

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.04.0334

论著

锌转运体 7 在脓毒性心肌病中的作用及其机制研究

韩佳家, 徐哲龙

(天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨锌转运体(ZIP)7在脓毒性心肌病中的作用及其机制。方法:动物实验采用盲肠结扎穿刺术(CLP)构建小鼠脓毒性心肌病动物模型。将野生型小鼠随机分为假手术组(Sham)、CLP-6 h、CLP-12 h、CLP-18 h和CLP-24 h组,检测ZIP7表达情况。将野生型(WT)和心脏特异性ZIP7条件敲除小鼠(ZIP7 cKO)随机分为WT Sham组、WT CLP组和cKO CLP组,用qPCR检测心肌组织细胞因子mRNA表达水平,用试剂盒检测琥珀酸脱氢酶(SDH)活性,用苏木精-伊红(HE)染色法和超声检测小鼠心肌结构功能改变,用MitoSOX Red荧光探针检测线粒体活性氧簇(ROS);采用Western印迹检测相关信号通路蛋白表达。细胞实验:用脂多糖(LPS)对小鼠心肌细胞HL-1进行处理,构建脓毒性心肌病细胞模型,将细胞分为对照组(Ctrl)、LPS-6 h、LPS-12 h、LPS-18 h和LPS-24 h组,检测ZIP7表达。将HL-1和ZIP7 KO HL-1细胞分为Ctrl组、LPS组和KOLPS组,采用qPCR检测相关细胞因子表达水平;检测SDH活性。将野生型HL-1随机分为Ctrl组、LPS组、丙二酸二甲酯(DMM)组和DMM+LPS组,用CCK-8试剂盒检测细胞活力,O₂k检测线粒体呼吸功能。结果:动物实验:与Sham组小鼠相比,CLP小鼠心肌组织在12、18和24 h ZIP7蛋白表达均升高($t=3.005, 4.510, 5.985$, 均 $P<0.05$)。与WT CLP组相比,cKO CLP组心脏射血分数、缩短分数、每搏输出量、左室前壁厚度均增加($t=2.867, 3.270, 3.845, 2.284$, 均 $P<0.05$),心肌纤维间隙减小,炎细胞浸润减少,白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA表达和SDH活性下降($t=3.171, 6.585, 7.119, 3.786$, 均 $P<0.01$),IL-10表达进一步增加($t=5.147, P<0.001$),线粒体ROS和缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、半胱天冬蛋白酶-1前体(ProCaspase-1)、切割型半胱天冬蛋白酶-1(Caspase-1 Cleaved)蛋白表达量减少($t=3.261, 2.625, 2.239, 2.995, 4.250$, 均 $P<0.05$)。细胞实验:与Ctrl组相比,LPS处理后6、12、18和24 h ZIP7蛋白表达均升高($t=2.728, 2.384, 3.216, 4.087$, 均 $P<0.001$)。与HL-1 LPS组相比,KO LPS组IL-1 β 、IL-6 mRNA水平和SDH活性降低($t=11.33, 11.94, 3.803$, 均 $P<0.05$),IL-10的mRNA水平进一步升高($t=7.525, P<0.001$)。与HL-1 LPS组相比,DMM+LPS组线粒体呼吸控制率(RCR)和细胞活力部分恢复($t=5.794, 3.224$, 均 $P<0.01$),呼吸链复合物1的质子泄露(C I Leak)呼吸和非线粒体呼吸减少($t=4.311, 10.17$, 均 $P<0.01$)。结论:脓毒性心肌病小鼠心肌细胞ZIP7过表达,ZIP7通过SDH/HIF-1 α /NLRP3信号通路导致心肌损伤。

关键词 锌转运体 7; 脓毒性心肌病; 线粒体活性氧; 琥珀酸脱氢酶

中图分类号 R363

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)04-0334-09

The role and mechanism of zinc transporter 7 in septic cardiomyopathy

HAN Jiajia, XU Zhelong

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the role and mechanism of zinc transporter (ZIP) 7 in septic cardiomyopathy. **Methods:** In animal experiments, cecal ligation and puncture (CLP) was used to construct an mouse model of septic cardiomyopathy in mice. Wild-type mice were randomly divided into sham operation group (Sham), CLP-6 h, CLP-12 h, CLP-18 h and CLP-24 h groups, and the expression of ZIP7 was detected. Wild-type (WT) and heart-specific ZIP7 conditional knockout mice (ZIP7 cKO) mice were randomly divided into the WT Sham group, the WT CLP group and the cKO CLP group. The expression of cytokine mRNA in myocardial tissue was detected by qPCR, and the activity of succinate dehydrogenase (SDH) was detected by the kit. The structural and functional changes of mouse myocardium were detected by hematoxytin-eosin (HE) staining and ultrasound, and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) were detected by MitoSOX Red fluorescent probe. The expression of related pathways proteins was detected by Western blotting. Cell experiment: Mouse cardiomyocyte HL-1 was treated with lipopolysaccharide (LPS) to construct a cell model of septic cardiomyopathy. The cells were randomly divided into the control group (Ctrl), LPS-6 h, LPS-12 h, LPS-18 h and LPS-24 h groups, and the expression of ZIP7 was detected. HL-1 and ZIP7 KO HL-1 cells were divided into the Ctrl group, the LPS group and the KO LPS group. The expression of related cytokines were detected by qPCR, and SDH activity was detected. Wild-type HL-1 was randomly divided into the Ctrl group, the LPS group, the dimethyl malonate (DMM) group and the DMM+LPS group. Cell viability was detected using the CCK-8 kit. Mitochondrial respiratory function was detected using O₂k. **Results:** Animal experiment: Compared with the mice in the Sham group, the expression of ZIP7 protein in the myocardial tissue of CLP mice increased at 12, 18 and 24 h ($t=3.005, 4.510, 5.985$, all $P<0.05$). Compared with the WT CLP group, the cardiac ejection fraction,

作者简介 韩佳家(1999-),女,硕士在读,研究方向:病理学与病理生理学;通信作者:徐哲龙,E-mail:z xu@tmu.edu.cn.

shortening fraction, stroke volume, and the thickness of the anterior left ventricular wall all increased in the cKO CLP group ($t=2.867, 3.270, 3.845, 2.284$, all $P<0.05$), the myocardial fiber space decreased, and the infiltration of inflammatory cells decreased. The mRNA expressions of cytokines interleukin (IL)- 1β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α and the activity of SDH decreased ($t=3.171, 6.585, 7.119, 3.786$, all $P<0.01$), and the expression of IL-10 further increased ($t=5.147, P<0.001$). The expression levels of mitochondrial ROS and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), protease Caspase-1 (ProCaspase-1), and Caspase-1 Cleaved proteins decreased ($t=3.261, 2.625, 2.239, 2.995, 4.250$, all $P<0.05$). Cell experiment: Compared with the Ctrl group, the expression of ZIP7 increased at 6 h, 12 h, 18 h and 24 h after LPS treatment ($t=2.728, 2.384, 3.216, 4.087$, all $P<0.001$). Compared with the HL-1 LPS group, the mRNA of IL- 1β , IL-6 and SDH activity in the KO LPS group decreased ($t=11.33, 11.94, 3.803$, all $P<0.05$), and the mRNA of IL-10 further increased ($t=7.525, P<0.001$). Compared with the HL-1 LPS group, the mitochondrial respiratory control rate (RCR) and cell viability in the DMM+LPS group partially recovered ($t=5.794, 3.224$, both $P<0.01$), and complex I proton (C I Leak) respiration and non-mitochondrial respiration decreased ($t=4.311, 10.17$, both $P<0.01$). **Conclusion:** ZIP7 is overexpressed in cardiomyocytes of mice with septic cardiomyopathy, causing myocardial injury through the SDH/HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway.

Key words zinc transporter 7; septic cardiomyopathy; mitochondrial reactive oxygen species; succinate dehydrogenase

脓毒症是宿主对感染反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍^[1]。心脏是脓毒症最常受累的器官之一,脓毒性心肌病是脓毒症引发的心功能障碍,临床主要表现为左心室收缩功能异常和心室扩张^[2]。研究显示,脓毒性心肌病发病率20%,病死率高达70%^[3-4]。

锌是机体必须的微量元素,在免疫应答中起重要作用。锌转运体(ZIP)帮助锌的转移,在维持锌稳态中发挥重要作用^[5]。目前研究证实,ZIP4、ZIP6、ZIP10和ZIP14在脓毒症患者的肝脏中表达增加^[6]。本课题组前期研究证实ZIP7在心肌缺血-再灌注损伤和糖尿病心肌病等方面发挥重要作用^[7-8]。目前,ZIP7在脓毒性心肌病中的作用还不清楚。

琥珀酸脱氢酶(SDH)是三羧酸循环(TCA)中唯一的线粒体内膜蛋白,是连接TCA和氧化磷酸化的桥梁。SDH可以直接产生线粒体活性氧簇(ROS),对心肌细胞造成伤害^[9]。越来越多的研究证实,SDH活性改变在疾病发生、发展中发挥着重要作用。例如肥胖、糖尿病、心肌缺血-再灌注损伤以及脓毒症都会出现SDH活性增强现象^[10-13]。尽管研究已证实,应用SDH抑制剂丙二酸二甲酯(DMM)可以限制缺氧诱导因子(HIF)-1 α 募集并减少糖酵解和细胞因子的表达,增强心肌再生能力同时减轻脓毒性心肌病的心肌损伤,但目前仍不清楚SDH活性增加的具体机制^[14-16]。因此本研究主要探讨ZIP7是否通过影响SDH活性及相关通路,从而在脓毒性心肌病中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J野生型雄性小鼠由斯贝

福(北京)生物技术有限公司提供[动物批号:SYXK(津)2019-0004,许可证号:SCXK(京)2019-0010]。所有小鼠均在SPF级动物房饲养繁殖,饲养环境温度为(24 \pm 1) $^{\circ}$ C,日温差 $<3^{\circ}$ C,相对湿度在40%~70%,新鲜空气换气次数15次/h,气流速度 <0.18 m/s,压差25 Pa(1 Pa=760 mmHg),噪音 <60 dB,光照时间自动控制在8:00~20:00,照度150~300 Lux,垫料、饲料和饮用水均经过高压灭菌处理。动物实验方案获得伦理委员会批准(伦理号:TMUaMEC2023101)。

心脏特异性ZIP7条件敲除小鼠(ZIP7cKO)与江苏集萃药康生物科技股份有限公司合作构建。采用CRISPR/Cas9系统,选用转录本ZIP7-201,将Cas9mRNA、sgRNA和供体共同注入受精卵,通过移码突变破坏ZIP7基因,获得ZIP7^{fllox/fllox}小鼠。将ZIP7^{fllox/fllox}小鼠和诱导型心脏特异Cre转基因(MYh6-cre)小鼠杂交获得基因型为ZIP7^{fllox/wt}/MYh6-cre的F1代小鼠,将F1代小鼠与ZIP7^{fllox/fllox}小鼠杂交,获得基因型为ZIP7^{fllox/fllox}/MYh6-cre的F2代小鼠即为cKO小鼠。通过PCR对敲除小鼠进行鉴定,PCR引物序列见表1。

鉴定成功敲除ZIP7基因的雄鼠在4周龄时用

表1 PCR引物序列

Tab.1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')
Cre-forward	ATACCGAGATCATGCAAGC
Cre-reverse	AGGTGGACCTGATCATGGAC
ZIP7-forward	GAAGCTCCATCTTTGCCCTTCTG
ZIP7-reverse	TTAGTGTTGGAGCACTGTTAAGC

注:forward:上游引物;reverse:下游引物;Cre:重组酶;ZIP7:锌转运体7

浓度为 10 mg/L 的他莫昔芬玉米油溶液(75 mg/kg)腹腔注射 3 d。诱导 4 周后用 Western 印迹验证其敲除效率。

1.1.2 实验细胞 小鼠心肌细胞 HL-1 购自美国 ATCC 公司。将 HL-1 转染连入靶向 ZIP7 外显子 5 和 7sgRNA 的 pLentiCRISPRv2 质粒,转染 72 h 后用 0.5 μ g/mL 嘌呤霉素筛选并验证敲除效果,进行单克隆培养并通过 Western 印迹验证 ZIP7 敲除效率。

1.1.3 主要实验试剂 胎牛血清购于武汉博士德生物工程有限公司;青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液、PBS、PMSF、BSA、Tris-base、吐温 20、RIPA、DEPC 水、中性树胶、SDH 试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;DMEM 购于美国 Cytiva 公司;ADP、脂多糖(LPS)购于美国 Sigma-Aldrich 公司;蛋白质 marker 购于美国 ThermoFisherScientific 公司;Mio-trackerGreen、MitoSOXRed 购于美国 Invetrogen 公司;DNAMarker、逆转录试剂盒、qPCR 染料购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;BCA 试剂盒、CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;抗鼠 IgG 抗体(7076)、抗兔 IgG 抗体(7074)和含 CARD 结构域的凋亡相关斑点蛋白(ASC)抗体(67824)购于美国 Cell Signaling Technology 公司;GAPDH 抗体(AC033)购于爱博泰克生物技术有限公司;Caspase-1 抗体(WL03450)、HIF-1 α 抗体(WL01607)购于沈阳万类生物技术有限公司;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)抗体(T55651)购于艾比玛特医药科技有限公司;ZIP7 抗体(19429-1-AP)购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及脓毒症模型建立 采用盲肠结扎穿刺术(CLP)建立脓毒性心肌病模型,按随机数字法将 25 只 8 周龄 C57BL/6J 野生型雄性小鼠随机分为 5 组:假手术(Sham)组、盲肠结扎穿刺模型 CLP-6 h、CLP-12 h、CLP-18 h 和 CLP-24 h 组,每组 5 只。CLP 组:采用 CLP 开腹后用 3-0 手术线结扎盲肠中部并用 20G 注射器针头刺穿盲肠盲端,挤出少许粪便,将其还纳回腹腔并关闭,在颈枕部皮下注射生理盐水补液。根据分组,分别于术后 6、12、18 和 24 h 处死,取出心脏组织。Sham 组:沿腹中线切开并暴露腹腔,找到盲肠后关闭腹腔,术后 24 h 处死小鼠,取出心脏组织,用于检测不同时间模型小鼠心肌组织 ZIP7 蛋白和 mRNA 相对表达量。

按随机数字法将 12 只 8 周龄 C57BL/6J 野生型雄性小鼠和 6 只 8 周龄 ZIP7 cKO 小鼠随机分为野生型小鼠假手术(WTSham)组,野生型小鼠盲肠结

扎穿刺模型(WTCLP)组和 ZIP7 心脏特异性基因敲除小鼠盲肠结扎穿刺模型(cKOCLP)组,每组 6 只。操作同上文 Sham 组和 CLP 组,并于术后 24 h 进行超声心动图检查,结束后立即处死,取出心脏组织,用于检测 HE 染色下的心脏损伤程度、心肌组织炎症细胞因子 mRNA 相对表达情况、SDH 活性和线粒体 ROS 水平。

1.2.2 细胞分组及脓毒症模型建立 将细胞接种于培养皿中,使用含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素-两性霉素的 DMEM 培养基,于 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵箱培养。过夜培养后根据不同实验目的,对细胞进行如下分组。

第一部分细胞实验:对照组(Ctrl)、LPS-6 h、LPS-12 h、LPS-18 h 和 LPS-24 h 共 5 组,每组 5 个 3.5 cm 培养皿。Ctrl 组:DMEM 培养基处理 24 h;LPS-6 h、LPS-12 h、LPS-18 h 和 LPS-24 h:10 μ g/mL LPS+DMEM 培养基分别处理 6、12、18 和 24 h 后收取样本,用于检测不同时间细胞模型 ZIP7 蛋白和 mRNA 相对表达量。

第二部分细胞实验:HL-1 细胞对照组(HL-1 Ctrl)、HL-1 细胞 LPS 处理组(HL-1 LPS)和 ZIP7 基因敲除 LPS 处理组(KO LPS)共 3 组,每组 5 个 3.5 cm 培养皿。HL-1 Ctrl 组:DMEM 培养基处理 24 h;HL-1 LPS 和 KO LPS 组:10 μ g/mL LPS+DMEM 培养基处理 24 h,用于检测细胞炎症细胞因子 mRNA 相对表达情况和 SDH 活性。

第三部分细胞实验:HL-1 细胞对照组(HL-1 Ctrl)、HL-1 细胞 LPS 处理组(HL-1 LPS)、HL-1 细胞丙二酸二甲酯处理组(DMM)和 HL-1 细胞丙二酸二甲酯和 LPS 联合处理组(DMM+LPS)共 4 组,每组 5 个 6 cm 培养皿。HL-1 Ctrl 组:DMEM 培养基处理 24 h;HL-1 LPS 组:10 μ g/mL LPS+DMEM 培养基处理 24 h;DMM 组:10 mmol/L DMM+DMEM 培养基处理 24 h;DMM+LPS 组:10 mmol/L DMM+10 μ g/mL LPS+DMEM 培养基处理 24 h,用于检测 HL-1 细胞活力和线粒体呼吸功能。

1.2.3 苏木精-伊红染色(HE)观察小鼠心脏组织病理改变 取新鲜心肌组织放入 4%多聚甲醛固定。经 PBS 清洗后用 30%、50%、70%、85%、95% 和 100%乙醇梯度脱水各 1 h,二甲苯透明 30 min,浸蜡 3 次,每次 1 h。包埋后切成 5 μ m 厚度的石蜡切片。切片烘干后进行脱蜡处理,分别用二甲苯、无水乙醇、95%、85%、75%和 60%的梯度乙醇脱蜡后,滴染苏木素和伊红进行染色,流水冲洗切片、脱水并用中性树脂封片,在显微镜下观察。

1.2.4 小鼠心脏超声 脱去小鼠前胸和颈部的毛发,麻醉后以仰卧位固定在操作台上,四肢与前胸部涂抹适量耦合剂,用MS400探头对小鼠胸骨旁心脏长轴数据进行测量,保存并计算Mmode图像,再将探头顺时针旋转90°获得胸骨旁短轴切面,保存图片并计算射血分数(EF)、缩短分数(FS)、心输出量(CO)和左心室前壁厚度(LVAWd)。

1.2.5 小鼠原代心肌细胞分离 用三蒸水清洗心脏灌流装置,取下新鲜的小鼠心脏后将主动脉修剪到合适长度悬挂固定。缓冲消化液对小鼠心脏灌流15~20 min,待小鼠心脏在灯光下呈半透明状态,取下心脏放入存有缓冲液的细胞培养皿。用移液枪吹打并过筛,使心肌细胞呈现单个分离状态。用缓冲液重悬细胞并离心,重复3次所得的细胞沉淀用含有20%FBS的M199培养基重悬,接种到提前用基质胶包被好的共聚焦小皿中培养。

1.2.6 细胞荧光实验 用PBS清洗细胞,向共聚焦小皿中加入含有MitotrackerGreen(1:2 000)和MitoSOXRed(1:1 000)的M199培养基。37℃孵育20 min后用PBS清洗。使用共聚焦显微镜(激发光设置为488、559 nm)观察拍摄。

1.2.7 蛋白样本提取和Western印迹实验 向小鼠心肌组织或HL-1细胞中加入RIPA和PMSF混合液(体积比例是100:1),冰上充分研磨后静置30 min,离心吸上清获得蛋白并通过BCA蛋白检测试剂盒测定浓度。用12%SDS-PAGE分离胶电泳,300 mA恒流转至PVDF膜。5%奶粉封闭1.5 h,一抗GAPDH(1:4×10⁵)、HIF-1 α 、NLRP3、caspase-1、ASC、ZIP7(1:1 000)4℃过夜孵育,二抗(1:1 000)室温孵育1 h,TBST清洗后曝光并保存图片。各种蛋白的条带净化密度计算使用Image J软件,用目的蛋白/GAPDH的光密度来表示目的蛋白的相对表达。

1.2.8 RT-qPCR 采用Trizol法提取心肌组织或细胞总RNA,通过逆转录试剂盒将RNA逆转录为总体积20 μ L cDNA进行qPCR。反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性10 s、60℃退火30 s、72℃延伸30 s,40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算。qPCR引物序列见表2。

1.2.9 SDH活性检测 根据碧云天SDH活性检测试剂盒说明书进行如下操作:向100 mg组织或5×10⁶个细胞中加入1 mL试剂一和10 μ L试剂二,对组织、细胞分别匀浆或超声处理,4℃、11 000 \times g离心10 min取上清。在96孔板中分别加入10 μ L上清、170 μ L试剂三、10 μ L试剂四和10 μ L试剂五。空白孔将上清液换为双蒸水,其他条件相同。酶标仪预

表2 qPCR引物序列
Tab.2 qPCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小
GAPDH-forward	CCTGCCGCCTGGAGAAACCTG	140 bp
GAPDH-reverse	AGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG	
ZIP7-forward	TGTTGGTAAAGGTATCGGGGC	126 bp
ZIP7-reverse	ATGGTCATCACCGCGCTC	
IL-1 β -forward	CTAAGGCCAACCCGTGAAAAG	104 bp
IL-1 β -reverse	ACCAGAGGCATACAGGACA	
IL-6-forward	TAGTCTTCTACCCCAATTTC	76 bp
IL-6-reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTT	
IL-10-forward	AAGGACCAGCTGGACAACAT	88 bp
IL-10-reverse	TCATTTCCGATAAGGCTTGG	
TNF- α -forward	CCTCCACTTGGTGGTTTGCTAC	180 bp
TNF- α -reverse	GGGCCACCACGCTCTTC	

注:forward:上游引物;reverse:下游引物;ZIP7:锌转运体7;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;IL:白细胞介素;TNF- α :肿瘤坏死因子- α

热,分别读取20 s和1 min时在波长600 nm处的OD值,通过公式计算得到SDH活性。

1.2.10 细胞活力检测 在96孔板接种7×10³个细胞,过夜培养后按照1.2.2的方法处理。处理结束后用PBS清洗,加入为100 μ L CCK-8工作液。空白孔内无细胞,其他条件相同。37℃反应30 min,用酶标仪测定波长450 nm处的OD值。通过公式计算得到细胞活力。

1.2.11 线粒体呼吸测定 用三蒸水清洗O2k仪器,向仓内加入2 mL呼吸介质,打开转子待呼吸介质达到氧饱和,插入STOPPER校准。依次加入1×10⁶个细胞、苹果酸(2 mmol/L)和谷氨酸(10 mmol/L)混合试剂,待体积特异性氧气通量平稳后,所得数值为C I Leak呼吸,加入ADP(1~5 mmol/L)平稳后的测量数值除以C I Leak呼吸得到线粒体呼吸控制率(RCR),加入琥珀酸(10 mmol/L)、羰基氰化物间氯苯腙(0.5 μ mol/L)、鱼藤酮(0.5 μ mol/L)和抗霉素A(2.5 μ mol/L)平稳后测得非线粒体呼吸,结束程序清洗。

1.3 统计学处理 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用GraphPadPrism8.0统计软件进行统计学处理,当数据满足正态分布方差齐时,采用完全随机设计的独立样本t检验以及单因素方差分析(one-way ANOVA),P<0.05为差异具有统计学意义。

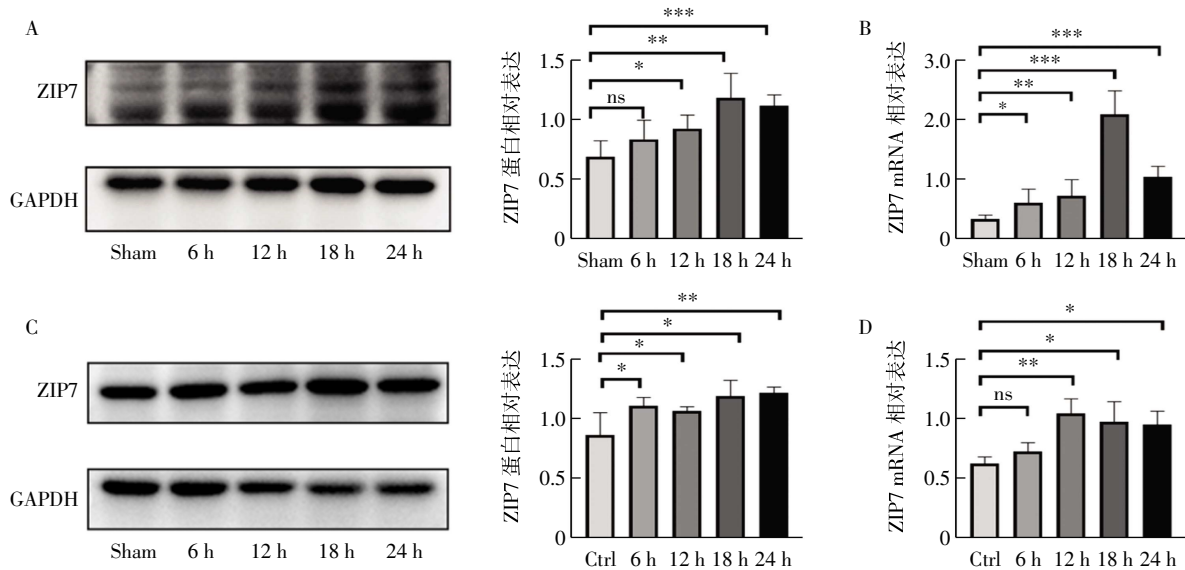
2 结果

2.1 在脓毒性心肌病小鼠心肌组织中ZIP7表达增加 动物实验结果表明,与Sham组相比,CLP-12 h、CLP-18 h组心肌组织中ZIP7 mRNA和蛋白表达均增加($t=3.005, P<0.05; t=4.510, P<0.01$),且在CLP-

24 h 时 ZIP7 蛋白增加最明显($t=5.985, P<0.001$), 见图 1A、1B。

细胞实验结果表明, 与 Ctrl 组相比, LPS-6 h、

12 h、18 h ZIP7 mRNA 和蛋白表达均增加($t=2.728、2.384、3.216$, 均 $P<0.05$), 且在 LPS-24 h 时 ZIP7 蛋白表达增加最明显($t=4.087, P<0.01$), 见图 1C、1D。



注:A: 盲肠结扎穿刺术后不同时间小鼠心肌组织 ZIP7 蛋白表达情况;B: 盲肠结扎穿刺术后不同时间小鼠心肌组织 ZIP7 mRNA 表达水平;C: HL-1 细胞脂多糖(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理不同时间 ZIP7 蛋白表达情况;D: HL-1 细胞脂多糖(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理不同时间 ZIP7 mRNA 表达情况; Sham: 假手术组; Ctrl: 对照组; ZIP7: 锌转运体 7; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; ns: 无显著统计学差异

图 1 脓毒性心脏病小鼠心肌组织和 HL-1 细胞的 ZIP7 mRNA 和蛋白质表达水平

Fig.1 ZIP7 mRNA and protein expression levels in myocardial tissue and HL-1 cells of mice under different sepsis duration

2.2 敲除 ZIP7 基因减轻脓毒性心肌病的心脏功能障碍和心肌细胞损伤 动物实验结果显示, 与 WTSham 组相比, WTCLP 组 EF 降低($t=9.650, P<0.001$)、FS 降低($t=10.46, P<0.001$)、CO 减少($t=4.467, P<0.01$)、LVAWd 变薄($t=3.095, P<0.05$); 与 WTCLP 组相比, cKOCLP 组 EF 增加($t=2.867, P<0.05$)、FS 增加($t=3.270, P<0.01$)、CO 增加($t=3.845, P<0.01$)、LVAWd 增厚($t=2.284, P<0.05$), 见图 2A。HE 染色结果显示, 与 WT Sham 组相比, WTCLP 组心肌纤维间隙变大, 炎细胞浸润增加; 与 WTCLP 组相比, cKOCLP 组心肌纤维间隙缩小, 炎细胞浸润减少(图 2B)。qPCR 结果显示, 与 WTSham 组相比, WTCLP 组心肌促炎细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 和抗炎细胞因子 IL-10 的 mRNA 水平均增加($t=5.037、9.616、7.952、3.705$, 均 $P<0.01$); 与 WTCLP 组相比, cKOCLP 组促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平降低($t=3.171、6.585、7.119$, 均 $P<0.01$), 抗炎细胞因子 IL-10 的 mRNA 水平更高($t=5.147, P<0.001$), 见图 2C。

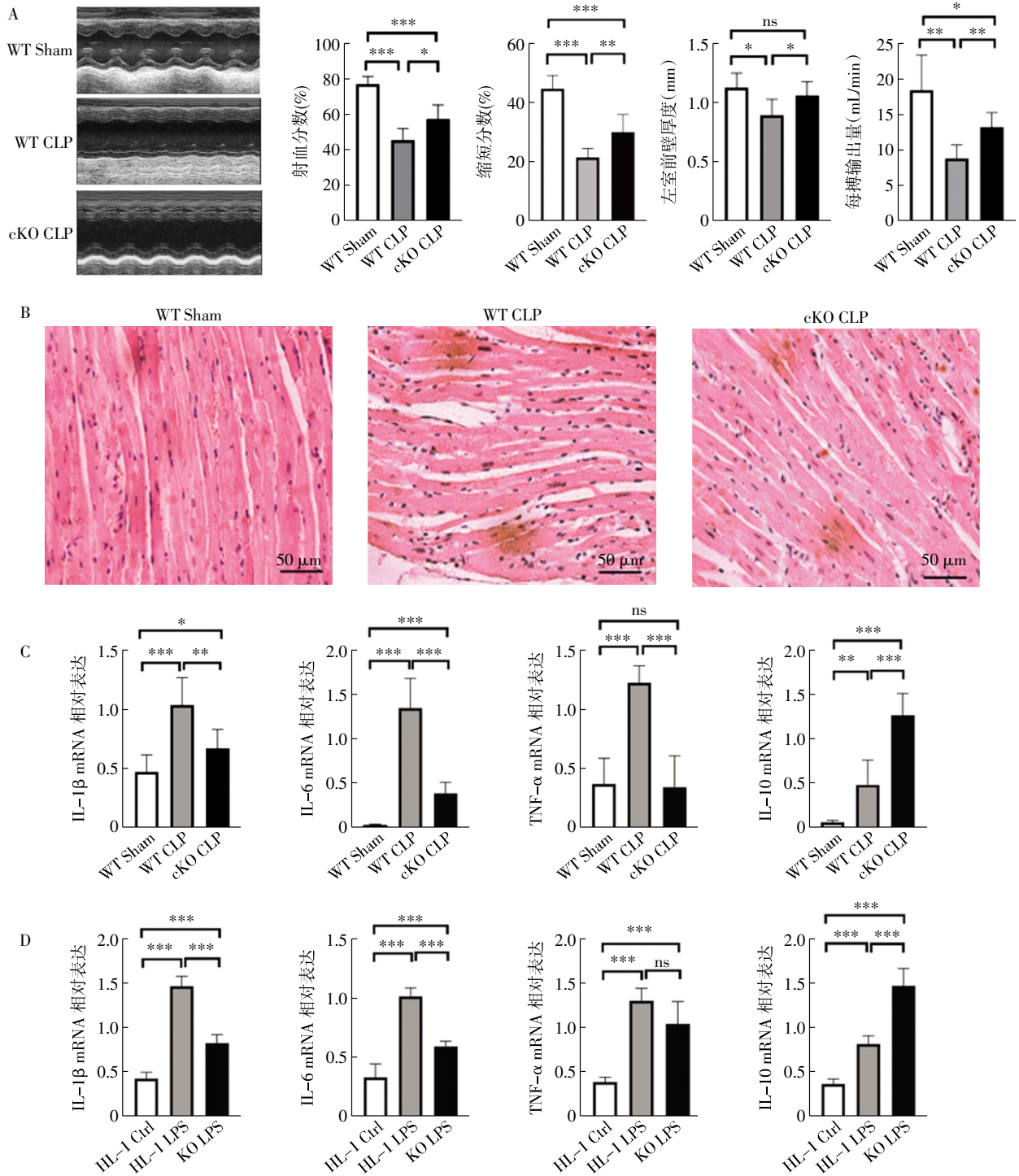
细胞实验结果显示, 与 HL-1 Ctrl 组相比, HL-1 LPS 组心肌促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和抗炎细胞因子 IL-10 的 mRNA 表达水平均升高($t=$

20.37、12.29、14.71、10.12, 均 $P<0.001$); 与 HL-1LPS 组相比, KOLPS 组促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平降低($t=11.33、11.94$, 均 $P<0.001$), 抗炎细胞因子 IL-10 mRNA 表达水平更高($t=7.525, P<0.001$), 见图 2D。

2.3 ZIP7 基因敲除对脓毒性心肌病心肌 SDH 活性和线粒体 ROS 的影响 荧光结果显示, 与 WTSham 组相比, WTCLP 组线粒体 ROS 增多($t=6.621, P<0.001$); 与 WTCLP 组相比, cKOCLP 组线粒体 ROS 减少($t=3.261, P<0.01$), 见图 3A。SDH 活性测定结果显示, 与 WTSham 组相比, WTCLP 组 SDH 活性明显增加($t=10.69, P<0.001$); 与 WTCLP 组相比, cKOCLP 组 SDH 活性下降($t=3.786, P<0.01$), 见图 3B。

细胞实验结果显示, 与 HL-1Ctrl 组相比, HL-1 LPS 组 SDH 活性明显增加($t=6.116, P<0.01$), 与 HL-1 LPS 组相比, KOLPS 组 SDH 活性下降($t=3.803, P<0.05$), 见图 3C。

2.4 DMM 对脓毒性心肌病的心肌细胞活力和线粒体呼吸功能的影响 CCK-8 结果显示, 与 HL-1Ctrl 组相比, HL-1 LPS 组、DMM 组和 DMM+LPS 组细胞活力均下降($t=6.753、2.530、4.355$, 均 $P<0.05$); 但与 HL-1LPS 组相比, DMM+LPS 组细胞活力明



注:A:小鼠超声心动图;B:40×显微镜下观察 HE 染色的小鼠心肌组织切片;C:小鼠心肌组织细胞因子 mRNA 表达;D:HL-1 细胞中细胞因子;WT Sham:野生型小鼠假手术组;WT CLP:野生型小鼠盲肠结扎穿刺模型组;cKO CLP:ZIP7 心脏特异性基因敲除小鼠盲肠结扎穿刺模型组;HL-1 Ctrl:HL-1 细胞对照组;HL-1 LPS:HL-1 细胞脂多糖处理组;KO LPS:ZIP7 基因敲除脂多糖处理组;IL-1β: 白细胞介素-1β;IL-6: 白细胞介素-6;IL-10: 白细胞介素-10;TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: 差异无统计学意义

图 2 超声心动图、HE 染色和细胞因子转录水平检测脓毒症和 ZIP7 基因敲除后心肌损伤程度

Fig.2 Echocardiography, HE staining, and cytokine transcription levels were used to detect myocardial damage after sepsis and ZIP7 gene knockout

显上升($t = 3.224, P < 0.01$), 见图 4A。

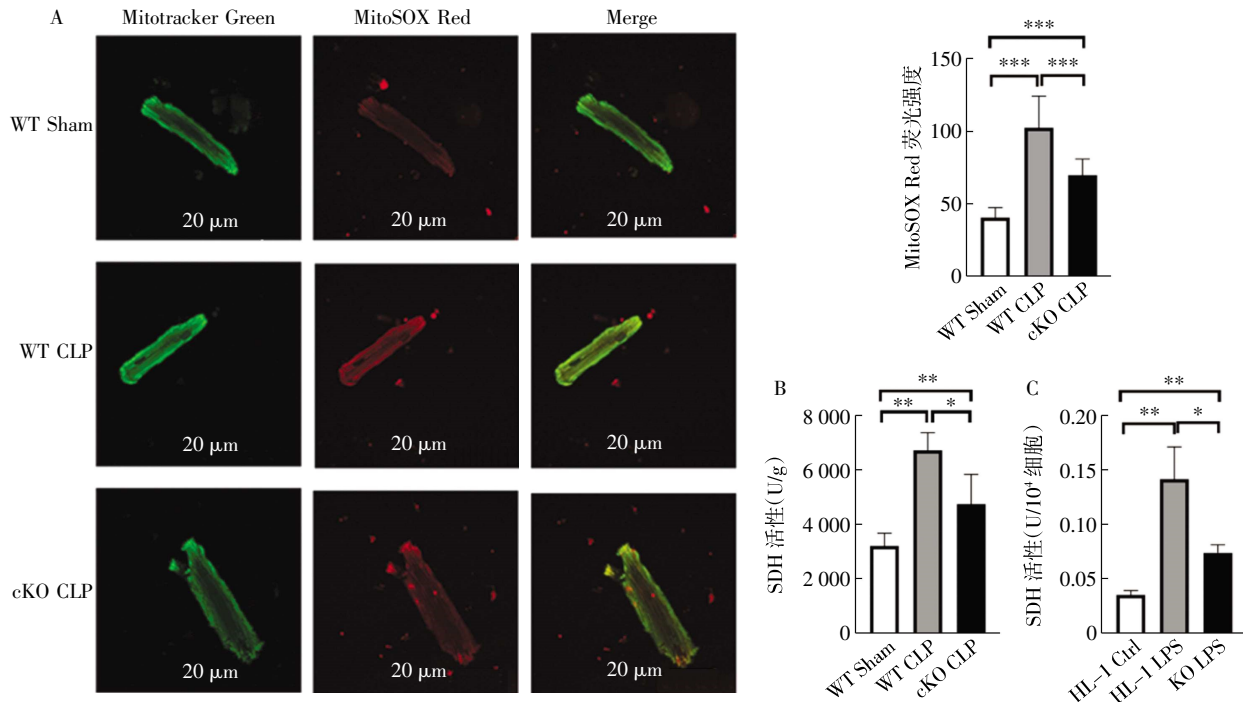
线粒体呼吸实验结果显示, 与 HL-1Ctrl 组相比, HL-1LPS 组、DMM 组和 DMM+LPS 组细胞 RCR

均降低($t = 8.543, 4.834, 7.342$, 均 $P < 0.01$); 与 HL-1LPS 组相比, DMM+LPS 组 RCR 明显增加($t = 5.794, P < 0.01$), 见图 4B。与 HL-1Ctrl 组相比, HL-1LPS 组

Leak 呼吸明显增加($t=8.519, P<0.001$);与 HL-1LPS 组相比,DMM+LPS 组 Leak 呼吸明显减少($t=4.311, P<0.01$),见图 4C。与 HL-1Ctrl 组相比,HL-1LPS 组非线粒体呼吸明显增加($t=10.17, P<0.001$);与 HL-1LPS 组相比,DMM+LPS 组非线粒体呼吸明显减少($t=4.821, P<0.01$),见图 4D。

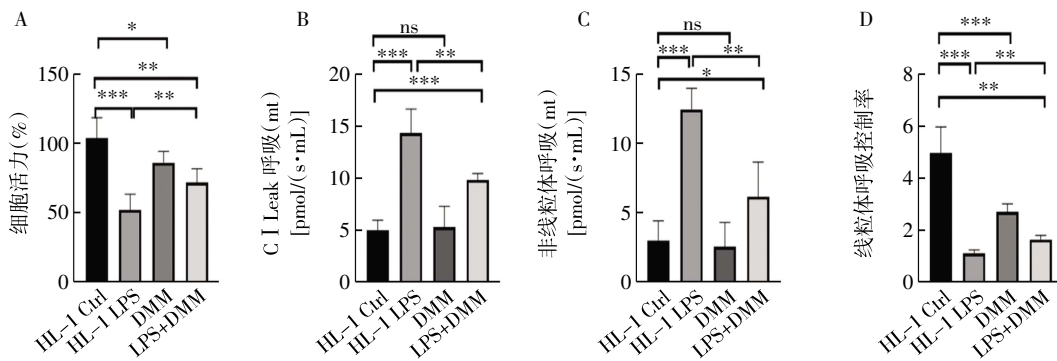
2.5 ZIP7 通过 SDH/HIF-1 α /NLRP3 信号通路参与调节脓毒性心肌病 Western 印迹结果显示,与

WTSham 组相比,WTCLP 组 HIF-1 α 、NLRP3、半胱天冬蛋白酶-1 前体(Pro Caspase-1)、切割型半胱天冬蛋白酶-1(Ca-spase-1 Cleaved)、凋亡相关斑点蛋白(ASC)的蛋白表达均明显增加($t=3.110、3.872、2.232、4.251、3.305$,均 $P<0.05$);与 WTCLP 组相比,cKOCLP 组 HIF-1 α 、NLRP3、ProCaspase-1、Caspase-1 Cleaved 蛋白表达明显减少($t=2.625、2.239、2.995、4.250$,均 $P<0.05$),见图 5。



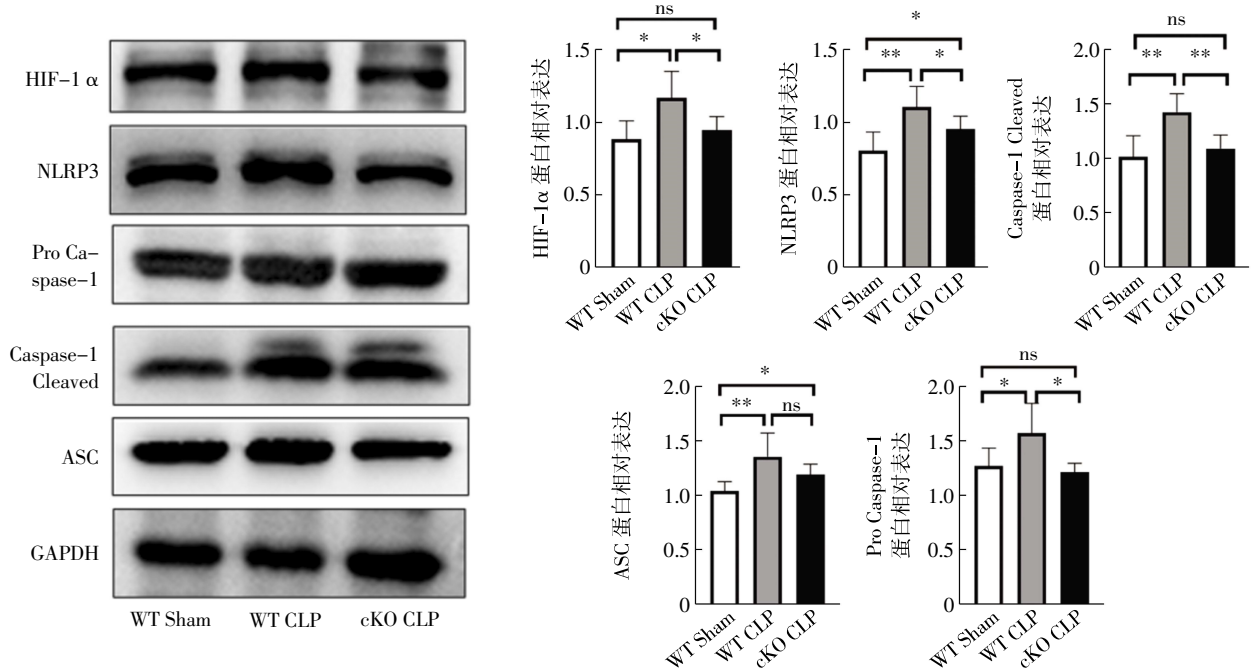
注:A:小鼠心肌组织细胞分离后 Mitotracker Green、MitoSOX Red 染色免疫荧光图(60 \times);B:小鼠心肌组织琥珀酸脱氢酶活性检测结果;C:HL-1 细胞琥珀酸脱氢酶活性检测结果;WT Sham:野生型小鼠假手术组;WT CLP:野生型小鼠盲肠结扎穿刺模型组;cKO CLP:ZIP7 心脏特异性基因敲除小鼠盲肠结扎穿刺模型组;Mitotracker Green:线粒体基质聚集荧光染料;MitoSOX Red:特异靶向线粒体的活细胞荧光探针;SDH:琥珀酸脱氢酶;ROS:活性氧簇;* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;ns:差异无统计学意义

图 3 各组线粒体 ROS 和 SDH 活性
Fig.3 Activities of mitochondria ROS and SDH in each group



注:A:CCK-8 细胞活力检测结果;B:O₂k 检测细胞呼吸链复合物 1 的质子泄露呼吸结果;C:O₂k 检测细胞非线粒体呼吸结果;D:O₂k 检测细胞线粒体呼吸控制率结果;HL-1 Ctrl:HL-1 细胞对照组;HL-1 LPS:HL-1 细胞脂多糖处理组;DMM:HL-1 细胞丙二酸二甲酯处理组;DMM+LPS:HL-1 细胞丙二酸二甲酯和脂多糖联合处理组;C I Leak:呼吸链复合物 1 的质子泄露;* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;ns:差异无统计学意义

图 4 各组细胞活力和线粒体呼吸功能比较
Fig.4 Comparison of cell viability and mitochondrial respiratory function in each group



注: WT Sham:野生型小鼠假手术组; WT CLP:野生型小鼠盲肠结扎穿刺模型组; cKO CLP: ZIP7 心脏特异性基因敲除小鼠盲肠结扎穿刺模型组; HIF-1α:缺氧诱导因子-1α; NLRP3:核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; Pro Caspase-1:半胱天冬蛋白酶-1 前体; Caspase-1 Cleaved:切割型半胱天冬蛋白酶-1; ASC:凋亡相关斑点蛋白; GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns:差异无统计学意义

图 5 各组 HIF-1α、NLRP3、Caspase-1、ASC 的蛋白表达

Fig.5 Protein expression of HIF-1α, NLRP3, Caspase-1 and ASC in each group

3 讨论

脓毒性心肌病机制较为复杂, 目前关于脓毒性心肌病功能障碍的病理生理机制包括免疫反应失调、心肌缺血、心肌抑制物、肾上腺素能系统、冠状动脉微血管功能障碍、线粒体功能障碍和钙处理异常等^[17]。由于其较高的发病率与死亡率, 脓毒性心肌病机制的研究成为世界范围内的重要课题。

锌是许多蛋白质的重要结构元件在免疫系统具有重要作用, 也是 ROS 依赖性信号转导的重要组成部分, 其在氧化应激中发挥重要作用^[18-19]。有研究显示, 敲除 ZIP14 可以部分恢复脓毒症期间打破的锌稳态, 减轻炎症^[20]。作为 ZIP 家族重要成员的 ZIP7 主要定位在内质网和高尔基体, 负责向胞质内运输锌离子, 提高胞质内游离锌浓度。同时 ZIP7 抑制酪氨酸磷酸酶, 可以激活其他定位于胞质的 ZIP, 让胞外锌离子流入胞质, 进一步提高胞质内锌浓度^[21]。脓毒症时细胞内游离锌水平增加, 且会出现钙超载现象^[5, 22]。本课题组前期研究表明钙超载在心肌缺血-再灌注时导致心肌细胞 ZIP7 表达增加^[7, 22]。本研究通过检测盲肠结扎穿刺术后不同时间心肌组织和小鼠心肌细胞系的 ZIP7 蛋白和 mRNA 表达情况, 发现脓毒性心肌病时小鼠心肌细胞的 ZIP7 表达也显著增加。当特异性敲除心肌细胞 ZIP7 基因后, 脓毒性心肌病小鼠的 EF、FS 出现不同程度恢复, LVAWd 明显增加, 表明敲除 ZIP7 后心脏收缩功能障碍减轻, 心室扩张情况缓解。对小鼠心脏进行 HE

染色, 发现特异性敲除心脏 ZIP7 基因的脓毒性心肌病小鼠心肌纤维间隙更小, 炎症细胞浸润也更少。检测心肌细胞的细胞因子表达情况, 发现敲除 ZIP7 基因后的心肌细胞促炎细胞因子明显减少, 抗炎细胞因子进一步增加, 表明心肌损伤程度减轻, 反应失调情况改善。这些结果表明, ZIP7 是改善脓毒性心肌病心肌损伤的一个重要靶点。

SDH 位于线粒体内膜, 最近发现其对心肌功能有重要影响。心肌缺血时 SDH 会发生功能逆转, 产生过量促炎损伤物质琥珀酸, 当发生再灌注时 SDH 活性增加, 将琥珀酸迅速氧化产生 ROS, 对心肌造成影响^[12]。另一方面, SDH 活性增加会影响心肌的代谢重编程, 抑制其再生能力^[15]。最近研究证实 SDH 对于免疫应答有重要作用, 在 LPS 诱导下, 巨噬细胞会出现 SDH 活性增加并增强糖酵解, 产生大量的线粒体 ROS 损伤^[10]。本研究发现在脓毒性心肌病的心肌细胞同样会出现 SDH 活性和线粒体 ROS 增加的现象, 敲除 ZIP7 基因后其 SDH 活性下降, 线粒体 ROS 减少。当用 DMM 对 SDH 活性进行抑制时, 脓毒性心肌病的心肌细胞活力增加。对心肌细胞线粒体呼吸功能进行检测发现, 代表线粒体呼吸效率的 RCR 在 LPS 处理后下降, 加入 SDH 抑制剂后则出现明显的上升。同时, 加入 DMM 后心肌细胞的非线粒体呼吸和标志线粒体功能受损的 C I Leak 呼吸明显减少, 说明抑制 SDH 活性可以减轻脓毒性心肌病线粒体呼吸功能障碍。这些结果表明在脓毒性心肌病时

ZIP7 可能通过增加 SDH 活性来对心肌造成损伤。

HIF-1 α 是一种氧感应转录调节因子,有研究显示琥珀酸和 SDH 活性对巨噬细胞 HIF-1 α 有重要的调控作用^[14]。HIF-1 α 可以调节 NLRP3 炎症小体的激活^[23]。NLRP3 炎症小体是目前研究较为深入的炎症小体,现已被证实在炎症、神经退行性疾病、肿瘤、糖尿病和肥胖等中具有重要意义^[24-25]。其 LRR 区域作为 DAMPs 和 PAMPs 的传感器触发 NACHT 区域分解 ATP 激活 NLRP3 蛋白,激活的 NLRP3 通过 PYD-PYD 与衔接蛋白 ASC 相连,而 ASC 的另一端 CARD 结构域可募集 Pro Caspase-1 结合,以促进 Caspase-1 的二聚化和激活。激活后的 Caspase-1 可以剪切 IL-1 β 前体形成 IL-1 β 成熟体,从而促进炎症表达以及细胞焦亡^[26-28]。本研究的结果显示,脓毒性心肌病发生时,HIF-1 α 表达增加,NLRP3 炎症小体增加,但当敲除 ZIP7 后,HIF-1 α 表达降低,NLRP3 炎症小体减少。表明 ZIP7 通过 SDH/HIF-1 α /NLRP3 信号通路的调节导致心肌损伤。

综上所述,本研究首次证实脓毒性心肌病时,ZIP7 对 SDH 活性的影响,并证实锌转运体 ZIP7 通过 SDH/HIF-1 α /NLRP3 信号通路的调节导致心肌损伤。

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] 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.
- [3] HASEGAWA D, ISHISAKA Y, MAEDA T, et al. Prevalence and prognosis of sepsis-induced cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Intensive Care Med*, 2023, 38(9): 797-808.
- [4] ROMERO-BERMEJO F J, RUIZ-BAILLEN M, GIL-CEBRIAN J, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2011, 7(3): 163-183.
- [5] WESSELS I, MAYWALD M, RINK L. Zinc as a gatekeeper of immune function[J]. *Nutrients*, 2017, 9(12): 1286.
- [6] ALKER W, HAASE H. Zinc and sepsis[J]. *Nutrients*, 2018, 10(8): 976.
- [7] ZHANG H, YANG N, HE H, et al. The zinc transporter ZIP7 (Slc39a7) controls myocardial reperfusion injury by regulating mitophagy[J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 54.
- [8] YANG N, ZHANG R, ZHANG H, et al. ZIP7 contributes to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy by suppressing mitophagy in mouse hearts[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2024, 23(1): 399.
- [9] SHEKHOVA E. Mitochondrial reactive oxygen species as major effectors of antimicrobial immunity[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(5): e1008470.
- [10] MILLS E L, KELLY B, LOGAN A, et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 457-470.e13.
- [11] AZZIMATO V, CHEN P, BARREBY E, et al. Hepatic miR-144 drives fumarate activity preventing NRF2 activation during obesity[J]. *Gastroenterology*, 2021, 161(6): 1982-1997.
- [12] CHOUCANI E T, PELL V R, GAUDE E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS[J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 431-435.
- [13] MANICKAM R, TUR J, BADOLE S L, et al. Nampt activator P7C3 ameliorates diabetes and improves skeletal muscle function modulating cell metabolism and lipid mediators[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(2): 1177-1196.
- [14] SANGINETO M, CIARNELLI M, CASSANO T, et al. Metabolic reprogramming in inflammatory microglia indicates a potential way of targeting inflammation in Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2023, 66: 102846.
- [15] BAE J, SALAMON R J, BRANDT E B, et al. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration[J]. *Circulation*, 2021, 143(20): 1973-1986.
- [16] WANG Y, TAO H, TANG W, et al. Succinate level is increased and succinate dehydrogenase exerts forward and reverse catalytic activities in lipopolysaccharides-stimulated cardiac tissue: the protective role of dimethyl malonate[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 940: 175472.
- [17] HOLLENBERG S M, SINGER M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(6): 424-434.
- [18] YAMASAKI S, SAKATA-SOGAWA K, HASEGAWA A, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger[J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(4): 637-645.
- [19] HASAN R, RINK L, HAASE H. Zinc signals in neutrophil granulocytes are required for the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Innate Immun*, 2013, 19(3): 253-264.
- [20] WESSELS I, COUSINS R J. Zinc dyshomeostasis during polymicrobial sepsis in mice involves zinc transporter Zip14 and can be overcome by zinc supplementation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(9): G768-G778.
- [21] KAMBE T, TAYLOR K M, FU D. Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100320.
- [22] WU Q R, YANG H, ZHANG H D, et al. IP3R2-mediated Ca²⁺ release promotes LPS-induced cardiomyocyte pyroptosis via the activation of NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10: 91.
- [23] ZHONG B, SUN S, TAN K S, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α activates the NLRP3 inflammasome to regulate epithelial differentiation in chronic rhinosinusitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, 152(6): 1444-1459.e14.
- [24] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 550-559.
- [25] ANDERSON F L, BIGGS K E, RANKIN B E, et al. NLRP3 inflammasome in neurodegenerative disease[J]. *Transl Res*, 2023, 252: 21-33.
- [26] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [27] TOLDO S, MEZZAROMA E, BUCKLEY L F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 236: 108053.
- [28] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141-1160.