

铁死亡在1型糖尿病心肌病小鼠心功能障碍中的作用

卢清 和凤 王文秋 王焱林 柯剑娟

【摘要】目的:探讨铁死亡在1型糖尿病心肌病(DCM)小鼠心功能障碍中的作用。**方法:**选取清洁级健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,随机分为对照组、DCM 组和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 组 (Fer-1 组),每组 12 只。DCM 组和 Fer-1 组采用连续 5 d 腹腔注射新鲜制备的链脲佐菌素(STZ) 40 mg/(kg·d)后继续饲养 12 周的方法建立 1 型糖尿病 DCM 小鼠模型。自建模起第 2 周末, Fer-1 组小鼠连续 10 周腹腔注射铁死亡抑制剂 Fer-1 2.5 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,对照组和 DCM 组小鼠给予等量二甲基亚砷(DMSO)。第 12 周末行超声心动图检查,采用苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠心肌组织病理形态学变化,透射电镜观察小鼠心肌组织超微结构,Western blot 法检测小鼠心肌组织中铁死亡相关蛋白表达情况。**结果:**与对照组相比,DCM 组小鼠出现明显心功能障碍;HE 染色显示心肌细胞肥大且排列紊乱,炎性细胞浸润;透射电镜显示心肌细胞线粒体形态学改变,包括线粒体变小,膜密度增高,线粒体皱缩,线粒体嵴减少或消失;Western blot 结果显示心肌组织谷胱甘肽还原酶 4 (GPX4) 的蛋白表达水平均显著降低,酯酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 的蛋白表达水平显著升高 (P 均 <0.05)。与 DCM 组比, Fer-1 组小鼠心功能障碍减轻,心肌组织 GPX4 的蛋白表达水平均显著升高, ACSL4 的蛋白表达水平显著降低 (P 均 <0.05), 心肌组织病理改变明显减轻。**结论:**铁死亡参与了 1 型糖尿病 DCM 小鼠心功能障碍的发病过程。

【关键词】 铁死亡;糖尿病心肌病;心功能障碍

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.03.010

Effect of ferroptosis on cardiac dysfunction in type 1 diabetic cardiomyopathy in mice

LU Qing, HE Feng, WANG Wenqiu, WANG Yanlin, KE Jianjuan Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of ferroptosis on cardiac dysfunction in type 1 diabetic cardiomyopathy (DCM) in mice. **Methods:** A total of 36 healthy adult male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, DCM group, and ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 group (Fer-1 group), with 12 mice in each group. DCM model was built by intraperitoneal injection of freshly prepared streptozotocin (STZ) 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for 5 consecutive days, then mice were fed for additional 12 weeks. Fer-1 (2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) was given intraperitoneally after the second week in Fer-1 group, while equal volume of dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered in control and DCM groups. At 12 weeks, echocardiography was performed to assess cardiac function, then all mice were sacrificed. Myocardial pathological and ultrastructural changes were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscope (TEM), respectively. Expression of ferroptosis protein was assessed by western blot. **Results:** Compared with control group, distinct cardiac dysfunction was detected in DCM group. HE staining showed cardiomyocyte hypertrophy, irregular arrangement and inflammatory cell infiltration, and TEM revealed certain abnormal morphological features

基金项目:国家自然科学基金(81471858, 81871553)

作者单位:430071 武汉大学中南医院麻醉科

通信作者:柯剑娟, E-mail:1219628972@qq.com

of mitochondria, including shrunken mitochondria with increased membrane density and mitochondrial ridge reduction or even disappearance in DCM group. Western blot indicated that for DCM group, the expression levels of glutathione reductase 4 (GPX4) were decreased, whereas the expression levels of esteryl CoA synthetase long chain member 4 (ACSL4) were increased in the myocardial tissue (all $P < 0.05$). Treatment with Fer-1 resulted in a remarkable improvement in cardiac function and an increase in expression levels of GPX4 and a decrease in expression levels of ACSL4 in the myocardial tissue (all $P < 0.05$). The pathological changes in the myocardial tissue were alleviated as well. **Conclusion:** Ferroptosis is involved in the process of cardiac dysfunction in type 1 diabetic cardiomyopathy in mice.

【Key words】 Ferroptosis; Diabetic cardiomyopathy; Cardiac dysfunction

糖尿病心肌病 (DCM) 是指无法用冠状动脉疾病、高血压和瓣膜病解释的糖尿病心肌损伤,是糖尿病患者晚期死亡的主要原因^[1-3]。DCM 的发病机制复杂,可能与许多因素,包括高血糖、炎症反应、氧化应激、血管内皮损伤、微血管病变、心肌细胞肥大和纤维化等有关,最终引起心功能障碍甚至心力衰竭^[4]。DCM 的治疗主要采用常规抗心力衰竭疗法,强化降糖治疗并没有改善糖尿病患者心功能。铁死亡是指铁依赖的脂质过氧化引起的细胞死亡^[5]。研究证实,糖尿病肾病、糖尿病性骨质疏松、糖尿病视网膜病变等与铁死亡关系密切,抑制铁死亡可以减轻糖尿病相关并发症^[6-9]。研究表明,高糖培养后的心肌细胞损伤和 2 型糖尿病的 DCM 均有铁死亡参与^[10-11]。然而,目前尚不清楚铁死亡是否参与 1 型糖尿病 DCM 所致的心功能障碍。本研究探讨铁死亡在 1 型糖尿病 DCM 小鼠心功能障碍中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,8 周龄,体质量 22~26 g,由湖北省疾控中心提供。纯度 99.59% 的铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 购于 MedChemExpress 公司;链脲佐菌素 (STZ) 购于北京索莱宝科技有限公司;稳豪倍易血糖仪购于强生 (中国) 医疗器械有限公司;苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒、BCA 蛋白质测定试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;电镜固定液、ECL 超敏发光液购于武汉普美克生物技术有限公司;兔抗谷胱甘肽还原酶 4 (GPX4)、酯酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4)、GAPDH 抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购于武汉爱博泰克 (ABclonal) 生物科技有限公司;

Hitachi HT7700 透射电镜由武汉大学医学部结构中心平台提供;小鼠心脏超声机由武汉大学人民医院实验室提供。

1.2 分组及处理方法

采用随机数字表法将小鼠分为对照组、DCM 组和 Fer-1 组,每组各 12 只。DCM 组和 Fer-1 组采用连续 5 d 腹腔注射新鲜制备的 STZ 40 mg/(kg·d) 后继续饲养 12 周的方法建立 1 型糖尿病 DCM 小鼠模型。注射 STZ 1 周后测量血糖高于 16.7 mmol/L,小鼠出现多饮、多食、多尿、体质量下降的临床症状,第 12 周末超声心动图检测示心功能障碍,则模型构建成功。实验初期及饲养期间,每 2 周对所有小鼠称量体质量和测量血糖,自建模起第 2 周末 Fer-1 组小鼠开始连续腹腔注射铁死亡抑制剂 Fer-1 2.5 μmol/(kg·d),对照组和 DCM 组腹腔注射等量 DMSO,3 组小鼠的腹腔注射均持续到第 12 周末。

1.3 超声心动图检查

自建模起第 12 周末,将小鼠胸部脱毛,置于恒温检测台上,使用 1% 戊巴比妥钠麻醉,心率波动在 400~500 次/min 时,使用小鼠专用高频超声探头,经胸骨旁左室长轴切面检测小鼠心脏结构及心功能情况,检测期间采集 3 个及以上连续稳定的心动周期图像,测量并记录左室舒张末期内径 (LVDd)、左室收缩末期内径 (LVDs),计算左室短轴缩短率 (LVFS)、左室射血分数 (LVEF)。

1.4 心肌组织苏木精-伊红染色

心脏超声检查结束后处死小鼠,取小鼠心肌组织,放入 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋后切片,利用二甲苯和梯度酒精对石蜡切片进行脱蜡处理,按照试剂盒所示步骤进行苏木精-伊红 (HE) 染色,使用中性价封片,光学显微镜下观察小鼠心肌组

织形态学变化。

1.5 透射电镜观察小鼠心肌组织超微结构

将小鼠心肌组织切成 1 mm³ 组织块, 以 2.5% 戊二醛溶液固定 24 h, 放入 1% 锇酸固定 1.5 h 后梯度酒精脱水, 环氧树脂包埋, 制成厚约 70 nm 的超薄切片, 行枸橼酸铅 - 醋酸铀双重染色, Hitachi HT7700 透射电镜下观察心肌组织超微结构。

1.6 Western blot法检测小鼠心肌组织中铁死亡相关蛋白表达

RIPA 裂解液提取心肌组织蛋白, BCA 蛋白质测定试剂盒进行蛋白定量并调整样品浓度至 1 g/L。取蛋白进行十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 100 V 稳压电泳 1.5 h, 100 V 稳压转膜 2 h。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 GPX4、ACSL4、GAPDH 一抗 (1 : 1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, 加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 10 000 稀释), 室温孵育 1 h, ECL 超敏发光液进行化学发光成像,

使用 ImageJ 软件分析测定条带灰度值, 目的蛋白相对表达水平 = 目的蛋白条带值 / 内参条带值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在体 1 型糖尿病 DCM 小鼠模型评估

自建模起第 2 周末, DCM 组小鼠血糖均高于 16.7 mmol/L, 并出现明显多饮、多食、多尿、体质量下降的症状, 第 12 周末, 超声心动图检测示 LVDd、LVDs 均明显升高, LVFS、LVEF 均明显降低 (P 均 < 0.05), 提示在体 1 型糖尿病 DCM 小鼠模型建立成功。与 DCM 组比较, Fer-1 组小鼠心功能受损得到缓解, 表现为 LVDd、LVDs 均明显降低, LVFS、LVEF 均明显升高 (P 均 < 0.05)。见图 1、图 2、表 1。

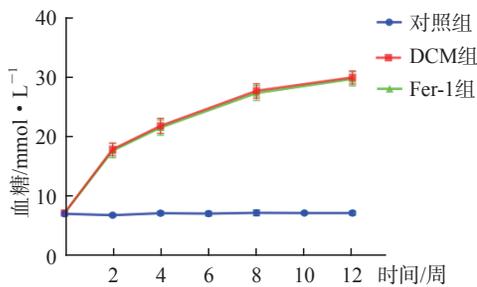


图1 3组小鼠血糖变化情况比较

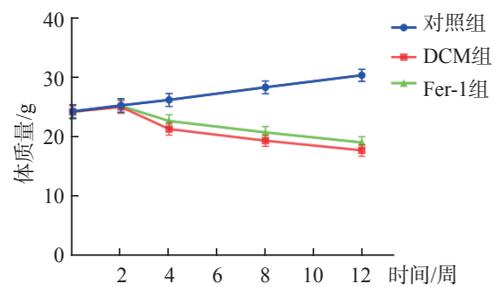


图2 3组小鼠体质量变化情况比较

表1 3组小鼠血流动力学变化情况比较

组别	LVEF/%	LVFS/%	LVDd/mm	LVDs/mm
对照组	88.72 ± 2.45	45.32 ± 1.49	3.60 ± 0.12	1.91 ± 0.16
DCM组	57.42 ± 2.35 ⁽¹⁾	33.64 ± 1.47 ⁽¹⁾	3.86 ± 0.14 ⁽¹⁾	2.52 ± 0.15 ⁽¹⁾
Fer-1组	76.23 ± 2.51 ⁽¹⁾⁽²⁾	39.10 ± 2.01 ⁽¹⁾⁽²⁾	3.69 ± 0.21 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.21 ± 0.13 ⁽¹⁾⁽²⁾

注: 与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$; 与DCM组比较, ⁽²⁾ $P < 0.05$

2.2 Fer-1改善1型糖尿病DCM小鼠心肌组织病理形态学变化

对照组小鼠心肌细胞排列整齐, 形态结构完整, 心肌纤维呈束状排列, 结构均匀, 细胞间质无明显水肿和结缔组织增生; DCM 组小鼠心肌细胞肥大且排列紊乱, 有炎性细胞浸润; Fer-1 组心肌细胞排列较为规则, 炎性细胞浸润程度较轻。见图 3。

2.3 Fer-1改善1型糖尿病DCM小鼠心肌细胞线粒体结构

对照组小鼠心肌细胞线粒体结构基本正常, 未见明显线粒体嵴断裂, 未见线粒体内外膜消失; DCM 组小鼠心肌细胞线粒体发生形态学改变, 包括线粒体变小, 膜密度增高, 线粒体皱缩, 线粒体嵴减少或消失; Fer-1 组线粒体结构改变较轻。见图 4。

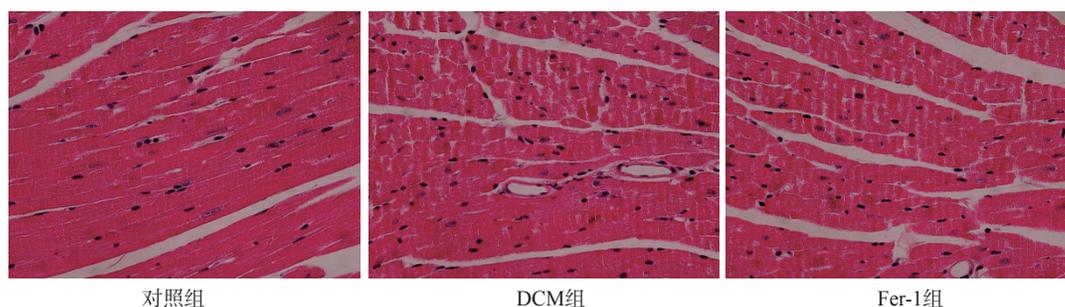


图3 3组小鼠心肌组织病理形态学变化情况 (HE染色, ×400)

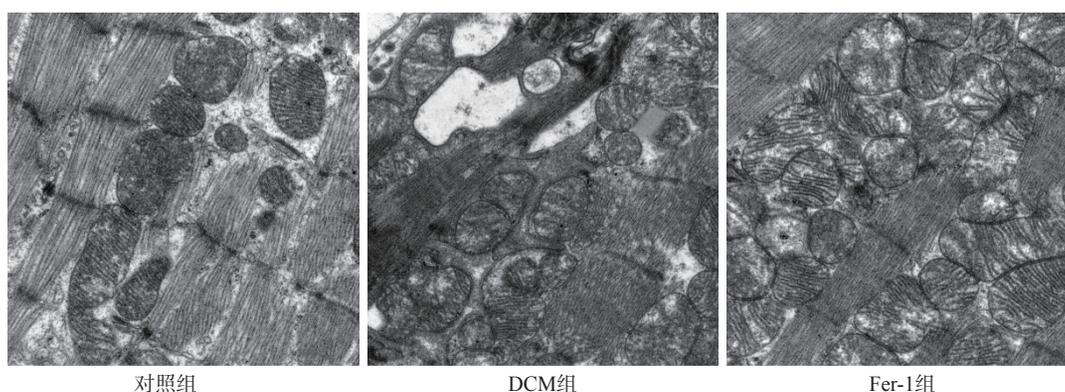


图4 3组小鼠心肌组织超微结构变化情况 (枸橼酸铅-醋酸铀双重染色, ×6 000)

2.4 Fer-1调控1型糖尿病DCM小鼠心肌组织中 铁死亡相关蛋白表达

与对照组比较, DCM组小鼠心肌组织中 GPX4 的蛋白表达水平显著下调, ACSL4 的蛋白表达水平显著上调 (P 均 <0.05); 与 DCM组比较, Fer-1组小鼠心肌组织中 GPX4 的蛋白表达水平显著上调, ACSL4 的蛋白表达水平显著下调 (P 均 <0.05)。见图 5、表 2。

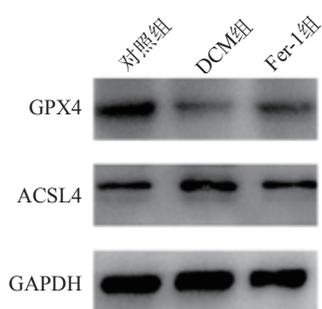


图5 3组小鼠心肌组织铁死亡相关蛋白表达情况

表2 3组DCM小鼠心肌组织铁死亡相关蛋白表达水平比较

组别	GPX4	ACSL4
对照组	0.97±0.10	0.20±0.05
DCM组	0.13±0.08 ⁽¹⁾	0.67±0.03 ⁽¹⁾
Fer-1组	0.43±0.07 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.24±0.03 ⁽¹⁾⁽²⁾

注: 与对照组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 与 DCM组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$

3 讨论

DCM 是不同于高血压和冠状动脉疾病的一类特异性心肌病, 发病机制尚不清楚, 可能与糖代谢及脂质代谢紊乱、氧化应激、炎症反应及免疫调节紊乱、细胞凋亡等有关, 这些因素相互作用导致心肌出现病理改变, 形成病理性恶性循环, 最终发展为心功能障碍甚至心力衰竭^[4]。本研究结果显示, DCM组小鼠心肌细胞肥大且排列紊乱, 炎症细胞浸润, 左心功能明显受损, 表现为 LVDD、LVDs 均明显升高, LVFS、LVEF 均明显降低, 这与文献报道结果一致^[12-13]。

DCM 的发病机制复杂, 氧化应激被认为在 DCM 发病机制中起着关键作用^[14-15]。铁死亡主要机制是细胞膜高表达的不饱和脂肪酸在二价铁或脂氧化酶的作用下发生脂质过氧化, 使脂质活性氧增加, 进而诱导细胞死亡。铁死亡时线粒体发生形态学改变, 包括线粒体变小, 膜密度增高, 线粒体皱缩, 线粒体嵴减少或消失^[8]。有研究表明, GPX4 是维持还原型和氧化型谷胱甘肽平衡的关键酶, 它在诱导铁死亡的发生中扮演着至关重要的作用。GPX4 表达减少时, 抗氧化能力降低, 细胞膜磷脂易受到活性氧攻击, 发生脂质过氧化。脂质过氧化的最终产物为丙二醛和 4-羟基壬烯醛, 易与蛋白

和 DNA 形成加合物,产生细胞毒性作用,诱发铁死亡^[16-17]。ACSL4 是重要的参与多不饱和脂肪酸代谢的同工酶, ACSL4 酯化游离脂肪酸中的 CoA,形成的酰化 CoA,进一步激活参与脂质过氧化反应的相应脂肪酸。有研究表明, ACSL4 可以作为在不同细胞环境中铁死亡敏感性的预测指标^[18]。综上所述, ACSL4 和 GPX4 分别是铁死亡的正性和负性调节因子。本研究结果显示, 1 型糖尿病 DCM 小鼠左心功能明显受损, 心肌细胞线粒体发生形态学改变, 心肌组织中 GPX4 蛋白表达水平明显下降, ACSL4 蛋白表达水平明显升高, 提示 1 型糖尿病 DCM 小鼠心功能障碍与铁死亡有关。

本研究参照文献[8], 选择铁死亡抑制剂 Fer-1 的给药途径、剂量和时机。已有研究表明, Fer-1 在糖尿病肾病、糖尿病性骨质疏松和糖尿病视网膜病变中具有保护作用^[6-9]。在本研究中, Fer-1 可以有效改善 DCM 左心功能, 还能够减轻 DCM 小鼠心肌组织的病理损伤, 这对改善 DCM 小鼠不良预后具有重要意义。Fer-1 能够显著上调 GPX4 蛋白表达水平, 显著下调 ACSL4 蛋白表达水平, 提示铁死亡参与了 1 型糖尿病小鼠心功能障碍的发病过程。

综上所述, 本研究证实铁死亡参与了 1 型糖尿病 DCM 小鼠心功能障碍的发病过程, 抑制铁死亡可以改善 1 型糖尿病 DCM 小鼠的心功能障碍。

参 考 文 献

- [1] 罗说明, 周智广. 1 型糖尿病血管并发症防治: 挑战与希望[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(8):645-650.
- [2] 刘鲁豫, 刘爱霞. 1 型糖尿病的发病机制与治疗的新进展[J]. 医学综述, 2019, 25(22):4504-4508.
- [3] Wu H, Li GN, Xie J, et al. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- β /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2016, 16:5.
- [4] Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, et al. Diabetic cardiomyopathy—a comprehensive updated review[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2019, 62(4):315-326.
- [5] Tang DL, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. Cell Res, 2019, 29(5):347-364.
- [6] Ma HD, Wang XD, Zhang WL, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:9067610.
- [7] Kim S, Kang SW, Joo J, et al. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2):160.
- [8] Li S, Zheng L, Zhang J, et al. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 162:435-449.
- [9] Liu Y, Zhang ZY, Yang J, et al. lncRNA ZFAS1 positively facilitates endothelial ferroptosis via miR-7-5p/ACSL4 axis in diabetic retinopathy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022:9004738.
- [10] Li WY, Li W, Leng Y, et al. Ferroptosis is involved in diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress[J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(2):210-225.
- [11] Wang X, Chen XX, Zhou WQ, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(2):708-722.
- [12] Wang G, Song X, Zhao L, et al. Resveratrol prevents diabetic cardiomyopathy by increasing Nrf2 expression and transcriptional activity[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:2150218.
- [13] 吴国祥, 陈小丽, 罗顺祥, 等. 白藜芦醇对糖尿病心肌病大鼠心功能的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(19):2332-2335.
- [14] Khullar M, Al-Shudiefat AA, Ludke A, et al. Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(3):233-240.
- [15] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. Circ Res, 2010, 107(9):1058-1070.
- [16] Maiorino M, Conrad M, Ursini F. GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(1):61-74.
- [17] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014:360438.
- [18] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1):91-98.

(收稿:2022-10-13 修回:2023-03-27)

(本文编辑:胡晓静)