

网络出版时间: 2023-03-07 15:04:37 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1346.005.html>

ATRA 通过抑制铁死亡缓解脂多糖诱导的小鼠急性心肌损伤

但章勇¹, 束传林¹, 施晓蕊¹, 周青¹, 汪渊¹, 任梦飞², 王怡³, 朱华庆¹

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)对脂多糖(LPS)诱导C57BL/6小鼠急性心肌损伤的影响及机制。方法 20只C57BL/6雄性小鼠随机均分成正常组、模型组、ATRA组、ferrostatin-1组。ATRA组和ferrostatin-1组小鼠分别腹腔注射ATRA [15 mg/kg·d], ferrostatin-1 [2 mg/(kg·d)], 正常组和模型组给予溶剂, 持续给药一周后, 模型组、ATRA组、ferrostatin-1组腹腔注射LPS (6 mg/kg), 6 h后处死所有小鼠。检测小鼠血清中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量; qPCR检测心脏组织IL-6、TNF- α 的mRNA水平; 苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠心脏组织变化; 透射电子显微镜(TEM)观察小鼠心肌线粒体的结构; 蛋白质印迹法(Western blot)检测铁死亡标志物[谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、铁蛋白重链1(FTH1)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)]以及相关调控蛋白[核因子E2相关因子2(NRF2)、kelch样ECH关联蛋白1(KEAP1)]的表达。结果 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠血清中MDA含量上升、GSH含量下降、还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽的比值(GSH/GSSG)下降, ATRA组和ferrostatin-1组逆转以上变化; 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠心脏组织IL-6、TNF- α 的mRNA水平增高, 与模型组相比, ATRA组和ferrostatin-1组mRNA水平降低; 各组小鼠心肌组织HE染色无明显差异; TEM显示与正常组相比, 模型组心肌线粒体出现嵴减少或消失的现象, 与模型组相比, ATRA组和ferrostatin-1组心肌线粒体嵴数量增多; Western blot显示, 与正常组相比, 模型组小鼠心肌组织中GPX4、FTH1、SLC7A11、NRF2蛋白表达减少, ACSL4、KEAP1蛋白表达增加, ATRA组、ferrostatin-1组逆转以上变化。结论 ATRA通过抑制铁死亡缓解脂多糖引起的小鼠急性心肌损伤。

关键词 全反式维甲酸; 铁死亡; 核因子E2相关因子2; 脂多糖

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0373-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.005

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌的细胞壁成分, 临床上是脓毒症的主要诱因之一。据估计全球至少有1 900万患者患有脓毒血症, 仍然是人类健康的重大负担^[1]。心肌损伤是脓毒血症的重要特征, 包括炎症反应失调、氧化应激、线粒体损伤等^[2], 有研究^[3]表明脓毒血症造成的心肌损伤与铁死亡有关, 铁死亡是被提出的一种程序性细胞死亡模式, 铁死亡的主要机制是在二价铁和酯氧合酶的作用下发生芬顿反应, 催化细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化而产生次级代谢产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)等, 从而诱导细胞死亡; 此外, 还表现为抗氧化体系的核心酶谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的降低、细胞线粒体损伤等。许多器官损伤和退行性疾病由铁死亡引起的, 包括神经退行性疾病、急性肾功能衰竭、心脏缺血再灌注等, 病理条件下细胞发生铁死亡加速了疾病的发展, 通过抑制铁死亡的药物可以减轻细胞损伤和防止不可逆转的损伤, 在疾病的治疗上有巨大的潜力。

全反式维甲酸(all-*trans* retinoic acid, ATRA)是维生素A的中间代谢产物, 研究^[4]显示ATRA有抗氧化、抗细胞凋亡等多种生物活性。该实验以C57BL/6小鼠为研究对象, 腹腔注射LPS制备急性心肌损伤模型, 探究ATRA缓解小鼠急性心肌损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只8周龄的C57BL/6雄性小鼠购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 于安徽医科大学动物中心SPF级环境中饲养, 环境温度 20 ± 2 °C, 湿度40%~70%, 12 h光照12 h黑暗交替。所有实验动物的操作与饲养均符合安徽省实验动物中心管理饲养条例(伦理批号: LLSC20210825)。

1.1.2 实验试剂 4%的戊巴比妥钠由安徽医科大

2023-02-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82170484); 安徽省重点研究与开发项目(编号: 202004b11020025); 安徽高校自然科学基金重点项目(编号: KJ2021A0247)

作者单位: ¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 安徽医科大学分子生物学实验室, 合肥 230032

²安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

³安徽医科大学生命科学院生物工程系, 合肥 230032

作者简介: 但章勇, 男, 硕士研究生;

朱华庆, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydzhq@126.com;

王怡, 女, 讲师, 博士, 责任作者, E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn

学实验动物中心提供; ATRA、LPS、二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司; 铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 购自美国 Selleck 公司; MDA 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; RIPA 裂解液、谷胱甘肽(glutathione, GSH) 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 聚氧乙烯蓖麻油、2.5% 戊二醛固定液(电镜专用) 购自上海源叶生物科技有限公司; 多聚甲醛溶液购自北京兰杰柯科技有限公司; GPX4、胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、酰基辅酶 A 合成酶长链 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)、kelch 样 ECH 关联蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 抗体购自美国 Proteintech 公司; 铁蛋白重链 1(ferritin heavy chain 1, FTH1) 抗体购自成都正能生物; 山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 购自美国 Santa Cruz 公司; 逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自上海新贝生物科技有限公司。

1.1.3 实验仪器 透射电子显微镜 Talos L120C G2、酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 化学发光凝胶成像分析系统 ChemiDoc™ Touch Imaging System(美国 Bio-Rad 公司); -80 °C 冰箱(日本 SANYO 电器股份有限公司); 正置生物显微镜(德国 Leica 公司); pH 仪(上海雷磁仪器厂); 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 20 只 C57BL/6 雄性小鼠适应性喂养 1 周, 体质量(22 ± 2) g, 随机分 4 组: 正常组、模型组、ATRA 组、ferrostatin-1 组, 5 只/组。ATRA 组腹腔注射 ATRA 15 mg/(kg · d), ferrostatin-1 组腹腔注射 ferrostatin-1 2 mg/(kg · d), 正常组、模型组腹腔注射等体积的 0.9% NaCl 溶液(含 25% 聚氧乙烯蓖麻油和 0.1% 二甲基亚砷), 连续 7 d 进行以上操作, 第 8 天模型组、ATRA 组、ferrostatin-1 组腹腔注射 LPS 6 mg/kg, 6 h 后处死所有小鼠。

1.2.2 动物样本获取及处理 使用 4% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠, 眼球取血后处死小鼠, 迅速取出心脏组织, 使用刀片沿肌丝取长条状, 在 2.5% 戊二醛固定液里切成 1 mm³ 以内, 将其置于 2.5% 戊二醛固定液中 4 °C 冰箱前固定; 余下组织漂洗干净分成两份, 一部分液氮急速冷冻后 -80 °C 冰箱保存待用, 另一部分置于多聚甲醛中固定后, 石蜡包埋切片。取出的血液 4 °C 静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 10

min, 取血清置于 -20 °C 冰箱待用。

1.2.3 GSH 和 GSSG、脂质过氧化的次级产物 MDA 检测 收取的血清严格按照试剂盒说明书步骤操作, 测定 GSH 和 GSSG 时, 先测定总谷胱甘肽(GSH + GSSG), 酶标仪读取吸光度根据标准曲线计算总谷胱甘肽含量; 另外准备样品用适当的试剂清除样品中的 GSH, 注意标准品同时要去 GSH, 重新作标准曲线, 酶标仪读取吸光度根据新的标准曲线计算 GSSG 含量, 在总谷胱甘肽中扣除 GSSG 的量后得到 GSH 的含量。MDA 含量也是通过读取酶标仪吸光度值计算得出。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qPCR) 称取心肌组织加入 TRIzol 进行研磨, 参考提取过程说明得到总 RNA, 使用分光光度计测量纯度和含量。按照逆转录和 qPCR 试剂盒的说明书分别进行逆转录和 qPCR, 计算小鼠心肌组织炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) 的相对水平(正常组为 1)。引物序列如下: IL-6(F: 5'-CTGCAAGAGACTTCCATC-CAG-3', R: 5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'); TNF-α(F: 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAG-3', R: 5'-GGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'); GAPDH(F: 5'-TGGCCTTCCGTGTTCTTAC-3', R: 5'-GAGTTGC-TGTTGAAGTCGCA-3')。

1.2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色观察 石蜡切片脱蜡水化后, 按常规方法进行 HE 染色, 使用正置显微镜拍照并保存。

1.2.6 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM) 观察小鼠心肌线粒体 参照 1.2.2 固定的心肌组织送往安徽医科大学科研实验中心, 按照 TEM 生物样品制备的基本步骤制样, TEM 下观察心肌细胞线粒体拍照并保存。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 取出 -80 °C 冰箱保存的心肌组织, 切下一部分称重后转入研磨器中, 按照每 0.1 g 组织加入 1 ml RIPA 裂解液(含 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂), 置于冰上研磨裂解后, 14 000 r/min 离心 30 min 取上清液, 采用 BCA 法测上清液蛋白浓度, 样品加入蛋白上样缓冲液后置于沸水中煮至蛋白变性, 分装后置于 -80 °C 冰箱待用。配置 SDS-PAGE 胶, 按照每个上样孔蛋白总量 10 μg 加样, 电泳至条带分开后在转移液中将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜 2 h, 清洗后切膜按照条带位置置于 Anti-KEAP1(1 : 1 000)、Anti-NRF2(1 :

1 000)、Anti-SLC7A11(1:1 000)、Anti-GPX4(1:1 000)、Anti-Beta Actin(1:2 000)、Anti-ACSL4(1:1 000)、Anti-FTH1(1:1 000) 4℃冰箱孵育12~18 h,使用TBST和TBS洗涤条带,室温孵育二抗羊抗兔(1:5 000)或羊抗鼠(1:3 000) 2 h,TBST和TBS洗涤条带,ECL发光试剂显影。使用Image J软件计算各条带灰度值, β -actin为内参。

1.3 统计学处理 实验数据使用SPSS 20.0软件进行数据分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA对LPS损伤的小鼠血清MDA、GSH和GSSG的影响 与正常组比较,模型组脂质过氧化的重要产物MDA水平上升($P < 0.05$),GSH水平、GSH/GSSG下降($P < 0.05$);与模型组相比,ATRA组、ferrostatin-1组MDA的水平下降($P < 0.05$),GSH水平、GSH/GSSG上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 ATRA对LPS损伤的小鼠血清MDA、GSH和GSSG的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA($\mu\text{mol/L}$)	GSH($\mu\text{mol/L}$)	GSH/GSSG
正常	5.00 \pm 0.64	14.31 \pm 3.69	2.24 \pm 0.97
模型	9.82 \pm 0.96*	3.78 \pm 1.04*	0.21 \pm 0.05*
ATRA	4.60 \pm 0.97#	11.36 \pm 0.72#	1.10 \pm 0.13#
ferrostatin-1	5.32 \pm 0.74#	10.54 \pm 2.04#	1.18 \pm 0.43#
F值	42.36	20.40	12.00

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 ATRA对LPS损伤的小鼠心脏组织炎症因子IL-6、TNF- α mRNA相对水平的影响 与正常组比较,模型组炎症因子IL-6、TNF- α mRNA相对水平明显上升($P < 0.05$),与模型组相比,ATRA组、ferrostatin-1组IL-6、TNF- α mRNA相对水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

2.3 HE染色结果 各组小鼠心脏组织HE染色结果无明显差异,心肌纤维结构有序且排列整齐,细胞核结构清晰排列。图2。

2.4 TEM观察小鼠心肌线粒体的损伤情况 正常组小鼠心肌的线粒体膜完整,线粒体嵴清晰可见,模型组小鼠心肌的线粒体出现损伤的现象,线粒体膜出现不完整现象,线粒体嵴减少或消失,ATRA组、ferrostatin-1组线粒体损伤的情况缓解。见图3。

2.5 ATRA对LPS损伤小鼠心脏组织ACSL4、FTH1、SLC7A11、GPX4的影响 Western blot结果

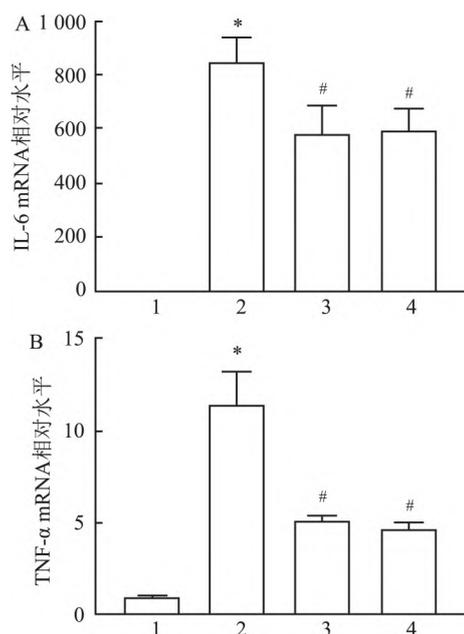


图1 ATRA对LPS损伤小鼠心脏组织炎症因子IL-6、TNF- α mRNA相对水平的影响
1: 正常组; 2: 模型组; 3: ATRA组; 4: ferrostatin-1组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

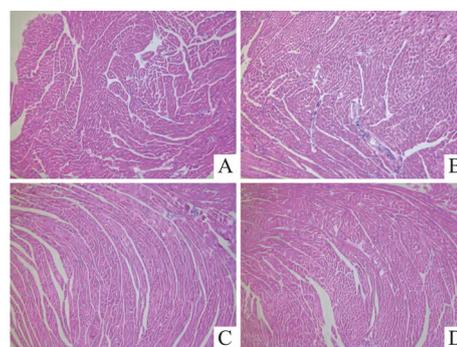


图2 光学显微镜下小鼠心脏HE染色结果 $\times 100$
A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA组; D: ferrostatin-1组

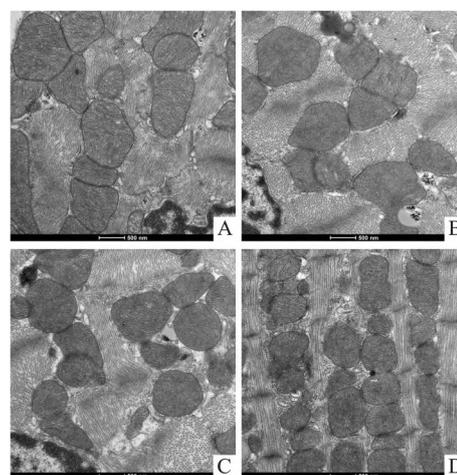


图3 TEM下小鼠心肌线粒体损伤情况 $\times 13 500$
A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA组; D: ferrostatin-1组

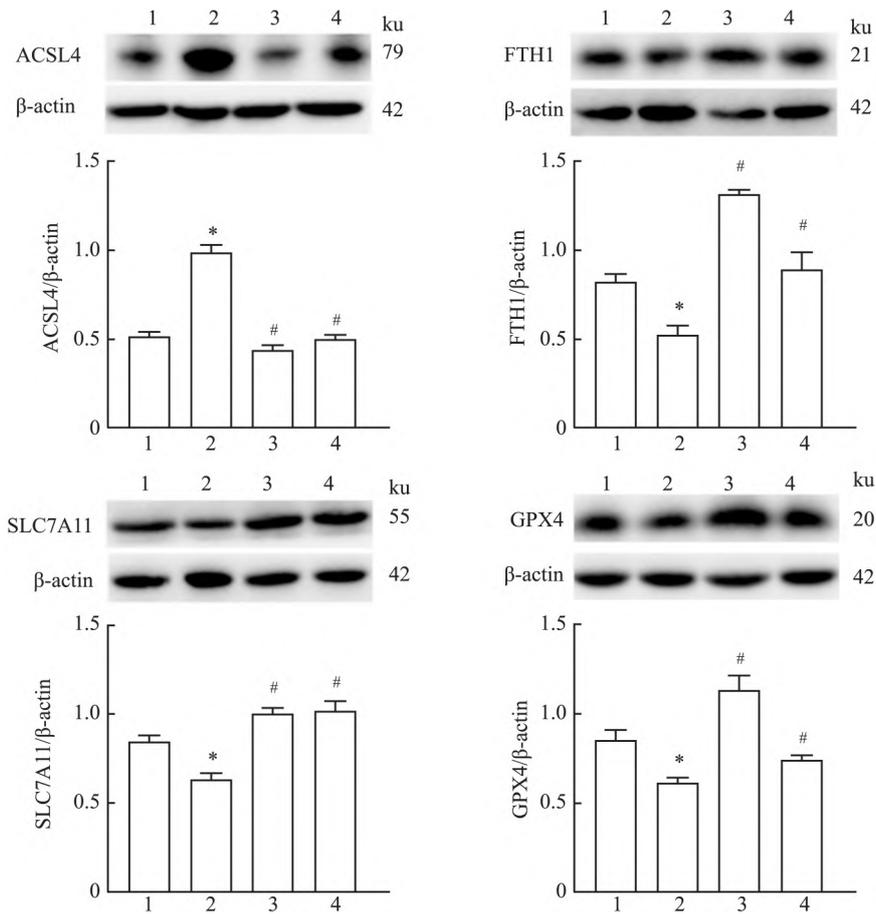


图4 ATRA对LPS损伤小鼠心脏组织ACSL4、FTH1、SLC7A11、GPX4的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: ATRA组; 4: ferrostatin-1组; 与正常组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: # P < 0.05

显示,与正常组相比,模型组GPX4、SLC7A11、FTH1蛋白表达下降(P < 0.05),ACSL4蛋白表达升高(P < 0.05),与模型组相比,ATRA组、ferrostatin-1组GPX4、SLC7A11、FTH1蛋白表达升高(P < 0.05),ACSL4蛋白表达下降(P < 0.05)。见图4。

2.6 ATRA对LPS损伤小鼠心脏组织KEAP1、NRF2的影响 Western blot结果显示,与正常组相比,模型组NRF2的含量下降(P < 0.05),KEAP1蛋白表达升高(P < 0.05),与模型组相比,ATRA组、ferrostatin-1组NRF2的含量升高(P < 0.05),KEAP1蛋白表达下降(P < 0.05)。见图5。

3 讨论

ATRA是维生素A的衍生物,其具有许多生物学功能,有研究^[5]报道,ATRA对LPS引起的炎症有缓解作用,ATRA调控细胞因子的表达改善免疫反应和炎症反应,本研究中ATRA下调LPS损伤小鼠的心脏组织炎症因子IL-6、TNF-α mRNA的相对水平。但ATRA是否通过抑制铁死亡缓解LPS心肌细

胞的损伤一直没有报道,本实验以C57BL/6小鼠为实验对象,ATRA预处理后腹腔注射LPS,探究LPS是否对小鼠心肌造成损伤及ATRA对其调控机制是否与铁死亡有关。铁死亡是由铁依赖的磷脂过氧化驱动的^[6],细胞内游离多不饱和脂肪酸在ACSL4和LPCAT3的作用下结合到磷脂上,在铁离子和分子氧及酶的作用下发生芬顿反应生成脂质过氧化物而产生自由基。细胞有许多防御系统来处理脂质过氧化物的增加,例如GSH和利用GSH的GPX4,催化膜脂质过氧化物还原为反应性较低的醇。受到药物抑制或细胞损伤而造成膜脂质过氧化物积累,进而大量次级产物的形成如MDA,最终导致细胞器或细胞膜的破裂而引起铁死亡。

本研究证明,LPS刺激后模型组小鼠血清中MDA水平上升,GSH含量、GSH/GSSG降低,抗氧化能力下降,可能造成铁死亡的发生;TEM显示模型组小鼠心肌的线粒体出现严重损伤,ferrostatin-1组缓解了以上现象,ferrostatin-1是一种铁死亡抑制剂,可以与铁离子形成络合物降低不稳定铁^[7],铁离子

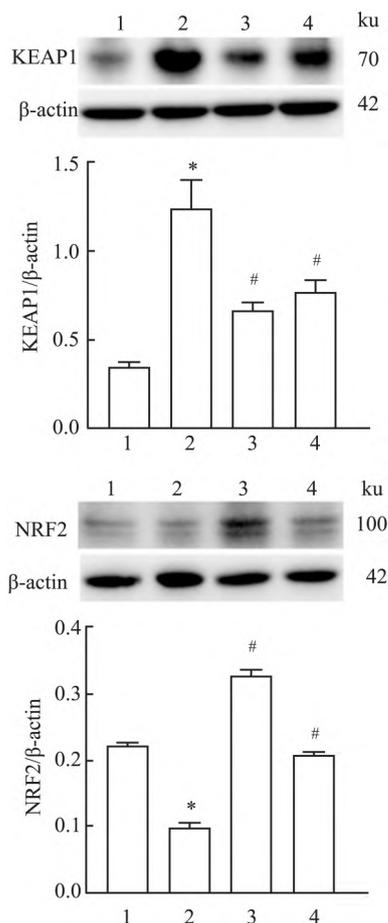


图5 ATRA对LPS损伤小鼠心脏组织KEAP1、NRF2的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: ATRA组; 4: ferrostatin-1组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

是铁死亡关键步骤芬顿反应的重要组成,表明模型组小鼠心肌的损伤与铁死亡有关。ATRA组MDA水平下降、GSH水平升高,ATRA预处理增加了心肌抗氧化的能力,TEM显示ATRA组线粒体损伤情况明显得到了缓解,线粒体嵴基本上清晰可见,表明ATRA能够抑制LPS引起的铁死亡。HE染色显示各组间心肌组织无明显变化,LPS刺激时间较短,对心脏组织形态学无明显影响。

NRF2是负责维持细胞代谢、氧化还原和蛋白质平衡的关键转录因子^[8],SLC7A11、GPX4、FTH1都是其靶基因,NRF2在细胞内移位到细胞核并激活含有抗氧化反应元件基因的转录^[9]。模型组LPS刺激导致心脏组织内KEAP1含量升高、NRF2含量下降,研究^[10]表明,NRF2的表达通过与KEAP1相互作用而受到抑制,KEAP1是泛素E3连接酶复合物的一部分,可导致NRF2蛋白酶体降解。KEAP1在LPS刺激后表达量上调而增强了NRF2的降解,而导致靶基因SLC7A11、GPX4、FTH1表达的下调。

SLC7A11是细胞膜上System Xc⁻(胱氨酸/谷氨酸反向转运体)的一个亚基,研究^[11]表明,SLC7A11表达下降后细胞往细胞内运输胱氨酸的能力下降,细胞内胱氨酸被氧化为半胱氨酸并用于合成重要的抗氧化的物质GSH,SLC7A11表达下调造成GSH含量下降。GPX4发挥作用是预防脂质过氧化而引起的铁死亡的必要条件^[12],模型组GPX4表达下调造成缓解膜脂质过氧化的能力下降。研究^[13]表明,铁蛋白在铁的新陈代谢中发挥核心作用,心脏组织中铁蛋白富含重链,具有铁氧合酶活性的FTH1催化细胞质中的Fe²⁺转化为Fe³⁺而储存在铁蛋白中^[14]。FTH1表达下调增加了活性铁的含量而更容易发生芬顿反应。ATRA预处理组NRF2含量升高,上调SLC7A11、GPX4、FTH1的表达,抗氧化能力增加而活性铁的含量下降,抑制铁死亡的发生。NRF2可以通过Hippo-YAP通路调控ACSL4的表达,NRF2抑制YAP的转录活性下调ACSL4的表达^[15],模型组NRF2含量下降而导致ACSL4表达增加,更多的不饱和脂肪酸结合到磷脂造成膜脂质过氧化。ATRA预处理组NRF2的含量增加,ACSL4的表达下调导致膜脂质过氧化降低。

综上所述,ATRA预处理缓解LPS对小鼠心肌线粒体的损伤和脂质过氧化物的积累,这个保护作用可能与抑制细胞铁死亡有关。这些结果表明ATRA作为药物对治疗LPS造成的心脏损伤有一定的潜力。

参考文献

- [1] Mayr F B, Yende S, Angus D C. Epidemiology of severe sepsis [J]. Virulence, 2014, 5(1): 4-11.
- [2] Liu Y C, Yu M M, Shou S T, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: Mechanisms and treatments [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1021.
- [3] Wang C, Yuan W, Hu A, et al. Dexmedetomidine alleviated sepsis-induced myocardial ferroptosis and septic heart injury [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 175-84.
- [4] Blaner W S, Shmarakov I O, Traber M G. Vitamin a and vitamin e: Will the real antioxidant please stand up? [J]. Annu Rev Nutr, 2021, 41: 105-31.
- [5] Wang X, Allen C, Ballow M. Retinoic acid enhances the production of IL-10 while reducing the synthesis of IL-12 and TNF-alpha from LPS-stimulated monocytes/macrophages [J]. J Clin Immunol, 2007, 27(2): 193-200.
- [6] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.
- [7] Miotto G, Rossetto M, Di Paolo M L, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1 [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101328.

- [8] Dodson M , Castro-Portuguez R , Zhang D D . Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Redox Biol* , 2019 , 23 : 101107.
- [9] 瞿子庭 胡永涛 杨孝娟 等 . 白藜芦醇通过 Nrf2/ARE 信号通路降低 AA 大鼠脾脏中氧化应激反应 [J]. *安徽医科大学学报* 2019 54(3) : 369 - 73.
- [10] Bellezza I , Giambanco I , Minelli A , et al . Nrf2-keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* , 2018 , 1865(5) : 721 - 33.
- [11] Parker J L , Deme J C , Kolokouris D , et al . Molecular basis for redox control by the human cystine/glutamate antiporter system XC [J]. *Nat Commun* , 2021 , 12(1) : 7147.
- [12] Ingold I , Berndt C , Schmitt S , et al . Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell* , 2018 , 172(3) : 409 - 422.
- [13] Ganz T . Systemic iron homeostasis [J]. *Physiol Rev* , 2013 , 93(4) : 1721 - 41.
- [14] Gozzelino R , Soares M P . Coupling heme and iron metabolism via ferritin h chain [J]. *Antioxid Redox Signal* , 2014 , 20(11) : 1754 - 69.
- [15] Wu J , Minikes A M , Gao M , et al . Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling [J]. *Nature* , 2019 , 572(7769) : 402 - 6.

ATRA alleviates lipopolysaccharide – induced acute myocardial injury in mice by inhibiting Ferroptosis

Dan Zhangyong¹ , Shu Chuanlin¹ , Shi Xiaorui¹ , Zhou Qing¹ , Wang Yuan¹ , Ren Mengfei² , Wang Yi³ , Zhu Huaqing¹
(¹Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University Hefei 230032;

²Dept of College of Life Sciences , Anhui Medical University Hefei 230032;

³Dept of Bioengineering , College of Life Sciences , Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of all-*trans* retinoic acid (ATRA) on lipopolysaccharide (LPS) -induced acute myocardial injury in C57BL/6 mice. **Methods** Male mice of C57BL/6 strain were randomly divided into normal group , model group , ATRA group , and ferrostatin-1 group. Mice in the ATRA group were injected intraperitoneally with ATRA 15mg/(kg • d) , ferrostatin-1 group received ferrostatin-1 2 mg/(kg • d) , the normal group and the model group were given solvent. After one week of continuous administration , the model group , ATRA group , and ferrostatin-1 group were intraperitoneally injected with LPS 6 mg/kg. All mice were sacrificed after 6 hours. The contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in serum of mice were detected. qPCR was used to detect mRNA levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in heart tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the changes of heart tissue in mice. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the structure of mouse myocardial mitochondria. Western blot was used to detect the expression of ferroptosis markers glutathione peroxidase 4 (GPX4) , ferritin heavy chain 1 (FTH1) , Solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) , acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) and related regulatory proteins , Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) , kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) . **Results** Compared with the normal group , the MDA content in the serum of the model group increased and the GSH content decreased , the above changes were reversed in the ATRA group as well as in the ferrostatin-1 group. Compared with normal group , the mRNA levels of IL-6 and TNF- α in the heart tissue of model group increased steeply , the above changes were relieved in the ATRA group and the ferrostatin-1 group. There was no significant difference in HE staining of myocardial tissue among the groups of mice. Compared with the normal group , myocardial mitochondria in the model group showed the phenomenon of cristae reduction or disappearance under TEM , while myocardial mitochondrial injury was alleviated in the ATRA group and the ferrostatin-1 group. Western blot showed that GPX4 , FTH1 , SLC7A11 , and NRF2 expression were reduced in the myocardial tissue of mice in the model group compared with the normal group , ACSL4 and KEAP1 expression increased. The above changes were reversed in the ATRA group as well as in the ferrostatin-1 group. **Conclusion** ATRA alleviates lipopolysaccharide-induced acute myocardial injury in mice by inhibiting ferroptosis.

Key words all-*trans* retinoic acid; ferroptosis; NRF2; lipopolysaccharide