明显差异 ($P > 0.05$)。

Tab. 1 Myocardial injury markers of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Group	CK-MB (ng/ml)	cTn-I (pg/ml)	NT-proBNP (pg/ml)
Ctrl	0.30±0.09	3.80±1.65	16.61±3.55
EE	1.35±0.01*	6.86±2.27*	28.72±4.70*
IR-61+EE	0.65±0.08#	3.70±0.68#	26.58±6.80

CK-MB: Creatine kinase isoenzyme-MB; cTn-I: Cardiac troponin I; NTproBNP: N-terminal B-type natriuretic peptide

* $P < 0.05$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$ vs EE group

2.5 IR-61 对力竭大鼠线粒体呼吸功能的影响

IR-61 不能完全逆转力竭大鼠心肌线粒体呼吸功能障碍 (图 4)。由表 2 可知, 与 Ctrl 组相比, EE 组基础呼吸速率、脂肪酸氧化呼吸速率、复合物 I、II、IV 呼吸速率均有下降 ($P < 0.05$), 与 EE 组相比, IR61+EE 组脂肪酸氧化呼吸速率, 复合物 II、IV 呼吸速率均有提高 ($P < 0.05$)。

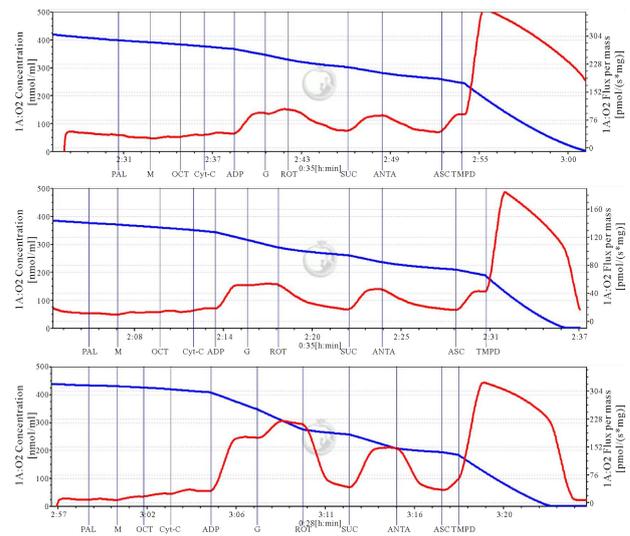


Fig. 4 Curve of myocardial mitochondrial respiration rate

A: Ctrl; B: EE; C: IR-61+EE

Tab. 2 Mitochondrial respiration rate of rats in each group ($\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$, $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Group	Basal respiration rate	Oxidative respiration rate of fatty acids	Respiration rate of complex I	Respiration rate of complex II	Respiration rate of complex IV
Ctrl	19.92±9.37	94.90±27.42	105.46±15.46	95.80±24.88	349.95±54.99
EE	7.42±2.73*	46.74±14.84*	56.66±11.94*	48.55±12.89*	159.78±34.41*
IR-61+EE	11.15±5.04*	82.69±19.63#	62.11±30.06*	108.24±37.88#	266.39±69.73#

* $P < 0.05$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$ vs EE group

2.6 IR-61 对力竭大鼠心电图参数的影响

由图 5 及表 3 可见, 与 Ctrl 组相比, EE 组心率加快, PR 间期缩短, QRS 间期延长, QTc 延长, ST 段

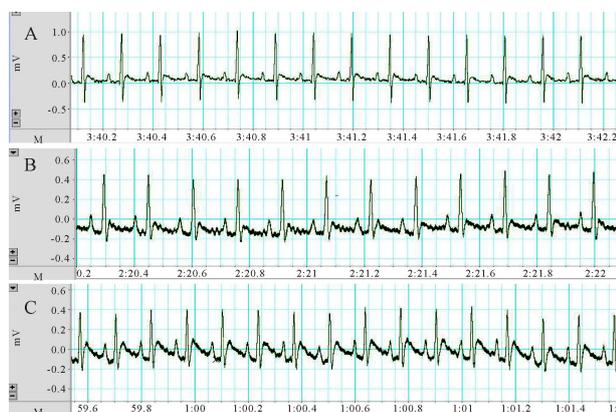
明显压低 ($P < 0.05$); 与 EE 组相比, IR-61+EE 组心率加快, PR 间期延长, QRS 间期缩短, QTc 缩短, ST 段未见明显压低 ($P < 0.05$)。

Tab. 3 ECG parameters of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Group	HR (BPM)	PR (ms)	QRS (ms)	QTc (ms)	ST ($\times 10^{-3}$ mv)
Ctrl	343.26 \pm 13.66	50.70 \pm 3.10	18.98 \pm 1.09	139.64 \pm 16.47	28.29 \pm 24.87
EE	391.94 \pm 8.10 *	44.26 \pm 2.77 *	21.68 \pm 0.99 *	195.46 \pm 22.69 *	-57.59 \pm 31.75 *
IR-61+EE	418.96 \pm 22.11 *#	50.60 \pm 4.18#	19.48 \pm 1.39#	146.42 \pm 13.65#	5.63 \pm 22.13#

HR: Heart rate; QTc: Corrected QT interval prolongation

* $P<0.05$ vs Ctrl group; # $P<0.05$ vs EE group

**Fig. 6** Electrocardiogram of rats in each group

A: Ctrl; B: EE; C: IR-61+EE

3 讨论

目前,力竭性心脏损伤及心脏性猝死的防治仍然是一个挑战。既往研究表明,线粒体为心肌细胞的能量加工厂,产生超过95%的心脏ATP^[10],其能量代谢功能障碍是引起力竭性运动心脏损伤的重要原因^[11]。IR-61是一种线粒体靶向七甲川花萼类近红外荧光小分子,具有线粒体保护作用,并通过激活Nrf2途径、PI3K/Akt信号通路增加线粒体保护作用^[7]。本实验首先确定腹腔注射IR-61能够改善力竭大鼠的心电活动,减轻心脏细胞及线粒体损伤,减少凋亡,降低心肌损伤标志物指标,这表明IR-61可能是预防性治疗力竭性心脏损伤的潜在药物。其次进行的线粒体呼吸功能试验表明,IR-61可以提高力竭大鼠线粒体脂肪酸氧化呼吸速率,复合物II、IV呼吸速率,改善力竭后线粒体能量代谢障碍。

本文中力竭大鼠心肌损伤标志物水平CK-MB、cTn-I显著升高,心电活动中ST段压低、QRS波增宽,心肌纤维断裂,心肌细胞凋亡增加等结果均可以证实力竭运动造成心肌损伤。力竭运动是与心脏损伤(包括心源性猝死)相关的主要因素之一,作为一种有效的急性应激性刺激,可损害心肌细胞并导致心肌酶学变化、心肌细胞凋亡增加^[12]。研究表明,力竭大鼠心肌细胞动作电位0相上升相减缓并且2、3相复极延长,钠电流幅值和钠电流密度明显降低,提示力竭运动时钠离子通道更容易失活,导致开

放通道减少,钠电流减低,更容易出现心律失常^[13]。然而,IR-61给药阻断了这些改变,证明其保护作用。值得注意的是,IR-61+EE组心率最快,可能与力竭路程及时间增加有关,从侧面证实IR-61可以改善大鼠的耐力,增强对力竭等剧烈运动的耐受性。或可将IR-61作为长期耐力运动或急性力竭运动的辅助治疗选择。

本研究中,通过线粒体质量下降、数量减少和线粒体空泡化证实力竭运动诱导的线粒体损伤,而这些损伤通过IR-61给药得到缓解。有研究表明^[14],维持线粒体稳态可以保留线粒体功能并减少心肌细胞的凋亡。本研究通过电镜可以看到IR-61增加线粒体融合趋势。线粒体融合是线粒体质量控制体系中至关重要的部分,在调节线粒体功能和维持线粒体稳态方面起重要作用。此外,力竭运动中线粒体产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),线粒体ROS产生和线粒体DNA释放到继发于线粒体损伤的细胞质中能够激活自噬和生物发生^[15]。有研究证实^[16],IR-61能够增加SIRT1, SIRT3和Nrf2的蛋白质水平。SIRT1和SIRT3在调节线粒体功能和维持线粒体稳态方面起重要作用。Nrf2的激活也通过调节线粒体生物发生和线粒体膜电位参与调节线粒体稳态。综上,力竭大鼠线粒体融合和自噬趋势增加可能是IR-61保持线粒体稳态并改善心脏损伤的机制,有待进一步研究。

前期实验已证实,IR-61富集至心肌线粒体^[3,17]。线粒体的主要作用是细胞产生ATP,该过程依赖于氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS),OXPHOS水平降低可导致ATP产生不足,能量代谢紊乱。有研究表明^[18,19],力竭运动可以导致线粒体能量代谢紊乱。另一方面,OXPHOS的副产品是ROS。ROS几乎完全由OXPHOS产生(约90%)。Kausar等^[20]介绍了目前关于ROS如何由线粒体产生。复合物I长期以来一直被视为ROS的主要生产者。有缺陷的线粒体自噬或氧化磷酸化受损会触发线粒体活性氧的产生。本研究中,IR61提高力竭大鼠的脂肪酸氧化呼吸速率及复合物II、IV呼吸速率,提高氧化磷酸化活性及ATP产量;但

未能逆转复合物 I 的呼吸速率降低,考虑 IR-61 可能导致 ROS 产生减少,有待进一步研究。

该研究的一个主要局限性是尚未进行具体机制探索,后续实验将进行线粒体融合、分裂、自噬相关蛋白的检测,检测活性氧水平,并应用相应抑制剂,来明确 IR-61 改善心肌线粒体能量代谢的具体机制。另一个局限性是,未能建立细胞模型,因为运动过程无法在细胞层面复制,可考虑建立心肌细胞低氧模型,进一步应用膜片钳技术研究 IR-61 对力竭性运动心脏损伤大鼠心肌细胞及线粒体膜电位的影响。

综上所述,本研究首次报道 IR-61 能够改善力竭运动大鼠心肌损伤,抑制心肌细胞凋亡,改善心电活动,并减少线粒体损伤、提高线粒体呼吸速率,可能与 IR-61 改善心肌线粒体能量代谢有关。这些发现突出了 IR-61 作为预防性治疗力竭性心脏损伤的新型候选药物的潜力。后续研究将进一步明确在该损伤模型中 IR-61 通过线粒体能量代谢起保护作用的可能机制,以期为全面评价 IR-61 提供参考,为力竭性心脏损伤的防治提供新治疗思路。

【参考文献】

- [1] 王雪绮, 陆 娇. 力竭运动对心肌线粒体结构与功能影响的研究进展[J]. 当代体育科技, 2021, 11(16): 27-31.
- [2] Wang X, Chen Z, Luo S, *et al.* Development of therapeutic small-molecule fluorophore for cell transplantation [J]. *Adv Funct*, 2016, 26(46): 8397-8407.
- [3] 王 昕. 新型近红外小分子 NIRCP-61 用于干细胞示踪成像和促进组织修复的实验研究[D]. 第三军医大学, 2017.
- [4] 黄 玉, 王子文, 王会兰, 等. 七甲川花菁类荧光小分子 IR-61 改善大鼠肺纤维化[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(4): 350-358.
- [5] 唐斌林, 王亚伟, 祥 蔚, 等. 线粒体靶向小分子 IR-61 改善小鼠非酒精性脂肪肝[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(4): 296-301.
- [6] Huang Y, Zhou J, Luo S, *et al.* Identification of a fluorescent small-molecule enhancer for therapeutic autophagy in colorectal cancer by targeting mitochondrial protein translocase TIM44[J]. *Gut*, 2018, 67(2): 307-319.
- [7] Wang J, Dai L, Yue X, *et al.* IR-61 improves voiding function *via* mitochondrial protection in diabetic rats[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 608-637.
- [8] Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, *et al.* Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1979, 47(6): 1278-1283.
- [9] 邱伟佳. 运动预适应保护力竭大鼠心脏损伤优化方案的探索及能量代谢机制[D]. 承德医学院, 2020.
- [10] Shin B, Cowan DB, Emani SM, *et al.* Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982: 595-619.
- [11] Shin EJ, Jo S, Choi S, *et al.* Red ginseng improves exercise endurance by promoting mitochondrial biogenesis and myoblast differentiation [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 865-868.
- [12] Li J, Xu P, Wang Y, *et al.* Exercise preconditioning plays a protective role in exhaustive rats by activating the PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 359-362.
- [13] 李佳鑫. 运动预适应对力竭大鼠心室肌钠离子流的作用及机制研究[D]. 河北大学, 2021.
- [14] 方 雯, 李 泽, 刘晓华, 等. 一次性力竭运动对大鼠 PHB1 表达及线粒体功能的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(6): 544-549.
- [15] Nahapetyan H, Moulis M, Grousset E, *et al.* Altered mitochondrial quality control in Atg7-deficient VSMCs promotes enhanced apoptosis and is linked to unstable atherosclerotic plaque phenotype[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 119-123.
- [16] Yue XF, Shen CX, Wang JW, *et al.* The near-infrared dye IR-61 restores erectile function in a streptozotocin-induced diabetes model *via* mitochondrial protection[J]. *Asian J Androl*, 2021, 23(3): 249-258.
- [17] Wang Y, Tang B, Long L, *et al.* Improvement of obesity-associated disorders by a small-molecule drug targeting mitochondria of adipose tissue macrophages [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 102-106.
- [18] Monsalves-Alvarez M, Morales PE, Castro-Sepulveda M, *et al.* β -Hydroxybutyrate Increases Exercise Capacity Associated with Changes in Mitochondrial Function in Skeletal Muscle[J]. *Nutrients*, 2020, 12(7): 1930-1936.
- [19] 李 洁, 谈文博, 王 艳. 有氧运动对衰老大鼠骨骼肌线粒体能量代谢的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(3): 234-237.
- [20] Kausar S, Wang F, Cui H. The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases [J]. *Cells*, 2018, 7(12): 274-278.