

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2021.06.11

补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 改善急性心肌梗死小鼠心脏功能和减轻心肌组织纤维化

李香敏, 谭延振, 张冰, 赵荣, 易定华, 孙阳, 易蔚, 张平

[摘要]:目的 探究补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (CTRP9) 对减轻急性心肌梗死 (AMI) 后心肌组织纤维化的作用及其机制。方法 构建小鼠 AMI 模型, 使用超声检测左心室射血分数 (LVEF) 评估心脏功能, 应用免疫荧光染色检测 α -SMA/ Vimentin 双染阳性细胞, 心肌组织不同区域 CTRP9 表达情况, 应用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 CTRP9、转化生长因子 (TGF)- β 1 含量, 通过 Masson 染色检测小鼠心肌纤维化情况, Western Blotting 检测心肌组织胶原蛋白 I、TGF- β 1、蛋白激酶 A (PKA)、p-PKA 表达情况。结果 小鼠 AMI 后第 4 天, 血清 CTRP9 水平减低 ($P < 0.001$)、TGF- β 1 水平升高 ($P < 0.001$); AMI 后第 28 天, LVEF 显著减低 ($P < 0.001$), 心肌纤维化明显增加 ($P < 0.001$), 心肌组织 TGF- β 1 水平明显升高 ($P = 0.0025$), 肌成纤维细胞数量大量增加 ($P < 0.001$), PKA 活性增强 ($P = 0.0023$), 胶原蛋白 I 表达明显增加 ($P = 0.0238$); 敲除 CTRP9 小鼠 AMI 组 (10/22) 较野生型小鼠 AMI 组 (10/27) 死亡率增加, 但生存曲线未达到统计学差异, 心脏收缩功能进一步减低 ($P = 0.0010$), 心肌纤维化更加严重 ($P = 0.0395$), PKA 活性受到部分抑制 ($P = 0.0063$), TGF- β 1 ($P = 0.0126$)、胶原蛋白 I ($P = 0.0090$) 表达增加更多; 补充 rCTRP9 后, AMI 组小鼠死亡明显减少, 但生存曲线未达到统计学差异; 心脏收缩功能明显改善 ($P < 0.001$); 心肌纤维化明显减轻 ($P < 0.001$); PKA 活性升高 ($P < 0.001$), TGF- β 1 ($P < 0.01$)、胶原蛋白 I 表达减少 ($P < 0.01$), 应用 PKA 抑制剂 H-89 阻断后, CTRP9 的心肌保护作用被阻断。结论 CTRP9 通过 PKA 通路明显减轻 AMI 小鼠心肌组织纤维化和改善心脏功能。

[关键词]: 补体 1q/肿瘤坏死因子相关蛋白 9; 心肌成纤维细胞; 转化生长因子 β 1; 蛋白激酶 A; 急性心肌梗死

Complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9 improves cardiac function and ameliorates cardiac fibrosis in acute myocardial infarction mice

Li Xiangmin, Tan Yanzhen, Zhang Bing, Zhao Rong, Yi Dinghua, Sun Yang, Yi Wei, Zhang Ping

Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Air Force Medical University,

Shaanxi Xi'an 710032, China

Corresponding author: Zhang Ping, Email: zhangping420@163.com

[Abstract]: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9 (CTRP9) on reducing myocardial fibrosis after acute myocardial infarction (AMI). **Methods** AMI-injured mouse model was established and the left ventricular ejection fraction (LVEF) was measured to assess cardiac function by ultrasound. α -SMA/ vimentin double staining positive cells and the expression of CTRP9 in different regions of myocardium was detected by immunofluorescence staining. The content of serum CTRP9 and TGF- β 1 in mice was detected by ELISA kit, and the myocardial fibrosis was detected by Masson staining. The expression of Collagen I, TGF- β 1, PKA and p-PKA in myocardial tissue was detected by Western Blotting. **Results**

On the fourth day after AMI, serum CTRP9 levels decreased ($P < 0.001$) and TGF- β 1 levels increased ($P < 0.001$). On the 28th day after AMI, the LVEF decreased ($P < 0.001$), myocardial fibrosis increased ($P < 0.001$), TGF- β 1 level in myocardium increased ($P = 0.0025$), the number of myofibroblasts increased ($P < 0.001$), the PKA activity increased ($P = 0.0023$), and the expression of collagen I increased ($P = 0.0238$). Compared with WT-MI + Vehicle group (10/27), the mortality rate of KO-MI + Vehicle group (10/22) increased, but the survival curve did not reach statistical difference. The cardiac contractile function further reduced ($P = 0.0010$), myocardial fibrosis was more severe ($P = 0.0395$), PKA activity was partially inhibited ($P = 0.0063$),

作者单位: 710038 西安, 空军军医大学第二附属医院肾脏内科 (李香敏); 710032 西安, 空军军医大学第一附属医院心血管外科 (谭延振、张冰、赵荣、易定华、易蔚、张平), 老年病科 (孙阳)

通信作者: 张平, Email: zhangping420@163.com

TGF- β 1 ($P=0.0126$) and collagen I expression increased more ($P=0.0090$); After rCTRP9 supplementation, the death of mice in AMI group decreased significantly, but the survival curve did not reach statistical difference; the cardiac contractile function was significantly improved ($P<0.001$); myocardial fibrosis was significantly reduced ($P<0.001$); PKA activity increased ($P<0.001$), TGF- β 1 ($P<0.01$) and collagen I expression decreased ($P<0.01$). However, the myocardial protective effect of CTRP9 was blocked after treated with PKA inhibitor H-89. **Conclusion** CTRP9 significantly ameliorates myocardial fibrosis and improves cardiac function in AMI mice via PKA pathway.

[Key words]: Complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9; Cardiac fibroblasts; Transforming growth factor- β 1; Protein kinase A; Acute myocardial infarction

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的发病率显著下降^[1], 随着早期再灌注治疗策略的实施, 以及新的药理学方法的引入, AMI 的 30 天死亡率降低了 60%, 心脏急性事件期间预后获得了很大改善, 但生存率的提高导致 AMI 后慢性心力衰竭的患者明显增加^[2-3]。AMI 后心力衰竭的发病过程中抗心肌纤维化研究探索一直是心血管领域研究的热点, 但是尚未研究出确实有效的治疗靶点和方法。补体 1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9, CTRP9) 作为一种分泌糖蛋白在心脏高度表达, 参与多种代谢紊乱的发生和发展, 在心血管疾病的保护、炎症的调控及糖脂代谢的调节中发挥重要的作用。CTRP9 在改善 AMI 后心肌重塑中也发挥重要作用, 这与其抗心肌纤维化密切相关, 但具体的分子机制尚未完全明确, 限制其进一步深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料 八周龄健康雄性野生型 C57BL/6 小鼠, 由空军军医大学实验动物中心提供; CTRP9-KO 小鼠由南京大学生物医学研究中心构建。实验动物的饲养及实验条件严格按照国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》进行。抗转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) β 1、抗波形蛋白 (vimentin) 抗体购于 abcam 公司, 苯基吡啶 (DAPI) 蓝色荧光购于 LEAGENE 公司, C1qTNF9 酶联免疫吸附分析试剂盒购于 Cloud-clone 公司, 小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体购于 CMCTAG 公司, 小鼠 TGF- β 1 酶免试剂盒购于 Elabscience 公司, H-89 (二氢氯化物 dihydrochloride) 购于 MedChemExpress 公司, Phospho-PKA C (Thr197) (D45D3) 兔单克隆抗体购于 CST 公司, 重组补体 1q/ 肿瘤坏死因子相关蛋白 9 (recombinant Complement 1q/ tumor necrosis factor related protein 9, rCTRP9) 由本实验室合成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 AMI 模型的构建 小鼠 AMI 模型由美

国 Thomas Jefferson 大学的 Gao Erhe 教授帮助构建。

1.2.2 动物实验分组及给药方式 手术 4 h 后, 待动物麻醉完全复苏后, 将 AMI 组 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: AMI+Vehicle 组 (小鼠进行 AMI 手术+腹腔注射生理盐水); AMI+CTRP9 组 [小鼠进行 AMI 手术+腹腔注射 rCTRP9 0.25 μ g/(g $\cdot$ day)]; AMI+CTRP9+H89 组 [小鼠进行 AMI 手术+腹腔注射 H-89 0.5 μ g/(g $\cdot$ day)+腹腔注射 rCTRP9 0.25 μ g/(g $\cdot$ day)]; 外加另外 3 组: KO-AMI+Vehicle 组 (KO 小鼠进行 AMI 手术+腹腔注射生理盐水); 野生型小鼠 (wild type, WT) 假手术 (Sham)+Vehicle 组 (WT 小鼠进行假手术操作+腹腔注射生理盐水); KO-Sham+Vehicle 组 (KO 小鼠进行假手术操作+腹腔注射生理盐水)。

1.2.3 动物饲养管理 开放管理, 自由采食, 足量饮水。每日检查有无死亡动物, AMI 后第 4 天处死少量动物留取血清标本, 手术后第 28 天行超声心动图检测后, 处死动物, 留取标本。

1.2.4 心脏功能评估 应用 Matrx 动物麻醉机将异氟烷和氧气混合后在麻醉盒内将小鼠麻醉后四肢用胶布固定并继续吸入混合气维持麻醉, 使用 Vevo2100 小动物超声影像系统检测并计算小鼠左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.2.5 取材 应用 Matrx 动物麻醉机将异氟烷和氧气混合后在麻醉盒内将小鼠麻醉, 称重、取血标本、取出心脏用磷酸盐缓冲液将血液冲洗干净后称重。

1.2.6 石蜡包埋小鼠心脏及切片 将小鼠左心室用多聚甲醛固定后修剪、石蜡包埋、切片。

1.2.7 小鼠心脏组织 masson 染色 脱蜡至水、重铬酸钾染色、铁苏木素染色、丽春红酸性品红染色、磷钼酸染色、苯胺蓝染色、分化、透明封片。结果判读: 胶原纤维呈蓝色; 肌纤维呈红色。

1.2.8 心肌组织免疫荧光染色检测 CTRP9 表达及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)/vimentin 双染检测肌成纤维细胞 石蜡切片脱蜡至水、抗原修复、透化处理、封闭、孵育一抗 (CTRP9 稀释比例为 1:50, α -SMA 稀释比例为 1:100, vimentin 稀释比例为 1:100)、孵育二抗、染核、

封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.2.9 波形蛋白 vimentin 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠血清 CTRP9、TGF- β 1 水平 参照 ELISA 试剂盒步骤检测血清 CTRP9、TGF- β 1 水平变化。

1.2.10 免疫蛋白印迹 (Western Blotting) 检测心肌组织蛋白表达 Western Blotting 检测心肌组织胶原蛋白 I、TGF- β 1、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、p-PKA 蛋白表达。

1.3 统计分析 文中和图中的所有数值均以 n 个独立实验的均值 $\pm$ 标准误 (standard error of mean, SEM) 表示。数据用 Graph Pad Prism-5 统计软件进行分析。生存曲线采用 Log-rank (Mantel-Cox) 检验。对两组数据采用 t 检验,对多组数据首先对所有实验组进行单因素方差分析,然后进行 Bonferroni's 多重比较检验。 $P \leq 0.05$ (双侧) 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI 28 d 后,小鼠生存率显著减低,心脏收缩功能明显降低,心肌纤维化程度明显增加 AMI+

Vehicle 组死亡率为 (10/27)、Sham+Vehicle 组为 (0/16), Log-rank (Mantel-Cox) 检验, $I^2 = 7.233$, $P = 0.0072$, AMI 后小鼠生存显著降低; Sham+Vehicle 组心脏重量/体重为 (4.475 ± 0.165) mg/g, AMI+Vehicle 组心脏重量/体重为 (6.675 ± 0.135) mg/g, AMI 后小鼠心脏变大; Sham+Vehicle 组 LVEF 为 $(74.460 \pm 1.668)\%$, AMI+Vehicle 组 LVEF 为 $(25.190 \pm 1.488)\%$, AMI 后小鼠心脏收缩功能明显减低; Sham+Vehicle 组 (左室游离壁) 纤维化为 $(0.495 \pm 0.084)\%$, AMI+Vehicle 组 (梗死交界区) 心肌纤维化为 $(25.410 \pm 1.041)\%$, AMI 后小鼠梗死交界区心肌纤维化明显增加。见图 1。

2.2 AMI 后小鼠心肌组织及血清 CTRP9 水平降低,血清 TGF- β 1 水平明显升高,梗死交界区肌成纤维细胞数量明显增加,PKA 活性增强,纤维化相关蛋白表达明显增加 小鼠 AMI 后第 28 天应用免疫荧光染色检测小鼠 AMI 后心肌组织 CTRP9 表达变化,与 Sham+Vehicle 组 (左室游离壁) 比较, AMI+Vehicle 组 CTRP9 在远离区、交界区及梗死区表达均有不同程度降低,且越接近梗死区,降低越严重。见图 2。

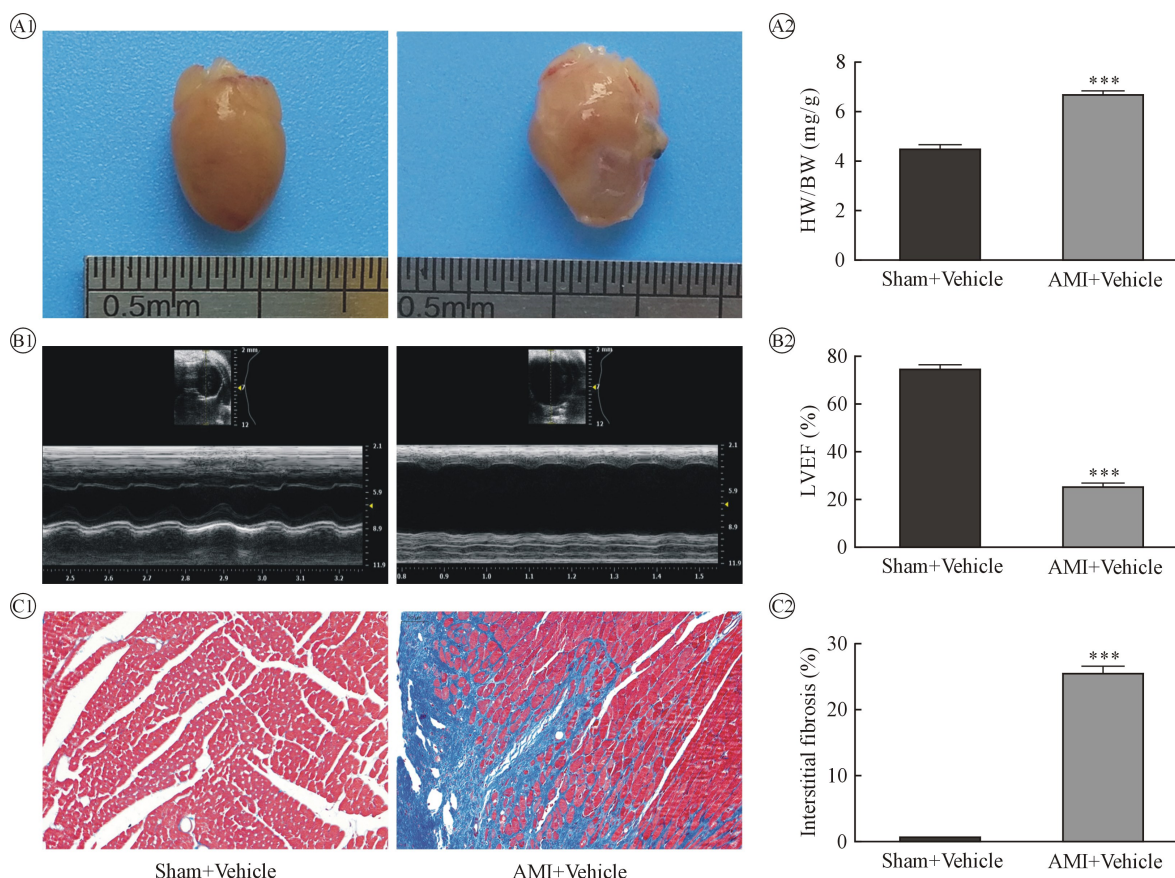


图 1 Sham+Vehicle 组与 AMI+Vehicle 组心脏大小、收缩功能、纤维化程度比较

注:小鼠急性心肌梗死后第 28 天 A1:心脏大小;B1:心脏超声心动图;C1:心肌 Masson 染色图像;A2:心脏重量/体重;B2:左室射血分数统计结果;C2:纤维化统计结果;与 Sham+Vehicle 组相比 *** $P < 0.001$

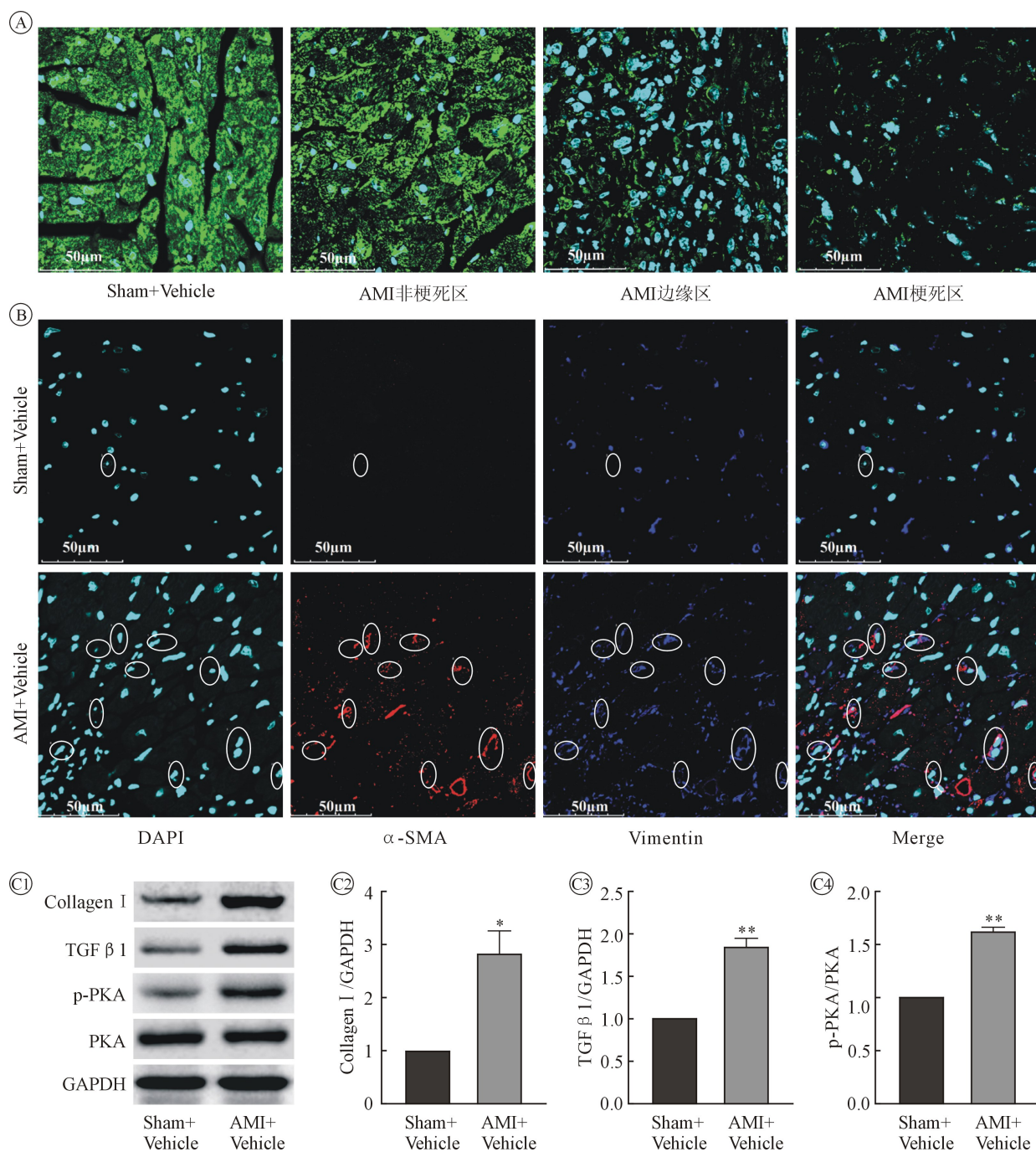


图2 Sham+Vehicle 组与 AMI+Vehicle 组心肌组织染色图像及蛋白变化比较

注:小鼠急性心肌梗死后第 28 天 A:CTRP9 免疫荧光染色;B:α-SMA/Vimentin 双染免疫荧光染色;C1~C4:心肌组织蛋白表达;与 Sham+Vehicle 组相比 ** $P < 0.001$

小鼠 AMI 后第 4 天 Sham+Vehicle 组血清 CTRP9 为 $(907.000 \pm 40.190) \mu\text{g/L}$, AMI+Vehicle 组为 $(519.700 \pm 17.770) \mu\text{g/L}$, $n = 5$, t 检验 $P < 0.001$, AMI 后小鼠血清 CTRP9 水平明显降低。小鼠 AMI 后第 4 天 Sham+Vehicle 组血清 TGF-β1 为 $(66.790 \pm 2.690) \text{ng/L}$, AMI+Vehicle 组为 $(118.500 \pm 6.872) \text{ng/L}$, $n = 5$, t 检验 $P < 0.001$, AMI 后小鼠血清 TGF-

β1 水平明显升高。

小鼠 AMI 后第 28 天 Sham+Vehicle 组心肌组织中(左室游离壁)肌成纤维细胞数量(α-SMA/Vimentin 双染阳性)为 (0.250 ± 0.250) , AMI+Vehicle 组(梗死交界区)为 (7.500 ± 0.646) , $n = 4$, t 检验 $P < 0.001$, AMI 后小鼠梗死交界区肌成纤维细胞数量增加。

小鼠 AMI 后第 28 天 AMI+Vehicle 组心肌组织

(取自梗死交界区)胶原蛋白 I (Collagen I)、TGF- β 1、p-PKA/PKA 分别为 Sham+Vehicle 组(取左室游离壁)的(2.819 $\pm$ 0.427)倍、(1.839 $\pm$ 0.089)倍、(1.605 $\pm$ 0.062)倍, $n=4$, t 检验 $P=0.0238$ 、 $P=0.0025$ 、 $P=0.0023$, AMI 后胶原蛋白 I、TGF- β 1 表达升高, PKA 磷酸化水平增高, 活性显著增加。

2.3 敲除 CTRP9 AMI 小鼠较野生型 AMI 小鼠 28 天死亡率更高, 心脏收缩功能更差, 心肌纤维化更加严重, PKA 活性受到部分抑制, 纤维化相关蛋白表达增加更多 WT-Sham+Vehicle 组小鼠第 28 天死亡率为(0/13), KO-Sham+Vehicle 组为(0/11), WT-AMI+Vehicle 组为(10/27), KO-AMI+Vehicle 组为(10/22)。4 组 Log-rank (Mantel-Cox) 检验, $\chi^2=12.52$, $P=0.0058$, 4 组之间比较有显著的统计学意义, 虽然 KO-AMI+Vehicle 组较 WT-AMI+Vehicle 组死亡率增加, 但 2 组之间 $\chi^2=0.2983$, $P=0.5849$, 生存曲线未达到统计差异。见图 3。

WT-Sham+Vehicle 组心脏重量/体重为(4.475 $\pm$ 0.165) mg/g, $n=6$, KO-Sham+Vehicle 组心脏重量/体重为(4.633 $\pm$ 0.194) mg/g, $n=6$, t 检验 $P=0.5485$, KO-CTR9+Vehicle 组小鼠心脏大小与 WT-Sham+Vehicle 组小鼠无差异; WT-AMI+Vehicle 组心脏重量/体重为(6.675 $\pm$ 0.135) mg/g, $n=6$, KO-AMI+Vehicle 组心脏重量/体重为(7.233 $\pm$ 0.145) mg/g, $n=6$, t 检验 $P=0.0182$, AMI 后 KO-CTR9 型小鼠心脏比 WT-AMI 组明显增大。

WT-Sham+Vehicle 组 LVEF 为(74.460 $\pm$ 1.668)%, $n=5$, KO-Sham+Vehicle 组 LVEF 为(73.400 $\pm$ 1.839)%, $n=5$, t 检验 $P=0.7931$, 两组小鼠心脏收缩功能无差异; KO-AMI+Vehicle 组 LVEF 为(15.100 $\pm$ 1.345)%, $n=5$, WT-AMI+Vehicle 组 LVEF 为(25.190 $\pm$ 1.488)%, $n=5$, t 检验 $P=0.0010$, KO-AMI+Vehicle 组小鼠心脏收缩功能减低更严重。

Masson 染色检测 KO-Sham+Vehicle 组(左室游离壁)纤维化为(0.495 $\pm$ 0.084)%, $n=4$, KO-Sham+Vehicle 组(梗死交界区)纤维化为(0.510 $\pm$ 0.103)%, $n=4$, t 检验 $P=0.9139$, 两组小鼠心肌纤维化程度无差异; WT-AMI+Vehicle 组纤维化为(25.410 $\pm$ 1.041)%, $n=4$, KO-AMI+Vehicle 组纤维化为(31.550 $\pm$ 2.098)%, $n=4$, t 检验 $P=0.0395$, KO-AMI+Vehicle 组小鼠心脏纤维化较 WT-AMI+Vehicle 组小鼠严重。

KO-Sham+Vehicle 组心肌组织胶原蛋白 I、TGF- β 1、p-PKA/PKA 分别为 WT-Sham+Vehicle 组的(1.029 $\pm$ 0.079)倍、(1.010 $\pm$ 0.088)倍、(0.984 $\pm$

0.080)倍, $n=4$, t 检验 $P=0.7365$ 、 $P=0.9197$ 、 $P=0.8494$, 两组之间胶原蛋白 I、TGF- β 1、PKA 磷酸化水平无差异; WT-AMI+Vehicle 组心肌组织胶原蛋白 I、TGF- β 1、p-PKA/PKA 分别为 WT-Sham+Vehicle 组的(2.819 $\pm$ 0.427)倍、(1.839 $\pm$ 0.089)倍、(1.605 $\pm$ 0.062)倍, KO-AMI+Vehicle 组心肌组织胶原蛋白 I、TGF- β 1、p-PKA/PKA 分别为 WT-Sham+Vehicle 组的(3.110 $\pm$ 0.464)倍、(2.257 $\pm$ 0.092)倍、(1.465 $\pm$ 0.047)倍, $n=4$, WT-AMI+Vehicle 组与 KO-AMI+Vehicle 组之间进行 t 检验, $P=0.0090$ 、 $P=0.0126$ 、 $P=0.0063$, KO-AMI+Vehicle 组较 WT-AMI+Vehicle 组胶原蛋白 I、TGF- β 1 表达升高, PKA 磷酸化水平减低, 活性受到抑制。

2.4 补充 rCTRP9 后小鼠 AMI 第 28 天的死亡率较 AMI+Vehicle 组降低, 心脏收缩功能改善, 心肌纤维化减轻, 纤维化相关蛋白表达减少, 且这种作用可被 PKA 抑制剂 H-89 阻断 AMI 后第 28 天 AMI+Vehicle 组小鼠死亡率为(10/27), AMI+CTR9 组为(4/26), AMI+CTR9+H-89 组为(9/27); Log-rank (Mantel-Cox) 检验, $\chi^2=3.272$, $P=0.1948$ 。虽然 AMI+CTR9 组死亡率较 AMI+Vehicle 组及 AMI+CTR9+H-89 组减低, 但三组生存曲线未达到统计差异。见图 4。

AMI+Vehicle 组心脏重量/体重为(6.675 $\pm$ 0.135) mg/g, $n=6$, AMI+CTR9 组心脏重量/体重为(5.833 $\pm$ 0.182) mg/g, $n=6$, AMI+CTR9+H-89 组心脏重量/体重为(6.600 $\pm$ 0.193) mg/g, $n=6$, AMI+CTR9 组小鼠心脏比 AMI+Vehicle 组小鼠减小, AMI+Vehicle 组和 AMI+CTR9+H-89 组小鼠心脏大小无差异, AMI+CTR9+H-89 组较 AMI+CTR9 组小鼠心脏增大。

心脏超声检查 AMI+Vehicle 组 LVEF 为(25.190 $\pm$ 1.488)%, AMI+CTR9 组 LVEF 为(41.250 $\pm$ 1.493)%, AMI+CTR9+H-89 组 LVEF 为(26.760 $\pm$ 1.481)%, $n=5$, AMI+CTR9 组小鼠心脏收缩功能较 AMI+Vehicle 组明显增强, AMI+Vehicle 组和 AMI+CTR9+H-89 组小鼠心脏收缩功能无差异, AMI+CTR9+H-89 组较 AMI+CTR9 组小鼠心脏收缩功能明显差。

Masson 染色检测 AMI+Vehicle 组(梗死交界区)纤维化为(25.410 $\pm$ 1.041)%, AMI+CTR9 组纤维化为(17.510 $\pm$ 0.893)%, $n=4$, AMI+CTR9+H-89 组纤维化为(25.430 $\pm$ 1.031)%, $n=4$, AMI+CTR9 组小鼠心肌纤维化程度较 AMI+Vehicle 组明显减轻, AMI+Vehicle 组和 AMI+CTR9+H-89 组小

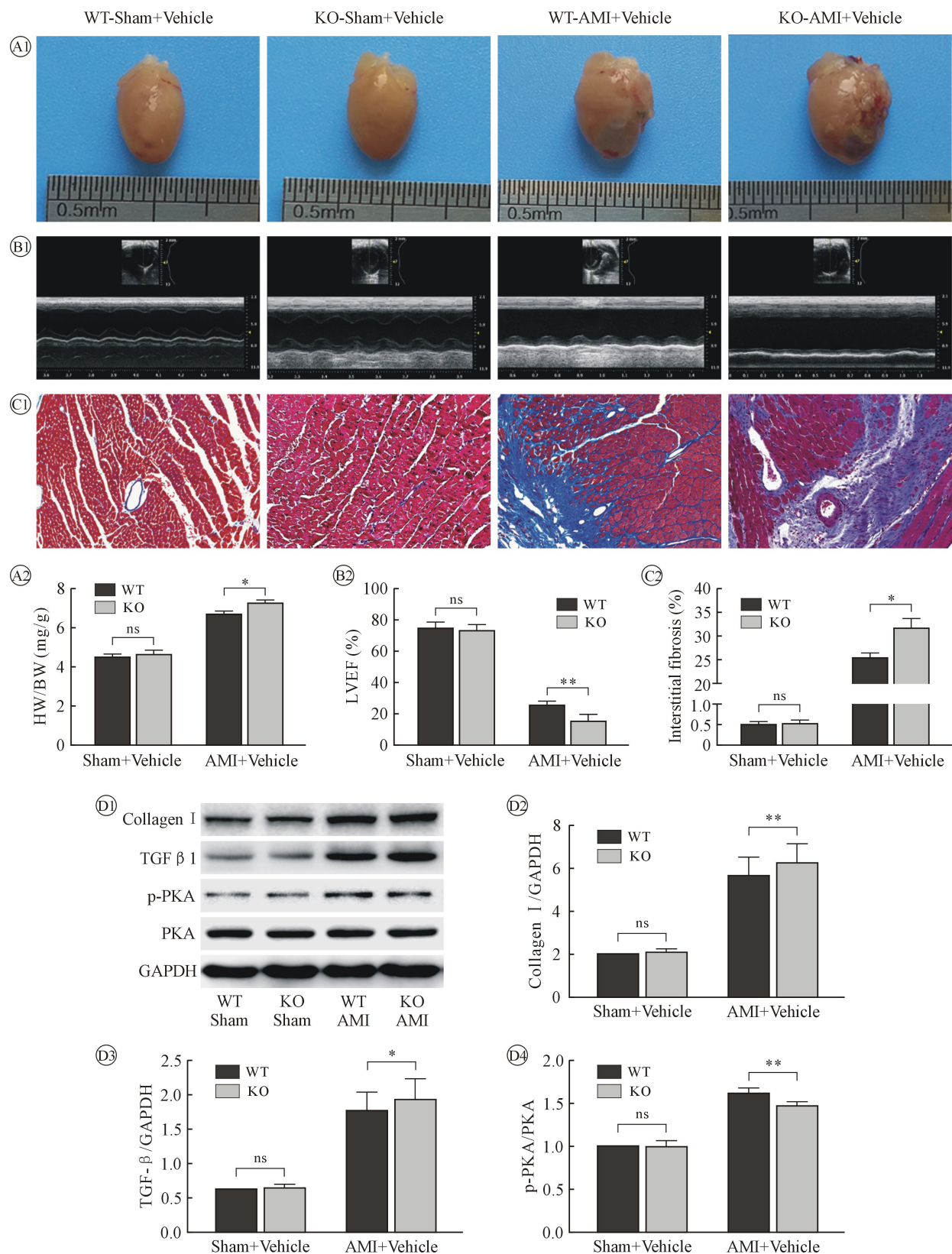


图3 WT-Sham+Vehicle、KO-Sham+Vehicle、WT-AMI+Vehicle、KO-AMI+Vehicle 四组检测图像和各项统计比较
注:小鼠急性心肌梗死后第28天 A1:心脏大小;B1 心脏超声心动图;C1:心肌 Masson 染色图像;A2:心脏重量/体重的统计结果;B2: 左室射血分数统计结果;C2:纤维化统计结果;D1~D4:心肌免疫印迹蛋白表达;与 WT-Sham+Vehicle 组相比无显著差别 $P > 0.05$;与 WT-AMI+Vehicle 组相比 * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$

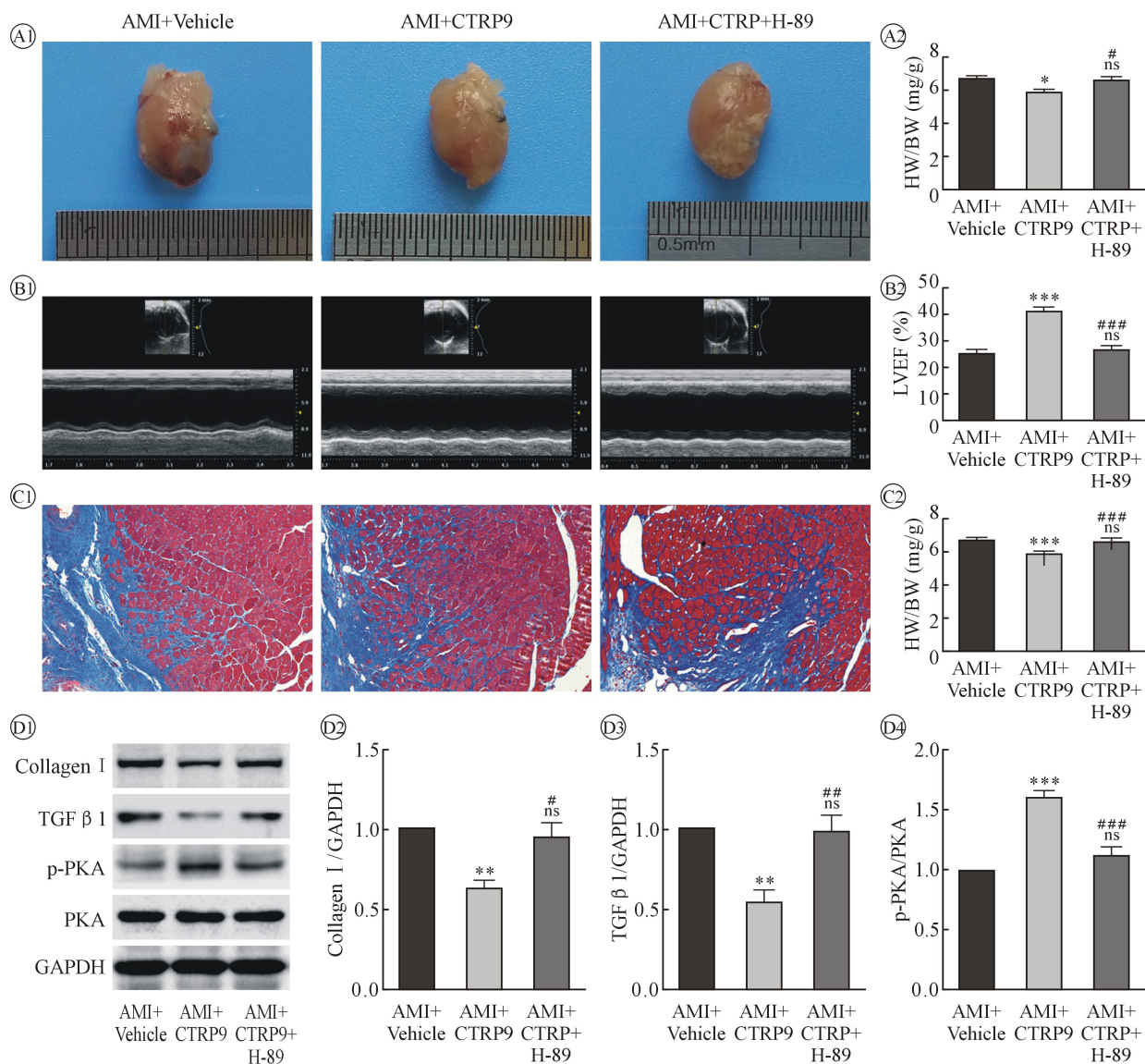


图4 AMI+ Vehicle、AMI+CTRP9、AMI+CTRP9+H-89 三组检测图像和各项统计比较

注:小鼠急性心肌梗死后第28天 A1:心脏大小;B1:心脏超声心动图;C1:心肌 Masson 染色图像;A2:心脏重量/体重的统计结果;B2:左室射血分数统计结果;C2:纤维化统计结果;D1~D4:心肌 Western Blotting 蛋白表达;与 MI+Vehicle 组比较 ns $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 AMI+CTRP9 组比较[#] $P \leq 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$

鼠心肌纤维化程度无差异,AMI+CTRP9+H-89 组较 AMI+CTRP9 组小鼠心肌纤维化程度明显重。

Western Blotting 检测 AMI+CTRP9 组心肌组织(梗死交界区)蛋白表达变化原蛋白 I、TGF-β1、p-PKA/PKA 分别为 AMI+Vehicle 组的(0.624±0.054)倍、(0.538±0.082)倍、(1.598±0.058)倍,AMI+CTRP9+H-89 组心肌组织(梗死交界区)蛋白表达变化原蛋白 I、TGF-β1、p-PKA/PKA 分别为 AMI+Vehicle 组的(0.947±0.096)倍、(0.988±0.101)倍、(1.113±0.078)倍, $n=4$,AMI+CTRP9 组小鼠心肌组织胶原蛋白 I、TGF-β1 的表达量较 AMI+Vehicle 明显减少,AMI+Vehicle 组和 AMI+CTRP9+H-89 组

小鼠心肌组织胶原蛋白 I、TGF-β1 的表达量无差异,AMI+CTRP9+H-89 组较 AMI+CTRP9 组小鼠心肌组织胶原蛋白 I、TGF-β1 的表达量明显增加,AMI+CTRP9 组小鼠 PKA 磷酸化激活程度较 AMI+Vehicle 升高,AMI+Vehicle 组和 AMI+CTRP9+H-89 组小鼠 PKA 磷酸化激活程度相同,AMI+CTRP9+H-89 组较 AMI+CTRP9 组小鼠 PKA 磷酸化激活减低。

3 讨论

缺血性心脏病在全球范围内仍然是主要死亡原因^[4],心肌成纤维细胞通过沉积细胞外基质来修复坏死心肌组织,在心力衰竭的发病机制中起着关键

作用^[5]。AMI 后非梗死区局部结缔组织的扩张,梗死边缘区和远离区未受损伤心肌的反应性纤维化导致心肌硬度增加,顺应性降低,从而进一步降低心输出量^[6],引起心脏功能衰竭,这是造成 AMI 致死的重要原因之一。

CTRP9 是一种在心脏高度表达的分泌糖蛋白,在心血管疾病的保护、炎症的调控及糖脂代谢的调节中发挥重要的作用,本研究组在过去研究中发现缺血性心脏损伤中,血浆和心室组织中 CTRP9 的表达显著降低,CTRP9 具有明显的心肌保护作用,CTRP9 通过改善心肌纤维化在改善心肌重塑中发挥重要作用^[7]。但目前研究 CTRP9 主要以心肌细胞、血管内皮细胞为研究对象,以心肌成纤维细胞作为对象的研究尚未见报道。

本研究应用免疫荧光染色的方法直接观察了 AMI 不同区域 CTRP9 的表达变化,与缺血的严重程度直接相关,表达水平从梗死远离区、交界区、梗死区依次明显降低。在小鼠 AMI 后第 4 天血清中 CTRP9 水平明显减低伴随着血清中 TGF- β 1 明显升高。TGF- β 家族是研究最多的纤维反应调节因子之一,它在心肌损伤后的适应和重塑中起着重要作用^[8-10]。本研究发现 AMI 后 28 天梗死交界区肌成纤维细胞数量明显增加。肌成纤维细胞分泌大量结构细胞外基质蛋白^[11-12],可以引起心肌组织纤维化,在梗死交界区纤维化明显增加。这些结果提示在 AMI 过程中 CTRP9 的表达降低及 TGF- β 1 的升高可引起成纤维细胞的持续激活,分泌大量基质蛋白造成心肌组织发生纤维化。

为了进一步证实这一观点,本研究构建了 CTRP9 敲除小鼠,在无 AMI 时,KO-CTRP9 小鼠与 WT 型小鼠心肌纤维化程度及心脏收缩功能基本一致,但在 AMI 发生后,KO-CTRP9 小鼠的心肌纤维化程度更加严重,心脏收缩功能降低更加严重,从反面证实 CTRP9 的减低参与了 AMI 后过度的心肌纤维化并且造成心脏收缩功能的进一步减低。补充 rCTRP9 后,心肌纤维化明显减轻,心脏收缩功能明显改善,从正面证实补充 CTRP9 可减低 AMI 后的心肌纤维化并且改善心脏的收缩功能。

前期研究证实 CTRP9 可激活促生存信号分子 PKA 而抑制 H9C2 细胞缺氧损伤引起的心肌细胞凋亡减轻心肌重塑^[7]。本研究发现在 AMI 后第 28 天,PKA 活性水平比对照组明显升高,而 KO-CTRP9 小鼠的 AMI 发生后,PKA 活性水平比野生型 AMI 小鼠明显减低;补充 rCTRP9 后 PKA 活性水平进一步明显提高,从正反两面证实在整体水平

CTRP9 通过影响 PKA 活性发挥抗 AMI 后心肌纤维化,改善心脏收缩功能。

为了进一步研究 PKA 通路在 CTRP9 抗 AMI 后心肌纤维化中的作用,在动物水平应用 PKA 抑制剂 H-89 阻断 PKA 活性升高,观察 CTRP9 抗 AMI 后心肌纤维化的作用的变化。发现应用 H-89 后补充 rCTRP9 引起的 PKA 活性水平提高被阻断,同时 Masson 染色检测 AMI 交界区纤维化结果显示 CTRP9 抗 AMI 后心肌纤维化作用也被阻断,CTRP9 改善心脏收缩功能的作用也随之被阻断。

本研究证实 CTRP9 有通过 PKA 通路减轻 AMI 小鼠心肌组织纤维化和改善心脏功能的作用。

参考文献:

- [1] Ford ES, Roger VL, Dunlay SM, *et al*. Challenges of ascertaining national trends in the incidence of coronary heart disease in the United States[J]. J Am Heart Assoc, 2014,3(6):e001097.
- [2] Tomasoni D, Adamo M, Lombardi CM, *et al*. Highlights in heart failure[J]. ESC Heart Fail, 2019,6(6):1105-1127.
- [3] Choi HM, Park MS, Youn JC. Update on heart failure management and future directions[J]. Korean J Intern Med, 2019,34(1):11-43.
- [4] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, *et al*. Heart Disease and Stroke Statistics - 2019 Update: A Report From the American Heart Association[J]. Circulation, 2019,139(10):e56-e528.
- [5] Czajka C. Linking fibroblasts to cardiac fibrosis[J]. Science, 2017,356(6344):1243.
- [6] Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction -from repair and remodeling to regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2016,365(3):563-581.
- [7] Sun Y, Yi W, Yuan Y, *et al*. C1q/tumor necrosis factor-related protein-9, a novel adipocyte-derived cytokine, attenuates adverse remodeling in the ischemic mouse heart via protein kinase A activation[J]. Circulation, 2013,128(11 Suppl 1):S113-120.
- [8] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016,12(6):325-338.
- [9] Yue Y, Meng K, Pu Y, *et al*. Transforming growth factor beta (TGF- β) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017,133:124-130.
- [10] 马晓媛,俞瑾,马海平,等. 转化生长因子- β 1 预处理调控缺氧诱导因子-1 α 蛋白表达水平对心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2017,15(1):51-55.
- [11] Shinde AV, Frangogiannis NG. Mechanisms of fibroblast activation in the remodeling myocardium[J]. Curr Pathobiol Rep, 2017,5(2):145-152.
- [12] Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart[J]. JACC Basic Transl Sci, 2019,24(3):449-467.

(收稿日期:2021-04-20)

(修订日期:2021-07-12)