DOI:10.16016/j.2097-0927.202406038

抑制乙酰辅酶 A 羧化酶 2 改善脓毒症小鼠心功能障碍的机制研究

杜云霞[1,2],佘 汉[1,2],吴银雨[1],王 易[1],周远群[2],王维飞[1],李 涛[2],胡 戈[1],毛庆祥[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心:麻醉科[1],野战外科研究部战伤休克与输血研究室[2]

[**摘要**] **目的** 观察抑制乙酰辅酶 A 羧化酶 2(acetyl-CoA carboxylase 2,ACC2)对脓毒症小鼠心脏功能障碍的改善作用并研究其机制。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术建立小鼠脓毒症模型,取 24 只 8 周龄且体质量为 20~25 g 的雄性 C57BL/6 小鼠,按照随机数字表法分为假手术组、脓毒症组、ND-630+脓毒症组。利用 Cre-LoxP 重组酶系统构建心脏特异性 ACC2 敲除小鼠($ACC2^{\Delta CM}$),并以 $ACC2^{flox/flox}$ Myh6-Cre$^-$($ACC2^{fl/fl}$)小鼠作为对照,取 48 只 $ACC2^{fl/fl}$ 小鼠、48 只 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠(8 周龄,20~25 g,雄性)按照随机数字表法分为 $ACC2^{fl/fl}$+假手术组、$ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组、$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组、$ACC2^{\Delta CM}$+Mal-CoA+脓毒症组、$ACC2^{\Delta CM}$+假手术组。采用细胞微张力仪检测心肌细胞收缩功能与肌丝钙敏感性;Western blot 检测 ACC2 蛋白表达水平;ELISA 检测心肌组织中丙二酰辅酶 A(malonyl-CoA,Mal-CoA)水平。观察小鼠脓毒症后 36 h 存活情况。**结果** 脓毒症组较假手术组心肌细胞收缩幅度显著下降,钙敏感性显著下降($P<0.05$);以 $ACC2^{fl/fl}$+假手术组为基础水平,$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组较 $ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组心肌细胞收缩幅度恢复 48.1%,钙敏感性明显恢复($P<0.05$);$ACC2^{\Delta CM}$+Mal-CoA+脓毒症组较 $ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组心肌细胞收缩幅度与钙敏感性明显下降($P<0.05$);ND-630+脓毒症组较脓毒症组心肌细胞收缩幅度与肌丝钙敏感性上升($P<0.05$)。脓毒症组较假手术组小鼠心肌组织 ACC2 蛋白表达水平增加($P<0.05$)。脓毒症组心肌 Mal-CoA 水平较假手术组升高($P<0.05$);$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组小鼠心肌 Mal-CoA 水平较脓毒症组降低($P<0.05$)。$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组较 $ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组 36 h 存活率提高 37.5%($P<0.05$)。**结论** 抑制 ACC2 通过降低 Mal-CoA 水平对脓毒症小鼠心肌收缩功能和钙敏感性发挥保护作用。

[**关键词**] 脓毒症;心肌细胞;乙酰辅酶 A 羧化酶 2;钙敏感性;丙二酰辅酶 A
[**中图法分类号**] R322.11; R631.1; R977.3 [**文献标志码**] A

Mechanism of inhibiting acetyl CoA carboxylase 2 to improve cardiac dysfunction in septic mice

DU Yunxia[1,2], SHE Han[1,2], WU Yinyu[1], WANG Yi[1], ZHOU Yuanqun[2], WANG Weifei[1], LI Tao[2], HU Yi[1], MAO Qingxiang[1] [1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Shock and Transfusion, Institute of Field Surgery, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the ameliorative effect of inhibiting acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) on cardiac dysfunction in septic mice and investigate its underlying mechanism. **Methods** Mouse model of sepsis was established by cecal ligation and perforation. A total of 24 male C57BL/6 mice (aged 8 weeks, weighing 20~25 g) were divided into sham operation group, sepsis group and ND-630+sepsis group. The cardiac specific ACC2 knockout ($ACC2^{\Delta CM}$) mice were constructed by Cre-LoxP recombinase system, and $ACC2^{flox/flox}$ Myh6-Cre$^-$($ACC2^{fl/fl}$) mice were used as control. Several genetically engineered mice (8 weeks old, 20~25 g, male) were divided into $ACC2^{fl/fl}$+ sham operation group, $ACC2^{fl/fl}$+sepsis group,

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82300561);重庆英才创新领军人才项目(CSTC2024YCJH-BGZXM0011);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0713)

[**通信作者**] 毛庆祥,E-mail:qxmao@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

$ACC2^{\Delta CM}$+sepsis group, $ACC2^{\Delta CM}$+Mal-CoA+sepsis group, and $ACC2^{\Delta CM}$+sham operation group according to the random number table method. The contractile function and myofilament calcium sensitivity of cardiomyocytes were measured by a cell microtensiometer. Western blotting was used to detect the expression level of ACC2, and ELISA was employed to measure the level of malonyl-CoA (Mal-CoA) in myocardial tissue. The survival of the mice in 36 h after sepsis was observed. **Results** Compared with the sham operation group, the contraction amplitude of cardiomyocytes in sepsis group was decreased markedly, and the calcium sensitivity decreased significantly as well ($P<0.05$). Based on the $ACC2^{fl/fl}$+ sham operation group, the $ACC2^{\Delta CM}$ + sepsis group showed significant improvement in myocardial contraction compared with the $ACC2^{fl/fl}$ + sepsis group, with the contraction amplitude of cardiomyocytes recovered by 48.1%, and significantly restored calcium sensitivity ($P<0.05$). $ACC2^{\Delta CM}$+ Mal-CoA + sepsis group showed a notable decrease in myocardial cell contraction amplitude and a significant decrease in calcium sensitivity when compared to the $ACC2^{\Delta CM}$ + sepsis group ($P<0.05$). Compared with the sepsis group, the contraction amplitude of cardiomyocytes in the ND-630+ sepsis group increased significantly, and the calcium sensitivity of myofilament also increased ($P<0.05$). The expression level of ACC2 protein in the myocardial tissue of mice in the sepsis group increased compared to the sham operation group ($P<0.05$). The level of myocardial Mal-CoA in the sepsis group was higher than that in the sham operation group ($P<0.05$); Mal-CoA level in the myocardium of $ACC2^{\Delta CM}$+ sepsis group mice was lower than that of sepsis group ($P<0.05$). The 36-hour survival rate of the $ACC2^{\Delta CM}$+ sepsis group. mice was 37.5% higher than that of the $ACC2^{fl/fl}$+ sepsis group mice. ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of ACC2 exerts a protective effect on myocardial contractility and calcium sensitivity in septic mice by reducing Mal-CoA.

[**Key words**] sepsis; cardiomyocytes; acetyl-CoA carboxylase 2; calcium sensitivity; malonyl CoA

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82300561), the Innovative Leading Talents of Chongqing Talent Program (CSTC2024YCJH-BGZXM0011), and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0713). Corresponding author: MAO Qingxiang, E-mail: qxmao@tmmu.edu.cn

脓毒症是由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]。最新流行病学报告显示,全球每年约有脓毒症患者 4 800 万例,脓毒症相关性死亡 1 100 万例[2]。在我国,脓毒症患者 90 d 的死亡率高达 35.5%[3]。脓毒症合并心脏功能障碍(sepsis-induced myocardial dysfunction,SIMD)是脓毒症的主要并发症之一,也是脓毒症危重症患者死亡的主要原因。SIMD 主要表现为左心室扩张、心室收缩力降低、对容量输注的反应性降低,相比单纯脓毒症,其病死率增加 70%~90%[4]。目前,针对 SIMD,临床上主要采取抗生素治疗、液体复苏、应用血管加压药物及正性肌力药物等非特异性治疗方案,疗效并不显著[5]。过往研究虽已揭示 SIMD 与诸多病理机制紧密相关,如过度的炎症反应、线粒体功能障碍、微循环障碍、细胞凋亡以及钙稳态失衡等,也相应提出了诸如使用炎症因子清除剂维持线粒体稳态,抑制细胞凋亡等治疗措施,可实际效果仍差强人意[6]。因此深入阐明 SIMD 的分子机制,寻找针对性的防治措施,对改善脓毒症治疗效果具有重要的临床意义。

代谢重编程是脓毒症的重要特征,研究表明,脓毒症器官功能障碍可能与代谢异常相关[7]。心脏具备代谢灵活性,可根据外界刺激、底物可用性变化等情况发生代谢重编程[8]。健康成人心脏约 70%能量来自脂肪酸氧化,而脓毒症后心肌细胞可出现脂质蓄积,提示脂代谢紊乱可能在 SIMD 中发挥重要作用,但具体机制不明[9]。乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase,ACC)是参与脂肪酸生物合成过程的关键酶,ACC 有 ACC1 和 ACC2 两种亚型。ACC2 主要在心肌和骨骼肌中表达,其主要作用是催化乙酰辅酶 A 向丙二酰辅酶 A(malonyl CoA, Mal-CoA)转化,该过程发生在线粒体膜上,可阻止中长链脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化而导致脂质堆积[10]。在正常的生理环境中,ACC2 在调控脂肪酸代谢及维持能量稳态方面发挥着积极作用;而在病理情况下,ACC2 的功能失调可能会导致脂肪酸合成过度,进而引发一系列代谢紊乱[11]。近年来,研究显示,ACC2 在能量平衡、体质量控制、胰岛素敏感性以及维持重要器官功能等诸多病理生理过程中发挥着重要作用。就心脏功能而言,ACC2 的表达水平与酶活性水平会对心肌细胞的能量供应及收缩功能产生影响[12-13],但 ACC2 是否参与 SIMD 的发生,

目前尚不清楚。

因此,本研究在盲肠结扎穿孔的小鼠脓毒症模型基础上,利用 Cre-LoxP 重组酶系统、ACC2 抑制剂 ND-630 等手段干扰 ACC2 的表达水平与酶活性,观察心肌细胞收缩功能,钙敏感性变化,旨在明确抑制 ACC2 对脓毒症心脏功能障碍的作用及机制,为脓毒症心脏功能障碍的防治寻找新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 $ACC2^{fl/+}$ 小鼠、Myh6-Cre 重组酶小鼠购自上海和元生物技术公司[SYXK(沪)2022-0015],经繁育得到 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠与 $ACC2^{fl/fl}$ 小鼠用于实验(8 周龄,20~25 g,雄性)。48 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(体质量 20~25 g)由陆军特色医学中心实验动物中心提供,均饲养于陆军特色医学中心实验动物中心 SPF 级动物饲养环境,饲养期间自由饮水摄食。饲养环境:光照/黑暗 12 h 周期循环,湿度恒定(40%~70%),温度控制在 22~24 ℃。该研究已获陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准[AMUWEC20224867],且所有操作符合动物伦理要求。

1.1.2 药物与试剂 BSA、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠尾裂解试剂盒购自成都福际生物技术有限公司;小鼠 Mal-CoA ELISA 试剂盒购买自上海晶抗生物工程有限公司;ACC2 抗体、β-actin 抗体购自美国 CST 生物公司。NaCl、NaH_2PO_4、HEPES、葡萄糖、NaOH、$CaCl_2$ 购自上海生工生物工程股份有限公司。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、丙二酰辅酶 A 锂盐、Ⅱ型胶原酶、KCl、$MgCl_2$、牛磺酸、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、K-EGTA 购自美国 Sigma 公司。Fura-2 AM 购自美国 Invitrogen 公司。ND-630 购自美国 MedChemExpress 生物科技公司。无钙台氏液、梯度浓度有钙台氏液、胶原酶消化液及 KB 液均按照本课题组前期研究描述过的方法配制[14]。

1.2 方法

1.2.1 脓毒症小鼠模型的制备 将小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,仰卧固定于手术板上,腹部手术区常规消毒与去毛,用手术刀在腹壁作一长 1.0~1.5 cm 切口,暴露盲肠,用湿润棉签使盲肠中粪便堆积于盲端,以 4-0 丝线在盲端结扎成一个直径约为 3 mm 的粪球,用 18 号注射器针头避开血管贯穿粪球,挤出少量肠内容物并将处理好的盲肠还纳至腹腔,逐层缝合腹膜及皮肤,腹腔注射生理盐水(50 mg/kg)抗休克。术毕放回笼中,禁食、自由饮水 16 h。16 h 后,小鼠如出现发热、心率和呼吸频率明显加快、口鼻腔分泌物增多、精神萎靡、竖毛、少动,拒食或少食、眼角分泌物增多等症状,则建模成功。

1.2.2 心肌特异性 ACC2 基因敲除小鼠($ACC2^{\Delta CM}$)构建 将 F1 代 $ACC2^{fl/+}$ 杂合小鼠互配于 F2 代获得 $ACC2^{fl/fl}$ 纯合小鼠,将 Myh6-Cre 重组酶小鼠与 $ACC2^{fl/fl}$ 纯合小鼠互配获得 F3 代 Myh6 Cre/$ACC2^{fl/+}$ 小鼠,最后将 Myh6 Cre/$ACC2^{fl/+}$ 小鼠与 $ACC2^{fl/fl}$ 纯合小鼠互配得到 F4 代 Myh6 Cre/$ACC2^{fl/fl}$($ACC2^{\Delta CM}$)小鼠。

1.2.3 敲基因小鼠基因型鉴定 F2、F3、F4 代小鼠出生后 2~3 周进行编号,剪下 1 mm 鼠尾裂解获取模版 DNA。Flox 引物序列:5′-GGCTAGGTGCCTATGA-ACATGA-3′(上游引物),5′-CCTATCTGAAGGAAGG-CTGCAAAG-3′(下游引物);Myh6-Cre 引物序列:5′-CATATTGGCAGAACGAAAACGC-3′(上游引物),5′-CCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG-3′(下游引物)。PCR 反应体系:Premix Tag Polymerase 12.5 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,无酶水 9.5 μL,模板 DNA 1 μL。反应程序设置如下:94 ℃ 3 min→(94 ℃ 30 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 35 s)×35 个循环→72 ℃ 6 min。扩增结束后,根据琼脂糖凝胶电泳条带结果判断小鼠基因型:出现 378 bp 条带者,鉴定为 flox/flox 纯合子;出现 378 bp+311 bp 条带者,鉴定为 flox/+杂合子;出现 311 bp 条带者,鉴定为野生型(wild type, WT);出现 413 bp 条带者,鉴定为 Cre 阳性。

1.2.4 实验分组及设计

取 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为 2 组:①假手术组:仅开关腹;②脓毒症组:行盲肠结扎穿孔术制作脓毒症模型。腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后取心脏,急性分离心肌细胞,并使用 IonOptix 系统检测心肌细胞收缩功能与肌丝钙敏感性($n=8$);利用 Western blot 检测小鼠心肌组织中 ACC2 蛋白表达水平($n=3$);采用 ELISA 法测定心肌组织 Mal-CoA 水平($n=3$)。

取 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠与 $ACC2^{fl/fl}$ 小鼠分为:①$ACC2^{fl/fl}$+假手术组;②$ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组;③$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组。观察小鼠 36 h 存活情况($n=16$)、心肌收缩功能及肌丝钙敏感性变化($n=8$);心肌细胞收缩功能恢复率(%)=($ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组指标值- $ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组指标值)/($ACC2^{fl/fl}$+假手术组指标值)×100%。

取 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠,按照随机数字表法分为①$ACC2^{\Delta CM}$+假手术组;②$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组。测定心肌组织 Mal-CoA 水平($n=3$)。取 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠按照随机数字表法分为:①$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组;②$ACC2^{\Delta CM}$

+Mal-CoA+脓毒症组:急性分离心肌细胞复钙后以20 μmol/L Mal-CoA 孵育 30 min[15]。观察 Mal-CoA 对于 $ACC2^{\Delta CM}$ 脓毒症小鼠心肌收缩功能和钙敏感性的影响($n=8$)。

取 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分为:①脓毒症组;②ND-630+脓毒症组:脓毒症造模前尾静脉注射 ND-630(3 mg/kg)[8]。观察使用 ND-630 抑制 ACC2 对脓毒症小鼠心肌钙敏感性及收缩功能的影响($n=8$)。

1.2.5 Western blot 法检测 ACC2 蛋白在心肌组织中的表达 将小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后取下心脏,剪成小块加入 RIPA 裂解液并研磨成匀浆,冰上继续裂解 30 min,11 000×g、4 ℃ 离心 15 min,取上清后加上样缓冲液,105 ℃干浴 7 min 使蛋白变性。蛋白用 7.5% SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜,将 PVDF 膜以 5%脱脂奶粉常温封闭 2 h,再以 TBST 稀释的 ACC2 一抗(1∶1 000)和 β-actin 一抗(1∶2 000) 4 ℃孵育过夜,最后用 TBST 清洗后孵育二抗(1∶25 000)1 h。用双色红外成像激光系统扫描,获得 ACC2 的蛋白电泳图像。

1.2.6 急性分离小鼠心肌细胞 小鼠心肌细胞的分离及复钙程序按照本课题组前期研究的方法进行[14]:采用 Langendorff 法以无钙台氏液灌流小鼠心脏,5 min 后将无钙台氏液换为消化液,继续灌注至心脏变大、柔软,取下心脏立刻置于预冷的 KB 液中剪去心房部分,剪碎、吹打、过筛,以制备单个心肌细胞;采用浓度梯度法复钙,最后将细胞重悬于 1 mL 含 Ca^{2+}(1 mmol/L)台氏液中。

1.2.7 心肌细胞收缩功能及钙敏感性测定 心肌细胞收缩功能测定方法按以本课题组前期研究的方法进行[14]:将上述复钙后的心肌细胞用 Fura-2 AM(2 μmol/L)室温避光孵育 15 min。随后将其避光加载于细胞微张力仪(美国 Ionoptix 公司)的刺激浴槽中,以 15 V、1 Hz 的电压刺激心肌细胞。并用 340 nm 与 380 nm 波长的的紫外激发光分别照射细胞,在 480~520 nm 处检测对应的荧光强度。340 nm 与 380 nm 激发的荧光强度比值(F340/F380)变化反映了细胞内钙瞬变。记录 15~20 次肌节稳定收缩的肌节长度变化曲线及钙瞬变曲线,使用 IonWizard 软件将其整合成平均收缩曲线与平均钙瞬变曲线,并从中分析出反映心肌细胞收缩功能指标:收缩幅度、最大收缩速度、舒张速度等。以时间为横坐标,归一化肌节长度作为纵坐标绘制收缩曲线(归一化肌节长度=刺激收缩后肌节长度/静息肌节长度)。进一步将平均收缩曲线与平均钙瞬变曲线整合,绘制肌节缩短程度与细胞内钙瞬变的相平面图。绘制方法如下:以归一化肌节收缩程度作为纵坐标,归一化肌节收缩程度=(静息肌节长度-刺激收缩后肌节长度)/(静息肌节长度-收缩末肌节长度);以同步采集的钙荧光变化幅度 $\Delta[Ca^{2+}]i$ (360/380)作为横坐标,$\Delta[Ca^{2+}]i$ (360/380)=刺激收缩后荧光强度$_{F340/F380}$-静息荧光强度$_{F340/F380}$。定义肌丝舒张 50%时,细胞内钙荧光变化幅度(EC50)为钙敏感性的指标。较高的 EC50 值和环轨迹的右移表明发生了钙脱敏[16]。

1.2.8 小鼠存活情况观察 小鼠建立脓毒症模型后,缝合伤口,放回笼中饲养,禁食,自由饮水。模型制作 16 h 后,每小时观察 1 次,总计观察 36 h,记录小鼠的状态和存活时间。

1.2.9 心肌组织 Mal-CoA 水平检测 腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠后,取心脏组织称量并剪碎,加入对应体积的 PBS 在匀浆器中充分研磨,1 000×g、4 ℃离心 20 min,收集上清,采用 ELISA 法检测上清中 Mal-CoA 含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 27.0 统计软件分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组数据均采用 Shapiro-Wilk 法检验数据正态性,符合正态分布者两组之间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差不齐采用 Tamhane's 法处理;不符合正态分布的数据采用 Mann-Whitney 法进行非参数检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

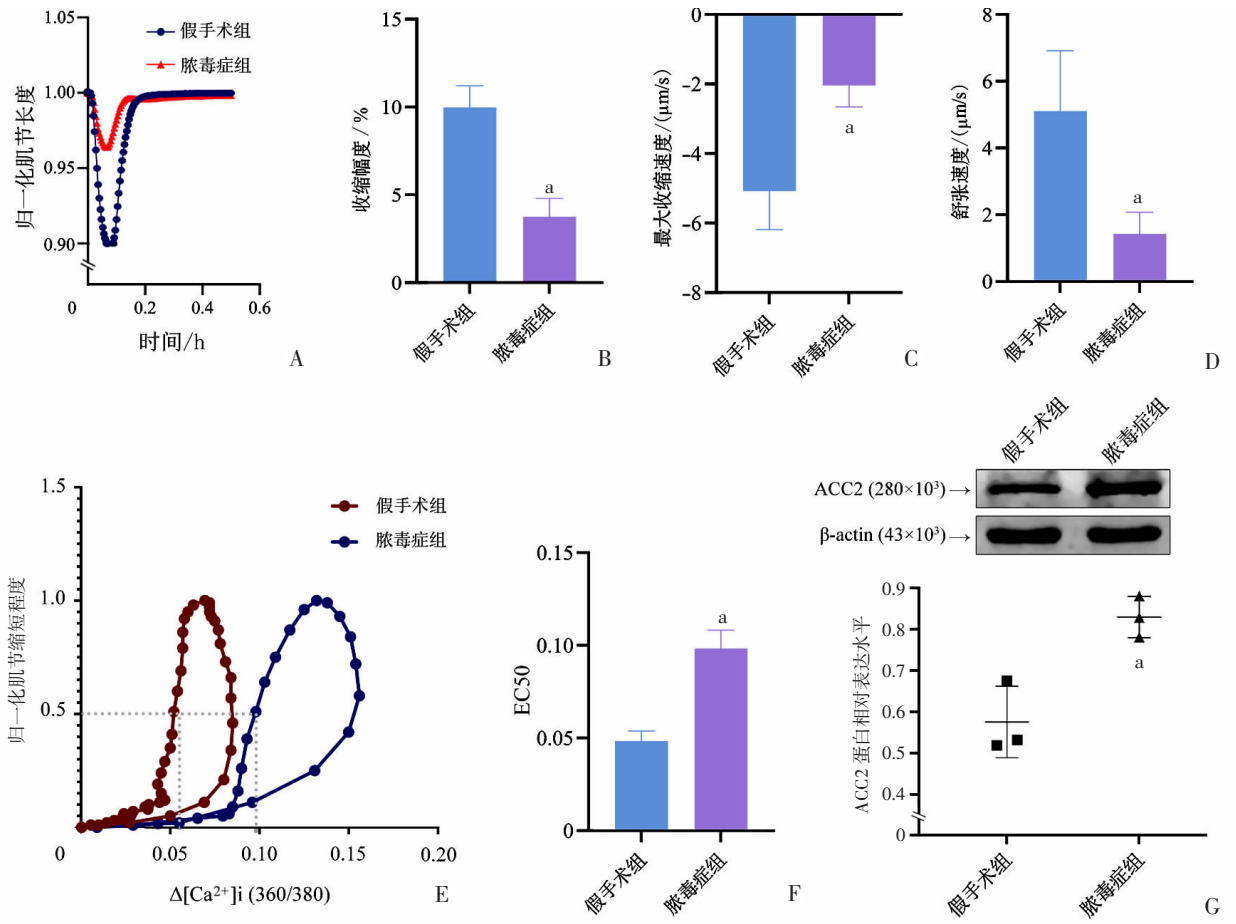
2 结果

2.1 脓毒症后心肌细胞收缩功能及钙敏感性降低

与假手术组比较,脓毒症组小鼠心肌细胞肌节收缩显著减弱,表现为收缩幅度下降,最大收缩速度下降,舒张速度降低($P<0.05$,图 1A~D)。此外,根据肌节收缩与钙瞬变的相平面图(图 1E)可计算出:与假手术组比较,脓毒症组的钙敏感性指标 EC50 显著增加($P<0.05$,图 1F),表明脓毒症组小鼠的肌丝钙敏感性较假手术组显著降低。Western blot 结果显示,与假手术组比较,脓毒症小鼠心肌 ACC2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$,图 1G)。提示脓毒症心肌收缩功能与钙敏感性下降可能与 ACC2 表达升高相关。

2.2 心肌特异性敲除 ACC2 对脓毒症小鼠心脏功能具有保护作用

利用 Cre-LoxP 重组酶系统构建 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠,并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型(图 2A)。存活观察实验显示,$ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组小鼠36h存活率为0,



a:$P<0.05$,与假手术组比较

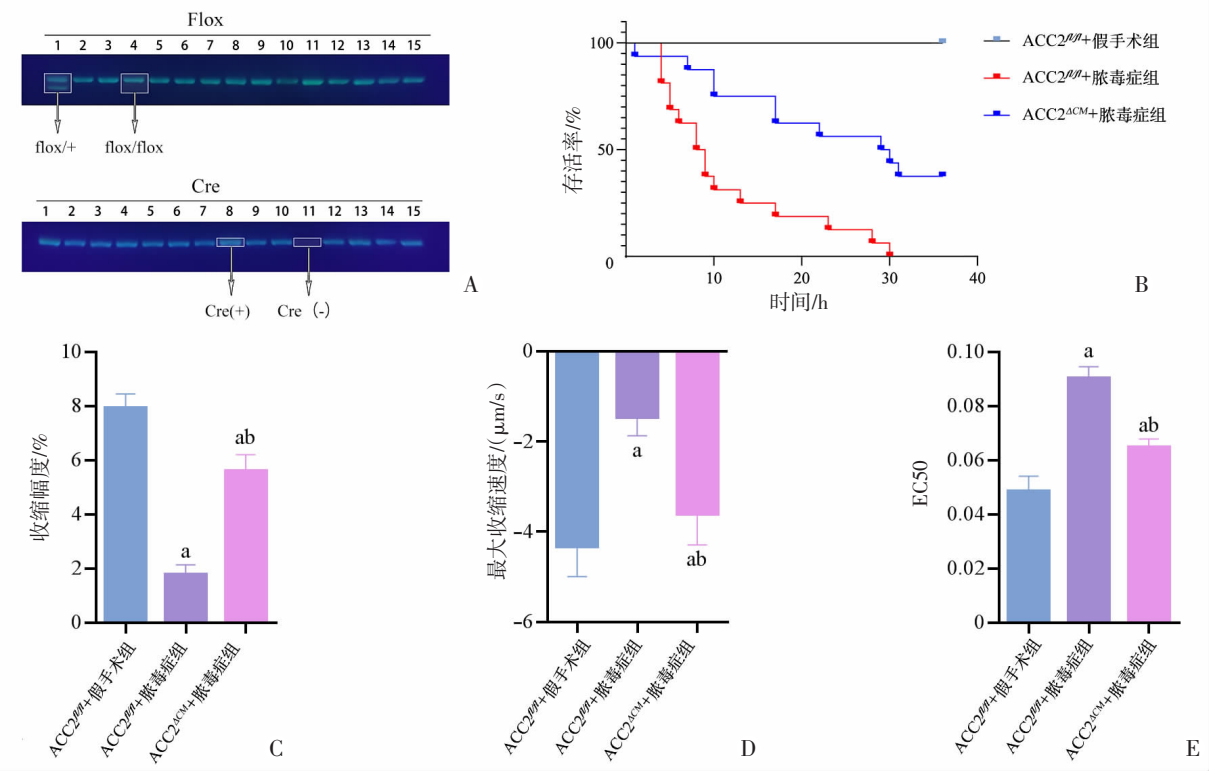
A:持续电刺激下心肌细胞肌节长度相对变化曲线;B:心肌细胞肌节收缩幅度($n=8,\bar{x}\pm s$);C:心肌细胞肌节最大收缩速度($n=8,\bar{x}\pm s$);D:心肌细胞肌节舒张速度($n=8,\bar{x}\pm s$);E:肌节缩短程度与细胞内钙瞬变幅度的代表性相平面图;F:心肌细胞肌丝钙敏感性变化($n=8,\bar{x}\pm s$);G:Western blot 检测 ACC2 的蛋白表达水平($n=3,\bar{x}\pm s$)

图 1 脓毒症后心肌细胞收缩力及钙敏感性变化

$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组小鼠 36 h 存活率为 37.5%($P<0.05$,图 2B)。离体心肌细胞实验结果表明,与 $ACC2^{fl/fl}$+假手术组比较,$ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组心肌细胞收缩功能与钙敏感性显著下降,表现为收缩幅度下降、最大收缩速度下降、钙敏感性指标 EC50 升高($P<0.05$,图 2C~E)。心脏特异性敲除 ACC2 可以使脓毒症导致的心脏收缩功能障碍及低钙敏感性得到显著改善,表现为以 $ACC2^{fl/fl}$+假手术组心肌细胞收缩功能为基准,$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组较 $ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组心肌细胞收缩幅度恢复了 48.1%($P<0.05$,图 2C),最大收缩速度恢复了 49.7%($P<0.05$,图 2D),钙敏感性指标 EC50 显著下降($P<0.05$,图 2E)。以上结果表明,心脏特异性敲除 ACC2 可以改善脓毒症小鼠心脏功能障碍并提高存活率。

2.3 ACC2 通过影响 Mal-CoA 水平参与调控脓毒症小鼠心肌收缩功能与钙敏感性

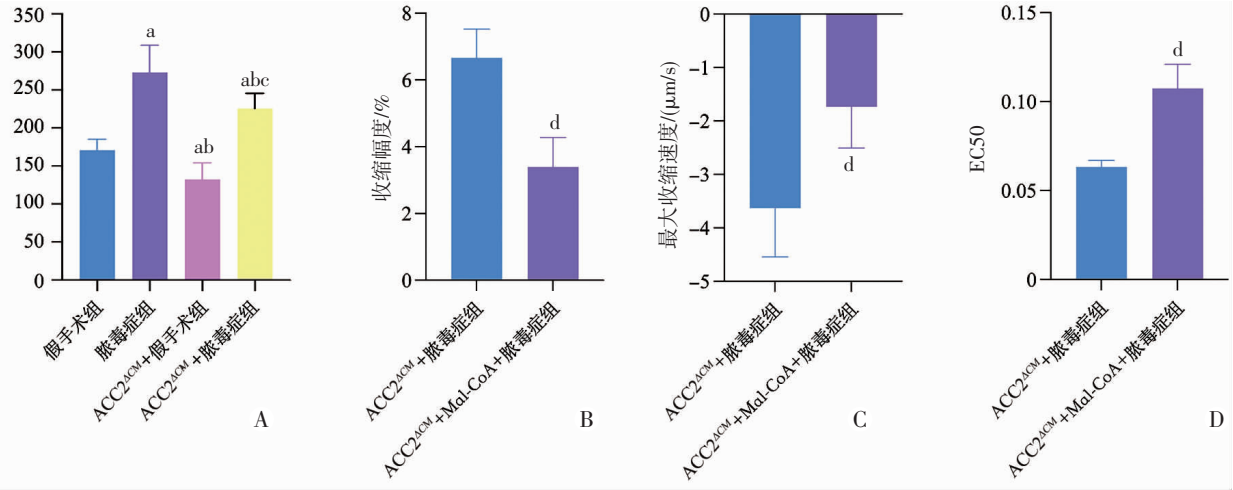
ELISA 结果显示:脓毒症组小鼠心肌组织内的 Mal-CoA 水平较假手术组升高,$ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组小鼠心肌组织 Mal-CoA 水平较脓毒症组下降($P<0.05$,图 3A)。使用外源性 Mal-CoA 会逆转心脏 ACC2 敲除对脓毒症心肌细胞功能的保护作用:用外源性丙二酰辅酶 A 锂盐孵育脓毒症 $ACC2^{\Delta CM}$ 小鼠心肌细胞后,收缩幅度下降、最大收缩速度下降、钙敏感性指标 EC50 上升($P<0.05$,图 3B~D);$ACC2^{\Delta CM}$+Mal-CoA+脓毒症组相较于 $ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组心肌细胞肌节收缩显著减弱(图 3E)、肌节收缩与钙瞬变相平面图右移(图 3F)。提示心脏特异性敲除 ACC2 可能通过降低 Mal-CoA 水平来改善脓毒症后心肌细胞低钙敏感性与收缩功能障碍。



a:$P<0.05$,与 $ACC2^{fl/fl}$+假手术组比较;b:$P<0.05$,与 $ACC2^{fl/fl}$+脓毒症组比较

A:Myh6-Cre/$ACC2^{fl/fl}$ 小鼠琼脂糖凝胶电泳基因型鉴定图;B:脓毒症后 36 h 存活情况($n=16,\bar{x}\pm s$);C:心肌细胞肌节最大收缩幅度($n=8,\bar{x}\pm s$);D:心肌细胞肌节最大收缩速度($n=8,\bar{x}\pm s$);E:心肌细胞肌丝钙敏感性变化($n=8,\bar{x}\pm s$)

图 2 心脏特异性敲除 ACC2 对心肌细胞收缩功能及钙敏感性的影响

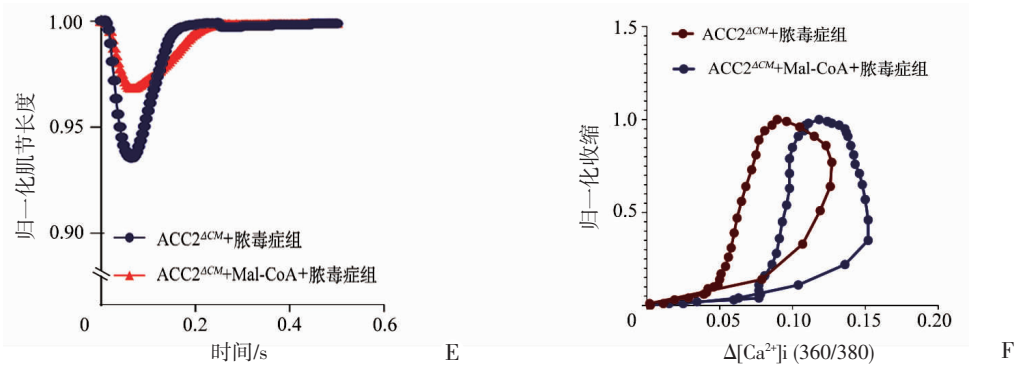


a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与脓毒症组比较;c:$P<0.05$,与 $ACC2^{\Delta CM}$+假手术组比较;d:$P<0.05$,与 $ACC2^{\Delta CM}$+脓毒症组比较

A:ELISA 检测心肌组织中 Mal-CoA 水平($n=3,\bar{x}\pm s$);B:心肌细胞肌节最大收缩幅度($n=8,\bar{x}\pm s$);C:心肌细胞肌节最大收缩速度($n=8,\bar{x}\pm s$);D:心肌细胞肌丝钙敏感性变化($n=8,\bar{x}\pm s$)

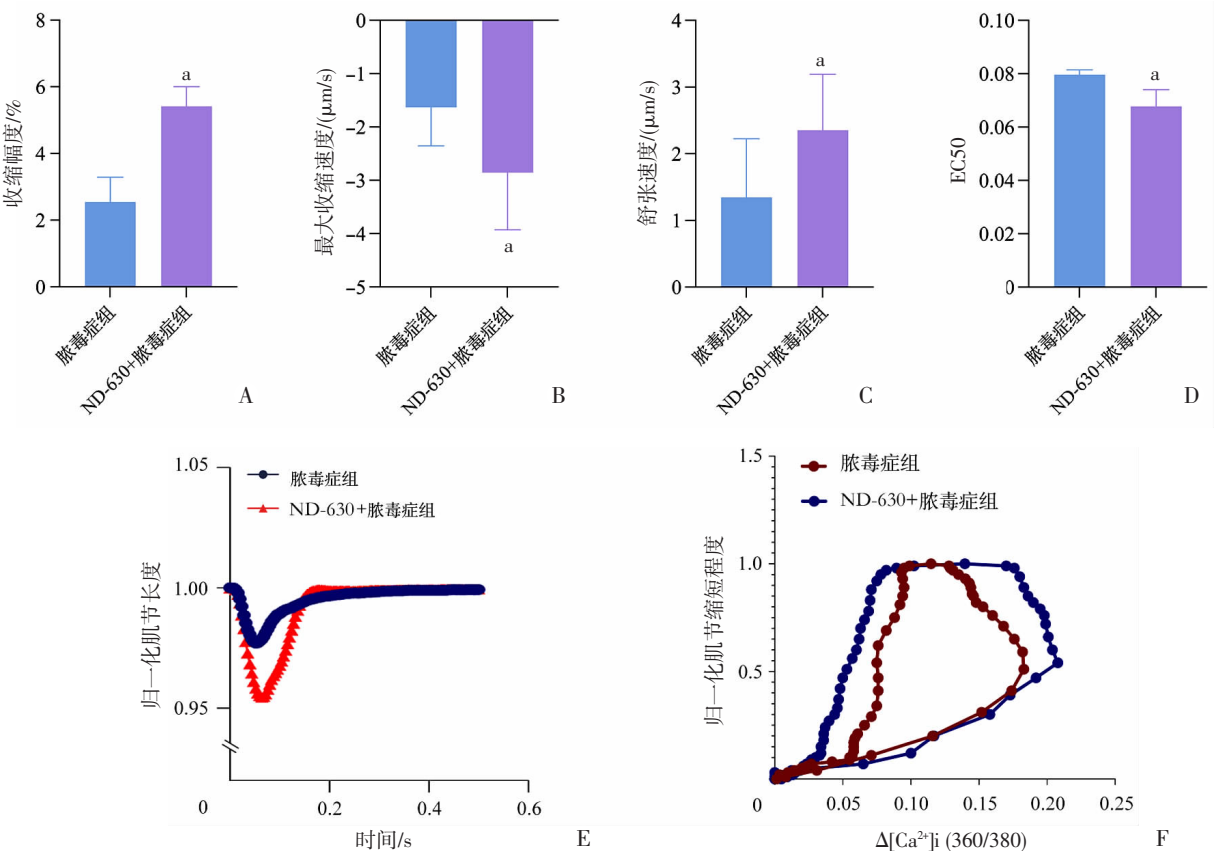
图 3 外源性添加 Mal-CoA 对心肌细胞收缩功能及钙敏感性的影响

(图 3E、F 续下页)



E:持续电刺激下心肌细胞肌节长度相对变化曲线;F:肌节缩短程度与钙瞬变相平面图

续图 3 外源性添加 Mal-CoA 对心肌细胞收缩功能及钙敏感性的影响



a:$P<0.05$,与脓毒症组比较

A:心肌细胞肌节最大收缩幅度($n=8,\bar{x}\pm s$);B:心肌细胞肌节最大收缩速度($n=8,\bar{x}\pm s$);C:心肌细胞肌节舒张速度($n=8,\bar{x}\pm s$);D:心肌细胞肌丝钙敏感性变化($n=8,\bar{x}\pm s$);E:持续电刺激下心肌细胞肌节长度相对变化曲线;F:肌节缩短程度与细胞内钙瞬变相平面图

图 4 ACC2 抑制剂 ND-630 对于脓毒症小鼠心肌细胞收缩功能及钙敏感性的影响

2.4 ACC2 抑制剂 ND-630 对于脓毒症小鼠心肌功能具有保护作用

进一步观察 ACC2 酶活性抑制剂 ND-630 对于脓毒症小鼠心肌功能的影响。结果显示:与脓毒症组比较,使用 ND-630 治疗后,急性分离的心肌细胞的收缩幅度增加($P<0.05$,图 4A),最大收缩速度提高($P<0.05$,图 4B),舒张速度提高($P<0.05$,图 4C),肌丝钙敏感性指标 EC50 下降($P<0.05$,图 4D)。ND-630+脓毒症组较脓毒症组心肌细胞肌节收缩显著增强(图 4E);肌节缩短程度与钙瞬变相平面图除了其左半部分向左侧移位外,其右半部分也向右侧移位,呈现出向两侧扩展的趋势(图 4F)。提示使用 ND-630 抑制 ACC2 酶活

性可以实现对脓毒症心肌细胞收缩功能障碍和肌丝钙失敏的治疗作用。

3 讨论

SIMD 作为脓毒症高死亡风险的重要原因之一,其主要表现为心肌收缩功能障碍[4],许多信号传导途径参与 SIMD 的病理过程,包括一氧化氮、自由基氧/氮物质、cAMP、转录调节因子以及代谢应激等,钙-收缩耦联是这些信号传导途径导致心脏收缩功能障碍的末端整合路径[17]。心肌肌丝的钙敏感性是心肌细胞内钙-收缩耦联效应的重要组成部分之一[18],因此进一步阐明钙敏感性改变在 SIMD 发生中的机制,并寻找靶向的治疗措施具有重要意义。

3.1 心脏 ACC2 敲除在 SIMD 中对心肌细胞收缩功能的保护作用

ACC 是一种以生物素为辅基、以 HCO_3^- 为羧基供体,催化依赖于 ATP 的乙酰辅酶 A 羧化的代谢酶[19],ACC1 主要分布于脂肪、肝脏及乳腺组织细胞的细胞质中负责脂肪酸合成;ACC2 则主要分布于心脏、肌肉组织中并定位于线粒体外膜,通过调节肉碱棕榈酰转移酶 1(CPT1)影响脂肪酸氧化供能[20]。ACC2 作为脂代谢与糖代谢的调节枢纽,参与了非酒精性脂肪肝炎、运动应激、肿瘤代谢等多种病理生理过程[11,21-22],可作为潜在干预靶点。有研究表明,ACC2 敲除可以通过改善心肌细胞能量供应来发挥对心脏的保护作用:缺乏 ACC2 的小鼠心肌中 Mal-CoA 水平可下降约 10 倍、脂肪酸持续氧化并且脂肪储存减少[23];小鼠心脏中 ACC2 的特异性缺失可以通过增强脂肪酸氧化而改善 AngⅡ引起的舒张功能障碍[24]。本研究则发现了心肌特异性敲除 ACC2 也可以通过增强心肌肌丝的钙敏感性改善心肌细胞收缩功能障碍。然而,ACC2 敲除在 SIMD 中的保护作用具体是通过改善能量供应还是提高肌丝钙敏感性来增强细胞收缩,或者二者之间是否存在内在关联仍有待进一步研究。

3.2 Mal-CoA 在 SIMD 中对心肌钙敏感性的影响

Mal-CoA 是细胞脂肪酸合成途径中的重要中间体,主要存在于线粒体、过氧化物酶体和细胞质中。有研究表明:Mal-CoA 除了可通过抑制 CPT 1 参与调控细胞的代谢功能外,还可以作为蛋白质赖氨酸残基丙二酰化修饰的底物调节多种蛋白质的功能[20]。赖氨酸丙二酰化是以 Mal-CoA 作为底物向蛋白质赖氨酸残基添加丙二酰基团,进而影响赖氨酸与其他氨基酸的静电相互作用,改变蛋白质的结构与功能。有研究表明:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)丙二酰化可调节其与 mRNA 之间的结合来促进炎症反应[25];电压依赖性阴离子通道蛋白 VDAC2 丙二酰化可导致心肌细胞铁死亡[8]。本研究发现,ACC2 敲除对肌丝钙敏感性的改善作用与 Mal-CoA 水平改变密切相关。因此,除外能量供应方面的影响,推测在 SIMD 病理进展过程中也许存在钙-收缩耦联相关蛋白质发生丙二酰化进而影响肌丝钙敏感性的情况。ND-630 是一种作用于 ACC 酶四级结构的别构抑制剂,在 ACC 磷酸化位点和二聚化位点内发挥作用以防止二聚化并抑制 ACC 的酶活性。近年研究表明,ND-630 表现出良好的药物特性,可以纠正代谢紊乱、减少肝脏脂肪变性、改善胰岛素敏感性、纠正血脂异常[26],在本研究中也发挥了改善 SIMD 心肌细胞钙敏感性与增强收缩的作用。此外,本研究中 ND-630 治疗后的钙敏感相平面图不仅向左侧移位,也出现了向右扩展的现象,表明其钙敏感性增加的同时,整体的钙瞬变幅度也增加,这可能与 ND-630 影响了细胞内钙离子通道有关[14],而钙瞬变幅度的增大对于心肌收缩也具有积极意义。由此可见,抑制 ACC2 有望成为治疗 SIMD、增强收缩以及提高钙敏感性的有效靶点,为临床治疗提供崭新的思路。

综上所述,抑制 ACC2 可以显著改善脓毒症心肌细胞的收缩功能与肌丝钙敏感性,其机制可能主要与调节 Mal-CoA 水平相关,但 Mal-CoA 调控心肌钙敏感性与收缩功能的机制有待进一步研究。

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. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, *et al*. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study[J]. Lancet, 2020, 395: 200-211. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)32989-7

[3] XIE J F, WANG H L, KANG Y, *et al*. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey[J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.

[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] 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. DOI: 10.1016/j.chest.2018.08.1037.

[6] TAN L, SHE H, ZHENG J, *et al*. Effects of Malate Ringer's solution on myocardial injury in sepsis and enforcement effects

of TPP@PAMAM-MR[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 591. DOI: 10.1186/s12967-022-03811-y.

[7] SHE H, HU Y, ZHOU Y Q, *et al*. Protective effects of dexmedetomidine on sepsis-induced vascular leakage by alleviating ferroptosis *via* regulating metabolic reprogramming [J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 6765-6782. DOI: 10.2147/JIR.S340420.

[8] SHE H, TAN L, DU Y L, *et al*. VDAC2 malonylation participates in sepsis-induced myocardial dysfunction *via* mitochondrial-related ferroptosis[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(10): 3143-3158. DOI: 10.7150/ijbs.84613.

[9] DE BACKER D, SCOLLETTA S. Clinical management of the cardiovascular failure in sepsis[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2013, 11(2): 222-242.

[10] WANG Y, YU W X, LI S, *et al*. Acetyl-CoA carboxylases and diseases[J]. Front Oncol, 2022, 12: 836058. DOI: 10.3389/fonc.2022.836058.

[11] CHEN J Q, ZOU L, LU G, *et al*. PFKP alleviates glucose starvation-induced metabolic stress in lung cancer cells *via* AMPK-ACC2 dependent fatty acid oxidation [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 52. DOI: 10.1038/s41421-022-00406-1.

[12] FULLERTON M D, GALIC S, MARCINKO K, *et al*. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin [J]. Nat Med, 2013, 19(12): 1649-1654. DOI: 10.1038/nm.3372.

[13] SHAO D, KOLWICZ S C Jr, WANG P, *et al*. Increasing fatty acid oxidation prevents high-fat diet-induced cardiomyopathy through regulating parkin-mediated mitophagy[J]. Circulation, 2020, 142(10): 983-997. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043319.

[14] 张濒丹, 张杰, 孙悦, 等. 丙泊酚对脓毒症心肌收缩功能障碍的改善作用及机制[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(22): 2310-2318. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202303171.
ZHANG B D, ZHANG J, SUN Y, *et al*. Effect and mechanism of propofol on myocardial contractile dysfunction in sepsis[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(22): 2310-2318. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202303171.

[15] THUPARI J N, PINN M L, KUHAJDA F P. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(2): 217-223. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5146.

[16] GORSKI P A, KHO C, OH J G. Measuring cardiomyocyte contractility and calcium handling *in vitro*[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1816: 93-104. DOI: 10.1007/978-1-4939-8597-5_7.

[17] HOBAI I A, EDGECOMB J, LABARGE K, *et al*. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. Shock, 2015, 43: 3-15. DOI: 10.1097/shk.0000000000000261.

[18] JOZEFOWICZ E, BRISSON H, ROZENBERG S, *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha by fenofibrate prevents myocardial dysfunction during endotoxemia in rats[J]. Crit Care Med, 2007, 35: 856-863. DOI: 10.1097/01.Ccm.0000256843.75446.A0

[19] KANG Z Q, ZHANG Z, LI J, *et al*. Mechanistic of AMPK/ACC2 regulating myoblast differentiation by fatty acid oxidation of goat[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 270(Pt 2): 132243. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.132243.

[20] O'NEILL H M, LALLY J S, GALIC S, *et al*. Skeletal muscle ACC2 S212 phosphorylation is not required for the control of fatty acid oxidation during exercise[J]. Physiol Rep, 2015, 3(7): e12444. DOI: 10.14814/phy2.12444.

[21] ROSS T T, CROWLEY C, KELLY K L, *et al*. Acetyl-CoA carboxylase inhibition improves multiple dimensions of NASH pathogenesis in model systems [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 10: 829-851. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.06.001

[22] YOON H, SPINELLI J B, ZAGANJOR E, *et al*. PHD3 loss promotes exercise capacity and fat oxidation in skeletal muscle[J]. Cell Metab, 2020, 32(2): 215-228.e7. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.06.017.

[23] ABU-ELHEIGA L, MATZUK M M, ABO-HASHEMA K A, *et al*. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2[J]. Science, 2001, 291(5513): 2613-2616. DOI: 10.1126/science.1056843.

[24] CHOI Y S, DE MATTOS A B M, SHAO D, *et al*. Preservation of myocardial fatty acid oxidation prevents diastolic dysfunction in mice subjected to angiotensin Ⅱ infusion[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 100: 64-71. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.001.

[25] GALVAN-PENA S, CARROLL R G, NEWMAN C, *et al*. Malonylation of GAPDH is an inflammatory signal in macrophages[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 338. DOI: 10.1038/s41467-018-08187-6.

[26] HARRIMAN G, GREENWOOD J, BHAT S, *et al*. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(13): E1796-E1805. DOI: 10.1073/pnas.1520686113.

(**收稿**:2024-06-14;**修回**:2024-10-22)

(编辑 刘秋池)