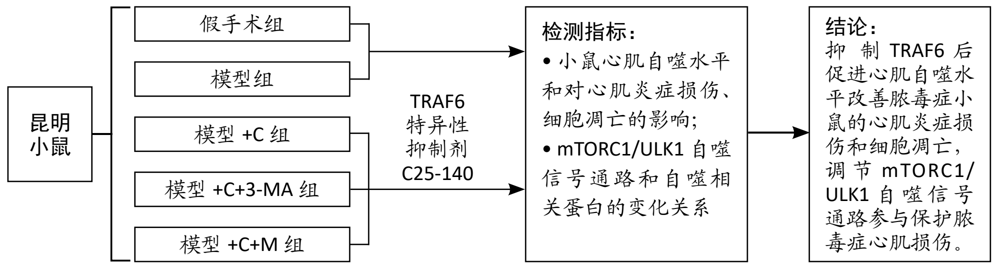
抑制TRAF6调节mTORC1/ULK1信号通路促进自噬改善脓毒症小鼠的心肌损伤

周 颖[1, 2]，田 勇[2]，钟芝梅[1]，古雍翔[2]，方 昊[3]

https://doi.org/10.12307/2025.800
投稿日期：2024-09-28
采用日期：2024-11-11
修回日期：2024-12-24
在线日期：2025-01-11
中图分类号：
R459.7；R318；R364.5
文章编号：
2095-4344(2025)30-06434-07
文献标识码：B

文章快速阅读： 抑制肿瘤坏死因子受体相关因子6调节mTORC1/ULK1信号通路对脓毒症小鼠心肌损伤的作用



文题释义：
肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6，TRAF6)：是一种存在于细胞质的衔接蛋白，目前认为是肿瘤坏死因子受体家族和Toll 样受体/白细胞介素1受体家族中唯一的信号转导连接分子。TRAF6具有独特的特异性结合受体参与调节先天性和适应性免疫、自噬等病理生理过程。
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin，mTOR)：是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，分为mTOR复合体1和复合体2(mTORC1，mTORC2)，具有调节细胞生长和代谢等作用。mTORC1作为自噬的主要调节因子发挥负调节作用。

摘要
背景：研究发现抑制肿瘤坏死因子受体相关因子6能改善脓毒症心肌功能并促进心肌自噬水平，但具体机制尚不明确。
目的：探索抑制肿瘤坏死因子受体相关因子6调节mTORC1/ULK1自噬信号通路对脓毒症小鼠心肌损伤的作用。
方法：雄性昆明小鼠30只，随机分为5组，分别为假手术组、盲肠结扎穿刺术组(模型组) 、模型+肿瘤坏死因子受体相关因子6特异性抑制剂C25-140(模型+C)组、模型+C25-140+自噬抑制剂3−甲基腺嘌呤(模型+C+3-MA)组、模型+C25-140+mTORC1特异性激动剂MHY1485(模型+C+M)组。假手术组小鼠盲肠不结扎穿刺；其余各组小鼠行盲肠结扎穿刺术建立小鼠脓毒症模型，按分组术后0.5 h分别腹腔注射C25-140、3−甲基腺嘌呤、MHY1485。术后24 h取心肌组织，苏木精−伊红染色评估心肌炎症病变；透射电镜观察心肌细胞自噬小体、线粒体微结构变化；TUNEL检测心肌细胞凋亡，PCR检测肿瘤坏死因子受体相关因子6 mRNA的相对表达量，Western blot检测相关蛋白的表达。
结果与结论：①与假手术组比较，模型组小鼠心肌炎症细胞浸润、纤维水肿；细胞线粒体明显肿胀，偶见自噬小体；心肌细胞凋亡显著增加；肿瘤坏死因子受体相关因子6、磷酸化核因子κB P65/P65、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1、P62、Bax蛋白表达升高，Bcl2蛋白表达下降(P < 0.05)。②与模型组比较，模型+C组小鼠心肌炎症缓解、纤维水肿减轻；心肌线粒体肿胀减轻，自噬小体增多；心肌细胞凋亡减少；磷酸化核因子κB P65 /核因子κB P65、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1、P62、Bax蛋白表达下降，Beclin-1、Bcl2蛋白表达升高(P < 0.05)。③与模型+C比，模型+C+3-MA组心肌自噬小体减少、心肌线粒体肿胀较明显；心肌炎症有加重；心肌细胞凋亡增多；磷酸化核因子κB65/核因子κB65、P62、Bax蛋白表达升高，Beclin-1、Bcl2蛋白表达下降(P < 0.05)。④与模型+C比，模型+C+M组p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1表达升高，Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3Ⅱ/Ⅰ蛋白表达下降(P < 0.05)。结论：抑制肿瘤坏死因子受体相关因子6可以调节mTORC1/ULK1自噬信号促进心肌自噬参与改善脓毒症心肌损伤。
关键词：肿瘤坏死因子受体相关因子6；自噬；脓毒症；心肌损伤；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；工程化组织构建

Inhibition of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 regulates mTORC1/ULK1 signaling and promotes autophagy to improve myocardial injury in sepsis mice

Zhou Ying[1, 2], Tian Yong[2], Zhong Zhimei[1], Gu Yongxiang[2], Fang Hao[3]
[1]Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Qianxinan Prefecture, Xingyi 562400, Guizhou Province, China; [2]School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; [3]Department of MICU, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Zhou Ying, MS, Associate chief physician, Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Qianxinan Prefecture, Xingyi 562400, Guizhou Province, China; School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

[1]贵州省黔西南州人民医院呼吸科，贵州省兴义市 562400；[2]贵州医科大学临床医学院，贵州省贵阳市 550004；[3]贵州医科大学附属医院内科ICU，贵州省贵阳市 550004
第一作者：周颖，男，1987年生，贵州省兴仁市人，汉族，2024年贵州医科大学毕业，硕士，副主任医师，主要从事老年呼吸危重症、脓毒症的研究。
通讯作者：方昊，副主任医师，贵州医科大学附属医院内科ICU，贵州省贵阳市 550004
https://orcid.org/0009-0007-2333-4985(周颖)
基金资助：贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwkj2023-112)，项目负责人：方昊；贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwkj2024-276)，项目负责人：周颖；贵州省黔西南州科技计划项目(2022-2-08；2023-3-12)，项目负责人：周颖
引用本文：周颖，田勇，钟芝梅，古雍翔，方昊. 抑制TRAF6调节mTORC1/ULK1信号通路促进自噬改善脓毒症小鼠的心肌损伤[J]. 中国组织工程研究，2025，29(30):6434-6440.

Corresponding author: Fang Hao, Associate chief physician, Department of MICU, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that inhibition of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 improves myocardial function and promotes myocardial autophagy in sepsis, but the specific mechanism is not clear.

OBJECTIVE: To explore the effect of inhibiting tumor necrosis factor receptor-associated factor 6-regulated mTORC1/ULK1 autophagy signaling pathway on myocardial injury in sepsis mice.

METHODS: Thirty male Kunming mice were randomly divided into sham operation group, cecal ligation and puncture group (model group), model+tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 specific inhibitor C25-140 (model+C) group, model+C25-140+autophagy inhibitor 3-methyladenine (model+C+3-MA) group, and model+C25-140+mTORC1-specific agonist MHY1485 (model+C+M) group. The cecum of mice in the sham operation group was not ligated or punctured. The mice in the other groups underwent cecum ligation and puncture to establish the mouse sepsis model. C25-140, 3-methyladenine, and MHY1485 were intraperitoneally injected 0.5 hours after surgery according to the grouping. Myocardial tissue was obtained 24 hours after surgery. Hematoxylin-eosin staining was used to evaluate myocardial inflammatory lesions. Transmission electron microscopy was used to observe the changes in the autophagic bodies and mitochondrial microstructures of myocardial cells. TUNEL assay was used to detect myocardial cell apoptosis. PCR was used to detect the relative expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 mRNA. Western blot assay was used to detect the expression of related proteins.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with sham operation group, myocardial inflammatory cell infiltration and fibrous edema were observed in the model group. The mitochondria of the cells were obviously swollen, and autophagosomes were occasionally seen; cardiomyocyte apoptosis increased significantly; the expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, phosphorylated nuclear factor κB P65/P65, p-mTOR/mTOR, p-ULK1/ULK1, P62 and Bax protein increased, and the expression of Bcl2 protein decreased (P < 0.05). (2) Compared with the model group, myocardial inflammation and fibrous edema were alleviated in the model+C group. Myocardial mitochondrial swelling was reduced and autophagosomes increased; cardiomyocyte apoptosis decreased; the expression of phosphorylated nuclear factor κB P65/nuclear factor-κB P65, p-mTOR/mTOR, p-ULK1/ULK1, P62, and Bax protein decreased, while the Beclin-1 and Bcl2 protein increased (P < 0.05). (3) Compared with the model+C group, myocardial autophagosomes decreased and myocardial mitochondrial swelling was more obvious in the model+C+3-MA group. Myocardial inflammation was aggravated; myocardial cell apoptosis increased; the expression of phosphorylated nuclear factor κB P65/nuclear factor κB P65, P62, and Bax protein increased, and the Beclin-1 and Bcl2 protein decreased (P < 0.05). (4) Compared with the model+C group, the expression of p-mTOR/mTOR and p-ULK1/ULK1 in the model+C+M group increased, and the Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I protein expression decreased (P < 0.05). It is concluded that inhibition of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 regulates mTORC1/ULK1 autophagy signal to promote myocardial autophagy and participate in the protection of myocardial injury in sepsis.

Key words: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; autophagy; sepsis; myocardial injury; mammalian target of rapamycin; engineered tissue construction

Funding: *Science and Technology Fund Project of Health Commission of Guizhou Province, No. gzwkj2023-112 (to FH); Science and Technology Fund Project of Health Commission of Guizhou Province, No. gzwkj2024-276 (to ZY); Science and Technology Plan Project of Qianxinan Prefecture of Guizhou Province, No. 2022-2-08; 2023-3-12 (to ZY)*

How to cite this article: *ZHOU Y, TIAN Y, ZHONG ZM, GU YX, FANG H. Inhibition of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 regulates mTORC1/ULK1 signaling and promotes autophagy to improve myocardial injury in sepsis mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(30):6434-6440.*

0 引言 Introduction

脓毒症心肌损伤是由脓毒症引起的整体性、可逆的心脏功能障碍，也称脓毒症心肌病或者脓毒症心功能障碍 [1-2]。脓毒症患者合并有心肌功能障碍，死亡风险增加，临床医师对该病的治疗和管理面临严峻的挑战。脓毒症心肌损伤的发病机制复杂，目前认为包括有细胞炎症反应、线粒体损伤、自噬紊乱、氧化应激、细胞凋亡等综合因素有关 [1]。

肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6，TRAF6) 调节自噬参与调控细胞炎症反应、凋亡、氧化应激等生物学过程 [3-4]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin，mTOR) 复合体 1(mammalian target of rapamycin complex 1，mTORC1) 的活化促进 unc-51 样自噬激活激酶 1(unc-51-like autophagy activating kinase 1，ULK1) 在 ser757 位点的磷酸化并抑制 ULK1 的活性，负调节自噬体的形成 [5]。课题组前期发现抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 能改善脓毒症心肌功能并促进心肌自噬水平 [6]。因此推测，肿瘤坏死因子受体相关因子 6 可能调节 mTOR/ULK1 自噬信号参与脓毒症心肌损伤的病理生理过程。此次研究从动物模型层面探索肿瘤坏死因子受体相关因子 6 调节 mTOR/ULK1 自噬信号通路对脓毒症心肌炎性损伤和细胞凋亡的影响，旨在促进自噬和抑制炎症方面探索其有效的治疗靶点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 ①随机对照动物实验。②观察 C25-140 对模型小鼠心肌组织肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的抑制作用，以及心肌组织的炎性损伤、心肌细胞凋亡、微结构及自噬相关蛋白的变化，实验在假手术组、模型组、模型 +C25-140(模型 +C) 组、模型 +C25-140+3-MA(模型 +C+3-MA) 组中开展；检测心肌组织自噬蛋白与 mTORC1/ULK1 通路蛋白的变化关系，实验在假手术组、模型组、模型 +C 组、模型 +C25-140+MHY1485(模型 +C+M) 组中开展。③多组间比较行单因素方差分析，组间比较使用 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 3 月至 2024 年 4 月在贵州医科大学分子生物学重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康雄性昆明小鼠 30 只，清洁级，8 周龄，体质量 25−30 g，购于贵州医科大学实验动物中心，使用许可证号：SYXK(黔)2018-0001。每天定时更换饮用水及饲料、垫料，自由进食和饮水，环境温度 22−25 ℃，湿度 50%−55%，适应性喂养 7 d 后按照实验分组造模。动物实验符合贵州医科大学动物实验伦理委员会审批规范，批准号：2200656。

1.3.2 主要试剂及仪器 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 特异性抑制剂 C25-140(批号：HY-120934，纯度 99.86%，美国 MCE 公司)；3− 甲基腺嘌呤 (3-MA，批号：HY-19312，

纯度 99.91%，美国 MCE)；mTORC1 特异性激动剂 MHY1485(批号：HY-B0795，纯度 99.74%，美国 MCE 公司)；三溴乙醇 (型号：M2910，南京爱贝生物科技有限公司)；肿瘤坏死因子受体相关因子 6 抗体 (货号：AF5376，Affinity 生物科技公司)；自噬效应蛋白 1 (beclin-1) 抗体 (货号：T55092)、泛素结合蛋白 (protein 62，P62) 抗体 (货号：T55546)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3，LC3) 抗体 B(货号：T55992)、核因子 κB P65 抗体 (货号：TU329612)、磷酸化核因子 κB P65(p-P65) 抗体 (货号：TP70621)、mTOR 抗体 (货号：T55306)、p-mTOR(货号：T56571)、ULK1(货号：T56902)、p-ULK1(货号：TA4387)、B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma 2，Bcl2) 抗体 (货号：T40056)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein，Bax) 抗体 (货号：T40051) 均购于上海 Abmart 公司；内参 GAPDH 抗体 (货号：ET1601-4，华安生物公司)；兔二抗 (货号：T55546，美国 SAB 公司)；Tunel 试剂盒 (货号：11684795910，瑞士罗氏公司)；PCR 试剂盒 (货号：G3326，武汉塞维尔公司)；透射电子显微镜 (型号：JEM-1400FLASH，日本电子株式会社)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组及构建小鼠脓毒症模型 将小鼠随机分为 5 组，每组 6 只，分别命名为假手术组、模型组、模型 +C25-140(模型 +C) 组、模型 +C25-140+3-MA(模型 +C+3-MA) 组，模型 +C25-140+MHY1485(模型 +C+M) 组。根据前期建模经验 [6]，采用盲肠结扎穿刺术 (CLP) 建立脓毒症小鼠模型，术前用 1.25% 三溴乙醇 (400 mg/kg) 左侧腹腔注射麻醉，待麻醉效果满意后，予仰卧位固定，腹部备皮、消毒，铺无菌洞巾，腹正中偏左作约 1 cm 长的竖直切口，找到盲肠后直尺测量长度，在其 1/2 结扎，22 号针头在不同穿刺点来回刺穿盲肠末端 2 次 (避开血管位置)，轻轻挤出少许肠内容物，随后将盲肠还纳腹腔并逐层缝合。假手术组未行盲肠结扎穿刺，其余手术操作步骤与模型组处理一致。术后颈背部皮下注射 1 mL 预温 37 ℃的生理盐水补液。术后 0.5 h 按照分组条件给予腹腔注射 C25-140 (10 mg/kg)、3-MA(10 mg/kg) 和 MHY1485(10 mg/kg)，使用剂量依据实验动物体表面积的等效剂量转换表计算得到 [6]。假手术组和模型组分别给予同剂量生理盐水作为对照。麻醉苏醒后放回动物房，自由饮水进食。

1.4.2 心肌组织苏木精 - 伊红染色 术后 24 h 麻醉后采用断头法处死小鼠，开胸暴露心脏，生理盐水灌洗后，取左心室最大横径冠状切面的心肌组织，40 g/L 中性甲醛固定，后期切片镜下观察各组心肌组织炎性损伤病理变化。

1.4.3 心肌组织透射电镜观察自噬小体、线粒体微结构 于心尖组织取约米粒大小于载玻片上修成 0.1 cm×0.1 cm×0.1 cm 大小，放入 2.5% 戊二醛固定，随后用于切片后透射电镜观察自噬小体、线粒体微结构。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	探索抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 调节的 mTORC1/ULK1 自噬信号通路对脓毒症小鼠心肌损伤的作用
模型与所研究疾病的关系	通过盲肠结扎穿刺术模拟腹腔感染构建脓毒症模型
选择动物的条件	雄性昆明小鼠，健康清洁级，8 周龄，体质量 25-30 g
动物品系	雄性昆明小鼠购于贵州医科大学实验动物中心
造模技术描述	根据前期建模经验 [6]，采用盲肠结扎穿刺术建立脓毒症小鼠模型，于腹正中偏左作约 1 cm 长的竖直切口，找到盲肠在其 1/2 处结扎，22 号针头在不同穿刺点来回刺穿盲肠末端 2 次 (避开血管位置)，轻轻挤出少许肠内容物，随后将盲肠还纳腹腔并逐层缝合
动物数量及分组方法	将 30 只小鼠随机分为 5 组，假手术组、模型组、模型 +C25-140 (模型 +C) 组、模型 +C25-140+3-MA(模型 +C+3-MA) 组，模型 +C25-140+MHY1485(模型 +C+M) 组，每组 6 只
造模成功评价指标	小鼠出现毛发竖立、活动减少、对刺激的反应减退、呼吸减慢、半睁眼及眼眶分泌物，以及心肌组织病理变化
造模后实验观察指标	① C25-140 对模型小鼠心肌组织肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的抑制作用；②心肌组织病理变化及细胞凋亡情况；③心肌组织炎症与凋亡相关蛋白的变化；④心肌组织超微结构；⑤心肌组织自噬相关蛋白表达；⑥心肌组织自噬蛋白与 mTORC1/ULK1 通路蛋白的变化
造模过程中动物死亡原因	模型组小鼠死亡 2 只，模型 +C 组死 1 只，模型 +C+3-MA 组死 2 只，模型 +C+M 组死 2 只；符合盲肠结扎穿刺术建立的脓毒症模型死亡率
如何补充造模过程中缺失的动物	样本量至少有 3 次重复，无需补充
造模后动物处理	术后 24 h 麻醉后采用断头法处死小鼠，开胸暴露心脏，生理盐水灌洗后，取左心室最大横径冠状切面的心肌组织
伦理委员会批准	动物实验符合贵州医科大学动物实验伦理委员会审批规范，批准号：2200656

1.4.4 心肌组织 TUNEL 染色 标本采集、脱水、包埋、切片、脱蜡，柠檬酸微波修复 8 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min；暗处配制荧光 TUNEL 孵育液 (A ∶ B=1 ∶ 30) 放入 37 ℃温箱孵育 1 h；PBS 洗 3 次，每次 5 min，加 DAPI 染细胞核 15 min，PBS 冲洗，甘油明胶封固。检测小鼠心肌细胞凋亡情况，在 520 nm 荧光下观察绿色荧光为凋亡细胞，在 460 nm 荧光下观察蓝色荧光为正常细胞。

1.4.5 Western blot 检测蛋白表达 从 −80 ℃冰箱取出心肌组织 30 mg，加入 RIPA 组织裂解液 300 μL，剪碎组织后超声波碎裂组织 3 次，冰上裂解 30 min。在 4 ℃恒温离心机 12 000 r/min 离心 20 min，收集上清后 BCA 定量测蛋白浓度。加上样缓冲液煮沸变性后保存备用。依据分子质量选用 8%，10%，12% 的 SDS-PAGE 凝胶，电泳，转膜，封闭，孵育一抗 (肿瘤坏死因子受体相关因子 6、beclin-1、P62、微管相关蛋白 1 轻链 3、核因子 κB P65、磷酸化核因子 κB P65、Bcl2、Bax 抗体稀释比例均为 1 ∶ 1 000；mTOR、p-mTOR、ULK1、p-ULK1 为 1 ∶ 750，内参 GAPDH 为 1 ∶ 30 000)，4 ℃摇床孵育过夜；孵育兔二抗 (1 ∶ 15 000)2 h，ECL 曝光显影，Image J 软件

对条带灰度值分析。

1.4.6 RT-qPCR 检测心肌组织肿瘤坏死因子受体相关因子 6 mRNA 的相对表达量　依据 Trizol 试剂说明书操作提取心肌组织总 RNA，测定浓度 A_{260}/A_{280} 在 1.8–2.0 之间，将 RNA 反转录成 cDNA。然后依据 qPCR 的反应体系 20 μL，经过预变性、变性、退火 / 延伸、扩增。每组设 3 个复孔；以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算肿瘤坏死因子受体相关因子 6 mRNA 的相对表达量。引物序列从 5'–3' 所示：肿瘤坏死因子受体相关因子 6-F：GGA AGA GCA GTC GTT TCC TG；肿瘤坏死因子受体相关因子 6-R：GTC ACA CCT CTA CGG GGA AA；GAPDH-F：GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA；GAPDH-R：TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC。

1.5 主要观察指标　① C25-140 对模型小鼠心肌组织肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的抑制作用；②心肌组织的炎性损伤变化；③心肌细胞凋亡情况；④心肌组织中炎症与凋亡相关蛋白的变化；⑤心肌组织中自噬小体、线粒体微结构；⑥心肌组织中自噬相关蛋白的变化；⑦心肌组织中自噬蛋白与 mTORC1/ULK1 通路蛋白的变化关系。

1.6 统计学分析　采用 SPSS 25.0 对数据进行统计分析，符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较单因素方差分析 (One-way ANOVA)，组间比较使用 t 检验；检验水准取 α=0.05，P < 0.05 为差异有显著性意义；使用 GraphPad Prism 9.0 绘制统计图。该文的统计学方法已经通过贵州医科大学基础医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析　假手术组全部存活；模型组在术后 24 h 内小鼠死亡 2 只，模型 +C 组死亡 1 只，模型 +C+3-MA 组死亡 2 只，模型 +C+M 组死亡 2 只。为符合随机对照的原则，每组小鼠随机选取 3 个样本开展后续实验。

2.2 C25-140 对模型小鼠心肌组织肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的抑制作用　与假手术组比较，模型组肿瘤坏死因子受体相关因子 6 蛋白及 mRNA 表达升高 (P < 0.05)；与模型组比较，模型 +C 组、模型 +C+3-MA 组肿瘤坏死因子受体相关因子 6 蛋白及 mRNA 表达下降 (P < 0.05)，见图 **1**。

2.3 苏木精 – 伊红染色各组小鼠心肌组织的炎性损伤　光镜下可见假手术组小鼠心肌无炎症细胞浸润；模型组心肌炎症细胞浸润，心肌纤维排列稍不规则、纤维水肿；模型 +C 组心肌炎性细胞浸润、纤维水肿较模型组减轻；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组见炎症细胞浸润较明显，见图 **2**。

2.4 TUNEL 染色检测小鼠心肌细胞凋亡　荧光显微镜下可见假手术组小鼠心肌偶见单个细胞凋亡；模型组心肌细胞凋亡明显增多；与模型组比较，模型 +C 组心肌细胞凋亡明显减轻；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组心肌凋亡细胞增多，见图 **3**。

2.5 各组小鼠心肌组织中炎症与凋亡相关蛋白的变化　与假手术组比较，模型组小鼠心肌磷酸化核因子 κB P65/P65、Bax 表达升高，Bcl2 表达下降 (P < 0.05)；与模型组比较，模型 +C 组心肌磷酸化核因子 κB P65/P65、Bax 表达下降，Bcl2 表达升高 (P < 0.05)；与模型 +C 组比较，模型 +C+3-MA 组心肌磷酸化核因子 κB P65/P65、Bax 表达升高，Bcl2 表达下降 (P < 0.05)，见图 **4**。

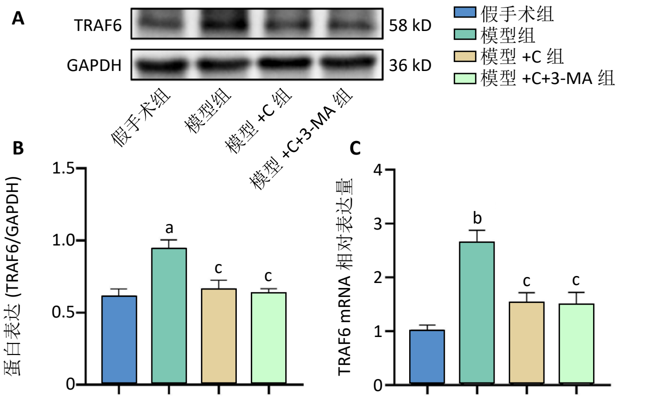
2.6 透射电镜观察各组小鼠心肌组织中自噬小体、线粒体微结构　透射电镜可见假手术组小鼠心肌线粒体排列正常，无肿胀，未见自噬小体；模型组心肌线粒体明显肿胀，排列紊乱，偶见自噬小体；与模型组比较，模型 +C 组心肌线粒体肿胀减轻，自噬小体增多；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组心肌见自噬小体数量明显减少，线粒体肿胀有加重，见图 **5**。

2.7 各组小鼠心肌组织中自噬相关蛋白的变化　与假手术组比较，模型组小鼠心肌 P62 表达升高 (P < 0.05)；与模型组比较，模型 +C 组心肌 P62 表达下降，Beclin-1 表达升高 (P < 0.05)；与模型 +C 组比较，模型 +C+3-MA 组心肌 P62 表达升高，Beclin-1 表达下降 (P < 0.05)，见图 **6**。

2.8 抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 后小鼠心肌组织中自噬蛋白与 mTORC1/ULK1 通路蛋白的变化关系　为进一步探索肿瘤坏死因子受体相关因子 6 是否调节 mTORC1/ULK1 通路参与模型小鼠心肌自噬过程，采用 Western blot 检测了 mTOR/ULK1 蛋白磷酸化和自噬相关蛋白的变化。与假手术组比较，模型组小鼠心肌肿瘤坏死因子受体相关因子 6、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 表达升高 (P < 0.05)；与模型组比较，模型 +C 组心肌肿瘤坏死因子受体相关因子 6、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 表达下降，Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ / Ⅰ表达升高 (P < 0.05)；与模型 +C 组比较，模型 +C+M 组心肌 p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 表达升高，Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ / Ⅰ表达下降 (P < 0.05)，见图 **7**。

3 讨论 Discussion

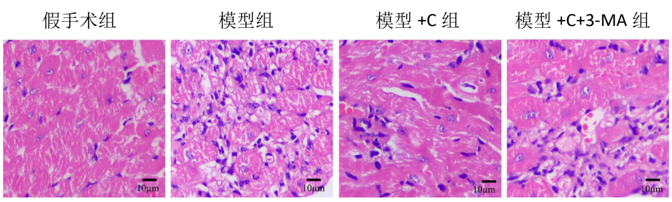
脓毒症炎症反应失调的后果是并发各器官功能障碍，心脏是脓毒症常见累及的靶器官，在脓毒症休克患者中，约 40% 的患者合并脓毒症心肌损伤，当脓毒症合并心功能障碍时死亡率可高达 50% 以上 [7]。临床上对该病无统一的规范性认识和指南，目前治疗原则是脓毒症原发病灶的处理、抗生素应用、液体复苏、血管活性药物维持循环稳定、加强各脏器保护等措施，但治疗效果不甚满意 [8]。此次研究拟从动物层面围绕抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 后促进心肌细胞自噬调节心肌细胞炎症、细胞凋亡的保护作用机制。



图注：图 A 为 Western blot 条带；图 B 为 TRAF6 蛋白相对表达量；图 C 为 TRAF6 mRNA 相对表达量。与假手术组比较，$^aP < 0.001$，$^bP < 0.000\ 1$；与模型组比较，$^cP < 0.001$。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。

图 1 | **各组小鼠心肌组织中的肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6) 蛋白及 mRNA 表达变化**

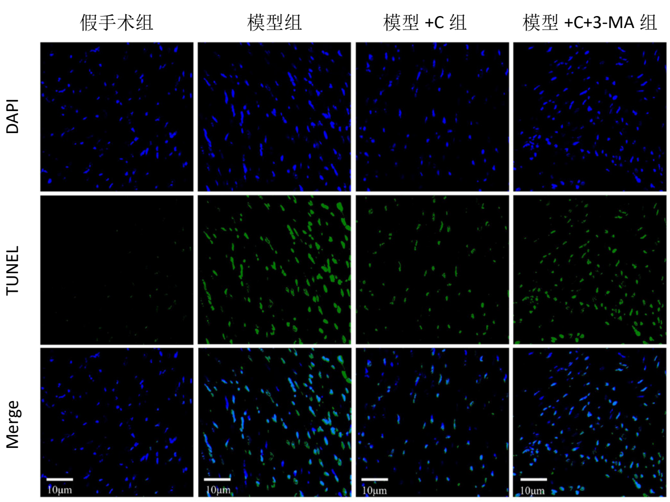
Figure 1 | **Changes of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) protein and mRNA expression in myocardial tissue of mice in each group**



图注：结果显示，模型组心肌炎症细胞浸润，心肌纤维水肿；模型 +C 组心肌炎性细胞浸润、纤维水肿较模型组减轻；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组炎症细胞浸润较明显。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。比例尺为 10 μm。

图 2 | **各组小鼠心肌组织病理变化 (苏木精 – 伊红染色)**

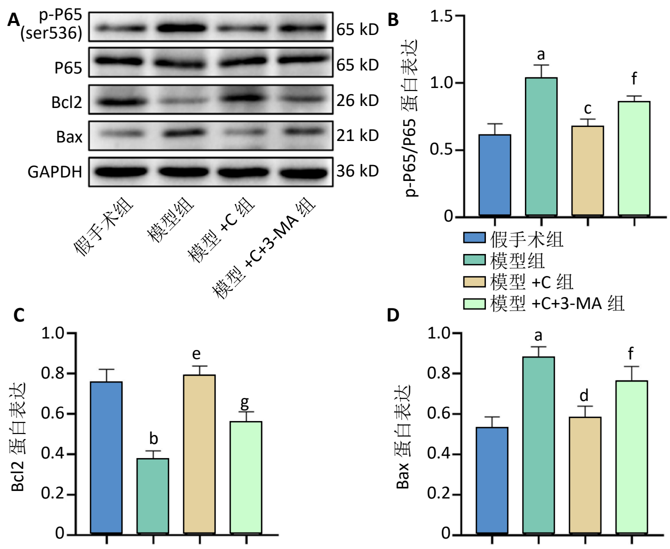
Figure 2 | **Pathological changes of myocardial tissue in each group of mice (hematoxylin-eosin staining)**



图注：蓝色荧光为正常细胞核；绿色荧光为凋亡细胞，并且与蓝色荧光重合。结果显示，模型组心肌细胞凋亡明显增多；模型 +C 组心肌细胞凋亡较模型组明显减轻；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组心肌凋亡细胞增多。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。比例尺为 10 μm。

图 3 | TUNEL 染色检测各组小鼠心肌细胞凋亡情况

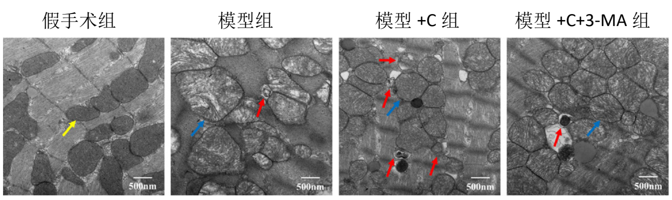
Figure 3 | **TUNEL staining to detect cardiomyocyte apoptosis in each group of mice**



图注：图 A 为 Western blot 条带；图 B 为磷酸化核因子 κB P65/P65 (p-P65/P65) 蛋白相对表达量；图 C 为 Bcl2 蛋白相对表达量；D 为 Bax 蛋白相对表达量。与假手术组比较，$^aP < 0.001$，$^bP < 0.000\ 1$；与模型组比较，$^cP < 0.01$，$^dP < 0.001$，$^eP < 0.000\ 1$；与模型 +C 组比较，$^fP < 0.05$，$^gP < 0.01$。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。

图 4 | **各组小鼠心肌组织中的炎症及凋亡相关蛋白表达变化**

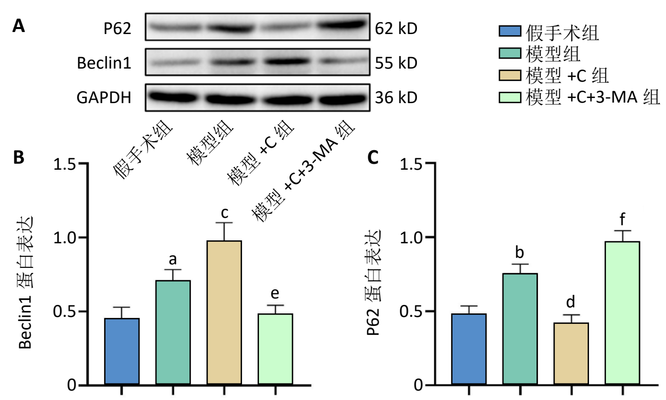
Figure 4 | **Changes in the expression of inflammation and apoptosis-related proteins in the myocardial tissue of mice in each group**



图注：结果显示，模型组心肌线粒体明显肿胀，偶见自噬小体；模型 +C 组心肌线粒体肿胀减轻，自噬小体增多；与模型 +C 组比较，模型 +C+3MA 组心肌自噬小体数量明显减少，线粒体肿胀有加重。图中黄色箭头是正常线粒体，红色箭头所示为自噬体，蓝色箭头所示为肿胀的线粒体。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。比例尺为 500 nm。

图 5 | **透射电镜观察心肌细胞自噬小体、线粒体微结构**

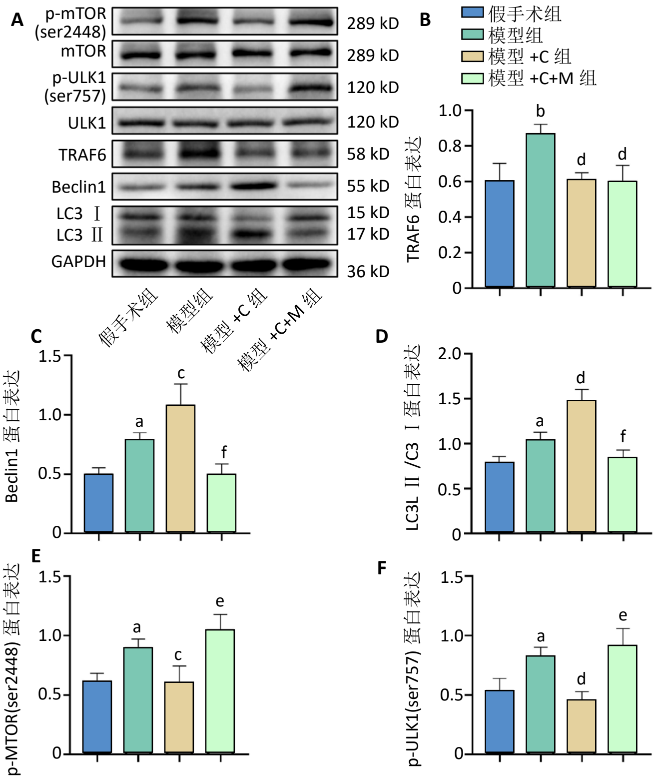
Figure 5 | **Transmission electron microscopy observation of autophagosomes and mitochondrial microstructures in cardiomyocytes**



图注：图 A 为 Western blot 条带；图 B 为 Beclin1 蛋白相对表达量；图 C 为 P62 蛋白相对表达量。与假手术组比较，$^aP < 0.05$，$^bP < 0.01$；与模型组比较，$^cP < 0.05$，$^dP < 0.001$；与模型 +C 组比较，$^eP < 0.001$，$^fP < 0.000\ 1$。组别中的 C 代表 C25-140，3-MA 代表 3- 甲基腺嘌呤。

图 6 | **各组小鼠心肌组织中的自噬蛋白表达变化**

Figure 6 | **Changes in the expression of autophagy proteins in myocardial tissue of mice in each group**



图注：图 A 为 Western blot 条带；图 B 为肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6) 蛋白相对表达量；图 C 为 Beclin1 蛋白相对表达量；图 D 为 LC3 Ⅱ /LC3 Ⅰ蛋白相对表达量；图 E 为 p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达量；图 F 为 p-ULK1/ULK1 蛋白相对表达量。与假手术组比较，[a]$P < 0.05$，[b]$P < 0.01$；与模型组比较，[c]$P < 0.05$，[d]$P < 0.01$；与模型 +C 组比较，[e]$P < 0.01$，[f]$P < 0.001$。mTOR：哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；ULK1：unc-51 样自噬激活激酶 1；LC3：微管相关蛋白 1 轻链 3。组别中的 C 代表 C25-140，M 代表 MHY1485。

图 7 | **各组小鼠心肌组织中的蛋白表达变化**

Figure 7 | **Changes of protein expression in myocardial tissue of mice in each group**

当机体处于脓毒症状态时，Toll 样受体 (TLRs) 尤其是 Toll 样受体 4 介导的核因子 κB 信号通路，激活下游信号肿瘤坏死因子受体相关因子 6，产生大量肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β 等导致炎症风暴并加重脓毒症全身炎症反应和心肌功能损伤 [9]。在动物脓毒症模型中对肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的抑制表现出对器官组织的保护作用，可以减轻脓毒症小鼠肺损伤、血管内皮损伤等，提示肿瘤坏死因子受体相关因子 6 对脓毒症器官功能的保护发挥重要潜在作用 [10-11]。此次实验使用特异性抑制剂 C25-140 抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6，苏木精 – 伊红染色观察心肌病理炎性细胞浸润减少。肿瘤坏死因子受体相关因子 6 处于核因子 κB 炎症信号通路的上游关键节点，降低其表达是抑制核因子 κB 炎症信号通路激活、阻断炎症信号通路的关键环节。

心肌细胞凋亡是脓毒症发生各脏器功能障碍的发病机制之一，调节细胞凋亡能改善脓毒症心肌损伤 [12]。ZHU 等 [13] 研究表明，过表达 miR-150-5p 在脂多糖构建的脓毒症休克模型大鼠中调节凋亡蛋白的变化，改善心肌细胞凋亡减轻心肌抑制。XIAO 等 [14] 研究显示，苦参碱调节 PI3K/AKT 通路活性抑制细胞凋亡和铁死亡，从而减轻脓毒症诱发的心肌损伤。

细胞自噬和凋亡的交互作用共同参与脓毒症心肌损伤的病理生理过程 [15]。当自噬不足时，采取促进心肌细胞自噬的方法可改善心肌细胞凋亡 [16]。WU 等 [17] 研究显示，木犀草素在脂多糖诱导的脓毒症心肌病小鼠模型中具有增强心肌自噬和缓解心肌细胞凋亡的作用，加用自噬抑制剂 3-MA 后心肌细胞自噬受到抑制，心肌细胞凋亡增加，表明木犀草素可促进细胞自噬减轻脓毒症诱发的心肌损伤。WANG 等 [18] 研究显示，枣苷 A 通过增强心肌细胞自噬，明显改善心肌细胞凋亡和氧化应激，改善脓毒症心肌病模型小鼠的心肌损伤。此次实验中，使用特异性抑制剂 C25-140 抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 后，透射电镜观察心肌组织细胞自噬小体数量增多，肿胀的线粒体缓解，TUNEL 染色见凋亡细胞数量减少，Western blot 检测心肌组织 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ / Ⅰ、Bcl2 蛋白表达增加，P62、Bax 蛋白减少，表明抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 可增强心肌细胞自噬和减少细胞凋亡，苏木精 – 伊红染色提示心肌组织炎性细胞浸润减少；当给予自噬抑制剂 3-MA 后，部分逆转了 C25-140 对心肌炎性损伤和细胞凋亡的保护作用，进而可以得出抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 促进心肌自噬调节心肌细胞凋亡参与改善脓毒症心肌炎症损伤的结论。

mTOR 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶，分为 mTOR 复合体 1 和复合体 2(mTORC1，mTORC2)，具有调节细胞生长和代谢等作用 [19]。mTORC1 作为自噬的主要调节因子发挥负调节作用 [20]。ULK1 复合物由 ULK1、自噬相关蛋白 13(autophagy-related protein 13，Atg13)、自噬相关蛋白 101(autophagy-related protein 101，Atg101)、黏着斑激酶家族相互作用蛋白 200(focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa，FIP200) 组成，ULK1 激活是自噬所必需的并调节自噬体的起始步骤 [21-23]。既往的多项研究表明，自噬起始源于 ULK1 复合物活性的激活，靶向敲低会抑制自噬体的形成，说明 ULK1 是自噬启动机制的重要核心激酶之一 [22，24]。当饥饿或氨基酸缺乏的情况下，mTORC1 活性被抑制，自噬相关蛋白 13 被去磷酸化，其对 ULK1 的亲和力增加，聚集成自噬体前结构最终激活 ULK1，进一步募集下游的自噬相关蛋白，触发自噬的形成 [21，25-26]。mTORC1 促进 ULK1 ser757 位点磷酸化抑制 ULK1 的活性降低自噬水平 [27-28]。LINARES 等 [29] 研究表明，氨基酸激活的营养细胞中存在的肿瘤坏死因子受体相关因子 6 促进 mTORC1 的激活。此次实验中 Western blot 检测显示模型组小鼠心肌组织中肿瘤坏死因子受体相关因子 6、p-mTOR(ser2448)、p-ULK1(ser757) 表达升高，自噬

小体减少，促自噬蛋白表达降低，模型小鼠心肌自噬与严重的炎症反应不相适应，可能是肿瘤坏死因子受体相关因子 6 促进 mTORC1 的磷酸化抑制 ULK1 的活性；抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 后，p-mTOR(ser2448)/mTOR、p-ULK1 (ser757)/ULK1 表达下降，自噬蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ / Ⅰ表达增加，电镜示自噬小体增多，促进心肌细胞自噬水平；当抑制自噬后心肌炎性损伤和凋亡有增加，部分降低了对心肌损伤的保护作用。与模型 +C 组比较，模型 +C+M 组小鼠外源性使用 mTORC1 特异性激动剂 MHY1485 后，心肌组织中 mTOR、ULK1 蛋白的磷酸化水平升高，自噬蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ / Ⅰ表达下降，也从侧面证明了模型小鼠心肌组织中抑制 mTORC1 的激活也是增强自噬的关键环节。WU 等 [30] 研究与此次研究结果得出基本一致的结论，在骨肉瘤细胞中敲低激光激酶 B 抑制 mTOR/ULK1 信号通路促进自噬抑制骨肉瘤转移，予 MHY1485 激活 mTOR 的磷酸化抑制自噬后促进肿瘤细胞迁移和侵袭。表明抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 负调节 mTOR、ULK1 的磷酸化水平促进自噬参与保护脓毒症小鼠心肌细胞的病理生理过程。

此次研究也存在不足之处，实验仅在动物模型层面开展，与临床脓毒症患者存在差异；脓毒症心肌自噬存在动态变化的过程，未在多个时间点分析自噬变化对脓毒症心肌损伤病程进展的影响；肿瘤坏死因子受体相关因子 6 是否直接促进 mTORC1 的磷酸化进而抑制 ULK1 的活性下调自噬水平，有待于在细胞层面进一步完善免疫共沉淀、质谱分析等研究明确。

作者贡献：周颖、方昊负责实验设计，田勇、古雍翔负责实验实施，钟芝梅负责实验数据统计，周颖成文，方昊审校。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

出版规范：文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] L'HEUREUX M, STERNBERG M, BRATH L, et al. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: a Comprehensive Review. Curr Cardiol Rep. 2020;22(5):35.

[2] 中国中西医结合学会重症医学专业委员会 , 中国医师协会中西医结合医师分会心脏介入专业委员会 . 脓毒性心肌病中西医结合诊治专家共识 [J]. 中国中西医结合急救杂志 ,2022,29(1):1-6.

[3] GUO Y, ZHANG X, LI J, et al. TRAF6 regulates autophagy and apoptosis of melanoma cells through c-Jun/ATG16L2 signaling pathway. MedComm (2020). 2023;4(4):e309.

[4] HUA T, YANG M, SONG H, et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF6 axis. J Nanobiotechnology. 2022;20(1):324.

[5] WU C, ZENG L, YI W, et al. Echovirus induces autophagy to promote viral replication via regulating mTOR/ULK1 signaling pathway. Front Immunol. 2023;14:1162208.

[6] 周颖 , 蒋大军 , 田勇 , 等 . 抑制 TRAF6 调节炎症和自噬改善脓毒症小鼠的心肌损伤和心功能 [J]. 实用医学杂志 ,2024,40(5):608-614.

[7] YAO H, LIU S, ZHANG Z, et al. A bibliometric analysis of sepsis-induced myocardial dysfunction from 2002 to 2022. Front Cardiovasc Med. 2023;10:1076093.

[8] KHALID N, PATEL PD, ALGHAREEB R, et al. The Effect of Sepsis on Myocardial Function: A Review of Pathophysiology, Diagnostic Criteria, and Treatment. Cureus. 2022;14(6):e26178.

[9] 宁海慧 , 郭娜 , 邢博民 , 等 . 炎症相关信号通路在脓毒症中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志 ,2022,38(7):744-747.

[10] LIU X, LIN Z, XU Y. Pellino1 promoted inflammation in lung injury model of sepsis by TRAF6/ NF-κB signal pathway. J Inflamm (Lond). 2021;18(1):11.

[11] FENG D, GUO R, LIAO W, et al. Plantamajoside alleviates acute sepsis-induced organ dysfunction through inhibiting the TRAF6/NF-κB axis. Pharm Biol. 2023;61(1):897-906.

[12] SHENG SY, LI J M, HU XY, et al. Regulated cell death pathways in cardiomyopathy. Acta Pharmacol Sin. 2023;44(8):1521-1535.

[13] ZHU XG, ZHANG TN, WEN R, et al.Overexpression of miR-150-5p Alleviates Apoptosis in Sepsis-Induced Myocardial Depression. Biomed Res Int. 2020;2020:3023186.

[14] XIAO Y, YU Y, HU L, et al. Matrine Alleviates Sepsis-Induced Myocardial Injury by Inhibiting Ferroptosis and Apoptosis. Inflammation. 2023;46(5):1684-1696.

[15] PRERNA K, DUBEY VK. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. Int J Biol Macromol. 2022;204:258-273.

[16] BI CF, LIU J, YANG LS, et al. Research Progress on the Mechanism of Sepsis Induced Myocardial Injury. J Inflamm Res. 2022;15:4275-4290.

[17] WU B, SONG H, FAN M, et al. Luteolin attenuates sepsis-induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice. Int J Mol Med. 2020;45(5):1477-1487.

[18] WANG Z, XIAO D, JI Q, et al. Jujuboside A attenuates sepsis-induced cardiomyopathy by inhibiting inflammation and regulating autophagy. Eur J Pharmacol. 2023;947:175451.

[19] SZWED A, KIM E, JACINTO E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. Physiol Rev. 2021;101(3):1371-426.

[20] BATTAGLIONI S, BENJAMIN D, WÄLCHLI M, et al. mTOR substrate phosphorylation in growth control. Cell. 2022;185(11):1814-1836.

[21] TURCO E, FRACCHIOLLA D, MARTENS S. Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. J Mol Biol. 2020;432(1):123-134.

[22] CAI YY, LI L, ZHU XM, et al. The crucial role of the regulatory mechanism of the Atg1/ULK1 complex in fungi. Front Microbiol. 2022;13:1019543.

[23] LIU N, ZHAO H, ZHAO YG, et al. Atlastin 2/3 regulate ER targeting of the ULK1 complex to initiate autophagy. J Cell Biol. 2021;220(7):e202012091.

[24] LIU L, YAN L, LIAO N, et al. A Review of ULK1-Mediated Autophagy in Drug Resistance of Cancer. Cancers (Basel). 2020;12(2):352.

[25] HOLCZER M, HAJDÚ B, LŐRINCZ T, et al. Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. Sci Rep. 2020;10(1):17803.

[26] HOLLENSTEIN D M, KRAFT C. Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure.Curr Opin Cell Biol. 2020;65:50-57.

[27] HAN S, LI X, WANG K, et al. PURPL represses autophagic cell death to promote cutaneous melanoma by modulating ULK1 phosphorylation. Cell Death Dis. 2021;12(11):1070.

[28] RONG Z, ZHENG K, CHEN J, et al. Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology. Gene. 2022;840:146772.

[29] LINARES JF, DURAN A, YAJIMA T, et al. K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. Mol Cell. 2013;51(3):283-296.

[30] WU X, LIU JM, SONG HH, et al. Aurora-B knockdown inhibits osteosarcoma metastasis by inducing autophagy via the mTOR/ULK1 pathway. Cancer Cell Int. 2020;20(1):575.

(责任编辑：WZH，ZN，QY，ZLJ)