

长期高脂饮食对小鼠心肌组织自噬、凋亡及炎症反应的影响

刘强 韩晨俊 吴晓云 臧旺福 周健

【摘要】 目的:研究长期高脂饮食对小鼠心肌组织自噬、凋亡及炎症反应的影响。

方法:6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和高脂喂养组,饲养至 24 周时,称量体质量,取小鼠心脏及附睾周围脂肪组织并称重,计算心脏质量/体质量比值;Western blot 和实时荧光定量聚合酶链反应检测小鼠心肌组织自噬、心肌凋亡及炎症反应相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平。 **结果:**与对照组相比,高脂喂养组体质量、内脏脂肪和心脏组织质量均明显增加,心脏质量/体质量的比值也明显增加(P 均 <0.05);小鼠心肌组织自噬标志基因 LC3 II 的 mRNA 和蛋白表达明显降低,自噬核心基因 *Becn1* 的 mRNA 和蛋白表达水平也明显降低(P 均 <0.05);凋亡相关基因 *Bax* 和 *Bad* 的 mRNA 表达水平均明显升高,凋亡标志蛋白裂解型胱天蛋白酶-3(c-caspase-3)和裂解型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(c-PARP)的蛋白表达水平均明显升高(P 均 <0.05);炎症基因 *NLRP3*、白细胞介素(IL)-1 β 和胱天蛋白酶-1(*caspase-1*)的 mRNA 表达水平均明显增加(P 均 <0.05)。 **结论:**长期高脂饮食抑制小鼠心肌组织自噬,增加心肌细胞凋亡和炎症反应相关基因的表达。

【关键词】 自噬;凋亡;炎症反应;高脂饮食;心肌组织

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.05.012

Effects of long-term high-fat diet on autophagy, apoptosis and inflammation in myocardium of mice LIU Qiang, HAN Chenjun, WU Xiaoyun, ZANG Wangfu, ZHOU Jian Department of Cardiac Surgery, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072, China

【Abstract】 Objective: To study the effect of long-term high-fat diet on autophagy, apoptosis and inflammation of myocardium in mice. **Methods:** Six-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into the control group and high-fat feeding group. All the mice were weighed after being fed for 24 weeks. The pericardiac and periepididymal adipose tissue were isolated and weighed to calculate the heart weight/body weight ratio. Western blot and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction were used to detect changes in the mRNA and protein expression levels of autophagy, myocardial apoptosis and inflammatory response-related genes in myocardium. **Results:** Compared with the control group, body mass, visceral fat and heart weight were higher in the high-fat feeding group, and heart weight/body weight ratio was also higher (all $P<0.05$). The mRNA and protein expression of autophagy-related gene LC3 II in the high-fat feeding group was lower, so did the *Becn1*, the core gene of autophagy (all $P<0.05$). The mRNA levels of apoptosis-related genes *Bax* and *Bad* were significantly higher, and the protein levels of c-caspase-3 and c-PARP, apoptosis marker proteins, were significantly higher in the high-fat feeding group (all $P<0.05$). The mRNA levels of inflammatory genes *NLRP3*, *IL-1 β* and *caspase-1* were higher in the high-fat feeding group (all $P<0.05$). **Conclusions:** Long-term high-fat diet inhibits autophagy in myocardium of mice, and increases the

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会面上项目(201440476);上海市自然科学基金(18ZR1435800)

作者单位:200070 上海,同济大学附属第十人民医院心胸外科

通信作者:周健, E-mail: drjose@163.com

expression of apoptosis and inflammation related genes.

【Key words】 Autophagy; Apoptosis; Inflammation; High-fat diet; Myocardium

肥胖是导致心血管病的重要因素。肥胖增加心输出量,使左室压力负荷增加,并诱发左室肥厚,最终导致心力衰竭^[1]。自噬是一种溶酶体依赖的降解途径,需要自噬相关基因(ATG)的参与,可调节心肌细胞结构和功能^[2-3]。在正常心脏中,自噬充当细胞质成分周转的管家,维持能量平衡^[4],溶酶体关联膜蛋白 2(LAMP2)缺乏引起的自噬降解缺陷可导致严重的心功能障碍^[5]。自噬在主动脉弓缩窄(TAC)、肺动脉高压(PAH)等情况下被激活,促进心肌肥厚,抑制自噬能减缓心肌肥厚^[6];而 Li 等^[7]发现特异性敲除心肌细胞自噬基因 ATG7 会加重心肌肥厚。凋亡和炎症反应在心血管病的发展中起重要作用^[8-9],自噬与凋亡的相关蛋白存在相互作用^[10],自噬可调节炎症小体依赖的炎症反应信号^[11]。本研究观察长期高脂饮食对小鼠心肌细胞自噬、凋亡和炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠购自上海 SLAC 实验动物公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自 PIERCE 公司;抗微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)抗体购自 Sigma 公司;抗 ATG5 抗体、抗 ATG7 抗体、抗裂解型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(c-PARP)抗体、抗裂解型胱天蛋白酶-3(c-caspase-3)抗体购自 CST 公司;抗 GAPDH 抗体购自上海康成公司;RNA 逆转录酶购自 Invitrogen 公司;SYBR Premix Ex TaqTM 荧光实时定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公

司;引物购自博尚生物公司。

1.2 实验分组

常规饲料喂养 12 只 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 1 周,将小鼠随机分为对照组和高脂饲料喂养组(HFD 组),每组 6 只。对照组继续予以常规饲料喂养,HFD 组改为高脂饲料喂养,每周测量体质量,饲养至 24 周,禁食 12 h 后称重并处死小鼠,取小鼠心脏及附睾周围脂肪组织并称重。将心脏组织保存在 -80℃ 冰箱中,用于蛋白质和 RNA 的提取。

1.3 Western blot 分析

取部分小鼠心脏匀浆,提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,等量蛋白质经过 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移到硝化纤维素膜上,室温下用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 2 h,加入 LC3、ATG5、ATG7、c-PARP、c-caspase-3、GAPDH 等一抗 4℃ 孵育过夜,加入 HRP 标记的兔或鼠二抗室温下孵育 2 h,ECL 发光,用 ImageQuant LAS 4000 化学发光成像分析仪显影,ImageJ 软件对蛋白表达水平进行定量。

1.4 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测

用 Trizol 试剂分离总 RNA,逆转录后在 LightCycler480 PCR 系统(Roche 公司)中用 SYBR 预混 ExTaq 进行定量 PCR 分析,引物序列见表 1。以 36B4 基因作为内参,每个样本均设置复孔,并进行 3 次独立实验。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
36B4	AGCGCT CCTGGCATTGCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT
Becn1	ACCGT TCACCATCCAGGA	GAAGCTGTGGCACTTCT GT
ATG5	TGTGCTTCGAGATGTG	GTCAATAGCTGATCTTGGCA
ATG7	CCTGCA CAACCA CACAC	CACCTGATTATGGCT TCCC
ULK1	AAGTTC GAGTT CT CGCAA G	ACCTCCAAGGTCGT GCTTCT
BAD	TGAGCCGAGTGAGCAGGAA	GCC TCCATGAT GATTGGGT
Bax	AGACAGGGGCCTTT GCTAC	AATTCGCCGGAGACACATCG
NLRP3	AT TACCCGCCGAGAAAGG	CATGA GTGGCTA GAAG
IL-1β	GAAA TGCCACCTTT GAAGTG	TGGAT GCTC TCAGGACAG
caspase-1	AACAGAAGAGAATGGACA	ACCCTCGGAGAAAAG
LC3 II	TTATAGAGCGATACAAGGGGGAG	CGCCGTCGTATTATCTTGATGAG

注:Becn1 为酵母自噬基因 Atg6/Vps30 的同系物;ATG5 为自噬相关基因 5;ATG7 为自噬相关基因 7;ULK1 为人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1;BAD 为 BCL-2/BCL-XL 相关凋亡启动子;Bax 为 BCL-2 相关 X 蛋白;NLRP3 为 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3;IL-1β 为白细胞介素-1β;caspase-1 为胱天蛋白酶-1

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件包进行统计学分析。所有实验数据用均数±标准差表示,组间比采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食诱导小鼠肥胖并增加心脏质量

与对照组小鼠相比,HFD 组小鼠体质量、内脏脂肪和心脏组织质量均明显增加,心脏质量/体质量的比值也明显增加(*P* 均<0.05)。见表 2。

表 2 两组小鼠体质量和心脏质量比较

组别	体质量/g	心脏质量/g	内脏脂肪质量/g	心脏质量/体质量/mg·g ⁻¹
对照组	30.51±1.17	0.17±0.01	0.86±0.07	5.47±0.63
HFD 组	51.23±0.97 ⁽¹⁾	0.46±0.04 ⁽¹⁾	1.91±0.24 ⁽¹⁾	9.14±0.71 ⁽¹⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05

表 3 两组小鼠心肌自噬相关基因 mRNA 与蛋白表达水平比较

基因名称	mRNA 表达水平		蛋白表达水平	
	对照组	HFD 组	对照组	HFD 组
<i>ULK1</i>	1.22±0.43	1.02±0.29		
<i>ATG5</i>	1.07±0.39	0.86±0.37	1.00±0.02	1.04±0.09
<i>ATG7</i>	1.30±0.61	1.19±0.34	1.01±0.06	1.00±0.05
<i>Becn1</i>	1.48±0.54	0.79±0.23 ⁽¹⁾	1.02±0.08	0.67±0.03 ⁽¹⁾
<i>LC3 II</i>	1.01±0.16	0.66±0.11 ⁽²⁾	1.00±0.03	0.67±0.07 ⁽¹⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与对照组相比,⁽²⁾*P*<0.01

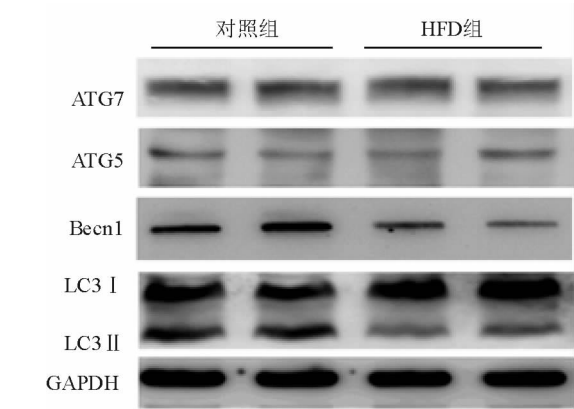


图 1 两组小鼠心肌自噬相关基因的蛋白表达情况

2.3 高脂饮食对心肌组织凋亡的影响

与对照组小鼠相比,HFD 组小鼠心肌组织中促凋亡基因 *Bax*(1.65±0.33 对 1.02±0.25)和 *BAD*(1.57±0.33 对 0.88±0.31)的 mRNA 表达水平明显升高(*P* 均<0.05);HFD 组小鼠心肌组织中凋亡标记基因 *c-PARP*(1.29±0.03 对 1.00±0.07)和 *c-caspase-3*(1.38±0.01 对 1.00±0.08)的蛋白表达水平显著升高(*P* 均<0.05),见图 2。

2.2 高脂饮食抑制心肌组织的自噬

与对照组小鼠相比,HFD 组小鼠心肌组织中 *Becn1* 和 *LC3 II* 的 mRNA 表达水平明显降低(*P* 均<0.05),两组 *ATG5*、*ATG7* 和 *ULK1* 的 mRNA 表达水平的差异无统计学意义,见表 3。与对照组小鼠相比,HFD 组小鼠心肌 *Becn1* 和 *LC3 II* 的蛋白表达水平明显降低(*P* 均<0.05),两组 *ATG5*、*ATG7* 的蛋白表达水平的差异无统计学意义,见表 3、图 1。

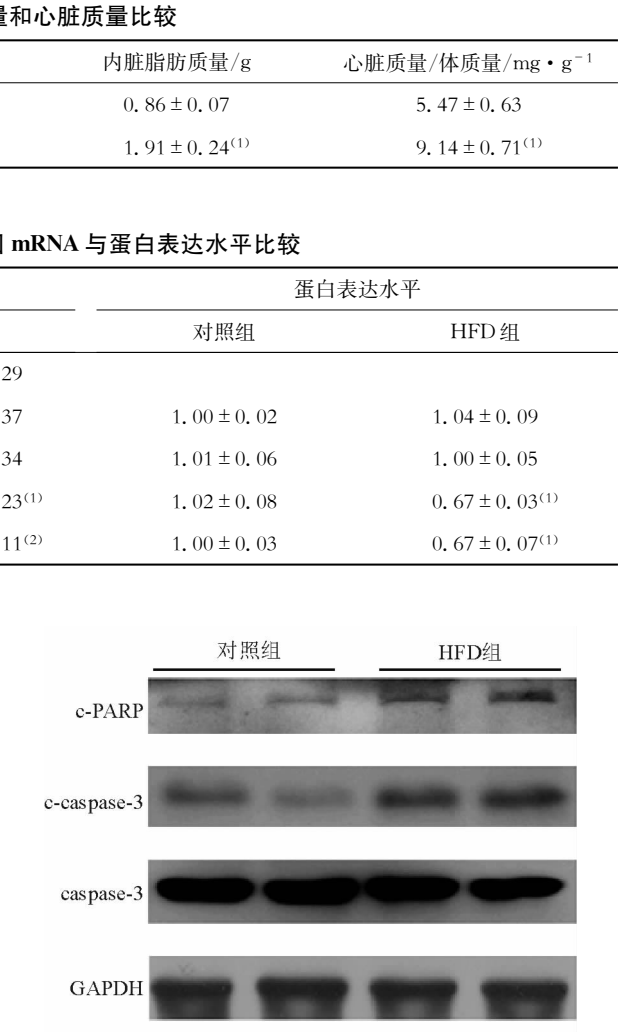


图 2 两组小鼠心肌凋亡相关蛋白的表达情况

2.4 高脂饮食促使心肌组织发生炎症反应

与对照组小鼠相比,HFD 组小鼠 *NLRP3* 的 mRNA(1.46±0.42 对 0.73±0.31,*P*<0.05)和蛋白(2.37±0.02 对 1.00±0.06,*P*<0.01)表达水平明显升高,胱天蛋白酶-1(*caspase-1*,1.60±0.26 对 0.97±0.14,*P*<0.01)和白细胞介素-1β(*IL-1β*,1.15±0.08 对 0.99±0.07,*P*<0.05)的 mRNA 表达水平也明显上调,见图 3。

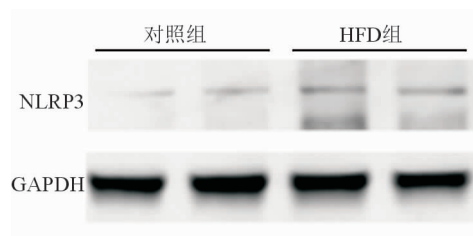


图 3 两组小鼠炎症基因的蛋白表达情况

3 讨论

高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型被广泛应用于研究。据报道,24 周高脂饮食喂养可诱导小鼠肥胖和心脏肥大^[12]。高脂饮食喂养 16 周的小鼠心脏质量和心肌细胞大小明显增加^[13]。本研究采用高脂饲料喂养小鼠 24 周,发现高脂饮食小鼠的体质量和心脏质量/体质量显著增加,提示心肌肥大模型构建成功。在此基础上,本研究进一步观察高脂饮食小鼠的心肌自噬、凋亡及炎症基因的表达变化,发现高脂饮食可以抑制小鼠心肌组织的自噬,增加心肌组织的凋亡,加重炎症反应,提示自噬、凋亡和炎症反应可能参与肥胖引起的心肌肥厚和功能障碍。

自噬在不同刺激如衰老、缺血、高血压等诱导的心肌肥厚中起着重要作用^[14]。本研究为明确自噬是否与高脂饮食引起的心肌肥大有关,检测高脂饮食小鼠 *Becn1*、*ATG5*、*ATG7*、*ULK1* 和 *LC3* 等自噬核心基因的表达变化。这些因子参与自噬的起始、成核、伸长/封闭步骤,促进自噬体形成。其中 *Becn1* 是自噬的关键调节因子,协调自噬途径的每个主要步骤。*LC3* 是自噬的标志蛋白,*LC3II/LC3I* 的比值可反映自噬活性。Lancel 等^[15]发现在高脂饮食 12 周的小鼠心肌组织中,自噬标志基因 *LC3 II/LC3 I* 比值的变化无统计学意义,而自噬底物 *P62* 的水平明显升高。Wang 等^[16]的研究表明在高脂饮食 11 个月的小鼠的心肌组织中,*LC3 II/LC3 I* 比值明显降低,*P62* 蛋白水平明显升高。本研究结果显示,24 周高脂饮食喂养明显降低了小鼠心肌组织中自噬标志基因 *LC3 II* 和自噬核心基因 *Becn1* 的表达水平。但近期也有研究表明,在高脂饮食 24 周的小鼠的心肌组织中,*LC3 II* 和 *P62* 的表达水平增加,提示自噬通量受损与自噬降解有关^[12]。因此,需要进一步明确肥胖状态下心肌组织的自噬活性。

细胞凋亡是维持细胞稳态的方法。在缺血/再灌注和心力衰竭的心肌细胞中,凋亡增加,细胞凋亡促进代偿性心肌肥厚发展为失代偿性心肌肥厚,进而导致心力衰竭^[17]。在肥胖动物模型如 db/db 小鼠中,心肌细胞凋亡增加,在高脂饮食诱导的肥

胖小鼠中,凋亡标志物 c-PARP 增加^[12]。这提示凋亡参与了肥胖引起的心肌功能障碍。本研究检测高脂饮食小鼠心肌组织中凋亡相关基因的变化,结果表明高脂饮食喂养 24 周可显著增加小鼠心肌细胞凋亡基因的表达,这与先前的研究结果相似。近期研究发现,自噬与细胞凋亡密切相关。自噬核心基因 *Becn1* 具有与抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 相互作用的 BH3 结构域^[18],在凋亡中可被 caspase 裂解,从而失去其自噬活性^[19]。提示在高脂饮食诱导的肥胖小鼠心肌中,细胞凋亡的增加可能是通过抑制自噬实现。

研究发现,肥胖患者的脂肪组织释放大量炎症因子,促进全身慢性低度炎症反应,慢性炎症反应是肥胖患者发生心血管并发症的重要原因。在高脂饮食诱导的肥胖动物模型中,炎症反应可能在心肌肥大和心力衰竭的进展中起重要作用。既往文献表明,激活 NLRP3 炎症小体可通过激活 caspase-1 促进 IL-1 β 的成熟和分泌,进一步触发炎症反应。本研究果显示,高脂饮食显著增加小鼠心肌 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 表达水平。有研究表明,6-氨基-3-甲基嘌呤对自噬的抑制显著增加了炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 在人和小鼠脂肪组织中的表达,特别是在肥胖组中,自噬通过降解受损的线粒体抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[20],提示抑制自噬可能加速炎症反应,导致心脏功能障碍。

本研究利用高脂饮食诱导心肌肥大小鼠模型,发现长期高脂饮食可以抑制心肌细胞自噬,激活凋亡和炎症反应,这可能为预防和治疗肥胖引起的心血管病提供新的治疗靶点。

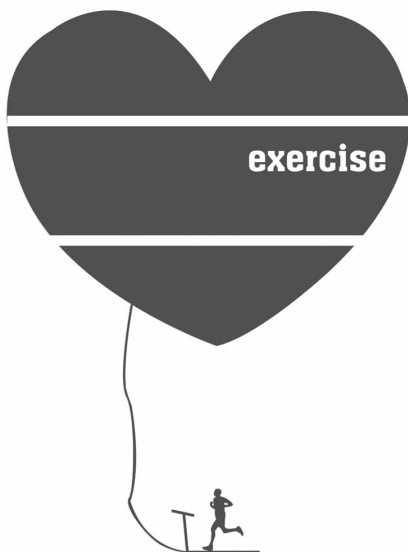
参 考 文 献

- [1] Lavie CJ, Alpert M, Arena R, et al. Impact of obesity and the obesity paradox on prevalence and prognosis in heart failure[J]. JACC Heart Fail, 2013, 1(2):93-102.
- [2] Wang ZV, Ferdous A, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy: metabolic profit and loss[J]. Heart Fail Rev, 2013, 18(5): 585-594.
- [3] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4):445-544.
- [4] De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(9): 1485-1495.
- [5] Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice[J]. Nature, 2000, 406(6798):902-906.
- [6] Rifki OF, Hill JA. Cardiac autophagy: good with the bad[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 60(3):248-252.

- [7] Li S, Liu C, Gu L, et al. Autophagy protects cardiomyocytes from the myocardial ischaemia-reperfusion injury through the clearance of CLP36[J]. Open Biol, 2016, 6(8):160177.
- [8] Taube A, Schlich R, Sell H, et al. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302 (11): H2148-H2165.
- [9] Kim NH, Kang PM. Apoptosis in cardiovascular diseases: mechanism and clinical implications[J]. Korean Circ J, 2010, 40(7):299-305.
- [10] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4):571-580.
- [11] Zhong ZS, Karin M. Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases [J]. Clin Exp Rheumatol, 2016, 34(4 Suppl 98):12-16.
- [12] Hsu HC, Chen CY, Lee BC, et al. High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy[J]. Eur J Nutr, 2016, 55(7):2245-2254.
- [13] Zeng H, Vaka VR, He X, et al. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(8): 1847-1856.
- [14] Zhu H, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease[J]. Methods Enzymol, 2009, 453:343-363.
- [15] Lancel S, Montaigne D, Marechal X, et al. Carbon monoxide improves cardiac function and mitochondrial population quality in a mouse model of metabolic syndrome[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e41836.
- [16] Wang Z, Li L, Zhao H, et al. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice[J]. Metabolism, 2015, 64(8):917-925.
- [17] Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure[J]. J Clin Invest, 2003, 111(10):1497-1504.
- [18] Ciechomska IA, Goemans GC, Skepper JN, et al. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function [J]. Oncogene, 2009, 28(21):2128-2141.
- [19] Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1 [J]. Oncogene, 2010, 29 (12): 1717-1719.
- [20] Saitoh T, Akira S. Regulation of inflammasomes by autophagy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138 (1): 28-36.

(收稿:2020-04-21 修回:2021-08-05)

(本文编辑:胡晓静)



运动演绎精彩

健康成就未来