

但由于纳入研究的方法设计及报告质量的局限性,需要高质量临床研究的验证,未来期待设计更加严谨、随访时间较长的多中心、随机对照双盲、大样本 RCT 的出现,为中药治疗 MS 的临床有效性和安全性提供更加有力的研究证据。

参考文献

- 1 Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, *et al.* Metabolic syndrome: definitions and controversies[J]. BMC Med, 2011, 9(1): 48
- 2 Lu J, Wang L, Li M, *et al.* 2010 China noncommunicable disease surveillance group. Metabolic syndrome among adults in China – The 2010 China noncommunicable disease surveillance[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016; jc20162477
- 3 祝之明. 代谢综合征的临床特征与发病机制[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 17–20
- 4 中华医学会糖尿病学分会代谢综合征研究协作组中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(3): 156–161
- 5 宋秀霞, 纪立农. 国际糖尿病联盟代谢综合征全球共识定义[J]. 中华糖尿病杂志, 2005, 13(3): 178–180
- 6 Higgins JPT, Green S. Cochrane Handbook for systematic reviews of interventions[M]. Chichester UK: Wiley and Sons, 2008
- 7 邓舜, 吴桂熙, 王永年, 等. 健脾益肾化痰祛湿法治疗代谢综合征临床观察[J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(6): 34–35

- 8 董学敏. 血管软化汤治疗代谢综合征临床研究[J]. 中医学报, 2012, 27(8): 1006–1007
- 9 甘莉, 章可谓, 葛丹枫. 泻浊茶治疗代谢综合征 63 例[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(11): 803
- 10 柏江锋. 燮理颗粒治疗代谢综合征的临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(6): 35
- 11 徐秋, 翟宏伟, 邱娟娟, 等. 脂糖安颗粒治疗代谢综合征临床研究[J]. 中国中医急症, 2014, 23(8): 1455–1457
- 12 黎燕华, 陈雪梅, 陈丽霞. 中药治疗代谢综合征的临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2013, 13(9): 58–59
- 13 张奇, 张志民, 时俊伟, 等. 化湿解毒法治疗代谢综合征 100 例临床观察[J]. 中医药临床杂志, 2008, 20(2): 145–147
- 14 宋镇星. 调脂胶囊治疗代谢综合征疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(10): 1294–1295
- 15 汪锦丹, 曾健球, 林乐野. 颜氏益心方对代谢综合征患者临床疗效观察[J]. 深圳中西医结合杂志, 2015, 24(8): 28–29
- 16 许忆峰, 荆可辉, 吴雁翔. 中医辨证治疗代谢综合征临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(8): 215–216
- 17 张君波, 唐慈苾, 陆文洁. 自拟九味茶治疗代谢综合征临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(10): 39–41
- 18 冉滨. 益寿丹治疗代谢综合征 80 例临床分析[J]. 药物与人, 2014, 27(11): 175–176

(收稿日期: 2016–12–25)
(修回日期: 2017–01–12)

IRAK4 对心肌细胞凋亡的影响

王兆鹏 袁园 车妍 唐其柱 刘文卫

摘要 **目的** 探讨白介素-1 受体相关激酶-4(interleukin 1 receptor-associated kinase-4, IRAK-4)对心肌肥厚诱导的心肌细胞凋亡的影响。**方法** 本研究采用野生型(C57)和 IRAK4 基因敲除型(heterozygous IRAK4 knockout, IRAK4 HET)两组小鼠,行胸主动脉缩窄术(aortic banding, AB)建立动物模型。术后 4 周取材,用 TUNEL 法检测心肌组织细胞凋亡水平,Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、C-caspase-3 的表达水平。观察 IRAK4 基因敲除对压力负荷诱导的小鼠心肌组织中心肌细胞凋亡的影响;采用 H9C2 细胞(对照组)和 IRAK4 过表达的 H9C2 细胞(pcDNA3.1-IRAK4),使用血管紧张素 II(Ang II)分别刺激 0、15、30、60 min,用 Western blot 法检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、C-caspase-3 的表达水平;Ang II 组和 pcDNA3.1-IRAK4 组细胞经 Ang II 刺激 48 h 后,用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡水平。观察 IRAK4 过表达对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡的影响。**结果** AB 术后,与 C57 组小鼠相比,IRAK4 HET 小鼠 Bax、C-caspase-3 蛋白表达水平显著增高,Bcl-2 蛋白表达水平降低,心肌细胞凋亡水平明显增加;Ang II 刺激后,与 Ang II 组细胞比较,PC DNA3.1-IRAK4 组细胞 Bcl-2 的表达水平上调,Bax、C-caspase-3 的表达水平下调,细胞凋亡数量明显降低。**结论** IRAK4 对心肌肥厚所诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用。

关键词 白介素-1 受体相关激酶-4(IRAK-4) 心肌细胞凋亡

中图分类号 R 541 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.014

Effects of IRAK4 on Myocardial Apoptosis. Wang Zhaopeng, Yuan Yuan, Che Yan, *et al.* Department of Cardiology, Renmin Hospital of

基金项目:教育部博士点基金资助项目(优先发展领域)(20130141130010);湖北省医学领军人才培养工程专项基金资助项目
作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科(王兆鹏、袁园、车妍、唐其柱);441000 襄樊市中心医院心血管内科(刘文卫)
通讯作者:唐其柱,电子信箱:qztang@whu.edu.cn;刘文卫,电子信箱:liuwenwei@medmail.com.cn

Wuhan University, Hubei 43000, China

Abstract Objective To observe the effect of Interleukin 1 receptor - associated kinase - 4 (IRAK4) on myocardial apoptosis induced by cardiac hypertrophy. **Methods** Wild type C57 mice and heterozygous IRAK4 knockout mice (IRAK4 HET mice) were divided into two groups. Each group used aortic banding (AB) to establish animal models, observed the apoptosis of myocardial cells in each group after 4 weeks. The apoptosis of myocardial cells were tested by TUNEL method. The protein levels of Bcl - 2, Bax and C - caspase - 3 were detected by western blotting. We observed the effect of apoptosis in myocardial cells induced by pressure overload in heterozygous IRAK4 knockout mice. In vitro studies were performed using H9C2 cells (Ang II) and IRAK4 - overexpressed H9C2 cells (pcDNA3.1 - IRAK4). The protein levels of Bcl - 2, Bax and C - caspase - 3 were detected by western blotting after angiotensin II (Ang II) stimulation for 0, 15, 30, 60min, cardiac myocytes apoptosis was tested by TUNEL. We observed the effects of IRAK4 - overexpression on the apoptosis of myocardial cells induced by Ang II. **Results** After aortic banding, the protein expression levels of Bax and C - caspase - 3 were significantly increased in IRAK4 HET mice compared with C57 group, while the protein expression levels of Bcl - 2 was evidently reduced, and the level of myocardial apoptosis was significantly increased. Compared with Ang II group, the expression level of Bcl - 2 in pcDNA3.1 - IRAK4 cells was up - regulated, the expression levels of C - caspase - 3 and Bax were down - regulated after stimulation of Ang II, the apoptosis of pcDNA3.1 - IRAK4 cells was significantly decreased. **Conclusion** IRAK4 has protective effects on myocardium by preventing myocardial apoptosis induced by cardiac hypertrophy.

Key words Interleukin1 receptor - associated kinase - 4 (IRAK4); Myocardial apoptosis

细胞凋亡是指机体在有害物质、破损细胞等体内外诱导因素下激活细胞内某些编码基因而导致的细胞死亡,是程序性死亡的一种。目前普遍认为凋亡相关基因的表达受到某些激活的信号通路影响发生改变,激活或合成执行凋亡的多种酶,从而导致了细胞凋亡。大量研究表明,心肌细胞凋亡与心力衰竭、再灌注心肌损伤、心肌梗死等心血管疾病有着密切联系^[1-3]。

Toll 样受体 (toll - like receptor, TLR) 所介导的信号通路是细胞凋亡过程的重要环节,白介素 - 1 受体相关激酶 - 4 (IRAK4) 是 TLR/白介素 - 1 (interleukin - 1 receptor, TIR) 信号转导通路下游的关键因子,在 TLR 信号通道介导的细胞凋亡中有着重要作用^[4,5]。而 IRAK4 与心肌细胞凋亡的关系目前尚未见报道。本研究初步探讨了 IRAK4 对心肌肥厚所诱导的心肌凋亡的影响以期为以后的临床应用与研究提供实验依据。

材料与方法

1. 实验动物:野生型 C57 与以其为研究背景的 IRAK4 基因敲除的雄性小鼠各 20 只。IRAK4 基因敲除的小鼠由加拿大多伦多大学 Liu 教授赠送,本研究所有动物实验均得到武汉大学人民医院动物保健与使用委员会批准。

2. 实验材料:蛋白 BCA 定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司,Bcl - 2 抗体、Bax 抗体、C - caspase - 3 抗体均购自美国 CST 公司;DMEM 培养基和胎牛血清购自

美国 Gibco 公司,H9C2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;Tunel 染色试剂盒购自美国 Roche 公司;胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自中国 Tiangen Biotech 公司;BamH I 酶、EcoR I 酶、Solution I、dTNP Mixture, 5 × PrimeSTAR 和 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 购自日本 TaKaRa 公司,pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒为自制^[6]。

3. TUNEL 染色:细胞染色在 24 孔板中进行,分成 3 组: H9C2 (对照组)、对照组 + Ang II (Ang II 组)、导入 pcDNA3.1 - IRAK4 质粒的 H9C2 + Ang II (pcDNA3.1 - IRAK4 组,pcDNA3.1 - IRAK4 重组质粒制备与转染方法同上),Ang II 组与 pcDNA3.1 - IRAK4 组均使用 Ang II 刺激 48h,对照组不做任何处理。每组均采用 4% 多聚甲醛 (PBS 稀释) 固定细胞爬片,按照 TUNEL 试剂说明书染色,DAPI 封片,荧光显微镜下观察凋亡细胞数量。组织染色使用石蜡切片,二甲苯浸洗切片 2 次,每次 5min,随后用梯度乙醇 (100%、95%、90%、80%、75%) 各浸洗 1 次,每次 3min,根据 TUNEL 试剂说明书染色,DAPI 封片,荧光显微镜下观察细胞凋亡数量。

4. 动物模型的制备:8 ~ 10 周龄 IRAK4 HET 小鼠和 C57 小鼠随机分成两组:IRAK4 + AB、C57 + AB。戊巴比妥钠麻醉 (80mg/kg) 后行胸主动脉缩窄术,术后 4 周取材^[7]。

5. 体外实验:将复苏后的 H9C2 细胞接种到含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基的培养皿中,放入含 5% CO₂ 的 37℃ 温箱培养。把培养好的细胞接种

到 4 块 6 孔板中,每块 6 孔板分成 Ang II 组和 PCDNA3.1 - IRAK4 组,每组各 3 个孔,放入温箱备用。依照 FuGENE@ HD Transfection Reagent 说明书将制备好的质粒转染入 PCDNA3.1 - IRAK4 组细胞中,放入 5% CO₂ 温箱培养。转染后 12h 将培养液换成不含血清的细胞培养液继续培养 24h,然后用 Ang II 对其中 4 块 6 孔板分别刺激 0、15、30、60min,另外一块不做任何处理。弃培养基,根据 RIPA 试剂说明裂解细胞,离心取上清液,为接下来的 Western blot 法检测做准备。

6. Western blot 法检测细胞和组织 Bcl - 2、Bax、C - caspase - 3 表达水平:按照蛋白提取试剂盒的说明提取总蛋白,采用 BCA 法对所提蛋白定量并将所有样本蛋白稀释至适宜浓度,72℃ 水浴加热后放入 - 80℃ 冰箱储存。制备电泳凝胶,点样(每组 2 个样

品,每个孔 20μl),在 75V 电压下电泳 2h,随后转膜 1.5h。转膜过后,将膜浸入 5% 的脱脂牛奶(TBS 稀释)中封闭 1h,再用 TBST 清洗 3 遍,加入一抗后放入 4℃ 冰箱过夜。按照一抗抗体说明书加入二抗,双通道荧光扫描仪扫膜,计算机分析结果。组织实验 Western blot 法同上。

7. 统计学方法:本研究使用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,所有实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据之间均采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. TUNEL 染色显示细胞凋亡情况:对照组在 AngII 刺激 48h 后可见凋亡细胞(绿色荧光部分)所占比例明显增加。pcDNA3.1 - IRAK4 组在细胞 AngII 刺激 48h 后可见凋亡细胞所占比例明显降低(图 1)。

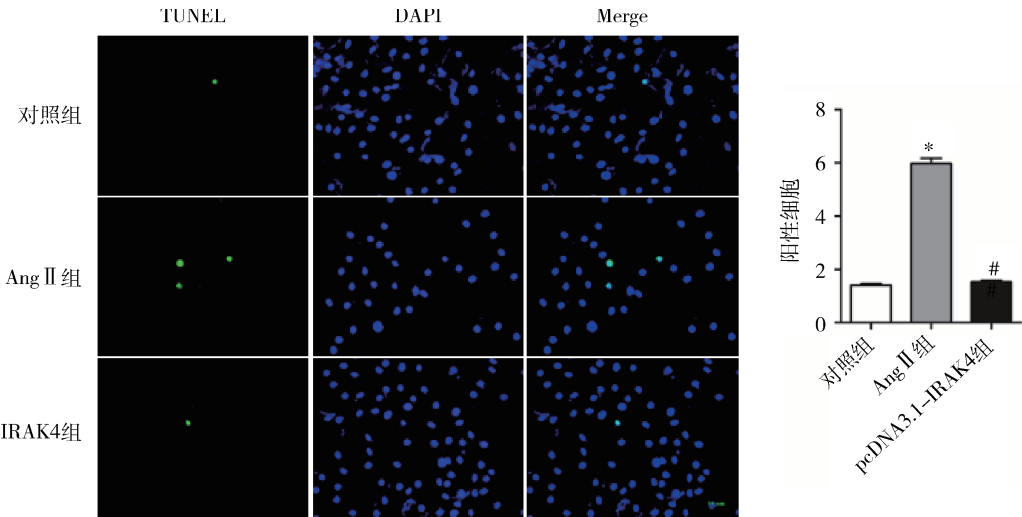


图 1 Ang II 刺激后各组细胞的凋亡情况
与对照组比较,* *P* < 0.05;与 Ang II 组比较,# *P* < 0.01

2. 石蜡切片染色结果:与野生型 C57 小鼠比较, IRAK4 HET 小鼠在 AB 术后 4 周凋亡细胞(绿色荧光

部分)所占的比例明显增加(图 2)。

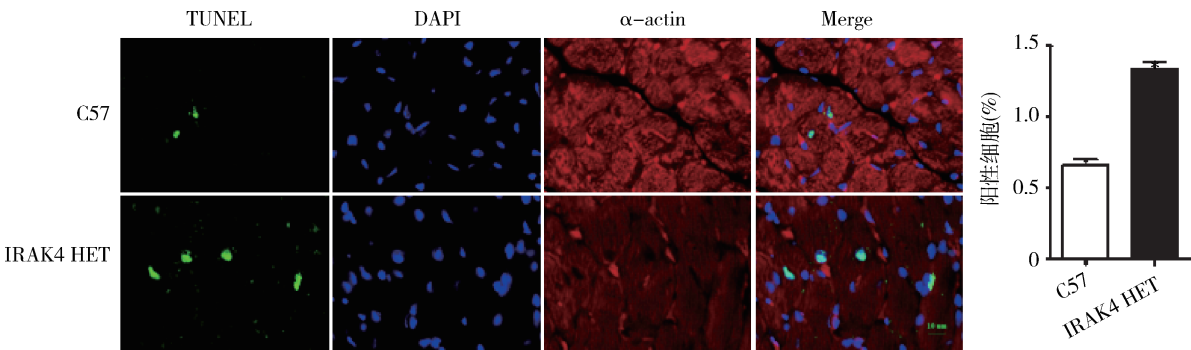


图 2 AB 术后 4 周 TUNEL 染色显示组织凋亡情况
与 C57 比较,* *P* < 0.05

3. Western blot 法检测 Ang II 刺激后各时段凋亡相关蛋白表达水平: pcDNA3.1-IRAK4 组细胞在

Ang II 刺激后 Bcl-2 表达水平上调, C-caspase-3、Bax 的表达水平下调(图 3)。

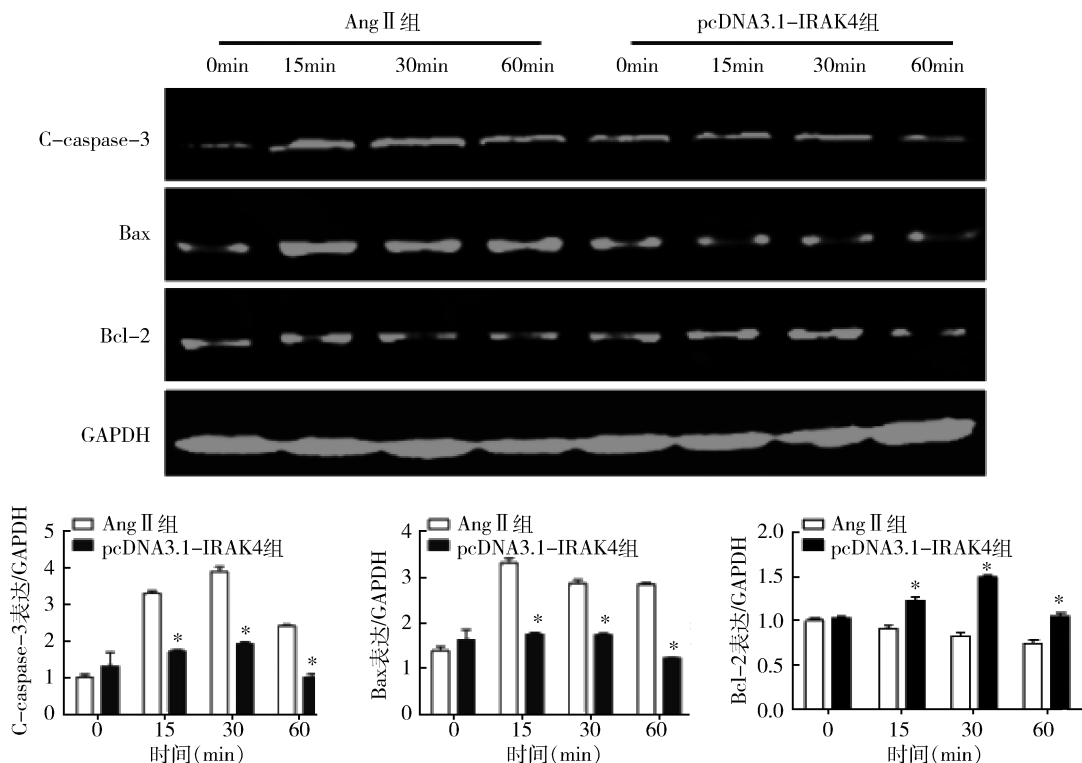


图 3 Ang II 刺激后 H9C2 凋亡相关蛋白表达情况

与 Ang II 组比较, * $P < 0.05$

4. Western blot 法检测组织凋亡相关蛋白表达水平:与 C57 比较, IRAK4 HET C-caspase-3 和 Bcl-

2 表达水平明显上调, Bax 表达水平下调(图 4)。

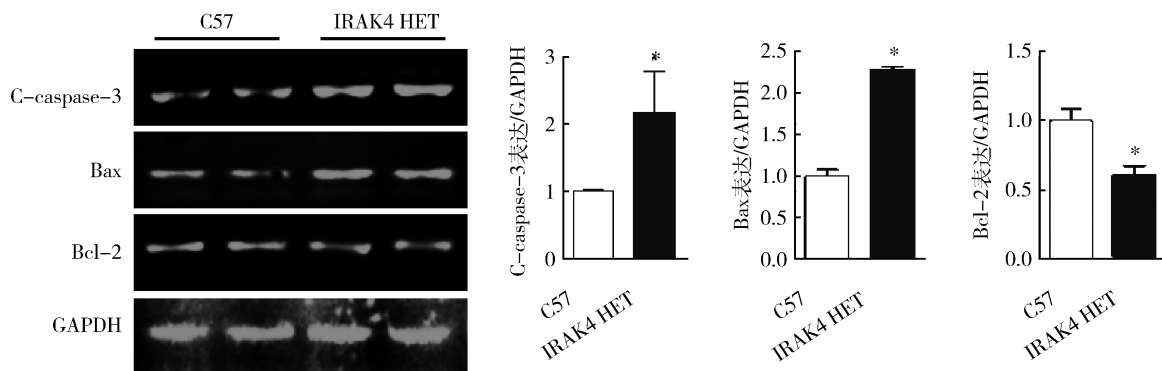


图 4 AB 术后 4 周凋亡相关蛋白的表达情况

与 C57 比较, * $P < 0.05$

讨 论

IRAK4 是 IRAK 家族中的一员, 该家族还有 IRAK1、IRAK2、IRAK3 3 个成员, 在机体免疫、炎症反应、细胞凋亡中起着重要作用。IRAK 均具有两个特殊的结构域, N 端保守的死亡结构域(death domain,

DD) 和一个富含丝氨酸和苏氨酸的激酶结构域(kinase domain, KD)^[8]。研究表明, IRAK4 与 TLR 介导的凋亡通路有着密切联系, IRAK4 的死亡结构域可募集 TLR 调控信号分子 MyD88, 引起 IRAK1 磷酸化, 磷酸化的 IRAK1 与 TRAF6 形成复合物, 与 TAK1 互相

作用,继而磷酸化 I- κ B,I- κ B 是一种抑制蛋白,其通过与 NF- κ B 结合而使 NF- κ B 保持失活状态,I- κ B 磷酸化导致其泛素化并激活酶系自我降解,NF- κ B 失去 I κ B 的抑制向细胞核内易位,激活 NF- κ B 途径的凋亡相关基因转录从而调控细胞凋亡^[9-11]。

细胞凋亡的情况可以用 Bcl-2、Bax、C-caspase-3 表达水平表明。Bcl-2 和 Bax 同属于 Bcl-2 家族,该家族由促凋亡蛋白(如 Bax)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2)组成,Bcl-2 可以通过抑制凋亡蛋白 Bax 的功能抵抗细胞凋亡^[12]。caspase-3 在 caspase 所介导的凋亡通路中起到关键作用^[13],其可通过细胞表面死亡受体途径和线粒体引发途径调控细胞凋亡。在本研究中,AB 术后 C57 组和 IRAK4 HET 组小鼠的凋亡相关蛋白表达水平的结果显示在敲除 IRAK4 基因后,给予压力负荷刺激,小鼠对凋亡的耐受能力降低。Ang II 诱导细胞凋亡后,通过 Western blot 法检测比较两组细胞凋亡蛋白的表达情况,可以推测出 IRAK4 的表达可以增强细胞抵抗凋亡的能力。TUNEL 染色的结果显示,转入 pcDNA3.1-IRAK4 质粒的细胞在 Ang II 的诱导下凋亡细胞数量较对照组明显减少,增加压力负荷后,IRAK4 HET 组小鼠凋亡细胞数量较 C57 组显著增加,通过对以上实验结果的分析,认为 IRAK4 基因在心肌肥厚所诱导的心肌细胞凋亡中起保护作用。

综上所述,细胞凋亡在心血管系统疾病的发生、发展中起着重要的作用,完善其凋亡机制对心血管疾病的预防与治疗有着重要意义。通过本研究笔者发现了 IRAK4 对心肌肥厚所诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用,虽未能进行更加深入的探索,但为进一步的研究提供了实验依据。

参考文献

- Zungu-Edmondson M, Suzuki YJ. Differential stress response mechanisms in right and left ventricles[J]. Rare Dis Res Treat, 2016, 1(2):39-45
- Zhu J, Yao K, Wang Q, et al. Ischemic postconditioning-regulated miR-499 protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis through PDCD4[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6):2364-2380
- Wang D, Zhu H, Yang Q, et al. Effects of relaxin on cardiac fibrosis, apoptosis, and tachyarrhythmia in rats with myocardial infarction[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:348-355
- Kuglstatter A, Villaseñor AG, Shaw D, et al. Cutting edge: IL-1 receptor-associated kinase 4 structures reveal novel features and multiple conformations[J]. Immunology, 2007, 178:2641-2645
- Yuan Y, Gan HW, Tang QZ, et al. IRAK4 deficiency promotes cardiac remodeling induced by pressure overload[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):20434
- 袁园,廖海含,吴青青,等.白介素 1 受体相关激酶 4 重组过表达质粒 pcDNA3.1-IRAK4 的构建及转染[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(4):42-45
- Yan L, Wei X, Tang QZ, et al. Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking AKT/GSK3 β and TGF- β 1-Smad signaling[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92:85-94
- Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members[J]. Mol Cell, 2003, 11(2):293-302
- Lasker MV, Gajjar MM, Nair SK. Nair Cutting edge: molecular structure of the IL-1R-associated kinase-4 death domain and its implications for TLR signaling[J]. J Immunol, 2005, 175(7):4175-4179
- Pennini ME, Perkins DJ, Salazar AM, et al. Complete dependence on IRAK4 kinase activity in TLR2, but not TLR4, signaling pathways underlies decreased cytokine production and increased susceptibility to Streptococcus pneumoniae infection in IRAK4 kinase-inactive mice[J]. J Immunol, 2013, 190(1):307-316
- Janssens S, Beyaert R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(9):474-482
- Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1):45-51
- Lee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10):7320-7326

(收稿日期:2016-12-05)

(修回日期:2016-12-19)

(上接第 21 页)

- Tsugawa D, Fukumoto T, Kido M, et al. The predictive power of serum α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin for survival varies by tumor size in hepatocellular carcinoma[J]. Kobe J Med Sci, 2016, 61(5):124-131
- Manuel RP, Vinh LT, Lorenzo A, et al. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma:diagnostic and prognostic variability[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(1):325-339
- 席强,孙桂荣,丛培珊,等.血清异常凝血酶原和甲胎蛋白联合检测对原发性肝癌的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(12):928-932
- Erdal H, Gül Utku Ö, Karatay E, et al. Combination of DKK1 and AFP improves diagnostic accuracy of hepatocellular carcinoma compared with either marker alone[J]. Turk J Gastroenterol, 2016, 27(4):375-381
- Li Y, Li DJ, Chen J, et al. Application of joint detection of AFP,

- CA19-9, CA125 and CEA in identification and diagnosis of cholangiocarcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(8):3451-3455
- Viggiani V, Palombi S, Gennarini G, et al. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) specifically increased in Italian hepatocellular carcinoma patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51(10):1257-1262
- Wang XP, Su H, Tian HW, et al. Clinical efficacy of magnesium isoglycyrrhizinate in treatment of liver injury among patients with obstructive jaundice after percutaneous transhepatic cholangiodrainage[J]. J Clin Hepatol, 2014, 30(6):563-566
- Miyakawa T, Kajiwara Y, Shirahata A, et al. Vitamin K contents in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients[J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(1):68-74

(收稿日期:2016-12-10)

(修回日期:2016-12-26)