

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.19.011

黄芩苷调节线粒体动力学平衡后减缓小鼠 骨骼肌缺血再灌注损伤的研究*

张永春¹, 孙 林^{2△}, 徐 凯², 陈绪龙³, 李 昊², 张永创², 杨清滔³

1. 武警贵州省总队医院外二科, 贵州贵阳 550005; 2. 武警贵州省总队医院卫勤处, 贵州贵阳 550005;

3. 贵州医科大学附属医院泌尿外科, 贵州贵阳 550004

摘 要:目的 研究黄芩苷对小鼠骨骼肌缺血再灌注损伤是否具有抑制作用, 该抑制作用是否通过调节线粒体动力学平衡来实现。方法 随机将 30 只昆明小鼠分为空白对照组、缺血复供组及低、中、高剂量黄芩苷干预组。除空白对照组外, 其余各组小鼠构建双下肢缺血再灌注损伤模型, 并使用不同剂量黄芩苷溶液腹腔注射干预, 缺血复供组使用生理盐水替代。采用苏木素-伊红(HE)染色检测各组骨骼肌损伤情况, 检测各组骨骼肌组织线粒体分裂蛋白 1(FIS1)、线粒体动力相关蛋白 1(DRP1)、线粒体融合蛋白(Mfn)1、Mfn2 的基因和蛋白表达水平, 同时检测各组骨骼肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)水平。结果 小鼠双下肢缺血再灌注损伤后, 下肢骨骼肌出现明显损伤和炎症浸润。与空白对照组相比, 其他各组骨骼肌组织 FIS1、DRP1 的基因和蛋白表达及 MDA 水平均明显升高($P < 0.05$), Mfn1、Mfn2 的基因和蛋白表达及 GSH、SOD 水平均明显降低($P < 0.05$)。给予 3 种剂量黄芩苷溶液干预小鼠模型后, 与缺血复供组比较, 高剂量黄芩苷干预组 DRP1 基因表达明显下降($P < 0.05$), 中、高剂量黄芩苷干预组的 DRP1 蛋白表达均明显下降($P < 0.05$), 高剂量黄芩苷干预组 GSH、SOD 水平均明显升高($P < 0.05$), 高剂量黄芩苷干预组 MDA 水平明显下降($P < 0.05$)。不同剂量黄芩苷干预组的 FIS1 基因、蛋白表达比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 不同剂量黄芩苷干预组 Mfn1、Mfn2 的基因及蛋白表达出现少量升高但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 小鼠下肢骨骼肌缺血再灌注损伤后, 下肢肌群发生氧化应激损伤, 线粒体动力学失衡。黄芩苷对骨骼肌缺血再灌注损伤的抑制作用可能与减轻氧化应激损伤、抑制 DRP1 的表达有关。

关键词:黄芩苷; 线粒体; 动力学平衡; 骨骼肌; 缺血再灌注损伤

中图分类号:R642;R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)19-2835-06

Effects of baicalin in retarding mice skeletal muscle ischemia-reperfusion injury after regulating mitochondrial dynamic balance*

ZHANG Yongchun¹, SUN Lin^{2△}, XU Kai², CHEN Xulong³,
LI Hao², ZHANG Yongchuang², YANG Qingtao³1. Second Department of Surgery; 2. Department of Medical Administration, Hospital of Armed Police
Guizhou Provincial Corps, Guiyang, Guizhou 550005, China; 3. Department of Urologic Surgery,
Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

Abstract: Objective To investigate whether baicalin having the inhibitory effect on mice skeletal muscle ischemia-reperfusion injury and whether the inhibitory effect being achieved by regulating mitochondrial dynamic balance. **Methods** Thirty Kunming mouse models were divided into the blank control group, ischemia-reperfusion group, low, medium and high-dose baicalin intervention groups. Except for the blank control group, the mice in the other groups were constructed the bilateral lower limb ischemia-reperfusion injury model, and different doses of baicalin solution were intraperitoneally injected for intervention. The ischemia-reperfusion group was replaced with physiological saline. The HE staining was used to detect the pathological damage of skeletal muscle, and detected the gene and protein expression levels of mitochondrial fission protein 1 (FIS1), mitochondrial dynamics related protein 1 (DRP1), mitochondrial fusion protein (Mfn) 1, and Mfn2 in skeletal muscle tissues of each group. At the same time, the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in skeletal muscle tissues of each group were detected. **Results** After ischemia-reperfusion injury in both lower limbs of mice, the skeletal muscles of the lower limbs developed sig-

* 基金项目:贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目(gzwbj2021-199)。

作者简介:张永春,男,副主任医师,主要从事泌尿、骨关节系统创伤修复的研究。△ 通信作者,E-mail:10152628@qq.com。

nificant damage and inflammatory cell infiltration; compared with the blank control group, the gene and protein expression of FIS1 and DRP1, as well as the levels of MDA in skeletal muscle tissues of other groups were significantly increased ($P < 0.05$); the gene and protein expression of Mfn1 and Mfn2 as well as GSH and SOD levels were significantly reduced ($P < 0.05$). After administering three doses of baicalin solution to intervene in the mouse model, compared with the ischemia-reperfusion group, the DRP1 gene expression in the high-dose baicalin intervention group was significantly decreased ($P < 0.05$), while the DRP1 protein expression in the medium and high-dose baicalin intervention groups was significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of GSH and SOD in the high-dose baicalin intervention group were significantly higher ($P < 0.05$), while the level of MDA in the high-dose baicalin intervention group was significantly lower ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in FIS1 gene and protein expression levels between different doses of baicalin intervention groups ($P > 0.05$). The gene and protein expression of Mfn1 and Mfn2 in different doses of baicalin intervention groups showed a slight increase but no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** After ischemia reperfusion injury of lower limb skeletal muscle in mice, the lower limb muscle group develops the oxidative stress damage and mitochondrial dynamics unbalance. The inhibitory effect of baicalin on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury may be related to reduce the oxidative stress injury and inhibit the DRP1 expression.

Key words: baicalin; mitochondria; dynamics balance; skeletal muscle; ischemia-reperfusion

线粒体作为能量代谢的中心,维持了骨骼肌消耗全身 90% 摄氧量^[1]的高耗能、高耗氧行为,并在不断的合成和分裂中出现频繁的动态变化,维持着动力学平衡^[2]。线粒体动力学失衡会降低肌细胞的摄氧量,导致线粒体活性氧超载,氧化、合成代谢受损^[3]。

黄芩苷是从黄芩根中分离出来的一种天然黄酮类化合物,价廉易获取,具有较好的抗氧化损伤功效^[4],且对人的正常上皮细胞、外周细胞和髓细胞几乎无毒性^[5]。在影响线粒体动力学平衡方面,黄芩苷可下调动力相关蛋白 1 (DRP1),促进 DRP1 磷酸化^[6],并诱导线粒体融合蛋白(Mfn)2 生成,使线粒体动力学平衡倾向融合,通过减少分裂来抑制细胞的缺血再灌注损伤(IRI)^[7]。然而,围绕黄芩苷抑制 IRI 的研究多集中在心脑血管系统^[8],尚未见针对骨骼肌的报道。但是,在战创伤或自然灾害导致的创伤中,常因躯体卡压、止血带长期使用等造成伤员骨骼肌的 IRI,甚至危及生命。此时,研究不良反应小、已临床成品生产的黄芩苷是否对骨骼肌 IRI 具有显著的抑制作用就显得较有实际意义。并且,将调控线粒体动力学平衡引入到实验中,拓展了实验广度和提高了创新性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 30 只雄性昆明小鼠,均为 1 月龄,体质量为 15~22 g,购自贵州医科大学实验动物中心,动物模型的构建和剖杀在该中心实施,实验动物许可证号:SYXK(黔)2018-0001。

1.2 实验试剂 黄芩苷(货号:HY-N97)购自 MCE 生物公司;超氧化物歧化酶(SOD,货号:A006-4-1)、丙二醛(MDA,货号:A003-4-1)、谷胱甘肽(GSH,货号:A006-1-1)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TRIzol Reagent(货号:15596026CN)购自赛默

飞世尔科技公司;线粒体分裂蛋白 1 (FIS1, 货号:10956-1-AP)多克隆抗体、线粒体 DRP1(货号:12957-1-AP)多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;Mfn1 (货号:R27027) Rabbit mAb、Mfn2 (货号:340604) Rabbit pAb 购自成都正能生物技术有限责任公司。 β -actin 内参抗体(货号:PMK081M)购自湖北普美生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的分组及构建 所有实验程序均符合贵州医科大学实验动物中心、贵州省人民医院中心实验室、武警贵州省总队医院伦理委员会相关规定。动物模型适应性喂养 7 d 后,随机分为空白对照组、缺血复供组及低剂量(50 mg/kg)、中剂量(100 mg/kg)、高剂量(200 mg/kg)黄芩苷干预组,自由进食、进饮。按文献[9]的方法构建小鼠下肢骨骼肌 IRI 模型,并对双下肢均行 IRI 干预,即使用止血带从后肢根部阻断小鼠双下肢血供,阻断后对低、中、高剂量黄芩苷干预组小鼠分别给予相应的低、中、高剂量黄芩苷溶液腹腔注射,缺血复供组仅在 IRI 建模后用生理盐水干预,空白对照组不做任何缺血及药物干预处理。缺血 2 h 后迅速解除止血带,恢复双侧下肢血供,当再灌注 4 h 后剖杀小鼠,并收集下肢骨骼肌组织,一侧采用 4% 多聚甲醛固定,另一侧进行基因及蛋白检测。

1.3.2 苏木精-伊红(HE)染色及病理学分析 将使用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后的肌肉组织流水冲洗过夜,用梯度浓度乙醇致组织脱水完全,然后使用二甲苯和无水乙醇进行透明处理。在经 50% 石蜡和二甲苯处理后继续浸蜡,于 4 ℃ 环境下保存。做厚度为 3 μ m 的连续切片,将组织贴附载玻片后 37 ℃ 温箱干燥。采用二甲苯及乙醇脱蜡,HE 染色,乙醇及二甲苯

脱水,中性塑胶及盖玻片封片。完全晾干后观察并拍片。

1.3.3 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 的基因检测 取 40 mg 骨骼肌组织,充分研磨后置入 EP 管,使用 1 mL TRIzol Reagent;4 ℃ 环境下 13 400×g 离心 15 min 后取上清液,室温孵育 5 min,氯仿混匀振荡 15 s,室温孵育 3 min,离心后取上清液至 EP 管;加入异丙醇振荡混匀后室温孵育 10 min,离心取沉淀;使用 75%

乙醇(DEPC 配置)涡旋混匀,洗涤离心 2 次,晾干沉淀后加入 DEPC 溶解;测定样品总 RNA 浓度并行完整性检测;将 RNA 反转录为 cDNA,并作为模板扩增。PCR 扩增反应条件:预变性 94 ℃ 30 s,单次循环;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 次循环。采用 Roche LightCycle® 480 Real-Time PCR System 自动分析目的基因及内参的 Ct 值并重复 3 次后获取数据,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达水平。引物见表 1。

表 1 各基因 PCR 引物

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
FIS1	TGTCCAAGAGCACGCAATTTG	CCTCGCACATACTTTAGAGCCTT
DRP1	TCTGTTTTTCAGAGCAGCGGA	GCATACTACTTCTCACAGGACTTCT
Mfn1	ATTGGGGAGGTGCTGTCTC	TTCGGTCATAAGGTAGGCTTT
Mfn2	AGAACTGGACCCGGTTACCA	CACCTTCGCTGATACCCCTGA
β-actin	GACGGCCAGGTCATCACTATTG	CCACAGGATTCCATACCCAAGA

1.3.4 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 蛋白含量检测 4 ℃ 环境下预冷 PBS 并加入 EP 管,取骨骼肌组织 20 mg,剪碎并液氮研磨后置入 EP 管称重,1∶10 加入蛋白裂解液,冰上匀浆破碎。4 ℃ 环境下 12 000 r/min 离心 15 min 后提取上清液,重复 2 次;一抗抗体稀释倍数均为 1∶1 000,二抗稀释倍数是 1∶5 000;采用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度,调整浓度后加入 Loading buffer,样品在沸水中煮 3~5 min,使蛋白质变性,并于低温冰箱保存;配置分离胶及浓缩胶后将电泳板置入电泳槽,蛋白样品及 Marker 上样(Marker 上样量均为 4.0 μL,空白对照组蛋白上样量 5.3 μL,缺血复供组蛋白上样量 6.3 μL,低剂量黄芩苷干预组蛋白上样量为 5.8 μL,中剂量黄芩苷干预组蛋白上样量 6.1 μL,高剂量黄芩苷干预组蛋白上样量 5.6 μL),80、120 V 两步电泳;PVDF 转膜、TBST 洗膜 3 次后置于孵育盒中,分别加入 2 mL TBST 稀释的各目的蛋白、内参一抗,4 ℃ 孵育过夜;复温并 TBST 洗膜 5 min,重复 3 次后加入二抗上摇床,室温孵育 2 h,再次 TBST 洗膜 5 min,重复 3 次后进行化学发光检测,检测目的蛋白的相对表达量。

1.3.5 下肢肌肉组织 GSH、SOD、MDA 的检测 取材步骤和要求同蛋白检测过程,生理盐水清洗组织后尽量剪碎,再用 Tris-HCl 缓冲液对肌肉碎块研磨并匀浆化,4 ℃ 环境下 15 000 r/min 离心,连续进行 3 次,每次 15 s。然后取上清液按各试剂盒使用方法测定 GSH、SOD、MDA 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计学处理。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

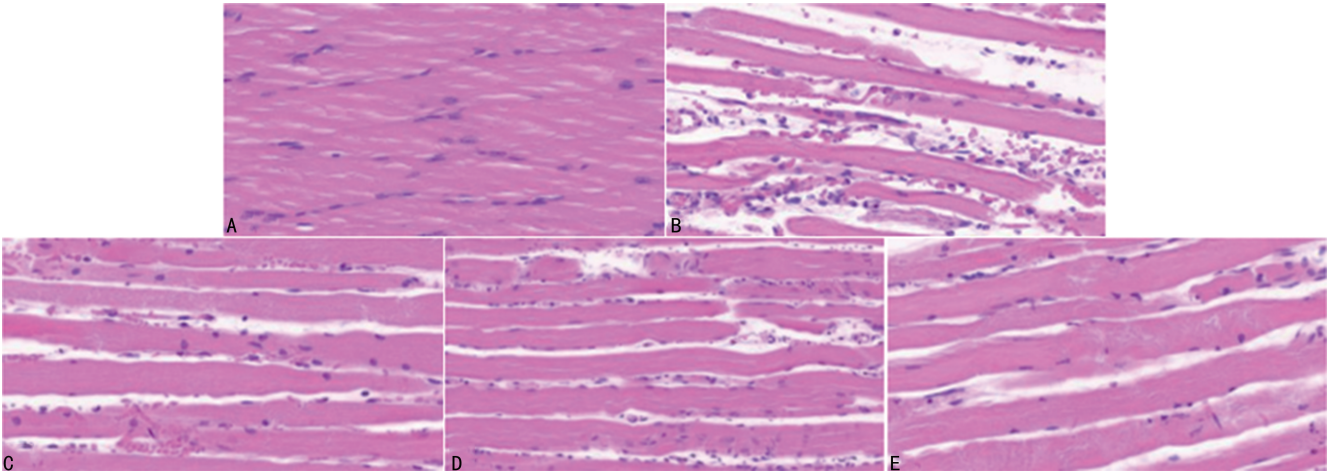
2.1 黄芩苷对小鼠骨骼肌 IRI 影响的病理学表现 所有进行下肢缺血再灌注干预的小鼠骨骼肌组织均出现了不同程度的炎症浸润和细胞肿胀,甚至部分细胞发生破裂,在大体结构上出现排列的不规则和界限紊乱;给予不同剂量黄芩苷干预后,在中、高剂量黄芩苷干预组即可见细胞损伤程度减轻,而空白对照组小鼠骨骼肌细胞排列整齐有序,细胞结构呈现多边形结构,无肿胀、破裂,细胞质、细胞核结构正常,未发现明显炎症浸润(所有图片均使用 CaseViewer 2.4 进行阅片并同比率截图)。见图 1。

2.2 各组 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 基因表达比较 与空白对照组比较,其他各组 FIS1、DRP1 基因表达在缺血复供干预后均明显升高(*P*<0.05),Mfn1、Mfn2 基因表达均明显下降(*P*<0.05)。与缺血复供组比较,高剂量黄芩苷干预组 DRP1 基因表达明显下降(*P*<0.05),低、中剂量黄芩苷干预组的 DRP1 基因表达虽下降但差异无统计学意义(*P*>0.05),不同剂量黄芩苷干预组的 FIS1 基因表达差异无统计学意义(*P*>0.05),不同剂量黄芩苷干预组的 Mfn1、Mfn2 基因表达仅出现少量升高但差异均无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

2.3 各组 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 蛋白变化情况 与空白对照组比较,其他各组 FIS1、DRP1 蛋白表达均明显升高(*P*<0.05),Mfn1、Mfn2 蛋白表达均明显下降(*P*<0.05)。与缺血复供组比较,不同剂量黄芩苷干预组的 FIS1 蛋白表达仅出现少量下降但差异无统计学意义(*P*>0.05),中、高剂量黄芩苷干预组的 DRP1 蛋白表达均明显下降(*P*<0.05),不同剂量黄芩苷干预组的 Mfn1、Mfn2 蛋白表达仅出现少量升高但差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 3、图 2。

2.4 各组氧化应激指标水平比较 与空白对照组比较,其他各组 GSH、SOD 水平明显降低($P<0.05$),而 MDA 水平明显上升($P<0.05$)。与缺血复供组比较,高剂量黄芩苷干预组 GSH、SOD 水平均明显升高

($P<0.05$),高剂量黄芩苷干预组 MDA 水平明显下降($P<0.05$),低、中剂量黄芩苷干预组 GSH、SOD、MDA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。



注:A 为空白对照组;B 为缺血复供组;C 为低剂量黄芩苷干预组;D 为中剂量黄芩苷干预组;E 为高剂量黄芩苷干预组。

图 1 各组小鼠骨骼肌组织形态变化(HE 染色,100×)

表 2 各组 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 基因表达比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

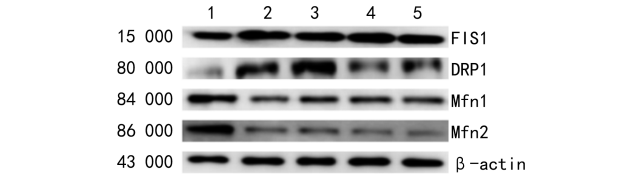
组别	FIS1 基因	DRP1 基因	Mfn1 基因	Mfn2 基因
空白对照组	1.00±0.13	1.00±0.06	0.99±0.04	1.01±0.07
缺血复供组	1.59±0.22 ^a	1.48±0.25 ^a	0.58±0.07 ^a	0.52±0.03 ^a
低剂量黄芩苷干预组	1.53±0.36 ^a	1.41±0.31 ^a	0.60±0.08 ^a	0.53±0.05 ^a
中剂量黄芩苷干预组	1.55±0.13 ^a	1.35±0.21 ^a	0.60±0.07 ^a	0.54±0.04 ^a
高剂量黄芩苷干预组	1.55±0.07 ^a	1.24±0.17 ^{ab}	0.67±0.03 ^a	0.59±0.02 ^a
F	23.29	13.17	11.71	12.36
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与缺血复供组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 各组 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 蛋白表达比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	FIS1 蛋白	DRP1 蛋白	Mfn1 蛋白	Mfn2 蛋白
空白对照组	1.00±0.13	0.99±0.06	1.00±0.11	0.99±0.05
缺血复供组	1.69±0.31 ^a	1.87±0.33 ^a	0.41±0.11 ^a	0.39±0.03 ^a
低剂量黄芩苷干预组	1.68±0.35 ^a	1.74±0.40 ^a	0.43±0.37 ^a	0.41±0.39 ^a
中剂量黄芩苷干预组	1.66±0.24 ^a	1.48±0.19 ^{ab}	0.44±0.08 ^a	0.42±0.02 ^a
高剂量黄芩苷干预组	1.65±0.29 ^a	1.46±0.36 ^{ab}	0.48±0.27 ^a	0.39±0.37 ^a
F	23.28	41.81	23.82	26.84
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与缺血复供组比较,^b $P<0.05$ 。



注:1 为空白对照组;2 为缺血复供组;3 为低剂量黄芩苷干预组;4 为中剂量黄芩苷干预组;5 为高剂量黄芩苷干预组。

图 2 各组 FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 蛋白条带

表 4 各组骨骼肌氧化应激指标水平比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/mg)	MDA (pmol/mg)
空白对照组	1.77±0.14	31.17±2.26	0.65±0.24
缺血复供组	0.91±0.13 ^a	19.24±1.51 ^a	1.42±0.12 ^a
低剂量黄芩苷干预组	0.94±0.25 ^a	20.63±2.07 ^a	1.34±0.31 ^a

续表 4 各组骨骼肌氧化应激指标水平比较($n=6, \bar{x} \pm s$)			
组别	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	SOD (U/mg)	MDA (pmol/mg)
中剂量黄芩苷干预组	1.05 $\pm$ 0.31 ^a	22.95 $\pm$ 1.67 ^a	1.06 $\pm$ 0.11 ^a
高剂量黄芩苷干预组	1.38 $\pm$ 0.19 ^{ab}	25.67 $\pm$ 1.60 ^{ab}	0.85 $\pm$ 0.06 ^{ab}
F	39.83	66.97	31.51
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与缺血复供组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

全世界每年有数百万人面临地震、洪水、山体滑坡等自然灾害,或恐怖袭击、交通事故、战争等人为伤害,而四肢损伤发生的比例最大,且大多出现在下肢^[10],此时,止血带的使用能迅速、可靠地起到止血作用,挽救伤员生命。但长时间使用止血带并持续保肢和延迟截肢均会增加 IRI 的风险,导致局部和全身并发症的风险增加,从而引起器官衰竭,甚至死亡^[11]。

黄芩苷(7-葡萄糖醛酸-5,6-二羟基黄酮)是从黄芩根中分离得到的亲脂性类黄酮苷,具有较强的抗氧化作用,包括下调 MDA 水平,增强 GSH 和 SOD 活性,抑制氧葡萄糖剥夺/再灌注诱导的过量 ROS 生成等^[12]。相关的动物和细胞实验均证明了黄芩苷可显著抑制心、脑血管系统和泌尿系统的 IRI^[7]。其保护作用涉及多种机制^[13]。近年来,出现了少量关于黄芩苷调控细胞线粒体动力学平衡的报道,提示黄芩苷的抗 IRI 作用与调控线粒体动力学平衡有关^[7]。这些报道的结果具有一致性,即黄芩苷可弱化线粒体的裂变趋势,维持或上调线粒体的融合趋势^[14]。本研究团队曾用甘油注射的方式对大鼠进行横纹肌溶解的模型构建,并发现肌肉的破坏性改变可对器官造成严重损伤,而黄芩苷可抑制损伤的进展^[15]。本实验模拟实际环境建模,使用止血带将小鼠双侧下肢血供阻断 2 h,并恢复血供 4 h 后获取组织发现,缺血再灌注干预的小鼠骨骼肌组织均出现了不同程度的炎症浸润和细胞结构紊乱及损伤,甚至发生了细胞破裂,与前人的实验结果吻合。这从宏观上支撑了止血带可造成骨骼肌 IRI 的研究基础。在继续实验过程中发现,当给予模型小鼠不同剂量的黄芩苷溶液腹腔注射后,中、高剂量的黄芩苷干预可显著抑制缺血再灌注造成的骨骼肌损伤,并显著减轻氧化应激反应,印证了黄芩苷可缓解止血带造成的小鼠骨骼肌 IRI 的结论。

线粒体不仅仅提供了细胞的动力来源,在维持细胞稳态和死亡中起着至关重要的作用^[16],线粒体的功能依赖融合和裂变这两个相反过程的蛋白调节^[17]。在细胞损伤过程中,线粒体发生了显著的碎片化趋势,其中 Mfn1、Mfn2 调控线粒体的融合,而 DRP1、FIS1 则对线粒体裂变进行正向调节^[18]。黄芩苷能平衡线粒体动力学,抑制线粒体的分裂,促进其融

合^[6-7],但相关文献报道较少。继续深入本实验发现,下肢骨骼肌的 IRI 可导致 FIS1、DRP1 的表达显著升高,而 Mfn1、Mfn2 的表达显著下降,说明 IRI 导致了骨骼肌细胞线粒体的分裂增加,融合减少。在基因层面,高剂量的黄芩苷可使 DRP1 基因表达明显下降,Mfn1、Mfn2 基因表达出现少量升高但差异均无统计学意义($P>0.05$)。在蛋白层面,中、高剂量的黄芩苷可使 DRP1 蛋白表达明显下降。此时,Mfn1、Mfn2、FIS1 蛋白表达也未出现明显变化,说明黄芩苷对小鼠骨骼肌 IRI 的抑制作用可能主要是通过下调 DRP1 来实现。

活性氧的产生主要来自线粒体。在电子传递过程中产生的超氧阴离子自由基释放到线粒体基质中,迅速转化为过氧化氢,从而引起氧化损伤。线粒体与氧化应激之间的关系密切,氧化应激显著影响线粒体动力学平衡^[19]。黄芩苷能通过降低 MDA 水平,升高 SOD 和 GSH 水平来降低细胞的氧化应激损伤^[20]。因此,本实验检测相关氧化应激指标发现,小鼠骨骼肌在缺血复供后,GSH、SOD 水平降低,而 MDA 水平明显上升。给予黄芩苷干预后,氧化应激指标在高剂量黄芩苷干预组出现明显变化。这一方面可能体现了黄芩苷直接的抗氧化应激作用,另一方面,不排除黄芩苷调控线粒体动力稳定性后,线粒体发挥调控过氧化物作用^[21-22]。

综上所述,使用止血带造成小鼠下肢骨骼肌 IRI 后,黄芩苷的干预可显著抑制损伤的发展,不仅在病理上体现为减缓骨骼肌细胞损伤,还在线粒体动力学上体现了抑制 DRP1 蛋白的表达,从而减小线粒体的分裂趋势;在氧化应激层面,黄芩苷干预后,GSH、SOD 水平升高,MDA 水平下降。从 3 个方面印证了黄芩苷抑制骨骼肌 IRI 的有效性。但是本实验尚存在不足,实验结果仅提示了黄芩苷抑制 DRP1 蛋白表达后减缓线粒体分裂,缺乏形态学的证据支持,应进行电镜检查,得到直观和细致的资料。并且,动物模型的缺血时间、再灌注时间、药物干预时间的合理性尚待优化。下一步将继续深入研究,细化实验流程和研究内容,深入探讨黄芩苷的临床价值以及其调控线粒体动力、氧化应激的具体机制。

参考文献

[1] ZURLO F, LARSON K, BOGARDUS C, et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure[J]. J Clin Invest, 1990, 86(5): 1423-1427.

[2] ROMANELLO V, SANDRI M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance[J]. Front Physiol, 2015, 6: 422.

[3] CHEN T H, KOH K Y, LIN K M C, et al. Mitochondrial dysfunction as an underlying cause of skeletal muscle disorders[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 12926.

[4] ZHAO T T, TANG H L, XIE L, et al. Scutellaria baicalensis Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71(9): 1353-1369.

[5] FU Q, GAO L, FU X, et al. Scutellaria baicalensis inhibits coxsackievirus B3-induced myocarditis via AKT and p38 Pathways[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1230-1239.

[6] HE J, HE J. Baicalin mitigated IL-1 β -Induced osteoarthritis chondrocytes damage through activating mitophagy[J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101(6): 1322-1334.

[7] SUNG Y Y, SON E, IM G, et al. Herbal combination of phyllostachys pubescens and scutellaria baicalensis inhibits adipogenesis and promotes browning via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes[J]. Plants Basel, 2020, 9(11): 1422.

[8] JIA X J, SHAO W, TIAN S Q. Berberine alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory response and oxidative stress: the key function of miR-26b-5p-mediated PTGS2/MAPK signal transduction[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 652-663.

[9] CREAGER M A, KAUFMAN J A, CONTE M S. Clinical practice. Acute limb ischemia[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2198-2206.

[10] RANKIN I A, NGUYEN T T, CARPANEN D, et al. Restricting lower limb flail is key to preventing fatal pelvic blast injury[J]. Ann Biomed Eng, 2019, 47(11): 2232-2240.

[11] WALTERS T J, MABRY R L. Issues related to the use of tourniquets on the battlefield[J]. Mil Med, 2005, 170(9): 770-775.

[12] SABATE-FERRIS A, PFISTER G, BODDAERT G, et al. Prolonged tactical tourniquet application for extremity combat injuries during war against terrorism in the Sahelian strip[J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2022, 48(5): 3847-3854.

[13] WANG G, LIANG J X, GAO L R, et al. Baicalin administration attenuates hyperglycemia-induced malformation of cardiovascular system[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 234.

[14] LUAN Y, SUN C, WANG J, et al. Baicalin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt/NF- κ B pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 3212-3219.

[15] LEURCHARUSMEE P, SAWADDIRUK P, PUNJAS-AWADWONG Y, et al. Ischemic preconditioning upregulates mitofusin2 and preserves muscle strength in tourniquet-induced ischemia/reperfusion[J]. J Orthop Translat, 2022, 35: 113-121.

[16] 李祖攀, 谷江, 张永春, 等. 黄芩苷对大鼠横纹肌溶解综合征导致急性肾损伤的保护作用及机制研究[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(17): 2465-2468.

[17] WALSH S A, DAVIS T A. Key early proinflammatory signaling molecules encapsulated within circulating exosomes following traumatic injury[J]. J Inflamm (Lond), 2022, 19(1): 6.

[18] ZHAN M, BROOKS C, LIU F Y, et al. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology[J]. Kidney Int, 2013, 83(4): 568-581.

[19] TILOKANI L, NAGASHIMA S, PAUPE V, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms[J]. Essays Biochem, 2018, 62(3): 341-360.

[20] YI X L, GUO W N, SHI Q, et al. SIRT3-Dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo[J]. Theranostics, 2019, 9(6): 1614-1633.

[21] ZHAO H, LI C D, LI L N, et al. Baicalin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and fibroblast proliferation in rats via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(6): 2321-2334.

[22] ZHOU H, TOAN S. Pathological roles of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dynamics in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury[J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 85.

(收稿日期: 2024-01-25 修回日期: 2024-07-30)

(上接第 2834 页)

[13] 康丽, 唐云丽, 雷超兰. 转移因子口服液联合阿奇霉素序贯疗法治疗肺炎支原体肺炎患儿及对肺泡灌洗液 MPO、GM-CSF 的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(11): 1174-1178.

[14] 李点, 郑正, 江叶舟. 血清 GM-CSF、sTREM-1 联合 T-SPOT. TB 鉴别诊断肺结核的价值[J]. 检验医学, 2021, 36(8): 833-836.

[15] 王新刚, 王广河, 任青松. 创伤后急性呼吸窘迫综合征患者 IL-33、Ang-2、GM-CSF 水平的动态变化及其临床意义[J]. 福建医科大学学报, 2022, 56(2): 126-131.

[16] ANDERSSON U, YANG H, HARRIS H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(3): 263-277.

[17] XUE J M, SUAREZ J S, MINAAI M, et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5): 3406-3419.

[18] 邹蓉. 肺炎支原体肺炎患儿血清 IL-1R1、HMGB1、炎症细胞因子水平及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(12): 7-11.

[19] EVRAN S, CALIS F, AKKAYA E, et al. The effect of high mobility group box-1 protein on cerebral edema, blood-brain barrier, oxidative stress and apoptosis in an experimental traumatic brain injury model[J]. Brain Res Bull, 2020, 154: 68-80.

(收稿日期: 2024-02-18 修回日期: 2024-07-19)