

本文引用: 杨婷, 赖琦, 杨军, 等. 线粒体 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 对心肌梗死大鼠心肌纤维化的影响及其与线粒体动力学的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(6): 473-480. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.06.003.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-06-0473-08

· 线粒体与心血管疾病专栏 ·

## 线粒体 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 对心肌梗死大鼠心肌纤维化的影响及其与线粒体动力学的关系

杨婷<sup>1,2</sup>, 赖琦<sup>1,2</sup>, 杨军<sup>3</sup>, 褚春<sup>1,2</sup>

1. 南华大学药学院, 湖南省衡阳市 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属第二医院药剂科, 湖南省衡阳市 421001;  
3. 南华大学衡阳医学院附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001

**[摘要]** [目的] 已有研究表明 H<sub>2</sub>S 可拮抗心肌纤维化, 但线粒体靶向性 H<sub>2</sub>S 能否拮抗心肌梗死后心肌纤维化, 且是否与调控线粒体融合与分裂有关目前并不明确。为了探究这一关系, 进行了该研究。[方法] 在动物实验中予以异丙肾上腺素 [ISO, 50 mg/(kg·d)] 腹腔注射构建 SD 大鼠心肌梗死模型, 对各组大鼠行心电图检测, 使用线粒体 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 [36 μg/(kg·d)], 腹腔注射连续处理 SD 大鼠 4 周, 使用 Masson 染色检测心肌纤维化情况, 使用 Western blot 检测相关蛋白表达情况。体外实验以氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>, 800 μmol/L) 诱导 H9c2 心肌细胞缺氧损伤, AP39 (100 nmol/L) 处理 H9c2 细胞, 使用 DL-映丙基甘氨酸 (PAG, 2 mmol/L) 抑制内源性硫化氢合成酶胱硫醚-γ-裂解酶 (CSE), 并通过荧光探针检测心肌细胞活性氧 (ROS) 的水平。[结果] 梗死大鼠心肌存在明显间质纤维化, 胶原纤维大量堆积, 且 CSE、线粒体融合蛋白 2 (MFN2) 表达下调, 线粒体动力相关蛋白 1 (DRP1) 表达增加, AP39 干预后则可明显改善以上变化, 而加入 CSE 抑制剂 PAG 则可逆转 AP39 的以上作用。同时在体外实验中发现, 以 CoCl<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞缺氧损伤时, 细胞内 ROS 水平升高, MFN2 表达下调, DRP1 表达增加, AP39 则可上调 MFN2 蛋白表达, 抑制 DRP1 表达, 降低心肌细胞 ROS 水平, 而 PAG 则可逆转以上变化。[结论] 线粒体靶向性 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 可以改善心肌梗死大鼠心肌纤维化, 且可促进线粒体融合, 抑制线粒体过度分裂。

**[关键词]** H<sub>2</sub>S; AP39; 线粒体融合; 线粒体分裂; 心肌梗死; 心肌纤维化

**[中图分类号]** R966; R5

**[文献标识码]** A

### Effect of the mitochondrial H<sub>2</sub>S donor AP39 on myocardial fibrosis in rats with myocardial infarction and its relationship to mitochondrial dynamics

YANG Ting<sup>1,2</sup>, LAI Qi<sup>1,2</sup>, YANG Jun<sup>3</sup>, CHU Chun<sup>1,2</sup>

1. School of Pharmaceutical Science, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China; 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China

**[ABSTRACT]** **Aim** Previous studies have indicated that H<sub>2</sub>S can attenuate myocardial fibrosis. However, it is unclear whether mitochondria-targeted H<sub>2</sub>S can attenuate myocardial fibrosis after myocardial infarction and whether its mechanism is associated with the regulation of mitochondrial fusion and fission. To investigate this relationship, this study was conducted. **Methods** Isoproterenol (ISO, 50 mg/(kg·d)) was injected intraperitoneally to induce myocardial infarction in SD rats. Electrocardiograms were performed on each group of rats, and the rats were treated with AP39 (36 μg/(kg·d), intraperitoneal) for 4 weeks. Masson's staining was used to assess the extent of myocardial fibrosis. Western blot was used to measure the expression of relevant proteins. *In vitro* experiments were performed to induce hypoxic injury in H9c2 cardiomyocytes with CoCl<sub>2</sub> (800 μmol/L), H9c2 cells were treated with AP39 (100 nmol/L), and the

[收稿日期] 2023-08-29

[修回日期] 2024-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074236); 湖南省卫健委临床重大专项项目(20201913); 湖南省自然科学基金委员会科卫联合项目(2021JJ70035)

[作者简介] 杨婷, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, E-mail: 20212012210961@stu.usc.edu.cn. 通信作者褚春, 主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理及心脏重构等, E-mail: 1996020012@usc.edu.cn.

endogenous hydrogen sulfide synthase cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE) was inhibited using DL-propargylglycine (PAG, 2 mmol/L), and fluorescence probe was used to measure the level of reactive oxygen species (ROS) in myocardial cells.

**Results** Myocardial fibrosis was evident in infarcted rat hearts, with a significant accumulation of collagen fibers. Additionally, the expression of CSE and mitofusin 2 (MFN2) proteins was downregulated, while dynamin-related protein 1 (DRP1) protein expression was increased. Intervention with AP39 significantly improved the above changes, and the addition of CSE inhibitor PAG reversed the effects of AP39. In *in vitro* experiments, when H9c2 myocardial cells were subjected to hypoxic injury induced by  $\text{CoCl}_2$ , intracellular ROS levels increased, MFN2 expression was downregulated, and DRP1 expression was upregulated. AP39 upregulated MFN2 protein expression, inhibited DRP1 protein expression, and reduced ROS levels in myocardial cells. The addition of PAG reversed these changes. **Conclusion** The mitochondria-targeted  $\text{H}_2\text{S}$  donor, AP39, can improve myocardial fibrosis in rats with myocardial infarction and promote mitochondrial fusion and inhibit excessive mitochondrial division.

[**KEY WORDS**] hydrogen sulfide; AP39; mitochondrial fusion; mitochondrial division; myocardial infarction; myocardial fibrosis

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是冠状动脉急性持续性缺血缺氧所诱发的心肌坏死。心肌纤维化 (myocardial fibrosis, MF) 是缺血缺氧等损伤后心肌代偿性过度修复反应, 可导致心肌中胶原纤维的过度沉积和胶原排列紊乱<sup>[1]</sup>。抑制心肌纤维化有助于维持心脏功能和预防心力衰竭, 故防治心肌纤维化是改善梗死后心肌重构的基本策略之一。

线粒体自稳态受线粒体自噬和线粒体动力学调节, 线粒体通过分裂和融合的平衡形成线粒体网络 (即线粒体动力学)<sup>[2]</sup>。在心肌梗死大鼠心肌组织中, 线粒体自稳态失衡, 会引起细胞氧化产物增多, 最终导致细胞死亡<sup>[3]</sup>, 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平急速增加, 导致线粒体及细胞损伤进一步加重, 最终导致心肌细胞减少及心肌纤维化<sup>[4]</sup>。线粒体动力学失衡会导致线粒体结构改变和功能障碍<sup>[5]</sup>。作为线粒体裂变的关键调控因子, 线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1) 可以 GTP 依赖的方式将线粒体一分为二<sup>[6]</sup>。也有研究发现缺血会诱导线粒体分裂, 而抑制 DRP1 可有效防治心肌细胞缺血再灌注损伤<sup>[7-8]</sup>。相反, 线粒体融合可以拮抗过度的线粒体分裂诱发的细胞损伤, 同时有学者发现褪黑素能通过 Notch1/Mfn2 拮抗心肌梗死后负性重塑<sup>[9]</sup>。故改善细胞线粒体动力学可能是拮抗心肌重构的重要策略之一。

硫化氢 (hydrogen sulfide,  $\text{H}_2\text{S}$ ) 作为一种内源性气体信号分子, 参与多种心血管系统疾病的病理生理过程<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究发现,  $\text{H}_2\text{S}$  可改善甲亢<sup>[11]</sup>及糖尿病<sup>[12]</sup>大鼠心肌纤维化, 但  $\text{H}_2\text{S}$  改善心肌梗死大鼠纤维化的作用及内在调控机制目前仍不是十分清楚。近年来有研究发现  $\text{H}_2\text{S}$  在线粒体

中发挥多种保护作用, 包括线粒体呼吸、生物发生和 ATP 合成, 同时抑制细胞凋亡和促进细胞存活等<sup>[13]</sup>。AP39 是一种线粒体靶向性的  $\text{H}_2\text{S}$  供体, 可在线粒体内靶向释放  $\text{H}_2\text{S}$  并发挥线粒体保护作用<sup>[14]</sup>。有研究发现, AP39 通过拮抗氧化应激来发挥细胞保护作用并拮抗缺血再灌注损伤<sup>[15-16]</sup>。但是 AP39 能否改善心肌梗死后心肌纤维化且其与线粒体动力学的关系目前并不清楚。为了探究  $\text{H}_2\text{S}$  对心肌梗死后线粒体的保护作用及可能机制, 本研究拟建立急性心肌梗死大鼠模型, 予以 AP39 干预, 来探讨重建线粒体内  $\text{H}_2\text{S}$  稳态能否改善心肌梗死后心肌纤维化, 是否与促进线粒体融合、抑制线粒体分裂有关, 本研究有望为防治心肌梗死后心肌纤维化及心肌重构提供新的干预靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、主要试剂和仪器

50 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004], 体质量 ( $240 \pm 20$ ) g, 饲养于南华大学实验动物中心, 所有动物实验操作及规程遵守南华大学实验动物管理规定和相关实验动物法规。异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 购自大连美仑生物有限公司, AP39 (HY-126124) 购自美国 MCE 公司, 氯化钴 (cobalt chloride,  $\text{CoCl}_2$ ) 和内源性硫化氢合成酶胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶 (cystathionine- $\gamma$ -lyase, CSE) 抑制剂 DL-炔丙基甘氨酸 (dl-propargylglycine, PAG) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。Ⅲ型胶原 (collagen type III, Col III)、 $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、线粒体 DRP1、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2) 和 GAPDH 一抗及兔

源二抗均购自武汉 Proteintech 公司。Masson 染色试剂盒购自湖南艾碧维生物科技有限公司,细胞裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司。小型电泳仪、转膜仪和 BIO-RAD XRS+凝胶成像系统购自美国伯乐生命医学产品公司。

## 1.2 细胞培养及处理

H9c2 心肌细胞购自美国 ATCC,使用添加了 10% 胎牛血清的 DMEM(C11995500BT, Gibco, USA) 培养基放置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 无菌培养箱培养。分组设置如下:①对照组: H9c2 心肌细胞在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 无菌培养箱培养 48 h。②CoCl<sub>2</sub> 组:使用 CoCl<sub>2</sub> 诱导化学缺氧<sup>[17]</sup>, CoCl<sub>2</sub> (800 μmol/L) 加入培养基中,24 h 结束后, PBS 清洗 3 次, 更换为含 CoCl<sub>2</sub> 的新鲜培养基继续培养 24 h。③CoCl<sub>2</sub> + AP39 组: CoCl<sub>2</sub> (800 μmol/L) 加入培养基中,24 h 结束后, PBS 清洗 3 次, 更换为含有 AP39 (100 nmol/L, 溶于 DMSO) 及 CoCl<sub>2</sub> 的培养基继续培养 24 h。④CoCl<sub>2</sub> + AP39 + PAG 组: CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 后, PBS 清洗, PAG (2 mmol/L) 加入培养基中预处理 30 min 后加入含 PAG、AP39 及 CoCl<sub>2</sub> 的培养基培养 24 h。⑤AP39 组: 加入含 AP39 的培养基培养 48 h。⑥DMSO 组: 培养基中加入 DMSO (2 μL/孔), 培养 48 h。

## 1.3 心肌梗死大鼠模型构建及药物干预

50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组、ISO 组、ISO+AP39 组、ISO+AP39+PAG 组和 AP39 组。适应性喂养 1 周后, ISO 组、ISO+AP39 组和 ISO+AP39+PAG 组大鼠采用 50 mg/(kg·d) ISO 连续 2 天腹腔注射构建心肌梗死大鼠模型<sup>[18-19]</sup>, 对照组和 AP39 组连续 2 天腹腔注射等量生理盐水, 各组大鼠在第一次注射 ISO 或生理盐水前及最后一次注射后 24 h 行心电图检查 (VECG-2303B, 3ray, 广州, 中国), 心电图仪的速度 50 mm/s, 记录并分析心电图。ISO+AP39 组、ISO+AP39+PAG 组和 AP39 组均腹腔注射 AP39 [36 μg/(kg·d)]。ISO+AP39+PAG 组额外腹腔注射 CSE 抑制剂 PAG [40 mg/(kg·d), Sigma-Aldrich, USA]。腹腔注射连续 4 周。

## 1.4 心电图检查

各组大鼠在第 2 次注射 ISO 或生理盐水后行心电图检查。麻醉后 15 min, SD 大鼠仰卧位放在木板上, 红色电极绑到右上肢的爪垫, 黄色电极绑到左上肢的爪垫, 绿色电极绑到左下肢的爪垫, 黑色电极被绑定到右下肢的爪垫, 心电图仪的速度为 50 mm/s。随后, 记录并分析心电图。

## 1.5 Masson 染色

所有干预流程结束后, 取大鼠心脏, 心肌组织用 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水后石蜡包埋, 切片机制成 4 μm 薄片, 按照 Masson 染色试剂盒 (Abiowell Biotech Co, Ltd, 长沙) 染色说明染色, 密封, 光镜下观察染色情况。并使用 Image J 软件分析, 并计算胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF), 即胶原阳性的蓝色面积占组织总面积的百分比。

## 1.6 ROS 荧光探针

细胞 ROS 检测按照制造商的说明书进行。为了检测细胞内的 ROS, 干预后的细胞在 37 °C 下用 10 μmol/L DCFH-DA (碧云天, S0033S) 孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。然后用激发波长为 488 nm、发射波长为 525 nm 的荧光微板读数仪测定 DCF 荧光强度。并使用 Image J 软件计算 ROS 平均荧光强度。

## 1.7 H<sub>2</sub>S 检测

细胞 H<sub>2</sub>S 含量检测按照检测试剂盒 (格瑞斯生物, G0133W) 的说明书进行。为了检测细胞内的 H<sub>2</sub>S, 药物干预后的细胞使用含 EDTA 的胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 使用 PBS 清洗 2 次, 离心收集细胞并进行细胞计数, 按说明书进行后续操作, 室温 (25 °C) 反应 15 min, 于 665 nm 处读取吸光度值即 A 值。H<sub>2</sub>S (μmol/10<sup>6</sup> 个) = (ΔA + 0.001 4) ÷ 7.657 7 ÷ (V1 ÷ V × 细胞数量) = 0.82 × (ΔA + 0.001 4) ÷ 细胞数量 (V: 加入提取液体积, V1: 反应中样品体积, ΔA = A<sub>测定</sub> - A<sub>空白</sub>)。

## 1.8 Western blot

采用含蛋白酶抑制剂冷 RIPA 裂解液裂解大鼠心肌组织和细胞沉淀物, 离心后收集上清液, 根据厂家说明书使用 BCA 蛋白定量试剂盒对上清液中的蛋白浓度进行定量和调平, 95 °C 加热 10 min 后变性, 用 10% ~ 12% 聚丙烯酰胺电泳凝胶分离。电泳转移到 PVDF 膜 (聚偏氟乙烯膜, Millipore, 美国)。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h, 然后在 4 °C 下进行一抗过夜。用含 Tween 20 的 TBST 洗涤 3 次 (5 min × 3), 并与相应的辣根过氧化物酶偶联二抗在室温下孵育 1 h。TBST 洗涤 (5 min × 3) 后, 用 ECL 化学发光液, 使用 BIO-RAD XRS+ 成像系统采集图像信号, 并使用 Image J 软件分析相关数据。

## 1.9 统计分析

所有数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 GraphPad Prism 9 软件 (San Diego, California) 进行 Student's *t* 检验以评估统计学显著性, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 分析多组间差异。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。



## 2 结果

### 2.1 大鼠心电图表现

连续 2 天腹腔注射 ISO 构建心肌梗死大鼠模型后给各组大鼠行心电图检测,结果显示,对照组和

AP39 组大鼠检测为正常心电图,ISO 组、ISO+AP39 组和 ISO+AP39+PAG 组大鼠心电图 II 导联上的 ST 段上抬,提示 ISO 组、ISO+AP39 组和 ISO+AP39+PAG 组成功建立急性心肌梗死大鼠模型(图 1)。

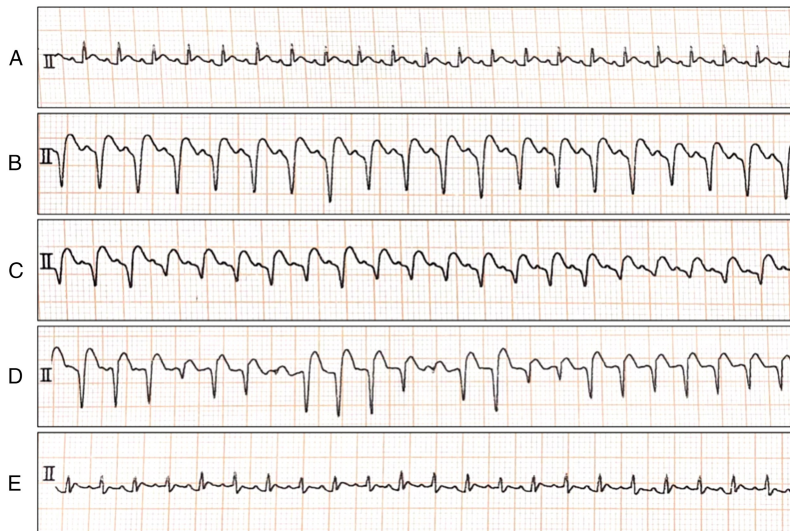


图 1. 各组大鼠心电图

A 为对照组,B 为 ISO 组,C 为 ISO+AP39 组,D 为 ISO+AP39+PAG 组,E 为 AP39 组。

Figure 1. Electrocardiograms of various rat groups

### 2.2 大鼠心肌组织纤维化形态表现和心肌胶原容积分数

对各组大鼠心肌组织进行 Masson 染色,蓝染部分为胶原沉积部位。与对照组相比,ISO 组大鼠心肌纤维排列紊乱,蓝染部分增多将近 10 倍,提示心肌间质中胶原纤维形成增加;与 ISO 组比较,ISO+AP39 组大鼠心肌纤维形态基本正常,纤维排列较

整齐,蓝染部分减少 60%;而使用 PAG 抑制内源性 H<sub>2</sub>S 生成后,AP39 改善心肌纤维化的效应被抵消,与 ISO+AP39 组比较,ISO+AP39+PAG 组大鼠心肌纤维蓝染胶原沉积增加且排列紊乱,而 AP39 组与对照组相比,两组大鼠心肌胶原沉积无明显差别(图 2),各组大鼠胶原容积分数统计见图 2。

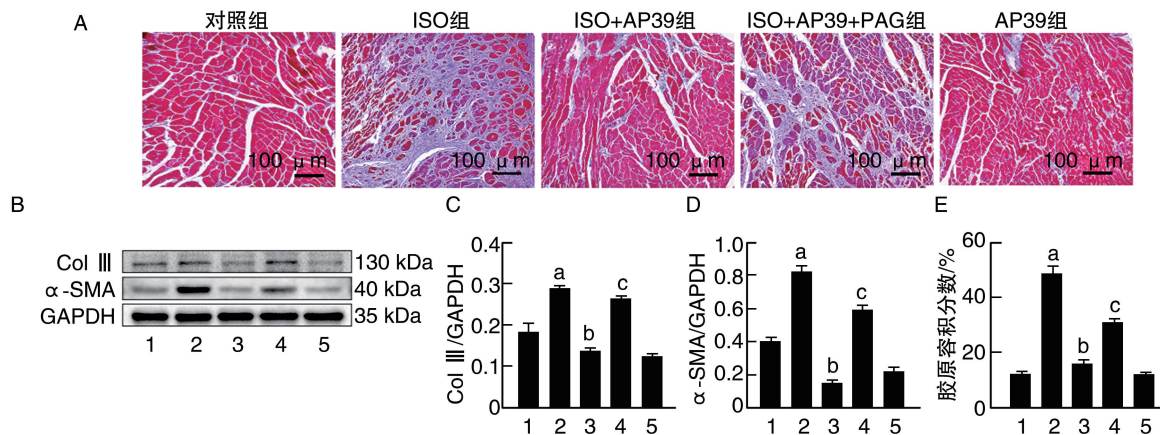


图 2. AP39 可改善心肌梗死大鼠心肌纤维化(n=3)

A 为各组大鼠心肌组织 Masson 染色结果(蓝染部分为胶原纤维);B 为各组大鼠心肌组织中 Col III 和 α-SMA 蛋白表达电泳图;

C 和 D 分别为 Col III 和 α-SMA 蛋白表达量化图;E 为 Masson 染色胶原容积分数。

1 为对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO+AP39 组,4 为 ISO+AP39+PAG 组,5 为 AP39 组。

a 为 P<0.01,与对照组比较;b 为 P<0.01,与 ISO 组比较;c 为 P<0.01,与 ISO+AP39 组比较。

Figure 2. AP39 improves myocardial fibrosis in rats with myocardial infarction(n=3)



### 2.3 大鼠心肌组织中 ColⅢ和 $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平

Western blot 实验检测大鼠心肌组织纤维化相关蛋白 ColⅢ及  $\alpha$ -SMA 的表达水平变化情况,结果显示,与对照组比较,ISO 组 ColⅢ和  $\alpha$ -SMA 的表达均增加 1 倍 ( $P < 0.01$ ),给予 AP39 干预后,纤维化相关蛋白 ColⅢ和  $\alpha$ -SMA 表达则降低 50% ( $P < 0.01$ ),而同时给予内源性  $H_2S$  合成酶抑制剂 PAG 后,ColⅢ蛋白表达增加了 50%, $\alpha$ -SMA 蛋白表达增加了 60% ( $P < 0.01$ ),AP39 组与对照组大鼠心肌组织以上蛋白表达的差异未显示出统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 2)。

### 2.4 大鼠心肌组织中 CSE 的蛋白表达水平

Western blot 检测大鼠心肌组织内源性  $H_2S$  合成酶 CSE 的表达情况,结果显示,与对照组比较,ISO 组 CSE 蛋白表达水平降低 25% ( $P < 0.01$ ),而以 AP39 干预后,CSE 蛋白表达水平增加 15% ( $P < 0.01$ ),内源性  $H_2S$  合成酶抑制剂 PAG 则可逆转 AP39 的这一作用 ( $P < 0.01$ ),而 AP39 组与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 3)。

### 2.5 H9c2 心肌细胞中 $H_2S$ 水平

使用  $H_2S$  含量检测试剂盒检测各组心肌细胞中  $H_2S$  的水平,结果显示  $CoCl_2$  组的  $H_2S$  水平低于

对照组 ( $P < 0.01$ ),使用 AP39 干预后,心肌细胞中  $H_2S$  水平增加 ( $P < 0.01$ ),而  $CoCl_2 + AP39 + PAG$  组的  $H_2S$  水平低于  $CoCl_2 + AP39$  组 ( $P < 0.01$ ),AP39 组与对照组相比  $H_2S$  水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,表 1)。

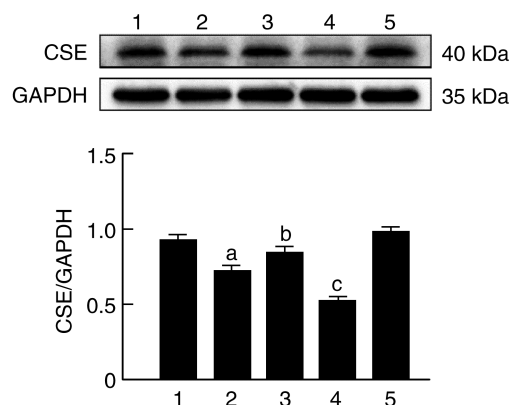


图 3. 各组大鼠心肌组织中 CSE 蛋白表达 ( $n=3$ )

1 为对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO+AP39 组,4 为 ISO+AP39+PAG 组,5 为 AP39 组。

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 ISO 组比较;c 为  $P < 0.01$ ,与 ISO+AP39 组比较。

Figure 3. Expression of CSE protein in rat myocardial tissues of each group ( $n=3$ )

表 1. 各组心肌细胞  $H_2S$  水平 ( $n=3$ )

Table 1.  $H_2S$  levels in myocardial cells of each group ( $n=3$ )

分组	$\Delta A$	细胞数量/ $\times 10^6$ 个	V/mL	V1/mL	$H_2S/(nmol/10^6$ 个)
对照组	0.283 3 $\pm$ 0.006 7	4.890 0	1	0.16	47.7 $\pm$ 1.1
$CoCl_2$ 组	0.215 6 $\pm$ 0.007 1	4.290 0	1	0.16	41.5 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
$CoCl_2 + AP39$ 组	0.276 4 $\pm$ 0.007 2	4.560 0	1	0.16	50.0 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
$CoCl_2 + AP39 + PAG$ 组	0.196 9 $\pm$ 0.003 8	4.080 0	1	0.16	39.9 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
AP39 组	0.274 0 $\pm$ 0.007 1	4.970 0	1	0.16	45.4 $\pm$ 1.2

注:a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 ISO 组比较;c 为  $P < 0.01$ ,与 ISO+AP39 组比较。

### 2.6 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平

使用 ROS 荧光检测试剂盒检测各组心肌细胞中 ROS 的水平,结果显示  $CoCl_2$  组的绿色荧光强度高于对照组,提示 ROS 水平要高于对照组 ( $P < 0.01$ ),给与 AP39 处理后,心肌细胞内的绿色荧光强度减弱,即 ROS 水平降低 ( $P < 0.01$ ),而 PAG 可逆转 AP39 的这一作用 ( $P < 0.01$ ,图 4)。

### 2.7 大鼠心肌组织及 H9c2 心肌细胞中 DRP1 及 MFN2 蛋白表达水平

以 Western blot 检测各组大鼠心肌组织及 H9c2 心肌细胞中线粒体分裂蛋白 DRP1 和线粒体融合相

关蛋白 MFN2 的表达变化,结果显示,与对照组相比,ISO 组大鼠心肌组织中 DRP1 的表达增加 50%,MFN2 的表达降低 50% (均  $P < 0.01$ ),给予 AP39 处理后 MFN2 的表达增加 15%,DRP1 的表达降低 40% (均  $P < 0.01$ ),而给予 PAG 后,MFN2 的表达降低 15%,DRP1 的表达增加 30% ( $P < 0.01$ ),AP39 组与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,图 5),提示 AP39 可以降低心肌梗死大鼠心肌组织中 DRP1 介导的线粒体分裂,促进 MFN2 介导的线粒体融合,此效应会被内源性  $H_2S$  合成酶抑制剂 PAG 逆转,在 H9c2 心肌细胞中得到类似的结果 (图 5)。

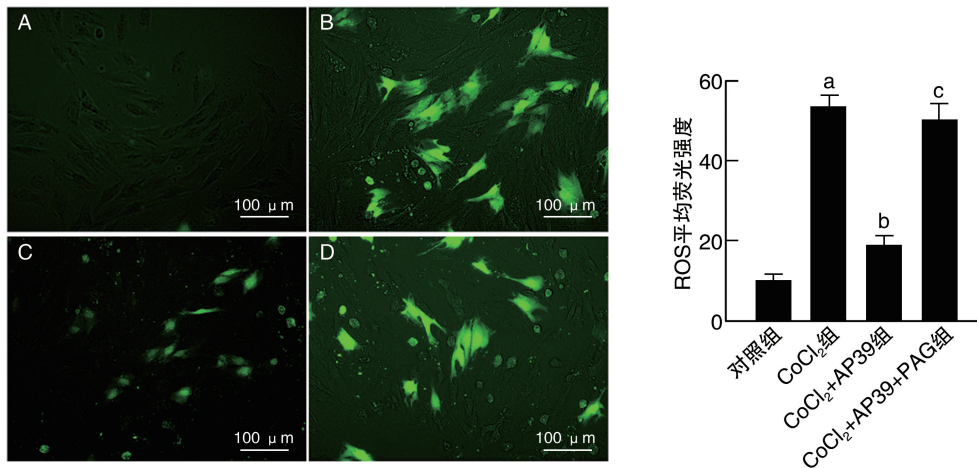


图 4. 各组 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平 (n=3)

A 为对照组, B 为 CoCl<sub>2</sub> 组, C 为 CoCl<sub>2</sub>+AP39 组, D 为 CoCl<sub>2</sub>+AP39+PAG 组。

a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与 CoCl<sub>2</sub> 组比较; c 为 P<0.01, 与 CoCl<sub>2</sub>+AP39 组比较。

Figure 4. ROS levels in H9c2 cardiomyocytes of each group (n=3)

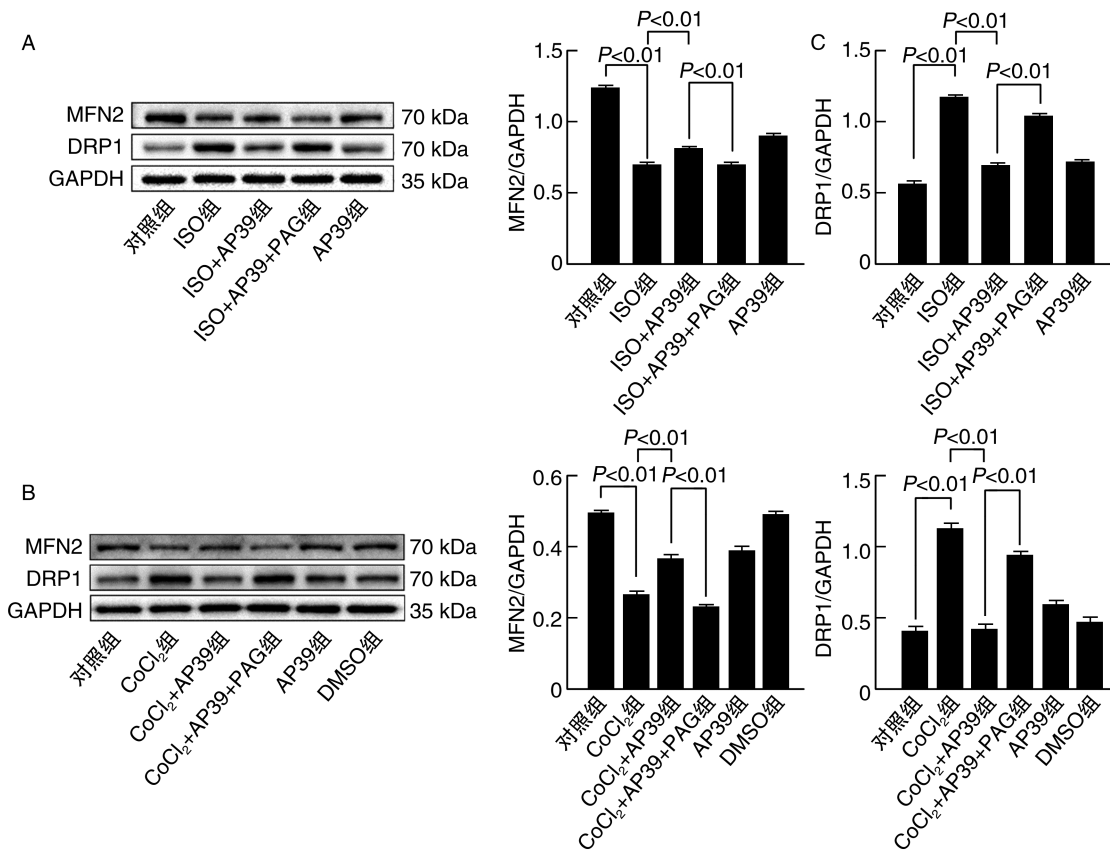


图 5. 各组大鼠心肌组织 (A) 及 H9c2 心肌细胞 (B) 中 DRP1 和 MFN2 蛋白表达 (n=3)

Figure 5. The expression of DRP1 and MFN2 proteins in myocardial tissue (A) and H9c2 cardiomyocytes (B) of rats in each group (n=3)

### 3 讨论

本文通过体内外实验构建心肌梗死模型及心肌细胞缺氧损伤模型并给予线粒体靶向性 H<sub>2</sub>S 供

体 AP39,旨在揭示线粒体靶向性 H<sub>2</sub>S 供体改善心肌梗死后心肌纤维化的作用及内在调控机制。AP39 线粒体靶向释放 H<sub>2</sub>S 的过程是利用线粒体内膜呈高负电性的原理,以亲脂性阳离子三苯基磷

(TPP<sup>+</sup>) 介导的线粒体靶向, AP39 在结构中包含 TPP<sup>+</sup> 结构, 被定向运送至线粒体, 在多种酶的作用下缓慢释放 H<sub>2</sub>S。有研究者总结了外源性 H<sub>2</sub>S 对线粒体功能的影响, 发现 H<sub>2</sub>S 可调节线粒体的能量代谢等<sup>[20]</sup>。本研究发现 AP39 可改善心肌梗死后心肌纤维化, 且其可能与调控线粒体动力学, 即抑制心肌梗死大鼠线粒体分裂及促进线粒体融合有关。本研究将会为防治心肌梗死后心肌纤维化提供新的治疗策略。

而成年哺乳动物心肌细胞再生能力基本为零, 所以大量的心肌细胞死亡或者凋亡会诱发纤维化过度修复, 导致胶原纤维过度沉积, 最终导致坏死心肌组织被过多形成的纤维组织所取代<sup>[21]</sup>。有研究<sup>[22]</sup>显示, 成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA 表达上调和胶原蛋白合成增加是心肌纤维化发生的主要原因。有研究发现外源性 H<sub>2</sub>S 可抑制心肌胶原纤维生成<sup>[23]</sup>, 前期研究也发现 H<sub>2</sub>S 可改善阿霉素诱导的心肌纤维化<sup>[24]</sup>。本研究结果表明, 心肌梗死大鼠心肌组织发生明显的纤维化, 而 AP39 处理则可减少心肌组织中  $\alpha$ -SMA 和 Col III 蛋白表达, 改善异常的心肌组织形态结构, 从而改善心肌梗死大鼠心肌纤维化。提示线粒体靶向 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 可改善心肌梗死大鼠心肌纤维化。

线粒体是细胞能量代谢的主要场所, 线粒体的形态和功能完整对保持细胞功能尤为重要。在心肌缺血缺氧损伤时, 线粒体内 ROS 等代谢产物大量生成, 并可诱发线粒体动力学障碍。线粒体融合和分裂的平衡是保持损伤应激下线粒体稳态的重要途径之一。有研究发现<sup>[25]</sup>, 缓解缺氧诱导的线粒体功能障碍, 降低 ROS 水平可有效改善心肌梗死引起的心功能不全及纤维化。研究表明<sup>[26]</sup>, 线粒体形态和功能的变化可能有助于心脏纤维化和病理重塑过程中的生物能量适应。有研究发现线粒体动力学障碍与心肌纤维化显著相关, 抑制过度线粒体分裂有助于改善梗死后心肌纤维化<sup>[27]</sup>。研究发现促进 MFN2 介导的线粒体融合<sup>[28]</sup>, 减少 DRP1 介导的线粒体分裂<sup>[29]</sup>可以有效保护心肌功能。本研究结果显示, 心肌梗死大鼠心肌组织中线粒体分裂蛋白 DRP1 显著升高, 而融合相关蛋白 MFN2 明显下调, 而 AP39 干预则可促进 MFN2 介导的线粒体融合, 减少 DRP1 介导的线粒体分裂, 在缺氧心肌细胞模型中也有同样的改变。提示 AP39 可促进心肌梗死大鼠心肌组织中线粒体融合, 减少线粒体分裂的发生。

H<sub>2</sub>S 作为机体内重要的气体信号分子之一, 参与抗炎、抗氧化等调控机制。有研究发现, 外源性 H<sub>2</sub>S 可改善高同型半胱氨酸血症骨骼肌间质纤维化及功能<sup>[30]</sup>, 还有研究发现 H<sub>2</sub>S 是线粒体动力学的重要调节因子<sup>[31]</sup>。有研究发现 H<sub>2</sub>S 可通过细胞信号传导通路, 如环磷酸腺苷蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, cAMP-PKA) 途径, 来调节 CSE 的表达<sup>[32]</sup>, 且 H<sub>2</sub>S 能影响机体内 ROS 的生成, 减少氧化应激, 从而可能影响 CSE 的表达。本研究发现在梗死大鼠心肌组织中内源性 H<sub>2</sub>S 生成关键酶 CSE 蛋白表达明显降低, 给予线粒体靶向 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 后, 心肌组织的 CSE 表达水平升高, 同时心肌细胞内 ROS 水平降低, 线粒体融合蛋白增加, 线粒体分裂蛋白表达降低, 抑制内源性 H<sub>2</sub>S 生成酶 CSE 后会减少机体 H<sub>2</sub>S 的总量, 我们的结果也显示抑制 CSE 后, AP39 的改善线粒体动力学效应被减弱。以上结果表明线粒体靶向 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 可通过 MFN2 及 DRP1 介导线粒体融合与分裂, 缓解心肌梗死后心肌细胞的线粒体损伤, 减少 ROS 生成, 这可能是线粒体靶向性 H<sub>2</sub>S 改善心肌梗死后心肌纤维化的重要机制。

综上所述, 本研究发现线粒体靶向 H<sub>2</sub>S 供体 AP39 可通过促进线粒体融合、抑制线粒体分裂来改善缺氧心肌细胞线粒体动力学障碍, 且能改善心肌梗死大鼠心肌纤维化, 而重建线粒体内 H<sub>2</sub>S 稳态可能是拮抗缺氧心肌损伤及梗死后心肌纤维化的新策略。

#### [参考文献]

- [1] 邱羽菲, 史嘉翊, 宋旭东, 等. 心肌纤维化的发生机制及治疗研究进展[J]. 心脏杂志, 2021, 33(5): 553-557.  
QIU Y F, SHI J Y, SONG X D, et al. Research progress in mechanism and treatment of myocardial fibrosis[J]. Chin Heart J, 2021, 33(5): 553-557.
- [2] LI Y Z, LIU X H. Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(8): 5589-5597.
- [3] CASTAÑO C, MIRASIERRA M, VALLEJO M, et al. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FoxO1 in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(48): 30335-30343.
- [4] SHI R Y, ZHU S H, LI V, et al. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(12): 1045-1055.
- [5] JIN J Y, WEI X X, ZHI X L, et al. DRP1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(5): 655-664.



- [6] ONG S B, HAUSENLOY D J. Mitochondrial dynamics as a therapeutic target for treating cardiac diseases[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 240: 251-279.
- [7] ONG S B, SUBRAYAN S, LIM S Y, et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2010, 121(18): 2012-2022.
- [8] LIU J X, YAN W, ZHAO X J, et al. Sirt3 attenuates post-infarction cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission and normalization of AMPK-DRP1 pathways[J]. *Cell Signal*, 2019, 53: 1-13.
- [9] PEI H F, DU J, SONG X F, et al. Melatonin prevents adverse myocardial infarction remodeling via Notch1/Mfn2 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 97: 408-417.
- [10] WEN Y D, WANG H, ZHU Y Z. The drug developments of hydrogen sulfide on cardiovascular disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 4010395.
- [11] LIU M J, LI Z N, LIANG B, et al. Hydrogen sulfide ameliorates rat myocardial fibrosis induced by thyroxine through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Endocr J*, 2018, 65(7): 769-781.
- [12] LI Y L, LIU M J, SONG X, et al. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates diabetic myocardial fibrosis by inhibiting cell aging through SIRT6/AMPK autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1150.
- [13] LI Z, XIA H J, SHARP T E 3, et al. Mitochondrial H<sub>2</sub>S regulates BCAA catabolism in heart failure[J]. *Circ Res*, 2022, 131(3): 222-235.
- [14] SZCZESNY B, MÓDIS K, YANAGI K, et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells *in vitro*[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 41: 120-130.
- [15] WEPLER M, MERZ T, WACHTER U, et al. The mitochondria-targeted H<sub>2</sub>S-donor AP39 in a murine model of combined hemorrhagic shock and blunt chest trauma[J]. *Shock*, 2019, 52(2): 230-239.
- [16] KARWI Q G, BORNBAUM J, BOENGLER K, et al. AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(4): 287-301.
- [17] GHOSH R, GILLASPIE J J, CAMPBELL K S, et al. Chaperone-mediated autophagy protects cardiomyocytes against hypoxic-cell death [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(5): C1555-C1575.
- [18] IBRAHIM M A, GEDDAWY A, ABDEL-WAHAB S. Sitagliptin prevents isoproterenol-induced myocardial infarction in rats by modulating nitric oxide synthase enzymes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 829: 63-69.
- [19] LI Y L, LIU M J, YI J L, et al. Exogenous hydrogen sulfide inhibits apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress-autophagy axis and improves myocardial reconstruction after acute myocardial infarction[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020, 52(12): 1325-1336.
- [20] 吴忱昊, 谢志忠. 线粒体源性硫化氢及其对线粒体功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 277-285.
- WU C H, XIE Z Z. Mitochondrial hydrogen sulfide and its effect on mitochondrial function[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(4): 277-285.
- [21] FRANGOIANNIS N G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [22] ZHANG L, JIAN X, YU J, et al. Pterostilbene interferes with lipopolysaccharide-induced myocardial injury through oxidative stress and inflammasome pathways[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 862187.
- [23] YANG R, JIA Q, MA S F, et al. Exogenous H<sub>2</sub>S mitigates myocardial fibrosis in diabetic rats through suppression of the canonical Wnt pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 549-558.
- [24] LI Y L, CHANDRA T P, SONG X, et al. H<sub>2</sub>S improves doxorubicin-induced myocardial fibrosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis via Keap1-Nrf2 [J]. *Technol Health Care*, 2021, 29(S1): 195-209.
- [25] QI B C, SONG L Q, HU L, et al. Cardiac-specific overexpression of Ndufs1 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction by alleviating mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(7): 946-960.
- [26] LIN L C, TU B, SONG K, et al. Mitochondrial quality control in cardiac fibrosis: epigenetic mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Metabolism*, 2023, 145: 155626.
- [27] LIU D H, ZOU S R, LI G N, et al. Downregulation of uncoupling protein 2 (UCP2) mediated by microRNA-762 confers cardioprotection and participates in the regulation of dynamic mitochondrial homeostasis of dynamin related protein1 (DRP1) after myocardial infarction in mice[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 764064.
- [28] ZHOU J R, LIU H H, ZHANG T A, et al. MORN4 protects cardiomyocytes against ischemic injury via MFN2-mediated mitochondrial dynamics and mitophagy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 196: 156-170.
- [29] HUANG B Y, XIE L, KE M, et al. Programmed release METTL3-14 inhibitor microneedle protects myocardial function by reducing Drp1 m6A modification-mediated mitochondrial fission [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(40): 46583-46597.
- [30] SINGH M, PUSHPAKUMAR S, ZHENG Y T, et al. Hydrogen sulfide mitigates skeletal muscle mitophagy-led tissue remodeling via epigenetic regulation of the gene writer and eraser function[J]. *Physiol Rep*, 2022, 10(16): e15422.
- [31] RAO G, MURPHY B, DEY A, et al. Cystathionine beta synthase regulates mitochondrial dynamics and function in endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(7): 9372-9392.
- [32] LEE S W, HU Y S, HU L F, et al. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells[J]. *Glia*, 2006, 54(2): 116-124.

(此文编辑 许雪梅)