

TAK1/NF- κ B 在小鼠心肌肥厚中的变化及意义

周 恒 唐其柱 沈涤非 严 玲 卞洲艳 袁 园

摘 要 **目的** 研究转化生长因子活化激酶 1/核因子- κ B(TAK1/NF- κ B)与炎症反应在心肌肥厚中的作用,探索心肌肥厚的分子机制并寻找潜在的防治靶点。**方法** 使用野生型 C57BL/6J 小鼠,以主动脉缩窄术(AB)建立压力负荷诱导的心肌肥厚模型,假手术(Sham)组作为对照组。AB 术后 8 周超声心动图评估小鼠心室结构与功能,处死小鼠称量心脏质量。HE 与 PSR 进行心肌组织病理学与纤维化。CD68 免疫荧光检测单核-吞噬细胞浸润,实时定量 RT-PCR 检测炎症反应标志物的表达,Western blot 法检测 TAK1/NF- κ B 通路蛋白质磷酸化水平。**结果** 与 Sham 组比较,AB 组小鼠的室壁厚度、室腔大小及心脏质量/体质量明显增加($P < 0.05$),心功能下降($P < 0.05$),心肌细胞横截面积与胶原沉积量显著增大($P < 0.05$)。此外,AB 组心肌组织中 CD68 阳性细胞数明显增多($P < 0.05$),TNF- α 与 IL-1 β 等炎症反应标志物的 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$);AB 组 TAK1/ κ B 抑制蛋白激酶 β 与 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)的磷酸化水平较对照组明显上调,I κ B α 总蛋白水平降低,NF- κ B p65 磷酸化水平增加。**结论** 压力负荷诱导的心肌肥厚伴有 TAK1/NF- κ B 通路激活与心肌组织炎症性浸润,提示 TAK1/NF- κ B 参与了心肌肥厚的发生、发展。

关键词 心肌肥厚 转化生长因子活化激酶 1 核因子- κ B 炎症反应 心力衰竭

中图分类号 R542

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.008

Changes and Significance of TAK1/NF- κ B Pathway in Cardiac Hypertrophy in Mice. Zhou Heng, Tang Qizhu, Shen Difei, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Metabolic and Chronic Diseases, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To study the role of transforming growth factor-activated kinase 1/nuclear factor- κ B (TAK1/NF- κ B) and inflammation in cardiac hypertrophy, to explore the molecular mechanism underlying cardiac hypertrophy and to find potential targets for prevention and treatment. **Methods** A pressure-induced cardiac hypertrophy model was established in wild C57BL/6J mice by aortic binding (AB), and the sham group was used as control. The ventricular structure and function of mice were assessed by echocardiography 8 weeks after AB, and then the mice were killed and the hearts were weighed. HE and PSR were used for myocardial histopathology and fibrosis. CD68 immunofluorescence was performed to detect monocyte/macrophage infiltration, real-time quantitative RT-PCR was used to examine the expression of inflammatory markers, and Western blot was used to evaluate protein phosphorylation in TAK1/NF- κ B pathway. **Results** Compared with Sham group, the thickness of ventricular wall, size of ventricular chamber, cardiac dysfunction and the ratio of heart weight to body weight in AB group increased significantly ($P < 0.05$), as well as the cross-sectional area of cardiomyocytes and the collagen deposition ($P < 0.05$). In addition, the number of CD68 positive cells in myocardium of AB group increased ($P < 0.05$) and the expression levels of TNF- α and IL-1 β elevated ($P < 0.05$). The phosphorylation levels of TAK1, IKK β and I κ B α in AB group were significantly higher than those in Sham group. The total protein level of I κ B α decreased, and the phosphorylation level of NF- κ B increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Cardiac hypertrophy induced by pressure overload is associated with the activation of TAK1/NF- κ B pathway and inflammation infiltration in myocardium, suggesting that TAK1/NF- κ B pathway is involved in the development of cardiac hypertrophy.

Key words Cardiac hypertrophy; Transforming growth factor-activated kinase 1; Nuclear factor- κ B; Inflammation; Heart failure

基金项目:国家自然科学基金资助项目(重点项目)(81530012);国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81770399);国家重点研发计划项目(2018YFC1311300);国家卫生和计划生育委员会医药卫生科技发展研究中心基金资助项目(2016ZX-008-01);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042018kf0121)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科、代谢与相关慢病湖北省重点实验室

通讯作者:唐其柱,电子邮箱:qztang@whu.edu.cn

心肌肥厚是心脏负荷增加或遭受损伤时的一种代偿性反应,虽然在早期可以减轻心室壁压力和维持心排出量,但长期持续的心肌肥厚会发展为失代偿,导致心室功能障碍,最终发生心力衰竭^[1]。压力负荷是心肌肥厚最常见的原因之一,高血压、主动脉瓣狭窄等疾病均会导致左心室压力负荷的升高,促进心肌肥厚发生。心肌肥厚涉及心肌细胞增大和功能障

碍、间质纤维化等多种病理生理反应,参与心肌肥厚的分子机制也非常复杂,目前尚未完全阐明。虽然针对神经体液机制的治疗能够在一定程度上改善心肌肥厚,但是仍有相当数量的心肌肥厚与心力衰竭患者疗效不佳^[2]。探索心肌肥厚的发生、发展机制,寻找潜在的防治靶点,对于减少高血压等心血管疾病的并发症、遏制心力衰竭的发展具有重要意义。

近年来研究显示,炎症反应与心肌肥厚及心力衰竭关系密切,可能成为调节心肌肥厚进程的新靶点^[3]。转化生长因子活化激酶 1 (transforming growth factor- β activated kinase 1, TAK1) 是促炎细胞信号转导通路中的关键分子,能够激活下游的核因子(nuclear factor, NF)- κ B,促进炎症细胞因子释放,介导炎症反应发生^[4]。然而,TAK1 在心肌肥厚中的作用尚不明确。本研究拟通过胸主动脉缩窄术(aortic banding, AB)建立压力负荷诱导的心肌肥厚模型,检测心肌组织中 TAK1/NF- κ B 与炎症反应水平,以探索 TAK1/NF- κ B 介导的炎症反应在心肌肥厚中的作用,为防治心肌肥厚与心力衰竭提供新的潜在分子靶点。

材料与方法

1. 实验动物:以 8~10 周龄、体质量 23.5~27.5 g 的雄性野生型 C57BL/6J 小鼠为研究对象。小鼠饲养于 SPF 级动物中心的独立送回风净化笼具(IVC)中,饮用水经高压处理,饲料经⁶⁰Co 照射灭菌。系统温度维持于 22~24℃,湿度为 50%~60%,12h 明暗交替。小鼠随机分为两组:假手术对照(Sham)组与心肌肥厚模型(AB)组。

2. 心肌肥厚模型的建立:采用胸主动脉缩窄术建立小鼠心肌肥厚模型。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,沿第 2~3 肋间水平切开皮肤,分离肌肉及软组织,游离胸主动脉,以 7-0 手术缝线横穿主动脉下方,将去尖的 26G (小鼠体质量 25.0~27.5 g) 或 27G (小鼠体质量 23.5~25.0 g) 注射器针头平行放置于血管上方,针头连同主动脉一起结扎,随后立即抽出针头,使用超声多普勒检测评估主动脉狭窄程度,以确定手术造成了主动脉约 70% 狭窄^[5]。对照组在分离出主动脉后,只挂线不结扎,其余手术步骤与 AB 组相同。术后 8 周进行各项指标检测。

3. 超声心动图:异氟烷(1.5%~2.0%)持续吸入麻醉,麻醉状态稳定后,小鼠左侧卧位,采用高频超声诊断仪,频率为 15 MHz。取胸骨旁左心室乳头肌水平短轴切面,测量舒张期室间隔厚度(IVSD)、舒张

期左心室后壁厚度(LVPWD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室舒张末期内径(LVEDD)以及短轴缩短率(FS)等指标。

4. 心脏取材:称量小鼠体质量,采用颈椎脱臼法处死小鼠,立即取出心脏,称量心脏质量。取材完成后半数心脏放至-80℃冰箱保存,用于 Western blot 法与 RT-PCR 法检测。其余心脏放入 4% 甲醛溶液中固定,用于病理学与免疫荧光检测。

5. 病理学检测:将固定后的小鼠心脏横切,进行脱水、透明、浸蜡,包埋入石蜡块。制备出 4~5 μ m 厚的组织切片,进行常规 HE 与天狼猩红染色,显微镜下观察、拍照。使用图像分析软件(Image Pro-Plus 6.0)计算心肌细胞横截面积与心肌组织胶原容积分数。

6. 免疫荧光:组织切片采用柠檬酸盐高压修复法进行抗原修复,10% 羊血清 37℃ 孵育 60 min 进行封闭。CD68 一抗 4℃ 孵育过夜,绿色荧光标记的二抗湿盒中 37℃ 孵育 60 min。滴加含有 DAPI 的封片剂封片,放置 5 min 左右后,在荧光显微镜下观察、拍照。拍照时在同一视野下分别拍摄绿色激发荧光与蓝色激发荧光两张图片,并使用 Image-pro plus 6.0 软件合成,计算各组 CD68 阳性细胞数。

7. 实时定量 RT-PCR 法:TRIzol 提取心肌组织总 RNA,分光光度法检测 RNA 纯度及浓度。每个样本取 2 μ g 总 RNA,使用反转录试剂盒(20 μ l 反应体系)进行反转录。得到的 cDNA 以 LightCycler 480 SYBR Green 1 Master Mix 反应体系进行 PCR 扩增:95℃ 变性 10 min,随后 95℃ 15 s 进行 40 个循环,GAPDH 作为内参。

8. Western blot 法:使用 RIPA 裂解液研磨心肌组织,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。蛋白样品经 SDS-PAGE 进行分离,然后转移至 PVDF 膜,于封闭液中封闭 2 h。继以待测蛋白的一抗 4℃ 孵育过夜,荧光标记的二抗室温孵育 1 h,置于双通道荧光扫描仪中扫膜,计算机分析结果。

9. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较采用两独立样本的 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 超声心动图与心脏质量:AB 术后 8 周的模型组小鼠左心室室壁厚度与室腔大小明显增加,而短轴缩短率明显下降,出现了明显的左心室结构异常与心

功能障碍(表 1)。心肌肥厚模型组小鼠心脏质量/体质量(HW/BW, mg/g)较对照组明显增加($4.07 \pm 0.12\text{mg/g}$ vs $8.07 \pm 0.45\text{mg/g}$, $P < 0.05$)。

表 1 两组小鼠超声心动图检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	IVSD (mm)	LVPWD (mm)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)	FS (%)
Sham 组	0.64 ± 0.01	0.68 ± 0.01	2.10 ± 0.04	3.70 ± 0.04	80.00 ± 0.73
AB 组	$0.82 \pm 0.01^*$	$0.81 \pm 0.02^*$	$3.70 \pm 0.18^*$	$5.00 \pm 0.14^*$	$56.00 \pm 2.70^*$

与 Sham 组比较, * $P < 0.05$

2. 病理学检测结果:HE 染色显示,模型组小鼠心肌细胞排列紊乱,横截面积较对照组明显增大,出现了明显的心肌肥厚(图 1)。PSR 染色显示,模型组

小鼠组织间隙染为红色的胶原成分明显增多,心肌组织胶原沉积、纤维化(图 2)。

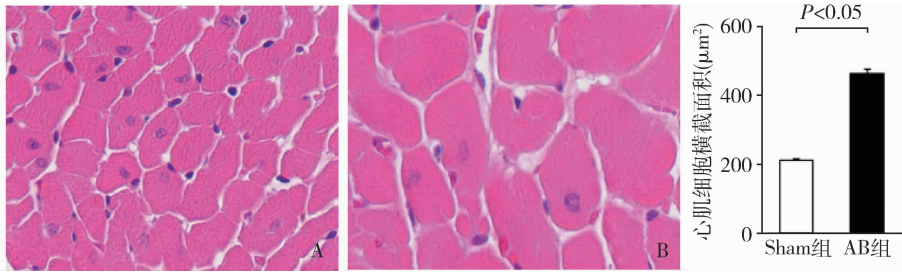


图 1 心肌组织 HE 染色结果($\times 400$)
A. Sham 组;B. AB 组

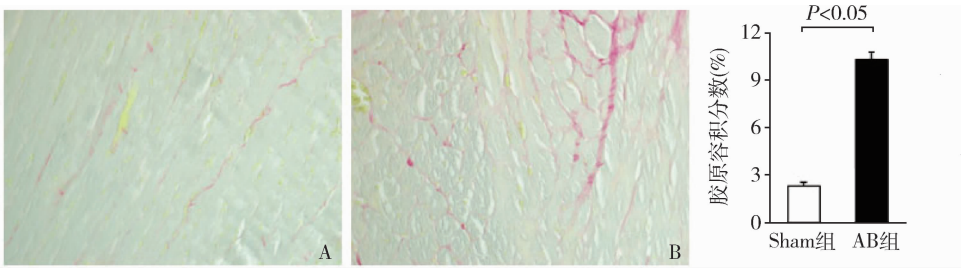


图 2 心肌组织 PSR 染色结果($\times 400$)
A. Sham 组;B. AB 组

3. 肥厚心肌组织中炎性反应增加:通过 CD68 免疫荧光标记单核-吞噬细胞,检测心肌组织炎性浸润情况。心肌肥厚模型组小鼠心肌组织中 CD68 阳性细胞数明显多于对照组(图 3)。此外,RT-PCR 检

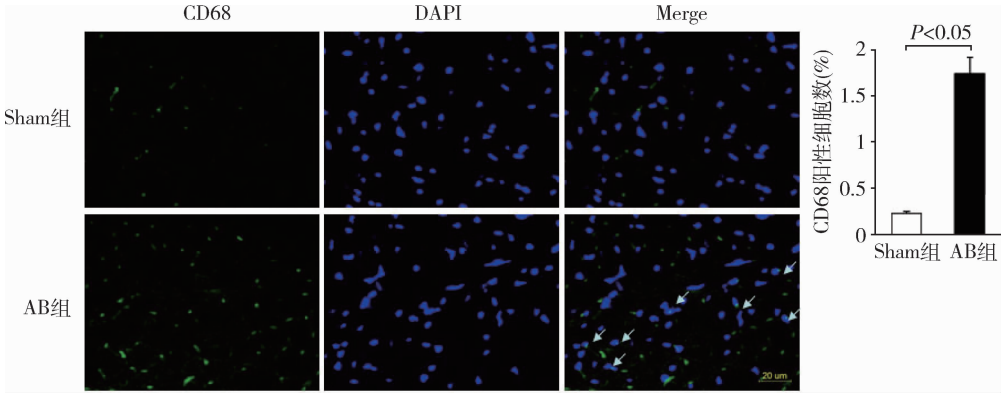


图 3 心肌组织 CD68 免疫荧光检测($\times 400$)

测发现,心肌组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与白介素-1 β (IL-1 β)等炎症反应标志物的 mRNA 表达水平在模型组中明显升高(图4)。

4. 肥厚心肌组织中 TAK1/NF- κ B 通路激活: Western blot 法检测结果显示,心肌肥厚模型组小鼠心肌组织中 TAK1、 κ B 抑制蛋白激酶 β (IKK β)与 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)的磷酸化水平较对照组明显上调,I κ B α 总蛋白水平降低,NF- κ B p65 磷酸化水平增加,TAK1/NF- κ B 信号通路的激活(图5)。

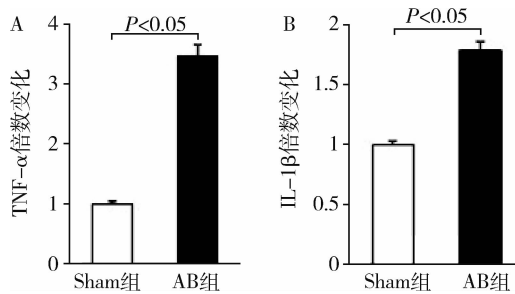


图4 心肌组织炎症反应标志物表达结果

A. TNF- α ; B. IL-1 β

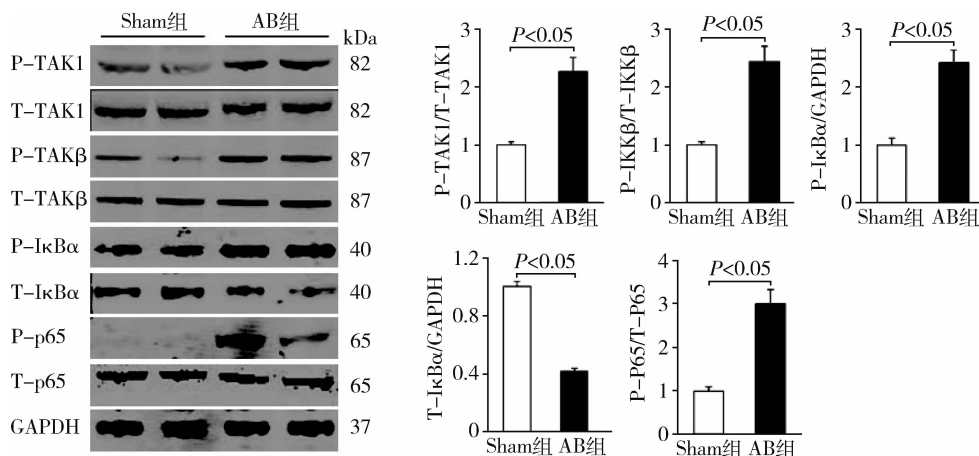


图5 肥厚心肌组织中 TAK1/NF- κ B 信号通路的激活

讨 论

心肌肥厚是心力衰竭的关键性临床阶段,是多种心血管疾病向心力衰竭发展的共有病理生理过程,涉及心肌细胞增大、排列紊乱和功能障碍、间质纤维化等多种病理改变。本研究通过主动脉缩窄术成功建立了压力负荷诱导的心肌肥厚模型,并使用超声心动图、HE 与 PSR 染色进行评估,在术后 8 周观察了模型组小鼠心肌肥厚、室腔扩大、心功能不全以及各种病理学表现。

然而,参与心肌肥厚的分子机制非常复杂,迄今尚未完全阐明。近年来,炎症反应及其相关信号通路在心肌肥厚中的作用逐渐受到重视。临床研究显示,左心室肥厚患者体内存在系统性炎症反应,其血清中的炎症反应标志物 CRP 以及促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 与 IL-6 的表达均明显升高^[6]。另外,心肌组织中包括心肌细胞在内的多种细胞能够分泌炎症细胞因子,并表达炎症细胞因子受体;心脏既是炎症细胞因子产生的场所,也是其作用的靶器官^[7]。因此,炎症反应不仅仅是心肌肥厚与心力衰竭的标志物与预后指标,同时参与了心肌肥厚的进程,与心肌

细胞肥大与心肌间质纤维化等病理过程密切相关^[8]。本研究显示,心肌肥厚模型组小鼠心肌组织中 CD68 阳性细胞数明显增多,TNF- α 与 IL-1 β 等炎症反应标志物的 mRNA 表达水平也明显升高,提示心肌出现炎症细胞浸润与促炎性细胞因子的产生。

NF- κ B 是调节炎症反应的关键转录因子,在细胞生长、增殖、凋亡和细胞外基质重塑等多种病理生理过程中也发挥重要作用^[9]。NF- κ B 二聚体(经典组合为 p65 和 p50)通过与 NF- κ B 抑制剂(I κ Bs)结合而失活,I κ Bs 在静息状态的细胞胞质维持 NF- κ B 的稳定^[10]。而在应激情况下,I κ Bs 可被 I κ B 激酶(IKKs,如 IKK β)磷酸化,导致 I κ Bs 的泛素化并降解,解除 I κ Bs 对 NF- κ B 的抑制,进而引起 NF- κ B 的释放和活化^[11]。已有研究发现,在体外培养的大鼠心肌细胞中,NF- κ B 可被多种肥厚刺激物激活,包括血管紧张素 II、苯肾上腺素和内皮素-1^[12]。本研究结果显示,AB 组 IKK β 与 I κ B α 的磷酸化水平较对照组明显上调,I κ B α 总蛋白水平降低,NF- κ B p65 磷酸化水平增加,进一步证实 NF- κ B 信号通路可在压力负荷诱导的心肌肥厚中激活。

但是, NF- κ B 在心肌肥厚中的作用尚存争议。过表达 NF- κ B 会促进肥厚刺激引起的心房利钠肽的表达和心肌细胞的增大, 而超抑制型 I κ B α 突变体或显性负性 IKK β 突变体的表达会抑制 NF- κ B 并减轻这些肥厚^[12]。小鼠心脏特异性 p65 缺失可缓解压力负荷诱导的心肌肥厚, 改善病理性心肌重构, 增强心脏收缩功能^[13]。以 sh-p65 RNA 转染心脏, 抑制 NF- κ B, 可减轻 Myo 转基因小鼠的自发性心肌肥厚^[14]。这些发现提示 NF- κ B 具有促进心肌肥厚的作用, 然而, 也有一些研究存在相反的结果。Hikoso 等^[15]报道, 心脏特异性敲除 IKK β 会降低 NF- κ B 活性, 但却加重了压力负荷诱导的心肌肥厚、心室扩张以及心功能障碍。NF- κ B 必须调节蛋白 (NF- κ B-essential modulator, NEMO) 是 IKK 复合物的调节亚基, 通过其心脏特异性缺失可抑制 NF- κ B 通路, 并促进压力负荷诱导的心肌肥厚与心力衰竭^[16]。这些结果则提示 NF- κ B 通路对心肌肥厚也具有保护作用。NF- κ B 在心肌肥厚中作用不一致的原因可能是由于模型构建的不同、实验环境的不同、NF- κ B 作用靶点的多样性以及 NF- κ B 上游调控分子的多样性所导致的。

TAK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 能够被转化生长因子- β 、Toll 样受体、NOD 样受体等多种因素激活, 是 NF- κ B 信号通路关键的上游调节因子^[17]。TAK1 可以使 IKK 磷酸化, 激活 IKK 复合物, 促进 I κ B 的磷酸化与降解, 致使 NF- κ B 的游离及活化入核, 诱导 TNF- α 等促炎性细胞因子表达^[18,19]。但是, 心肌肥厚过程中 TAK1 的作用及其与 NF- κ B 和炎症反应的关系, 尚不明确。本研究在心肌肥厚小鼠模型中发现, TAK1 的磷酸化水平较对照组明显增加, 与 NF- κ B p65 的变化趋势一致, 同时伴有心肌组织炎症浸润, 提示 TAK1 可能作为上游分子激活 NF- κ B 以及炎症反应, 并参与心肌肥厚的发生、发展。

综上所述, 本研究在压力负荷诱导的小鼠心肌肥厚模型中, 发现了 TAK1/NF- κ B 通路的激活与心肌组织炎症浸润, 提示 TAK1/NF- κ B 及其介导的炎症反应参与了心肌肥厚的发生、发展, 为探索心肌肥厚的分子机制与寻找潜在的防治靶点提供了一定的理论基础。

参考文献

- Zhou H, Li N, Yuan Y, *et al.* Activating transcription factor 3 in cardiovascular diseases: a potential therapeutic target [J]. *Basic Res Cardiol*, 2018, 113(5): 37
- Dinatólo E, Sciatti E, Anker MS, *et al.* Updates in heart failure: what last year brought to us [J]. *ESC Heart Fail*, 2018, 5(6): 989-1007
- Bacmeister L, Schwarzl M, Warne S, *et al.* Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 19
- Zou W, Yin P, Shi Y, *et al.* A novel biological role of alpha-mangostin via TAK1-NF- κ B pathway against inflammatory [J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 103-112
- Jiang DS, Liu Y, Zhou H, *et al.* Interferon regulatory factor 7 functions as a novel negative regulator of pathological cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2014, 63(4): 713-722
- Mocan M, Mocan Hognogi LD, Anton FP, *et al.* Biomarkers of inflammation in left ventricular diastolic dysfunction [J]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 7583690
- Carrillo-Salinas FJ, Ngwenyama N, Anastasiou M, *et al.* Heart inflammation: immune cell roles and roads to the heart [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(8): 1482-1494
- Briasoulis A, Androulakis E, Christophides T, *et al.* The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2): 169-176
- Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57
- Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular specificity of NF- κ B function in the nervous system [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1043
- Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(5): 414-429
- Purcell NH, Tang G, Yu C, *et al.* Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6668-6673
- Liu Q, Chen Y, Auger-Messier M, *et al.* Interaction between NF- κ B and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling [J]. *Circ Res*, 2012, 110(8): 1077-1086
- Gupta S, Young D, Maitra RK, *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF- κ B [J]. *J Mol Biol*, 2008, 375(3): 637-649
- Hikoso S, Yamaguchi O, Nakano Y, *et al.* The I κ B kinase β /nuclear factor κ B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression [J]. *Circ Res*, 2009, 105(1): 70-79
- Kratsios P, Huth M, Temmerman L, *et al.* Antioxidant amelioration of dilated cardiomyopathy caused by conditional deletion of NEMO/IKKgamma in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 133-144
- Fechtner S, Fox DA, Ahmed S. Transforming growth factor beta activated kinase 1: a potential therapeutic target for rheumatic diseases [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56(7): 1060-1068
- Hong CS, Park MR, Sun EG, *et al.* Gal-3BP negatively regulates NF- κ B signaling by inhibiting the activation of TAK1 [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1760
- Meng Z, Si CY, Teng S, *et al.* Tanshinone II A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through the TLR4/TAK1/NF- κ B signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(4): 1847-1858

(收稿日期: 2019-09-09)

(修回日期: 2019-10-15)