



6周热量限制通过调控SIRT3改善脂多糖引起的脓毒症心肌病*

张铭宸¹⁾ 张 慧²⁾ 李婷婷³⁾ 陈明华¹⁾ 王孝文¹⁾ 孙忠广^{1)**}

¹⁾ 山东第二医科大学康复医学院, 潍坊 261053; ²⁾ 山东省公共卫生临床中心康复医学科, 济南 250132;

³⁾ 苏州大学附属第四医院康复医学科, 苏州 215000)

摘要 目的 本实验旨在探究热量限制 (caloric restriction, CR) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 所诱导的脓毒症心肌病 (septic cardiomyopathy, SCM) 预防效果, 并探索 CR 发挥心肌保护作用的机制, 为 SCM 的预防提供新的策略和理论依据。**方法** 48 只 8 周龄的 20~25 g 雄性 C57BL/6 小鼠, 随机分成 4 组, 分别为: CON 组、LPS 组、CR 组和 CR+LPS 组, 每组 12 只。CR 组与 CR+LPS 组适应性喂养 2 周后计算每只小鼠的进食量, 第 1 周的 CR 设置为限制前的 80%, 后 5 周限制为 60%。6 周 CR 干预后, 4 组小鼠腹腔注射等量的生理盐水或 LPS (10 mg/kg), 12 h 后测试心功能, 然后取心脏和血液。ELISA 测定血清炎症因子水平; 全自动生化仪测定血清心肌酶谱; 心肌组织切片分别做 HE 染色和免疫荧光染色; Western blot 检测心肌组织炎症因子 (TNF- α 、IL-9、IL-18)、氧化应激因子 (iNOS、SOD2)、凋亡相关因子 (Bax/Bcl-2 比值、CASP3) 和 SIRT3/SIRT6 的表达水平。**结果** LPS 注射后 12 h, EF 和 FS 值显著下降, LVESD 值显著升高; CR 干预能够明显增加 EF 和 FS 值, 降低 LVESD。形态学和血液指标 (AST、LDH、CK 和 CK-MB) 显示 LPS 注射能够造成心肌形态结构紊乱和心肌损伤, 6 周 CR 能够预防上述心肌损伤。LPS 注射可显著增加小鼠循环炎症水平 (IL-1 β 、TNF- α), 免疫荧光和 Western blot 发现 LPS 注射显著上调心肌组织炎症相关蛋白 (TNF- α 、IL-9、IL-18)、氧化应激相关蛋白 (iNOS、SOD2) 和凋亡相关蛋白 (Bax/Bcl-2 比值、CASP3) 的表达。6 周 CR 干预能够显著降低循环炎症水平, 下调心肌组织炎症、氧化应激和促凋亡相关蛋白的表达。此外, LPS 注射显著下调了小鼠心肌组织 SIRT3 和 SIRT6 蛋白的表达, 且 CR 干预可恢复 SIRT3 蛋白的表达。**结论** 6 周 CR 能够预防 LPS 造成的 SCM, 包括心功能下降、心肌结构损伤、炎症、氧化应激和凋亡, 其机制可能与调节心肌 SIRT3 表达相关。

关键词 热量限制, 脂多糖, 脓毒症心肌病, 心肌炎症, SIRT3

中图分类号 Q418, R331

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0239

据《The Lancet》杂志最新报道, 脓毒症影响了全球 3 100 万人, 每年导致 500 万人死亡^[1]。脓毒症引起的心肌损伤是其最常见且最严重的并发症, 有 10%~70% 的脓毒症患者伴有心肌损伤, 可导致心功能障碍和恶性心律失常, 死亡率在 70%~90% 之间, 是脓毒症死亡的主要原因之一^[2-3]。脓毒症心肌病 (septic cardiomyopathy, SCM) 的发病与氧化应激、炎症、心肌细胞凋亡和线粒体功能障碍等诸多因素有关^[4]。然而, 脓毒症心肌损伤的具体发病机制错综复杂且高度异质性, 至今尚未阐明。截至目前, 仍未建立有效的药物治疗方案来防治脓毒症诱发的心肌病, SCM 患者主要通过液

体复苏、正性肌力药物和血管加压药来控制感染和改善血流动力学^[5]。因此, 迫切需要寻找脓毒症有效的治疗方法, 解决脓毒症引起的心脏功能障碍和致命性心律失常。

热量限制 (caloric restriction, CR) 又称为能量限制, 是指在不造成营养不良的前提下, 限制机体摄入的总热量, 将食物摄入量减少每日能量需求

* 山东省自然科学基金 (ZR2022QH094) 和山东省大学生创新创业训练计划 (S202310438041S) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0536-8462371, E-mail: sunzhongguang@outlook.com

收稿日期: 2024-06-02, 接受日期: 2024-10-29

的25%~50%的饮食方式^[6]。迄今为止,CR已被重复证明可以降低心血管疾病、糖尿病、癌症和脑萎缩的发病率,以延长无脊椎动物和脊椎动物(包括哺乳动物)的寿命^[7]。Mitchell等^[8]的研究表明,CR对心血管的保护效果与限食强度和持续时间相关,与饮食构成无关,CR强度越大,持续时间越长效果越明显。因此,开发CR的相关疗法可能为SCM的治疗提供新的机会。

Sirtuins (SIRT) 由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性酶家族组成,在哺乳动物中含有7个成员(SIRT1~7)^[9]。其中,SIRT3被认为是线粒体代谢和抗氧化反应的重要调节因子,其主要定位于线粒体基质。SIRT3活性的调节近年来已被提议作为改善SCM、心衰等相关心脏功能紊乱的潜在治疗靶点^[10]。目前已知心血管疾病中SIRT3的作用包括:增加心肌细胞的线粒体功能,并通过使其底物去乙酰化来增加能量产生;通过抑制AKT/mTOR、ERK1/2、TGF- β /Smad3和激活GSK-3 β 以抑制心肌纤维化;直接抑制心肌细胞凋亡;消除活性氧类(ROS)并激活线粒体自噬以抑制心脏重塑等^[11-12]。此外,Sirtuins家族中SIRT6也与心脏功能密切相关,在心血管疾病中可改善血脂异常、细胞衰老和左心室肥大等^[13-14]。在抵御氧化应激的过程中SIRT6与SIRT3之间存在着动态平衡,SIRT6通过上调依赖核因子红细胞2相关因子2(Nrf2)的转录活动,间接促进SIRT3基因的表达,从而保护心肌细胞免受氧化应激诱导的损伤^[15]。因此,SIRT家族可能是心血管疾病中有前景的治疗靶点。

目前热量限制对脓毒症心肌损伤的作用和SIRT家族在其中的机制尚不清楚,因此本研究探究CR是否保护脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的SCM及SIRT3、SIRT6在其中发挥的作用,为防治SCM相关药物的研究和临床应用提供基础理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8周龄的20~25 g雄性C57BL/6小鼠,SPF级饲养,每笼4~6只,白天光照12 h,夜间12 h,自由饮水,温度恒定25°C。由山东第二医科大学医学实验动物中心提供并饲养,所有的动物实验方案由山东第二医科大学动物保护和实验委员会批准(2021SDL503)。48只小鼠被随机分成4组,每组12只,分别为:CON组、LPS组、CR组和CR+

LPS组。CON组、LPS组小鼠正常饮食,CR组与CR+LPS组小鼠进行6周的CR干预,6周CR干预后,4组小鼠注射LPS或等量的生理盐水。

1.2 LPS注射方案

称量10 mg的LPS粉剂(Sigma, L6529),使用生理盐水稀释为1 g/L浓度的溶液。LPS组和CR+LPS组小鼠腹腔注射LPS,注射1次,注射剂量为10 mg/kg体重,其余组小鼠注射等量的生理盐水^[16]。LPS注射12 h后测试小鼠心功能,然后进行取材。

1.3 CR方案

参考既往研究^[17-18]设计了CR方案。计算小鼠每日进食量的步骤是:称量每笼小鼠前一日与后一日相同时间的饲料重量,连续测试1周,可得出每笼小鼠每日的平均进食量。正式实验前,CR组与CR+LPS组先正常喂养2周,同时计算每笼小鼠的进食量,随后进行6周的CR干预。在CR干预期间,为防止小鼠出现不适,第1周的CR设置为限制前平均进食量的80%,后5周限制为60%。根据CON组所记录的平均进食量,每周调整1次CR组与CR+LPS组的进食量。同时每周称量1次体重并记录。

1.4 超声心动图

异氟醚麻醉小鼠,取仰卧位固定,胸腹部脱毛,应用高分辨小动物超声成像系统(Vevo, 3100)测试小鼠心脏收缩与舒张情况,并测定相关心功能指标,取心脏M型超声图像进行测定,包括射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)、左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、和左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)。以下公式用于计算EF比值: $EF\% = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100\%$ 。

1.5 血清测试

超声测试后进行小鼠眼球取血,静置6 h后进行离心(4°C、2 000 rpm/min、2 min),取上清备用。通过酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清炎症因子水平:肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)。通过全自动生化仪测定心肌损伤指标(血清心肌酶谱):天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,

LDH) 和肌酸激酶同工酶 (creatine kinase isoenzyme, CK-MB)。

1.6 心肌组织HE染色

取部分小鼠心脏放入4%的多聚甲醛溶液中固定, 后进行石蜡包埋、切片和组织学实验。通过苏木素和伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色查看心肌细胞的形态结构情况, 步骤依次为脱蜡至水、苏木素染色、伊红染色、脱水封片、显微镜镜检。

1.7 Western blot

称量适量心脏组织, 进行组织匀浆、裂解和离心后提取蛋白质, BCA法进行蛋白浓度测定。后进行Western blot实验, 检测的蛋白质包括: TNF- α 、IL-6、IL-9、IL-18、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase gene, iNOS)、超氧化物歧化酶2 (superoxide dismutase 2, SOD2)、SIRT3和SIRT6。具体步骤包括蛋白质上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗和化学发光显影。最后使用Image J软件分析条带灰度值。

1.8 免疫荧光染色

切片依次浸泡于二甲苯、梯度无水乙醇, 最后用水漂洗。将切片置于微波炉中, 加入适量的EDTA修复液修复10 min, 冷却至室温。先后进行5%BSA封闭、一抗4℃湿盒孵育过夜、二抗37℃孵育1 h、抗荧光淬灭封片剂 (含DAPI) 封片、正置荧光显微镜观察并拍照。

1.9 统计学分析

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表

示, 采用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析。组间采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CR干预对小鼠体重等基础参数的影响

适应性喂养和6周CR干预期间的体重如图1所示, 0~2周为适应性喂养, 4组小鼠体重没有差异性; 2~8周为正式CR干预, CR干预小鼠的体重逐渐下降, 且相比对照组具有显著差异性 ($P<0.001$)。

6周CR后注射LPS或等量的生理盐水, 对期间和之后取材的基础参数进行统计 (表1)。注射LPS或生理盐水前CON组和CR组体重没有差异性, 注射LPS或等量生理盐水后, LPS组体重变化显著大于CON组 ($P<0.05$); CR组体重变化增加, 较CON组体重变化有显著差异 ($P<0.001$); CR+LPS组体重下降幅度小于LPS组, 差异显著 ($P<0.001$)。此外, LPS组和CR组心脏质量指数 (heart weight/body weight, HW/BW) 显著低于CON组 ($P<0.01$)。LPS组、CR组和CR+LPS组之间的HW/BW比值没有显著差异性。CR组相较于CON组小鼠附睾脂肪重量显著降低 ($P<0.001$); CR+LPS组相较于LPS组附睾脂肪含量同样显著降低 ($P<0.001$)。表明6周饮食限制对体重、HW/BW比值和附睾脂肪含量影响显著。

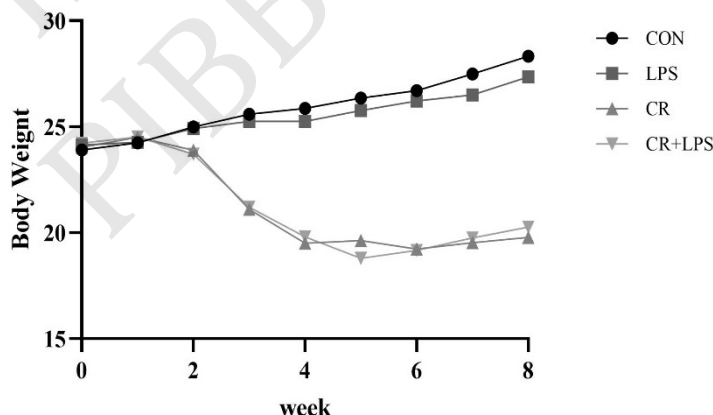


Fig. 1 Results of weekly weight changes in mice

Table 1 Parameters results of mice

Basic parameters	CON	LPS	CR	CR+LPS
BW before LPS injection/g	28.33±1.69	27.36±1.67	18.97±5.33***	19.02±4.4###
BW after LPS injection/g	26.58±1.51	24.92±1.38*	19.18±5.82***	18.93±4.24###
ΔBW/g	1.75±0.5	2.58±0.48*	-0.5±1.59***	0.25±0.80###
HW/BW/ (mg·g ⁻¹)	5.63±0.52	4.72±0.53***	4.61±1.37**	4.48±1.09
Epididymal fat/mg	351.39±66.08	315.18±65.50	99.58±49.04***	106.71±41.00###

Notes: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON; # $P<0.05$, ### $P<0.01$, #### $P<0.001$ vs LPS. BW: body weight; HW: heart weight.

2.2 CR干预预防LPS诱导的小鼠心功能下降

LPS注射后12 h, 对4组小鼠进行心功能测试。结果如图2所示, LPS组小鼠 EF 和 FS 比值相比CON组显著下降 ($P<0.001$), $LVEDD$ 没有显著变化, 但 $LVESD$ 显著升高 ($P<0.01$), 表明LPS注

射导致小鼠心脏收缩功能下降, 且主要是因为左心室收缩末期内径增加引起的。CR组小鼠心功能指标相比CON组无明显变化。CR+LPS组小鼠 EF 和 FS 比值较LPS组显著升高 ($P<0.001$), $LVEDD$ 没有显著变化, 但 $LVESD$ 显著下降 ($P<0.001$)。

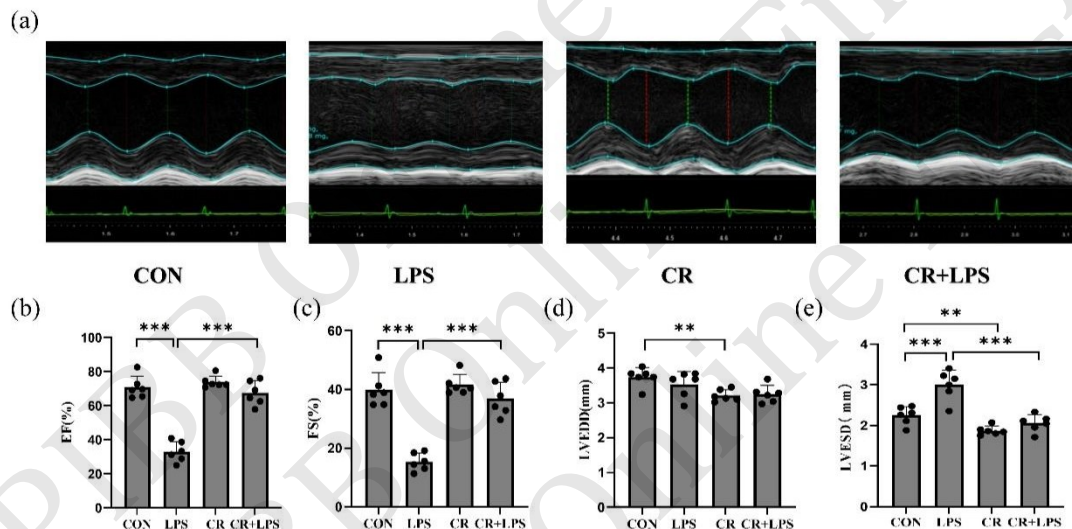


Fig. 2 Effects of 6-week CR intervention and LPS on cardiac function in mice

(a) Echocardiographic results; (b) EF value; (c) FS value; (d) $LVEDD$ value; (e) $LVESD$ value. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=6$.

2.3 CR干预预防LPS诱导的小鼠心肌损伤

对4组小鼠心肌组织分别进行HE染色, 结果如图3a所示。CON组心肌细胞形状清晰、排列有序, CR组相比CON组没有显著差异; 而LPS组心肌细胞形态紊乱, 较多炎症细胞浸润, 心肌纤维紊乱; CR+LPS组心肌细胞形态和纤维排列明显改善, 提示CR处理减弱了LPS组心肌结构受损程度。

对小鼠血清中心肌酶谱进行检测, 结果如图3b所示, LPS组小鼠心肌较CON组AST、LDH、CK-MB含量明显上升 ($P<0.05$), CK含量有上升趋势, 但无显著差异性。CR+LPS组较LPS组LDH、CK、CK-MB含量下降 ($P<0.05$), AST水平无明显差异。

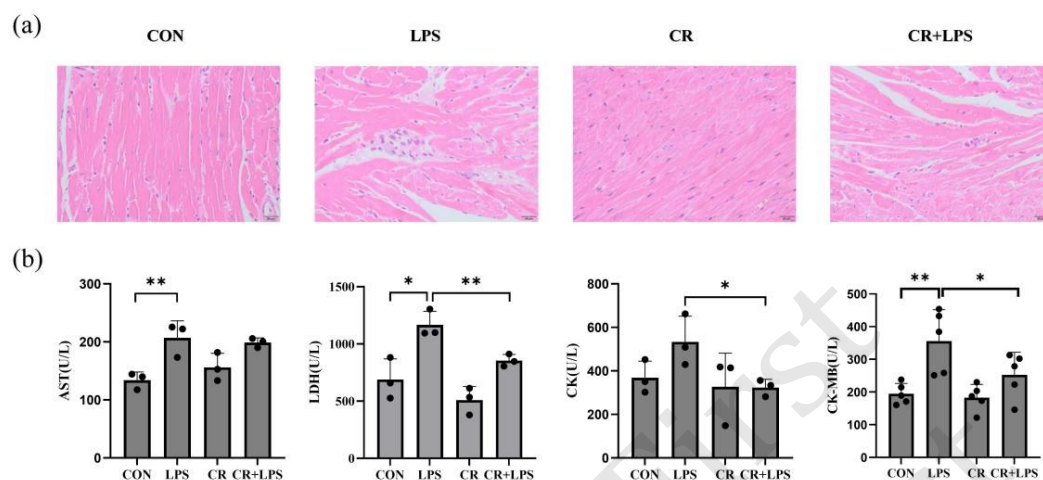


Fig. 3 Results of the myocardial injury test

(a) HE staining ($\times 500$); (b) serum levels of AST, LDH, CK, and CK-MB. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n \geq 3$.

2.4 CR干预预防LPS诱导的小鼠循环炎症和心肌炎症

检测小鼠血清中炎症指标的含里, 结果如图4a所示, LPS组较CON组TNF- α 、IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.01$), 而CR+LPS组较LPS组TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低 ($P < 0.01$).

通过Western blot检测各组TNF- α 、IL-9、IL-18蛋白表达含量, 如图4b, c所示, LPS组较CON组TNF- α 、IL-9和IL-18蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); CR+LPS组较LPS组TNF- α 、IL-9和IL-18蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$). 同时, 小鼠心脏切片免疫荧光结果提示, 在注射LPS 12 h后, 巨噬细胞和心肌细胞有明显的IL-18阳性表达 (图4d), 提示IL-18由巨噬细胞表达和释放, 且心肌细胞凋亡也会释放IL-18, 进而损害心肌细胞^[19-20].

2.5 CR干预预防LPS诱导的小鼠心肌氧化应激

通过Western blot检测各组氧化应激相关蛋白(SOD2、iNOS)的表达变化, 如图5所示, LPS组较CON组SOD2蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), iNOS蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); CR组较CON组iNOS蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); CR+LPS组较LPS组SOD2蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),

iNOS蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$).

2.6 CR干预预防LPS诱导的小鼠心肌细胞凋亡

如图6所示, 通过Western blot分析了心肌组织凋亡标志物的蛋白表达。结果表明, LPS注射导致小鼠心肌促凋亡蛋白表达(Bax、CASP 3)显著上调, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调, Bax/Bcl-2比值显著升高 ($P < 0.05$), 单纯的CR干预对小鼠凋亡蛋白的表达没有影响。但6周的CR干预可以抑制LPS注射诱导的小鼠心肌促凋亡蛋白的上调 ($P < 0.01$), 起到预防小鼠心肌细胞凋亡的作用。

2.7 CR预防LPS诱导的小鼠心肌SIRT3蛋白表达下降

由于SIRT家族成员(SIRT3、SIRT6)对心脏的有益作用, 因此为进一步探究CR预防心肌损伤是否依赖于SIRT3、SIRT6, 通过Western blot检测SIRT3、SIRT6蛋白表达情况。如图7所示, CR组小鼠较CON组SIRT3蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), SIRT6无显著差异性; LPS组较CON组SIRT3和SIRT6蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); CR+LPS组较LPS组SIRT3蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), SIRT6蛋白表达无显著差异性。

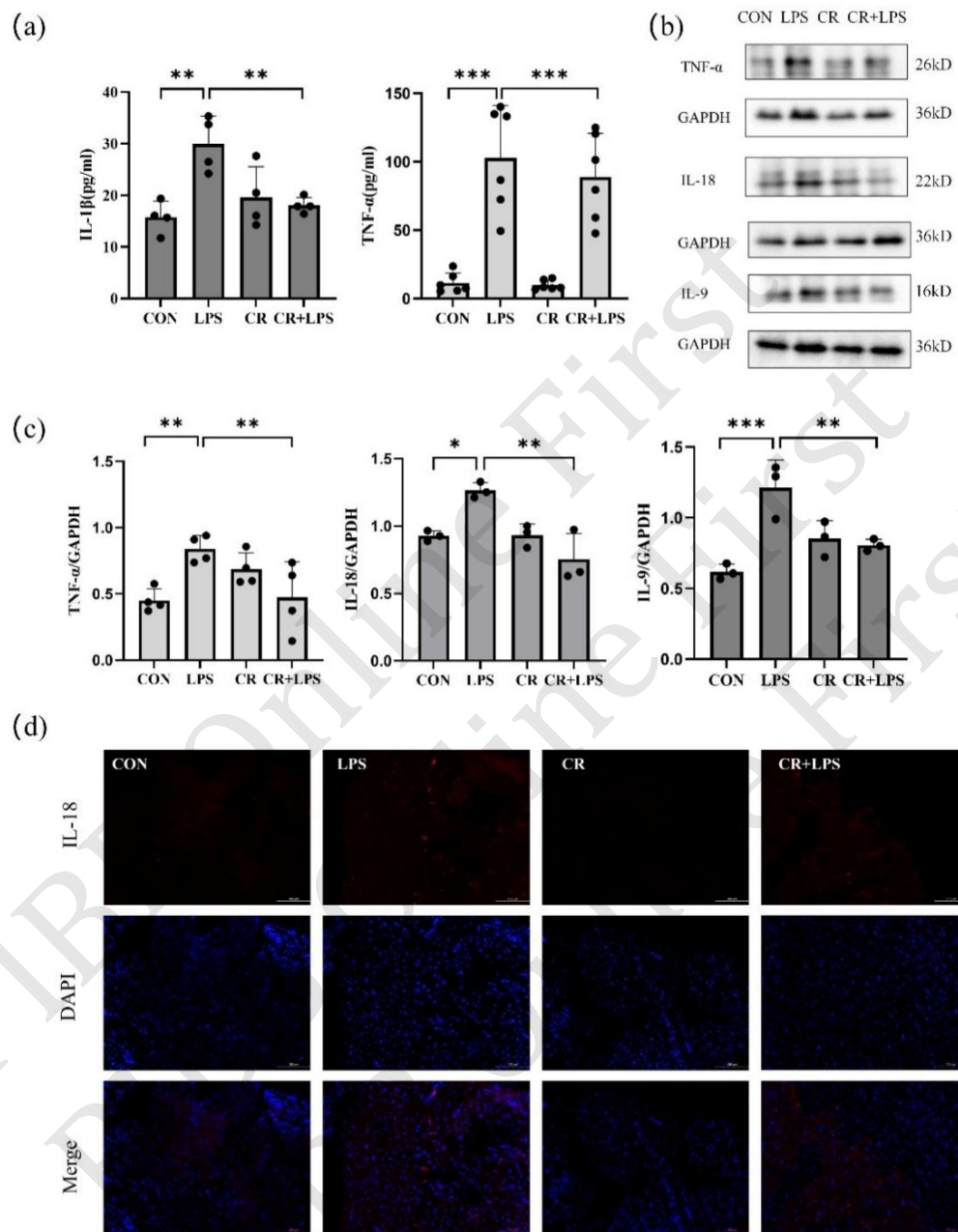


Fig. 4 Results of circulatory inflammation and myocardial inflammation

(a) Serum levels of IL-1 β and TNF- α ; (b) Western blot detection of the expression of inflammation-related proteins in myocardial tissue; (c) expression of TNF- α , IL-9, IL-18 proteins in myocardial tissue; (d) immunofluorescence detection of IL-18 expression in myocardial tissue ($\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n \geq 3$.

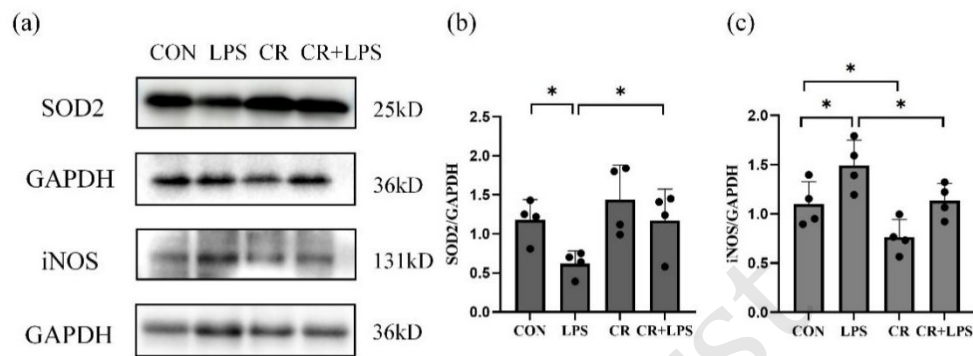


Fig. 5 Western blot detection of oxidative stress-related protein expression in myocardial tissue

(a) Western blot detection of the expression of oxidative stress-related proteins in myocardial tissue; (b) SOD2 protein expression; (c) iNOS protein expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 4$.

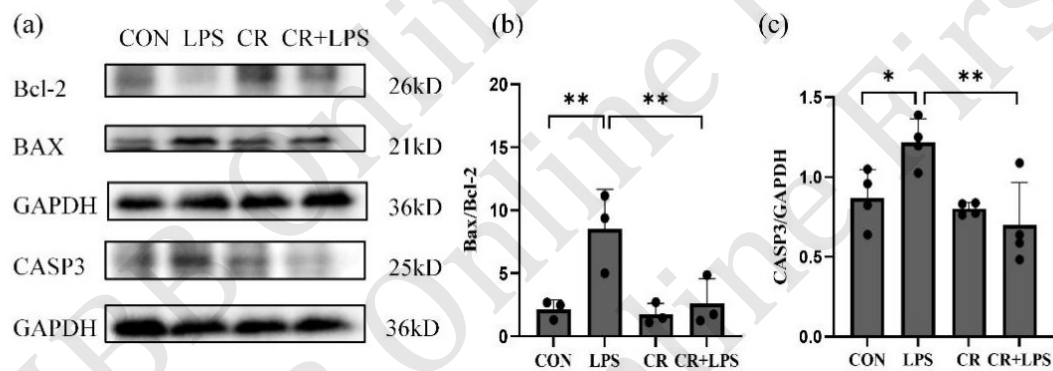


Fig. 6 Western blot detection of the expression of apoptosis-related proteins in myocardial tissue

(a) Western blot detection of the expression of apoptosis-related proteins in myocardial tissue; (b) expression of Bax/Bcl-2; (c) expression of CASP3 protein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n \geq 3$.

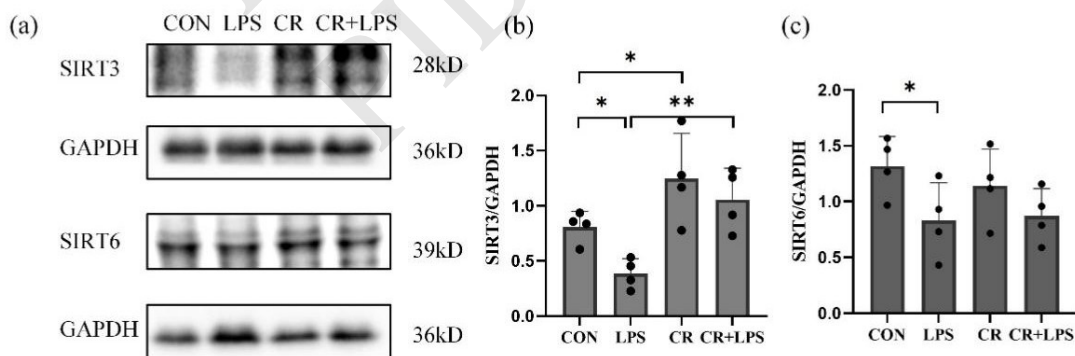


Fig. 7 Western blot detection of SIRT3 and SIRT6 protein expression in myocardial tissue

(a) Western blot detection of SIRT3 and SIRT6 protein expression; (b) SIRT3 protein expression; (c) SIRT6 protein expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 4$.

3 讨论

脓毒症引起的心肌损伤被视为导致脓毒症患者死亡的重要原因, LPS应用在动物模型中可模拟脓毒症对心脏收缩力的有害影响, 包括钙处理异常、ATP合成中断、内质网应激和自噬, 导致心肌电生理功能障碍, 钙稳态严重失衡, 最终引起脓毒症期间心肌收缩和舒张功能障碍^[21]。在本研究中, 对LPS组小鼠超声检测发现其EF、FS、LVESD等心功能指标与CON相比具有显著差异, 具有SCM的典型表现即左心室收缩力降低^[21]。此外, 我们也发现LPS组小鼠心脏存在明显的形态学改变, 表明本研究中SCM动物模型成立。脓毒症心肌损伤发生后, 患者几乎不可能再恢复到病前的健康状态, 因此可以尝试通过预防的手段, 减少脓毒症心肌损伤的发生, 改善患者预后。CR被认为是缓解心血管疾病的有效手段, 研究表明, 6周的70%CR显著减小了心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤后老年小鼠的心肌梗死面积, 恢复了心肌能量代谢^[17]。临床证据表明, 心衰患者应用CR可以有效增加峰值VO₂等, 改善患者心肺功能^[22]。而本研究观察到CR+LPS组较LPS组体重下降减轻, 心功能指标明显提升, 形态学变化改善, 表明6周CR有效减轻心肌损伤, 改善心功能。

研究表明, 脓毒症发生时, 机体可产生大量促炎因子(如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等)和血管紧张素II(angiotensin II, Ang II), 最终引起巨噬细胞反应^[23]。既往研究发现12个月40%CR可减弱I/R大鼠心肌炎症反应^[24]。而本研究通过相关检测发现6周CR处理后较模型组血清中IL-1 β 、TNF- α 表达水平及心肌IL-9、TNF- α 、IL-18等相关炎症因子均有所降低, 这表明6周60%CR可有效抑制SCM中循环和心肌炎症反应。但在SCM中, 炎症激活与许多的信号通路相关, 具体机制尚不明确。有研究证实TLR4/NF- κ B是心肌炎症诱导的关键信号通路^[25]。Su等^[26]证明, 使用TLR4抑制剂Esculin显著减少了脓毒症心脏中炎症细胞的产生以及炎性细胞因子的释放。而Wang等^[27]研究指出, SIRT3可通过TLR4/SIRT3通路调节LPS诱导的内皮细胞氧化应激和线粒体紊乱, 从而抑制促炎介质。此外, 已有研究发现SIRT3缺陷加剧了Ang II诱导促炎因子的产生, 而SIRT3-FXN轴可能通过增加巨噬细胞胞吞作用和抗炎活性来抑制心脏炎症^[28]。SIRT3在人和大鼠心肌细胞中的过表达同

样抑制了TNF- α 诱导的炎症和促纤维化反应^[29]。与以上结果类似, 本研究中CR+LPS组相较于单纯LPS组表现出更高的SIRT3表达, 这揭示了SIRT3在CR对心脏保护作用中是不可或缺的, 提示CR可能从SIRT3途径控制LPS导致的心肌炎症。

线粒体功能障碍是脓毒症心肌损伤的关键胞内损伤信号, 在发病机制中占据主要地位, 导致体内ROS和氧化应激水平升高, 甚至引起心肌细胞凋亡, 进而加速SCM发展^[30]。研究表明, LPS处理可以使心肌细胞线粒体呼吸减少, 线粒体氧化应激增加^[30]。而SCM中, 当氧化应激程度明显上调时, iNOS表达增高, 而SOD水平降低^[31]。与之相应, 本实验中通过相关检测发现LPS处理后心肌iNOS表达升高, SOD2表达降低, 提示LPS诱导的心肌损伤出现明显的氧化应激反应。已有临床实验证实CR可增强人体血液中抗氧化系统的活性^[32]。本研究同样发现CR恢复了LPS抑制的心肌抗氧化酶SOD2的表达, 减轻了氧化应激因子iNOS表达。且我们在心肌中观察到SOD2和SIRT3表达之间存在正相关^[33]。研究表明, SIRT3蛋白的表达和活性降低, 促进了肝细胞线粒体SOD2乙酰化, 从而降低了其活性, 促进线粒体ROS的产生^[34]。SIRT3/SOD2信号通路是细胞内源性抗氧化系统的重要通路, 激活SIRT3/SOD2号通路可抑制铁死亡, 改善阿霉素介导的人和大鼠的心肌毒性^[35]。且SIRT3可调节整体线粒体赖氨酸乙酰化^[36], 增强内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活性以加强抗氧化和保持线粒体功能^[37-38]。这些结果都提示CR可通过增强SIRT3/SOD2等途径的表达以响应心肌线粒体损伤及氧化应激。

SCM中细胞凋亡机制与Bcl-2介导的内源性抗凋亡途径和CASP3-8/Bid/t-Bid/CASP3-9外源性促凋亡途径的失调相关^[39]。之前的研究表明, CR减轻了衰老性心肌病中的细胞凋亡和纤维化^[40]。本研究结果显示, 与模型组比较, CR可显著降低LPS作用下心肌Bax/Bcl-2比值、CASP3蛋白的表达, 减缓心肌凋亡。由于线粒体凋亡信号通路属于细胞内源性凋亡, SIRT3定位于线粒体中, 因此与细胞凋亡密切相关。如前所述, SIRT3可以通过调节氧化应激来抑制细胞凋亡。此外, Qin等^[41]在体内研究中发现, 膜联蛋白-A1短肽(ANXA1sp)可促进SIRT3和Bcl-2的表达, 抑制Bax的表达, 继而抑制LPS诱导的心肌细胞凋亡, 然而, SIRT3

敲除后, ANXA1sp的抗凋亡作用明显减弱。与其结果相似, 本实验中使用CR预处理观察发现SIRT3表达升高, 逆转了LPS诱导的心肌细胞凋亡, 表明CR对脓毒症心肌细胞凋亡的改善可能是上调SIRT3信号介导的。现有研究提出SIRT3可通过多种途径抑制细胞凋亡: 首先, SIRT3可去乙酰化并激活视神经萎缩蛋白1 (OPA1), OPA1的丧失会损害线粒体融合, 增加细胞对凋亡的敏感性^[42-43]; 其次, SIRT3去乙酰化激活Ku70, 激活的Ku70与Bax结合, 从而抑制Bax诱导的心肌细胞凋亡^[44]; SIRT3还可介导环孢素D去乙酰化并关闭线粒体通透性转换孔 (mPTP), 以维持线粒体的正常形态, 从而抑制细胞凋亡^[45]。这提示SIRT3对脓毒症心肌细胞凋亡的改善可能是多途径介导的, 但需要更多研究进一步完善。

此外, 在我们的实验中没有观察到CR导致明显的SIRT6改善。但Hernández-Saavedra等^[46]对4周龄大鼠进行6个月的25%CR, 发现其骨骼肌SIRT6表达增加。Wei等^[47]对7周龄小鼠进行4个月的40%CR, 没有发现肝脏中SIRT3、SIRT6增加。提示CR影响SIRT表达可能受饮食限制的强度、开始CR的年龄、作用部位和干预时间等诸多因素的影响。未来心血管疾病患者的干预措施应进一步考虑评估不同营养状态、不同心血管疾病分型、不同干预周期等多维度多因素热量限制的安全性和可行性, 以制定个性化的CR方案。

4 结论和局限

本研究初步表明6周CR干预可预防LPS所造成的脓毒症小鼠心肌损伤, 改善心肌的收缩能力, 减轻心肌炎症、氧化应激和凋亡, 且无明显心功能副作用。其改善作用可能依赖于SIRT3表达。同时阐述了热量限制和SIRT3保护心脏功能的机制, 为探讨SCM的相关药物开发治疗提供了理论依据。本研究也有一些局限。如仅进行了6周的短期CR干预, 未进行长期干预, 无法探究长期CR的预防效果; 未对CR干预后恢复饮食的情况进行实验设计, 不确定恢复饮食后CR的效益是否能够持续, 是否会出现报复性饮食而加剧病情; 本研究未进行更深入的机制和细胞实验, CR通过SIRT3途径预防LPS诱导的心肌损伤的证据略有不足。

参考文献

- [1] Li J, Sparkenbaugh E M, Su G, *et al.* Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate E to attenuate bacteria lipopolysaccharide-induced organ damage. *ACS Cent Sci*, 2020, **6**(7): 1199-1207
- [2] Tucker R V, Williams K, Theyyunni N, *et al.* Sepsis-induced cardiomyopathy detected with focused cardiac ultrasound in the emergency department. *J Emerg Med*, 2022, **63**(4): e91-e99
- [3] Zhu H, Zhang L, Jia H, *et al.* Tetrahydrocurcumin improves lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction by inhibiting oxidative stress and inflammation via JNK/ERK signaling pathway regulation. *Phytomedicine*, 2022, **104**: 154283
- [4] Chen Z S, Yu M M, Wang K, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit cardiomyocyte apoptosis and attenuate sepsis-induced cardiomyopathy. *Nutrition*, 2023, **106**: 111886
- [5] Taha A M, Mahmoud A M, Ghonaim M M, *et al.* Melatonin as a potential treatment for septic cardiomyopathy. *Biomedecine Pharmacother*, 2023, **166**: 115305
- [6] Napoleão A, Fernandes L, Miranda C, *et al.* Effects of calorie restriction on health span and insulin resistance: classic calorie restriction diet vs. ketosis-inducing diet. *Nutrients*, 2021, **13**(4): 1302
- [7] Colman R J, Anderson R M, Johnson S C, *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009, **325**(5937): 201-204
- [8] Mitchell S J, Mitchell G J, Mitchell J R. Modulation of frailty syndrome by diet: a review of evidence from mouse studies. *Mech Ageing Dev*, 2019, **180**: 82-88
- [9] Greiss S, Gartner A. Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells*, 2009, **28**(5): 407-415
- [10] Xin T, Lu C. SirT3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury. *Aging*, 2020, **12**(16): 16224-16237
- [11] Zhang J, Xiang H, Liu J, *et al.* Mitochondrial Sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*, 2020, **10**(18): 8315-8342
- [12] Cao M, Zhao Q, Sun X, *et al.* Sirtuin 3: emerging therapeutic target for cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*, 2022, **180**: 63-74
- [13] Ardestani P M, Liang F. Sub-cellular localization, expression and functions of Sirt6 during the cell cycle in HeLa cells. *Nucleus*, 2012, **3**(5): 442-451
- [14] Guo Z, Li P, Ge J, *et al.* SIRT6 in aging, metabolism, inflammation and cardiovascular diseases. *Aging Dis*, 2022, **13**(6): 1787-1822
- [15] Kanwal A, Pillai V B, Samant S, *et al.* The nuclear and mitochondrial sirtuins, Sirt6 and Sirt3, regulate each other's activity and protect the heart from developing obesity-mediated diabetic cardiomyopathy. *FASEB J*, 2019, **33**(10): 10872-10888
- [16] Liu Y, Li S, Rong W, *et al.* Podocyte-released migrasomes in urine

- serve as an indicator for early podocyte injury. *Kidney Dis*, 2020, **6** (6): 422-433
- [17] Guo Z, Wang M, Ying X, *et al.* Caloric restriction increases the resistance of aged heart to myocardial ischemia/reperfusion injury via modulating AMPK-SIRT₁-PGC_{1α} energy metabolism pathway. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 2045
- [18] Chen J, Zou C, Guan H, *et al.* Caloric restriction leading to attenuation of experimental Alzheimer's disease results from alterations in gut microbiome. *CNS Neurosci Ther*, 2024, **30**(7): e14823
- [19] Brunner A, Schuller S, Hettlich B, *et al.* Kinetics of plasma cytokines, angiopoietin-2, and C-reactive protein in dogs with gastric dilatation volvulus. *Front Vet Sci*, 2021, **8**: 652479
- [20] Shi H, Gao Y, Dong Z, *et al.* GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury. *Circ Res*, 2021, **129** (3): 383-396
- [21] Carbone F, Liberale L, Preda A, *et al.* Septic cardiomyopathy: from pathophysiology to the clinical setting. *Cells*, 2022, **11**(18): 2833
- [22] Billingsley H E, Hummel S L, Carbone S. The role of diet and nutrition in heart failure: a state-of-the-art narrative review. *Prog Cardiovasc Dis*, 2020, **63**(5): 538-551
- [23] 袁睿, 陈凤英. 从信号传导通路方面减轻脓毒症心肌损伤的研究进展. *中华急诊医学杂志*, 2023, **32**(7): 865-869
Yuan R, Chen F Y. *Chin J Emerg Med*, 2023, **32**(7): 865-869
- [24] Chandrasekar B, Nelson J F, Colston J T, *et al.* Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280**(5): H2094-H2102
- [25] Chen H, Liu Q, Liu X, *et al.* Berberine attenuates septic cardiomyopathy by inhibiting TLR4/NF- κ B signalling in rats. *Pharm Biol*, 2021, **59**(1): 121-128
- [26] Su Z, Gao M, Weng L, *et al.* Esculin targets TLR4 to protect against LPS-induced septic cardiomyopathy. *Int Immunopharmacol*, 2024, **131**: 111897
- [27] Wang X, Yao W, Wang M, *et al.* TLR4-SIRT3 mechanism modulates mitochondrial and redox homeostasis and promotes EPCs recruitment and survival. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, **2022**: 1282362
- [28] Gao J, Huang C, Kong L, *et al.* SIRT3 regulates clearance of apoptotic cardiomyocytes by deacetylating frataxin. *Circ Res*, 2023, **133**(7): 631-647
- [29] Palomer X, Román-Azcona M S, Pizarro-Delgado J, *et al.* SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 14
- [30] Haileselassie B, Mukherjee R, Joshi A U, *et al.* Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, **130**: 160-169
- [31] Bertozzi G, Ferrara M, di Fazio A, *et al.* Oxidative stress in sepsis: a focus on cardiac pathology. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(5): 2912
- [32] Golbidi S, Daiber A, Korac B, *et al.* Health benefits of fasting and caloric restriction. *Curr Diab Rep*, 2017, **17**(12): 123
- [33] Zhang Y, Yang X, Ge X, *et al.* Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice. *Biomed Pharmacother*, 2019, **109**: 726-733
- [34] Pi H, Xu S, Reiter R J, *et al.* SIRT3-SOD2-mROS-dependent autophagy in cadmium-induced hepatotoxicity and salvage by melatonin. *Autophagy*, 2015, **11**(7): 1037-1051
- [35] Liu X, Li D, Pi W, *et al.* LCZ696 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis via AKT/SIRT3/SOD2 signaling pathway activation. *Int Immunopharmacol*, 2022, **113**(PtA): 109379
- [36] Lombard D B, Alt F W, Cheng H L, *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(24): 8807-8814
- [37] Tseng A H H, Shieh S S, Wang D L. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 2013, **63**: 222-234
- [38] Someya S, Yu W, Hallows W C, *et al.* Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 2010, **143**(5): 802-812
- [39] Xu P, Zhang W Q, Xie J, *et al.* Shenfu injection prevents sepsis-induced myocardial injury by inhibiting mitochondrial apoptosis. *J Ethnopharmacol*, 2020, **261**: 113068
- [40] Yan L, Gao S, Ho D, *et al.* Calorie restriction can reverse, as well as prevent, aging cardiomyopathy. *Age (Dordr)*, 2013, **35**(6): 2177-2182
- [41] Qin S, Ren Y, Feng B, *et al.* Annexin-A1 short peptide alleviates septic myocardial injury by upregulating SIRT3 and inhibiting myocardial cell apoptosis. *Histol Histopathol*, 2024, **39**(7): 947-957
- [42] Signorile A, Santeramo A, Tamma G, *et al.* Mitochondrial cAMP prevents apoptosis modulating Sirt3 protein level and OPA1 processing in cardiac myoblast cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, **1864**(2): 355-366
- [43] Samant S A, Zhang H J, Hong Z, *et al.* SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol Cell Biol*, 2014, **34**(5): 807-819
- [44] Sundaresan N R, Samant S A, Pillai V B, *et al.* SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(20): 6384-6401
- [45] Sun W, Liu C, Chen Q, *et al.* SIRT3: a new regulator of cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, **2018**: 7293861
- [46] Hernández-Saavedra D, Moody L, Tang X, *et al.* Caloric restriction following early-life high fat-diet feeding represses skeletal muscle TNF in male rats. *J Nutr Biochem*, 2021, **91**: 108598
- [47] Wei X, Wei C, Tan Y, *et al.* Both prolonged high-fat diet consumption and calorie restriction boost hepatic NAD⁺ metabolism in mice. *J Nutr Biochem*, 2023, **115**: 109296

6-Week Caloric Restriction Improves Lipopolysaccharide-induced Septic Cardiomyopathy by Modulating SIRT3*

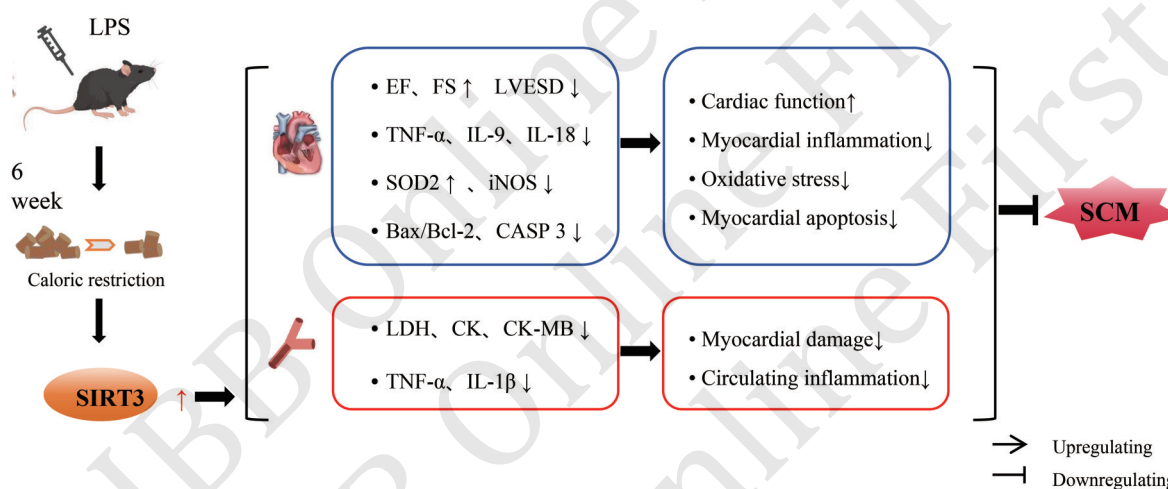
ZHANG Ming-Chen¹⁾, ZHANG Hui²⁾, LI Ting-Ting³⁾, CHEN Ming-Hua¹⁾,
WANG Xiao-Wen¹⁾, SUN Zhong-Guang^{1)**}

¹⁾School of Rehabilitation Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China;

²⁾Department of Rehabilitation Medicine, Shandong Public Health Clinical Center, Jinan 250132, China;

³⁾Department of Rehabilitation Medicine, Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The aim of this study was to investigate the prophylactic effects of caloric restriction (CR) on lipopolysaccharide (LPS)-induced septic cardiomyopathy (SCM) and to elucidate the mechanisms underlying the cardioprotective actions of CR. This research aims to provide innovative strategies and theoretical support for the prevention of SCM. **Methods** A total of forty-eight 8-week-old male C57BL/6 mice, weighing between 20 – 25 g, were randomly assigned to 4 distinct groups, each consisting of 12 mice. The groups were designated as follows: CON (control), LPS, CR, and CR+LPS. Prior to the initiation of the CR protocol, the CR and CR+LPS groups underwent a 2-week acclimatization period during which individual food consumption was measured. The initial week of CR intervention was set at 80% of the baseline intake, followed by a reduction to 60% for the subsequent 5 weeks. After 6-week CR intervention, all 4 groups received an intraperitoneal injection of either normal saline or LPS (10 mg/kg). Twelve hours post-injection, heart function was assessed, and subsequently, heart and blood samples were collected. Serum inflammatory markers were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The serum myocardial enzyme spectrum was analyzed using an automated biochemical instrument. Myocardial tissue sections underwent hematoxylin and eosin (HE) staining and immunofluorescence (IF) staining. Western blot analysis was used to detect the expression of protein in myocardial tissue, including inflammatory markers (TNF-α, IL-9, IL-18), oxidative stress markers (iNOS, SOD2), pro-apoptotic markers (Bax/Bcl-2 ratio, CASP3), and SIRT3/SIRT6. **Results** 12 hours after LPS injection, there was a significant decrease in ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) ratios, along with a notable

increase in left ventricular end-systolic diameter (*LVEDS*). Morphological and serum indicators (AST, LDH, CK, and CK-MB) indicated that LPS injection could induce myocardial structural disorders and myocardial injury. Furthermore, 6-week CR effectively prevented the myocardial injury. LPS injection also significantly increased the circulating inflammatory levels (IL-1 β , TNF- α) in mice. IF and Western blot analyses revealed that LPS injection significantly up-regulating the expression of inflammatory-related proteins (TNF- α , IL-9, IL-18), oxidative stress-related proteins (iNOS, SOD2) and apoptotic proteins (Bax/Bcl-2 ratio, CASP3) in myocardial tissue. 6-week CR intervention significantly reduced circulating inflammatory levels and downregulated the expression of inflammatory, oxidative stress-related proteins and pro-apoptotic level in myocardial tissue. Additionally, LPS injection significantly downregulated the expression of SIRT3 and SIRT6 proteins in myocardial tissue, and CR intervention could restore the expression of SIRT3 proteins. **Conclusion** A 6-week CR could prevent LPS-induced septic cardiomyopathy, including cardiac function decline, myocardial structural damage, inflammation, oxidative stress, and apoptosis. The mechanism may be associated with the regulation of SIRT3 expression in myocardial tissue.

Key words caloric restriction, lipopolysaccharide, septic cardiomyopathy, myocardial inflammation, SIRT3

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0239

* This work was supported by grants from Shandong Natural Science Foundation Youth Project (ZR2022QH094) and Shandong Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202310438041S).

** Corresponding author.

Tel: 86-536-8462371, E-mail: sunzhongguang@outlook.com

Received: June 2, 2024 Accepted: October 29, 2024