

线粒体转录因子A对糖尿病心肌病小鼠心肌细胞氧化应激及其凋亡的影响

吕丽丽¹, 张月梅², 陈永清^{3*}, 吴冰⁴, 顾华¹, 宋小刚⁵

¹兰州石化总医院急诊科, 甘肃兰州 730060; ²甘肃中医药大学临床医学院, 甘肃兰州 730030; ³甘肃省中心医院心血管内科, 甘肃兰州 730000; ⁴联勤保障部队第940医院老年病科, 甘肃兰州 730050; ⁵西安市中心医院心血管内科, 陕西西安 710000

[中图分类号] R587.1; R542.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2025.0924

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 吕丽丽, 张月梅, 陈永清, 等. 线粒体转录因子A对糖尿病心肌病小鼠心肌细胞氧化应激及其凋亡的影响[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(12): 1557-1566.

[收稿日期] 2024-09-01

[录用日期] 2025-02-21

[上线日期] 2025-09-24

[摘要] **目的** 研究糖尿病心肌病(DCM)小鼠心肌组织中线粒体转录因子A(TFAM)对心肌细胞氧化应激及其凋亡的影响。**方法** 将24只雄性糖尿病(db/db)小鼠随机分为db/db组、db/db+TFAM过表达组、db/db+TFAM空载组, 每组8只, 另取8只db/m雄性小鼠作为空白对照组。其中, db/db+TFAM过表达组的db/db小鼠经尾静脉注射腺相关病毒A1血清型载体(MyoAAV1A-TFAM), 病毒量为 5×10^{11} vg/只, 以构建db/db+TFAM过表达模型; db/db+TFAM空载组小鼠经尾静脉给予相同总量的MyoAAV1A血清型-CON, 而db/db组小鼠则经尾静脉给予等量生理盐水。采用PCR检测心肌组织TFAM及线粒体DNA(mtDNA)的mRNA表达水平, 20,70-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针检测各组心肌组织内活性氧(ROS)含量; 采用试剂盒检测心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性、丙二醛(MDA)及ATP的含量, TUNEL染色法测定心肌细胞凋亡情况, Western blotting检测心肌组织中TFAM、半胱天冬酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达变化。采用小动物超声仪检测各组小鼠的心功能指标。**结果** 与db/m组比较, db/db组小鼠心肌组织中TFAM蛋白表达水平($P < 0.01$)、线粒体ATP含量($P < 0.0001$)及mtDNA表达水平($P < 0.001$)均明显降低, ROS及MDA含量明显增加($P < 0.0001$), SOD活性降低($P < 0.001$), 心肌组织TUNEL阳性细胞率增高($P < 0.001$), Caspase-3、Bax蛋白表达水平升高, Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P < 0.0001$); 而与db/db组、db/db+TFAM空载组比较, db/db+TFAM过表达组小鼠的心肌组织中线粒体ATP及mtDNA生成增加($P < 0.01$), ROS及MDA含量减少($P < 0.0001$), SOD活性增加($P < 0.05$), 心肌组织TUNEL阳性细胞率降低($P < 0.01$), Caspase-3、Bax蛋白表达量降低($P < 0.0001$), Bcl-2蛋白表达量升高($P < 0.01$)。HE染色显示, 与db/m组比较, db/db组小鼠心肌细胞可见明显肥大、坏死, 心肌细胞排列结构紊乱; 而与db/db组、db/db+TFAM空载组比较, db/db+TFAM过表达组小鼠的心肌纤维紊乱改善, 坏死或炎症细胞明显减少。心脏彩超显示, 与db/m组比较, db/db组小鼠左室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)及E/A明显降低($P < 0.0001$); 而与db/db组、db/db+TFAM空载组比较, db/db+TFAM过表达组小鼠LVEF、LVFS及E/A明显升高($P < 0.001$)。**结论** TFAM蛋白可能通过改善线粒体功能抑制氧化应激及细胞凋亡, 从而减轻糖尿病造成的心肌损伤。

[关键词] 线粒体转录因子A; 细胞凋亡; 氧化应激; 心肌组织; 糖尿病心肌病

Effects of mitochondrial transcription factor A on oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes of mice with diabetic cardiomyopathy

Lyu Li-Li¹, Zhang Yue-Mei², Chen Yong-Qing^{3*}, Wu Bing⁴, Gu Hua¹, Song Xiao-Gang⁵

¹Emergency Department of Lanzhou Petrochemical General Hospital, Lanzhou, Gansu 733060, China

²Clinical Medical College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730030, China

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(JRRA1377); 兰州市科技计划项目(2022-5-84)

[作者简介] 吕丽丽, 硕士研究生, 主要从事心血管疾病方面的研究

[通信作者] 陈永清, E-mail: chyqmd@163.com

³Department of Cardiovascular Medicine, Gansu Provincial Central Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China

⁴Geriatrics Department, the 940th Hospital of the Joint Logistic Support Force, Lanzhou, Gansu 730050, China

⁵Department of Cardiovascular Medicine, Xi'an Central Hospital, Xian, Shaanxi 710000, China

*Corresponding author, E-mail: chyqmd@163.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (JRRA1377), and the Lanzhou Science and Technology Project (2022-5-84)

[Abstract] Objective To investigate the effects of mitochondrial transcription factor A (TFAM) in the myocardial tissue of mice with diabetic cardiomyopathy (DCM) on oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes. **Methods** Twenty-four male db/db mice were randomly divided into three groups ($n=8$ per group): db/db group, db/db+TFAM overexpression group and db/db+TFAM empty vector group. An additional 8 db/m male mice served as blank control group. Mice in db/db+TFAM overexpression group received a tail vein injection of MyoAAV1A-TFAM at a dose of 5×10^{11} vg/mouse to establish the TFAM overexpression model. db/db+TFAM empty vector group received a tail vein injection of an equivalent total amount of MyoAAV1A serotype-CON, while db/db group received an equal volume of normal saline *via* tail vein injection. The mRNA expression levels of TFAM and mitochondrial DNA (mtDNA) in myocardial tissue were detected by PCR. The reactive oxygen species (ROS) content in myocardial tissue was measured using the 20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the contents of malondialdehyde (MDA) and ATP in myocardial tissue were assessed using commercial assay kits. The apoptosis rate of cardiomyocytes was determined by TUNEL staining. The protein expression levels of TFAM, Caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) in myocardial tissue were detected by Western blotting, and cardiac function indices of mice were measured using a small animal ultrasound system. **Results** Compared with db/m group, the expression levels of TFAM protein ($P<0.01$), mitochondrial ATP content ($P<0.0001$), and mtDNA expression level ($P<0.001$) in myocardial tissue of db/db mice were significantly reduced; the contents of ROS and MDA were significantly increased ($P<0.0001$), and the activity of SOD was decreased ($P<0.001$); the rate of TUNEL-positive cells in myocardial tissue increased ($P<0.0001$), the expression levels of Caspase-3 and Bax proteins were increased, and the expression level of Bcl-2 protein significantly reduced ($P<0.0001$). Compared with db/db group and the db/db+TFAM empty vector group, the mitochondrial ATP content and mtDNA expression level in myocardial tissue of mice in db/db+TFAM overexpression group were significantly increased ($P<0.01$), the contents of ROS and MDA were significantly decreased ($P<0.0001$), and the activity of SOD was increased ($P<0.05$); the rate of TUNEL-positive cells in myocardial tissue was significantly decreased ($P<0.01$); the expression levels of Caspase-3 and Bax proteins were decreased ($P<0.0001$), and the expression level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P<0.01$). HE staining showed that compared with db/m group, myocardial cells in mice of db/db group were significantly hypertrophic and necrotic, and the arrangement and structure of myocardial cells were disordered; Compared with db/db group and db/db+TFAM empty vector group, the disorder of myocardial fibers in mice of db/db+TFAM overexpression group was improved, and the number of necrotic or inflammatory cells was significantly reduced. Cardiac color Doppler ultrasound showed that compared with db/m group, the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), and E/A ratio in mice of db/db group were significantly decreased ($P<0.0001$); Compared with db/db group and db/db+TFAM empty vector group, the LVEF, LVFS and E/A ratio in mice of db/db+TFAM overexpression group were significantly increased ($P<0.001$). **Conclusions** TFAM protein may alleviate diabetes-induced myocardial damage by improving mitochondrial function, inhibiting oxidative stress, and suppressing apoptosis.

[Key words] mitochondrial transcription factor A; cardiomyocyte apoptosis; oxidative stress; myocardial tissue; diabetic cardiomyopathy

心血管并发症是糖尿病患者致死、致残的主要原因^[1]。糖尿病心肌病(diabetic cardio myopathy, DCM)是由糖尿病相关的糖脂代谢失调引起的以代谢障碍及心功能障碍为特征的心血管并发症^[2-4],主要表现为早期出现细胞凋亡、心肌纤维化及心肌重塑,随后出现心功能障碍,最终发展为心功能不全^[5-6]。DCM的发病机制与代谢异常、线粒体功能障碍、氧化应激及心肌细胞凋亡等有关^[3,7-8]。目前的研究证实,高糖环境可引起线粒体功能紊乱^[4,9-10];线粒体对能量产生、细胞代谢及细胞死亡程序的调节

等至关重要^[11-12],而线粒体机能受损引起的氧化代谢紊乱及细胞的程序性死亡是DCM的主要发病原因^[13],但具体的调控机制目前尚不清楚。线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)是影响线粒体功能的关键因子,其表达及活性的改变均可导致线粒体功能改变^[14]。周益盛等^[15]发现,糖尿病小鼠心肌组织中TFAM的表达水平降低,可影响线粒体的复制及转录调控,进而影响线粒体的生物学功能。然而,TFAM蛋白是否通过改善糖尿病心肌线粒体的机能进而减轻心肌细胞氧化应激及

细胞凋亡, 目前尚不清楚。本研究以 db/db 糖尿病小鼠为模型, 观察 TFAM 对 DCM 线粒体功能、氧化应激、凋亡及心脏功能的影响, 以期发现 DCM 新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄 SPF 级、健康、雄性糖尿病小鼠(db/db)24 只, 以及具有同样遗传背景的雄性非糖尿病小鼠(db/m)8 只, 均购自江苏华创信诺医药科技有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2020-0009]。动物分笼饲养于甘肃中医药大学动物饲养房, 室温 20 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 光照昼夜循环。本研究获甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(SY2023-705), 实验在甘肃中医药大学实验中心完成, 实验过程符合国家级单位有关动物管理和使用的规定。

1.2 动物分组及建模 所有实验小鼠适应性喂养 2 周后分为 4 组: db/m 组、db/db 组、db/db+TFAM 过表达组和 db/db+TFAM 空载组。将 8 只 db/m 小鼠作为健康对照组, 24 只 db/db 小鼠作为实验组。db/db 小鼠属于 2 型糖尿病(T2DM)模型鼠, 给予普通饲料喂养, 饲养期间每周测量小鼠空腹血糖(FPG), 若 FPG >16.7 mmol/L, 即确认糖尿病模型小鼠造模成功。于 16 周用小动物超声仪检测 db/db 组及 db/m 组小鼠的心功能: 与 db/m 组小鼠比较, db/db 组小鼠的心功能明显受损, 即 DCM 模型构建成功。将 24 只 16 周龄的实验组 db/db 小鼠按照随机数字表法分为 3 组: (1)db/db+TFAM 过表达组[尾静脉注射腺相关病毒 A1 血清型载体(MyoAAV1A-TFAM), 病毒量为 5×10^{11} vg/只, 根据预实验筛选出最佳病毒总量]; (2)db/db+TFAM 空载组(尾静脉注射相同总量的 MyoAAV1A 血清型-CON); (3)db/db 组(尾静脉注射相同量生理盐水), 每组 8 只。给予以上 4 组小鼠干预处理后, 继续在 SPF 级实验室予普通饲料喂养 3 周, 自由饮水。3 周后, 各组分别选取 3 只小鼠, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(3 ml/kg)麻醉后处死, 快速取出心脏组织并制备冷冻切片, 置于荧光显微镜下观察病毒转染成功, 即

TFAM 过表达模型造模成功, 随后再次检测各组小鼠的心功能。

1.3 小鼠心功能检测 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(3 ml/kg)麻醉各组小鼠, 采用超高分辨率小动物超声成像系统 VEVO 3100 和 30 MHz 中心频率扫描头测定小鼠心脏功能, 记录左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及左心室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS), 每个指标至少检测 3 个心脏周期。

1.4 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)感染心肌的效率 将冷冻的心脏组织切为厚度 5 μ m 的薄片, 滴加甘油及抗荧光淬灭剂, 用盖玻片封片, 于荧光显微镜下观察荧光示踪情况, 以观察 AAV 感染心肌的效率。

1.5 HE 染色观察心肌组织损伤的情况 取已制备的心肌组织切片, 依次放入二甲苯中脱蜡 2 次, 每次 8~10 min, 用无水乙醇洗涤 5 min \times 2 次, 然后分别用梯度乙醇(95%、80%、70%)洗涤, 每次洗涤 2 min, 最后用蒸馏水冲洗 10 min \times 2 次; 滴加苏木精染液及伊红液染色, 乙醇脱水 2 次, 每次 1~2 min, 二甲苯透明 1 min, 中性树胶封片; 在光学显微镜下观察并拍照。

1.6 RT-PCR 检测小鼠心肌组织中 TFAM、线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的 mRNA 表达水平 取心肌组织 20 mg, 置于 4 °C 预冷的 PBS 中洗涤, 然后置于研磨仪中充分研磨至匀浆状态, 加 1 ml Trizol 试剂, 用移液枪重复吹打使其均匀混合, 室温放置 5 min, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液置于新的离心管中, 添加 200 μ l 氯仿溶液, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液并加 0.5 ml 异丙醇溶液, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液并加入 1 ml 80% 乙醇(-20 °C 预冷), 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 室温干燥 RNA 5 min, 向离心管中加入适量的去 RNA 酶水溶解 RNA。由美国 Thermo Fisher Scientific 公司设计并合成 TFAM、mtDNA 基因的引物(表 1)。以 GAPDH 作为内参对照基因, 按照试剂盒说明书进行反转录及扩增

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Sequence of primers for RT-PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	引物长度(bp)
TFAM	正向: GAAACGCCTAAAGAAGAAAGCA	28
	反向: AAGTCCATGGGCTACAGAAAAA	
mtDNA	正向: CTGATACTAGTGGCATTCTCCGAGTTGCTGCTAA	26
	反向: TACCGGAATTCTTGTGAGGGACGGTAAAAGG	
GAPDH	正向: CACTACCGTACCTGACACCA	20
	反向: ATGTCGTTGTCCCACCACCT	

TFAM. 线粒体转录因子 A; mtDNA. 线粒体 DNA

实验;以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理实验数据。

1.7 Western blotting 检测小鼠心肌组织中 TFAM、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白的表达 取心肌组织 40 mg,加入配制好的组织裂解液(RIPA:PMSF=100:1),在低温状态下用组织匀浆器匀浆,在冰上裂解 30 min,在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min 后,收集上清,用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量,取适量蛋白样品与上样 Buffer 缓冲液混合,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将黑色转膜夹(负极)、海绵垫、吸水滤纸 3 张、分离胶板、PVDF 膜、吸水滤纸 3 张、海绵垫、白色转膜夹(正极)夹紧制作湿式转膜“三明治”,在 280 mA 恒流下持续 90 min 转膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(1:500)及二抗(1:5000,兔抗),4 °C 孵育过夜,1×TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜,ECL 化学发光液曝光显影,获得各组蛋白的灰度值,用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.8 TUNEL 检测心肌组织细胞凋亡情况 将已制备好的组织切片放入二甲苯脱蜡 5~10 min×2 次;用无水乙醇及梯度乙醇(90%、70%)分别洗涤 3 min,加入蛋白酶 K 溶液(20 μg/ml)水解 15 min,加入含 3% 过氧化氢的 PBS 在室温下孵育 20 min;用 PBS 洗涤后,在切片上滴加末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)缓冲液及 60 μl TdT 反应液,于 37 °C 孵育 1 h;将切片置于染色缸中,用 PBS 洗涤后加入标记反应终止液,室温孵育 10 min;随后加入配制好的 Streptavidin-HRP 工作液,室温孵育 30 min,滴加 0.2~0.5 ml DAB 显色液,室温孵育 30 min,PBS 冲洗并在切片上滴入抗荧光淬灭封片剂封片后,观察并拍照统计凋亡阳性细胞数。

1.9 心肌组织内氧化应激指标的检测

1.9.1 活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测 用过氧化物敏感荧光探针 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)检测。按照试剂盒说明书配制 ROS 探针,将制备的心肌组织冷冻切片在 PBS 中浸泡 10 min,每张切片滴加 50 μl 配制好的 ROS 探针,并在 37 °C 下孵育 30 min,DAPI 染色 10 min,PBS 冲洗未结合染料,并滴加抗荧光淬灭封片剂,盖玻片封片后,用激光共聚焦显微镜采集图片,并使用 ImageJ 软件分析。

1.9.2 超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)活力检测 采用 SOD 检测试剂盒(WST-8 法,上海碧云天生物技术股份有限公司)测定。取适量样品制备液及 40 mg 心肌组织,置于低温匀浆器中匀浆 3 min,12 000 r/min 离心 3~5 min,取上清液作为待测样品,提前配制好 WST-8 工作液及启动反应工作液,按照说明书加液量添加相应试剂,然后用酶标仪检测样品在 450 nm 下的吸光度值,计算 SOD 的活力。

1.9.3 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测 采用 MDA 检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号 S0131S)测定。严格按照试剂盒说明书制备好样品,取上清液作为待测品,配制好各种待用试剂,按照实验说明书步骤,用酶标仪在 532 nm(或 530~540 nm)下测定吸光度值,同时检测 1、2、5、10、20、50 μmol/L 标准品的吸光度值,制备标准曲线为 $y=0.0009x+0.0454$, $R^2=0.9884$,根据标准曲线方程计算待测品中的 MDA 含量。

1.10 心肌组织中的 ATP 含量检测 采用 ATP 荧光检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号 S0026)测定。按照试剂盒说明书进行样品准备及试剂配制,取 40 mg 心肌组织,加 200 μl 裂解液,用匀浆器充分匀浆并裂解组织,在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用多功能酶标仪检测 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 μmol/L ATP 标准溶液的化学发光强度(relative light unit, RLU),并制备标准曲线。按照 1:100 比例配制 ATP 检测工作液,将工作液加入 96 孔板,采用多功能酶标仪测定其 RLU 值,最后根据 ATP 标准曲线 ($y=767.0436x-22.5197$, $R^2=0.9658$) 计算 ATP 含量。

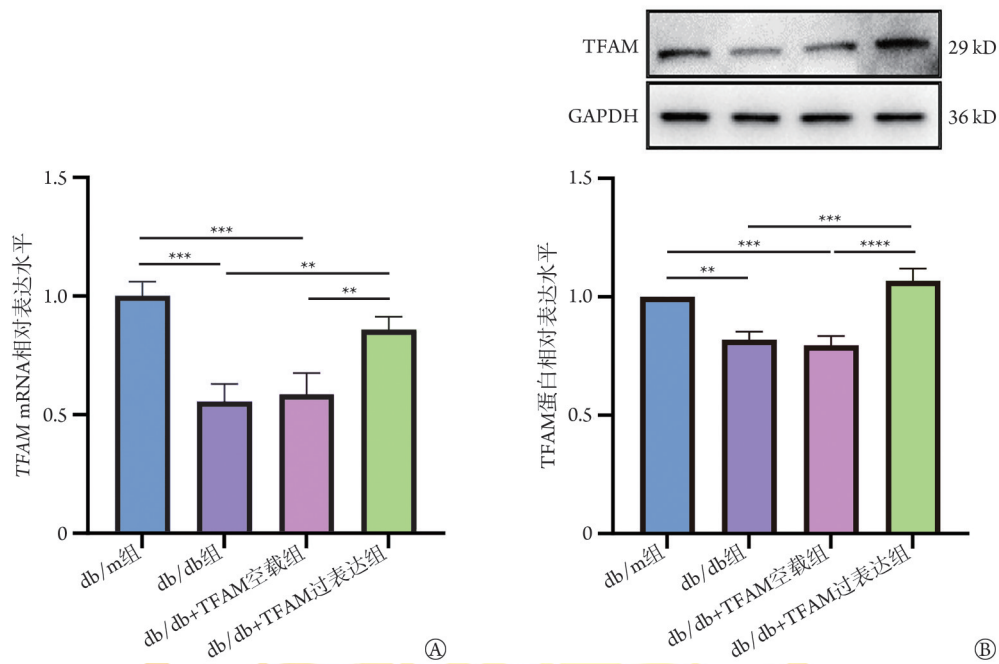
1.11 统计学处理 采用 SPSS 28.0 及 GraphPad Prism 软件进行统计分析及作图。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 TFAM 腺相关病毒的转染及 TFAM 表达情况 荧光显微镜下可见 db/db+TFAM 过表达组及 db/db+TFAM 空载组小鼠的心肌组织中均有绿色荧光蛋白(GFP)表达,而 db/m 组及 db/db 组无 GFP 表达(附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1243.2025.0924FJ>),表明 TFAM 过表达腺相关病毒转染成功。与 db/db 组及 db/db+TFAM 空载组小鼠比较,db/db+TFAM 过表达组小鼠的心肌组织中 TFAM mRNA 及蛋白表达水平明显升高($P<0.001$,图 1A、B)。

2.2 过表达 TFAM 对糖尿病小鼠心肌线粒体功能的影响 与 db/m 组比较,db/db 组小鼠的心肌组织中 mtDNA 拷贝数及 ATP 含量均明显降低($P<0.0001$);与 db/db、db/db+TFAM 空载组比较,db/db+TFAM 过表达组的 mtDNA 拷贝数及 ATP 含量均明显升高($P<0.05$),而 db/db 组与 db/db+TFAM 空载组,mtDNA 拷贝数及 ATP 含量变化差异无统计学意义($P>0.05$)(图 2)。

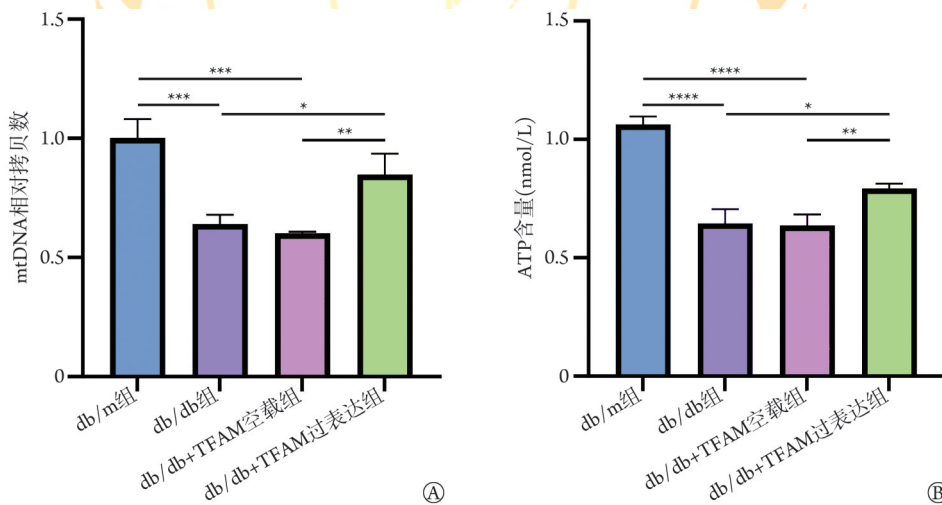
2.3 过表达 TFAM 对糖尿病小鼠心肌氧化应激的影响 荧光强度定量分析结果显示,与 db/m 组比较,



TFAM. 线粒体转录因子 A; A. 各组小鼠心脏组织中 TFAM 蛋白表达水平比较; B. 各组小鼠心脏组织中 TFAM mRNA 表达水平比较; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图 1 各组小鼠心肌组织中 TFAM mRNA 及蛋白表达水平比较

Fig.1 Comparison of mRNA and protein expression of TFAM in myocardial tissue of mice in each group



mtDNA. 线粒体 DNA; A. 各组小鼠心肌组织中 mtDNA 拷贝数比较; B. 各组小鼠心肌组织中 ATP 含量比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

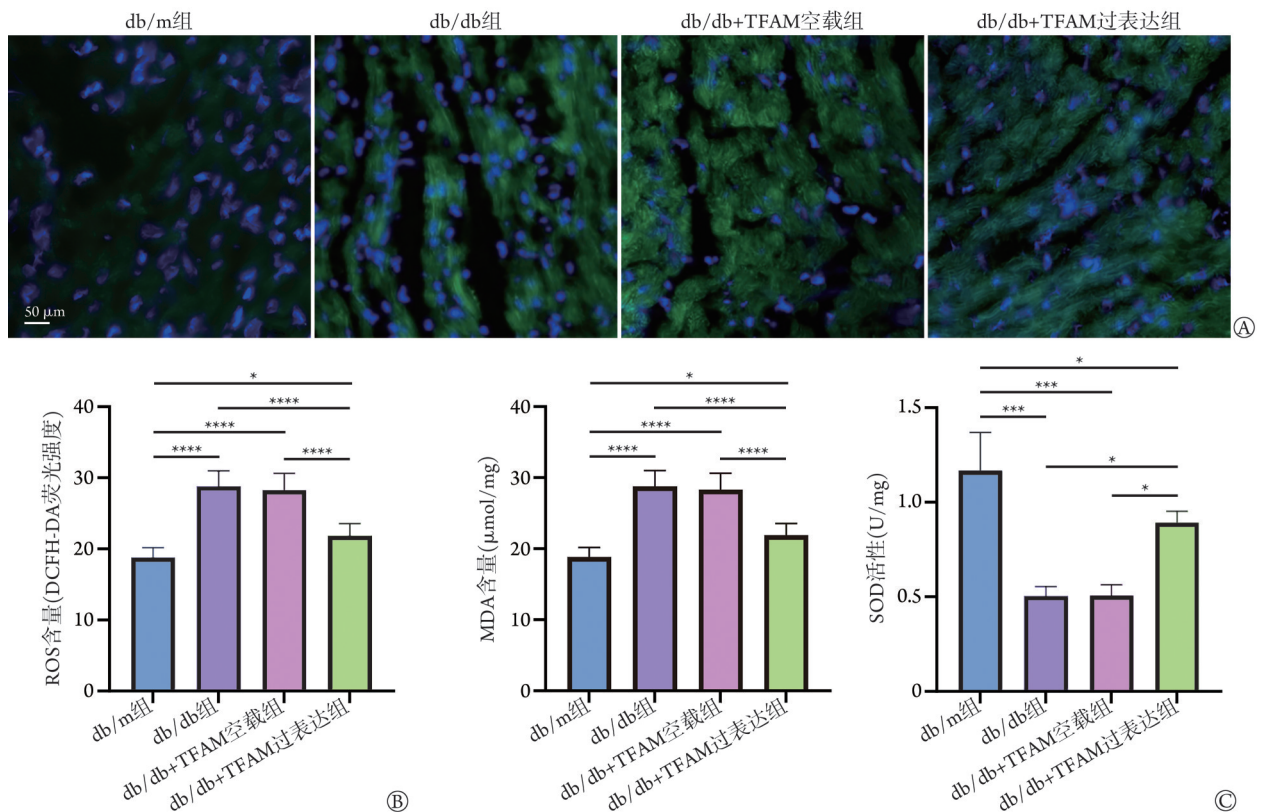
图 2 各组小鼠心肌组织中 mtDNA 拷贝数及 ATP 含量变化

Fig.2 Changes of mtDNA and ATP in myocardial tissue of mice in each group

db/db 组小鼠心脏组织中二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 及 DCFH-DA 的荧光强度增强, ROS 含量增加 ($P < 0.0001$); 与 db/db 组及 db/db+TFAM 空载组比较, db/db+TFAM 过表达组的荧光强度减弱, ROS 含量明显减少 ($P < 0.0001$); 与 db/db 组比较, db/db+TFAM 空载组荧光强度及 ROS 含量变化无统计学意义 (图 3A、B)。氧化应激指标检测结果显示, 与 db/m 组比较, db/db 组 MDA 含量升高 ($P < 0.0001$)、SOD 活性下降 ($P < 0.001$); 与 db/db+TFAM 空载组及 db/db 组

比较, db/db+TFAM 过表达组中 MDA 含量降低 ($P < 0.0001$)、SOD 活性增强 ($P < 0.05$); 而 db/db+TFAM 空载组与 db/db 组 MDA 含量及 SOD 活性变化无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3C)。

2.4 过表达 TFAM 对糖尿病小鼠心肌细胞凋亡的影响 Western blotting 检测结果显示, 与 db/m 组比较, db/db 组心肌组织中促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 表达水平升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平降低 ($P < 0.0001$); 与 db/db+TFAM 空载组和 db/db 组比较, db/db+



TFAM. 线粒体转录因子A; DCFH-DA. 2, 70-二氯荧光素二乙酸酯; MDA. 丙二醛; SOD. 超氧化物歧化酶; A. DCFH-DA 染色法检测各组小鼠心脏组织中荧光变化图; B. 各组小鼠心肌组织 ROS 含量比较; C. 各组小鼠心脏组织 MDA 含量及 SOD 活性比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图3 各组小鼠心肌组织中氧化应激指标比较

Fig.3 Changes of oxidative stress indexes in myocardial tissue of mice in each group

TFAM过表达组 Caspase-3、Bax 表达水平降低($P < 0.001$), Bcl-2 表达水平升高($P < 0.001$); 而 db/db+TFAM 空载组与 db/db 组 Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达水平变化无统计学意义($P > 0.05$)(图 4A)。TUNEL 法检测结果显示, 与 db/m 组比较, db/db 组小鼠心肌组织中 TUNEL 阳性细胞数增加($P < 0.001$); 与 db/db 组和 db/db+TFAM 空载组比较, db/db+TFAM 过表达组 TUNEL 阳性细胞数减少($P < 0.05$, $P < 0.01$); 而 db/db+TFAM 空载组与 db/db 组 TUNEL 阳性细胞数变化无统计学意义($P > 0.05$, 图 4B)。

2.5 过表达 TFAM 对糖尿病小鼠心肌损伤的影响

HE 染色结果显示, db/m 组小鼠心肌结构正常, 心肌纤维完整, 排列整齐, 细胞外基质及纤维组织少; 而 db/db 组小鼠的心肌纤维排列紊乱甚至断裂, 坏死或炎症细胞增加, 心肌纹状体模糊, 心肌细胞肥大; 与 db/db 组及 db/db+TFAM 空载组比较, db/db+TFAM 过表达组小鼠的心肌纤维紊乱明显改善, 坏死或炎症细胞明显减少(图 5A)。与 db/m 组比较, db/db 组、db/db+TFAM 空载组、db/db+TFAM 过表达组的心肌细胞横截面积明显增大, 心肌细胞肥大; 与 db/db 组、db/db+TFAM 空载组比较, db/db+

TFAM 过表达组的心肌细胞横截面积明显缩小, 心肌细胞肥大改善($P < 0.0001$, 图 5B)。

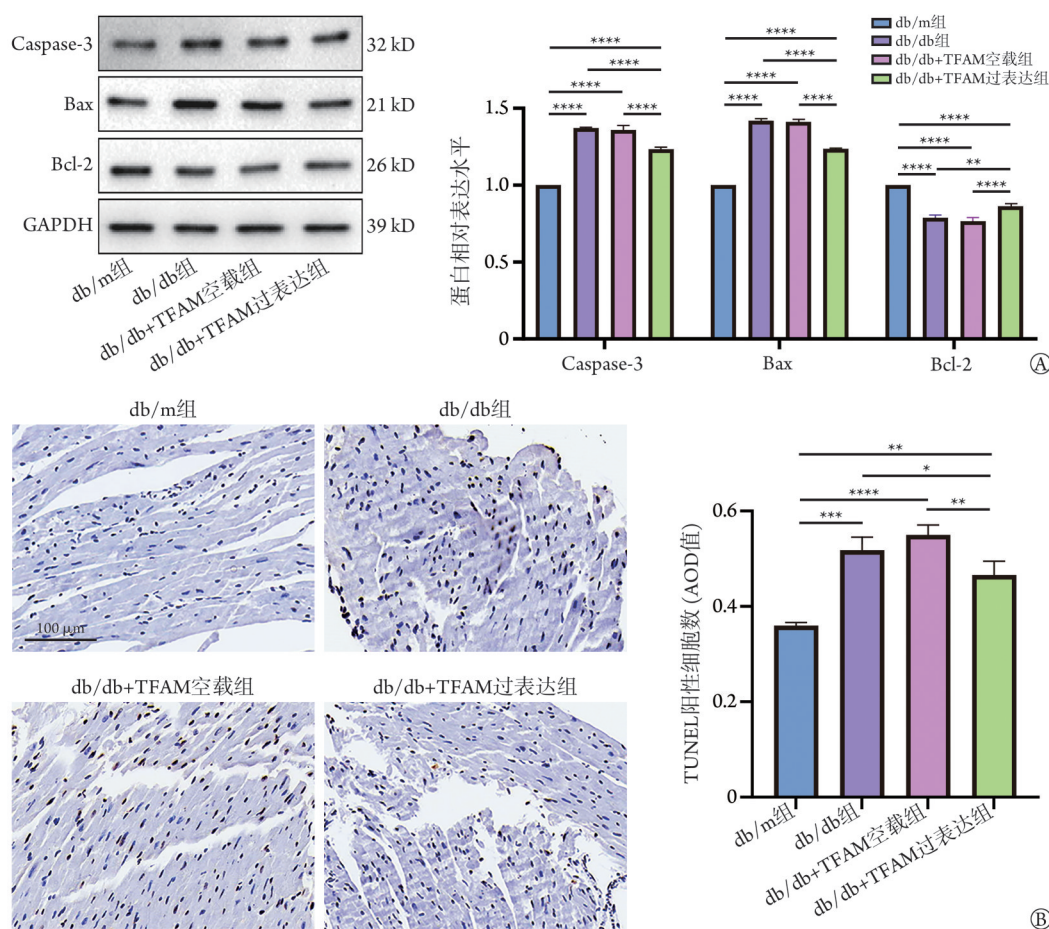
2.6 过表达 TFAM 对糖尿病小鼠心脏功能的影响

心脏彩超检测显示, 与 db/m 组比较, db/db 组小鼠心脏的收缩及舒张功能明显障碍, LVEF、LVFS 及 E/A 明显降低($P < 0.0001$); 与 db/db 组及 db/db+TFAM 空载组比较, db/db+TFAM 过表达组的 LVEF、LVFS 及 E/A 明显增加($P < 0.001$); 而 db/db+TFAM 空载组与 db/db 组的 LVEF、LVFS 及 E/A 差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 6A); 具有代表性的二维及 M 型超声心动图图像见图 6B。

3 讨论

线粒体是细胞的代谢场所, 对机体氧化代谢及细胞代谢过程的调节发挥关键作用^[11], 因此维持线粒体功能的稳定对延缓 DCM 的发生发展至关重要^[4,12]。

线粒体是唯一有 DNA 的细胞器, 受到核基因组 DNA 及 mtDNA 双重遗传控制, 其中 mtDNA 是细胞线粒体最重要的组成部分, 其拷贝数可反映 mtDNA 转录及 ATP 生成^[16-18], 且线粒体机能由 mtDNA 及



TFAM, 线粒体转录因子A; AOD, 平均荧光强度; A, Western blotting 检测各组小鼠心肌组织中凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的表达; B, TUNEL 法检测各组小鼠心脏组织中 TUNEL 阳性细胞数(免疫荧光染色, 图中黑点即 TUNEL 阳性细胞); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

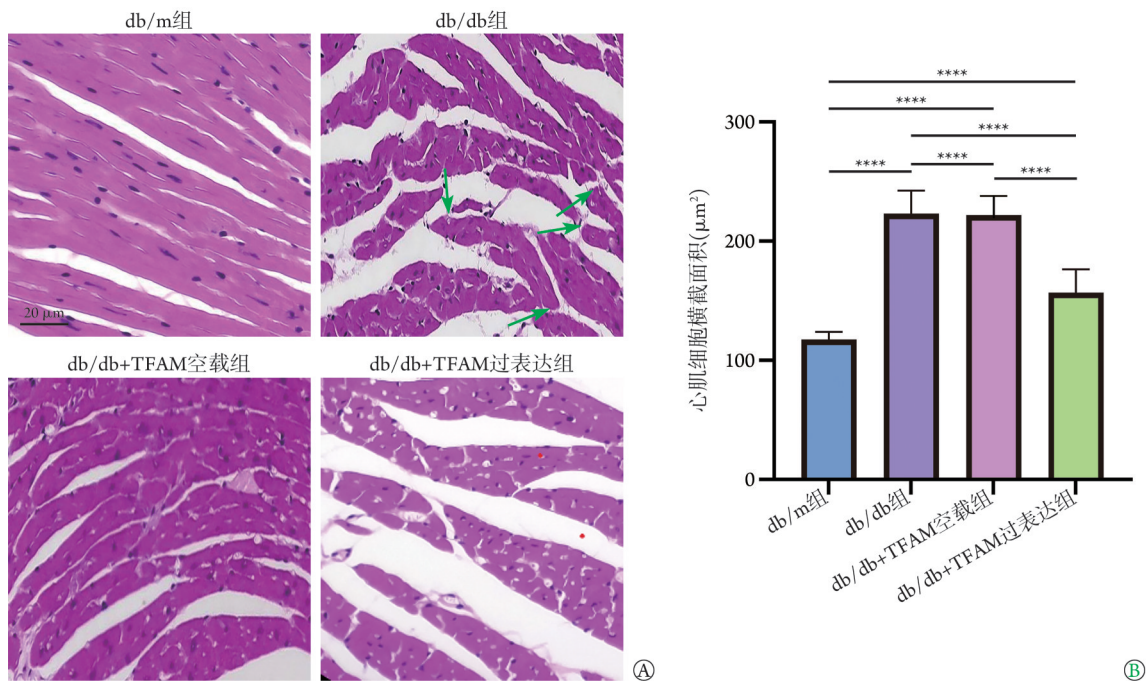
图4 各组小鼠心肌细胞凋亡相关指标检测

Fig.4 Detection of myocardial cell apoptosis-related indicators in each group of mice

TFAM 决定^[19], 而 TFAM 是哺乳动物模型 mtDNA 拷贝数的关键调节因素^[4]。由于 TFAM 是 mtDNA 启动子的特异性增强子, 对 mtDNA 转录、复制等生物学过程起着关键的调节作用^[4,20-22], 且 mtDNA 拷贝数的减少可导致线粒体功能障碍, 线粒体复合物 I 及 III 活性降低, 进而导致线粒体 ATP 生成障碍^[23]。此外, mtDNA 易受病理环境影响而使结构受损, 而 TFAM 可为 mtDNA 遗传信息的传递过程提供稳定的细胞环境, 因此 TFAM 与 mtDNA 的变化影响着线粒体的功能^[4,11,20,24]。既往有研究从细胞层面证实, 高糖环境可使线粒体功能受损, 进而引起氧化应激增强、细胞内糖脂等能量代谢异常^[3-4,23]。有动物实验发现, 随着 db/db 糖尿病小鼠周龄增加, 心肌组织中 TFAM 蛋白表达水平进行性降低, 这种变化可能使线粒体复制及转录调控过程受到影响, 进而影响线粒体的生物学功能^[15]。此外, 还有研究发现, TFAM 的破坏或缺乏可导致 mtDNA 耗尽及线粒体 ATP 缺乏^[13]。基于上述研究, 本研究提出如下假设, 在高糖环境

中, 心肌组织中 TFAM 表达水平降低, 同时 TFAM 可通过介导线粒体功能障碍, 进而引起氧化应激增强, 心肌细胞凋亡增加^[4]。为进一步论证上述假设, 本研究以瘦素受体敲除的 db/db 糖尿病小鼠为 DCM 疾病模型, 研究 TFAM 通过调控线粒体功能对糖尿病小鼠心肌组织氧化应激及凋亡的影响。结果发现, db/db 小鼠心肌组织中 TFAM 表达水平降低, ATP 含量降低, mtDNA 拷贝数减少, 从而导致线粒体功能紊乱, 与上述研究结果一致。

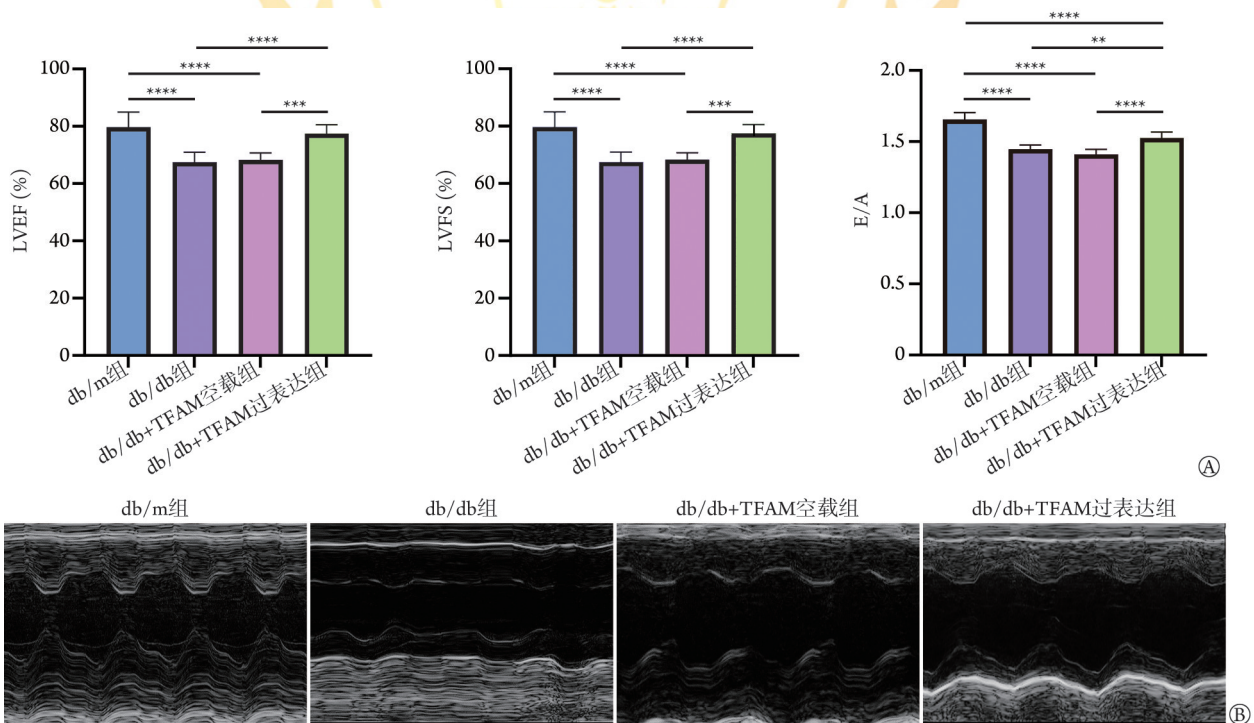
线粒体功能异常引起的机体氧化系统失衡及细胞凋亡是 DCM 的主要发病机制^[4,11]。氧化应激是机体过度生成 ROS 的一种病理变化, 而 ROS 的生成单位主要为心肌线粒体, 正常情况下机体的氧化系统处于平衡状态, 适量的 ROS 可激活蛋白质活性, 对机体的新陈代谢具有一定的辅助作用^[14], 但 ROS 产生增多可直接损伤线粒体功能, 进而降低脂肪酸的氧化能力, 引起脂质积聚、心肌纤维化甚至心功能不全^[4,25]。然而当机体处于病态情况(如糖尿病)下,



TFAM. 线粒体转录因子A; A. 各组心肌组织的病理结构图(绿色箭头示意心肌纤维断裂, HE ×400); B. 各组心肌细胞横截面积比较; **** $P < 0.0001$

图5 各组小鼠心肌组织病理学检测

Fig.5 Myocardial histopathology was detected in each group



LVEF. 左心室射血分数; LVFS. 左心室短轴缩短率; E/A值. 心脏舒张早期(E峰)和晚期(A峰)的血流速度比值; A. 各组小鼠LVEF、LVFS及E/A值的比较; B. 具有代表性的二维及M型超声心动图图像; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图6 各组小鼠心脏功能的比较

Fig.6 Comparison of cardiac function among each group

机体抗氧化系统失衡, 可使线粒体呼吸链及膜电位异常, 进而诱导线粒体功能不全^[4,26]。线粒体功能障碍常伴有氧化酶生成异常, 使机体抗氧化系统失衡,

进而增强氧化应激^[27-28]。已有研究发现, DCM患者心肌细胞内ROS增多, 内源性及外源性抗氧化系统均被破坏, 体内的氧化应激增强^[29-30]。氧化应激导

致线粒体转化通道异常,引起线粒体膜电位降低,进而导致ATP生成减少、细胞色素C释放减少,从而使含半胱氨酸的Caspase激活受阻。而活化的Caspase可将细胞内的重要蛋白降解,通过线粒体/细胞色素C介导的信号通路触发内源性细胞凋亡途径^[4,31-32];此外,有研究还发现,Caspase-8及-9等凋亡途径的主要启动子在高糖环境下可被激活,进一步激活凋亡下游的执行人Caspase-3,从而参与糖尿病小鼠心肌细胞的凋亡过程^[4,8,33],因此,线粒体为细胞凋亡的调节细胞器,而细胞程序性死亡是DCM发病的主要变化过程^[4]。为了进一步探究DCM中线粒体功能与氧化应激及细胞凋亡之间的关系,本研究检测了各组小鼠心肌组织中氧化应激指标(ROS、SOD、MDA)的变化及细胞凋亡情况,结果发现db/db组小鼠心肌组织中的ROS及MDA含量增加,SOD活性降低,促凋亡相关蛋白Caspase-3、Bax表达水平升高,抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低,此外,从组织学检测细胞凋亡情况发现,db/db组小鼠心肌组织中的TUNEL阳性细胞数明显增加,与分子学检测结果一致。本研究通过分析超声心动图数据发现,与db/m组比较,db/db组的LVEF、LVFS及E/A明显降低;心肌组织病理检测显示,db/db组小鼠心肌纤维紊乱甚至断裂,心肌细胞肥大,坏死或炎症细胞增加,心肌纹状体模糊。综上,糖尿病小鼠心肌组织中TFAM表达水平降低,可引起线粒体功能障碍,进而导致氧化应激增强及细胞凋亡增加,心肌细胞受损,心功能下降。

在结肠肿瘤细胞中,TFAM的降低可使mtDNA的生成减少,并延长mtDNA氧化损伤的时间,导致机体抗氧化系统失衡^[34]。另一项研究也发现,TFAM可减轻线粒体的氧化损伤,使线粒体功能在一定程度上得到恢复^[4,34]。Hickson-Bick等^[35]研究指出,TFAM通过激活线粒体的生物多样性抑制新生大鼠心肌细胞的程序性死亡,对心肌细胞产生保护作用;也有研究指出,过表达TFAM可经过激活T细胞核内因子途径减少ROS生成及细胞程序性死亡^[4,25]。线粒体SOD、过氧化氢酶等多种抗氧化酶可通过清除ROS并保护细胞免受其影响^[36-37]。上述研究表明,TFAM对氧化应激的清除及降低相关疾病的发生率具有重要意义,笔者推测在DCM中,TFAM可通过改善线粒体的氧化代谢从而延缓疾病的进展。本研究通过检测转基因模型db/db小鼠心肌组织中的TFAM,结果显示,与db/db+TFAM空载组比较,db/db+TFAM过表达组小鼠心肌细胞中ATP含量及mtDNA拷贝数均增加,MDA、ROS生成减少,SOD生成增多,Bax、Caspase-3等促凋亡蛋白表达水平明显降低,Bcl-2抗凋亡蛋白表达水平明显

升高,且TUNEL检测发现组织凋亡阳性细胞数明显降低;心功能检测发现,db/db+TFAM过表达组的LVEF、LVFS及E/A升高;病理检测发现,心肌纤维紊乱改善,坏死或炎症细胞明显减少,心肌细胞肥大减轻,与既往研究结果^[4,38]一致,表明TFAM过表达可减轻糖尿病心肌线粒体功能损伤所致的氧化应激及凋亡,进而改善糖尿病小鼠的心功能。

综上所述,本研究发现,糖尿病小鼠心肌组织中TFAM表达水平降低,氧化应激及细胞凋亡增加,线粒体及心脏功能损伤,表明TFAM蛋白可能通过抑制氧化应激及细胞凋亡,减轻糖尿病心肌线粒体损伤,进而改善心脏功能。但由于本研究局限于在动物组织水平体外模拟DCM的心肌代谢状态得到的初步结果,仍需通过细胞实验,甚至临床试验进一步验证。在对影响糖尿病心肌细胞线粒体功能的机制研究中,除了TFAM因子以外,TFAM上游调控因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (PGC-1 α)等的变化均可影响线粒体功能,且DCM的发生还与钙调节失衡、炎症反应等机制有关,仍需进一步研究验证。尽管db/db鼠是一种经典的自发性T2DM模型,其自发形成T2DM的发病过程与人类的T2DM发病过程相似,被认为是目前最好的T2DM动物模型之一,但动物的基因、代谢及排泄方式与人类存在差异。此外,本研究的样本量小、环境因素及实验动物应激等情况均可能影响实验结果的可靠性。因此,本研究仅可为人类疾病发病过程中的机制研究及相关临床试验提供一定的参考依据。

【参考文献】

- [1] Zhang Y, Song H, Bai J, *et al.* Association between the stress hyperglycemia ratio and severity of coronary artery disease under different glucose metabolic states[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1): 29.
- [2] Marfella R, Amarelli C, Cacciatore F, *et al.* Lipid accumulation in hearts transplanted from nondiabetic donors to diabetic recipients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(11): 1249-1262.
- [3] Tan Y, Zhang Z, Zheng C, *et al.* Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(9): 585-607.
- [4] 吕丽丽,翟满满,丁小艳,等.线粒体转录因子A介导的线粒体功能障碍在糖尿病心肌病中的作用[J]. *临床荟萃*, 2023, 38(5): 465-468.
- [5] Liu C, Yao Q, Hu T, *et al.* Cathepsin B deteriorates diabetic cardiomyopathy induced by streptozotocin *via* promoting NLRP3-mediated pyroptosis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 30: 198-207.
- [6] 彭文艺,周喆,王德琼,等. YAP对高糖培养大鼠心脏成纤维细胞活化作用的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(1): 34-41.

- [7] Yang R, Zhang X, Zhang Y, *et al.* Grpel2 maintains cardiomyocyte survival in diabetic cardiomyopathy through DLST-mediated mitochondrial dysfunction: a proof-of-concept study[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 200.
- [8] Zhang Q, Li D, Dong X, *et al.* LncDACH1 promotes mitochondrial oxidative stress of cardiomyocytes by interacting with sirtuin3 and aggravates diabetic cardiomyopathy[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(6): 1198-1212.
- [9] Ma H, Jiang T, Tang W, *et al.* Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(16): 2161-2175.
- [10] 曹兴丹, 陈子仪, 宋小刚, 等. EMRE 在高糖环境中的变化对心肌细胞凋亡机制的研究[J]. *心血管病学进展*, 2022, 43(10): 953-960.
- [11] Tomita K, Kuwahara Y, Igarashi K, *et al.* Mitochondrial dysfunction in diseases, longevity, and treatment resistance: tuning mitochondria function as a therapeutic strategy[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(9): 1348.
- [12] Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(4): 491-506.
- [13] Wu W, Ziemann M, Huynh K, *et al.* Activation of Hippo signaling pathway mediates mitochondria dysfunction and dilated cardiomyopathy in mice[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8993-9008.
- [14] Han X, Wang J, Li R, *et al.* Placental mesenchymal stem cells alleviate podocyte injury in diabetic kidney disease by modulating mitophagy via the SIRT1-PGC-1 α -TFAM pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4696.
- [15] 周益盛, 荆哲, 刘峰舟, 等. 糖尿病小鼠心肌组织中线粒体转录因子A的表达[J]. *山西医科大学学报*, 2017, 48(3): 211-214.
- [16] Ikeda M, Ide T, Fujino T, *et al.* Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119687.
- [17] Yan C, Duanmu X, Zeng L, *et al.* Mitochondrial DNA: distribution, mutations, and elimination[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 379.
- [18] Feng J, Chen Z, Ma Y, *et al.* AKAP1 contributes to impaired mtDNA replication and mitochondrial dysfunction in podocytes of diabetic kidney disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(10): 4026-4042.
- [19] Liu J, Wang R, Luo N, *et al.* Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood of IgA nephropathy: a cross-sectional study[J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2182133.
- [20] Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(9): 935-944.
- [21] Zhao M, Wang Y, Li L, *et al.* Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1845-1863.
- [22] Lu P, Hogan-Cann AD, Kamboj A, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits mitochondrial respiration by suppressing PGC-1 α activity in neurons[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 160: 107755.
- [23] Huo S, Wang Q, Shi W, *et al.* ATF3/SPI1/SLC31A1 signaling promotes cuproptosis induced by advanced glycosylation end products in diabetic myocardial injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1667.
- [24] Xu WY, Boyd RM, Tree MO, *et al.* Mitochondrial transcription factor A promotes DNA strand cleavage at abasic sites[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(36): 17792-17799.
- [25] Khan S, Ahmad SS, Kamal MA. Diabetic cardiomyopathy: from mechanism to management in a nutshell[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(2): 268-281.
- [26] Ma H, Li J. The ginger extract could improve diabetic retinopathy by inhibiting the expression of e/iNOS and G6PDH, apoptosis, inflammation, and angiogenesis[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(5): e14084.
- [27] Al-Azab M, Qaed E, Ouyang X, *et al.* TL1A/TNFR2-mediated mitochondrial dysfunction of fibroblast-like synoviocytes increases inflammatory response in patients with rheumatoid arthritis via reactive oxygen species generation[J]. *FEBS J*, 2020, 287(14): 3088-3104.
- [28] Morciano G, Boncompagni C, Ramaccini D, *et al.* Comprehensive analysis of mitochondrial dynamics alterations in heart diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3414.
- [29] Dhalla NS, Shah AK, Tappia PS. Role of oxidative stress in metabolic and subcellular abnormalities in diabetic cardiomyopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2413.
- [30] de Blasio MJ, Huynh N, Deo M, *et al.* Defining the progression of diabetic cardiomyopathy in a mouse model of type 1 diabetes[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 124.
- [31] Zheng D, Cao T, Zhang LL, *et al.* Targeted inhibition of calpain in mitochondria alleviates oxidative stress-induced myocardial injury[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(6): 909-920.
- [32] 王硕, 赵云罡. 非编码RNA通过调控线粒体功能影响心衰进程的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49: 1-17.
- [33] Zhang X, Ma X, Zhao M, *et al.* H2 and H3 relaxin inhibit high glucose-induced apoptosis in neonatal rat ventricular myocytes[J]. *Biochimie*, 2015, 108: 59-67.
- [34] Lillenes MS, Støen M, Günther CC, *et al.* Mitochondrial transcription factor A (TFAM) rs1937 and AP endonuclease 1 (APE1) rs1130409 alleles are associated with reduced cognitive performance[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 645: 46-52.
- [35] Hickson-Bick DL, Jones C, Buja LM. Stimulation of mitochondrial biogenesis and autophagy by lipopolysaccharide in the neonatal rat cardiomyocyte protects against programmed cell death[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(2): 411-418.
- [36] Nesci S, Lenaz G. Impaired mitochondrial bioenergetics under pathological conditions[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(2): 205.
- [37] Jahan I, Saha P, Eysha Chisty TT, *et al.* *Crataeva nurvala* bark (Capparidaceae) extract modulates oxidative stress-related gene expression, restores antioxidant enzymes, and prevents oxidative stress in the kidney and heart of 2K1C rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 4720727.
- [38] Pham TK, Nguyen THT, Yi JM, *et al.* Evogliptin, a DPP-4 inhibitor, prevents diabetic cardiomyopathy by alleviating cardiac lipotoxicity in db/db mice[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(4): 767-778.

(责任编辑: 张小利)