

限时进食通过抑制细胞铁死亡减轻脓毒性心肌损伤

卢素贤 郭慈航 王顺 鲁志兵

(武汉大学中南医院心血管内科/武汉大学心肌损伤与修复研究所 湖北省心血管病介入诊疗临床医学研究中心, 湖北 武汉 430071)

【摘要】目的 探讨限时进食(TRF)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠心肌损伤的影响。**方法** 将小鼠从6周龄开始随机分为正常喂养(NF)组和TRF组,喂养4周后,于建模前将小鼠随机分为4组,NF+磷酸盐缓冲液(PBS)组($n=6$)、TRF+PBS组($n=6$)、NF+LPS组($n=10$)、TRF+LPS组($n=10$),前两组小鼠给予腹腔注射PBS,后两组给予腹腔注射LPS(50 mg/kg),以此来构建脓毒性心肌损伤模型。为评估心肌损伤程度,给药6 h后,使用超声心动图评估各组小鼠心脏功能,12 h后采集小鼠血清检测心肌损伤标志物及炎症因子,对心脏组织进行HE染色评估心肌组织形态。通过蛋白质印迹法检测细胞铁死亡相关指标。为进一步验证TRF通过影响细胞铁死亡减轻LPS诱导的心肌损伤,再次重复上述喂养方法,于建模前,将小鼠随机分为NF+PBS组($n=6$)、NF+LPS组($n=6$)、TRF+LPS组($n=10$)及TRF+LPS+细胞铁死亡诱导剂(erastin)组($n=10$),除NF+PBS外,其余三组建模方法同上。采用上述方法再次评估心肌损伤程度及检测细胞铁死亡诱导情况。**结果** (1)与NF+PBS组相比,NF+LPS组表现为小鼠心脏功能下降,小鼠的左室射血分数和左室短轴缩短率均下降,心肌损伤标志物、心肌炎症因子水平及细胞铁死亡均增加;(2)与NF+LPS组相比,TRF+LPS组可以通过降低细胞铁死亡水平来减轻心肌炎症,从而改善小鼠心脏功能;(3)与TRF+LPS组相比,TRF+LPS+erastin组显著抑制了TRF对脓毒性心肌病心肌损伤的保护作用。**结论** TRF可以通过抑制细胞铁死亡来减轻脓毒性心肌损伤。

【关键词】 限时进食;炎症;脓毒性心肌病;细胞铁死亡;热量限制

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2025.12.015

Time-Restricted Feeding Alleviates Sepsis-Induced Myocardial Injury via Inhibition of Ferroptosis

LU Suxian, GUO Cihang, WANG Shun, LU Zhibing

(Department of Cardiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Institute of Myocardial Injury and Repair, Wuhan University, Hubei Provincial Clinical Research Center for Cardiovascular Intervention, Wuhan 430071, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of time-restricted feeding (TRF) and ferroptosis on lipopolysaccharide (LPS)-induced myocardial injury in murine models of sepsis-induced cardiomyopathy. **Methods** Six-week-old mice were randomized into normal feeding (NF) or TRF groups. After 4 weeks of feeding, prior to modeling, mice were further subdivided into four groups: NF+phosphate buffered saline (PBS) ($n=6$), TRF+PBS ($n=6$), NF+LPS ($n=10$), and TRF+LPS ($n=10$). Mice in the first two groups were administered intraperitoneal injections of PBS, whereas those in the latter two groups received intraperitoneal injections of LPS (50 mg/kg) to establish the sepsis-induced myocardial injury model. Cardiac function was assessed by echocardiography 6 hours post-injection. At 12 hours, serum samples were collected to measure myocardial injury biomarkers and inflammatory cytokines, while myocardial damage was histologically evaluated using HE staining. Ferroptosis-related proteins were analyzed by Western blotting. To further verify the role of TRF in ferroptosis regulation, a secondary experiment was performed with the following groups: NF+PBS ($n=6$), NF+LPS ($n=6$), TRF+LPS ($n=10$), and TRF+LPS+erastin (a ferroptosis inducer, $n=10$). Cardiac function and ferroptosis markers were re-evaluated using the same protocols. **Results** (1) Compared with the NF+PBS group, the NF+LPS group showed impaired cardiac function, characterized by decreased left ventricular ejection fraction and left ventricular fractional shortening, along with increased levels of myocardial injury biomarkers, pro-inflammatory cytokines, and ferroptosis. (2) Compared with the NF+LPS group, the TRF+LPS group exhibited reduced myocardial inflammation and ferroptosis, thereby improving cardiac function. (3) Compared with the TRF+LPS group, the TRF+LPS+erastin group markedly abrogated the cardioprotective effects of TRF against sepsis-induced cardiomyopathy. **Conclusion** TRF attenuates LPS-induced septic cardiomyopathy by inhibiting ferroptosis, suggesting a potential dietary intervention strategy for sepsis-associated myocardial injury.

【Keywords】 Time-restricted feeding; Inflammation; Sepsis-induced cardiomyopathy; Ferroptosis; Calorie restriction

基金项目:国家自然科学基金青年项目(82200427)

通信作者:鲁志兵, E-mail: luzhibing222@163.com

脓毒症合并心脏功能障碍即脓毒性心肌病 (sepsis-induced cardiomyopathy, SCM), 是脓毒症常见并发症, 可使脓毒症的死亡风险增加, 是影响患者发病率和死亡率的主要预测因素^[1]。目前, SCM 的发病机制尚未完全阐明, 其诊断与治疗策略仍存在不足。SCM 的发病机制十分复杂, 涉及补体激活、肾上腺素通路下调、心肌细胞凋亡以及线粒体功能障碍等^[2]。尽管诊断技术的进步提高了 SCM 的检出率, 但其病理生理机制仍有待进一步研究。SCM 定义多样, 在发病率、预后和临床重要性方面存在分歧。在治疗方面, 早期干预能显著改善 SCM 的预后^[3]。

近年来, 限时进食 (time-restricted feeding, TRF) 作为一种饮食干预措施, 在炎症性疾病及心血管疾病的预防中展现出独特的优势, 但其在 SCM 中的作用不明确^[4-6]。此外, 许多疾病都与细胞铁死亡有关, 包括癌症、代谢紊乱、自身免疫性疾病、心血管疾病等。细胞铁死亡相关蛋白已成为许多目前无法治愈的重大疾病的潜在靶标, 一些细胞铁死亡调节剂已在临床试验中显示出疗效^[7]。有研究^[8]表明, TRF 可通过抑制细胞铁死亡来减轻电离辐射诱导的肠道损伤。间歇性禁食作为 TRF 最常用的饮食模式, 也可通过抑制细胞铁死亡来改善小鼠创伤性脑损伤, 从而减轻认知功能障碍^[9]。此外, 间歇性禁食可对抗多种促细胞铁死亡蛋白的上调, 如长链酰基辅酶 A 合成酶 (long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL) 家族蛋白^[10]。目前, 细胞铁死亡已被证实与 SCM 密切相关^[11]。然而, 尚无研究探讨 TRF 及细胞铁死亡对 SCM 的作用机制。因此, 本研究主要探讨 TRF 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导下的心脏功能、炎症反应和细胞铁死亡的影响, TRF 可能成为减轻 SCM 的早期干预措施。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 64 只, 体重 18~20 g, 购自湖北省实验动物研究中心, 生产许可证号: SCXK (鄂)2020-0018。小鼠饲养于武汉大学人民医院动物实验中心的无特定病原体环境中, 饲养条件为温度 20~25 °C、湿度 40%~70% 和光照 12/12 h 光/暗周期。将小鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常喂养 (normal feeding, NF) 组及 TRF 组, NF 组小鼠 28 只, TRF 组小鼠 36 只。NF 组小鼠自由进食, TRF 组小鼠每天进食时间为 18:00—24:00, 期间自由进食。所有小鼠 unlimited 饮水, 共喂养 4 周^[12]。动物方案按照动物福利和美国兽医协会《动物安乐死指南(2020)》执行, 本研究已

通过武汉大学人民医院动物伦理委员会审核批准 [WDRM 动(福)第 20231104C 号]。

1.2 主要试剂及仪器

LPS 购自 Sigma-Aldrich; 细胞铁死亡诱导剂 erastin 购自 MedChemExpress; 小鼠肌酸激酶同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB)、心肌肌钙蛋白 (cardiac troponin, cTn) I、cTnT ELISA 试剂盒购自武汉江莱生物科技有限公司; 一抗谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、ACSL4、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 及二抗购自 Proteintech; HE 染色试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; TRIzol 购自 Invitrogen; 互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 合成试剂盒和 SYBR Green PCR 预混液购自 Roche; 放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 缓冲液、二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 蛋白定量试剂盒、增强化学发光曝光液购自上海碧云天生物技术有限公司; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自 Millipore。

心脏超声采用 Vevo 2100 System (FUJIFILM VisualSonics); 显微镜购自 Olympus; 酶标仪和化学发光成像系统购自 Bio-Rad; 高通量组织研磨器购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 实验分组及建模

(1) 按随机字母表法将 C57BL/6J 小鼠分为 NF 组 ($n=28$)、TRF 组 ($n=36$)。喂养 4 周后, NF 组小鼠分为磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 组 ($n=12$) 和 LPS 组 ($n=16$); TRF 组小鼠分为 PBS 组 ($n=6$)、LPS 组 ($n=20$) 及 LPS+erastin 组 ($n=10$)。(2) 所有 LPS 组及 LPS+erastin 组均通过腹腔注射 LPS (50 mg/kg)^[13] 建立 SCM 模型, 其余 3 组则注射等体积 PBS。细胞铁死亡诱导模型经腹腔注射细胞铁死亡诱导剂 erastin (15 mg/kg)^[14-15] 构建, 注射 erastin 48 h 后再进行 LPS 模型构建, 其余操作同上。详见图 1。

1.4 超声心动图评估及取材

LPS 注射后 6 h, 通过超声心动图评估小鼠心脏功能。首先, 小鼠在仰卧位下以 1.0%~1.5% 异氟烷进行吸入性维持麻醉。其次, 采用 Vevo 2100 System 经小鼠胸骨旁采集心脏短轴二尖瓣乳头肌切面的 M 型超声心动图。根据美国超声心动图学会指南^[16], 至少测量连续 3 个心动周期的左室收缩末期室间隔厚度 (left ventricular end-systolic interventricular septum thickness, IVSs)/左室舒张末期室间隔厚度 (left ventricular end-

diastolic interventricular septum thickness, IVSd)、左室收缩末期后壁厚度(left ventricular end-systolic posterior wall thickness, LVPWs)/左室舒张末期后壁厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)、左室收缩末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)/左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD),然后取平均值。使用超声 M 模式

或短轴线性法(teichholz 公式)计算左室收缩末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)/左室舒张末容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)。左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的计算公式为:(LVEDV-LVESV)/LVEDV×100%;左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)的计算公式为:(LVEDD-LVESD)/LVEDD×100%^[13,17]。

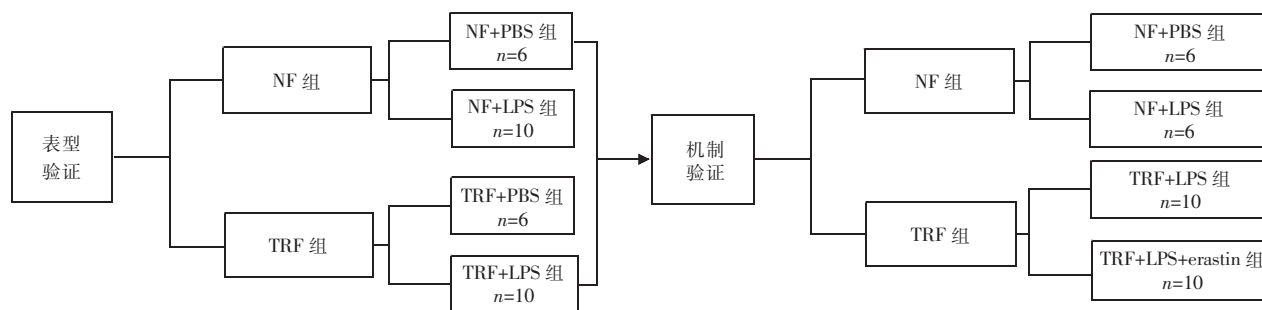


图 1 实验分组流程图

超声心动图完成 6 h 后,通过眼眶取血获得全血,然后通过离心(3 000 r/min, 15 min, 4 °C)获取上层血清,分装储存于-80 °C 用于下一步检测。随后对小鼠实施安乐死并采集心脏组织。在心脏中部二尖瓣乳头肌水平横切环状心肌组织并置于 4%多聚甲醛中进行固定;其余心尖及心底部心肌组织经液氮速冻后转移至-80 °C 超低温冰箱保存,用于后续 RNA 及蛋白检测。

1.5 心肌组织 HE 染色

心脏样本经 4%多聚甲醛室温固定 24 h 后,石蜡包埋并制备成 5 μm 切片,随后进行 HE 染色并于白光显微镜下拍照,观察心肌组织形态。

1.6 蛋白质印迹法检测

小鼠心脏组织采用 RIPA 裂解缓冲液进行蛋白质提取并采用 BCA 定量。取等量蛋白(20 μg/泳道)进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,随后将蛋白转移至 PVDF 膜,转膜完成后,使用 5%的脱脂奶粉室温封闭 60 min。然后与一抗 GPX4(1 : 1 000)、ACSL4(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 10 000)于 4 °C 孵育过夜。与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)室温孵育 60 min 后采用增强化学发光试剂进行显影。蛋白条带应用 Image Pro Plus 6.0 软件进行灰度值分析,GAPDH 作为内参进行标准化。

1.7 心肌损伤标志物检测

冻存的血清样本解冻后,根据制造商的使用说明,使用 ELISA 试剂盒检测 cTnI、cTnT 及 CK-MB 水平。ELISA 实验结束后,通过酶标仪测量所有样本的

光密度值,并根据标准品的浓度及光密度值绘制标准曲线,然后依据标准曲线计算血清样本中各指标浓度。

1.8 荧光定量 PCR

遵照说明书采用 Trizol 提取小鼠心脏组织总 RNA,随后使用反转录试剂盒进行 cDNA 合成,采用 SYBR Green PCR 预混液体系进行荧光定量 PCR 检测,以定量分析目标基因的表达水平,GAPDH 作为内参,具体引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

名称	引物序列(5' → 3' 方向)	产物长度/bp
GAPDH	F: AAGAGGGATGCTGCCCTTAC	81
	R: TCTACGGGACGAGGAAACAC	
IL-6	F: GACTGGGGATGCTCTGTAGCTC	107
	R: CAACTGGATGGAAGTCTCTTGC	
IL-1β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG	138
	R: TGATGTGCTGCTGCCGAGATT	
TNF-α	F: TAGCCACGCTCTAGCAAAC	136
	R: ACAAGGTACAACCCATCGGC	

注:IL,白细胞介素;TNF-α,肿瘤坏死因子 α。F,正向引物;R,反向引物。

1.9 统计学处理

所有连续变量数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)形式呈现,数据分析采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件。单因素方差分析结合 Tukey 多重比较法进行组间差异分析。 $P < 0.05$ 时判定具有统计学显著性。

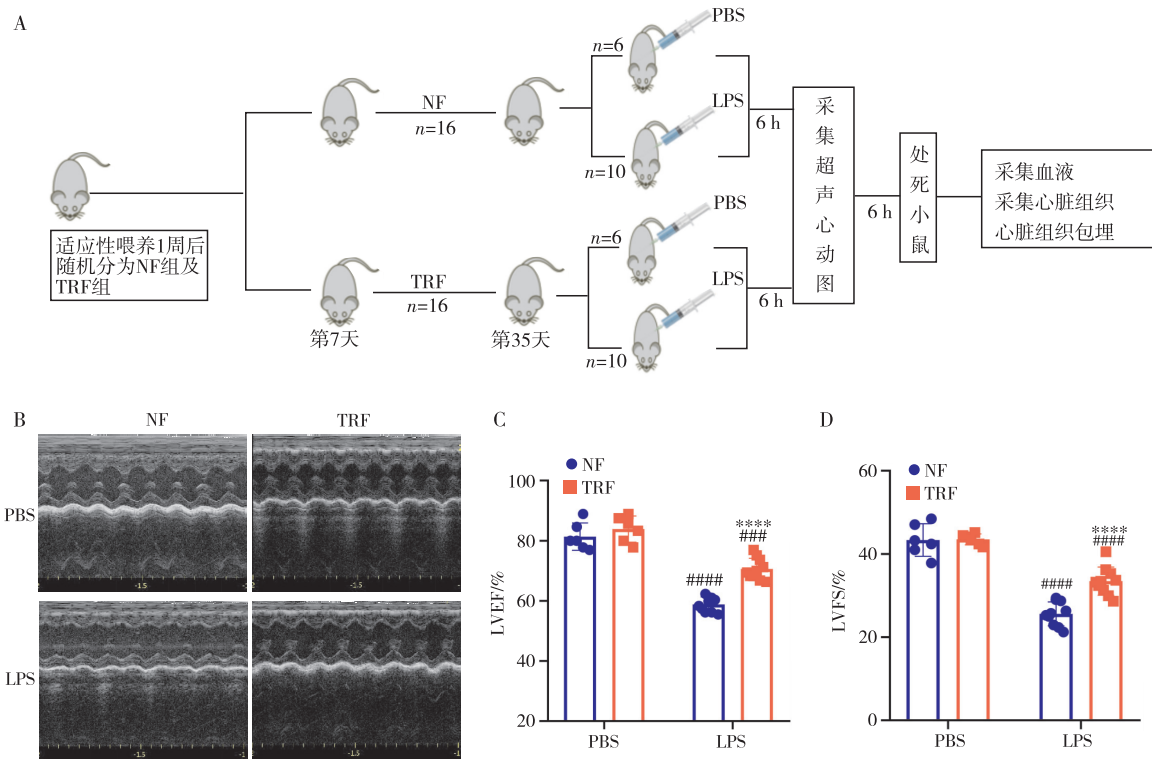
2 结果

2.1 TRF 对 SCM 心脏功能具有改善作用

近年来,有许多研究表明 TRF 对炎症性疾病具有保护作用,本研究通过腹腔注射 LPS 构建 SCM 小鼠模

型,以验证 TRF 对 SCM 的干预作用(图 2A)。经超声心动图评估发现,LPS 刺激 6 h 后,NF 组小鼠左心室收缩功能显著受损,表现为 LVEF 及 LVFS 的急剧下降;与之

相比,TRF 组小鼠心脏功能参数显著改善(图 2B~D)。上述结果表明,TRF 可有效维持 SCM 模型小鼠的心室收缩功能,对 SCM 心脏功能具有改善作用。



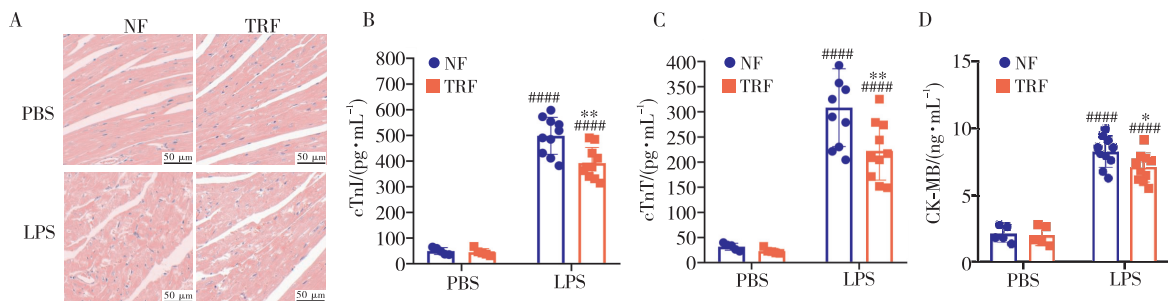
注:图 A,实验流程图;图 B,LPS 干预 6 h 后左心室 M 型超声图像;图 C~D,各组 LVEF 及 LVFS 定量分析。****表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.0001$;###表示与 PBS 组相比, $P < 0.001$;####表示与 PBS 组相比, $P < 0.0001$ 。

图 2 LPS 诱导 SCM 模型心脏功能评估

2.2 TRF 减轻了 SCM 的心肌损伤

通过 HE 染色对小鼠心肌组织进行病理学评估^[13,18],结果显示:LPS 诱导的 SCM 模型中,NF+LPS 组心肌组织呈现广泛单核细胞浸润及肌纤维排列紊乱伴局灶性断裂,而 TRF+LPS 组病理损伤显著减轻,仅见散在单核细胞浸润及轻度间质水肿(图 3A)。进

一步检测血清心肌损伤标志物,LPS 干预 12 h 后,TRF+LPS 组血清 cTnI、cTnT 及 CK-MB 水平均显著低于 NF+LPS 组(图 3B~D),且其降低幅度与心肌组织病理损伤程度呈正相关。上述数据表明,TRF 可显著抑制 SCM 进程中的心肌结构破坏及细胞损伤。



注:图 A,心肌组织 HE 染色;图 B~D,血清 cTnI、cTnT 及 CK-MB 水平。*表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.05$;**表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.01$;####表示与 PBS 组相比, $P < 0.0001$ 。

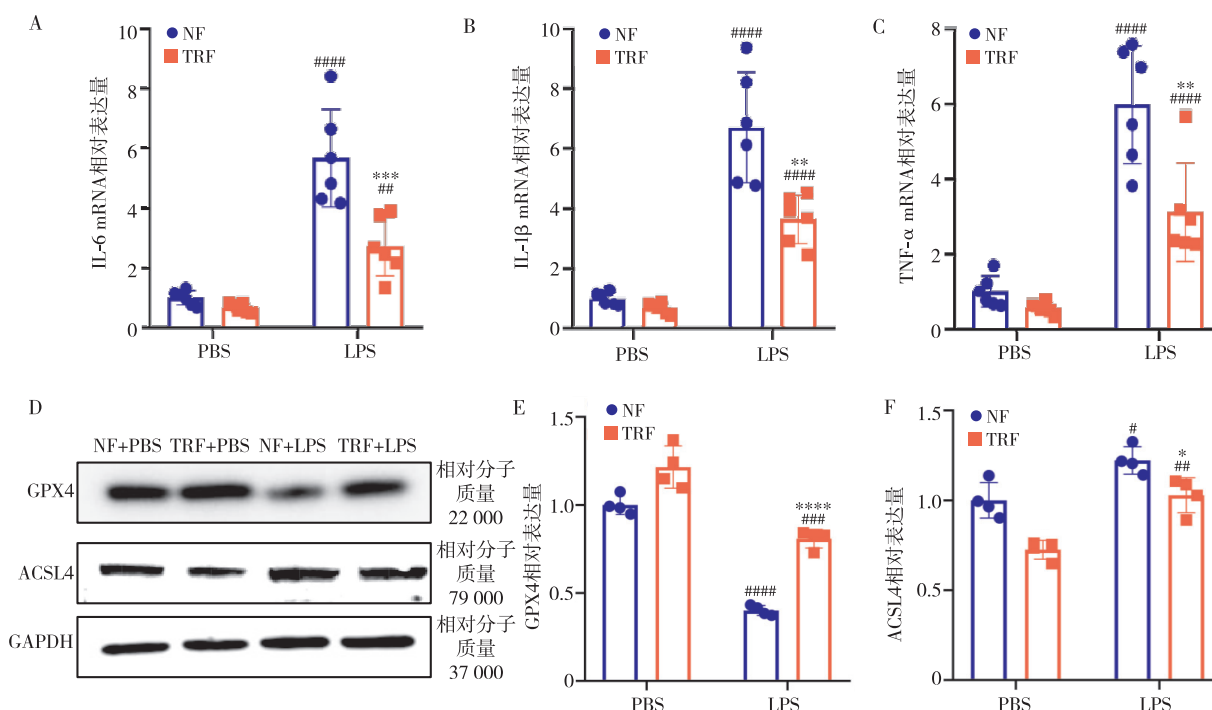
图 3 SCM 模型小鼠心肌病理学表现与血清标志物分析

2.3 TRF 减轻了 LPS 诱导的心肌损伤的炎症并抑制了心肌细胞铁死亡

基于 LPS 诱导的 SCM 模型中炎症反应与心肌损伤的病理关联性,本研究进一步通过荧光定量 PCR 分析了小鼠心肌组织炎症因子转录水平。在基础状态下(无 LPS 干预),NF 组与 TRF 组间炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 β 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 表达无显著差异。然而, LPS 刺激后, TRF+LPS 组心肌组织炎症因子表达较 NF+LPS 组显著降低,提示 TRF 可有效抑制脓毒症相关心

肌损伤炎症级联反应(图 4A~C)。

为阐明 TRF 心肌保护作用的分子机制,本研究通过蛋白质印迹法检测细胞铁死亡关键调控蛋白表达。结果显示, LPS 干预后, TRF+LPS 组心肌组织 GPX4 表达量较 NF+LPS 组显著上调,而 ACSL4 表达量则显著下调(图 4D~F)。GPX4 作为细胞铁死亡核心抑制因子,其表达上调可增强细胞抗氧化能力; ACSL4 作为脂质代谢关键酶,其下调可减少促细胞铁死亡脂质过氧化底物生成。上述结果表明, TRF 通过双向调控 GPX4/ACSL4 表达轴,抑制 LPS 诱导的心肌细胞铁死亡进程,进而发挥心肌保护作用。



注:图 A~C, IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA 相对表达量;图 D, GPX4 和 ACSL4 免疫印迹图;图 E 和 F, GPX4 和 ACSL4 蛋白表达水平。* 表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.05$; ** 表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.01$; *** 表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.001$; **** 表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.0001$; # 表示与 PBS 组相比, $P < 0.05$; ## 表示与 PBS 组相比, $P < 0.01$; ### 表示与 PBS 组相比, $P < 0.001$; #### 表示与 PBS 组相比, $P < 0.0001$ 。

图 4 LPS 干预 12 h 心肌炎症因子转录水平及细胞铁死亡蛋白表达

2.4 诱导细胞铁死亡后 TRF 对 SCM 的保护作用减弱

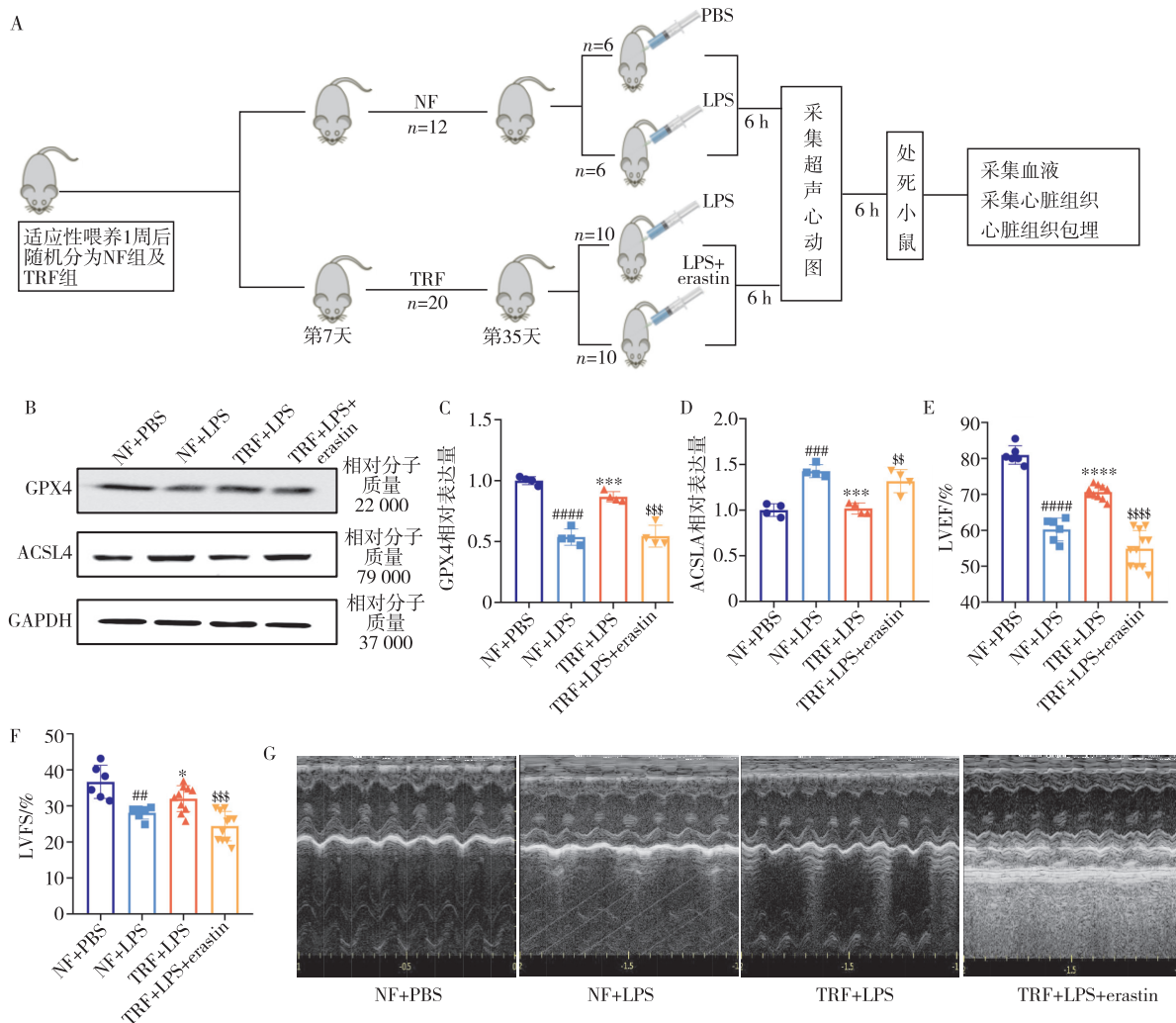
基于以上研究,本研究给予 TRF 组小鼠细胞铁死亡诱导剂 erastin,并用蛋白质印迹法检测不同组小鼠的细胞铁死亡相关蛋白 GPX4 及 ACSL4 的表达水平;在细胞铁死亡诱导成功后,再次对不同喂养组的小鼠进行 LPS 建模和小鼠心脏功能、心肌损伤及炎症指标的检测。

在 LPS 腹腔注射 6 h 后,通过超声心动图评估各

组小鼠心脏功能。结果显示, TRF+LPS+erastin 组小鼠心脏功能保护作用受到显著抑制,表现为 LVEF 和 LVFS 的显著降低。详见图 5。组织病理学分析显示, HE 染色下, TRF+LPS+erastin 组小鼠心肌组织呈现与 NF+LPS 组相似的病理特征,包括炎症细胞浸润及肌纤维断裂,而 TRF+LPS 组心肌结构损伤显著改善(图 6A)。分子标志物检测进一步证实, TRF+LPS+erastin 组小鼠血清 cTnI、cTnT 及 CK-MB 水平显著升高,与 NF+LPS 组无统计学差异(图 6B~D)。炎症因

子转录分析表明,TRF+LPS+erastin 组小鼠心肌组织中 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达水平与 NF+LPS 组趋于一致(图 6E~G)。

上述结果表明,细胞铁死亡诱导可抑制 TRF 对 SCM 心脏功能及炎症反应的保护作用,证实 TRF 的心脏保护机制依赖于其对细胞铁死亡通路的抑制作用。



注:图 A,实验流程图;图 B,GPX4 和 ACSL4 免疫印迹图;图 C 和 D,GPX4 和 ACSL4 蛋白表达水平;图 E 和 F,LVEF 及 LVFS 定量分析;图 G,M 型超声心动图代表性图像。##表示与 NF+PBS 组相比, $P<0.01$;###表示与 NF+PBS 组相比, $P<0.001$;####表示与 NF+PBS 组相比, $P<0.0001$;*表示与 NF+LPS 组相比, $P<0.05$;***表示与 NF+LPS 组相比, $P<0.001$;****表示与 NF+LPS 组相比, $P<0.0001$;\$\$表示与 TRF+LPS 组相比, $P<0.01$;\$\$\$表示与 TRF+LPS 组相比, $P<0.001$;\$\$\$\$表示与 TRF+LPS 组相比, $P<0.0001$ 。

图 5 小鼠心脏组织细胞铁死亡相关蛋白表达及细胞铁死亡诱导后超声心动图评估

3 讨论

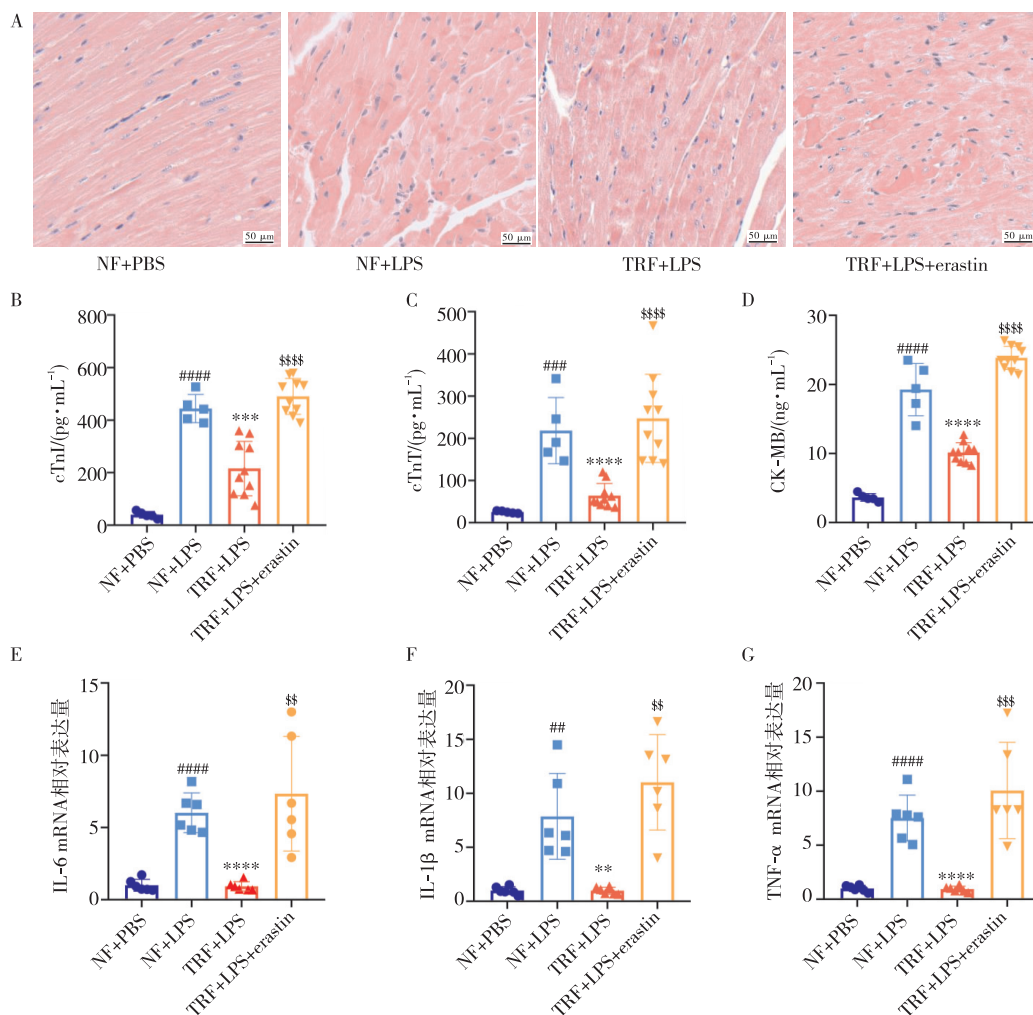
本研究首次揭示了 TRF 通过抑制心肌细胞铁死亡减轻 LPS 诱导的心肌损伤的分子机制。实验结果表明,TRF 干预显著降低了 LPS 诱导的血清心肌损伤标志物(cTnI, cTnT, CK-MB)升高,改善了心肌组织病理学改变,并同步抑制了细胞铁死亡特征性指标的表达异常(ACSL4 水平的升高及 GPX4 水平的降低)。这些发现为理解饮食节律调控在 SCM 中的保护作用提供了新的理论依据。

本研究发现 TRF 通过双重途径干预铁代谢失衡:

一方面,通过上调 GPX4 的表达增强抗氧化防御系统,抑制脂质过氧化终产物 4-羟基壬烯醛的积累;另一方面,通过显著下调 ACSL4 的表达,减少游离铁蓄积和促细胞铁死亡脂质前体的生物合成。这一发现与既往研究^[9]中 TRF 可改善遭受创伤性脑损伤的小鼠大脑皮质的细胞铁死亡形成机制呼应,但本研究首次在心肌组织中证实 TRF 对细胞铁死亡信号转导途径的特异性调控作用。此外,TRF 诱导的禁食-进食周期可能通过多种途径刺激自噬,包括上调自噬刺激蛋白、调节自噬体的大小和数量,以及 AMP 活化的蛋白质激

酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)磷酸化和雷帕霉素靶蛋白抑制^[19],从而清除受损线粒体以减轻氧

化应激,这一机制与细胞铁死亡抑制可能存在协同作用。



注:图 A, HE 染色代表性图像;图 B~D, cTnI, cTnT 及 CK-MB 水平的组间比较;图 E~G, 心肌组织 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表达水平。##表示与 NF+PBS 组相比, $P < 0.01$; ###表示与 NF+PBS 组相比, $P < 0.001$; ####表示与 NF+PBS 组相比, $P < 0.0001$; **表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.01$; ***表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.001$; ****表示与 NF+LPS 组相比, $P < 0.0001$; \$表示与 TRF+LPS 组相比, $P < 0.01$; \$\$\$表示与 TRF+LPS 组相比, $P < 0.001$; \$\$\$\$表示与 TRF+LPS 组相比, $P < 0.0001$ 。

图 6 erastin 诱导细胞铁死亡后心肌组织病理学、血清损伤标志物及炎症因子 mRNA 表达评估

细胞铁死亡的调控机制主要有氧化应激反应性转录因子,如核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、细胞铁死亡抑制因子的调节, Hippo-YAP、AMPK、缺氧信号转导以及铁代谢等途径。在机体中, TRF 主要通过调节细胞铁死亡抑制因子来发挥其保护作用;除本研究涉及的 GPX4 外, 细胞铁死亡抑制蛋白 1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)也承担着关键角色^[20-21]。FSP1 是转录因子 Nrf2 的靶标, 目前已有研究表明 TRF 可增强 Nrf2 的信号转导^[22]。因此, 笔者推测 TRF 可能通过调节 Nrf2 及 FSP1 来抑制细胞铁死亡从而对 SCM 产生保护作用; TRF 对肝脏的代谢具有一定的影响, 在细胞铁死亡的过程中, 铁调节也发挥重要的作用, 这

一作用与溶质载体家族 39 成员 A14(solute carrier family 39 member A14, SLC39A14)相关, 故 TRF 也可能通过调节肝脏铁代谢, 如铁调素、SLC39A14 等发挥作用^[23-24]; 除此之外, 在 TRF 的作用下, AMPK 通路会被激活, 而当 AMPK 通路被激活时, 机体会通过抑制细胞铁死亡来发挥保护机制, 如对急性肾损伤的保护作用^[25], 在大鼠射血分数保留的心力衰竭中, 卡格列净可通过 AMPK/PGC-1 α /Nrf2 信号转导途径来调节细胞铁死亡^[26], 这一发现很可能在 SCM 中也适用, 未来可进一步研究和探讨。

尽管本研究聚焦于细胞铁死亡通路, 但 TRF 对全身炎症反应的调控不可忽视。LPS 刺激下, TRF 组血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低, 这与既往研究中

TRF 可降低人群中促炎因子水平结果一致^[27]。值得注意的是,细胞铁死亡已被证实可通过释放损伤相关分子模式放大炎症反应,并且影响机体的免疫功能^[28],提示 TRF 可能通过打破“细胞铁死亡-炎症”恶性循环实现心肌保护。这一交互机制值得在后续研究中深入探讨。

本研究为脓毒症心肌损伤的预防提供了非药物干预新策略。相较于传统抗氧化剂,TRF 通过多靶点调控实现更全面的细胞保护,且具有依从性高、副作用少的特点。然而,研究仍存在以下局限:(1)动物模型未能完全模拟人类 SCM 复杂病理过程;(2)未明确 TRF 干预的时间窗及生物钟效应;(3)未解析肠道菌群-代谢物轴在其中的潜在作用。未来研究需结合单细胞测序和代谢组学技术,系统阐明生物节律调控与细胞铁死亡网络的时空互作关系。

综上所述,本研究首次证实了 TRF 通过抑制细胞铁死亡减轻 LPS 诱导的心肌损伤,其机制涉及铁代谢调控和炎症反应抑制。这一发现为 TRF 在心血管疾病防治中的应用提供了新的理论依据,并为细胞铁死亡相关疾病的治疗提供了潜在靶点。

利益冲突 所有作者声明本文无利益冲突

作者贡献 鲁志兵、王顺提出研究思路,给予经费和指导研究的开展;卢素贤、郭慈航进行实验并对小鼠进行病理评估;卢素贤、王顺分析数据并设计实验;卢素贤、王顺撰写原稿。所有作者阅读并批准了文稿的最终版本

参 考 文 献

- [1] Poveda-Jaramillo R. Heart dysfunction in sepsis [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2021, 35(1): 298-309.
- [2] Vasim I, Majeed CN, DeBoer MD. Intermittent fasting and metabolic health[J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 631.
- [3] Hollenberg SM, Singer M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(6): 424-434.
- [4] Melkani GC, Panda S. Time-restricted feeding for prevention and treatment of cardiometabolic disorders[J]. *J Physiol*, 2017, 595(12): 3691-3700.
- [5] Marko DM, Conn MO, Schertzer JD. Intermittent fasting influences immunity and metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(9): 821-833.
- [6] Allaf M, Elghazaly H, Mohamed OG, et al. Intermittent fasting for the prevention of cardiovascular disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 1(1): Cd013496.
- [7] Ru Q, Li Y, Chen L, et al. Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 271.
- [8] He Y, Zhao G, Ouyang X, et al. Creatine-mediated ferroptosis inhibition is involved in the intestinal radioprotection of daytime-restricted feeding[J]. *Gut Microbes*, 2025, 17(1): 2489072.
- [9] Yang Q, Li M, Liu J, et al. Intermittent fasting ameliorates neuronal ferroptosis and cognitive impairment in mice after traumatic brain injury [J]. *Nutrition*, 2023, 109: 111992.
- [10] Kazmirczak F, Hartweck LM, Vogel NT, et al. Intermittent fasting activates AMP-kinase to restructure right ventricular lipid metabolism and microtubules [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2023, 8(3): 239-254.
- [11] Li N, Wang W, Zhou H, et al. Ferritinophagy-mediated ferroptosis is involved in sepsis-induced cardiac injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 303-318.
- [12] Waldman HS, Renteria LI, McAllister MJ. Time-restricted feeding for the prevention of cardiometabolic diseases in high-stress occupations: a mechanistic review [J]. *Nutr Rev*, 2020, 78(6): 459-464.
- [13] Tang N, Tian W, Ma GY, et al. TRPC channels blockade abolishes endotoxemic cardiac dysfunction by hampering intracellular inflammation and Ca²⁺ leakage [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7455.
- [14] Yan R, Xie E, Li Y, et al. The structure of erastin-bound xCT-4F2hc complex reveals molecular mechanisms underlying erastin-induced ferroptosis [J]. *Cell Res*, 2022, 32(7): 687-690.
- [15] Lu S, Gong Y, He P, et al. 4-octyl itaconate attenuates acute pancreatitis and associated lung injury by suppressing ferroptosis in mice [J]. *Inflammation*, 2025, 48(5): 3156-3168.
- [16] Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2016, 17(12): 1321-1360.
- [17] Dao L, Liu H, Xiu R, et al. Gramine improves sepsis-induced myocardial dysfunction by binding to NF- κ B p105 and inhibiting its ubiquitination [J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155325.
- [18] Wu M, Huang Z, Huang W, et al. MicroRNA-124-3p attenuates myocardial injury in sepsis via modulating SP1/HDAC4/HIF-1 α axis [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 40.
- [19] Paoli A, Tinsley GM, Mattson MP, et al. Common and divergent molecular mechanisms of fasting and ketogenic diets [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(2): 125-141.
- [20] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [21] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 693-698.
- [22] Mattson MP. Dietary factors, hormesis and health [J]. *Ageing Res Rev*, 2008, 7(1): 43-48.
- [23] Manoogian ENC, Chow LS, Taub PR, et al. Time-restricted eating for the prevention and management of metabolic diseases [J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(2): 405-436.
- [24] Zeb F, Wu X, Fatima S, et al. Time-restricted feeding regulates molecular mechanisms with involvement of circadian rhythm to prevent metabolic diseases [J]. *Nutrition*, 2021, 89: 111244.
- [25] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225-234.
- [26] Ma S, He L, Zuo Q, et al. Canagliflozin regulates ferroptosis, potentially via activating AMPK/PGC-1 α /Nrf2 signaling in HFpEF rats [J]. *Cardiovasc Innov Appl*, 2022, 7(3): 92-101.
- [27] Ezzati A, Tamargo JA, Golberg L, et al. The effects of time-restricted eating on inflammation and oxidative stress in overweight older adults: a pilot study [J]. *Nutrients*, 2025, 17(2): 322.
- [28] Wang P, Lu YQ. Ferroptosis: a critical moderator in the life cycle of immune cells [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 877634.

收稿日期: 2025-04-25