

王佳丽,周慧婷,王娜娜,等. 电压依赖性阴离子通道 3(VDAC3)在脓毒症心肌损伤动物模型中的变化研究[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(6): 1-11.

Wang JL, Zhou HT, Wang NN, et al. Changes in voltage-dependent anion channel 3 in an animal model of sepsis-induced myocardial injury [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 1-11.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.001

电压依赖性阴离子通道 3(VDAC3)在脓毒症心肌损伤动物模型中的变化研究

王佳丽,周慧婷,王娜娜,夏雪霞,曹越,张帆,黄鑫,李娜,黄洁*

(苏州大学附属儿童医院,江苏 苏州 215003)

【摘要】 目的 观察电压依赖性阴离子通道 3(voltage-dependent anion channel 3,VDAC3)在脓毒症心肌损伤动物模型中的变化并探讨 VDAC3 在脓毒症心肌损伤中的潜在机制。**方法** 将 20 只小鼠随机分配为 2 组,分别记为假手术(Sham)组和脓毒症(Sepsis)组,每组 10 只。Sepsis 组采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture,CLP)构建脓毒症心肌损伤模型。采用酶联免疫吸附法检测血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase MB,CK-MB)和肌钙蛋白 T(cardiac troponin T,cTnT)水平;采用苏木精-伊红染色法观察心脏组织病理变化;超声心动图评估心脏结构和功能变化。采用比色法检测心脏组织中谷胱甘肽(glutathione,GSH)及丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平变化。通过透射电镜观察心肌细胞线粒体形态变化。采用反转录实时定量聚合酶链式反应技术检测心脏组织中 IL-6、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、VDAC3、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 members 11,SLC7A11)、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin peroxidase synthase 2,PTGS2)和脂质运载蛋白 2(lipocalin-2,LCN2)mRNA 表达水平。采用免疫荧光染色法检测 VDAC3 和 GPX4 蛋白在小鼠心脏组织中的定位及表达。分析 VDAC3 mRNA 与 GPX4、SLC7A11、PTGS2、LCN2、IL-6 和 IL-1 β mRNA 的相关性。采用 Western blot 法检测 VDAC3、GPX4 和 SLC7A11 蛋白的表达情况。**结果** 与 Sham 组相比,Sepsis 组血清中 IL-6、TNF- α 、CK-MB 和 cTnT 水平显著升高($P<0.05$);光学显微镜下可见 Sepsis 组心肌纤维断裂、间质水肿,心室壁增厚;透射电镜下 Sepsis 组心肌细胞线粒体膜破裂、线粒体嵴断裂甚至消失;Sepsis 组心脏组织中 GSH 水平降低($P<0.05$),脂质氧化物 MDA 明显升高($P<0.05$)。与 Sham 组相比,Sepsis 组 VDAC3、GPX4 及 SLC7A11 mRNA 和蛋白水平均降低($P<0.05$);IL-6、IL-1 β 、LCN2 和 PTGS2 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$)。VDAC3 mRNA 与 GPX4、SLC7A11 mRNA 水平呈显著正相关,而与 LCN2、IL-6 呈显著负相关,与 PTGS2、IL-1 β 呈负相关。**结论** VDAC3 在心肌损伤中表达下降,其可能通过调控铁死亡参与脓毒症心肌损伤的发生。

【关键词】 VDAC3;铁死亡;脓毒症;心肌损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0001-11

Changes in voltage-dependent anion channel 3 in an animal model of sepsis-induced myocardial injury

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82472207);江苏省科技计划项目(BE2023714);姑苏卫生人才项目(GSW2019015);苏州市科技发展项目(SKY2023058,SKJY2021108)。

【作者简介】 王佳丽(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:脓毒症心肌损伤。E-mail:wjl1992022@163.com

【通信作者】 黄洁(1975—),女,博士,主任医师,研究方向:儿童感染免疫性疾病如川崎病、脓毒症的基础与临床研究。

E-mail:j.shuang@163.com

WANG Jiali, ZHOU Huiting, WANG Nana, XIA Xuexia, CAO Yue, ZHANG Fan, HUANG Xin,
LI Na, HUANG Jie*

(Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215003, China)

【Abstract】 Objective To observe changes in voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3) in a mouse model of sepsis-induced myocardial injury and to explore its potential mechanism. **Methods** Twenty male C57BL/6J mice were divided randomly into a Sham group and Sepsis group, respectively ($n = 10$ mice per group). Sepsis was induced by the cecal ligation and puncture (CLP). Serum levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , creatine kinase MB (CK-MB), and cardiac troponin T (cTnT) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Pathological changes in heart tissue were observed by hematoxylin and eosin staining. Structural and functional changes in the heart were evaluated by echocardiography. Changes in total glutathione, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione, and malondialdehyde (MDA) in heart tissue were detected by spectrophotometry. The morphological structure of mitochondria in mouse cardiomyocytes was observed by transmission electron microscopy. Expression levels of IL-6, IL-1 β , VDAC3, glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), lipocalin-2 (LCN2), and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) mRNA were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction and the localization and expression of VDAC3 and GPX4 proteins in mouse heart tissue were detected by immunofluorescence staining. The correlations between VDAC3 mRNA and GPX4, SLC7A11, PTGS2, LCN2, IL-6, and IL-1 β mRNA were analyzed. Expression levels of VDAC3, GPX4, and SLC7A11 proteins were detected by Western blot. **Results** IL-6, TNF- α , CK-MB, and cTnT levels were significantly higher in the Sepsis group compared with the Sham group ($P < 0.05$). In the Sepsis group, myocardial fibers were torn, the ventricular wall was thickened and edematous, the mitochondrial membrane was ruptured, and mitochondrial cristae were broken or absent. GSH levels were significantly reduced in the Sepsis group ($P < 0.05$) and the lipid peroxide MDA was increased in the Sepsis group ($P < 0.05$) compared with the Sham group. VDAC3, GPX4 and SLC7A11 mRNA and protein levels were all lower in the Sepsis group compared with the Sham group ($P < 0.05$), while expression levels of IL-6, IL-1 β , LCN2, and PTGS2 mRNA were increased ($P < 0.05$). VDAC3 mRNA was positively correlated with GPX4 and SLC7A11 mRNA levels, and negatively correlated with LCN2, PTGS2, IL-6, and IL-1 β . **Conclusions** VDAC3 expression decreases in myocardial injury, and it may participate in the occurrence of sepsis-induced myocardial injury by regulating ferroptosis.

【Keywords】 VDAC3; ferroptosis; sepsis; myocardial injury

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

脓毒症(sepsis)是宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。脓毒症导致的多器官功能障碍是重症监护室中患者死亡的主要原因^[2]。脓毒症心功能障碍为更严重的器官衰竭,往往与更高的死亡率有关^[3]。脓毒症心肌损伤(sepsis induced myocardial injury, SIMI)是由脓毒症或脓毒症休克引起的可逆性心肌抑制性疾病^[4]。虽然 SIMI 是脓毒症进展的可逆性并发症,但其预后并不乐观,发生 SIMI 的患者住院率为 35%,1 年死亡率为 51%^[5]。有研究报道,线粒体功能在 SIMI 中起到极其重要的作用^[6-7],但发病机制仍不清楚。

铁死亡(ferroptosis)是一种不同于细胞凋亡、

自噬及坏死性凋亡的程序性细胞死亡方式,其在一系列疾病的临床前研究具有重要意义^[8]。发生铁死亡的细胞可以释放与损伤相关的分子模式和脂质过氧化,从而进一步介导炎症反应^[9]。此外,越来越多的研究报道,线粒体在铁死亡的发生中具有重要作用^[10]。

电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channels, VDACs)又称线粒体孔蛋白,是线粒体外膜中含量最丰富的蛋白,具有调节线粒体和细胞质之间的代谢物运输的作用^[11-12]。VDAC3 是 VDACs 异构体之一,具有保护线粒体免受氧化应激诱导损伤的功能,但其潜在的分子机制尚不清楚^[13]。多项研究证实,VDAC3 可通

过相关分子机制介导铁死亡^[14-16]。然而,VDAC3 是否调控铁死亡参与 SIMI 的发生发展,目前尚未明确。因此,本研究通过建立脓毒症心肌损伤小鼠模型,观察 VDAC3 在 SIMI 中的变化情况,初步探究 VDAC3 在 SIMI 中的潜在机制,以期治疗 SIMI 提供新靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 7~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J, 体重 20~24 g, 购于杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2024-0004], 于苏州敬咨达检测服务有限公司饲养[SYXK(自苏)2023-0007], 适应性喂养 1 周后进行实验, 进食及饮水自由, 环境温度 22~28 ℃, 相对湿度 50%, 昼夜交替 12 h/12 h。所有动物实验操作均符合苏州大学动物实验和伦理委员会的要求(SUDA20241104A02), 实验过程中均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠 IL-6 (1210602) 和 TNF- α (1217202) ELISA 检测试剂盒购于上海达科为生物技术有限公司; 小鼠 CK-MB (E-EL-M0355c) 和 cTnT (E-EL-M1801c) ELISA 检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; GSH 与 GSSG 检测试剂盒 (S0053) 和脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒 (S0131S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; qPCR 试剂盒 (AG11701) 购自艾科瑞生物工程有限公司; 总 RNA 提取试剂 (B610409) 购自 BBI 生命科学有限公司; 山羊抗兔 IgG (H+L) HRP (FDR007) 购于杭州弗典生物科技有限公司; GAPDH (ab8245) 和 GPX4 (ab125066) 抗体购于英国 Abcam 公司; SLC7A11 抗体 (T57046S) 购于上海艾比玛特医药科技有限公司; VDAC3 抗体 (A10544) 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; 环保型脱蜡液 (G1128)、抗原修复液 (G1202)、组织自发荧光淬灭剂 (G1221)、DAPI 染色试剂 (G1012)、抗荧光淬灭封片剂 (G1401) 购于武汉塞维尔生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪 (Roche LightCycler480); 动物超声成像系统 (VINNO 6LAB); 奥盛微孔板恒温振荡器 (MB100-4A); Thermo 酶标仪 (Multiskan FC); 正置荧光显微镜 (NIKON ECLIPSE C1)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与造模

将 20 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分配为 2 组: 假手术 (Sham) 组和脓毒症 (Sepsis) 组, 每组 10 只。适应性喂养 1 周后进行实验。术前 6 h 禁食, 不禁水。Sham 组仅行开腹和关腹操作, 术后皮下注射 1 mL 生理盐水。Sepsis 组采用盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 构建脓毒症模型^[17-18]。对小鼠进行麻醉诱导后, 于腹中线进行手术。术中仔细分离盲肠, 避免损伤血管。术后皮下注射 1 mL 生理盐水。待小鼠苏醒后送回鼠笼。

1.3.2 标本采集

CLP 术后 24 h 收集适量全血分离血清, 并于 -80 ℃ 储存备用。处死小鼠后, 收集心脏, 一部分用 4% 多聚甲醛溶液和电镜固定液固定, 分别行组织病理学检测和透射电镜检测, 另一部分于 -80 ℃ 储存备用。

1.3.3 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

采用 ELISA 检测各组小鼠血清中白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase MB, CK-MB) 和肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 的表达水平。于 -80 ℃ 低温冰箱取出备用血清, 按适当比例稀释样品后, 根据试剂盒说明书进行操作, 收集并进行数据分析。

1.3.4 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色法

取 4% 多聚甲醛溶液固定的小鼠心脏组织, 依次经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、脱水、冲洗、HE 染色及脱水透明封片后于显微镜下观察并采集图像。

1.3.5 超声心动图检查

采用 2.5% 的异氟醚吸入麻醉小鼠进行麻醉诱导, 后以 1% 的异氟醚进行麻醉维持, 直至检查结束。麻醉后, 将小鼠仰卧位固定在热台中央, 用棉签将脱毛膏均匀涂抹在小鼠胸腔, 等待 2~3 min 后用干净的棉签擦拭, 将残余脱毛膏擦拭干净, 将耦合剂均匀涂抹在探头呈色区域, 行经胸心脏超声检查, 观察小鼠心脏结构和功能改变。

1.3.6 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测

CLP 术后 24 h 收集小鼠心脏组织,称重后按试剂盒说明书进行操作,收集并分析数据。

1.3.7 心肌线粒体透射电镜检测

CLP 术后 24 h 收集小鼠心脏组织,剪成约 1 mm^3 大小,置于电镜固定液内固定,室温避光放置 2 h 后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,并送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行检测。

1.3.8 实时荧光定量聚合酶链反应法 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 mRNA 表达水平

于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱取出心脏组织,并加入 RNA 提取剂提取总 RNA,检测并记录 RNA 浓度及纯度;根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 链为模板,按试剂盒说明书进行 PCR 扩增。引物由苏州硅基生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3.9 Western blot 检测

于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱取出心脏组织,加入 RIPA 裂解液提取蛋白。取适当体积的待测蛋白加样,经电泳、转膜、封闭、洗膜、敷一抗、洗膜、敷二抗、洗膜和显影,条带结果用 Image J Fiji 软件分析定量。一抗: GAPDH (1 : 10 000)、VDAC3 (1 : 3000)、GPX4 (1 : 3000)、SLC7A11 (1 : 2000)、HRP 标记的羊抗兔二抗 (1 : 5000)。

表 1 qRT-PCR 引物基因序列

Table 1 Primer gene sequence for qRT-PCR

引物名称 Primer names	序列 Sequence
VDAC3	F:5'-GACGGGATGTGTTTACTCTCGG-3' R:5'-GCCTTGTAAACCAAGACGAAA-3'
GPX4	F:5'-TGTGCATCCCGCGATGATT-3' R:5'-CCCTGTACTTATCCAGGCAGA-3'
SLC7A11	F:5'-GGCACCGTCATCGGATCAG-3' R:5'-CTCCACAGGCAGACCAGAAAA-3'
PTGS2	F:5'-TGCACTATGGTTACAAAAGCTGG-3' R:5'-TCAGGAAGCTCCTTATTTCCCTT-3'
LCN2	F:5'-GCAGGTGGTACGTTGTGGG-3' R:5'-CTCTGTAGCTCATAGATGGTGC-3'
IL-6	F:5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3' R:5'-AGTGCTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
IL-1 β	F:5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3' R:5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'
β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3' R:5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

1.3.10 免疫荧光染色

心脏组织经多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,脱蜡前将切片置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘烤 2 h,经脱蜡、水化、抗原修复后,自然冷却。分别用 10% 驴血清和 3% BSA 室温封闭 30 min,分别加入一抗 VDAC3 (1 : 200)、GPX4 (1 : 500) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加入对应二抗 CY3 标记驴抗山羊 IgG 和 Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠 IgG,室温避光孵育 50 min,滴上 DAPI 染色,避光室温孵育 10 min。加自发荧光淬灭剂 B 液 5 min,流水冲洗 10 min。用抗荧光淬灭封片剂封片。在正置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学方法

运用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。采用 Pearson 相关分析连续数据之间的关系。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 水平变化

与 Sham 组相比,CLP 术后 24 h,脓毒症小鼠血清中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<0.001$)。见图 1。

2.2 小鼠心脏组织 IL-6、IL-1 β mRNA 水平变化

CLP 术后 24 h,脓毒症小鼠心脏组织中 IL-6 和 IL-1 β mRNA 水平较 Sham 组显著升高 ($P<0.0001$)。见图 2。

2.3 小鼠血清心肌损伤标志物 CK-MB、cTnT 水平变化

Sepsis 组血清中心肌损伤标志物 CK-MB 和 cTnT 较 Sham 组明显升高 ($P<0.01$)。见图 3。

2.4 小鼠心脏组织病理变化

Sham 组心肌细胞形态结构完整,细胞排列致密整齐,核仁清楚,未见明显异常;Sepsis 组心肌细胞排列紊乱,心肌纤维断裂,间质水肿明显,可见炎性细胞浸润。见图 4。

2.5 小鼠心脏结构和功能评估

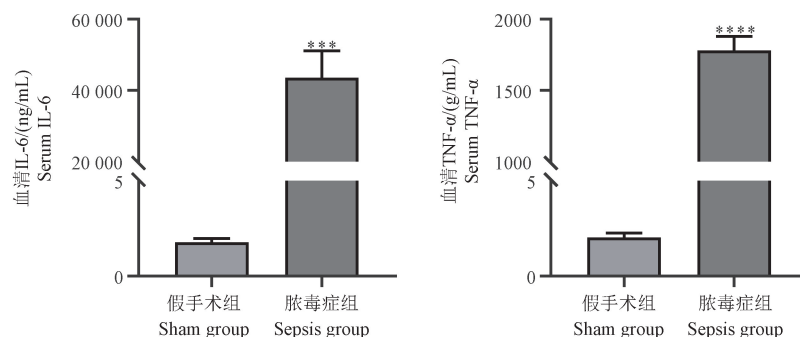
超声心动图检查结果显示,与 Sham 组相比,CLP 术后 24 h,脓毒症小鼠左室舒张末期容积及收缩末期容积显著减小 ($P<0.0001$);左室内径明显减小 ($P<0.0001$),左室壁及室间隔明显增厚水

肿,室壁边缘不清晰($P<0.01$)。见图 5。

2.6 小鼠心脏组织中 GSH 及 MDA 的变化

与 Sham 组相比,Sepsis 组心脏组织中总谷胱

甘肽、GSH、GSH/GSSG 水平显著降低($P<0.05$),而脂质过氧化物 MDA 代谢水平明显增加($P<0.05$)。见图 6。

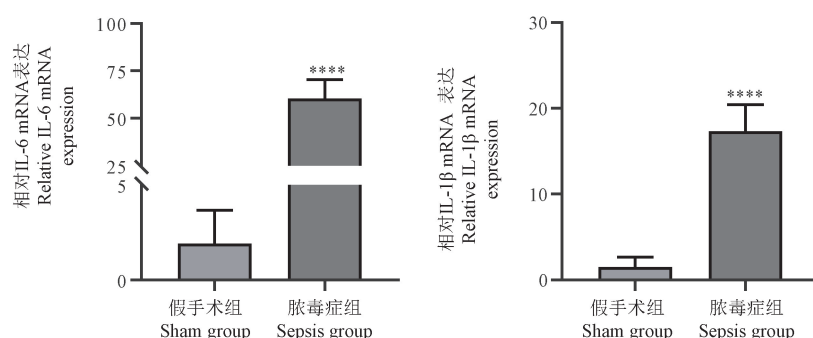


注:与假手术组相比, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 1 小鼠血清炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的水平变化

Note. Compared with the Sham group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 1 Levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in the serum

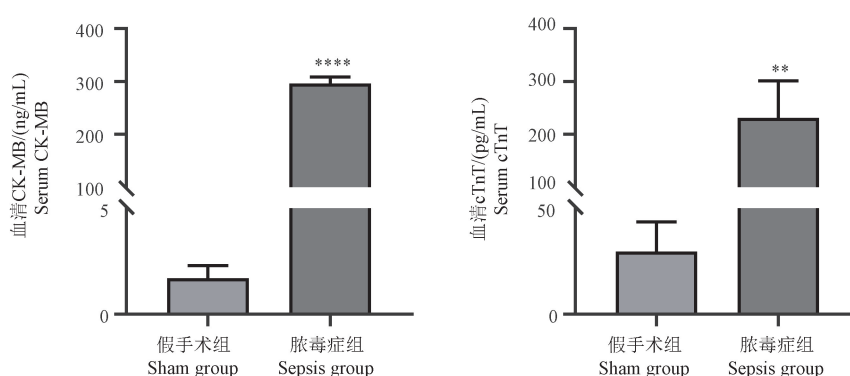


注:与假手术组相比, **** $P<0.0001$ 。

图 2 小鼠心脏组织 IL-6 和 IL-1β mRNA 水平

Note. Compared with the Sham group, **** $P<0.0001$.

Figure 2 Levels of IL-6 and IL-1β mRNA in mouse heart tissue



注:与假手术组相比, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

图 3 小鼠血清心肌损伤标志物 CK-MB 和 cTnT 水平变化

Note. Compared with the Sham group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Levels of markers of myocardial injury CK-MB and cTnT in the serum

2.7 小鼠心肌细胞线粒体形态观察

透射电镜下,可见 Sham 组心肌细胞线粒体形态清晰完整,排列整齐、紧密,基质均匀,线粒体嵴致密,边界清楚,无明显结构异常。Sepsis 组心肌细胞线粒体排列紊乱、疏松,可见不同程度的肿胀及空泡样改变,线粒体膜破裂且膜密度增高,线粒体嵴断裂、减少甚至消失。见图 7。

2.8 小鼠心脏组织中铁死亡相关 mRNA 表达水平

qRT-PCR 结果显示,与 Sham 组相比,Sepsis

组心脏组织中的 GPX4 和 SLC7A11 mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$),而心脏组织中的 PTGS2 和 LCN2 mRNA 表达水平显著升高($P<0.0001$)。见图 8。

2.9 小鼠心脏组织中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平

Western blot 结果显示,与 Sham 组相比,Sepsis 组心脏组织中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。见图 9。独立实验重复至少 3 次。

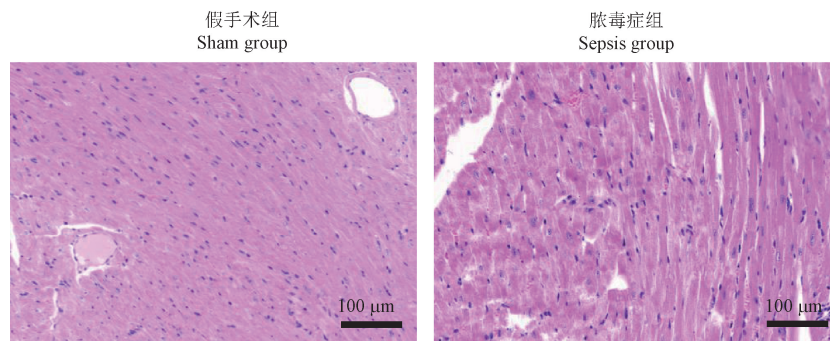
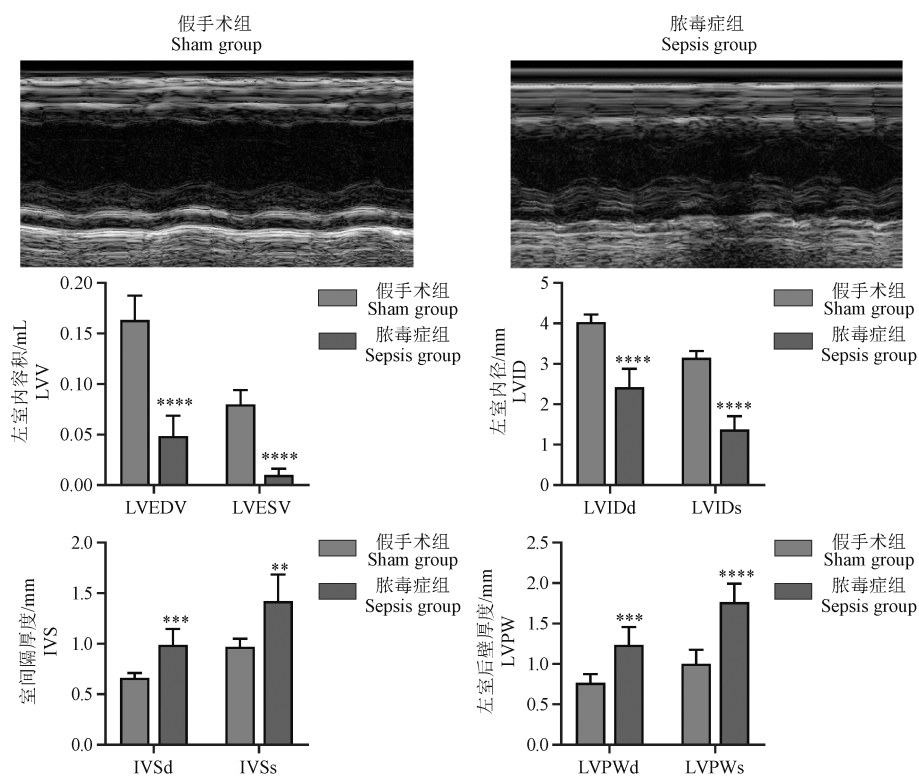


图 4 小鼠心脏组织 HE 染色切片

Figure 4 HE stained sections of heart tissue from mouse



注:与假手术组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 5 小鼠心脏 M 型超声心动图及超声心动图参数

Note. Compared with the Sham group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 5 M-mode echocardiogram and echocardiographic parameters of mouse heart

2.10 小鼠心脏组织中 VDAC3 蛋白和 mRNA 表达水平

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与 Sham 组相比,Sepsis 组心脏组织中 VDAC3 mRNA 表达和蛋白表达均明显降低($P<0.01$)。见图 10。独立实验重复至少 3 次。

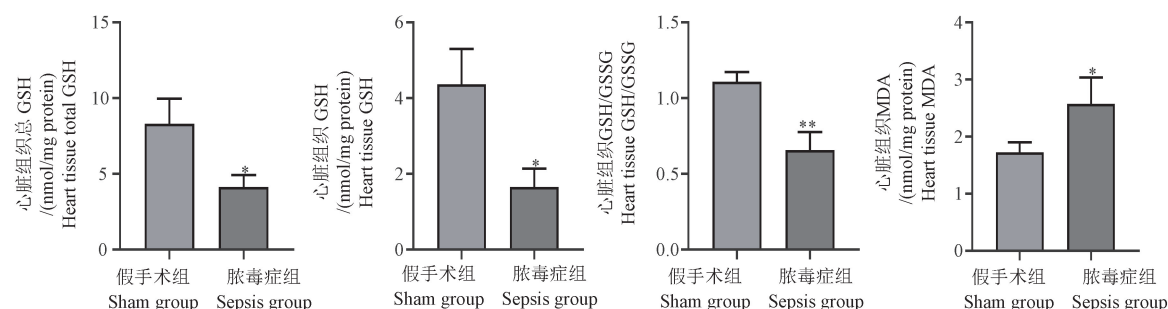
2.11 小鼠心脏组织中 VDAC3 与 GPX4 蛋白的定位与变化

免疫荧光结果显示,绿色为 GPX4 染色,红色

为 VDAC3 染色,蓝色为 DAPI 染色。Sepsis 组心脏组织中 VDAC3 和 GPX4 蛋白表达均明显低于 Sham 组($P<0.001$)。见图 11。

2.12 小鼠心脏组织中 VDAC3 与 IL-1 β 、IL-6 及铁死亡相关 mRNA 水平相关性分析

相关性分析结果显示,VDAC3 mRNA 与 GPX4、SLC7A11 mRNA 水平呈明显正相关,而与 LCN2、IL-6 呈显著负相关,与 PTGS2、IL-1 β 呈负相关。见图 12。



注:与假手术组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 小鼠心脏组织 GSH 和 MDA 水平变化

Note. Compared with the Sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Levels of GSH and MDA in the heart tissue

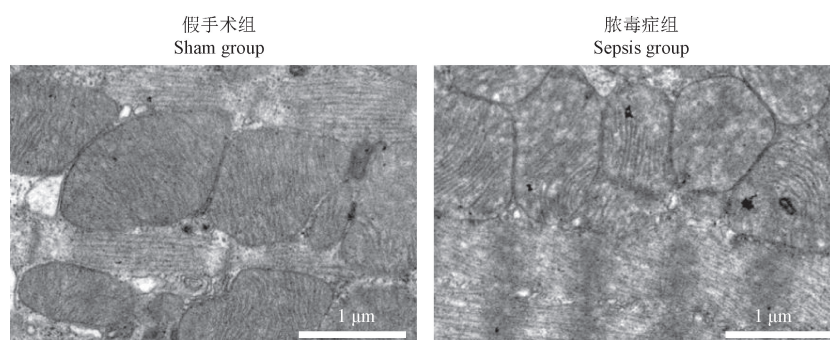
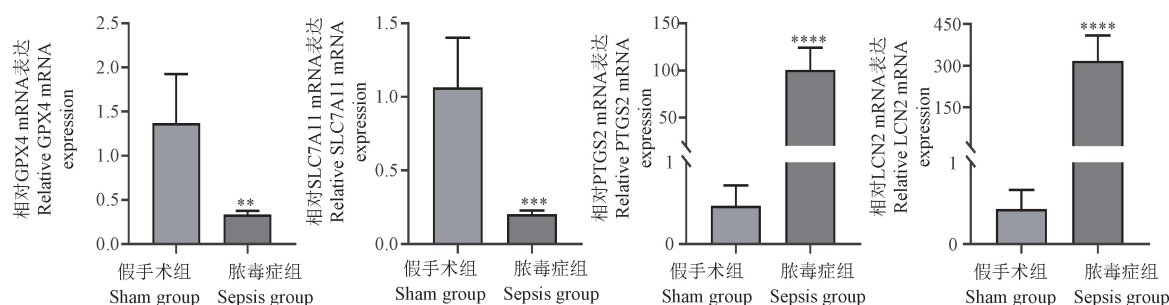


图 7 透射电镜观察心肌细胞线粒体形态结构

Figure 7 Observation of the morphology of myocardial cell mitochondria by transmission electron microscopy

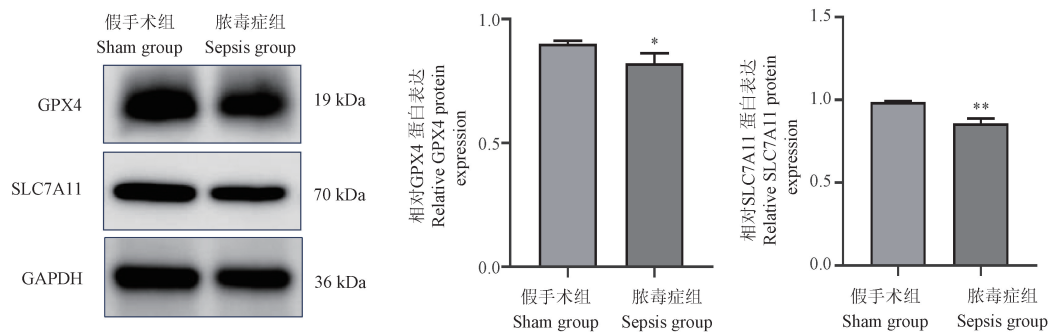


注:与假手术组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 8 小鼠心脏组织 GPX4、SLC7A11、PTGS2 和 LCN2 mRNA 水平

Note. Compared with the Sham group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 8 Levels of GPX4, SLC7A11, PTGS2 and LCN2 mRNA in mouse heart tissue

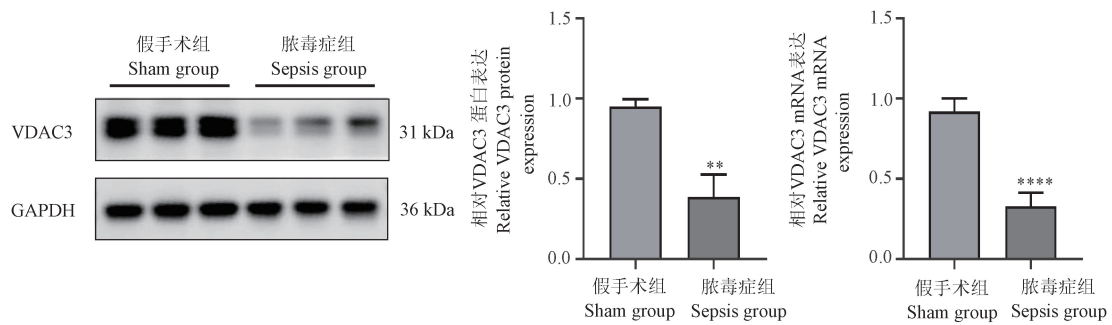


注:与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 9 小鼠心脏组织 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平

Note. Compared with the Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 9 Levels of GPX4 and SLC7A11 protein in mouse heart tissue

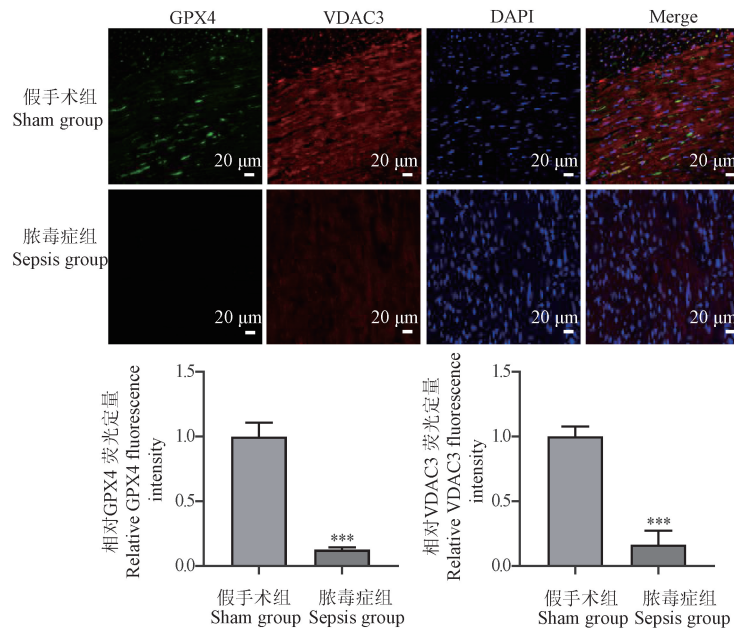


注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 10 小鼠心脏组织 VDAC3 蛋白和 mRNA 表达水平

Note. Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Figure 10 Levels of VDAC3 protein and mRNA in mouse heart tissue



注:与假手术组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 11 小鼠心脏组织中 GPX4 和 VDAC3 蛋白的定位与变化

Note. Compared with the Sham group, *** $P < 0.001$.

Figure 11 Localization and changes of GPX4 and VDAC3 proteins in mouse heart tissue

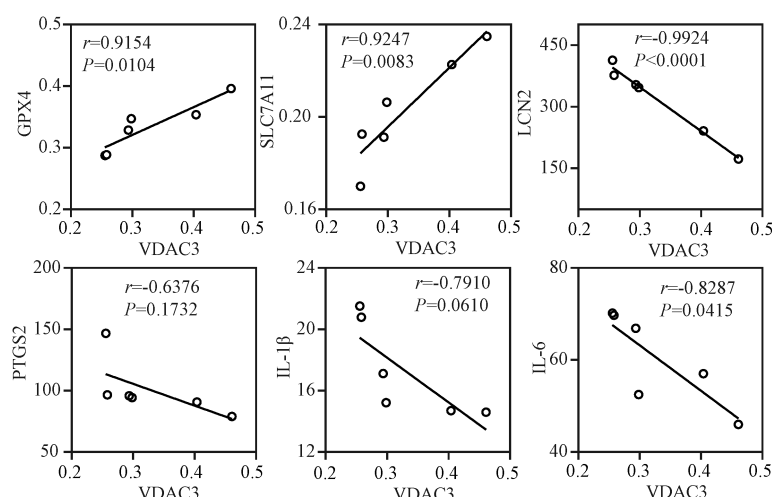


图 12 小鼠心脏组织中 VDAC3 与各 mRNA 水平相关性分析

Figure 12 Correlation analysis of VDAC3 and various mRNA levels in mouse heart tissue

3 讨论

脓毒症是一种以宿主对感染的反应失调为主要特征的危及生命的综合征,可迅速发展为脓毒症休克和多器官衰竭,是导致重症监护室患者死亡的主要原因之一^[19-20]。心肌损伤是脓毒症心脏功能障碍的主要表现,其发生率高达 50%^[21]。SIMI 的机制十分复杂,目前尚未有明确的研究报道。VDAC3 是维持线粒体稳态的重要调节因子^[22]。因此,本研究聚焦于 VDAC3 与铁死亡,探究其二者是否参与 SIMI 的发生。采用 CLP 术构建脓毒症心肌损伤动物模型^[23],通过检测血清炎症因子和心肌损伤标志物的水平以确定模型是否构建成功。ELISA 结果显示 IL-6、TNF- α 、CK-MB 和 cTnT 水平均明显升高。qRT-PCR 结果示,脓毒症小鼠心脏组织中 IL-6、IL-1 β mRNA 水平显著升高。此外,通过心脏组织病理学检测和超声心动图检查,CLP 术后 24 h,小鼠心脏组织出现明显损伤,以上结果表明 SIMI 模型构建成功。

铁死亡是一种以铁依赖的脂质过氧化物积累为特征的调节性细胞死亡方式^[24-25]。线粒体负责协调许多基本的代谢过程、氧化还原平衡和钙稳态,已有研究证据支持线粒体功能障碍和铁死亡之间存在明显联系^[26]。此外,线粒体是心肌细胞中重要的细胞器,线粒体功能障碍将引起心肌细胞功能失调^[27-29]。通过透射电镜观察到 Sepsis 组小鼠心肌细胞线粒体发生明显损伤。此

外,本研究结果显示 GSH 活性下降,而 MDA 明显升高,说明 CLP 术后 24 h,造模组小鼠出现心肌线粒体功能障碍和脂质过氧化堆积。进一步检测铁死亡经典指标^[30-31] GPX4、SLC7A11、LCN2 和 PTGS2 mRNA 和蛋白表达水平,结果显示,GPX4 和 SLC7A11 在 mRNA 和蛋白水平均下降,PTGS2 和 LCN2 在 mRNA 水平均升高,这与文献报道结果一致,证实了铁死亡参与 SIMI 的发生发展^[32-34]。

铁死亡的机制主要包括脂质过氧化物的增加、脂质活性氧的释放、GPX4 或 GSH 活性降低^[35-36]。此外,VDACs、热休克蛋白、核因子 E2 相关因子 2 和 P53 等因子也参与铁死亡的发生^[17]。VDACs 位于真核生物线粒体外膜的孔道,介导代谢物在细胞质和线粒体之间的交换^[13,37]。Erastin 是目前研究最广泛的铁死亡诱导剂之一^[38]。Erastin 通过直接结合 VDAC2/3 改变线粒体外膜的通透性,从而降低 NADH 的氧化速率,诱导细胞发生铁死亡^[30]。虽然 VDAC2 和 VDAC3 都是 Erastin 的直接作用靶点,但是目前只有 VDAC2 的功能有较为清楚的研究,而 VDAC3 的具体作用仍未阐明^[16,39-40]。因此,我们推测 VDAC3 可能参与线粒体稳态,并在脓毒症心肌损伤中起着至关重要的作用。为此,检测 VDAC3 分别在 mRNA 和蛋白水平的表达变化,结果显示,CLP 术后 24 h,脓毒症小鼠心脏组织中 VDAC3 的 mRNA 和蛋白水平均发生显著下降。此外,为了进一步验证 VDAC3 在心肌细胞上的

定位,本研究通过免疫荧光染色检测 VDAC3 与铁死亡经典防御通路 GPX4 蛋白的定位及变化情况,实验结果显示,CLP 术后,VDAC3 与 GPX4 均明显下降,这表明 VDAC3 在心肌损伤中具有保护作用。通过相关性分析,VDAC3 与铁死亡经典保护通路 GPX4、SLC7A11 mRNA 水平呈明显正相关,而与铁死亡相关因子 LCN2、PTGS2 及促炎因子 IL-6、IL-1 β 呈负相关,这一结果再次证明 VDAC3 可能具有与 GPX4-SLC7A11 通路相同调控铁死亡的作用,并且其可能通过调控铁死亡参与 SIMI 的发生。

综上所述,VDAC3 是线粒体功能的重要调节因子,VDAC3 在脓毒症心肌损伤中表达下降,可能导致心肌细胞线粒体功能障碍,从而介导铁死亡的发生。后续的研究可增加铁死亡激动剂或抑制剂干预,从而更清楚地阐明 VDAC3 与铁死亡之间的关系,并在细胞水平进一步验证。对 VDAC3 的进一步研究可能为多种相关疾病提供有前景的治疗方法。期待 VDAC3 能成为治疗多种疾病的靶点,为相关疾病带来新的治疗策略和突破。

参考文献:

- [1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810.
- [2] HONG G, ZHENG D, ZHANG L, et al. Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in sepsis [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 123: 125-137.
- [3] HOLLENBERG S M, SINGER M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(6): 424-434.
- [4] CARBONE F, LIBERALE L, PREDA A, et al. Septic cardiomyopathy: from pathophysiology to the clinical setting [J]. Cells, 2022, 11(18): 2833.
- [5] DONG Y, WEI S, LIU Y, et al. Aspirin is associated with improved outcomes in patients with sepsis-induced myocardial injury: an analysis of the MIMIC-IV database [J]. J Clin Anesth, 2024, 99: 111597.
- [6] LIU C, ZOU Q, TANG H, et al. Melanin nanoparticles alleviate sepsis-induced myocardial injury by suppressing ferroptosis and inflammation [J]. Bioact Mater, 2022, 24: 313-321.
- [7] HUANG J, ITA M, ZHOU H, et al. Autophagy induced by taurodine protects against polymicrobial sepsis by promoting both host resistance and disease tolerance [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(19): e2121244119.
- [8] DAI E, CHEN X, LINKERMANN A, et al. A guideline on the molecular ecosystem regulating ferroptosis [J]. Nat Cell Biol, 2024, 26(9): 1447-1457.
- [9] SHEN H, XIE K, TIAN Y, et al. N6-methyladenosine writer METTL3 accelerates the sepsis-induced myocardial injury by regulating m6A-dependent ferroptosis [J]. Apoptosis, 2023, 28(3/4): 514-524.
- [10] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. Cell, 2022, 185(14): 2401-2421.
- [11] KANWAR P, SANYAL S K, MAHIWAL S, et al. CIPK9 targets VDAC3 and modulates oxidative stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2022, 109(1): 241-260.
- [12] YUAN Z, DEWSON G, CZABOTAR P E, et al. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins [J]. Biochem Soc Trans, 2021, 49(6): 2787-2795.
- [13] REINA S, NIBALI S C, TOMASELLO M F, et al. Voltage Dependent Anion Channel 3 (VDAC3) protects mitochondria from oxidative stress [J]. Redox Biol, 2022, 51: 102264.
- [14] HUANG G, XIANG Z, WU H, et al. The lncRNA BDNF-AS/WDR5/FBXW7 axis mediates ferroptosis in gastric cancer peritoneal metastasis by regulating VDAC3 ubiquitination [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4): 1415-1433.
- [15] YANG Y, LUO M, ZHANG K, et al. Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 433.
- [16] HUANG F, PANG J, XU L, et al. *Hedyotis diffusa* injection induces ferroptosis via the Ba_x/Bcl2/VDAC2/3 axis in lung adenocarcinoma [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154319.
- [17] WANG C, YUAN W, HU A, et al. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 175-184.
- [18] 刘义琴, 朱婷婷, 毛海霞, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾纤维化过程中铁死亡相关因子的变化[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 85-91.
- [19] LIU Y Q, ZHU T T, MAO H X, et al. Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 85-91.
- [20] LIU D, HUANG S Y, SUN J H, et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options [J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 56.
- [20] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic

- shock [J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75–87.
- [21] MARTIN L, DERWALL M, AL ZOUBI S, et al. The septic heart: current understanding of molecular mechanisms and clinical implications [J]. Chest, 2019, 155(2): 427–437.
- [22] REINA S, GUARINO F, MAGRÌ A, et al. VDAC3 as a potential marker of mitochondrial status is involved in cancer and pathology [J]. Front Oncol, 2016, 6: 264.
- [23] SILVA C M S, WANDERLEY C W S, VERAS F P, et al. Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation [J]. Blood, 2021, 138(25): 2702–2713.
- [24] ZHAN M, DING Y, HUANG S, et al. Lysyl oxidase-like 3 restrains mitochondrial ferroptosis to promote liver cancer chemoresistance by stabilizing dihydroorotate dehydrogenase [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 3123.
- [25] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity [J]. J Exp Med, 2021, 218(6): e20210518.
- [26] QIU S, ZHONG X, MENG X, et al. Mitochondria-localized eGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression [J]. Cell Res, 2023, 33(4): 299–311.
- [27] SUN Y, YAO X, ZHANG Q J, et al. Beclin-1-dependent autophagy protects the heart during sepsis [J]. Circulation, 2018, 138(20): 2247–2262.
- [28] JAKOBSSON G, PAPAREDDY P, ANDERSSON H, et al. Therapeutic S100A8/A9 blockade inhibits myocardial and systemic inflammation and mitigates sepsis-induced myocardial dysfunction [J]. Crit Care, 2023, 27(1): 374.
- [29] PEOPLES J N, SARAF A, GHAZAL N, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1–13.
- [30] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [31] LI P, JIANG M, LI K, et al. Glutathione peroxidase 4-regulated neutrophil ferroptosis induces systemic autoimmunity [J]. Nat Immunol, 2021, 22(9): 1107–1117.
- [32] TANG D, KROEMER G, KANG R. Ferroptosis in immunostimulation and immunosuppression [J]. Immunol Rev, 2024, 321(1): 199–210.
- [33] LI J Y, REN C, WANG L X, et al. Sestrin2 protects dendrite cells against ferroptosis induced by sepsis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 834.
- [34] XU W, WEI D, SONG X. Identification of SLC40A1, LCN2, CREB5, and SLC7A11 as ferroptosis-related biomarkers in alopecia areata through machine learning [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 3800.
- [35] WIERNICKI B, MASCHALIDI S, PINNEY J, et al. Cancer cells dying from ferroptosis impede dendritic cell-mediated anti-tumor immunity [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3676.
- [36] NEWTON K, STRASSER A, KAYAGAKI N, et al. Cell death [J]. Cell, 2024, 187(2): 235–256.
- [37] XIAN H, WATARI K, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. Oxidized DNA fragments exit mitochondria *via* mPTP- and VDAC-dependent channels to activate NLRP3 inflammasome and interferon signaling [J]. Immunity, 2022, 55(8): 1370–1385.
- [38] DU Y, GUO Z. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors [J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 501.
- [39] ZHU T, LIU B, WU D, et al. Autophagy regulates VDAC3 ubiquitination by FBXW7 to promote erastin-induced ferroptosis in acute lymphoblastic leukemia [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 740884.
- [40] LUO P, ZHANG Q, SHEN S, et al. Mechanistic engineering of celastrol liposomes induces ferroptosis and apoptosis by directly targeting VDAC2 in hepatocellular carcinoma [J]. Asian J Pharm Sci, 2023, 18(6): 100874.

[收稿日期]2024-12-12