

热休克转录因子 1 在小鼠心脏淀粉样变疾病中的作用机制研究

钱俊乔 霍佳 钱金泽 王艳军 李瑞琛 段惠军 杜春阳

【摘要】 目的:探讨热休克转录因子 1(HSF1)在心脏淀粉样变疾病中的作用机制。

方法:将 30 只 HSF1 敲除小鼠随机分为 3 个实验组,HSF1 敲除型空白对照组、敲除型淀粉样变模型组及替普瑞酮治疗组;将 20 只野生型小鼠随机分为 2 个实验组,野生型空白对照组、野生型淀粉样变模型组,每组均为 10 只。进行淀粉样变诱导实验构建淀粉样变疾病模型。模型构建 2 个月后处死小鼠,通过刚果红染色、免疫组织化学染色、分子生物学检测,比较各个实验组心脏组织中热休克蛋白及淀粉样变沉积情况,以及肝脏、脾脏、胃、肠舌、皮肤组织中的淀粉样变沉积情况。 **结果:**淀粉样变诱导实验后,野生型小鼠心脏组织中热休克蛋白 70(HSP70)mRNA 的表达水平较空白组显著升高($P<0.05$),HSF1 敲除小鼠淀粉样变疾病模型的心脏组织中 HSP70 mRNA 的表达水平显著低于野生型实验组($P<0.05$),且心脏淀粉样变沉积程度显著高于野生型实验组。给予 HSP70 诱导剂替普瑞酮后,敲除型实验组心脏组织中的 HSP70 mRNA 的表达水平明显升高,其淀粉样变沉积程度明显得到改善。而未进行淀粉样变诱导实验的空白组,不管是野生型小鼠还是敲除型小鼠均未见淀粉样物质沉积。此外,敲除型实验组小鼠血清中心肌肌钙蛋白 T(TnT)表达显著高于野生型实验组,而给予替普瑞酮治疗后表达下降。 **结论:**HSF1 可能通过对 HSP70 的调控影响心脏淀粉样变的沉积情况,该结果为心脏淀粉样变的防治提供了新的思路。

【关键词】 热休克转录因子;心脏淀粉样变;热休克蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.05.007

The role of HSF1 in cardiac amyloidosis in mice QIAN Junqiao¹, HUO Jia², QIAN Jinze³, WANG Yanjun³, LI Ruichen³, DUAN Huijun³, DU Chunyang³. 1. Department of Oral Surgery, Oral hospital of Hebei Province, Hebei 050000; 2. Department of Osteopathy, The Third Hospital of Hebei Province, Hebei 050000; 3. Department of Pathology/the Key Laboratory of Kidney Diseases of Hebei Province, Hebei Medical University, Hebei 050017, China

【Abstract】 Objective: To probe the role of heat shock factor 1 (HSF1) in cardiac amyloidosis in mice model. **Methods:** Thirty female HSF1^{-/-} mice were divided into 3 random groups (negative control of HSF1^{-/-}, AA induction of HSF1^{-/-}, AA induction of HSF1^{-/-} with GGA) and 20 wide type mice were divided into 2 random groups (negative control of HSF1^{+/+}, AA induction of HSF1^{+/+}). The expressions of HSP70 mRNA in heart were detected by Real-Time PCR and Western Blot; amyloid degrees were assessed by Congo Red and immunohistochemistry methods in the heart, liver, spleen, stomach, intestine, tongue, skin. **Results:** After amyloid induction, the expression of HSP70 mRNA was increased in wide type mouse, and the expression of HSP70 mRNA was

基金项目:国家自然科学基金(81300606);河北省高等学校科学技术研究项目(BJ2014042);高等学校博士科学点专项科研基金(2012323120012);河北省卫生厅医学科学研究课题计划项目(ZD20140355)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学病理学教研室,河北省肾脏病重点实验室(钱金泽,段惠军,杜春阳);050000 石家庄,河北医科大学口腔医院口腔科(钱俊乔);050000 石家庄,河北医科大学附属第三医院骨科(霍佳)

通信作者:钱金泽,Email:qianjz0125@163.com

markedly downregulated upon loss of HSF1 in the heart; HSP70 expression was suppressed by the loss of HSF1 even with exogenous amyloid application; HSF1 deficiency promotes cardiac AApoA II deposition. However, treated with GGA, the expression of HSP70 mRNA obviously increased in the heart, and the cardiac amyloid deposition was mitigated in HSF1^{-/-} mice. While there was no any amyloid deposition observed in HSF1^{-/-} and wide type mice without amyloid induction. In addition, the serum levels of Troponin T protein were higher in HSF1^{-/-} than in wild-type mice, while reduced after treated with GGA in HSF1^{-/-} mice. **Conclusions:** The loss of HSF1 induced a dysregulation of proteostasis in the heart via an inhibition of the HSP70, leading to the accumulation of amyloid fibrils in heart tissue. It demonstrated that agents that induce HSF1 activation can serve as potential therapeutics in the treatment of cardiac amyloidosis.

【Key words】 Heat shock factor; Cardiac amyloidosis; Heat shock protein

淀粉样变性是由蛋白质分子错误折叠/异常聚集导致的淀粉样物质的沉积综合征,并可引发多系统损伤的全身性疾病。目前,已发现 30 余种前体蛋白可在活体中形成淀粉样蛋白,并引起正常组织结构和功能的破坏,导致相应器官功能障碍,继而引起一系列病理改变,如朊病毒病、阿尔茨海默病等^[1]。其中,免疫球蛋白轻链 AL (acquired monoclonal light-chain)、甲状腺载运蛋白 ATTR 及老化系统性淀粉样变是形成心脏淀粉样变的主要原因。热休克转录因子 1 (heat shock factor 1, HSF1) 作为调节热休克蛋白 (HSP) 表达的主要转录因子,可被多种应激因素激活,通过与 DNA 上的热休克元件 (heat shock element, HSE) 的结合,诱导 HSP 的表达^[2],可有效抑制淀粉样变的发生及发展^[3]。此外,随着衰老,HSF1 与 HSP 的活性逐渐降低,而通过对线虫和小鼠的研究发现,减少淀粉样物质的沉积可以减缓衰老的进程,并在一定程度上延长寿命^[4]。HSF1 与蛋白质折叠/聚集密切相关,可以有效防治朊病毒疾病^[5]、多谷氨酰胺蛋白以及家族性淀粉样多神经病等蛋白质异常折叠/聚集引起的疾病^[6-8],但 HSF1 是否可以影响心脏淀粉样变的形成,以及其通过何种途径实现尚未见相关报道。本研究通过使用 HSF1 敲除小鼠构建淀粉样变模型,探讨 HSF1 对心脏淀粉样变的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

HSF1 敲除小鼠由日本山口大学医学系赠予,野生型 ICR 雌性小鼠购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。本实验采用 2 月龄的 ICR 野生型雌性小鼠 20 只,随机分为野生型空白对照组和野生型淀粉样变模型组,每组各 10 只;2 月龄的 HSF1 雌性小鼠 30 只,随机分为 HSF1 敲除型空白

对照组、敲除型淀粉样变模型组和替普瑞酮治疗组,每组各 10 只。替普瑞酮组小鼠按体重胃灌 500 mg/kg 替普瑞酮(替普瑞酮溶于 0.9% NaCl 溶液 4.0 mL 中使用),1 次/日,2 次/周,共 6 周,取材两周前停药。

1.2 模型制备

参照文献的方法,从淀粉样变诱导后 2 个月的 ICR 小鼠肝中提取淀粉样纤维种子^[9],并用蒸馏水稀释浓度至 1.0 mg/mL。将稀释液用超声打碎后,采用尾静脉注射法进行淀粉样变模型制备,各模型组小鼠注射量为 100 μ g。诱导实验进行 2 个月后,淀粉样蛋白指数 (AI) > 0 即造模成功。根据 AI 评估心脏、肝脏、脾脏、胃、肠、舌、皮肤各组织淀粉样变沉积程度,分为 0~4 级:0 级,无淀粉样沉积物;1 级,约 < 10% 的组织中可见淀粉样沉积物;2 级,约 10%~30% 的组织中可见淀粉样沉积物;3 级,30%~50% 的组织中可见淀粉样沉积物;4 级, > 50% 的组织中可见淀粉样沉积物。淀粉样变沉积程度为 0 级以上即为造模成功^[9]。

1.3 组织标本的取材

待淀粉样变诱导实验进行 2 个月后取材。用乙醚对小鼠麻醉后处死,将采集的肝脏、心脏、脾脏、皮肤、舌、肠、胃的组织标本分别置于福尔马林中,以便进行淀粉样变程度的判断及部位的判定。

1.4 刚果红染色

将福尔马林固定的组织样品进行刚果红染色,并通过偏光显微镜观察淀粉样沉积程度及位置。

1.5 免疫组织化学染色

将福尔马林固定的组织标本进行免疫组织化学染色,使用鼠 apoA-II 抗体,稀释浓度为 1:3 000,以特异性判定淀粉样变沉积的程度及部位。

1.6 心肌组织中 HSP70 mRNA 检测

使用 RNA easy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)试剂盒从心脏组织中提取总 RNA。利用 Firststrand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)试剂盒合成 cDNA, 并通过使用 Taq DNA polymerase (Promega; Madison, WI)进行扩增反应。PCR 反应产物经 3%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳,在紫外透射仪上观察。使用 SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)试剂盒及 Mx3005P Real-Time PCR System 进行实时定量。HSPA1A 上游引物为 5'-TGCTTGGGCACCGATTACTGTCA AGG-3', 下游引物为 5'-GGCAGCTAGACTATATGTCT TCCCAGGCTCTG-3'。

1.7 蛋白检测

采用 SDS-PAGE 进行电泳分离。转膜后用 TnT(ProteintechTM, 1 : 200)检测蛋白表达情况。

1.8 统计学分析

使用 StatView 进行数据分析。数据采用 Mann Whitney U 检验进行两组比较。

2 结果

2.1 心脏 HSP70 mRNA 的表达

敲除型淀粉样变模型组的心脏组织中 HSP70 mRNA 表达水平显著低于野生型淀粉样变模型组的心脏组织,提示 HSF1 敲除小鼠的心脏组织不能有效激活 HSP70;而给予口服替普瑞酮处理后,心脏组织中的 HSP70 mRNA 表达水平明显上升,见表 1。

表 1 各组小鼠 HSP70 mRNA 表达水平比较

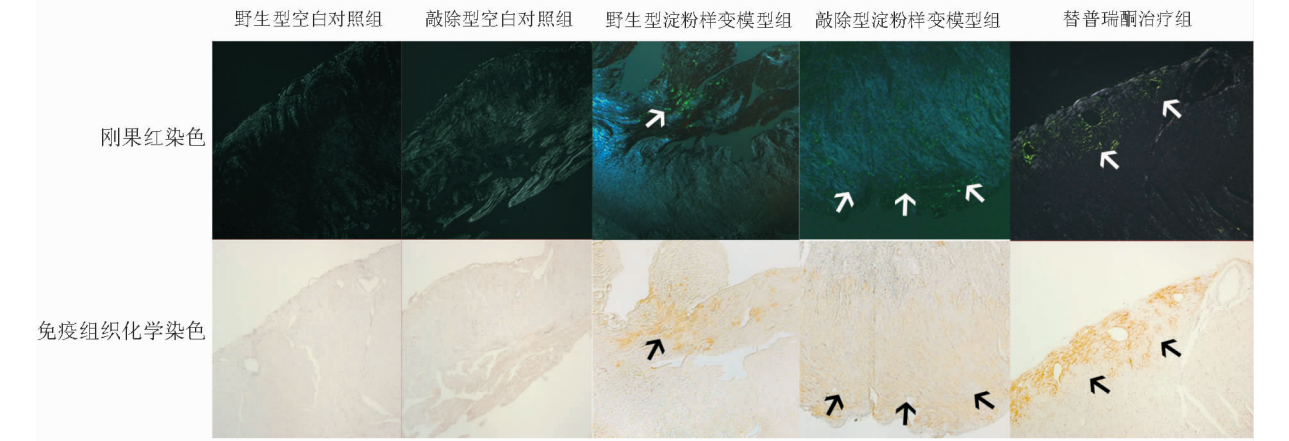
	野生型空白对照组	野生型淀粉样变模型组	敲除型空白对照组	敲除型淀粉样变模型组	替普瑞酮治疗组
HSP70 mRNA	1.0	1.54 ⁽¹⁾	0.28	0.29 ⁽²⁾	0.56 ⁽³⁾

注:与野生型空白对照组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$;与野生型淀粉样变模型组比较,⁽²⁾ $P<0.05$;与敲除型淀粉样变模型组比较,⁽³⁾ $P<0.01$

2.2 HSF1 敲除型小鼠心脏淀粉样变沉积程度明显增强

淀粉样变诱导实验 2 个月后,通过刚果红及免疫组织化学检测,根据 AI 评估发现,HSF1 敲除型淀粉样变模型组心脏组织淀粉样变沉积程度较野

生型淀粉样变模型组明显增强,给予口服替普瑞酮治疗后淀粉样变沉积程度明显下降。而无论是野生型还是敲除型小鼠,未进行淀粉样变诱导实验时均未见到淀粉样物质沉积。见图 1。



注:箭头所示为淀粉样沉积物质
图 1 各组心肌染色结果

2.3 淀粉样变沉积程度评估

根据 AI 方法对各器官组织中淀粉样纤维的沉积情况进行分析,进行淀粉样变诱导实验 2 个月后,敲除型淀粉样变模型组系统性淀粉样变沉积程度,特别是心脏组织的淀粉样沉积程度显著高于野生型淀粉样变模型组;给予替普瑞酮治疗后,心脏淀粉样沉积程度明显减轻,而未进行诱导实验时,均

未见淀粉样物质沉积。见表 2。

2.4 血清中心肌肌钙蛋白 T(cTnT)的表达情况

淀粉样变诱导实验 2 个月后,敲除型淀粉样变模型组小鼠血清中心肌肌钙蛋白 T 表达显著高于野生型淀粉样变模型小鼠,而给予替普瑞酮治疗后,血清中心肌肌钙蛋白 T 表达明显下降。见图 2。

表 2 各组淀粉样变评分

	野生型空白 对照组	敲除型空白 对照组	野生型淀粉 样变模型组	敲除型淀粉 样变模型组	替普瑞酮 治疗组
系统性淀粉样变评分	0	0	0.93	1.48 ⁽¹⁾	0.87 ⁽²⁾
心脏淀粉样变评分	0	0	0.58	1.50 ⁽¹⁾	0.74 ⁽²⁾
肝脏淀粉样变评分	0	0	0.23	0.79	0.49
脾脏淀粉样变评分	0	0	0	0	0
舌淀粉样变评分	0	0	1.61	2.12	1.67
胃淀粉样变评分	0	0	1.24	1.46	1.2
肠淀粉样变评分	0	0	1.68	2	1.5
皮肤淀粉样变评分	0	0	0	0.49	0.32

注：与野生型淀粉样变模型组相比，⁽¹⁾ $P<0.01$ ；与敲除型淀粉样变模型组相比，⁽²⁾ $P<0.01$

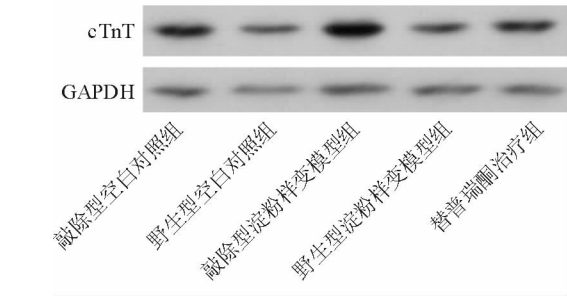


图 2 各组小鼠血清中 TnT 的表达

3 讨 论

淀粉样变性是一种严重的全身性疾病，它是一种以蛋白质构象障碍为特点的疾病。心肌受累可主要发生 3 种类型的淀粉样变性：后天获得性单克隆轻链、遗传性转甲状腺素蛋白和老年性淀粉样变。目前，蛋白质反应以及热休克反应这两种通路被认为与蛋白质稳态有一定的相关性。其中，热休克反应是当细胞或者组织暴露在高温、毒物、自由基、感染、淀粉样纤维蛋白的异常沉积等应激原作用下，蛋白质发生构象改变、聚合等一系列防御适应性反应，各种具有分子伴侣功能的 HSP 通过该反应被 HSF1 激活而被诱发出来，参与蛋白质的折叠、聚合、转运和信号传递等生理过程^[10]。大量研究证实，HSF1 和 HSP 通过降解细胞内错误折叠蛋白发挥对退变性疾病保护作用^[11]，HSPB1 的表达可以促进病理性超磷酸化微管相关蛋白 Tau 的降解，而 HSPB1 表达下降可加剧病理性超磷酸化微管相关蛋白 Tau 的积聚^[12]。

本研究采用老年性淀粉样变性小鼠模型，探讨了 HSF1 及 HSP70 对心脏淀粉样变的作用机制。有报道指出，激活 HSF1 在心脏适应性肥大过程中发挥了重要作用^[13]，而心脏是系统性淀粉样变如家族性淀粉样多神经病、原发性淀粉样蛋白轻链淀粉

样变性和老化淀粉样变等疾病的特征性器官^[14]，因此，HSF1 及 HSP 在心脏损伤时发挥重要的保护作用。心脏组织在热休克反应及缺血损伤时，HSF1 缺失直接导致 HSP 失活。因此，我们采用 HSF1 基因敲除小鼠构建心脏淀粉样变动物模型，很好的模拟了心脏老化淀粉样变的发生发展过程，并且根据本研究可以推测心脏组织中 HSF1 的缺失导致了 HSP 失活，从而加剧了心脏淀粉样物质的沉积程度。

综上所述，HSF1 的表达缺失加剧了小鼠老年性淀粉样变所致的心脏淀粉样变程度，而激活 HSP70 可以有效地缓解由淀粉样变所致的心功能障碍。本研究为揭示心脏淀粉样变的形成机制提供了新的依据，并为临床预防和治疗提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Benson MD, James S, Scott K, et al. Leukocyte chemotactic factor 2: a novel renal amyloid protein[J]. Kidney Int, 2008, 74(2):218-222.

[2] Young JC, Agashe VR, Siegers K, et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(10):781-791.

[3] Fujimoto M, Nakai A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress[J]. FEBS J, 2010, 277(20): 4112-4125.

[4] Calderwood SK, Murshid A, Prince T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging—a mini-review[J]. Gerontology, 2009, 55(5):550-558.

[5] Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, et al. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity [J]. Science, 2006, 313(5793):1604-1610.

[6] Park KW, Hahn JS, Fan Q, et al. De novo appearance and "strain" formation of yeast prion [PSI⁺] are regulated by the heat-shock transcription factor[J]. Genetics, 2006, 173(1): 35-47.

病无创诊断和预后判断的生物指标之一。但对 miRNA 在不稳定冠状动脉粥样斑块的诊断中的机制尚不明确^[5-6]。寻找特异性出现在外周血中的 miRNA 对冠状动脉粥样硬化的及时诊治具有重要意义^[7-8]。在本研究中,非钙化斑块组的 miR-21 水平显著低于钙化斑块组和正常组;非钙化斑块组的 miR-16 水平显著的高于钙化斑块组和正常组,结果表明 miR-16 表达水平上调能够评估急性冠脉综合征患者病情程度,而 miR-21 水平下调也具有相同的评估功能。miR-16 与 miR-11(AUC=0.857)联合应用在诊断非钙化斑块方面的诊断价值高于单独检测 miR-16(AUC=0.786)或 miR-21(AUC=0.775), $P<0.05$ 。

综上所述,外周血 miR-16、miR-21 水平有望能作为判定斑块性质的血清学检测指标之一。

参 考 文 献

[1] Ballouz S, Liu JY, Oti M, et al. Candidate disease gene prediction using Gentrepid; application to a genome-wide association study on coronary artery disease[J]. Mol Genet Genomic Med, 2014, 2(1):44-57.

[2] 范雪松,谷春,王宪云,等. miR-16 和 miR-21 作为冠脉不稳定斑块生物标志物的研究[J]. 中国循环杂志, 2013, 28

(S1):54.

[3] 杨中保. 血液循环和植物来源 miRNA 的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(3):271-274.

[4] Schulte C, Zeller T. microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2015, 5(1):17-36.

[5] 郁怡,孙赬. 基质金属蛋白酶 9 与 2 型糖尿病并发冠状动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2017, 22(2):147-150.

[6] 马小欣,彭萍,徐光泽,等. 急性冠状动脉综合征患者血浆 MMP-2、MMP-9 水平变化的临床观察[J]. 心脑血管病防治, 2016, 16(5):353-355.

[7] Wang J, Hang T, Cheng XM, et al. Associations of C1q/TNF-Related protein-9 levels in serum and epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis in humans[J]. Biomed Res Int, 2015(2):971683.

[8] Yin X, Zhou L, Han F, et al. Beta-adrenoceptor activation by norepinephrine enhances lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the ERK/JNK-c-Fos pathway in human THP-1 cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(1):55-67.

(收稿:2017-12-20 修回:2018-05-15)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 284 页)

[7] Fujimoto M, Takaki E, Hayashi T, et al. Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models[J]. J Biol Chem, 2005, 280(41):34908-34916.

[8] Santos SD, Fernandes R, Saraiva MJ. The heat shock response modulates transthyretin deposition in the peripheral and autonomic nervous systems[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(2):280-289.

[9] Teixeira PF, Cerca F, Santos SD, et al. Endoplasmic reticulum stress associated with extracellular aggregates-evidence from transthyretin deposition in familial amyloid polyneuropathy [J]. J Biol Chem, 2006, 281(31):21998-22003.

[10] Batulan Z, Shinder GA, Minotti S, et al. High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1[J]. J Neurosci, 2003, 23(13):5789-5798.

[11] Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, et al. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70[J]. Nat Genet, 1999, 23(4):425-428.

[12] Wiederrecht G, Seto D, Parker CS. Isolation of the gene encoding the S. cerevisiae heat shock transcription factor[J]. Cell, 1988, 54(6):841-853.

[13] Sakamoto M, Minamino T, Toko H, et al. Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2006, 99(12):1411-1418.

[14] Rapezzi C, Quarta CC, Riva L, et al. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(7):398-408.

(收稿:2017-11-10 修回:2018-02-15)

(本文编辑:丁媛媛)