DOI:10.16016/j.2097-0927.202204140

NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与 LPS 诱导的心肌细胞铁死亡

郭立春[1*],曹国栋[1,2*],罗茜晴[1],林 靓[1],赵宇含[1],曾佑成[1],张艺馨[1],程青虹[1,2] 832000 新疆 石河子,石河子大学医学院[1],石河子大学医学院第一附属医院重症二科[2]

[摘要] **目的** 探讨核受体辅激活因子 4(nuclear receptor coactivator 4,NCOA4)介导的铁蛋白(Ferritin)自噬是否参与脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的脓毒症心肌细胞铁死亡的发生。**方法** 采用不同剂量(5、10、20 μg/mL)的 LPS 诱导大鼠心肌细胞 H9c2 形成脓毒症心肌细胞损伤体外模型,以正常 H9c2 细胞作为 Control 组。应用试剂盒检测心肌细胞活力、Fe^{2+}、心肌酶释放水平变化与氧化应激水平;荧光探针检测细胞线粒体膜电位水平变化;免疫荧光检测 NCOA4、Ferritin 在心肌细胞中的表达定位;应用小干扰 RNA(si RNA)降低 H9c2 细胞中的 NCOA4 的表达,Western blot 检测铁死亡调控蛋白、自噬蛋白表达水平。**结果** 不同剂量 LPS 刺激后 H9c2 细胞活力明显降低($P<0.05$),Fe^{2+}浓度升高($P<0.05$),丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、活性氧(reactive oxygen species,ROS)等细胞氧化应激的水平升高($P<0.05$),线粒体膜电位降低($P<0.05$),荧光镜下观察到 NCOA4-Ferritin 共定位表达增加($P<0.05$),铁死亡调控蛋白 NCOA4 表达增加($P<0.05$),Ferritin、SLC7A11、GPX4 的表达水平下降($P<0.05$),自噬蛋白 LC3-Ⅱ表达增加($P<0.05$)。慢病毒敲低 NCOA4 表达,Ferritin、SLC7A11、GPX4 的表达增加($P<0.05$),LC3-Ⅱ表达水平下降($P<0.05$)。**结论** NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与了脓毒症心肌细胞铁死亡的发生过程。

[关键词] 铁蛋白自噬;铁死亡;脓毒症;心肌细胞损伤
[中图法分类号] R322.11; R361.3; R631.2 [文献标志码] A

Nuclear receptor coactivator 4 -mediated ferritinophagy is involved in LPS-induced ferroptosis in cardiomyocytes

GUO Lichun[1*], CAO Guodong[1,2*], LUO Xiqing[1], LIN Jing[1], ZHAO Yuhan[1], ZENG Youcheng[1], ZHANG Yixin[1], CHENG Qinghong[1,2] [1]Medicine College of Shihezi University; [2]Second Department of Intensive Care Medicine, First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 832000, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether ferritin autophagy mediated by nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) is involved in lipopolysaccharide (LPS)-induced ferroptosis in septic cardiomyocytes. **Methods** Different doses of LPS (5,10 and 20 μg/mL) were adopted to induce rat cardiomyocytes H9c2 to form an in vitro model of cardiomyocyte injury, and normal H9c2 cells were used as control group. The cell viability, Fe^{2+} level, releases of myocardial enzymes and oxidative stress level were detected by corresponding reagent kits, and the change in mitochondrial membrane potential was measured with fluorescent probe. Immunofluorescence assay was performed to determine the expression and localization of NCOA4 and ferritin in the cardiomyocytes. Moreover, small interfering RNA (siRNA) was used to reduce NCOA4 expression in

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81860336);兵团科技攻关与成果转化计划项目(2016AD003)
[通信作者] 程青虹,E-mail:xunfeicheng2015@163.com
* 同等贡献者

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

H9c2 cells, and the levels of ferroptosis regulatory proteins as well as autophagy proteins were detected with Western blotting. **Results** After stimulation with different doses of LPS, the viability of H9c2 cells was decreased significantly ($P<0.05$), the concentration of Fe^{2+} was increased ($P<0.05$), the levels of oxidative stress products such as malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) were both elevated ($P<0.05$), and the mitochondrial membrane potential was declined ($P<0.05$). Increased expression of NCOA4-Ferritin colocalization was observed under fluoroscopy ($P<0.05$). Western blotting showed that the expression levels of ferroptosis regulatory protein NCOA4 and autophagy protein LC3-Ⅱ were up-regulated ($P<0.05$), while those of ferritin, SLC7A11 and GPX4 were down-regulated ($P<0.05$). NCOA4 knockdown resulted in significantly enhanced expression of ferritin, SLC7A11 and GPx4 ($P<0.05$), whereas reduced expression of LC3-Ⅱ ($P<0.05$). **Conclusion** NCOA44-mediated ferritin autophagy is involved in the occurrence of ferroptosis in septic cardiomyocytes.

[**Key words**] ferritinophagy; ferroptosis; sepsis; cardiomyocyte injury

Supported by the Regional Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China (81860336) and the Project of Science and Technology Tackling and Achievement Transformation Plan of Xinjiang Corps (2016AD003). GUO Lichun and CAO Guodong contributed equally to the article.
Corresponding author: CHENG Qinghong, E-mail: xunfeicheng2015@163.com

脓毒症作为一种高致死疾病,是导致重症监护室(ICU)患者死亡的主要原因之一[1]。最新的脓毒症和感染性休克管理国际指南强调脓毒症所致的多器官功能障碍,同时规范了脓毒症诊疗方面的临床实践[2]。心肌损伤是脓毒症的严重并发症之一,与脓毒症的高死亡率直接相关[3]。其复杂发病机制包括炎症介质失调、线粒体功能障碍、氧化应激、钙调节紊乱、自主神经系统失调和内皮功能障碍、内质网应激、自噬等[4]。铁死亡是一种新型依赖活性氧和铁的调节性细胞死亡形式,其本质是由于细胞内的脂质氧化物自身代谢发生障碍,在器官损伤和肿瘤靶向治疗中发挥重要作用[5]。NCOA4是铁蛋白选择性自噬周转的选择性货物受体,通过促进铁蛋白的储存或释放来维持细胞内铁稳态[6]。

铁死亡已被证实参与各种病理生理过程,包括急性肾功能衰竭、肝损伤、心脏病以及脓毒症等[7-9]。然而,其在脓毒症心肌细胞损伤中的具体作用机制尚不清楚,NCOA4介导的铁蛋白自噬是否参与其中亦尚未被阐述。本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激H9c2大鼠心肌细胞的方法,建立脓毒症心肌损伤细胞模型,探讨NCOA4介导的铁蛋白自噬是否参与LPS诱导的脓毒症心肌细胞铁死亡的发生,为脓毒症心肌损伤的诊断与治疗开拓新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

H9c2大鼠心肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司(CL-0089);DMEM培养基购自美国Gibcog公司;胎牛血清购自以色列BI公司;青霉素-链霉素购自美国HyClone公司;大肠杆菌内毒素LPS购自美国sigma公司;CCK-8细胞活力检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;铁离子比色法检测试剂盒E1042购自北京普利莱基因技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzymes, CK-MB)测试盒、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒、细胞丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;DCFH-DA活性氧(ROS)荧光探针、JC-1线粒体荧光探针、蛋白抽提试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;DAPI染液、抗荧光淬灭封片剂均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔抗NCOA4、Ferritin、SLC7A11、GPX4、LC3-Ⅱ抗体购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;β-actin抗体、山羊抗鼠和山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。本研究经石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会审批(A2022-104-01)。

1.2 细胞培养和处理

将H9c2大鼠心肌细胞接种在DMEM完全培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗)、37 ℃、5% CO_2的培养瓶中,将大肠杆菌LPS溶解于双蒸水中,浓度分别为5、10、20 μg/mL。将H9c2细胞分为4组:Control组、LPS 5 μg/mL组、LPS 10 μg/mL组、LPS 20 μg/mL组。根据图1结果以及文献[10],在后续荧光实验中使用10 μg/mL的LPS,干预24 h。

1.3 H9c2心肌细胞活力、Fe^{2+}检测

采用CCK-8试剂盒检测心肌细胞活力,采用铁离

子比色法检测心肌细胞 Fe^{2+} 变化。将 H9c2 细接种于 96 孔板中过夜培养,然后用不同浓度 LPS 处理 24 h 后,按照试剂盒说明书向每个孔中加入对应试剂。最后使用酶标仪测量细胞活力、Fe^{2+} 浓度变化。

1.4 H9c2 心肌细胞损伤、氧化应激、脂质过氧化检测

采用检测试剂盒检测心肌细胞 LDH、CK-MB、GSH、MDA 释放变化;采用 DCFH-DA 荧光探针测定心肌细胞 ROS 水平。H9c2 细胞接种于 96 孔板中过夜培养,再用不同浓度 LPS 处理 24 h 后,根据各操作手册,加入相关检测工作液,最后使用酶标仪测定上清液中的心肌酶、氧化应激变化水平;根据荧光探针操作手册处理后,加入相应检测工作液,37 ℃下孵育 30 min 后洗涤细胞 2 次,最后在荧光显微镜观察并分析。其中绿色荧光强度变化代表心肌细胞内 ROS 的水平。

1.5 NCOA4 小干扰 RNA(NCOA4 siRNA)转染

为了产生 NCOA4 基因敲除细胞,首先构建 NCOA4 片段和突变体,然后进行慢病毒生产和稳定转染。H9c2 细胞用 5μL/孔的 NCOA4 siRNA 转染 48 h 以降低基因表达。然后用 10 μg/mL LPS 刺激 H9c2 细胞 24 h。慢病毒转导后,用 5 μg/mL 嘌呤霉素筛选细胞,将 H9c2 细胞分为 4 组:Control siRNA 组、NCOA4 siRNA 组、Control siRNA+LPS 10 μg/mL 组、NCOA4 siRNA+LPS 10 μg/mL 组。最后采用铁离子比色法检测心肌细胞 Fe^{2+} 变化、Western bolt 法检测各组蛋白表达变化。

1.6 免疫荧光

将 H9c2 细胞种于 6 孔板,细胞爬片,细胞用 4% 多聚甲醛固定,在含 1% BSA 的 PBS 中于室温封闭 1 h,孵育一抗 4 ℃过夜然后洗涤 3 次和孵育二抗,室温孵育 50 min。用 DAPI 染液对细胞核进行染色,避光室温孵育 10 min,洗涤 3 次,每次 5 min。玻片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂进行封片。荧光显微镜下观察并采集图像分析。

1.7 Western bolt 测定心肌细胞铁死亡相关蛋白表达

细胞蛋白提取采用 RIPA 裂解液,用超微量分光光度计对细胞提取物的浓度进行定量。Ferritin、LC3-Ⅱ、GPX4 蛋白在 12% 的 SDS-PAG 凝胶中电泳,其余蛋白在 10% 的 SDS-PAG 凝胶中电泳。然后转移到 PVDF 膜上。电转后用牛血清白蛋白在室温下封闭膜 2 h,与一抗在 4 ℃孵育过夜。一抗 NCOA4、Ferritin、LC3-Ⅱ、GPX4、SLC7A11 和 β-actin 抗体稀释度均为 1∶1 000。洗膜后,二抗室温孵育 1 h。二抗山羊抗鼠和山羊抗兔抗体稀释度均为 1∶10 000,洗膜,根据生产说明书用高敏 ECL 化学发光试剂盒 1∶1配制显影液,曝光,获取图像并使用 Image Lab 软件对每个波段的强度进行量化分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行分析,Image J 1.8.0 软件分析 NCOA4、Ferritin、LC3-Ⅱ、GPX4、SLC7A11 的表达定量及 Ferritin-NCOA4 免疫荧光阳性染色区域,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两个样本均数比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

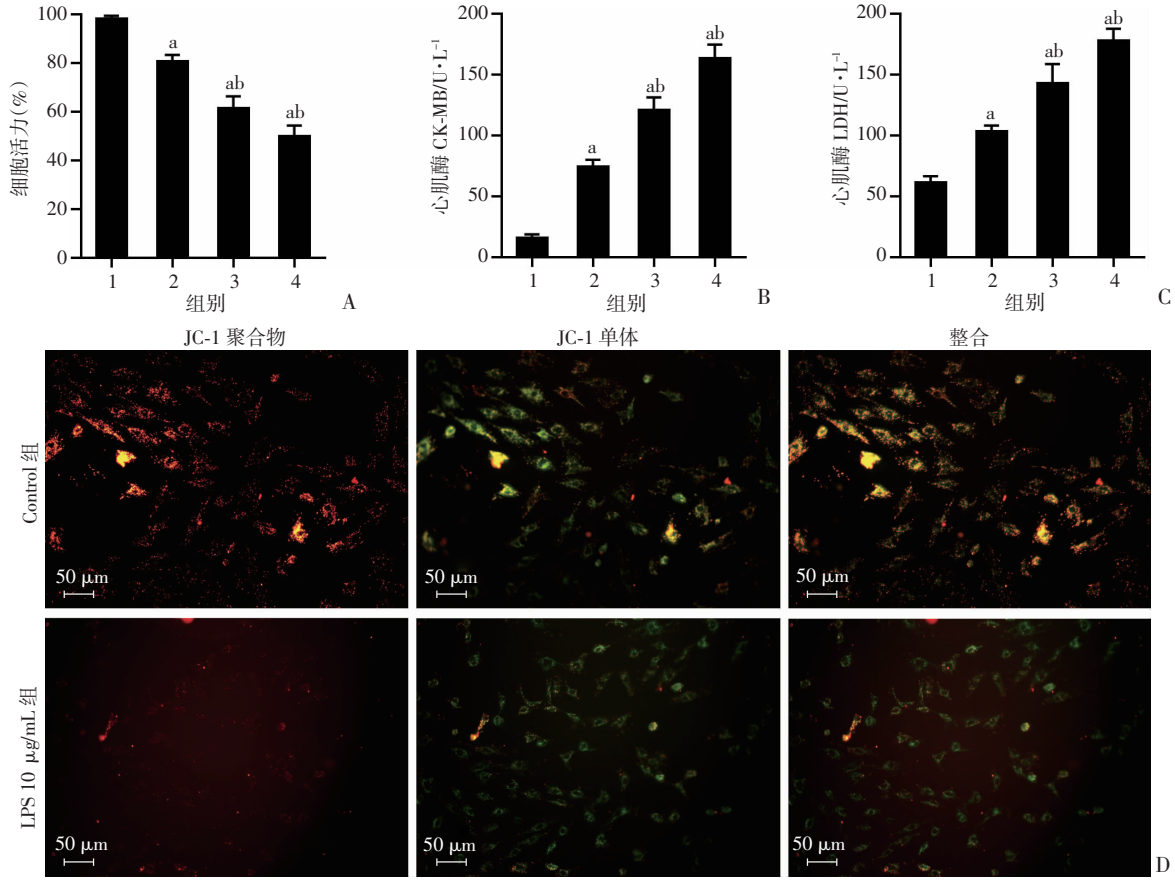
2 结果

2.1 LPS 诱导 H9c2 细胞损伤并抑制细胞活力

分别用等剂量双蒸水、5 μg/mL LPS、10 μg/mL LPS、20 μg/mL LPS 进行干预后,实验结果如图 1 所示,与 Control 组相比,LPS 5 μg/mL 组、LPS 10 μg/mL 组、LPS 20 μg/mL 组 H9c2 细胞的活力随 LPS 浓度梯度刺激的增加而降低。相比于 LPS 5 μg/mL 组,LPS 10 μg/mL 组和 LPS 20 μg/mL 组细胞活力降低更为明显($P<0.05$)。同时发现,与 Control 组相比,LPS 干预各组心肌酶 CK-MB 和 LDH 释放量升高($P<0.05$),心肌细胞损伤加重。相比于 LPS 5 μg/mL 组,LPS 10 μg/mL 组和 LPS 20 μg/mL 组心肌酶增多更为明显($P<0.05$)。提示脓毒症心肌细胞活力与 LPS 浓度存在一定依赖性。铁死亡发生有不同于凋亡等死亡方式的典型形态学改变,线粒体膜电位的异常改变不仅是线粒体损伤的重要标志,也是铁死亡发生的早期预警。采用 10 μg/mL 的 LPS 浓度进行进荧光探针实验,测量各组细胞的线粒体膜电位改变情况。如图 1 所示,JC-1 染色表明,与 Control 组相比,LPS 10 μg/mL 组细胞线粒体 JC-1 聚合物降低,红色荧光减弱($P<0.05$),线粒体膜电位降低。结果表明 LPS 可导致 H9c2 细胞的线粒体损伤和细胞活力下降。

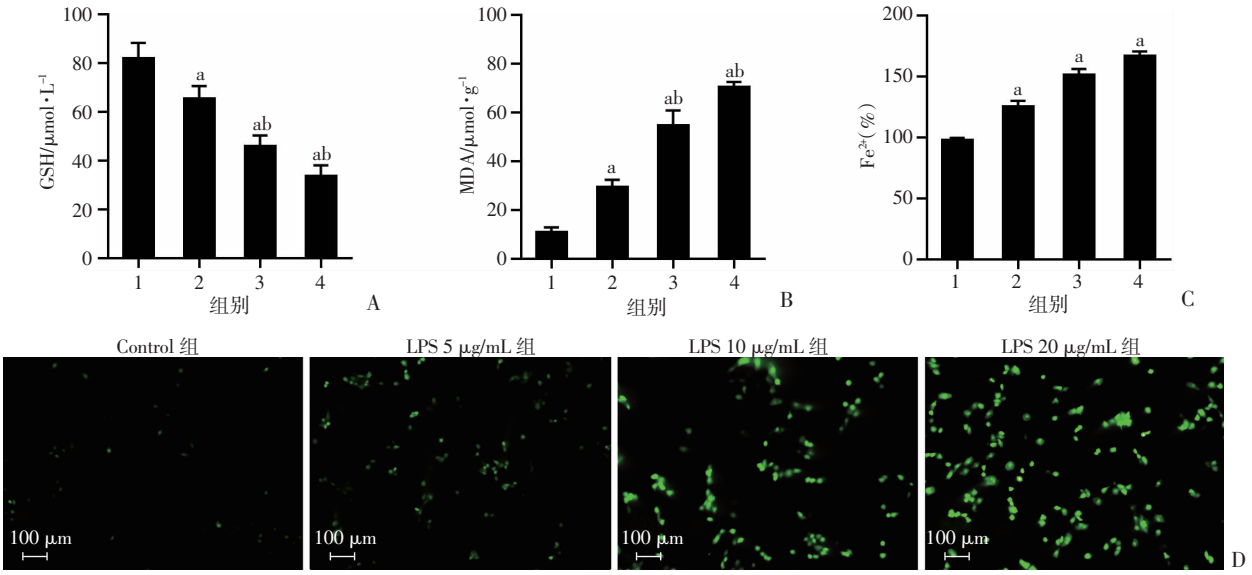
2.2 LPS 诱导 H9c2 细胞铁死亡

如图 2 所示,与 Control 组相比,不同浓度的 LPS 干预后脂质过氧化物 MDA 的释放增加($P<0.05$)、Fe^{2+} 浓度增加($P<0.05$)、ROS 荧光增强($P<0.05$),GSH 的释放有所下降($P<0.05$),细胞铁死亡标记物水平升高。相比于 LPS 5 μg/mL 组,LPS 10 μg/mL 组和 LPS 20 μg/mL 组细胞氧化应激水平明显增强($P<0.05$),脂质过氧化物 MDA 水平增加更为明显($P<0.05$)。MDA、ROS 等铁死亡标记物水平与 LPS 剂量浓度存在一定依赖性($P<0.05$)。提示 LPS 可在体外上调脓毒症心肌细胞 Fe^{2+} 浓度,引起氧化应激并激活铁死亡。



A:各组心肌细胞活力变化;B:各组细胞心肌酶 CK-MB 释放变化;C:各组细胞心肌酶 LDH 释放变化;D:Control 组与 LPS 10 μg/mL 组线粒体膜电位变化　1:Control 组;2:LPS 5 μg/mL 组;3:LPS 10 μg/mL 组;4:LPS 20 μg/mL 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 5 μg/mL 组比较

图 1　LPS 诱导 H9c2 细胞损伤并抑制细胞活力

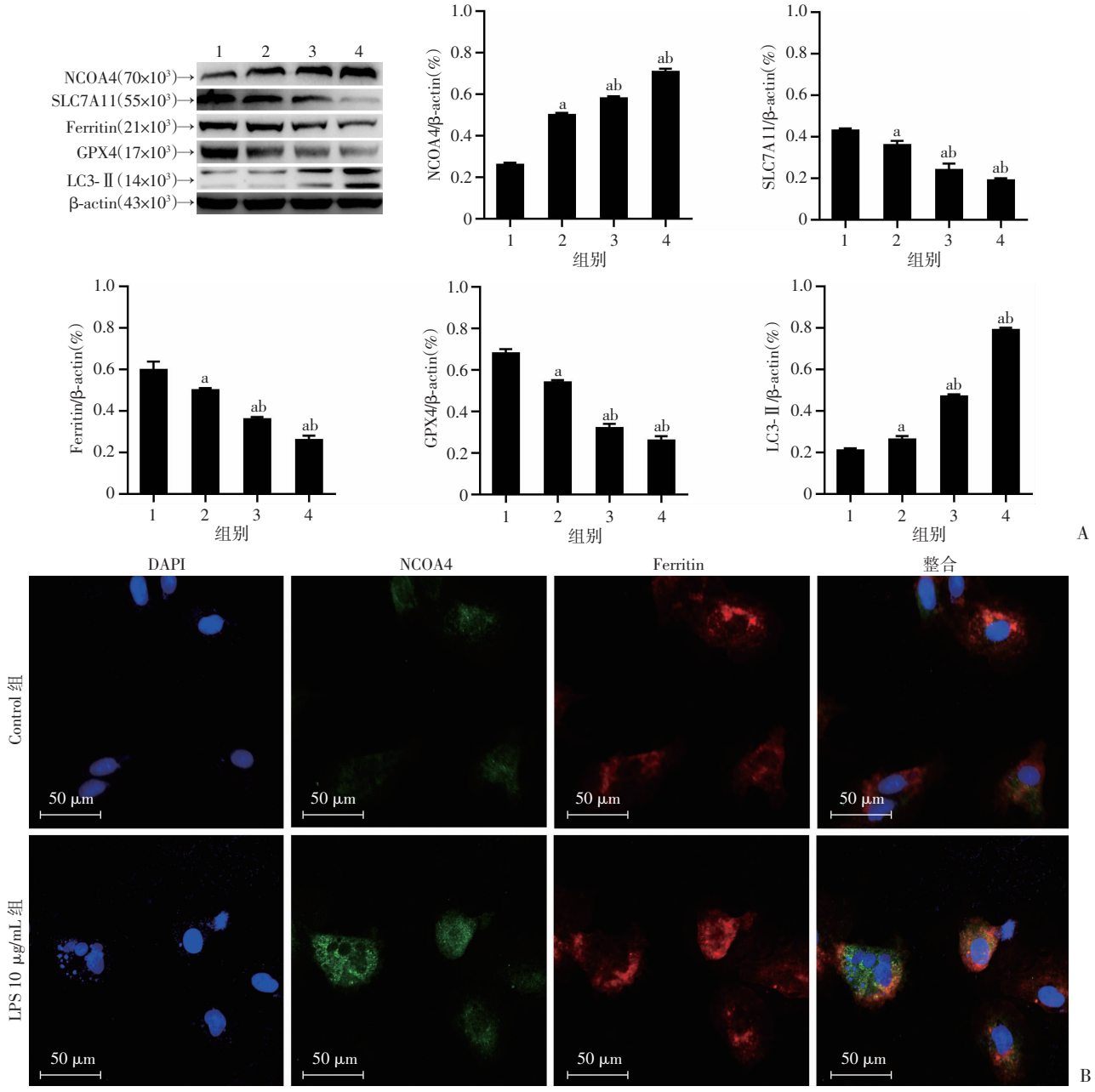


A:各组心肌细胞 GSH 活性变化;B:各组心肌细胞 MDA 含量变化;C:各组心肌细胞 Fe^{2+} 浓度变化;D:各组心肌细胞 ROS 水平变化　1:Control 组;2:LPS 5 μg/mL 组;3:LPS 10 μg/mL 组;4:LPS 20 μg/mL 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 5 μg/mL 组比较

图 2　LPS 诱导 H9c2 细胞铁死亡

2.3　LPS 通过促进铁蛋白自噬诱导 H9c2 细胞铁死亡

通过 Western blot 检测 Control 组、LPS 5 μg/mL 组、LPS 10 μg/mL 组、LPS 20 μg/mL 组铁死亡、自噬标志蛋白相对表达量。与 Control 组相比,不同浓度的 LPS 干预后细胞 NCOA4、LC3-Ⅱ表达升高($P<0.05$),Ferritin、SLC7A11 和 GPX4 表达降低($P<0.05$)。相比于 LPS 5 μg/mL 组,LPS 10 μg/mL 组和 LPS 20 μg/mL 组细胞铁死亡调控蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达水平明显降低($P<0.05$)。NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与了多种疾病的发病机制,为验证 LPS 对铁蛋白自噬的影响,使用了荧光共聚焦显微镜观察 NCOA4 与 Ferritin 在 LPS 诱导的细胞中的改变。如图 3 所示,荧光镜下观察,与 Control 组相比,LPS 10 μg/ml 组中 NCOA4 与 Ferritin 共定位表达明显,荧光斑增加,表明 LPS 可引发 H9c2 细胞铁蛋白自噬。提示脓毒症心肌细胞铁死亡的水平与 LPS 剂量浓度存在一定依赖性($P<0.05$),LPS 可通过激活铁蛋白自噬促进 H9c2 细胞铁死亡。



A:Western blot 检测各组铁死亡、自噬蛋白表达变化;B:Control 组和 LPS 10 μg/mL 组 Ferritin 和 NCOA4 荧光共定位表达;　1:Control 组;2:LPS 5 μg/mL 组;3:LPS 10 μg/mL 组;4:LPS 20 μg/mL 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 5 μg/mL 组比较

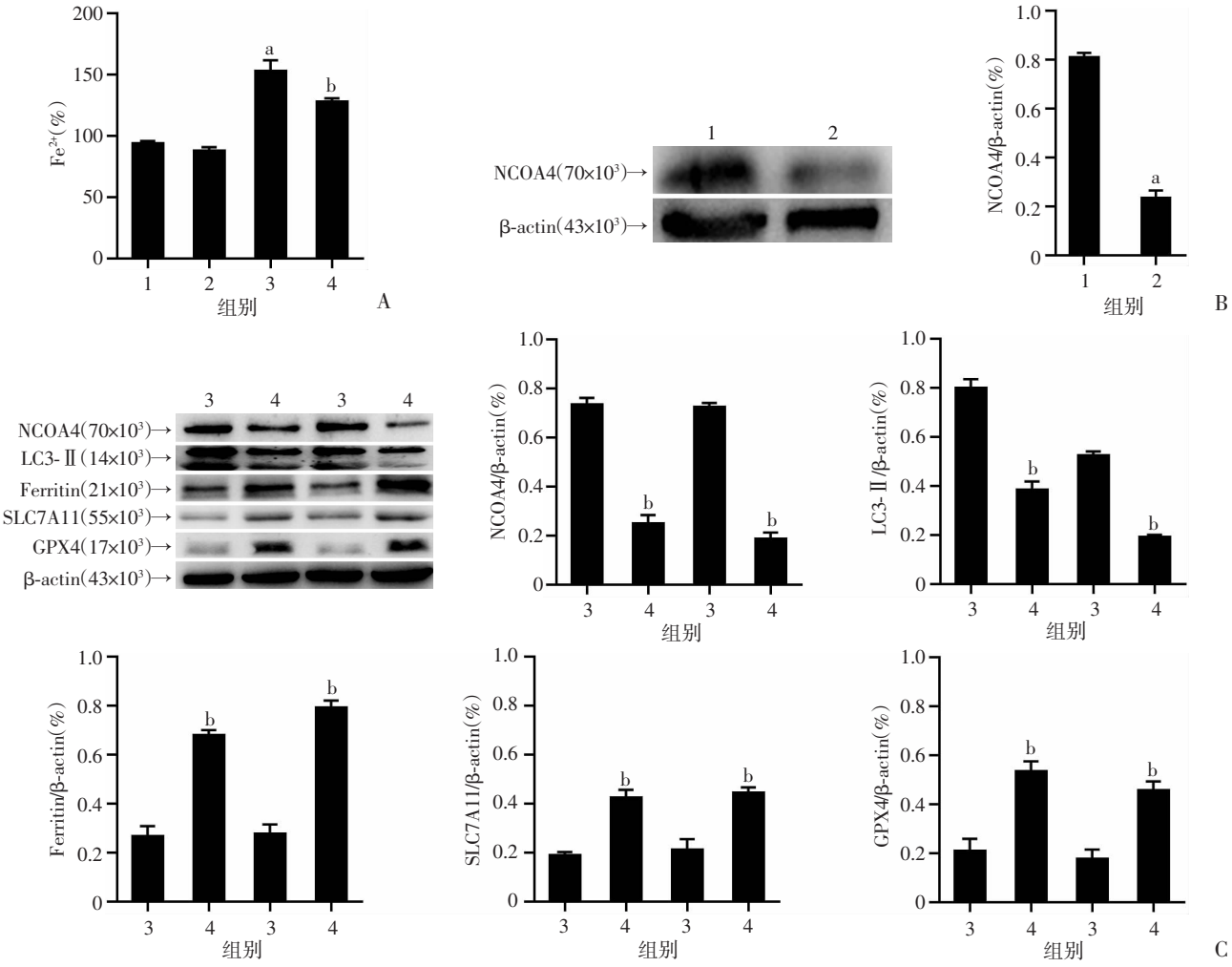
图 3　LPS 通过促进铁蛋白自噬诱导 H9c2 细胞铁死亡

2.4 NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与脓毒症心肌细胞铁死亡

NCOA4 作为选择性自噬货物受体,通过与铁蛋白结合将 NCOA4 铁蛋白复合物转移到溶酶体,介导铁蛋白的降解,并将铁蛋白结合的铁转化为游离铁,从而诱导铁死亡。为了产生 NCOA4 基因敲除细胞并验证转染效果,使用 NCOA4 siRNA 稳定转染 H9c2 细胞,结果表明 NCOA4 siRNA 组细胞中 NCOA4 蛋白表达较 Control siRNA 组明显降低($P<0.05$)。在前期实验发现 LPS 刺激诱导 NCOA4 上调,下调铁蛋白水平,促进 Fe^{2+}的释放($P<0.05$)。为进一步探索 LPS 促进心肌细胞铁死亡的分子机制,使用 siRNA 抑制 NCOA4 的表达,采用 LPS 10 μg/mL 建立脓毒症心肌铁死亡模型。结果如图 4 所示,抑制 NCOA4 可显著改变 LPS 诱导的铁蛋白下调及 LC3-Ⅱ上调($P<0.05$)。此外,慢病毒敲低 NCOA4 表达后,铁死亡相关蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达降低($P<0.05$)。上述实验结果表明,NCOA4 促进 LPS 诱导的 H9c2 细胞铁蛋白自噬,抑制 NCOA4 介导的铁蛋白自噬可减轻细胞铁死亡。

3 讨论

脓毒症目前被定义为由于宿主对感染的反应失调进而危及生命的全身器官损伤和功能障碍[11]。脓毒症引起的心肌功能障碍是脓毒症患者最常见的并发症之一,当患者出现休克时,心肌损伤将会进一步加重[12]。LPS 是革兰阴性细菌的主要结构组成部分,可诱发脓毒症,其中心肌功能障碍是公认的主要表现之一,已广泛用于脓毒症模型的制备[13]。本研究通过



A:各组心肌细胞 Fe^{2+}浓度变化;B:Western blot 检测慢病毒敲低后 NCOA4 表达变化;C:Western blot 检测慢病毒敲低 NCOA4,10 μg/ml LPS 刺激后铁死亡、自噬蛋白表达变化 1:Control siRNA 组;2: NCOA4 siRNA 组;3:Control siRNA+LPS 10 μg/mL 组;4: NCOA4 siRNA+LPS 10 μg/mL 组;a:$P<0.05$,与 Control siRNA 组比较;b: $P<0.05$,与 Control siRNA+LPS 10 μg/mL 组比较

图 4 NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与脓毒症心肌细胞铁死亡

LPS 刺激 H9c2 心肌细胞诱导脓毒症心肌细胞损伤模型,研究发现心肌细胞活力、心肌酶释放量均与 LPS 存在一定浓度依赖性。

ROS 的过度积聚在脓毒症心肌细胞损伤的发病机制中起着至关重要的作用[14]。其中脂质过氧化物 MDA 的水平间接反映了 ROS 的产生和细胞损伤的严重程度。与此同时,机体会分泌 GSH 等以此防御和减轻 ROS 所致损伤[15]。因此,在本研究中,通过检测细胞中 GSH、ROS 和相关蛋白的水平来检测铁死亡和氧化应激。结果表明,随着 LPS 浓度增加,抗氧化物 GSH 的活性明显减少,MDA 水平升高,同时荧光显微镜下观察不同浓度的 LPS 干预后心肌细胞 ROS 呈递增趋势。这些结果提示 LPS 可能通过刺激 ROS 的产生、MDA 的堆积从而导致脓毒症相关的心肌细胞损伤和氧化应激。

胱氨酸/谷氨酸逆向转运体(System Xc-)受阻、铁代谢障碍、脂质过氧化物的积累在铁死亡的发生和发展过程中扮演着关键角色[16]。目前,李浩甲等[17]的研究发现去铁胺(deferoxamine,DFO)处理 1 周可降低糖尿病大鼠血糖水平,降低心肌肌钙蛋白(cardiac troponin,cTn)浓度,抑制心肌细胞内铁蛋白重链(Ferritin heavy,FTH)和 NCOA4 的表达,抑制铁死亡通路,改善心肌细胞损伤。本课题组前期的研究发现[18] H_2S 缓释型供体 GYY4137 可以通过改善脓毒症所致小鼠肺组织病理改变,减轻氧化应激,增加肺组织 GPX4 和 SLC7A11 的表达来减轻脓毒症症所致的急性肺损伤的铁死亡,由此可见 Xc-系统活性即 SLC7A11 和 GPX4 可能是铁死亡发生的关键调控者。已有研究表明[19],LPS 刺激可引起肾小管细胞内 Fe^{2+} 和脂质过氧化积聚、降低 GPX4、Xc-和 NCOA4 蛋白的表达,增加肾小管线粒体损伤,表现为线粒体形态变小,膜密度增加,线粒体嵴功能或破坏。这与本实验结果是相似的,本课题组在体外用 LPS 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞铁死亡的模型中也同样发现了 LPS 干预后 H9c2 细胞活力下降,心肌酶释放增加,细胞中 Fe^{2+} 浓度升高,脂质过氧化物 MDA 增加,线粒体膜电位异常变化,JC-1 单体显著增加,铁死亡关键调控蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达降低,提示铁死亡参与了 LPS 诱导的心肌细胞损伤过程。

自噬是一种进化上保守的降解途径,可维持体内平衡[20]。HOU 等[21]证明自噬通过降解成纤维细胞和癌细胞中的铁蛋白而导致铁死亡,敲除自噬基因限制了铁死亡诱导剂伊拉斯汀(Erastin)诱导的铁死亡,细胞内亚铁水平降低,脂质过氧化减轻。ITO 等[22]在心力衰竭小鼠模型中的研究发现小鼠心脏中 NCOA4 的缺失降低了铁蛋白噬体介导的铁死亡,保护了心脏免受血流动力学应激,显著缓解压力超负荷诱导的野生型小鼠扩张型心肌病的发展。总而言之,这些发现为自噬和铁死亡之间的相互作用提供了新的见解。在本实验中也出现了相同的现象,随着 LPS 干预后 H9c2 细胞浓度的增加,NCOA4、LC3-Ⅱ蛋白表达水平逐渐升高,Ferritin 表达水平降低,镜下发现 NCOA4-Ferritin 荧光共定位表达增强。抑制 NCOA4 的表达减轻了铁蛋白降解,抑制了 LPS 诱导的心肌细胞铁死亡。以上实验表明 NCOA4 介导的铁蛋白自噬在 LPS 诱导的心肌细胞铁死亡这一过程中起关键作用。

综上所述,本研究发现,脓毒症心肌细胞损伤中,氧化应激指标升高,脂质过氧化物堆积,抗氧化物成分活性降低,自噬相关蛋白表达水平升高,铁死亡调控蛋白表达水平降低。基于以上结果,本研究推测 NCOA4 介导的铁蛋白自噬-铁死亡参与了脓毒症心肌细胞损伤的形成,靶向干预心肌细胞铁死亡可能是未来预防脓毒症心肌细胞损伤的一种治疗策略,但其具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] EVANS L, RHODES A, ALHAZZANI W, *et al*. Surviving *Sepsis* campaign: international guidelines for management of *Sepsis* and septic shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11): 1181-1247. DOI:10.1007/s00134-021-06506-y.

[2] FLEISCHMANN-STRUZEK C, MELLHAMMAR L, ROSE N, *et al*. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated *Sepsis*: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(8): 1552-1562. DOI:10.1007/s00134-020-06151-x.

[3] 赵鹏, 寿松涛, 李晨, 等. 脓毒症患者合并心肌损伤的危险因素及其生存分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(7): 961-965.
ZHAO P, SHOU S T, LI C, *et al*. Risk factors for myocardial injury in *Sepsis* patients and survival analysis[J]. Chin J Nosocomiology, 2022, 32(7): 961-965.

[4] HOLLENBERG S M, SINGER M. Pathophysiology of *Sepsis*-induced cardiomyopathy[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(6): 424-434. DOI:10.1038/s41569-020-00492-2.

[5] ZHENG J S, CONRAD M. The metabolic underpinnings of ferroptosis[J]. Cell Metab, 2020, 32(6): 920-937. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.10.011.

[6] SANTANA-CODINA N, GIKANDI A, MANCIAS J D. The role of NCOA4-mediated ferritinophagy in ferroptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1301: 41-57. DOI:10.1007/978-3-030-62026-4_4.

[7] QIU Y M, CAO Y, CAO W J, *et al*. The application of

ferroptosis in diseases[J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 104919. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104919.

[8] WU X G, LI Y, ZHANG S C, *et al*. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease [J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3052-3059. DOI:10.7150/thno.54113.

[9] LIU Y T, TAN S C, WU Y B, *et al*. The emerging role of ferroptosis in *Sepsis*[J]. DNA Cell Biol, 2022, 41(4): 368-380. DOI:10.1089/dna.2021.1072.

[10] REN Q, ZHAO S J, REN C J, *et al*. *Astragalus* polysaccharide alleviates LPS-induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32: 2058738418759180. DOI:10.1177/2058738418759180.

[11] FONT M D, THYAGARAJAN B, KHANNA A K. *Sepsis* and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making[J]. Med Clin North Am, 2020, 104(4): 573-585. DOI:10.1016/j.mcna.2020.02.011.

[12] 慕婉晴, 韩奕, 顾国嵘, 等. 脓毒症患者的预后危险因素及脓毒症相关性心肌损伤患者的临床特征研究[J]. 中华危重病急救医学, 2021(7):809-814.
MU W Q, HAN Y, GU G R, *et al*. Prognostic risk factors of patients with *Sepsis* and the clinical characteristics of patients with septic myocardial injury[J]. Chin Crit Care Med, 2021(7):809-814.

[13] DICKSON K, LEHMANN C. Inflammatory response to different toxins in experimental *Sepsis* models[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): E4341. DOI:10.3390/ijms20184341.

[14] LU J Q, LIU J Y, LI A. Roles of neutrophil reactive oxygen species (ROS) generation in organ function impairment in *Sepsis*[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2022, 23(6): 437-450. DOI:10.1631/jzus.B2101075.

[15] LIU T, SUN L, ZHANG Y B, *et al*. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(1): e22942. DOI:10.1002/jbt.22942.

[16] SUN Y T, CHEN P, ZHAI B T, *et al*. The emerging role of ferroptosis in inflammation[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 127: 110108. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110108.

[17] 李浩甲, 杨文曲, 韩冲芳, 等. 去铁胺对糖尿病大鼠心肌细胞铁死亡通路的影响[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(9): 116-119. DOI:10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.025.
LI H J, YANG W Q, HAN C F, *et al*. Effect of deferoxamine on ferroptosis of myocardial cell in diabetic rats[J]. J Med Res, 2020, 49(9): 116-119. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.025.

[18] LI J H, LI M Y, LI L, *et al*. Hydrogen sulfide attenuates ferroptosis and stimulates autophagy by blocking mTOR signaling in *Sepsis*-induced acute lung injury[J]. Mol Immunol, 2022, 141: 318-327. DOI:10.1016/j.molimm.2021.12.003.

[19] CHEN Y H, JIN S, TENG X, *et al*. Hydrogen sulfide attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 6717212. DOI: 10.1155/2018/6717212.

[20] 梁译丹, 覃王, 黄豪, 等. 自噬通过降解铁蛋白促进神经元铁死亡参与蛛网膜下腔出血后早期脑损伤[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(15): 1407-1414. DOI:10.16016/j.1000-5404.201902124.
LIANG Y D, QIN W, HUANG H, *et al*. Autophagy promotes neuronal ferroptosis by degrading ferritin and induces early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(15): 1407-1414. DOI:10.16016/j.1000-5404.201902124.

[21] HOU W, XIE Y C, SONG X X, *et al*. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin[J]. Autophagy, 2016, 12(8): 1425-1428. DOI: 10.1080/15548627.2016.1187366.

[22] ITO J, OMIYA S, RUSU M C, *et al*. Iron derived from autophagy-mediated ferritin degradation induces cardiomyocyte death and heart failure in mice[J]. Elife, 2021, 10: e62174. DOI:10.7554/eLife.62174.

(**收稿**:2022-04-29;**修回**:2022-06-30)

(编辑 张艺霖)