

• 基础研究 •

射血分数保留的心力衰竭小鼠端粒缩短的研究

黄舒影 陈骁楠 张俊峰 张绘莉

【摘要】 目的:探讨端粒缩短与射血分数保留的心力衰竭(HFpEF)间的关系。**方法:**野生型 C57BL/6J 小鼠、第二代端粒酶敲除(mTRG2)和第三代 mTRKO(mTRG3)小鼠简单随机抽样法分为对照组和 HFpEF 组,每组各 8 只。对照组给予标准饲料和饮水, HFpEF 组给予 60% 高脂饲料和含 0.5 g/L N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)的饮水,造模 16 周。造模开始后每 2 周检测小鼠左室射血分数(LVEF)、二尖瓣口舒张早期和晚期血流速度峰值的比值(E/A)、舒张早期二尖瓣口血流速度峰值和二尖瓣环运动速度峰值的比值(E/e')、左室整体纵向应变(GLS)、舒张末期左室前壁厚度(LVAWd)和舒张末期左室后壁厚度(LVPWd),评估左室收缩与舒张功能及心室重构情况。造模 16 周后,评估小鼠收缩期血压(SBP)、舒张期血压(DBP)和血脂水平。**结果:**高脂饮食和 L-NAME 饮水诱导造模的 16 周期间,各组 LVEF 差异无统计学意义, HFpEF 组野生型小鼠在第 8 周出现了 E/e'、E/A、LVAWd 和 LVPWd 上升及 GLS 的下降($P<0.05$),提示舒张功能降低和左室肥厚,即出现 HFpEF 表型。HFpEF 组 mTRG2 小鼠、mTRG3 小鼠分别在第 6 周和第 4 周出现了 HFpEF 表型。造模 16 周后, HFpEF 组各基因型小鼠的血脂、收缩压、舒张压均较对照组同基因型小鼠明显升高($P<0.05$)。**结论:**端粒缩短可以促进由高脂饮食和 L-NAME 饮水联合诱导的小鼠 HFpEF 早期发生和形成。

【关键词】 射血分数保留的心力衰竭;端粒缩短;基因敲除

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2024.04.011

Effect of telomere attrition in mice of heart failure with preserved ejection fraction HUANG Shuying, CHEN Xiaonan, ZHANG Junfeng, ZHANG Huili Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

【Abstract】 Objective: To explore the relationship between telomere attrition and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). **Methods:** Wild-type C57BL/6J mice, second-generation mTRKO mice(mTRG2) and third-generation mTRKO mice(mTRG3) were divided into control and HFpEF groups by a random sampling method($n=8$ in each group). The control group was given routine feed and normal drinking water, while the model group was given 60% high-fat diet and drinking water containing 0.5 g/L N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for 16 weeks. Left ventricular ejection fraction(LVEF), peak early to late trans-mitral flow velocity ratio (E/A), peak early diastolic mitral valve flow to annular motion velocity ratio (E/e'), global longitudinal strain(GLS), left ventricular anterior (LVAWd) and posterior wall dimensions (LVPWd) were assessed every 2 weeks. Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) and lipid profile were determined at 16 weeks. **Results:** After 16 weeks of treatment with high-fat diet and L-NAME drinking water, there were no significant differences in LVEF values between groups in each genotype. Wild-type mice showed a decrease in diastolic function indices including a increase in E/e', E/A, LVAWd and LVPWd and a decrease in GLS at 8 weeks. HFpEF phenotype was observed in mTRG2 at 6 weeks and in mTRG3 at 4 weeks, respectively. After 16 weeks of modeling, lipid levels, SBP and DBP were significantly higher in the HFpEF group compared

基金项目:上海市自然科学基金(21ZR1438000)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院心内科

通信作者:张绘莉, E-mail: huilizhang815@163.com

to control group of same genotypes ($P < 0.05$). **Conclusion:** Telomere attrition accelerates the development of HFpEF with the combination of high-fat diet and L-NAME drinking water.

【Key words】 Heart failure with preserved ejection fraction; Telomere attrition; Gene knock-out

射血分数保留的心力衰竭 (HFpEF) 是左室射血分数 (LVEF) $\geq 50\%$ 的心力衰竭 (心衰), 大约 50% 的心衰患者表现为 HFpEF^[1]。端粒是真核生物染色体末端一段重复的 DNA 序列, 可以保护染色体末端免受降解和非常规重组, 在控制细胞与机体衰老中起着关键作用^[2]。端粒的长度由端粒酶中的特殊逆转录酶维持, 特殊逆转录酶包括蛋白质 Tert 和 RNA (Terc, TR) 两部分。随着染色体复制和体细胞的增殖, 端粒在机体衰老过程中逐渐缩短, 短端粒或功能失调的端粒可诱导 DNA 损伤反应, 从而触发细胞的复制性衰老。因此端粒缩短被认为是衰老的主要诱导因素^[3]。目前, 针对端粒缩短和 HFpEF 关系的研究仍然较少。本研究使用高脂饲料 (HFD) 和 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 在 C57BL/6J 野生型 (WT) 小鼠和 Terc 敲除 (mTRKO) 小鼠中诱导构建 HFpEF 动物模型^[4], 探究端粒缩短对 HFpEF 发病进程的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

8 周龄的雄性和雌性 WT 小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司, 8 周龄的雄性和雌性第二代 mTRKO 小鼠 (mTRG2) 及第三代 mTRKO 小鼠 (mTRG3) 由国家蛋白质科学研究中心 (上海) 提供。实验小鼠在上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房中饲养, 昼夜光照规律。简单随机抽样法分为对照组和 HFpEF 组, 每组各 8 只。对照组小鼠喂食普通饲料和普通饮水 16 周, HFpEF 模型组小鼠在 60% HFD 和含有 0.5 g/L L-NAME 的饮水条件下饲养 16 周, 期间观察各组 HFpEF 模型的形成与进展。

1.2 试剂与仪器

L-NAME (德国 Sigma 公司), 60% HFD (江苏省协同医药生物工程有限责任公司), 异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司), Vevo 3100 小动物超声成像系统 (加拿大 Visual Sonics 公司),

Softron BP-2010 动物血压计 (日本软隆株式会社), AU5800 全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 心脏超声心动图检测

造模开始后, 小鼠每 2 周进行一次经胸超声心动图检测。检测开始前, 用 2.0% 的异氟烷以大约 0.8 L/min 的流速对小鼠进行深度麻醉。在心电图传感器上涂一层电极胶后, 将小鼠放在 37 °C 恒温平台上。使用彩色多普勒、组织多普勒、M 型超声和二维超声 4 种模式检测小鼠左室射血分数 (LVEF)、二尖瓣口舒张早期和晚期血流速度峰值的比值 (E/A)、舒张早期二尖瓣血流速度峰值和二尖瓣环运动速度峰值的比值 (E/e')、舒张末期左室前壁厚度 (LVAWd) 和舒张末期左室后壁厚度 (LVPWd)。超声心动图检测期间, 异氟烷浓度稳定在 1.0%~1.5%, 并使小鼠心率维持在 350~450 次/min。所有小鼠在超声心动图检测后完全恢复至清醒。超声数据使用 Vevo Lab31003.2.6 进行成像分析。

1.4 小鼠血压、血脂水平检测

使用 Softron BP-2010 动物血压计测量小鼠尾部收缩期血压 (SBP) 和舒张期血压 (DBP)。在正式测试前, 所有小鼠都经过训练以适应血压测量程序。当小鼠状态稳定后, 在温暖 (37°C) 和黑暗的单通道中读取数据。每次至少测量 8 次血压, 至少连续 4 d, 取平均值。

小鼠血清中三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平根据 AU5800 全自动生化分析仪的说明书操作与测量。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 所有数据采用均值 \pm 标准差表示。2 组间的比较采用 Student's *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析, 随后进行 TukeyHSD 事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量变化

自第 4 周起, HFpEF 组雄性野生型、mTRG2、mTRG3 小鼠的体质量较对照组同基因型小鼠明显上升。HFpEF 组雌性 mTRG3 小鼠的体质量在第 4 周起与对照组小鼠呈现出明显的差异, HFpEF 组雌性野生型和 mTRG2 小鼠的体质量在第 8 周开

始明显高于对照组。见表 1。

2.2 血脂和血压水平变化

HFpEF 组小鼠 HFD 与 L-NAME 饮食造模第 16 周时,血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平较对照组明显上升, SBP 和 DBP 较对照组明显升高。见表 2。

表1 WT小鼠与mTRKO小鼠造模期间体质量变化

| 分组 | 时间 | WT小鼠 | | mTRG2小鼠 | | mTRG3小鼠 | |
|--------|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 雄性 | 雌性 | 雄性 | 雌性 | 雄性 | 雌性 |
| 对照组 | 造模前 | 23.21±1.08 | 19.83±1.03 | 23.04±0.95 | 19.65±0.67 | 22.66±0.80 | 19.80±0.72 |
| | 4周后 | 26.34±1.35 | 20.63±0.71 | 26.40±2.15 | 21.26±1.46 | 27.11±1.42 | 20.30±0.55 |
| | 8周后 | 27.28±1.61 | 20.40±0.81 | 26.85±1.40 | 20.35±0.89 | 27.93±1.22 | 20.34±1.02 |
| | 12周后 | 28.80±2.61 | 21.29±1.06 | 29.15±1.68 | 20.34±0.96 | 30.30±1.78 | 21.30±1.14 |
| | 16周后 | 30.26±2.46 | 20.53±0.76 | 30.60±1.97 | 20.30±1.44 | 31.00±1.95 | 20.34±1.05 |
| HFpEF组 | 造模前 | 22.18±1.09 | 19.55±0.81 | 22.36±0.87 | 19.68±0.99 | 22.08±0.96 | 19.66±0.87 |
| | 4周后 | 32.66±2.13 ⁽¹⁾ | 20.13±1.19 | 34.25±3.00 ⁽¹⁾ | 20.34±0.93 | 40.58±4.37 ⁽¹⁾ | 23.86±1.63 ⁽¹⁾ |
| | 8周后 | 41.28±3.13 ⁽¹⁾ | 22.39±0.89 ⁽¹⁾ | 45.49±2.17 ⁽¹⁾ | 23.70±0.75 ⁽¹⁾ | 47.54±3.93 ⁽¹⁾ | 24.69±0.74 ⁽¹⁾ |
| | 12周后 | 44.45±1.12 ⁽¹⁾ | 23.84±0.86 ⁽¹⁾ | 45.26±3.01 ⁽¹⁾ | 28.06±2.01 ⁽¹⁾ | 48.26±3.84 ⁽¹⁾ | 28.74±3.09 ⁽¹⁾ |
| | 16周后 | 46.36±2.04 ⁽¹⁾ | 28.28±1.31 ⁽¹⁾ | 47.30±4.23 ⁽¹⁾ | 30.25±1.82 ⁽¹⁾ | 48.35±3.60 ⁽¹⁾ | 31.69±1.90 ⁽¹⁾ |

注:与对照组相比, ⁽¹⁾P<0.001

表2 WT小鼠与mTRKO小鼠造模16周后血脂和血压比较

| 分组 | 项目 | WT小鼠 | | mTRG2小鼠 | | mTRG3小鼠 | |
|--------|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 雄性 | 雌性 | 雄性 | 雌性 | 雄性 | 雌性 |
| 对照组 | TG | 1.21±0.05 | 0.82±0.11 | 1.23±0.05 | 0.91±0.11 | 1.20±0.08 | 0.93±0.16 |
| | TC | 2.60±0.18 | 2.39±0.07 | 2.58±0.19 | 2.39±0.06 | 2.61±0.15 | 2.38±0.05 |
| | HDL-C | 1.40±0.10 | 0.79±0.03 | 1.42±0.09 | 0.80±0.03 | 1.41±0.09 | 0.82±0.02 |
| | LDL-C | 0.14±0.01 | 0.15±0.03 | 0.14±0.02 | 0.13±0.03 | 0.15±0.01 | 0.14±0.04 |
| | SBP | 104.04±2.19 | 108.49±2.75 | 106.36±2.82 | 109.49±3.70 | 108.10±2.24 | 108.18±4.25 |
| | DBP | 78.78±2.82 | 76.11±3.00 | 80.62±3.85 | 78.48±5.06 | 80.63±3.97 | 78.63±5.12 |
| HFpEF组 | TG | 1.50±0.11 ⁽¹⁾ | 1.55±0.11 ⁽¹⁾ | 1.53±0.23 ⁽¹⁾ | 1.55±0.34 ⁽¹⁾ | 1.52±0.29 ⁽¹⁾ | 1.52±0.08 ⁽¹⁾ |
| | TC | 4.19±0.19 ⁽¹⁾ | 3.88±0.12 ⁽¹⁾ | 4.11±0.47 ⁽¹⁾ | 3.87±0.23 ⁽¹⁾ | 4.17±0.49 ⁽¹⁾ | 3.90±0.38 ⁽¹⁾ |
| | HDL-C | 1.88±0.13 ⁽¹⁾ | 1.38±0.06 ⁽¹⁾ | 1.82±0.19 ⁽¹⁾ | 1.35±0.07 ⁽¹⁾ | 1.77±0.19 ⁽¹⁾ | 1.35±0.06 ⁽¹⁾ |
| | LDL-C | 0.30±0.03 ⁽¹⁾ | 0.27±0.02 ⁽¹⁾ | 0.31±0.04 ⁽¹⁾ | 0.27±0.03 ⁽¹⁾ | 0.31±0.03 ⁽¹⁾ | 0.28±0.02 ⁽¹⁾ |
| | SBP | 128.53±4.53 ⁽¹⁾ | 127.81±3.65 ⁽¹⁾ | 129.36±4.31 ⁽¹⁾ | 129.99±3.26 ⁽¹⁾ | 127.15±5.15 ⁽¹⁾ | 127.97±3.55 ⁽¹⁾ |
| | DBP | 93.23±2.18 ⁽¹⁾ | 105.76±5.74 ⁽¹⁾ | 93.19±2.32 ⁽¹⁾ | 106.07±5.22 ⁽¹⁾ | 94.51±2.77 ⁽¹⁾ | 108.41±2.03 ⁽¹⁾ |

注:与对照组相比, ⁽¹⁾P<0.05

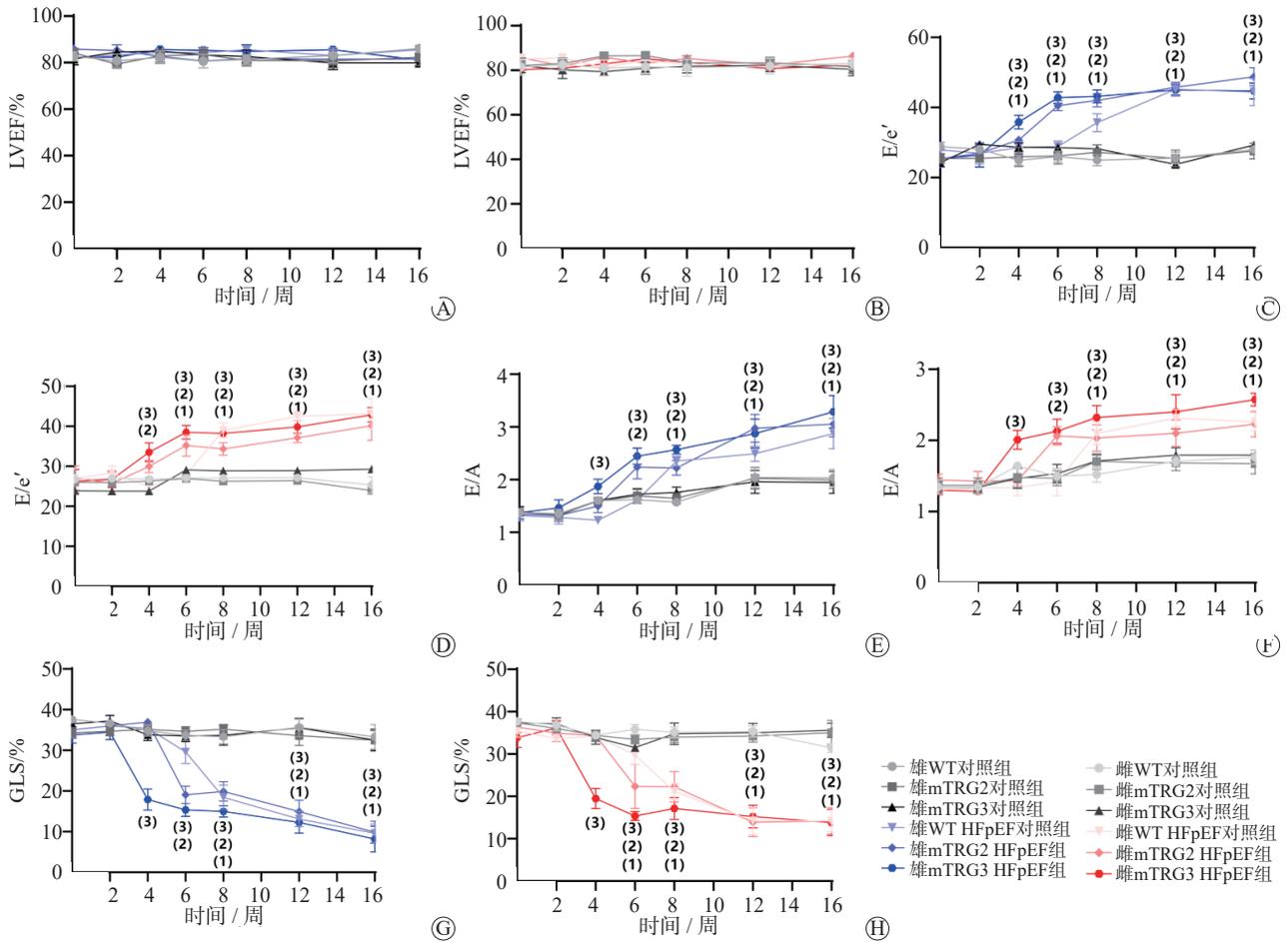
2.3 左室舒张功能的变化

HFD 和 L-NAME 饮水对小鼠左室收缩功能无明显影响,即在 HFpEF 造模的 16 周中,各基因型小鼠 LVEF 均维持在 75% 以上。与对照组相比, HFpEF 组雄性和雌性野生型小鼠在第 8 周出现了舒张功能障碍,即 E/e' 与 E/A 的升高和 GLS 绝对值的降低;雄性和雌性 mTRG2 和 mTRG3 小鼠则分别第 6 周和第 4 周出现了 E/e' 与 E/A 的升高和 GLS 绝对值的降低。提示端粒缩短可能加速

HFD 和 L-NAME 诱导的 HFpEF 表型形成。见图 1。

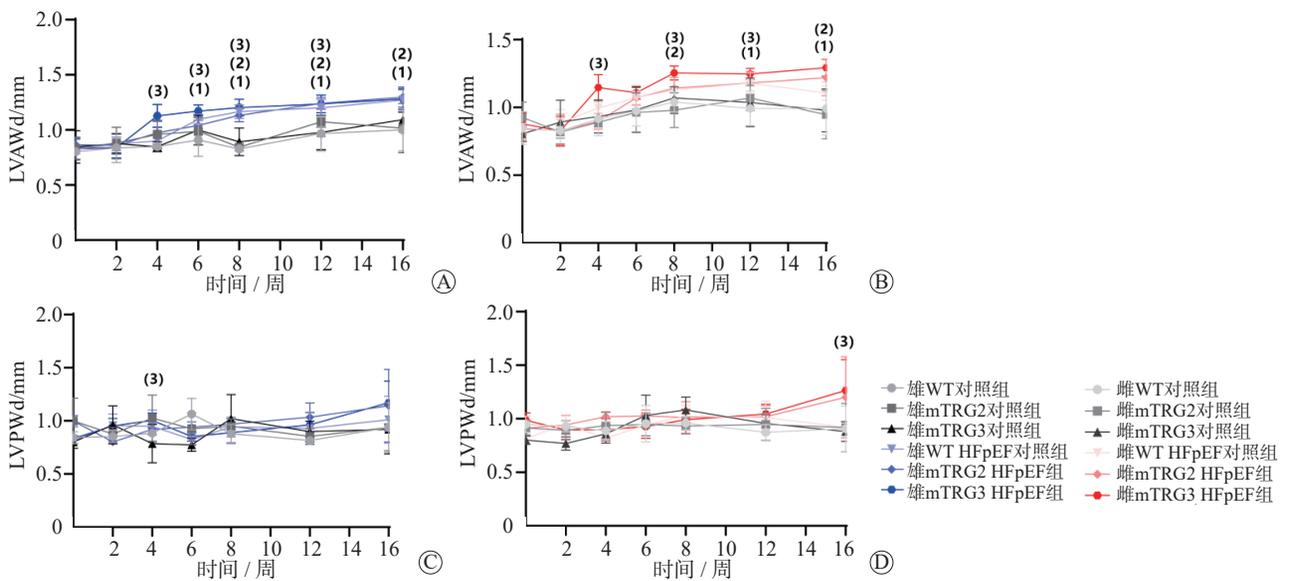
2.4 左室重构情况

与对照组相比, HFpEF 组雄性和雌性 mTRG3 小鼠 LVAwD 在第 4 周起明显增厚。雄性和雌性野生型、mTRG2 小鼠在 HFpEF 造模第 8 周时, LVAwD 出现了一定程度的增厚。HFpEF 组各基因型小鼠 LVPwD 在造模期间与对照组相比没有明显变化。见图 2。



注：A为雄性小鼠LVEF比较；B为雌性小鼠LVEF比较；C为雄性小鼠E/e'比较；D为雌性小鼠E/e'比较；E为雄性小鼠E/A比较；F为雌性小鼠E/A比较；G为雄性小鼠GLS比较；H为雌性小鼠GLS比较。WT小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽¹⁾ $P < 0.001$ ；mTRG2小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽²⁾ $P < 0.001$ ；mTRG3小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽³⁾ $P < 0.001$

图1 WT小鼠与mTRKO小鼠左室收缩和舒张功能的超声心动图改变



注：A为雄性小鼠LVAWd比较；B为雌性小鼠LVAWd比较；C为雄性小鼠LVPWd比较；D为雌性小鼠LVPWd比较。WT小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽¹⁾ $P < 0.05$ ；mTRG2小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽²⁾ $P < 0.05$ ；mTRG3小鼠HFpEF组与对照组相比，⁽³⁾ $P < 0.05$

图2 WT小鼠与mTRKO小鼠造模16周左室重构情况

3 讨论

本研究使用 L-NAME 和含 60% 脂肪的 HFD, 模拟了高血脂、肥胖、高血压等 HFpEF 的疾病特征^[5-6], 该造模方法已广泛运用于 HFpEF 模型的建立^[4-5]。在野生型小鼠中, 经 HFD 和 L-NAME 诱导第 8 周可出现稳定的 HFpEF 表型, 在以端粒缩短为特征的 mTRKO 小鼠中进行 HFpEF 造模, 第 4 周时 HFpEF 组 mTRG3 小鼠已出现体质量的显著性上升、E/e' 与 E/A 的升高和 GLS 绝对值的降低, 而 mTRG2 小鼠舒张功能障碍则在第 6 周左右出现。这些研究结果表明端粒缩短加速 HFpEF 发生。

短端粒是衰老的重要标志之一^[3]。大多数体细胞端粒酶活性缺乏, 随着体细胞的分裂, 端粒逐渐缩短, 染色体失去端粒的保护作用后更容易发生融合和裂变, 继而引起 DNA 损伤和细胞的衰老^[2]。研究表明, 端粒的缩短与多种衰老相关的慢性疾病有关, 如糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病和癌症^[3,7]。本研究在具有端粒缩短特征的 mTRKO 小鼠上, 应用高脂饮食与 L-NAME 饮水诱导 HFpEF 观察端粒缩短与舒张功能障碍和左室重构的关系。mTRG3 小鼠具有比 mTRG2 小鼠更短的端粒, 随着端粒缩短程度的加剧, HFpEF 的发生更早, 该结果进一步验证了 HFpEF 与端粒缩短之间的相关性。

HFpEF 患者的病因多样、异质性大、发病机制复杂, 导致目前针对 HFpEF 的治疗方法极其有限。衰老与许多生理功能逐渐下降的疾病发生有关, 如肥胖、代谢综合征和糖尿病等与 HFpEF 发展密切相关的疾病发病率均随着人口老龄化的加剧而日益增加^[8]。随着世界人口老龄化程度的日益加深, 衰老相关疾病的发生机制为众多学者所重视, 尤其是衰老在 HFpEF 发病机制中所扮演的角色是目前的研究热点。在既往的研究中, 快速老化小鼠 (SAM) 品系^[9]、自然衰老模型^[10]、辐照 γ 射线模型、D-半乳糖衰老模型^[11] 等均被用于构建啮齿类动物衰老模型, 但上述模型存在着相对来源较少、饲养周期长、个体差异大的缺陷。本研究使用 mTRKO 小鼠为研究衰老在 HFpEF 中的作用机制提供了新型、稳定、高效的模型。

衰老可以通过多种机制引起心衰。首先, 作为衰老特征之一的线粒体功能障碍促进了心肌细胞的衰老。衰老的心肌通过线粒体结构异常、自噬抑制、脂肪氧化能力降低和自由基产生增加等线

粒体功能障碍引起心肌细胞衰竭^[12]。其次, DNA 突变的累积也是衰老过程中重要的一环。缺乏 DNA 修复机制的 Ercc1 缺陷小鼠发生进行性的心脏重构及功能障碍, 展现出更严重的心衰和更短的生存期^[13-14]。此外, 表观遗传修饰的改变, 包括 DNA 的甲基化和羟甲基化、组蛋白甲基化和乙酰化及染色质结构的变化均被发现与心衰的发生有关^[15]。一方面, α -酮戊二酸 (α -KG)、乙酰辅酶 A、S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 等代谢相关基因可以通过表观遗传学控制途径影响心衰过程中的能量代谢变化^[16]; 另一方面, 组蛋白去乙酰化可以通过去乙酰化酶家族 (Sirt) 改善心肌细胞的功能障碍, 如 NAD 依赖的去乙酰化酶 3 (SIRT1) / 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α) / 成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 通路能促进自噬^[17], SIRT3/ 叉头框蛋白 O3 (Foxo3) / 锰超氧化物歧化酶 (mnSOD) 轴降低细胞活性氧 (ROS) 水平^[18], SIRT6/ 组蛋白 H3 (Lys9) / 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 轴减少内皮脂肪酸摄取^[19], 上述机制均能使心肌细胞的纤维化和肥大程度减轻。因此, 延缓心肌细胞的衰老为治疗 HFpEF 提供了可行的思路, 通过干预端粒的缩短能够成为治疗 HFpEF 的靶点。

本研究显示, mTRKO 引起的端粒缩短能使舒张功能障碍的发生提前, 这说明短端粒引起的心肌衰老能够加速心衰的进程, 进一步验证了短端粒是 HFpEF 发生的危险因素。随着人类端粒长度和心血管疾病之间关联证据的积累, 了解这些关联的性质为理解衰老相关心血管疾病的病因和发病机制至关重要。mTRKO 小鼠为研究衰老提供了可靠的动物模型, 也为未来基于端粒提供 HFpEF 治疗新靶点积累宝贵经验。

参 考 文 献

- [1] Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(10):591-602.
- [2] Aguado J, d'Adda di Fagagna F, Wolvetang E. Telomere transcription in ageing[J]. Ageing Res Rev, 2020, 62:32565330.
- [3] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. Hallmarks of aging: an expanding universe[J]. Cell, 2023, 186(2):243-278.
- [4] Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction[J]. Nature, 2019, 568(7752):351-356.
- [5] Chen XN, Lin H, Xiong WY, et al. p53-dependent mitochondrial

