

## · 论著 ·

## 4-辛基衣康酸减轻脂多糖诱导的心肌损伤

李彬 刘江文 王凤媛 文英 蒋学俊

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室,湖北 武汉 430060)

**【摘要】目的** 探讨 4-辛基衣康酸(4-OI)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠心肌损伤的影响。**方法** 采用 6~8 周雄性 C57BL/6J 小鼠,经腹腔注射 4-OI(25 mg/kg)或等量生理盐水连续预处理 3 d 后,腹腔注射 LPS(10 mg/kg)或等量生理盐水,12 h 后行心脏超声检查。取心脏,行苏木精-伊红(HE)染色观察心肌病理变化;Western blot 检测心肌组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、p65、pp65、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPx4)、前列腺素内过氧化物合成酶 2(PTGS2)和核转录因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)的蛋白表达水平。**结果** 心脏超声结果显示,LPS 腹腔注射后,小鼠左心室明显扩张,收缩功能减低;与 LPS 组相比,4-OI 组小鼠左心室收缩功能改善。HE 染色示 LPS 腹腔注射后,小鼠心脏炎症细胞浸润明显,心肌细胞排列疏松,表现出类似于脓毒症诱导的心肌损伤的病理特点。4-OI 组小鼠心脏的炎症细胞浸润程度和病理改变较 LPS 组低。Western blot 示 LPS 腹腔注射后,小鼠心肌组织中 Nrf2 和 GPx4 的表达明显降低,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PTGS2 以及 pp65/p65 表达明显升高;与 LPS 组相比,4-OI 组小鼠心肌组织中的 Nrf2 和 GPx4 蛋白水平更高,而 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、pp65/p65 和 PTGS2 表达水平降低。**结论** 4-OI 预处理可通过减轻炎症和氧化应激,减轻 LPS 诱导造成的心肌损伤,从而保护心脏功能。

**【关键词】** 4-辛基衣康酸;脂多糖;炎症;氧化应激**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2023.01.018

## 4-Octyl Itaconate Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Myocardial Injury

LI Bin, LIU Jiangwen, WANG Fengyuan, WEN Ying, JIANG Xuejun

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute, Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of 4-octyl itaconate(4-OI) on lipopolysaccharides(LPS)-induced myocardial injury in mice. **Methods** Male C57BL/6J mice of 6~8 weeks were injected intraperitoneally with 4-OI(25 mg/kg) or an equivalent amount of normal saline for continuous pretreatment for 3 days. LPS(10 mg/kg) or an equivalent amount of normal saline was injected intraperitoneally, and echocardiography was performed 12 hours later. The hearts were taken for hematoxylin and eosin(HE) staining to observe myocardial pathological changes; the protein expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), p65, pp65, glutathione peroxidase 4(GPx4), prostaglandin endoperoxide synthase 2(PTGS2), nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results** Cardiac ultrasound results showed that the left ventricle of mice significantly expanded and the systolic function decreased after LPS intraperitoneal injection; and compared with LPS group, the left ventricular systolic function in 4-OI group was improved. HE staining showed that the inflammatory cells in the heart of mice were significantly infiltrated and the arrangement of myocardial cells was loose after intraperitoneal injection of LPS, showing pathological characteristics similar to sepsis-induced myocardial injury. The degree of inflammatory cell infiltration and pathological changes in the heart of 4-OI group was lower than that of LPS group. Western blot showed that the expression of Nrf2 and GPx4 in myocardial tissue of mice were decreased significantly after intraperitoneal injection of LPS, but the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PTGS2 and pp65/p65 expression were increased significantly; and compared with LPS group, Nrf2 and GPx4 protein levels in myocardial tissue of 4-OI group were higher, while the expression levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , pp65/p65 and PTGS2 were decreased. **Conclusion** 4-OI pretreatment can protect cardiac function by reducing inflammation and oxidative stress, reducing LPS-induced myocardial damage.

**【Key words】** 4-Octyl itaconate; Lipopolysaccharide; Inflammation; Oxidative stress

脓毒症是临床上一种常见的全身性疾病,极易进展为多器官衰竭,进而导致患者死亡<sup>[1-2]</sup>。其中,脓毒

症引发的以左心室扩张和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)降低为特征的心肌

基金项目:湖北省卫生健康委科研立项青年基金(wj2019Q043)

通信作者:蒋学俊, E-mail: xjjiang@whu.edu.cn

损伤在脓毒症并发症中最为常见,是导致患者死亡的重要原因<sup>[3]</sup>。目前临床缺乏有效的特异性治疗方法。因此,寻求新的治疗方案以减轻脓毒症引发的心肌损伤是目前临床亟待解决的问题。新近研究<sup>[4]</sup>显示,作为三羧酸循环代谢物的衣康酸在活化的巨噬细胞中高度诱导,可显著抑制炎症反应。其作用机制主要是使 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 的半胱氨酸残基 151、257、288、273 和 297 烷基化,并阻止它与核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 结合,使 Nrf2 易位到细胞核,上调下游抗氧化反应相关基因的表达,从而抑制氧化应激<sup>[5]</sup>,同时 4-辛基衣康酸(4-octyl itaconate, 4-OI)还可抑制 p65 的磷酸化以及 pp65 的入核<sup>[6]</sup>。4-OI 是一种细胞通透性衣康酸衍生物,具备潜在的减轻脓毒症引发的心肌损伤的应用价值,但尚无研究证实。因此,本研究拟探究 4-OI 对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的心肌损伤的影响,以评估 4-OI 在脓毒症引发的心肌损伤方面的治疗价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与分组

6~8 周雄性 C57BL/6J 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于武汉大学动物实验中心,无特定病原体条件下,随机分为 3 组。Control 组( $n=10$ ):腹腔注射等量生理盐水连续 3 d;LPS 组( $n=10$ ):腹腔注射等量生理盐水 3 d 后,腹腔注射 LPS (10 mg/kg),构建 LPS 诱导的脓毒症造成的心肌损伤模型;4-OI 组( $n=10$ ):腹腔注射 4-OI (25 mg/kg) 连续处理 3 d 后,腹腔注射 LPS (10 mg/kg)。

### 1.2 药品与试剂

4-OI 和 LPS 购自 sigma 公司,p65、pp65、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)、Nrf2 和 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.3 超声心动图检查

用 1% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉小鼠,胸部备皮后固定,使用飞依诺公司的 VINNO6 超声仪描记 M 型心脏超声图像,测量 LVEF、左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd) 和左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESd),以评估左心室的结构及功能<sup>[7]</sup>。

### 1.4 苏木精-伊红染色

用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射 (90 mg/kg) 安乐死处死小鼠,迅速开胸摘取心脏,4% 多聚甲醛中 4℃ 固定过夜。石蜡包埋,6 μm 切片后行苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色,光学显微镜下观察并拍照。

### 1.5 Western blot 检测

分离小鼠左心室心肌组织并冷冻在液氮中,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白质测定试剂盒定量蛋白浓度并用 RIPA 裂解液调整至同一浓度,后加入 5X 上样缓冲液,混匀并 100℃ 加热 10 min。采用 SDS-PAGE 电泳分离 40 μg 蛋白质,电转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,然后与特定一抗工作液 4℃ 孵育过夜 [p65 1:1 000、pp65 1:1 000、GPx4 1:1 000、PTGS2 1:1 000、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 1:1 000、白介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 1:1 000 和 GAPDH 1:1 500]。洗膜后,二抗工作液室温孵育 1 h,使用 ECL 试剂盒激发化学发光信号,并用 ImageLab™ 软件检测。以 GAPDH 作为内参进行灰度分析。

### 1.6 统计学分析

所有数据均以平均值 ± 标准误表示。使用 GraphPad Prism 9 软件,采用单因素方差分析法进行统计分析, $P<0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 超声心动图检查结果

心脏超声检查结果显示 (图 1E 和表 1),与 Control 组相比,LPS 组 LVEF [(41.65 ± 4.49)% vs (80.32 ± 2.43)%,  $P<0.001$ ] 和 LVFS [(17.16 ± 2.92)% vs (41.84 ± 2.31)%,  $P<0.001$ ] 显著降低, LVESd [(3.05 ± 0.16) mm vs (2.17 ± 0.12) mm,  $P<0.001$ ] 显著增加。与 LPS 组相比,4-OI 组 LVEF [(60.93 ± 4.26)% vs (41.65 ± 4.49)%,  $P<0.001$ ] 和 LVFS [(28.89 ± 2.64)% vs (17.16 ± 2.92)%,  $P<0.001$ ] 得以保留, LVESd [(2.50 ± 0.12) mm vs (3.05 ± 0.16) mm,  $P<0.001$ ] 明显缩小 (图 1A、图 1B 和图 1C)。三组之间 LVEDd 无显著性差异 (图 1D)。

### 2.2 病理学检查结果

HE 染色显示,与 Control 组相比,LPS 组小鼠心脏表现出明显的炎症细胞浸润以及心肌细胞排列疏松,该表现类似于脓毒症诱导的心肌损伤的病理特点。与 LPS 组相比,4-OI 组小鼠心脏炎症细胞浸润程度较低,心肌细胞排列较紧密 (图 2)。

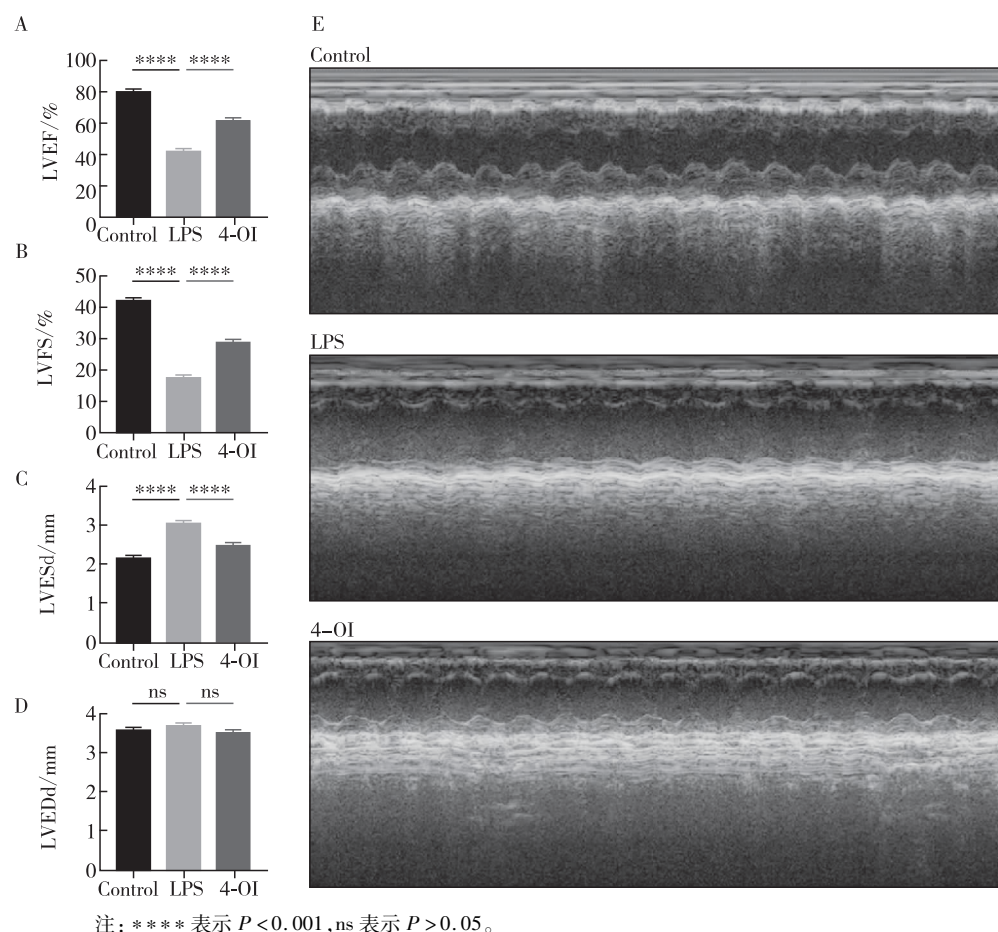
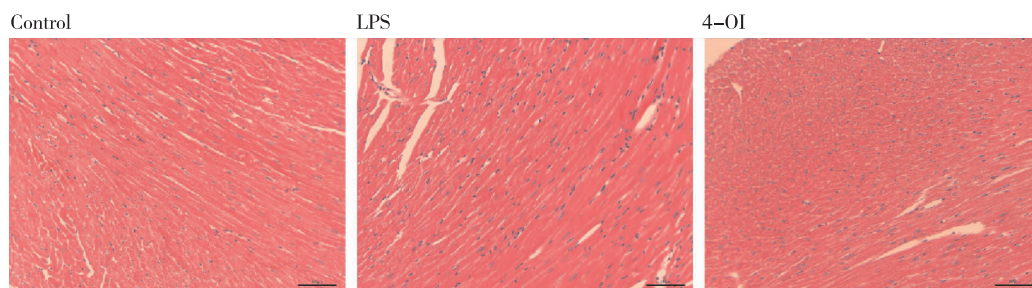


图 1 4-OI 腹腔注射预处理对 LPS 腹腔注射后小鼠心脏超声的影响

表 1 三组小鼠超声心功能比较

组别	LVEF/%	LVFS/%	LVEDd/mm	LVESd/mm
Control	80.32 ± 2.43	41.84 ± 2.31	3.58 ± 0.16	2.17 ± 0.12
LPS	41.65 ± 4.49	17.16 ± 2.92	3.68 ± 0.15	3.05 ± 0.16
4-OI	60.93 ± 4.26	28.89 ± 2.64	3.52 ± 0.12	2.50 ± 0.12



注: HE 染色, 200 倍。

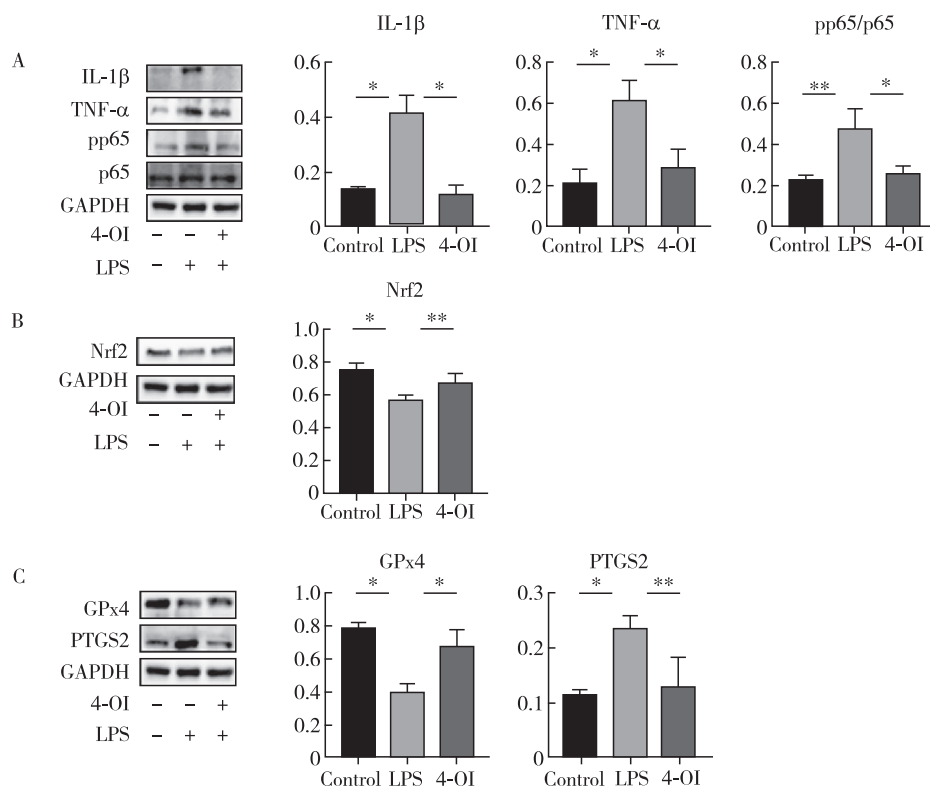
图 2 4-OI 腹腔注射预处理对 LPS 腹腔注射后小鼠心脏病理学的影响

### 2.3 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示,与 Control 组比较, LPS 组小鼠心肌组织中 Nrf2 和 GPx4 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PTGS2 ( $P < 0.05$ ) 和 pp65/p65 ( $P < 0.01$ ) 的表达明显升高;与 LPS 组相比,4-OI 组小鼠 Nrf2 ( $P < 0.01$ ) 和 GPx4 ( $P < 0.05$ ) 的表达明显

升高, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、pp65/p65 ( $P < 0.05$ ) 和 PTGS2 ( $P < 0.01$ ) 的表达明显下降(图 3)。LPS 组小鼠心肌组织中的 pp65/p65 ( $P < 0.01$ )、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) 的表达上调, Nrf2 ( $P < 0.05$ ) 的表达下调,而 PTGS2 ( $P < 0.05$ ) 的表达上调, GPx4 ( $P < 0.05$ ) 的表达下调;与 LPS 组相比,4-OI 组小鼠心肌组织中的 pp65/p65

p65、TNF- $\alpha$  和 IL- $\beta$  ( $P < 0.05$ ) 的表达下调, Nrf2 ( $P < 0.01$ ) 的表达上调, 而 PTGS2 ( $P < 0.01$ ) 的表达下调, GPx4 ( $P < 0.05$ ) 的表达上调。



注:图 A,炎症相关蛋白的改变;图 B,Nrf2 的改变;图 C,PTGS2 和 GPx4 的改变(\*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ )。

图 3 4-OI 腹腔注射预处理对 LPS 腹腔注射后小鼠心脏蛋白表达水平的影响

### 3 讨论与结论

脓毒症是一种常见的全身性炎症疾病,易进展为多器官功能衰竭,患者死亡率极高,尤以合并有心肌损伤时更为严重<sup>[8]</sup>。虽然脓毒症诱发的心肌损伤是一个可逆的过程,但其仍是导致脓毒症死亡率高的主要原因<sup>[9]</sup>。因此,在脓毒症患者的治疗中,减轻脓毒症引发的心肌损伤的治疗尤为重要,是降低脓症患者临床死亡率的重要措施。既往研究<sup>[1]</sup>表明,炎症反应和氧化应激是脓症患者发生心肌损伤的两个重要发病机制。LPS 可结合并激活巨噬细胞膜上的 Toll 样受体,促进 p65 的磷酸化以及 pp65 入核,促使包括 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  在内的促炎症因子表达上调<sup>[10]</sup>,激活炎症细胞直接损伤心肌细胞并抑制其收缩功能<sup>[11]</sup>,临床表现为 LVEF 及 LVFS 下降。另一方面,严重感染导致心肌细胞线粒体呼吸链酶复合物 II 功能障碍,导致电子传递方向逆转,诱发氧化应激,并对脂质、蛋白质和 DNA 等细胞组成成分产生直接损害<sup>[12]</sup>,还可进一步阻止缺氧诱导因子-1 $\alpha$  的降解,最终上调促炎症细胞 IL-1 $\beta$  的转录,加重炎症。GPx4 作为一种抗氧化成分,在氧化应激时表达水平会明显下降,同时诱导

PTGS2 上调,进而导致脂质氧化<sup>[13-14]</sup>。

衣康酸是三羧酸循环中的代谢产物,具有抗炎和抗氧化应激作用,新近研究<sup>[2]</sup>显示,4-OI 作为其衍生物可激活 Nrf2,上调抗氧化应激反应相关基因的表达,同时可作用于 p65 蛋白抑制炎症相关蛋白的表达,具备潜在的减轻脓毒症引发心肌损伤的应用价值,但尚无研究证实。本研究结果表明,4-OI 腹腔注射预处理能明显改善 LPS 腹腔注射后小鼠的心脏收缩功能,保护心脏结构的完整并缓解心肌组织的炎症浸润。4-OI 的应用可明显缓解 LPS 诱导的心肌组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等炎症因子的增加,抑制 p65 磷酸化。其机制可能与 4-OI 抑制 p65 的磷酸化,进而减少 pp65 入核以及下调促炎症因子的表达有关。同时,4-OI 的应用可激活 Nrf2,抑制 LPS 腹腔注射后导致的心脏 GPx4 水平下降及 PTGS2 水平上调,最终抑制氧化应激反应,从而保护心肌。

综上所述,4-OI 的预处理可能通过上调 Nrf2 的表达,降低 p65 的磷酸化水平来抑制炎症并发挥抗氧化应激作用,从而减轻 LPS 诱导造成的心肌损伤,但具体作用机制还有待深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392(10141):75-87.
- [2] Greco E, Lupia E, Bosco O, et al. Platelets and multi-organ failure in sepsis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2200.
- [3] Prescott HC, Angus DC. Enhancing recovery from sepsis; a review [J]. *JAMA*, 2018, 319(1):62-75.
- [4] Peace CG, O'Neill LA. The role of itaconate in host defense and inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(2):e148548.
- [5] Mills EL, Ryan DG, Prag HA, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1 [J]. *Nature*, 2018, 556(7699):113-117.
- [6] Li R, Yang W, Yin Y, et al. Protective role of 4-octyl itaconate in murine LPS/D-GalN-induced acute liver failure via inhibiting inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:9932099.
- [7] Settelmeier S, Rassaf T, Hendgen-Cotta UB. Revealing subtle changes in cardiac function using transthoracic dobutamine stress echocardiography in mice [J]. *J Vis Exp*, 2021, 168. DOI:10.3791/62019.
- [8] Ge WD, Li FZ, Hu BC, et al. Factors associated with left ventricular diastolic dysfunction in patients with septic shock [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1):134.
- [9] Okuhara Y, Yokoe S, Iwasaku T, et al. Interleukin-18 gene deletion protects against sepsis-induced cardiac dysfunction by inhibiting PP2A activity [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 243:396-403.
- [10] Huang Q, Liu DH, Chen CF, et al. Pgc-1 $\alpha$  promotes phosphorylation, inflammation, and apoptosis in H9c2 cells during the early stage of lipopolysaccharide induction [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5):1771-1781.
- [11] Hanna A, Frangogiannis NG. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(6):849-863.
- [12] Zang Q, Maass DL, Tsai SJ, et al. Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2007, 8(1):41-54.
- [13] Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis [J]. *Proteomics*, 2019, 19(18):e1800311.
- [14] Clemente SM, Martínez-Costa OH, Monsalve M, et al. Targeting lipid peroxidation for cancer treatment [J]. *Molecules*, 2020, 25(21):5144.

收稿日期:2022-08-01

## 本刊增加论著栏目的启事

本刊 2019 年起新增论著栏目,论著投稿注意事项如下。

1. 论著文章 6 000 字以内(包括摘要、图表及参考文献);论著采用结构式摘要(含目的、方法、结果和结论),摘要篇幅以 200~400 个汉字为宜,并有完整的英文(含文题、作者、单位、摘要和关键词);关键词以 3~8 个为宜;论著引用参考文献要求达到 20 条以上。

2. 论文如属国家自然科学基金项目或省、部级以上重点攻关课题,其他科研基金资助的项目,请在文稿首页脚注“【基金项目】xxx 科研资助项目(编号)”,如获专利请注明专利号。本刊对重大研究成果、国家自然科学基金、卫生部科研基金、省科技厅项目,将优先发表。

3. 本刊已全部实行网上投稿,请通过《心血管病学进展》杂志的稿件远程处理系统投稿(登录 <http://xxgbxzz.paperopen.com> 后,点击“作者投稿”,在“作者投稿管理平台”中投稿)。网上投稿成功后还需报送以下材料:(1)稿件处理费 50 元(可通过手机银行转账)。(2)论文投送介绍信和著作权授权书(可发电子版):来稿需经作者单位审核,应注明对稿件的审评意见以及无一稿多投等学术不端行为以及其他与国家有关法律法规相违背的问题,并加盖公章。如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。(3)若此项研究为基金项目者,需附基金批文复印件(可发电子版)。

本刊编辑部