

王美娟,李娇,李琦,等.褪黑素自组装多肽减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤[J].中国比较医学杂志,2025,35(6):35-40.

Wang MJ, Li J, Li Q, et al. Melatonin self-assembling peptide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 35-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.004

褪黑素自组装多肽减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤

王美娟^{1,2}, 李 娇², 李 琦², 魏丽萍^{2*}

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津市人民医院心内科,南开大学第一附属医院,天津 300121)

【摘要】 目的 设计褪黑素(melatonin, Mel)纳米药物并研究其对小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用。**方法** 合成特异性靶向心脏的 Mel 自组装多肽(Mel-NMs)并用透射电镜对其形态进行表征;随机将小鼠分为假手术组、模型组、Mel 组、NMs 组和 Mel-NMs 组,建立心肌缺血再灌注模型,再灌注前 10 min 腹腔注射等体积溶剂、Mel(5 mg/kg)、NMs 或 Mel-NMs(含 Mel 5 mg/kg);再灌注 24 h 后取材,检测小鼠心脏功能及心肌细胞凋亡、氧化应激水平。**结果** Mel-NMs 微观形貌呈蠕虫状;与模型组相比,Mel 组和 Mel-NMs 组小鼠心功能均升高,LDH、MDA 含量下降,GSH-Px 和 SOD 活性明显升高($P<0.05$),心肌细胞凋亡率明显下降($P<0.05$),且 Mel-NMs 组作用效果更好($P<0.05$)。**结论** Mel-NMs 可抑制心肌氧化应激和凋亡缓解小鼠 MIR 损伤,其心脏保护效果优于 Mel。

【关键词】 心肌缺血再灌注;褪黑素;自组装多肽;氧化应激;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0035-06

Melatonin self-assembling peptide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice

WANG Meijuan^{1,2}, LI Jiao², LI Qi², WEI Liping^{2*}

(1. School of Graduate Studies, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China.

2. Department of Cardiology, Tianjin Union Medical Center, the First Affiliated Hospital of Nankai University, Tianjin 300121)

【Abstract】 Objective To design melatonin (Mel)-based nanomedicines (Mel-NMs) and evaluate their therapeutic effects on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. **Methods** Melatonin self-assembled peptides (Mel-NMs) were synthesized and their structure was characterized by transmission electron microscopy. Mice were divided randomly into five groups: Sham, Model, Mel, NMs, and Mel-NMs, and a myocardial ischemia-reperfusion injury model was established. Mel (5 mg/kg), NMs, or Mel-NMs (containing Mel 5 mg/kg) were administered intraperitoneally 10 minutes prior to reperfusion, and the sham group was treated with an equal volume of solvent. Cardiac function, apoptosis, and oxidative stress markers were assessed 24 hours after reperfusion. **Results**

【基金项目】天津市人民医院重点课题(2023YJZD003);天津市科技计划项目面上项目(23JCYBJC01470);天津市卫生健康委中西医结合课题(2023055)。

【作者简介】王美娟(1998—),女,硕士,研究方向:心血管病的基础和临床研究。E-mail:wangmeijuan0209@163.com

【通信作者】魏丽萍(1972—),女,博士,主任医师,研究方向:冠心病基础及临床研究。E-mail:weilipingme@163.com

Transmission electron microscopy revealed that Mel-NMs formed worm-like structures. Treatment with Mel and Mel-NMs significantly improved cardiac function, reduced lactate dehydrogenase and malondialdehyde levels, and enhanced glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities ($P<0.05$), while also decreasing cardiomyocyte apoptosis ($P<0.05$), with greater effects in the Mel-NMs group ($P<0.05$). **Conclusions** Mel-NMs can effectively mitigate myocardial oxidative stress and apoptosis, offering a more potent cardioprotective effect than Mel alone.

【Keywords】 myocardial ischemia-reperfusion; melatonin; self-assembled peptide; oxidative stress; apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心血管病仍在我国城乡居民疾病死亡构成比中处于首位^[1]。急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 具有高致残率和致死率,是由于冠状动脉突然闭塞致使相应心肌区域缺血引发心肌坏死。如未能及时恢复血流灌注,会出现心肌不良重塑,甚至会发展为心力衰竭^[2]。经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 和冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass grafting, CABG) 可实现早期血运重建,从而缓解心肌缺血^[3]。而再灌注这一过程却能够促使心肌损伤进一步加剧,这种现象被称作缺血再灌注损伤。心肌缺血再灌注 (myocardial ischemia-reperfusion, MIR) 损伤是限制心肌梗死再灌注治疗效果的关键因素,目前防治 MIR 损伤的策略主要包括缺血预处理、缺血后处理、远端缺血处理和他汀类等药物治疗,但这些方法的临床疗效并不尽人意。因此,开发能有效减轻 MIR 损伤的药物已成为亟待解决的重要问题^[4-5]。

Mel 是一种多效性分子,具有抗氧化和抗凋亡作用,且 Mel 受体存在于整个心血管系统的不同血管组织中,可能在减轻 MIR 损伤中发挥关键作用^[6]。这种无明显毒副作用、耐受性良好、多靶点的分子对心血管病的防治具有巨大潜力。由于 Mel 半衰期短且无法特异性输送到受损区域,大多数药物实验不能达到预期效果,纳米递送系统具有增加药物水溶性、延长循环时间、增加摄取率和减少降解的作用,在解决药物靶向、缓释的问题等方面显示出了巨大优势。本研究基于 GFFY 肽和心脏靶向肽 CTP (APWHLSSQYSRT) 合成了特异性靶向到心脏的 Mel 自组装多肽,观察其对小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用,为 Mel 在临床应用方面提供更为丰富的理论支撑^[7-8]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

75 只 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量 (20 ± 2) g,来自北京华阜康生物科技公司 [SCXK(京)2024-0003],在易生源基因科技有限公司动物中心饲养 [SYXK(津)2021-0003]。按照《实验动物管理条例》规定进行实验,本实验获易生源基因科技有限公司动物伦理委员会批准 (YSY-DWLL-2023566)。实验动物饲养及实验过程中均严格依照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Mel (美国 MCE 公司, HY-B0075); LDH、MDA 和 GSH-Px 试剂盒南 (京建成生物工程有限公司, A020-2-2、A003-1-2、A005-1-2); SOD 和 TUNEL 试剂盒 (碧云天生物公司, S0101S、C1086)。

多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 高速低温离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); Vevo 3100 超声系统 (加拿大 VisualSonics 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Mel-NMs 构建及表征

Mel 分子首先需要与丁二酸酐反应形成一个裸露的羧基,再共价连接到 GFFY-CTP 上,其中 CTP 是具有心脏靶向功能和心肌细胞导入功能的多肽。将合成的 Mel-NMs 稀释到适宜浓度,滴加 5 μL 样品于碳镀铜网支持膜上,30 s 后再滴加 15 μL ddH₂O,用滤纸于边缘小心吸去液体。再滴加 5 μL 磷钨酸溶液于铜网上,2 min 后用滤纸吸去液体,把铜网放置在干燥器中过夜干燥后,透射电镜 (TEM) 观察样品微观结构。

1.3.2 分组与给药

将 75 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组:假手术组、模型组、Mel 组、NMs 组和 Mel-NMs 组。将小鼠用异氟醚气麻后固定,打开胸腔后迅速挤出

心脏,将冠状动脉左前降支活结,假手术组在小鼠冠状动脉左前降支仅穿线不打结,结扎 30 min 后打开冠脉活结恢复冠脉血流^[9]。再灌注前 10 min 腹腔注射等体积溶剂、Mel(5 mg/kg)、NMs 或 Mel-NMs(含 Mel 5 mg/kg),再灌注 24 h 后取材。

1.3.3 心功能检测

将小鼠麻醉后用脱毛膏脱去胸前毛发,仰卧位固定于超声操作面板上,使用 Vevo 3100 超声系统检测小鼠心功能参数。

1.3.4 生化指标检测

小鼠取血后处死并取材,使用 LDH 试剂盒检测小鼠血清 LDH 水平;取适量小鼠心肌组织用生理盐水洗去血液后加入 500 μ L 生理盐水,用眼科剪将组织剪碎,在冰上充分研磨,在 4 $^{\circ}$ C 的条件下 3000 r/min 离心 15 min 取上清,检测 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量。

1.3.5 TUNEL 检测

小鼠心脏取材后用 4% 多聚甲醛固定,将心脏组织石蜡包埋、切片。石蜡切片脱蜡至水,室温下用蛋白酶 K 液处理 20 min 后 PBS 洗 3 次。制备 TUNEL 工作液,于组织切片上滴加 TUNEL 工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育箱中孵育 1 h。PBS 洗 3 次后在组织切片上滴加 DAPI 染液,避光室温反应 15 min, PBS 洗 3 次,荧光显微镜观察并拍照。

1.4 统计学方法

统计学分析使用 GraphPad Prism 8.0 软件,多组间比较采用单因素方差分析,检测结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NMs 与 Mel-NMs 表征

透射电镜观察 NMs 和 Mel-NMs 的微观形貌呈蠕虫状,见图 1。

2.2 Mel-NMs 处理改善 MIR 小鼠心功能

超声心动图结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)显著降低($P<0.05$)。与模型组相比, Mel 与 Mel-NMs 干预都能使 LVEF 和 LVFS 显著升高($P<0.05$),且 Mel-NMs 组升高更明显($P<0.05$),见图 2。

2.3 Mel-NMs 处理缓解 MIR 小鼠心肌损伤并抑制氧化应激

与假手术组相比,模型组小鼠血清 LDH 显著上升,心肌组织 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低,抗氧化能力下降,氧化产物 MDA 含量显著升高($P<0.05$)。与模型组相比, Mel 组与 Mel-NMs 组 LDH 水平显著下降, GSH-Px 和 SOD 活性增强且 MDA 含量下降($P<0.05$), Mel-NMs 组作用更显著($P<0.05$),见图 3。

2.4 Mel-NMs 处理抑制 MIR 小鼠心肌凋亡

TUNEL 染色结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠凋亡率显著增高($P<0.05$), Mel 与 Mel-NMs 干预显著降低了心肌凋亡率($P<0.05$), Mel-NMs 组作用更显著($P<0.05$),见图 4。

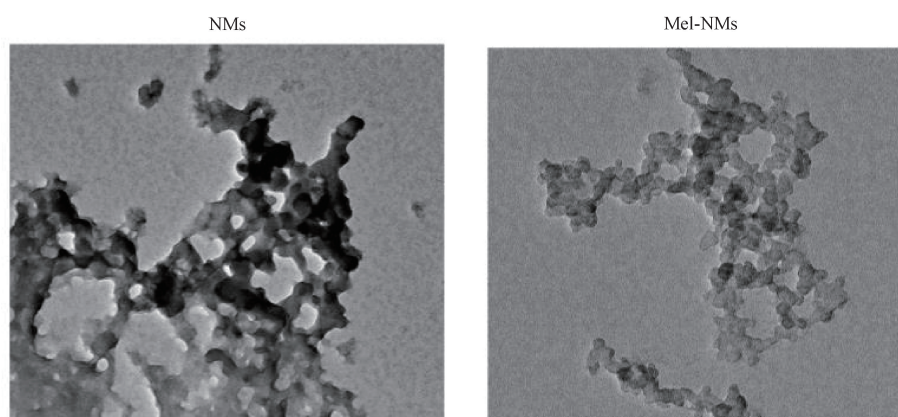
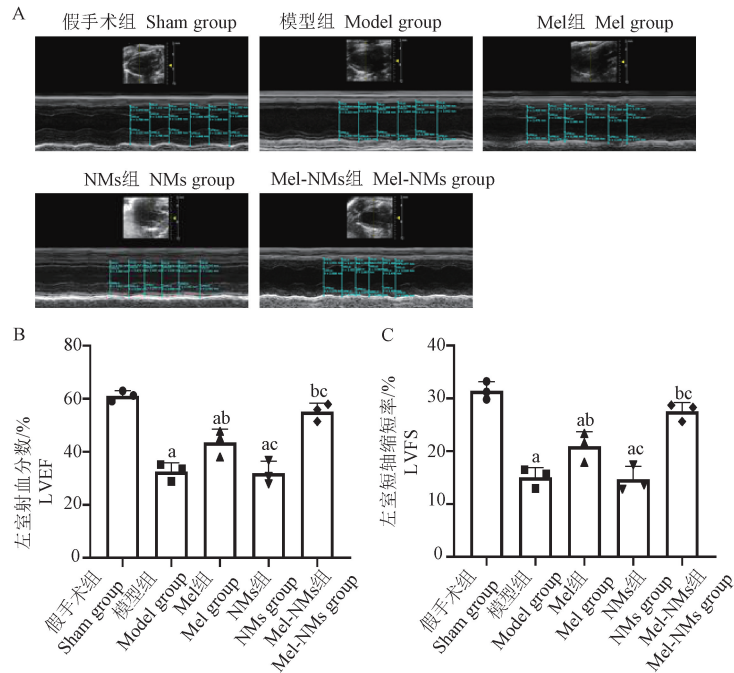


图 1 NMs(左)和 Mel-NMs(右)微观形态

Figure 1 Micromorphology of NMs (left) and Mel-NMs (right)

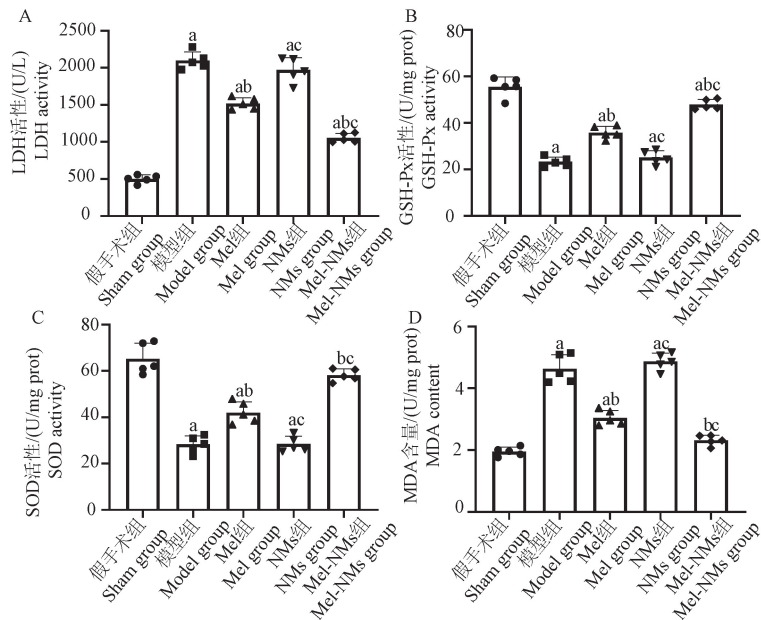


注:A:代表性超声心动图;B:左室射血分数;C:左室短轴缩短率。与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 Mel 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 2 各组小鼠心功能比较($n=3$)

Note. A, Representative images from an M-mode echocardiogram. B, LVEF. C, LVFS. Compared with the Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the Mel group, ^c $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of cardiac function among groups of mice($n=3$)

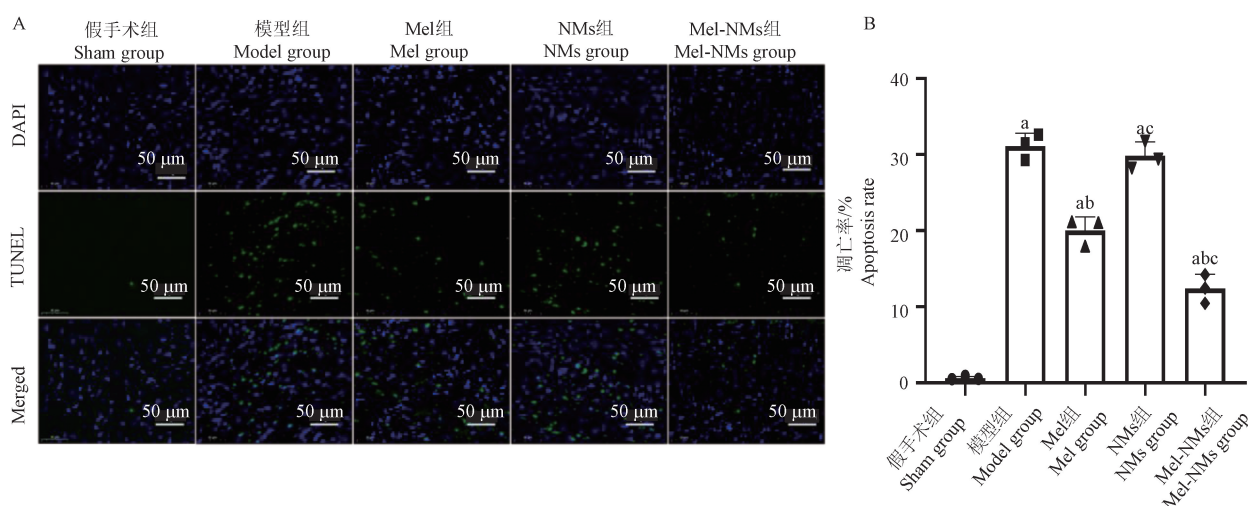


注:A:血清 LDH 活性;B:心肌组织 GSH-Px 活性;C:心肌组织 SOD 活性;D:心肌组织 MDA 含量。与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 Mel 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 3 各组小鼠心肌损伤及氧化应激水平比较($n=5$)

Note. A, Serum LDH level. B, Myocardial GSH-Px activity. C, Myocardial SOD activity. D, Myocardial MDA content. Compared with the Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the Mel group, ^c $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of myocardial injury and oxidative stress levels in groups of mice($n=5$)



注:A:代表性凋亡染色图;B:心肌细胞凋亡率。与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 Mel 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠心肌细胞凋亡率比较($n=3$)

Note. A, Representative images of apoptosis staining. B, Apoptosis rate. Compared with the Sham group, ^a $P<0.05$. Compared with the Model group, ^b $P<0.05$. Compared with the Mel group, ^c $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of apoptosis rates of cardiomyocytes in mice in each group($n=3$)

3 讨论

心肌缺血后再灌注治疗能挽救部分未受损心肌,而再灌注治疗也会导致心肌代谢改变^[10]。在再灌注开始时,血管再通的最初几分钟内可以引起有害氧衍生物的爆发,会破坏细胞内源性抗氧化防御,导致细胞凋亡和坏死,因此,及时清除堆积的氧自由基可以有效缓解心肌损伤^[11]。本研究发现,心肌缺血再灌注的小鼠心脏收缩功能明显受损,心肌损伤标志物 LDH 活性增强,而 Mel 与 Mel-NMs 干预都能使心肌缺血再灌注小鼠心肌收缩功能得到改善,心肌 LVEF 和 LVFS 显著升高,Mel-NMs 作用效果优于 Mel。氧化应激是缺血再灌注后导致心肌损伤的主要原因,再灌注过程中有氧代谢重新激活会使自由基大量产生并急剧堆积。自由基爆发会损伤线粒体能量代谢,导致电子泄漏,使自由基进一步累积,这会破坏细胞内源性抗氧化防御,导致脂质过氧化和膜完整性丧失,从而导致细胞凋亡和坏死^[12-14]。如本研究结果所示,缺血再灌注小鼠心肌抗氧化物 SOD 和 GSH-Px 活力降低,脂质过氧化物 MDA 含量增高,TUNEL 染色结果显示心肌凋亡率明显升高。给予 Mel 与 Mel-NMs 都可以降低氧化应激和凋亡水平,增强抗氧化物 SOD 和 GSH-Px 活力,降低心肌 MDA 含量,且 Mel-NMs 作用更显著。

研究表明心肌梗塞的患者和接受初次 PCI 治疗的患者 Mel 水平降低,说明 Mel 可能在防治缺血再灌注损伤中发挥重要作用,此外,研究发现 Mel 受体存在于人体脉管系统中,表明该分子在心血管疾病的局部控制中可能具有直接作用^[15-16]。SANTOS-LEDO 等^[17]的研究发现 Mel 会增加棕色脂肪组织的体积和活性,改善血脂水平、动脉硬化和肥胖严重程度。一项回顾性研究发现,心肌梗死后血清 Mel 浓度降低可预测心室重塑,并与不良预后相关^[18]。近年来,纳米药物相关的研究越来越多,纳米药物可以提供靶向、持续的递送,可以解决传统给药系统停留时间短、生物分布差的局限性^[19]。Mel 半衰期短,容易在循环中降解,本研究合成了能特异性靶向到心脏的 Mel 自组装多肽,靶向部分选择心脏靶向肽 CTP,CTP 是一种细胞穿透性多肽,在外周注射后能够特异性地转导正常小鼠心脏组织并成功穿过心肌细胞的细胞膜屏障。研究应用的多肽价格低、制备简便、化学结构明确、生物相容度高并易于降解^[20]。Mel 被截留在纳米递送系统中可防止其在循环中降解,通过延长半衰期、增强药代动力学特征改善其疗效。本研究结果也证明了 Mel-NMs 对于心肌缺血再灌注损伤的心脏保护作用优于 Mel。

综上所述,Mel-NMs 可以增强缺血再灌注小

鼠的心肌收缩力,通过增强抗氧化酶活力、减少脂质过氧化物堆积来降低氧化应激水平,并且抑制凋亡来缓解心肌缺血再灌注小鼠的心肌损伤。为 Mel 用于临床治疗心血管疾病提供了有益的数据支持。但其发挥心脏保护作用的机制及作用受体尚未非常明确,后续还需要更多分子生物学研究以探究 Mel 发挥保护作用的潜在机制。

参考文献:

- [1] 刘明波,何新叶,杨晓红,等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2024, 29(4): 305-324.
LIU M B, HE X Y, YANG X H, et al. Highlights of the China cardiovascular health and disease report 2023 [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2024, 29(4): 305-324.
- [2] XING M, JIANG Y, BI W, et al. Strontium ions protect hearts against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Sci Adv, 2021, 7(3): eabe0726.
- [3] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. Trends Cardiovasc Med, 2023, 33(6): 357-366.
- [4] WANG K, LI Y, QIANG T, et al. Role of epigenetic regulation in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Pharmacol Res, 2021, 170: 105743.
- [5] WANG J, ZHOU H. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(10): 1866-1879.
- [6] IMENSHAHIDI M, KARIMI G, HOSSEINZADEH H. Effects of melatonin on cardiovascular risk factors and metabolic syndrome: a comprehensive review [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2020, 393(4): 521-536.
- [7] GIORDO R, WEHBE Z, PALIOGIANNIS P, et al. Nano-targeting vascular remodeling in cancer: Recent developments and future directions [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 2): 784-804.
- [8] ZAHID M, FELDMAN K S, GARCIA-BORRERO G, et al. Cardiac targeting peptide, a novel cardiac vector: studies in bio-distribution, imaging application, and mechanism of transduction [J]. Biomolecules, 2018, 8(4): 147.
- [9] 丁怡铭,高杰,邢元铭,等.小鼠心肌梗死模型的建立及系统性评价[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 873-879.
DING Y M, GAO J, XING Y M, et al. Establishment of a mouse myocardial infarction model and systematic evaluation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 873-879.
- [10] SABOUNY R, SHUTT T E. Reciprocal regulation of mitochondrial fission and fusion [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(7): 564-577.
- [11] 卢迎宏,王丹,井海云,等.胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23-30.
LU Y H, WANG D, JING HY, et al. Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 23-30.
- [12] MILLIKEN A S, NADTOCHIY S M, BROOKES P S. Inhibiting succinate release worsens cardiac reperfusion injury by enhancing mitochondrial reactive oxygen species generation [J]. J Am Heart Assoc, 2022, 11(13): e026135.
- [13] BARDALLO R G, PANISELLO-ROSELLÓ A, SANCHEZ-NUNO S, et al. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury [J]. FEBS J, 2022, 289(18): 5463-5479.
- [14] LIU Y, LI L, WANG Z, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury; Molecular mechanisms and prevention [J]. Microvasc Res, 2023, 149: 104565.
- [15] RANDHAWA P K, GUPTA M K. Melatonin as a protective agent in cardiac ischemia-reperfusion injury: Vision/Illusion? [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 885: 173506.
- [16] CHITIMUS D M, POPESCU M R, VOICULESCU S E, et al. Melatonin's impact on antioxidative and anti-inflammatory reprogramming in homeostasis and disease [J]. Biomolecules, 2020, 10(9): 1211.
- [17] SANTOS-LEDO A, LUXÁN-DELGADO B, CABALLERO B, et al. Melatonin ameliorates autophagy impairment in a metabolic syndrome model [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(5): 796.
- [18] REITER R J, SHARMA R, CHUFFA L G A, et al. Mitochondrial melatonin: beneficial effects in protecting against heart failure [J]. Life (Basel), 2024, 14(1): 88.
- [19] YETISGIN A A, CETINEL S, ZUVIN M, et al. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications [J]. Molecules, 2020, 25(9): 2193.
- [20] ZHANG Z, AI S, YANG Z, et al. Peptide-based supramolecular hydrogels for local drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 174: 482-503.

[收稿日期] 2025-02-16