TMAO 通过 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路影响心脏原代成纤维细胞的增殖

赵 雨 刘向东 吕家顺 张庆勇

摘 要 目的 探讨研究氧化三甲胺(trimethylamine - N - oxide,TMAO)通过 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路影响心脏原代成纤维细胞的增殖的机制。**方法** 分别用 0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0μmol/L 的 TMAO 培养心脏原代成纤维细胞 48h,作为浓度梯度组;用 TMAO 分别处理心脏原代成纤维细胞 0、15、30、60min,作为时间梯度组;在用 TMAO 处理细胞前,加入 PI_3K 抑制剂 LY294002 预处理细胞 30min,作为抑制剂组。裂解细胞收集蛋白,用 Western blot 法检测蛋白表达量。**结果** TMAO 增加了 PI_3K/AKT/mTOR 细胞增殖信号通路中 p - PI_3K、p - AKT、p - mTOR 的表达量,p - PI_3K 在 TMAO 为 10μmol/L、处理 30min 的时候表达量最高,p - AKT 和 p - mTOR 在 TMAO 为 25μmol/L 处理 60min 的时候表达量最高。在抑制剂组中,与单纯用 TMAO 处理的细胞比较,同时用 PI_3K 抑制剂处理组,其 p - PI_3K、p - AKT、p - mTOR 的表达量明显减少。结果较对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TMAO 可能促进心脏原代成纤维细胞的增殖,且是通过激活 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路起作用。

关键词 氧化三甲胺 心脏原代成纤维细胞 增殖

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.008

TMAO Affects Proliferation of Primary Cardiac Fibroblasts via PI_3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Zhao Yu, Liu Xiangdong, Lv Jiashun, et al. Department of Cardiovascular Medicine, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China*

Abstract Objective To investigate the mechanism of TMAO affecting the proliferation of primary fibroblasts in the heart through PI_3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Methods** Primary cardiac fibroblasts were cultured in medium containing 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0μmol/L TMAO for 48 hours as the concentration gradient group. Primary cardiac fibroblasts were treated with TMAO for 0, 15, 30, 60min as the time gradient group. Before treated with TMAO, cells were treat with LY294002 (PI_3K inhibitor) in advance for 30min, as the inhibitor group. The protein expression was detected by western blot. **Results** TMAO increased the expression levels of p - PI_3K, p - AKT and p - mTOR in PI_3K/AKT/mTOR cell proliferation signaling pathway. p - PI_3K was highest in TMAO at 10μmol/L and treated for 30min. The expression level of p - AKT and p - mTOR was the highest when they were treated with TMAO at 25μmol/L and for 60min. In the inhibitor group, the expression levels of p - PI_3K, p - AKT, and p - mTOR were significantly reduced in the group treated with the PI_3K inhibitor as compared with the cells treated with TMAO alone. The results were statistically significant compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** TMAO promotes the proliferation of cardiac primary fibroblasts and activates the PI_3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key words Trimethylamine - N - oxide; Primary cardiac fibroblasts; Proliferation

在人体摄入富含卵磷脂、胆碱、L - 肉碱的高脂营养物质后,经某些特定的肠道微生物酶复合物的分解代谢,首先产生三甲胺(trimethylamine,TMA)。TMA 进入门静脉系统后,经肝脏含黄素单氧化酶(flavin - containing monooxygenases)氧化,即产生 TMAO[1]。TMAO 除了与慢性肾脏疾病、2 型糖尿病及肥胖关系密切外,还参与心血管代谢性疾病,如心肌肥大、心脏纤维化。TMAO 的产生、代谢过程与心血管疾病的发生高度相关,可作为心血管疾病治疗的潜在靶点[2,3]。

心脏间充质细胞,也被简称为“成纤维细胞”,是心脏中分布最广的细胞类型之一[4]。哺乳动物心脏的正常功能主要由心肌细胞和心脏成纤维细胞(CF)相互协调、相互作用来维持的,这两种细胞占心脏细胞的 90%[5]。在人类心脏中,心脏成纤维细胞占

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81771496)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院心血管内科(赵雨、刘向东、吕家顺);200011 上海交通大学附属第九人民医院心血管内科(张庆勇)

通讯作者:张庆勇,电子信箱:zhang_qingyong71@hotmail.com

60% ~70%,是细胞外基质的主要来源,除在细胞和非细胞组分间的机械、化学、电信号的转导中发挥作用外,在高血压、心肌梗死及心力衰竭发生时的心脏重构过程中也发挥重要作用[6]。肠道菌群代谢对人体的影响日益受到关注,但其代谢产物是如何影响人体病理生理进程的,是否会对心脏重构造成影响,尚缺乏足够研究,本研究旨在探索 TMAO 影响心脏成纤维细胞增殖的可能作用机制。

材料与方法

1. 材料:小鼠原代心脏成纤维细胞购自上海拜力生物科技有限公司;一抗抗体 PI_3K(phosphatidyl inositol 3 - kinase, #4292)、p - PI_3K(Tyr458, #4228)、AKT(protein kinase B, #9272)、p - AKT(Thr308, #13038)、mTOR(mammalian target of rapamycin, #2972)、p - mTOR(#2974)、GAPDH(glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase, #5174)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;二抗山羊抗兔购自北京博奥森公司;DMEM(dulbecco's modified eagle medium)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;氧化三甲胺(TMAO)、LY294002(PI_3K 抑制剂)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术公司;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液购自美国 Thermo 公司;PowerPac Universal 电泳装置购自美国 Bio - Rad 公司;EPOCH 型酶标仪购自美国 BioTek 公司。

2. 方法:(1)细胞培养:在 5% CO_2、37℃的培养条件下培养原代心脏成纤维细胞。培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。待细胞长满后使用 PBS 2 毫升/次冲洗 2 次,然后加入 2ml 0.25% 的胰酶消化 1min,再加入 2ml 培养液终止消化。使用枪头将贴壁细胞吹打下来,将细胞悬液吸入 15ml 离心管以 0.9 × g 速度离心 3min,离心后弃去上清,将细胞混匀后按以 5×10^5 细胞密度接种于 6 孔板中。(2)细胞处理:浓度梯度组:分别用含 0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0μmol/L TMAO 的培养基培养原代心脏成纤维细胞,48h 后收集细胞;时间梯度组:分别用 TMAO 处理原代心脏成纤维细胞 0、15、30、60min;抑制剂组:在用 TMAO 处理细胞前,加入 PI_3K 抑制剂 LY294002 10μmol/L 预处理细胞 30min。(3)Western blot 法检测蛋白表达:处理结束后,每孔加入 100μl 含 1% 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和 10% 磷酸酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞。待细胞充分裂解后离心,取上清后使用 BCA 检测试剂盒进行蛋白定量,浓度调齐后煮沸 15min。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)跑完后用二氟乙烯(polyvinylidene floride, PVDF)膜进行转膜。然后 40ml TBST 中加入 2g 牛奶混匀后于室温下将膜封闭 2h,一抗 PI_3K、p - PI_3K、AKT、p - AKT、mTOR、p - mTOR、GAPDH 4℃ 孵育过夜。TBST 10 分钟/次将膜洗涤 3 次。室温下孵育二抗 2h,TBST 10 分钟/次将膜洗涤 3 次。使用 Image Quant LAS 4000 mini 进行显影。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析处理。定量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较选用 t 检验,而多组均数间的比较选用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 在用不同浓度的 TMAO 处理心脏成纤维细胞后,各蛋白表达量的变化:Western blot 法检测结果表明,随着 TMAO 浓度不断提高,p - PI_3K、p - AKT、p - mTOR 的表达量呈增加趋势,其中 p - PI_3K 在 TMAO 为 10μmol/L 的时候表达量最高,p - AKT 和 p - mTOR 在 TMAO 为 25μmol/L 的时候表达量最高。

2. 用浓度为 10 μmol/L 的 TMAO,分别处理心脏成纤维细胞 0、15、30、60min 后,各蛋白表达量的变化:随着培养时间延长,p - PI_3K、p - AKT、p - mTOR 的表达量呈增加趋势,其中 p - PI_3K 在培养 30min 的时候表达量最高,p - AKT 和 p - mTOR 在培养 60min 的时候表达量最高。

3. PI_3K/AKT/mTOR 信号通路各蛋白表达量的变化:用 PI_3K 抑制剂 LY294002 预处理细胞 30min 后,再用 10μmol/L 的 TMAO 处理细胞后,与单纯用 TMAO 处理的细胞比较,同时用 PI_3K 抑制剂处理组,其 p - PI_3K、p - AKT、p - mTOR 的表达量明显减少。

讨　　论

一直以来,饮食都被认为与心血管疾病的发生有关,而近几年的研究也表明,营养摄入、肠道菌群代谢参与宿主心血管疾病的发生、发展。此外,宿主体内微生物产生的多种代谢物,如氧化三甲胺、短链脂肪酸(short chain fat acids, SCFAs)和次级胆汁酸(secondary bile acids),也会参与心血管疾病的病理生理过程。尽管一些强效降脂药已广泛应用于临床,心血管疾病位居是发达国家人口死亡原因之首,因此进一步明确心血管疾病治疗的靶点势在必行[7]。近 10 年来的研究发现,氧化三甲胺(TMAO)、短链脂肪肪酸

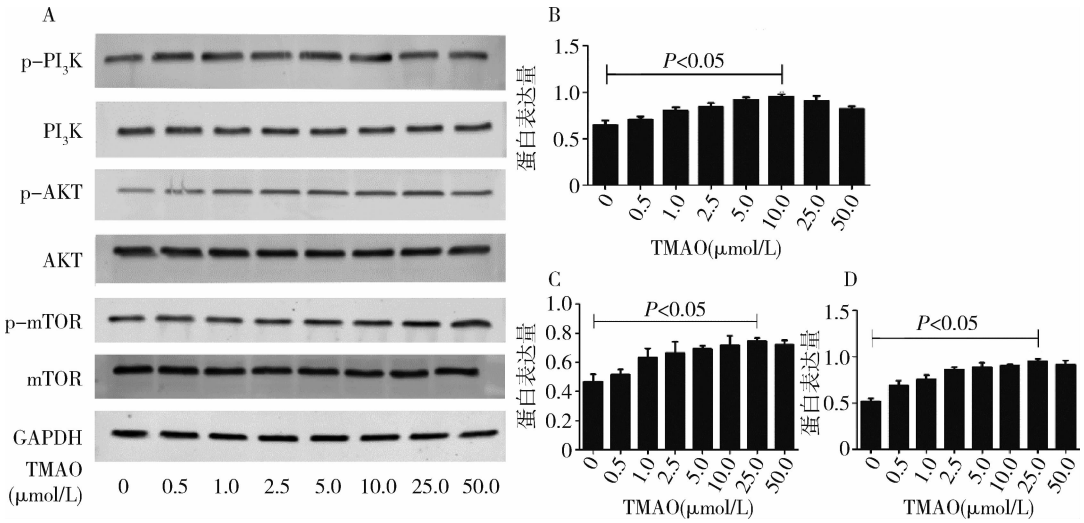


图 1　TMAO 不同浓度处理后，信号通路各蛋白表达量的变化

A. Western blot 法检测不同浓度的 TMAO 处理心脏成纤维细胞后各磷酸化蛋白表达的变化；B. p－ PI_3K/PI_3K；C. p－AKT/AKT；D. p－mTOR/mTOR

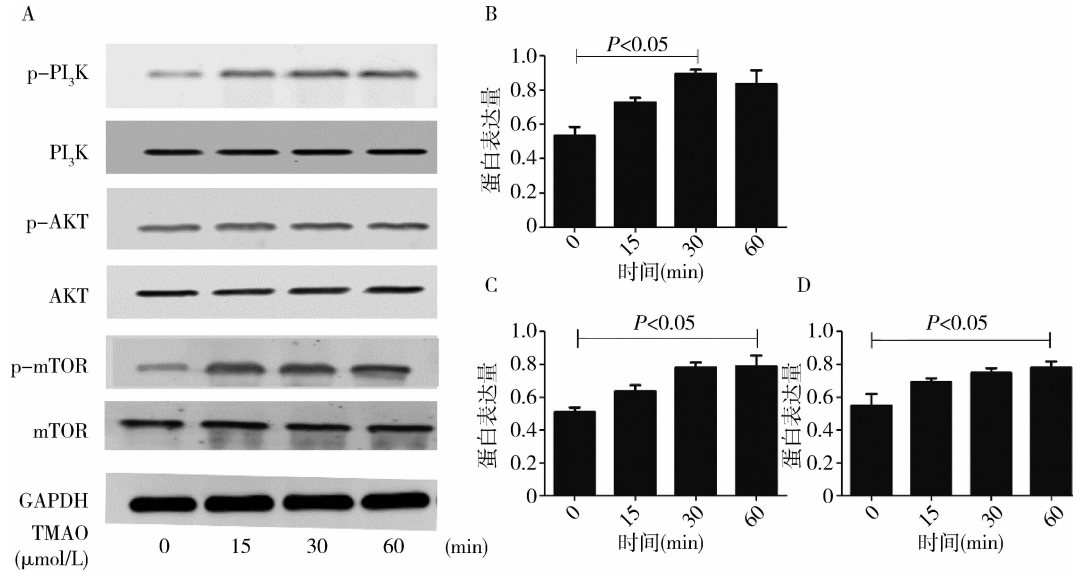


图 2　TMAO 不同时间处理后，信号通路各蛋白表达量的变化

A. Western blot 法检测用浓度为 10μmol/L 的 TMAO 处理心脏成纤维细胞不同时间后各磷酸化蛋白表达量的变化；B. p－PI_3K/PI_3K；C. p－AKT/AKT；D. p－mTOR/mTOR

(SCFAs)和次级胆汁酸在心血管疾病的发展中发挥特定作用，尽管一些大型抗生素治疗试验未能发现可以让心血管疾病患者获益，但目前心血管药物研究俨然已进入以肠道菌群代谢产物为靶点的新领域[8,9]。有研究发现，TMAO 可以通过 TGF－β/SMAD3 信号通路促进心脏和肾脏的纤维化[10]。

在健康的心脏中，成纤维细胞是参与心脏结缔组织形成和维持的主要细胞类型。心脏结缔组织包含细胞和非细胞成分，其中的细胞外基质(extracellular matrix，ECM)可以为心肌细胞提供稳定的结构，使心脏成为一个整体[6]。而纤维化是许多常见心血管疾病诸如心肌梗死和高血压的自然后遗症，并且通常加剧心血管疾病和心力衰竭的进展，此外，心脏局部瘢痕和散在纤维化也是扰乱正常电生理活动、导致心律失常发生的独立因素，但目前还没有专门针对纤维化的治疗方法[11]。因此，控制心脏成纤维细胞和肌成纤维细胞增殖、表型转化和基质合成这些行为的调节过程和细胞内信号转导途径代表了抗纤维化治疗发展的研究重点[12]。PI_3K/AKT/mTOR 信号通路可通过多种潜在机制影响细胞生长、细胞增殖、细胞存活

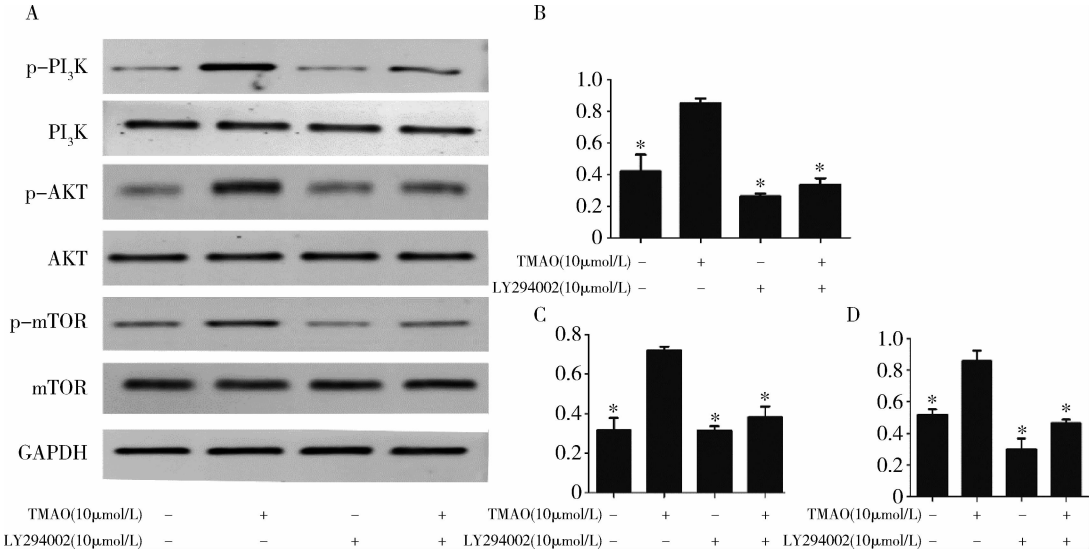


图 3　PI_3K 抑制剂 LY294002 预处理后，信号通路各蛋白表达量的变化

A. Western blot 法检测经 PI_3K 抑制剂 LY294002 预处理心脏成纤维细胞后各磷酸化蛋白表达的变化；B. p－PI_3K/PI_3K；C. p－AKT/AKT；D. p－mTOR/mTOR。与抑制剂预处理组比较，$^*P<0.05$

及糖吸收[13]：PI_3K 通过产生三磷酸磷脂酰肌醇引起信号级联放大反应，并激活 AKT；AKT 可以对胞内胞外多种刺激作出反应，是细胞存活重要的调节器；mTOR 作为一种相对分子质量为 289000 的非典型丝苏氨酸蛋白激酶，可调节细胞生长，主要受 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路的调控[14]。

本研究发现，TMAO 增加了 PI_3K/AKT/mTOR 细胞增殖信号通路中 p－PI_3K、p－AKT、p－mTOR 的表达量，说明 TMAO 可能通过激活 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路影响心脏成纤维细胞的增殖。为了进一步验证，笔者使用了 PI_3K 抑制剂 LY294002 将 PI_3K 的活性抑制后，p－PI_3K、p－AKT、p－mTOR 的表达量均明显降低，即使加入 TMAO 处理，p－PI_3K、p－AKT、p－mTOR 的表达量也未发生明显升高，进一步表明了 TMAO 可以通过 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路发挥作用。

综上所述，本研究发现 TMAO 可以激活 PI_3K/AKT/mTOR 信号通路，并可能通过该信号通路促进心脏成纤维细胞的增殖，这有助于进一步了解 TMAO 促进心脏纤维化的分子机制，而 TMAO 促纤维化是否还有其他分子机制参与，尚需进一步探究。

参考文献

1　Koeth RA, Levison BS, Culley MK, *et al*. gamma－Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L－carnitine to TMAO[J]. Cell Metab, 2014, 20(5): 799－812

2　Brown JM, Hazen SL. Targeting of microbe－derived metabolites to improve human health: the next frontier for drug discovery[J]. J Biol Chemi, 2017, 292(21): 8560－8568

3　Organ CL, Otsuka H, Bhushan S, *et al*. Choline diet and its gut microbe－derived metabolite, trimethylamine N－oxide, exacerbate pressure overload－induced heart failure[J]. Circulation: Heart Failure, 2016, 9(1): e002314

4　Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling[J]. Pharmacol Therapeut, 2009, 123(2): 255－278

5　Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(4): 549－574

6　Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function[J]. Physiol Rev, 2007, 87(4): 1285－1342

7　Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al*. Executive summary: heart disease and stroke statistics－2016 update: A Report From the American Heart Association[J]. Circulation, 2016, 133(4): 447－454

8　Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, *et al*. Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1646－1654

9　Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, *et al*. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16): 1637－1645

10　Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease. Nature reviews[J]. Microbiology, 2018, 16(3): 171－181

11　Kohl P, Gourdie RG. Fibroblast－myocyte electrotonic coupling: does it occur in native cardiac tissue? [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 70: 37－46

12　Roche PL, Filomeno KL, Bagchi RA, *et al*. Intracellular signaling of cardiac fibroblasts[J]. Compr Physiol, 2015, 5: 721－760

13　Sun CH, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI_3K/AKT/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder[J]. Histopathology, 2011, 58(7): 1054－1063

14　Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(2): 1886－1918

（收稿日期：2018－11－25）
（修回日期：2019－01－14）