

杨桃根活性成分DMDD对糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用及其与NCOA4/FTH1/ATG8轴的相关性研究[△]

陈永欣*, 李宇轩, 顾凯磊, 尤佳俊, 孙小涵, 马 静, 周艳平, 韦晓洁[#](广西中医药大学基础医学院生理学教研室, 南宁 530200)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)09-1141-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.09.06



摘要 **目的** 基于核受体共激活因子4/铁蛋白重链1/自噬相关蛋白8(NCOA4/FTH1/ATG8)轴探讨杨桃根活性成分2-十二烷基-6-甲氧基-2,5-二烯-1,4-环己二酮(DMDD)对糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用。**方法** 将造模成功的糖尿病小鼠随机分为模型组和DMDD低、中、高剂量组(12.5、25、50 mg/kg),另设不造模的对照组,每组6只。各组小鼠分别灌胃相应药液或生理盐水,每天1次,连续21 d。给药结束后,检测小鼠空腹血糖(FBG)、血清中乳酸脱氢酶(LDH)及肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)水平;观察心肌病理变化、纤维化程度及心肌细胞超微结构;检测心肌细胞死亡指数、NCOA4蛋白阳性指数;检测心肌组织中NCOA4、FTH1、ATG8、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)及谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌损伤明显缓解,心肌细胞超微结构亦有不同程度改善;小鼠FBG,血清中LDH、CK-MB水平,心肌细胞死亡指数、NCOA4蛋白阳性指数,心肌组织中NCOA4、FTH1、ATG8蛋白表达水平均显著降低($P<0.001$),而SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均显著升高($P<0.001$)。**结论** DMDD可降低糖尿病小鼠血糖水平,减轻心肌组织病理损伤,并抑制细胞死亡,其机制与抑制NCOA4/FTH1/ATG8轴过度激活、减少铁自噬有关。

关键词 杨桃根;DMDD;NCOA4/FTH1/ATG8轴;糖尿病心病;铁自噬

Protective effect of the active component DMDD from *Averrhoa carambola* root on myocardial injury in diabetic mice and its correlation with the NCOA4/FTH1/ATG8 axis

CHEN Yongxin, LI Yuxuan, GU Kailei, YOU Jiajun, SUN Xiaohan, MA Jing, ZHOU Yanping, WEI Xiaojie (Dept. of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the protective effect of 2-dodecyl-6-methoxy-2, 5-diene-1, 4-cyclohexanedione (DMDD), an active component from *Averrhoa carambola* root, on myocardial injury in diabetic mice based on the nuclear receptor coactivator 4/ferritin heavy chain 1/autophagy-related protein 8 (NCOA4/FTH1/ATG8) axis. **METHODS** The successfully modeled diabetic mice were randomly divided into model group and DMDD low-, medium-, and high-dose (12.5, 25, 50 mg/kg) groups, while an additional non-modeled control group was established, with 6 mice in each group. Each group received the corresponding drug solution or an equal volume of normal saline intragastrically once daily for 21 consecutive days. After the administration, the levels of fasting blood glucose (FBG), serum lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) were measured. Myocardial pathological changes, degree of fibrosis, and myocardial cell ultrastructure were observed. Myocardial cell death index and NCOA4 protein positive index were detected. The protein expression levels of NCOA4, FTH1, ATG8, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in cardiac tissue were measured. **RESULTS** Compared with model group, each DMDD group showed significant alleviation of cardiac pathological injury and varying degrees of improvement in the myocardial cell ultrastructure. The FBG and serum LDH and CK-MB levels, the myocardial cell death index and NCOA4 protein positive index, the protein expression levels of NCOA4, FTH1, and ATG8 in cardiac tissue were significantly decreased ($P<0.001$), while the protein expression levels of SLC7A11 and GPX4 were significantly increased ($P<0.001$). **CONCLUSIONS** DMDD can reduce blood glucose levels, alleviate myocardial histopathological injury, and inhibit cell death in diabetic mice. The mechanism is associated with

[△] **基金项目** 国家自然科学基金项目(No.82260881, No.82560873); 大学生创新训练计划(No.202510600027, No.X202510600055, No.X202510600011); 广西中医药大学大学生科研训练课题(No.2024DXS05)

* **第一作者** 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 天然产物防治代谢性疾病的基础研究。E-mail: 965643897@qq.com

[#] **通信作者** 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中草药天然产物防治代谢性疾病的基础研究。E-mail: 116190888@qq.com

inhibiting excessive activation of the NCOA4/FTH1/ATG8 axis and reducing ferritinophagy.

KEYWORDS *Averrhoa carambola* root; DMDD; NCOA4/FTH1/ATG8 axis; diabetic cardiomyopathy; ferritinophagy

糖尿病已成为全球性重大公共卫生难题。我国成年人的糖尿病患病率持续上升,其并发症严重影响患者的生活质量与预后^[1]。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)作为糖尿病常见且严重的心脏并发症,其特征为在排除高血压、冠心病等其他心脏疾病的前提下,心肌结构与功能发生进行性损害,最终可进展为心力衰竭,是导致糖尿病患者心血管死亡的重要原因之一^[2]。DCM的发病机制复杂,涉及高糖诱导的氧化应激、炎症反应、自噬紊乱、细胞凋亡与焦亡等多个病理过程,这些因素共同导致心肌纤维化、心室重构以及心功能下降^[3]。目前,DCM的临床治疗仍以血糖控制、血压管理以及心力衰竭常规药物干预为主。尽管钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂等新型药物在改善心力衰竭预后方面展现出一定潜力,但糖尿病相关心力衰竭的病死率仍居高不下^[4]。因此,深入探究DCM的分子机制,并探寻具有多靶点、多通路调控特性的新型治疗策略,具有重要的临床意义与科学价值。

中医药在糖尿病及其并发症的防治领域积累了丰富的临床实践经验。杨桃根为酢浆草科五敛子属植物杨桃(*Averrhoa carambola* L.)的干燥根,是广西地区常用药材,具有行气活血、祛风止痛的功效^[5]。本课题组前期研究发现,杨桃根提取物及其活性成分2-十二烷基-6-甲氧基-2,5-二烯-1,4-环己二酮(2-dodecyl-6-methoxy-2,5-diene-1,4-cyclohexanedione, DMDD)可显著改善糖尿病大鼠的糖脂代谢紊乱,减轻心肌氧化应激损伤,并抑制高糖诱导的心肌细胞过度自噬与凋亡,提示DMDD在糖尿病心肌保护方面具有潜在应用价值^[6]。然而,其具体作用靶点及信号调控网络尚未完全阐明。

研究表明,核受体共激活因子4(nuclear receptor co-activator 4, NCOA4)介导的铁自噬参与糖尿病心肌损伤的发生发展过程^[7]。NCOA4介导的铁自噬是调控细胞铁稳态的核心途径之一,NCOA4通过N端与铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)的 α 螺旋区特异性结合,然后沿微管将铁蛋白-自噬体复合物定向转运至溶酶体,进而促进自噬体与溶酶体融合,使铁蛋白在酸性环境下降解并释放可利用的铁离子,最终启动铁自噬^[8]。自噬相关蛋白8(autophagy-related protein 8, ATG8)参与自噬小体的形成^[9],其在铁自噬过程中与NCOA4-铁蛋白复合物结合,最终促使自噬体形成。目前,NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白的异常表达能否作为DCM的药物干预靶点,尚不清楚。

本课题组前期研究发现,DMDD不仅能够抑制糖尿病肾病中过度的自噬与内质网应激,还可调控钙信号以及肌醇需求酶1 α 通路^[5]。结合DMDD在糖尿病小鼠不同器官中呈现出的抗氧化、抗自噬以及铁稳态调节潜力,本研究主要探究杨桃根活性成分DMDD是否可通过调控NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白的表达,减少糖尿病小鼠心肌细胞死亡,进而发挥心肌保护作用,以期DCM的防治提供新的药物靶点和理论依据,同时为中药活性成分在代谢性心血管疾病中的应用提供实验支撑。

1 材料

1.1 实验动物与饲料

本研究所用动物为SPF级雄性C57BL/6J小鼠,共30只,6~8周龄,体重(20 \pm 2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2021-0002。动物饲养环境通风良好,室温18~25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~70%,12 h光照昼夜循环。本实验已获得广西中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(编号为DW20231016-223)。高糖高脂饲料购自北京博爱港生物技术有限公司。

1.2 主要药品与试剂

杨桃根活性成分DMDD由本课题组自行制备,经硅胶柱层析梯度洗脱、薄层色谱法检测,纯度不低于80%;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司;戊二醛、1%钼酸、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(货号分别为P1120、O1120、G1120)均购自北京索莱宝科技有限公司;Masson染色试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、兔抗 β -微管蛋白(β -tubulin)多克隆抗体、兔抗FTH1多克隆抗体、兔抗溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)多克隆抗体、兔抗谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)多克隆抗体(货号分别为GP1032、GB23303、GB11017、GB112933、GB115276、GB113745)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;TUNEL染色试剂盒(货号E-CK-A320)购自武汉伊莱瑞特科技股份有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)试剂盒(货号分别为A020-2、H197-1-2)均购自南京建成生物工程研究所;兔抗NCOA4单克隆抗体(货号ab314553)购自英国Abcam公司;兔抗ATG8多克隆抗体(货号DF10158)购自美国Affinity Biosciences公司。

1.3 主要仪器

7100型全自动生化分析仪、HITACHI-7650型透射电镜均购自日本Hitachi公司;LV100POL/50IPOL型光学显微镜购自日本Nikon公司;EVOS FL型全自动细胞成像系统购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Mini PROTEAN[®]Tetra Cell型电泳槽、UNHOOD II型凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司;卓越型血糖仪及配套的卓越金锐血糖试纸购自德国Roche公司。

2 方法

2.1 造模、分组与干预

小鼠适应性喂养1周后,随机选取6只作为对照组,饲喂普通饲料;剩余24只小鼠给予高糖高脂饲料喂养4周,造模前禁食12 h,随后经尾静脉注射STZ溶液(100 mg/kg)。72 h后,从小鼠尾静脉取血测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),当FBG>11.1 mmol/L时,判定为糖尿病小鼠造模成功^[10]。将造模成功的24只小鼠随机分为模型组及DMDD低、中、高剂量组(12.5、25、50 mg/kg,剂量根据本课题组前期预实验结果设置,助溶剂为吐温-80),每组6只。DMDD各剂量组小鼠每天上午空腹灌胃相应药液,模型组与对照组小鼠灌胃等体积生理盐水,灌胃体积均为10 mL/kg,每天1次,连续21 d。

2.2 小鼠血糖测定

末次给药后,通过尾尖采血法采集小鼠微量全血样本,使用血糖仪及配套试纸检测其FBG水平,以评估药物的干预效果。

2.3 样本采集

尾尖采血结束后,采用异氟烷吸入法对小鼠进行麻醉,随后通过眼球摘除术采集血液样本。采集后的血液在室温下静置1 h,待其自然凝固分层后,于4℃条件下以3 000 r/min离心15 min。分离得到的血清转移至离心管中,置于-80℃冰箱保存,以备后续各项生化指标检测。处死各组小鼠,取部分心脏组织立即浸入4%甲醛溶液中固定,经标准石蜡包埋处理后制备切片,用于HE染色、Masson染色、TUNEL染色、免疫组化分析及透射电镜观察;剩余心脏组织迅速放入液氮中速冻,随后转移至-80℃冰箱保存,用于后续Western blot实验。

2.4 小鼠心肌损伤指标检测

取“2.3”项下每组6只小鼠血清适量,严格按照试剂盒说明书方法操作,采用比色法或酶联免疫吸附测定法测定血清中LDH、CK-MB水平。

2.5 小鼠心肌病理变化及纤维化程度观察

HE染色:取“2.3”项下每组6只小鼠心肌组织的石蜡切片,经脱蜡、水化处理后进行HE染色,随后采用光学显微镜观察小鼠心脏组织的病理变化。

Masson染色:另取“2.3”项下每组6只小鼠心肌组织的石蜡切片,经脱蜡、水化处理后,依次用苏木精染液、丽春红-酸性复红混合液染色,再经磷钼酸溶液分化,最后以苯胺蓝复染。染色完成后,按常规流程进行脱水、透明及封片操作,借助光学显微镜观察小鼠心肌组织的纤维化程度(胶原纤维呈蓝色,肌纤维等其他成分呈红色)。

2.6 小鼠心肌细胞超微结构观察

取“2.3”项下各组小鼠心肌组织的石蜡切片,经2.5%戊二醛与1%锇酸双重固定、丙酮梯度脱水后,以环氧树脂包埋并完成聚合;随后使用超薄切片机切片,经醋酸铀与柠檬酸铅双重染色后,采用透射电镜观察小鼠心肌细胞的超微结构。

2.7 小鼠心肌细胞死亡检测

取“2.3”项下小鼠心肌组织的石蜡切片,采用TUNEL染色试剂盒进行染色。首先对完成脱蜡、水化处理的切片进行蛋白酶消化,随后用磷酸盐缓冲液彻底冲洗;按试剂盒说明书推荐比例将TdT酶与荧光标记液充分混匀,滴加至切片表面,于37℃避光条件下孵育60 min。孵育结束后,使用DAPI对细胞核复染,在荧光显微镜下观察(死亡细胞的细胞核呈红色荧光信号);随机选取5个视野,统计死亡细胞数,并计算死亡指数(死亡指数=死亡细胞数/总细胞数×100%)。

2.8 小鼠心肌组织中NCOA4蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.3”项下各组小鼠心肌组织的石蜡切片,先进行脱蜡、水化处理,随后使用柠檬酸钠缓冲液开展抗原修复;依次用3%过氧化氢溶液与5%牛血清白蛋白溶液对切片进行封闭处理后,滴加稀释比例为1:1 000的NCOA4一抗,置于4℃条件下孵育过夜。待切片经磷酸盐缓冲液洗涤后,滴加稀释比例为1:5 000的二抗,于室温下孵育;经DAB显色、苏木精复染后,用中性树胶封片。采用光学显微镜观察,每张切片随机选取5个不重叠的高倍视野(400×),通过Image J软件进行分析:将图像转换为灰度模式,设定统一阈值以识别阳性区域,测量积分光密度值和区域总面积,并计算阳性指数。阳性指数=积分光密度值/区域总面积×100%,以此反映NCOA4蛋白的阳性表达量。

2.9 小鼠心肌组织中NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3”项下各组小鼠冻存的心肌组织适量,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,在冰浴条件下充分匀浆;随后于4℃条件下离心,收集上清液,采用BCA法测定总蛋白浓度。将蛋白样品变性处理后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电

泳,再电转移至PVDF膜;将膜置于5%脱脂奶粉溶液中,室温封闭1.5 h,然后滴加NCOA4、FTH1、ATG8、SLC7A11、GPX4、 β -tubulin一抗(稀释比例均为1:1 000)于4℃孵育过夜。次日,加入二抗(稀释比例为1:10 000)孵育1 h,最后通过ECL化学发光系统显影。所有Western blot实验均进行3次独立生物学重复,所得免疫印迹条带采用Image J软件进行分析,以目标蛋白与内参蛋白(β -tubulin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行分析,所有计量资料均满足正态分布,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。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

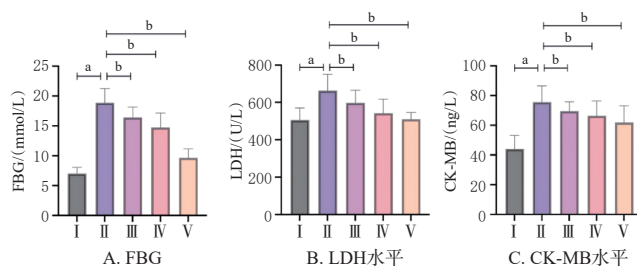
3 结果

3.1 DMDD对小鼠FBG及心肌损伤指标的影响

与对照组比较,模型组小鼠FBG及血清中LDH、CK-MB水平均显著升高($P<0.001$);与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠FBG及血清中LDH、CK-MB水平均显著降低($P<0.001$)。结果见图1。

3.2 DMDD对小鼠心肌病理变化及纤维化程度的影响

HE染色结果显示,对照组小鼠心肌组织形态正常,细胞染色均匀;与对照组比较,模型组小鼠心肌细胞着色不均,可见明显断裂、损伤及大量炎症细胞浸润;与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌组织损伤减轻,细胞着色趋于均匀。Masson染色结果显示,对照组小鼠心肌组织结构完整,肌纤维排列紧密有序,未见明显纤维



I: 对照组; II: 模型组; III: DMDD低剂量组; IV: DMDD中剂量组; V: DMDD高剂量组; a: 与对照组比较, $P<0.001$; b: 与模型组比较, $P<0.001$ 。

图1 各组小鼠FBG及血清中LDH、CK-MB水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

化;与对照组比较,模型组小鼠心肌组织可见散在的蓝色胶原纤维沉积;与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌纤维化程度得到明显改善。结果见图2。

3.3 DMDD对小鼠心肌细胞超微结构的影响

对照组小鼠心肌细胞超微结构完整,线粒体形态正常、嵴结构清晰,核膜光滑,未见明显病理改变;与对照组比较,模型组小鼠心肌细胞核膜皱缩,线粒体排列紊乱,部分线粒体肿胀、变性,线粒体嵴结构紊乱;与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌细胞超微结构均有不同程度改善。结果见图3。

3.4 DMDD对小鼠心肌细胞死亡的影响

与对照组比较,模型组小鼠心肌细胞死亡指数显著升高($P<0.001$);与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌细胞死亡指数均显著降低($P<0.001$)。结果见图4、图5。

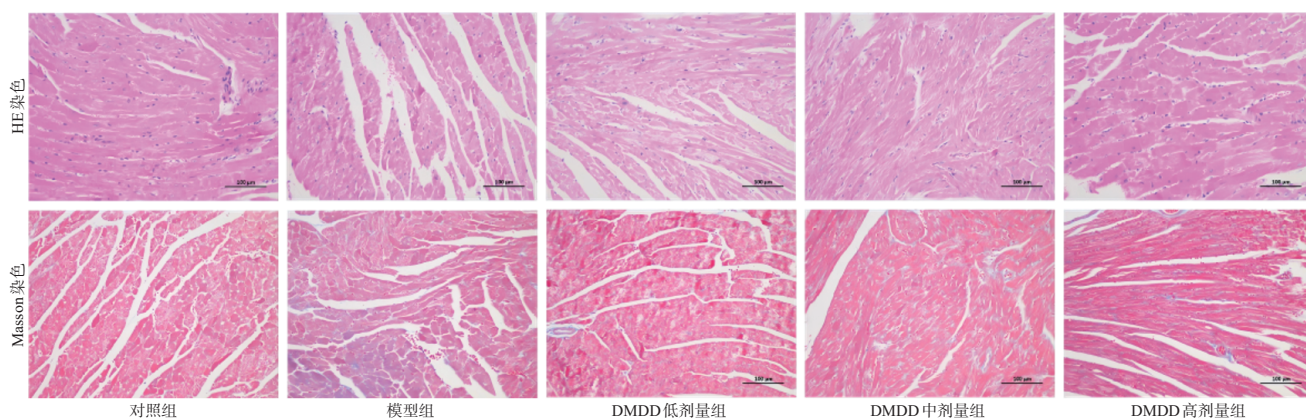


图2 各组小鼠心肌组织HE和Masson染色的显微图(标尺:100 μ m)

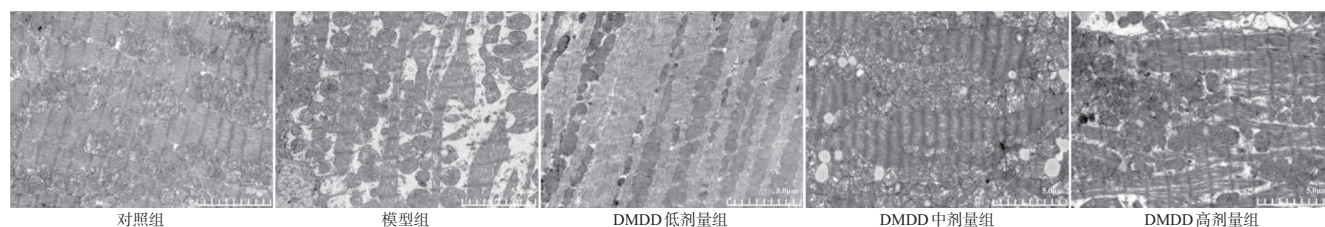
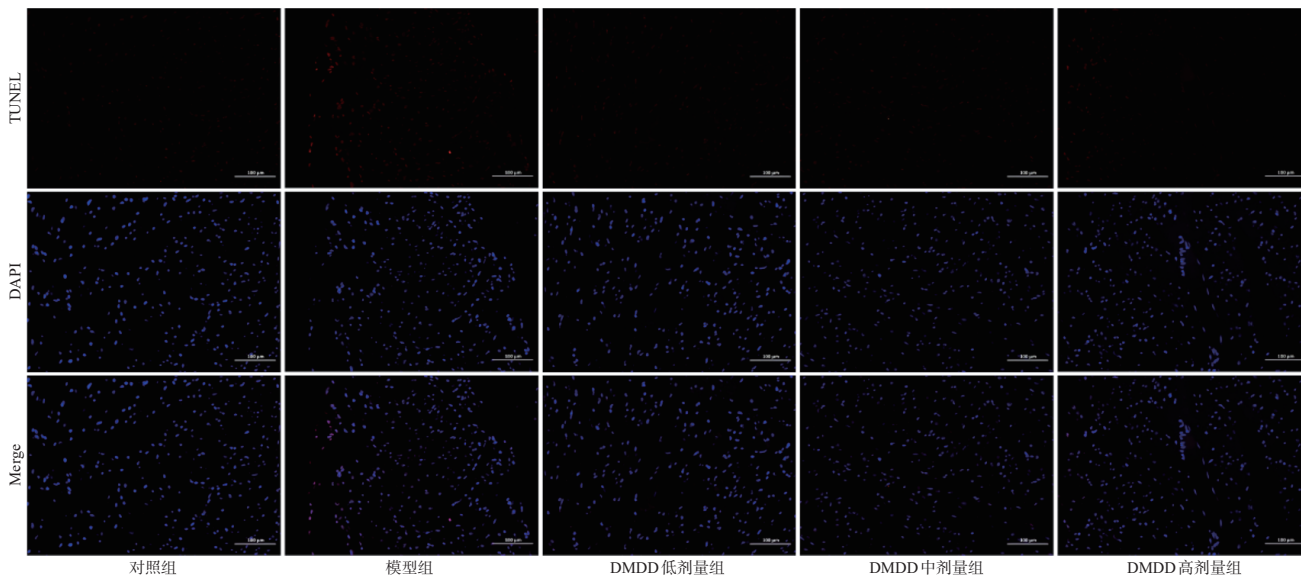
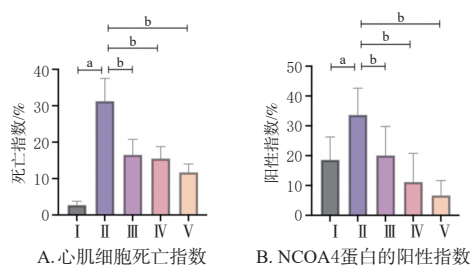


图3 各组小鼠心肌细胞超微结构透射电镜显微图(标尺:5 μ m)



注:红色荧光表示死亡细胞。

图4 各组小鼠心肌细胞死亡情况的显微图(TUNEL染色,标尺:100 μm)



I:对照组;II:模型组;III:DMDD低剂量组;IV:DMDD中剂量组;V:DMDD高剂量组;a:与对照组比较, $P<0.001$;b:与模型组比较, $P<0.001$ 。

图5 各组小鼠心肌细胞死亡指数、NCOA4蛋白的阳性指数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.5 DMDD对小鼠心肌组织中NCOA4蛋白阳性表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠心肌组织中NCOA4蛋白的阳性指数显著升高($P<0.001$);与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌组织中NCOA4蛋白的阳性指数均显著降低($P<0.001$)。结果见图5、图6。

3.6 DMDD对小鼠心肌组织中NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠心肌组织中NCOA4、FTH1、ATG8蛋白表达水平均显著升高($P<0.001$),而SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均显著降低($P<0.001$);与模型组比较,DMDD各剂量组小鼠心肌组织中

NCOA4、FTH1、ATG8蛋白表达水平均显著降低($P<0.001$),而SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均显著升高($P<0.001$)。结果见图7、图8。

4 讨论

本研究发现,糖尿病小鼠的血糖水平显著升高,同时心肌损伤指标CK-MB、LDH水平亦显著上升,提示小鼠糖尿病模型造模成功且已出现心肌损伤表现^[11]。经DMDD干预后,小鼠血糖水平得到一定程度控制,同时心肌损伤指标CK-MB、LDH水平也随之下落。这一结果表明,DMDD不仅具有一定的降血糖作用,还能减轻高糖环境对心肌细胞的损伤。

研究显示,DCM的发病机制极为复杂,涉及高糖及代谢紊乱引发的氧化应激、炎症反应、线粒体功能障碍、钙稳态失衡以及多种程序性细胞死亡模式的异常激活等多个病理环节^[12-14]。其中,心肌细胞的渐进性损伤是心功能持续恶化的结构基础,而细胞死亡、自噬等途径的失调,已被证实在此过程中发挥关键作用^[15]。近年来,铁自噬逐渐成为代谢性心血管疾病研究领域的前沿热点,其在糖尿病心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭等心血管病变中的作用已得到初步验证^[7,14]。探究铁自噬在糖尿病心肌损伤中的作用机制,或将为干预心肌细胞损伤提供新的靶点。本研究HE染色结果显示,糖尿病小鼠心肌组织出现明显病理改变,表现为心肌细胞着色不

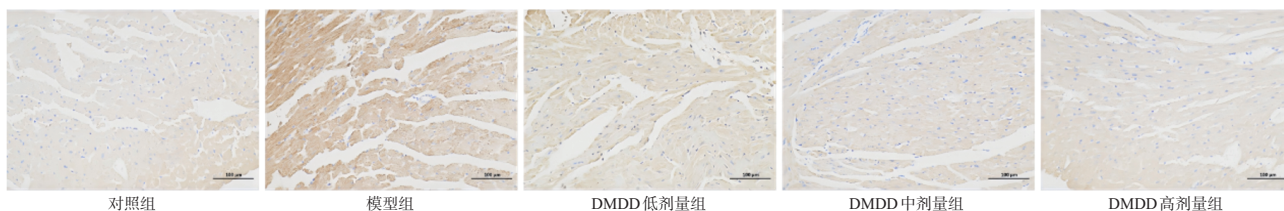
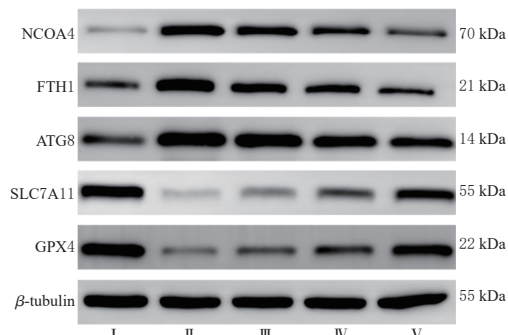
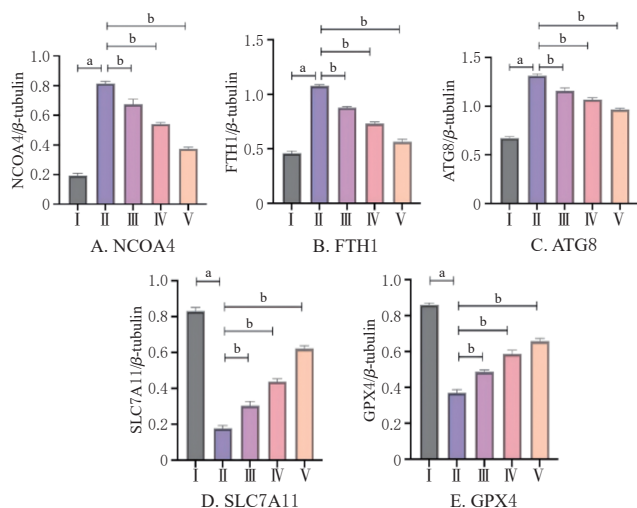


图6 各组小鼠心肌组织中NCOA4蛋白阳性表达的免疫组化显微图(标尺:100 μm)



I : 对照组; II : 模型组; III : DMDD低剂量组; IV : DMDD中剂量组; V : DMDD高剂量组。

图7 各组小鼠心肌组织中NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白表达电泳图



I : 对照组; II : 模型组; III : DMDD低剂量组; IV : DMDD中剂量组; V : DMDD高剂量组; a: 与对照组比较, $P < 0.001$; b: 与模型组比较, $P < 0.001$ 。

图8 各组小鼠心肌组织中NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

均、细胞断裂及大量炎症细胞浸润;而DMDD干预后可明显减轻上述病理损伤。透射电镜观察结果显示,糖尿病小鼠心肌细胞超微结构受损,表现为核膜皱缩、线粒体排列紊乱、部分线粒体肿胀变性及嵴结构紊乱;经DMDD干预后上述超微结构损伤均有不同程度改善。这些表现与铁自噬过程中线粒体的形态学改变高度一致^[7,14];经DMDD干预后,糖尿病小鼠心肌细胞的线粒体形态结构得到明显改善,嵴结构更为清晰,这进一步证实,DMDD的心肌保护作用与维持线粒体结构完整性密切相关。

鉴于线粒体结构损伤与铁自噬密切相关^[16],本研究进一步探究DMDD通过何种上游机制保护线粒体结构以发挥心肌保护作用。结合本课题组前期研究结果——DMDD可通过调控自噬通路减轻心肌细胞死亡^[6],本研究的TUNEL染色结果显示,糖尿病小鼠死亡的心肌细胞显著增多,经DMDD干预后,细胞死亡得到明显抑制;

同时免疫组化结果表明,NCOA4蛋白的阳性表达显著下调,这提示DMDD可能通过作用于NCOA4介导的铁自噬相关细胞死亡过程,发挥心肌保护效应。

近年来研究表明,NCOA4介导的铁自噬是调控细胞铁代谢的核心途径之一,而铁稳态对于维持心肌细胞正常代谢与存活至关重要^[17-18]。作为选择性自噬受体,NCOA4可特异性识别并结合铁蛋白复合物的主要成分FTH1,随后将其靶向运输至自噬溶酶体降解^[19];ATG8则是关键的自噬蛋白,通过独特的泛素样方式与自噬膜上的磷脂酰乙醇胺结合,参与自噬体形成^[20]。生理状态下,铁自噬可响应细胞铁需求,及时降解铁蛋白以释放铁离子;但该通路过度激活时,会导致FTH1大量降解、铁储存能力丧失,细胞内游离铁急剧增加^[21]。过量游离铁通过芬顿反应催化产生活性氧,引发脂质过氧化,最终导致细胞死亡^[14]。因此,NCOA4/FTH1/ATG8轴的平衡是维持心肌细胞铁稳态、防止铁自噬异常激活的关键环节。本研究结果显示,糖尿病小鼠心肌组织中NCOA4蛋白表达显著上调;同时,其介导的铁自噬关键蛋白FTH1降解增多,自噬标记蛋白ATG8表达亦有所上调。这提示糖尿病状态下,NCOA4介导的铁自噬通路异常激活,通过芬顿反应催化产生活性氧,加剧脂质过氧化,进而诱发心肌细胞死亡^[19]。本研究还发现,糖尿病小鼠心肌组织中SLC7A11和GPX4蛋白表达显著下调。SLC7A11是胱氨酸/谷氨酸逆向转运体的催化亚基,负责摄取胱氨酸以合成谷胱甘肽;GPX4则依赖谷胱甘肽将脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇,是细胞抵抗氧化性死亡的核心酶^[22];两者表达下调意味着糖尿病小鼠心肌细胞的抗氧化防御能力被削弱,进一步加剧心肌细胞损伤。经DMDD干预后,上述变化可被显著逆转,具体表现为抑制NCOA4过度表达、减少FTH1降解并下调ATG8表达,同时上调SLC7A11和GPX4表达。这些结果表明,DMDD能够调控NCOA4/FTH1/ATG8轴相关蛋白的表达,减少铁自噬、减轻脂质过氧化,进而抑制心肌细胞死亡、缓解糖尿病心肌损伤,并保护线粒体结构完整性。该机制与已报道的DMDD抗凋亡及调节自噬作用相互补充^[6],共同构成其多靶点保护机制。

综上所述,本研究证实DMDD可降低糖尿病小鼠血糖水平,减轻心肌组织病理损伤,并抑制细胞死亡,其机制与抑制NCOA4/FTH1/ATG8轴过度激活、减少铁自噬有关。然而,目前的研究证据主要基于蛋白表达的相关性分析,尚缺乏基因过表达或特异性抑制剂的挽救实验来明确严格的因果关系。未来,本课题组将通过开展NCOA4调控及挽救实验验证该靶点,以期为糖尿病心肌损伤的防治提供新的策略。

参考文献

- [1] ORTEGA H I, UDLER M S, GLOYN A L, et al. Diabetes mellitus polygenic risk scores: heterogeneity and clinical translation[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2025, 21(9):530-545.
- [2] KAMAKSHI SHRIYA A S, PAWAR V B, PAUL A A. Diabetic heart disease: an intricate interplay of a widespread metabolic disorder with the cardiovascular system[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2024, 21(6):e110724231859.
- [3] BELLEMARE M, BOURCIER L, IGLESIES-GRAU J, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy: focus on inflammation[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2025, 27(5):2326-2338.
- [4] PREDA A, MONTECUCCO F, CARBONE F, et al. SGLT2 inhibitors: from glucose-lowering to cardiovascular benefits[J]. *Cardiovasc Res*, 2024, 120(5):443-460.
- [5] SHI J M, WANG Y X, LIANG T, et al. DMDD, isolated from *Averrhoa carambola* L., ameliorates diabetic nephropathy by regulating endoplasmic reticulum stress-autophagy crosstalk[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1):125.
- [6] 马静, 吴娅妮, 黄德伦, 等. 杨桃根 DMDD 调控 ROS 介导的自噬通路减轻糖尿病大鼠心肌损伤[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(6):823-827.
- [7] ZHANG X Y, DONG X F, JIE H P, et al. Downregulation of the (pro)renin receptor alleviates ferroptosis-associated cardiac pathological changes via the NCOA4-mediated ferritinophagy pathway in diabetic cardiomyopathy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138:112605.
- [8] WANG Y, ZHANG Y, GAO M, et al. Lipocalin-2 promotes CKD vascular calcification by aggravating VSMCs ferroptosis through NCOA4/FTH1-mediated ferritinophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(11):865.
- [9] FUJIOKA Y, TSUJI T, KOTANI T, et al. Phase separation promotes ATG8 lipidation and vesicle condensation for autophagy progression[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2025, 32(11):2285-2295.
- [10] 谢静晓, 王誉湘, 张晓萍, 等. 杨桃根 DMDD 调控 JNK/P38MAPK 通路抑制 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝小鼠肝脏内质网应激[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(5):786-791.
- [11] LORENZO-ALMORÓS A, CEPEDA-RODRIGO J M, LORENZO Ó. Diabetic cardiomyopathy[J]. *Rev Clin Esp*, 2022, 222(2):100-111.
- [12] XU B T, WAN S R, WU Q, et al. BDH1 overexpression alleviates diabetic cardiomyopathy through inhibiting H3K9bbh-mediated transcriptional activation of LCN2[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2025, 24(1):101.
- [13] NIU W P, LIU X, DENG B, et al. Piezo1 deletion mitigates diabetic cardiomyopathy by maintaining mitochondrial dynamics via ERK/Drp1 pathway[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2025, 24(1):127.
- [14] LI W Y, LI W, WANG Y, et al. Inhibition of DNMT-1 alleviates ferroptosis through NCOA4 mediated ferritinophagy during diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7:267.
- [15] ZHANG S Z, TIAN W C, DUAN X X, et al. Melatonin attenuates diabetic cardiomyopathy by increasing autophagy of cardiomyocytes via regulation of VEGF-B/GRP78/PERK signaling pathway[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2024, 23(1):19.
- [16] NAGAKANNAN P, ISLAM M I, SULTANA S, et al. TXNIP promotes ferroptosis through NCOA4 mediated ferritinophagy[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2025, 1872(8):120054.
- [17] WU H, LIU Q, SHAN X Y, et al. ATM orchestrates ferritinophagy and ferroptosis by phosphorylating NCOA4[J]. *Autophagy*, 2023, 19(7):2062-2077.
- [18] LI H H, WANG X T, ZHANG Y, et al. SLC39A13 regulates heart function via mitochondrial iron homeostasis maintenance[J]. *Circ Res*, 2025, 137(6):e144-e156.
- [19] LUO C Y, LIANG H S, JI M T, et al. Autophagy induced by mechanical stress sensitizes cells to ferroptosis by NCOA4-FTH1 axis[J]. *Autophagy*, 2025, 21(6):1263-1282.
- [20] SONG J Z, LI H, YANG H Y, et al. Recruitment of Atg1 to the phagophore by ATG8 orchestrates autophagy machineries[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2025, 32(9):1606-1621.
- [21] HOELZGEN F, NGUYEN T T P, KLUKIN E, et al. Structural basis for the intracellular regulation of ferritin degradation[J]. *Nat Commun*, 2024, 15:3802.
- [22] ZHANG M, ZHENG H, JIN H, et al. Regulating SLC7A11/GSH/GPX4 axis by glucose dyshomeostasis to simultaneously promote disulfidptosis, cuproptosis and ferroptosis[J]. *Bioact Mater*, 2025, 54:744-758.

(收稿日期:2026-01-08 修回日期:2026-04-18)

(编辑:舒安琴)