

# C1ORF54 在小鼠心肌梗死后心脏修复中的作用

谢洪洋 闫小响 章航 范骏 陆林 沈卫峰

**【摘要】** 目的:探讨 1 号染色体开放读码框 54 位基因编码蛋白(C1ORF54)在小鼠心肌梗死后心脏修复中的作用及其机制。 方法:选择 C1ORF54 基因敲除小鼠与野生型小鼠,采用结扎冠状动脉左前降支制作心肌梗死小鼠模型。21 d 后以超声心动图测定各组小鼠心功能相关指标,Masson 染色法观察心脏组织纤维化程度。应用免疫组织化学染色法检测心肌梗死后第 3 天心脏 Ki-67 蛋白表达变化;应用 Western blot 定量测定各组小鼠 p38 丝裂原活化蛋白激酶/磷酸化的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38/p-P38)、信号转导及转录激活因子 3/磷酸化的信号转导及转录激活因子 3(STAT3/p-STAT3)、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)和磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)等的表达水平。 结果:心肌梗死 21 d 后,尽管两组小鼠的心率相似,但与野生型小鼠相比,C1ORF54 基因敲除小鼠左室舒张末期内径[(6.04 ± 0.14) mm 对 (5.41 ± 0.17) mm]和收缩末期内径[(5.77 ± 0.15) mm 对 (5.07 ± 0.19) mm]明显增大,而射血分数明显降低[(18.75 ± 3.03)% 对 (23.12 ± 0.70)%], $P$  均 < 0.01。C1ORF54 基因敲除小鼠心肌纤维化程度增高,Ki-67 阳性细胞数明显减少。两组小鼠心肌 p38/p-P38、STAT3/p-STAT3、 $\beta$ -catenin 的蛋白表达水平无统计学差异,C1ORF54 基因敲除小鼠 p-AKT 的蛋白表达水平较野生型小鼠明显降低( $P$  < 0.05)。 结论:C1ORF54 可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路,影响心肌纤维增殖,在心肌梗死后心脏组织修复中发挥重要作用。

**【关键词】** 1 号染色体开放读码框 54 位基因编码蛋白;心肌梗死;心脏修复

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.01.007

**Effects of C1ORF54 on cardiac repair after myocardial infarction in mice** XIE Hongyang, YAN Xiaoxiang, ZHANG Hang, FAN Qin, LU Lin, SHEN Weifeng. Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effects and mechanisms of C1ORF54 on cardiac repair after myocardial infarction. **Methods:** Myocardial infarction model was established by ligating left anterior coronary artery in wild-type and C1ORF54 knockout mice. Twenty-one days later, left ventricular size and function were determined by echocardiography, and the degree of myocardial fibrosis was assessed by Masson technique. Myocardial Ki-67 expression was evaluated by immunohistochemistry at the third day after myocardial infarction. The expression of regulatory pathways including p38/p-P38, STAT3/p-STAT3,  $\beta$ -catenin and p-AKT was quantified by western blot. **Results:** Twenty-one days after myocardial infarction, despite similar heart rate, the left ventricular end-diastolic [(6.04 ± 0.14) mm vs. (5.41 ± 0.17) mm] and end-systolic diameters [(5.77 ± 0.15) mm vs. (5.07 ± 0.19) mm] were greater, while ejection fraction [(18.75 ± 3.03)% vs. (23.12 ± 0.70)%] was lower in C1ORF54 knockout mice than those in wild-type mice (all  $P$  < 0.01). The degree of myocardial fibrosis was higher while the number of Ki-67 positive cells was lower in C1ORF54 knockout mice. Although the expression of p38/p-P38, STAT3/p-STAT3, and  $\beta$ -catenin was similar, the p-AKT phosphorylation of infarct

myocardium was considerably reduced in C1ORF54 knockout mice ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** The present study suggests that C1ORF54 promotes cardiac repair after myocardial infarction through PI3K/AKT signaling pathway.

**【Key words】** C1ORF54; Myocardial infarction; Cardiac repair

缺血性心脏病是威胁人类健康的主要疾病之一。急性心肌梗死后心肌组织大量损伤、坏死<sup>[1]</sup>,由于成年哺乳动物的心肌再生能力有限,坏死心肌常由肉芽组织和胶原瘢痕替代,引起心室结构和功能的改变,最终导致心力衰竭<sup>[2-4]</sup>。以往的研究发现,骨髓来源的前体细胞群可以分泌一系列细胞因子、趋化因子以及生长因子,并通过旁分泌作用促进组织修复<sup>[5]</sup>。1 号染色体开放读码框 54 位基因编码蛋白(C1ORF54)是一种具有潜在促修复功能的分泌蛋白<sup>[6]</sup>,本研究旨在探讨 C1ORF54 对心肌梗死后心脏修复的作用和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠购买自上海斯莱克实验动物有限公司,C1ORF54 敲除小鼠(C57BL/6 遗传背景,C1KO)购自上海南方模式生物科技股份有限公司。小鼠在上海交通大学附属瑞金医院实验动物中心 SPF 级环境中以普通饲料喂养。实验期间,保持动

物房内适宜的温度、湿度以及光照时间,小鼠自由进食,自由饮水。

### 1.2 实验动物分组

选取 8~12 周雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:敲除假手术组( $n=12$ )、野生假手术组( $n=12$ )、敲除心肌梗死模型组( $n=17$ )和野生心肌梗死模型组( $n=17$ )。其中,野生型小鼠处理流程见图 1,C1ORF54 敲除小鼠做相同分组处理。

### 1.3 主要试剂

C1ORF54 一抗购自 Abnova 和 Santa Cruz 公司;Ki-67、p38 丝裂原活化蛋白激酶/磷酸化的 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38/p-P38)、信号传导及转录激活因子 3/磷酸化的信号传导及转录激活因子 3(STAT3/p-STAT3)、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)和蛋白激酶 B/磷酸化蛋白激酶 B(AKT/p-AKT)抗体购自 Cell Signal Technology 公司,鼠/兔超敏反应组织化学试剂盒、Masson 染色试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自福州迈新公司。

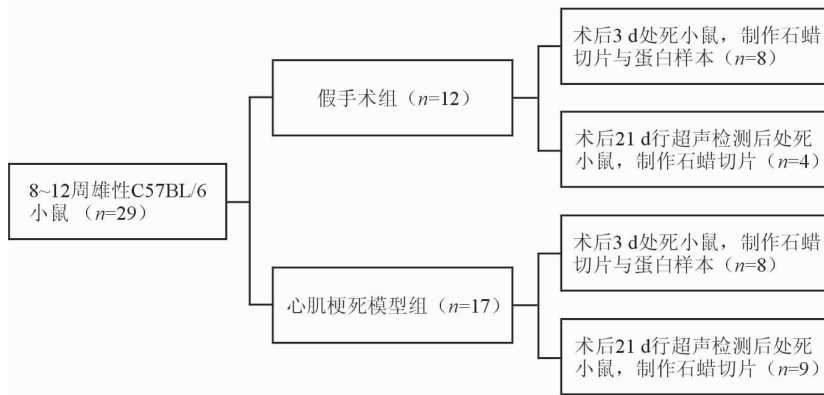


图 1 野生型小鼠处理流程

### 1.4 心肌梗死模型构建

C1ORF54 敲除小鼠及野生型小鼠经异氟烷麻醉,气管插管后连接小动物呼吸机维持麻醉,侧卧位剪开皮肤,撑开器撑开第 3、4 肋软骨,暴露心脏。7-0 丝线结扎冠状动脉左前降支,依次关闭肋骨,并使用 5-0 丝线缝合各层皮肤,撤除麻醉,待小鼠恢复自主呼吸后拔管。假手术组小鼠在暴露心脏后不结扎左前降支,但按相同步骤进行缝合。

### 1.5 心肌梗死后心脏质量及超声心动图检测

造模后,使用小动物超声系统 Visual Sonics Vevo 2100(VISUAL SONIC 公司)检测并计算各

组小鼠心功能各项指标,包括左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)。测定小鼠体质量及心脏组织质量并计算其质量比。

### 1.6 Masson 染色

小鼠于心肌梗死造模后 21 d 行超声检测后处死,并用生理盐水行全身灌注,取出心脏浸泡于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,最终制作成厚度为 5  $\mu$ m 的组织切片。依次进行脱蜡水化、苏木精染色、盐酸酒精分化、丽春红酸性品红染色、冰醋酸浸洗、磷钼酸溶液分化、苯胺蓝染色、常规透明后中性

树胶封片等步骤。采用 Olympus 光学显微成像系统观察并拍照记录。

1.7 免疫组织化学染色法检测 Ki-67 蛋白表达

各组小鼠术后第 3 天的心脏组织石蜡切片,经常规脱蜡水化后,使用柠檬酸缓冲液进行微波加热抗原修复。滴加过氧化酶阻断液阻断内源性过氧化酶,经非免疫动物血清封闭后,加入稀释后一抗孵育,加入生物素标记二抗孵育,加入链霉菌抗生物素-过氧化酶溶液,最终滴加 DAB 显色液。苏木素染核,分化并返蓝,透明,中性树胶封片。于 Olympus 显微镜下观察心肌梗死后心肌组织中蛋白的表达情况。

1.8 Western blot 法检测 p38、STAT3、β-catenin、AKT 等蛋白的表达水平

在各组小鼠术后第 3 天的蛋白样本中加入 PMSF+RIPA 裂解液并研磨、定量,制成蛋白样本。凝胶电泳后,将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。使用 3%BSA 室温下封闭。按蛋白大小裁剪条

带并加入对应一抗,于 4℃孵育过夜。之后加入对应一抗种属来源的二抗,室温下孵育 1 h,使用显影液显影,采用 Tanon 成像系统进行拍摄。

1.9 统计学分析

图像结果均采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料使用均数±标准差表示。组间比较采用 two-way ANOVA 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

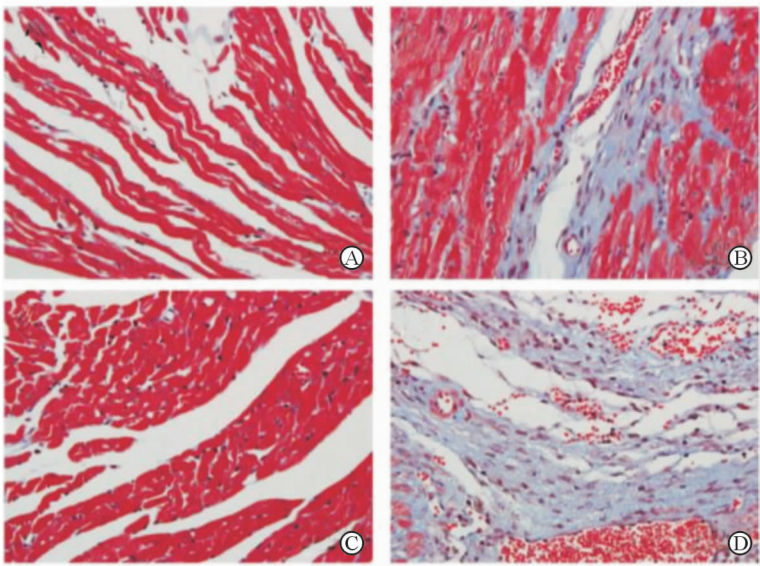
2.1 心功能及纤维化程度比较

造模 21 d 后,心肌梗死模型组与假手术组小鼠相比,心功能各指标均有明显恶化,见表 1。而敲除心肌梗死模型组与野生心肌梗死模型组相比,尽管两组心率相似,但敲除心肌梗死模型组小鼠的 LVEDD、LVESD 和心脏质量比明显升高,而 EF 明显降低( $P$  均 $<0.01$ )。Masson 染色结果显示,C1ORF54 基因敲除小鼠心肌纤维化程度高于野生型小鼠,见图 2。

表 1 造模 21 d 后各组小鼠心脏超声测定比较

	野生假手术组 (n=4)	敲除假手术组 (n=4)	野生心肌梗死模型组 (n=9)	敲除心肌梗死模型组 (n=9)
体质量/g	23.75±0.23	24.01±0.88	23.69±0.76	23.78±0.64
心脏质量比	4.39±0.16	4.37±0.12	6.50±0.19 <sup>(1)</sup>	6.85±0.15 <sup>(2)(3)</sup>
心率/次·min <sup>-1</sup>	586.3±4.2	570.4±11.2	569.7±8.4	572.1±10.6
LVEDD/mm	3.21±0.19	3.32±0.08	5.41±0.17 <sup>(1)</sup>	6.04±0.14 <sup>(2)(3)</sup>
LVESD/mm	1.53±0.18	1.62±0.09	5.07±0.19 <sup>(1)</sup>	5.77±0.15 <sup>(2)(3)</sup>
FS/%	50.13±1.57	50.56±0.73	8.33±0.54 <sup>(1)</sup>	6.90±0.83 <sup>(2)(3)</sup>
EF/%	80.68±1.03	81.72±1.59	23.12±0.70 <sup>(1)</sup>	18.75±3.03 <sup>(2)(3)</sup>

注:与野生假手术组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与敲除假手术组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ;与野生心肌梗死模型组比较,<sup>(3)</sup> $P<0.05$



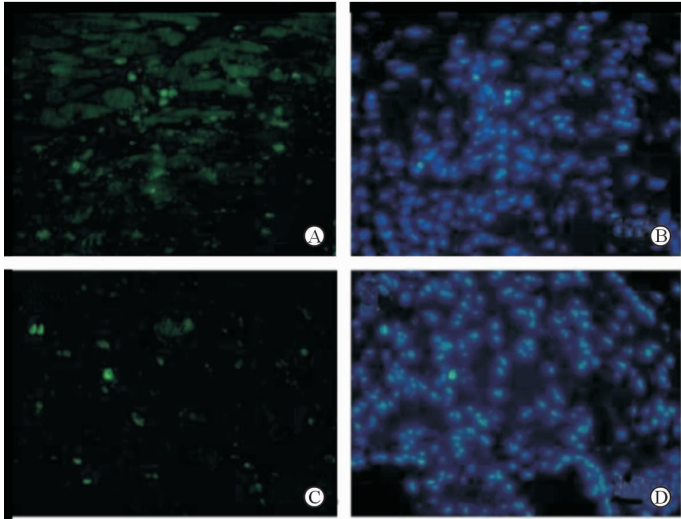
注: A 为野生假手术组术后 21 d 的心肌组织;B 为野生心肌梗死模型组术后 21 d 的心肌组织;C 为敲除假手术组术后 21 d 的心肌组织;D 为敲除心肌梗死模型组术后 21 d 的心肌组织;红色部分为正常肌纤维,蓝色部分为胶原纤维

图 2 小鼠心肌组织 Masson 染色结果(×400)

2.2 心肌组织 Ki-67 染色结果

小鼠左室心肌 Ki-67 免疫组织化学染色结果显示,心肌梗死后第 3 天,C1ORF54 基因敲除小鼠

Ki-67 阳性细胞数较野生型小鼠明显升高( $P$  均 $<0.05$ ),见图 3。



注:A 为敲除心肌梗死模型组术后 3 d 的 Ki-67 染色;B 为敲除心肌梗死模型组术后 3 d 的 Ki-67 与 DAPI 共染色;C 为野生心肌梗死模型组术后 3 d 的 Ki-67 染色;D 为野生心肌梗死模型组术后 3 d 的 Ki-67 与 DAPI 共染色;图中绿色为 Ki-67 阳性细胞,蓝色为 DAPI 核染色

图 3 小鼠心肌组织 Ki-67 免疫组织化学染色结果(×400)

2.3 p38、STAT3、β-catenin、AKT 通路蛋白的表达变化

Western blot 检测结果表明,心肌梗死造模后第 3 天,敲除心肌梗死模型组小鼠的 p38/p-P38、STAT3/p-STAT3、β-catenin 的蛋白表达水平与野生型心肌梗死模型组相比,差异无统计学意义,但敲除心肌梗死模型组小鼠 p-AKT 通路蛋白的表达水平明显低于野生型心肌梗死模型组( $P<0.01$ )。敲除假手术组与野生假手术组相比,各蛋白表达水平并无明显差异。见图 4。

3 讨论

分泌蛋白具有改善心肌梗死后组织再灌注以及舒缩功能的潜力,近年来受到广泛关注。在哺乳动物蛋白质组中,大约 2 000 种蛋白具有与分泌功能相关的结构<sup>[7]</sup>,但至今大多数蛋白的生物学功能未被检测出。Jay 等<sup>[8]</sup>发现了两种具有分泌蛋白结构和潜在的促进组织修复功能的蛋白,包括 C19ORF10(后命名为“骨髓来源生长因子”)和 C1ORF54。之后的研究表明,C19ORF10 可促进血管及心肌细胞再生。但是,C1ORF54 的具体功能尚不清楚。本研究显示,C1ORF54 基因的缺失可引起小鼠心肌梗死后左室收缩和舒张功能恶化,心肌纤维化程度上升,这种作用可能通过影响心肌纤维细胞的增殖来完成。这些研究结果提示,C1ORF54 可能在心肌梗死后心脏重构中发挥一定作用。

既往研究发现,C1ORF54 可能通过影响 IGF-1/mTOR/AKT 信号通路,参与先天性弥漫性高胰岛素血症的发生发展<sup>[9]</sup>。PI3K/AKT 通路在细胞增殖、迁移、蛋白合成和血管生成中发挥着重要作用<sup>[10-11]</sup>。本研究显示,心肌梗死后 C1ORF54 敲除小鼠 p-AKT 的激活受到明显抑制,提示 C1ORF54 可能通过激活 AKT 通路而发挥抑制心肌纤维细胞增殖的功能。我们推测,心肌梗死后 C1ORF54 作为分泌蛋白,进入血液循环,进而影响心肌纤维细胞的增殖。然而,有关

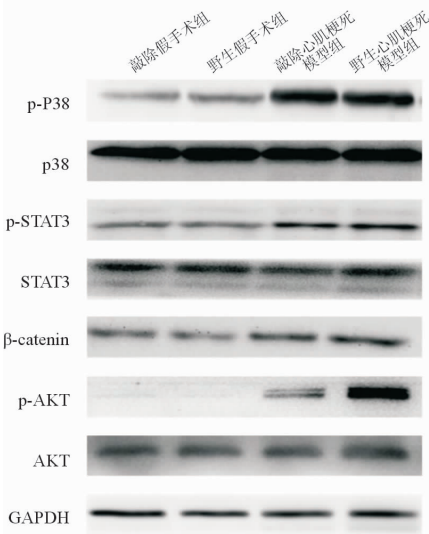


图 4 各组小鼠心脏信号通路蛋白的表达情况

C1ORF54 如何释放入血液循环,以及通过何种方式调控 PI3K/AKT 信号通路,仍需要进一步研究。此外,C1ORF54 对心肌梗死后心肌纤维化的具体作用机制也需进一步论证。

本研究证明,C1ORF54 可以通过调控 PI3K/AKT 信号通路,促进心肌梗死后心肌纤维细胞增殖,进而改善左心功能。C1ORF54 有望成为心肌梗死治疗的新靶点。

### 参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2017, 135 (10): e146-e603.
- [2] Burns RJ, Gibbons RJ, Yi Q, et al. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(1):30-36.
- [3] Kelle S, Roes SD, Klein C, et al. Prognostic value of myocardial infarct size and contractile reserve using magnetic resonance imaging[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(19): 1770-1777.
- [4] Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction[J]. Circulation, 2008, 118(20):2057-2062.
- [5] Wollert KC, Drexler H. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(4):204-215.
- [6] Korf-Klingebiel M, Rebol M, Klede S, et al. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction[J]. Nat Med, 2015, 21(2): 140-149.
- [7] Grimmond SM, Miranda KC, Yuan Z, et al. The mouse secretome: functional classification of the proteins secreted into the extracellular environment[J]. Genome Research, 2003, 13(6B):1350-1359.
- [8] Jay SM, Lee RT. Protein engineering for cardiovascular therapeutics: untapped potential for cardiac repair [J]. Circ Res, 2013, 113(7):933-943.
- [9] Senniappan S, Brown RE, Hussain K. Genomic and morphoproteomic correlates implicate the IGF-1/mTOR/AKT pathway in the pathogenesis of diffuse congenital hyperinsulinism[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2016, 9(2): 548-562.
- [10] Yu J, Li M, Qu Z, et al. SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/AKT [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(5):496-505.
- [11] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/AKT pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2013, 10(3):301-312.

(收稿:2018-04-28 修回:2018-12-03)

(本文编辑:丁媛媛)

## 《国际心血管病杂志》2019 年征订启事

《国际心血管病杂志》是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、卫生系列高级职称评审核心期刊和华东地区优秀期刊。《国际心血管病杂志》设综述、基础研究、临床研究、经验交流、短篇论著、病例报告等栏目。办刊宗旨为:执行党和国家的卫生工作政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针,及时反映国内外心血管领域临床、科研、防治工作的重大进展,促进国内外心血管领域学术交流,服务于心血管专业的中高级临床、教学和科研工作者。

《国际心血管病杂志》为双月刊,逢单月 25 日出版,大 16 开本,全国各地邮局订购,邮发代号 4-188。

定价 12.0 元/期,全年 72.0 元。编辑部常年接受个人邮购,免收邮费。

地址:200031,上海市建国西路 602 号《国际心血管病杂志》编辑部

电话:021-33262055

Email: xin\_xg@aliyun. com