

骨化三醇调节 VDR-NF-κB 轴抑制心肌细胞肥大的研究

王自伟¹, 曾永春², 马剑飞^{3△}

1. 陆军军医大学第一附属医院手术麻醉科, 重庆 400038; 陆军军医大学大坪医院: 2. 心内科; 3. 急诊科, 重庆 400042

摘要:目的 研究骨化三醇对心肌细胞肥大的抑制作用及作用机制。方法 采用血管紧张素 II (1 μmol/L) 诱导大鼠心肌细胞株 H9c2 以获得心肌细胞肥大模型; 采用鬼笔环肽染色观察细胞面积; 采用免疫印迹法和免疫荧光法检测维生素 D 受体(VDR)和核转录因子-κB(NF-κB)的表达及核移位; 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)的表达。结果 骨化三醇(≥10 nmol/L)显著抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大; 骨化三醇显著上调肥大心肌细胞模型的 VDR 表达及核移位, 同时显著抑制肥大心肌细胞模型的 NF-κB/p50 亚基表达和核移位, 从而下调促炎细胞因子 TNF-α 和 IL-6 表达。结论 骨化三醇对心肌细胞肥大具有抑制作用, 其机制与调节 VDR-NF-κB 轴从而抑制炎症因子表达有关。

关键词: 心肌细胞肥大; H9c2; 骨化三醇; 维生素 D 受体; 核转录因子-κB; 炎症因子
中图分类号: R542.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2019)15-2178-04

Study on calcitriol inhibits cardiocytes hypertrophy by modulating VDR-NF-κB axis

WANG Ziwei¹, ZENG Yongchun², MA Jianfei^{3△}

1. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Cardiology; 3. Department of Emergency, Daping Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of calcitriol on cardiocytes hypertrophy and its action mechanism. **Methods** Angiotensin II (Ang II, 1 μmol/L) was used to induce rat cardiocyte line H9c2 for obtaining the cardiocyte hypertrophy model. The phalloidine staining was adopted to observe cell area. Western blotting and immunofluorescence were carried out to detect the expression and nuclear translocation of vitamin D receptor (VDR) and nuclear factor-κB (NF-κB). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to detect the expression levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6). **Results** Calcitriol (≥ 10 nmol/L) significantly inhibited Ang II -induced cardiocyte hypertrophy. Moreover, calcitriol remarkably up-regulated VDR expression and nuclear translocation of hypertrophy cardiocyte model, meanwhile significantly inhibited NF-κB/p50 subunit expression and nuclear translocation in hypertrophy cardiocyte model, thus down-regulated proinflammatory cytokines TNF-α and IL-6 expression levels. **Conclusion** Calcitriol has the inhibiting effect on cardiocyte hypertrophy and its mechanism is related with modulating VDR-NF-κB axis to inhibit inflammatory cytokines expression.

Key words: cardiocyte hypertrophy; H9c2; calcitriol; vitamin D receptor; nuclear factor-κB; inflammatory cytokine

成年心肌细胞已基本丧失有丝分裂能力, 在压力负荷、交感因素或其他病理因素刺激下, 通常表现为心肌细胞肥大而不是增殖^[1]。在疾病状态下, 代偿性心肌肥大有利于提升心肌收缩力和心输出量, 但同时也增加组织耗氧量, 进而引起心肌细胞失代偿, 最终导致心力衰竭(简称心衰)和恶性心律失常等严重并发症^[2]。因此, 研究心肌肥大的发病机制和治疗措

施, 具有重要意义。维生素 D(V_D)是重要的固醇类激素, 膳食摄入的 V_D 在体内经代谢转化为 1,25-二羟基维生素 D 即骨化三醇(CCT), 被维生素 D 受体(VDR)识别而发挥作用^[3-4]。流行病学研究表明, 心肌肥大与 V_D 的缺乏或代谢异常具有关联性, 而低 V_D 血症患者心肌肥大和心衰风险升高 90%^[5]。虽然没有临床研究证实膳食补充 V_D 或类似物可以改善患者

心肌肥大和减小心衰风险,但是来自动物实验的数据已显示 V_D 和 CCT 具有心脏保护作用^[3]。但 V_D 类药物对心肌细胞肥大的影响,特别是机制尚不明确。本研究将探讨 CCT 对心肌细胞肥大的保护作用,并聚焦 VDR 及其相关的核转录因子(NF)- κ B 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

CCT、血管紧张素 II (Ang II)、异硫氰酸荧光素(FITC)-鬼笔环肽(美国 Sigma);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco);兔 β -actin 单抗、兔组蛋白 H3 单抗、兔 VDR 单抗、兔 p50 单抗(美国 Cell Signaling);DAPI 染色液、细胞核蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测试盒、AF555-驴抗兔 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔 IgG、一抗/二抗稀释液(上海 Beyotime);引物设计合成、RNAiso 裂解液、RNA 反转录试剂盒(大连 Takara);实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)耗材、SYBR green 预混液、Clarity™ ECL 化学发光底物(美国 Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

大鼠传代心肌细胞株 H9c2 购自中科院上海细胞库。H9c2 细胞培养于含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 中,置于 5%CO₂ 培养箱(37 °C)中培养。取生长旺盛的细胞,按 2×10^4 /孔接种到共聚焦皿中或按 2×10^5 /孔接种到 6 孔板中,贴壁后换液为无血清培养基,培养 24 h 后加药处理。分组:对照组,CCT 组(100 nmol/L),Ang II 组(1 μ mol/L),低、中、高剂量处理组(1 μ mol/L Ang II+1、10、100 nmol/L CCT),继续培养 24 h 后用于后续检测。

1.2.2 细胞骨架

取已给药处理 24 h 的共聚焦皿,去上清液,加入 4%(m/v)多聚甲醛室温固定 10 min;磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 3 次,加入含 1%(m/v)牛血清清蛋白和 0.1%(v/v)Triton X-100 的 PBS,打孔封闭 20 min;PBS 洗涤后加入 FITC-鬼笔环肽(50 μ g/mL)染色 30 min;PBS 洗涤后加入 DAPI(5 μ g/mL)染色 5 min;PBS 洗涤后封片,LSM780 共聚焦显微镜观察。

1.2.3 RT-PCR

引物如下: β -actin(NM_031144.3)上游 5'-ATT ACT GCC CTG GCT CCT AG-3',下游 5'-CGT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3';肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(NM_012675.3)上游 5'-GGA AAG CAT GAT CCG AGA TG-3',下游 5'-CAG TAG ACA GAA GAG CGT GGT G-3';白细胞介素-6(IL-6)(M26744.1)上游 5'-TTG CCT TCT TGG GAC TGA TG-3',下游 5'-ACT GGT CTG TTG TGG GTG GT-3'。采用 RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA 作为模板,PCR 反应体系为 10 μ L。PCR 条件:95 °C 变性 30 s;95 °C 变性 5 s,55 °C

退火延伸 30 s,循环 40 次。反应结束后,测定熔解曲线条件:检测温度 65~95 °C(0.5 °C 增幅),每 2~5 s 采集信号。以内参 β -actin 的循环阈值(Ct)为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计结果,计算 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 相对表达量。

1.2.4 免疫印迹法

取已给药处理 24 h 的 6 孔板,去上清液后加入 PBS 润洗细胞,采用细胞核蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒依次提取细胞质蛋白和核蛋白;BCA 法定量后煮沸变性蛋白;各组取 20 μ g 蛋白,免疫印迹法检测细胞核和细胞质中的 VDR、p50 表达,细胞质蛋白以 β -actin 为内参,核蛋白以组蛋白 H3 为内参。转膜条件:湿法转膜,250 mA 恒流转印 3 h。一抗稀释 1 000 倍、二抗稀释 10 000 倍。显影采用 Clarity™ ECL 化学发光底物,在 ChemiDoc™ Touch 系统中进行化学发光成像。

1.2.5 免疫荧光法

取已给药处理 24 h 的共聚焦皿,固定、打孔、封闭如前述细胞骨架实验;PBS 洗涤后,加入稀释 200 倍的 VDR 或 p50 抗体,4 °C 孵育过夜;PBS 洗涤后加入稀释 200 倍的 AF555-驴抗兔 IgG,室温孵育 2 h;PBS 洗涤后如前述实验染核、封片和观察。采用 Image J 统计核转移系数(核平均荧光强度/细胞质平均荧光强度)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

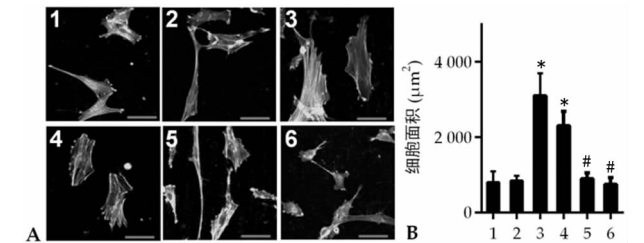
2.1 CCT 对 Ang II 诱导 H9c2 细胞肥大的影响

鬼笔环肽对 H9c2 细胞 F-actin 染色后,其形态为多边形和纺锤形,与成年大鼠杆状的心肌细胞和乳大鼠不规则多边形的心肌细胞有差别(图 1A)。细胞面积统计显示(图 1B):CCT(100 nmol/L)本身对细胞面积无明显影响;而 Ang II 显著增加细胞面积($P < 0.01$);低剂量 CCT(1 nmol/L)对 Ang II 诱导的 H9c2 细胞肥大有一定下调作用,但差异无统计学意义($P > 0.05$);中、高剂量 CCT(≥ 10 nmol/L)具有显著的抑制细胞肥大作用($P < 0.01$),中剂量 CCT(10 nmol/L)即能将细胞面积减小到对照水平。根据上述结果,选择 10 nmol/L 作为后续实验 CCT 浓度。

2.2 CCT 对 Ang II 诱导 H9c2 细胞 VDR 表达和核移位的影响

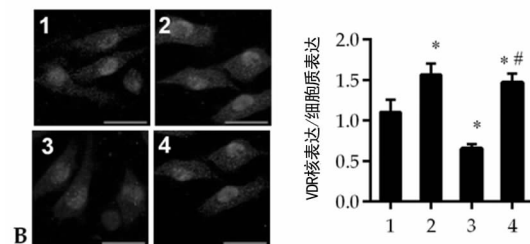
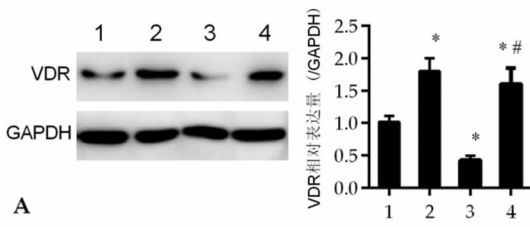
免疫印迹法结果显示(图 2A):CCT 作为激动剂,可上调 VDR 表达;与之相反,Ang II 则显著抑制 VDR 表达;而 CCT 与 Ang II 联合后,CCT 可逆转被 Ang II 下调的 VDR 表达,表达水平接近单用 CCT。该结果表明 CCT 可拮抗 Ang II 对 VDR 表达的抑制作用。由于 CCT 为转录因子,需活化进入细胞核才能发挥作用,因此采用免疫荧光法观察 CCT 对 VDR 核移位的影响。结果显示(图 2B):CCT 显著

升高 VDR 核转移系数,表明其促进 VDR 活化入核;与之相反,Ang II 显著抑制 VDR 核移位;当 Ang II 联合 CCT 时,CCT 可显著促进 VDR 核移位,表明其可拮抗 Ang II 抑制 VDR 核移位作用。该结果与免疫印迹法结果一致,表明 CCT 可上调被 Ang II 抑制的 VDR 表达,并促进其活化入核。由于 V_D 缺乏与心肌梗大关联,该结果初步提示 CCT 的抗心肌细胞肥大作用与恢复 VDR 功能有关。



注:1为对照组;2为CCT组(100 nmol/L);3为Ang II组(1 μmol/L);4为低剂量处理组(1 μmol/L Ang II + 1 nmol/L CCT);5为中剂量处理组(1 μmol/L Ang II + 10 nmol/L CCT);6为高剂量处理组(1 μmol/L Ang II + 100 nmol/L CCT);A为鬼笔环肽染色;B为细胞面积统计(n=50);标尺为50 μm;与对照组比较,* P<0.01;与Ang II组比较,# P<0.01

图1 CCT对Ang II诱导H9c2细胞肥大的影响

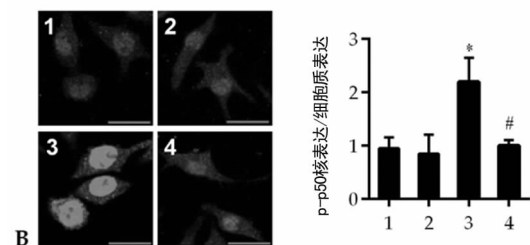
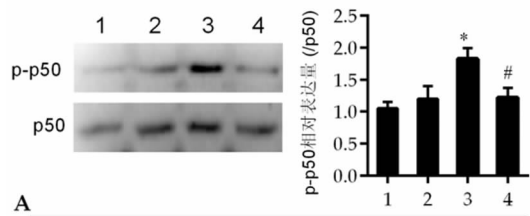


注:1为对照组;2为CCT组(100 nmol/L);3为Ang II组(1 μmol/L);4为中剂量处理组(1 μmol/L Ang II + 10 nmol/L CCT);A为免疫印迹法观察H9c2细胞VDR表达,柱状图为VDR相对表达量统计(n=3);B为免疫荧光法观察H9c2细胞VDR核移位,柱状图为VDR核相对表达量与细胞质相对表达量的比值统计(n=5);标尺为20 μm;与对照组比较,* P<0.01;与Ang II组比较,# P<0.01

图2 CCT对Ang II诱导H9c2细胞VDR表达和核移位的影响

2.3 CCT对Ang II诱导H9c2细胞p-p50表达和核移位的影响 免疫印迹法结果显示(图3A):与VDR结果不同,CCT不影响p50磷酸化;而Ang II显著上调中剂量p50磷酸化;而在中剂量处理组,CCT对Ang II诱导的p50磷酸化具有显著抑制作用,使其下调到正常水平。作为NF-κB主要亚基,活化的p50需

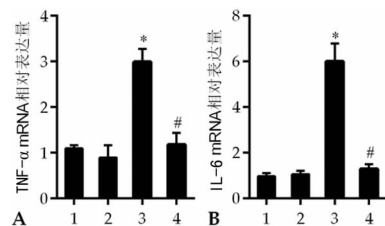
进入细胞核才能发挥作用,因此采用免疫荧光法观察CCT对p-p50核移位的影响。结果显示(图3B):CCT本身不影响p-p50核移位,但其可抑制Ang II诱导的p-p50核移位。该结果与免疫印迹法结果一致,表明CCT可抑制Ang II诱导的NF-κB活化及入核,可能与其抗心肌细胞肥大作用有关。



注:1为对照组;2为CCT组(100 nmol/L);3为Ang II组(1 μmol/L);4为中剂量组处理组(1 μmol/L Ang II + 10 nmol/L CCT);A为免疫印迹法观察H9c2细胞p-p50表达,柱状图为p-p50相对表达量统计(n=3);B为免疫荧光法观察H9c2细胞p-p50核移位,柱状图为p-p50细胞核相对表达量与细胞质相对表达量的比值统计(n=5);标尺为20 μm;与对照组比较,* P<0.01;与Ang II组比较,# P<0.01

图3 CCT对Ang II诱导H9c2细胞p-p50表达和核移位的影响

2.4 CCT对Ang II诱导H9c2细胞炎症因子表达的影响 上述结果已提示CCT通过调节肥大H9c2细胞模型的VDR-NF-κB轴,通过促进VDR功能发挥抑制NF-κB活性的作用。为确认CCT具有抗炎作用,采用RT-PCR观察CCT对肥大H9c2细胞模型的炎症因子TNF-α和IL-6 mRNA表达的影响。结果显示(图4):与p-p50结果一致,CCT本身不影响TNF-α和IL-6表达,但显著抑制Ang II诱导的这两种炎症因子mRNA表达。上述结果表明,CCT通过调节VDR-NF-κB轴抑制炎症因子表达,可能与其抗心肌细胞肥大作用有关。



注:1为对照组;2为CCT组(100 nmol/L);3为Ang II组(1 μmol/L);4为中剂量处理组(1 μmol/L Ang II + 10 nmol/L CCT);A为TNF-α mRNA相对表达量(n=3);B为IL-6 mRNA相对表达量(n=3);与对照组比较,* P<0.01;与Ang II组比较,# P<0.01

图4 CCT对Ang II诱导H9c2细胞炎症因子表达的影响

3 讨 论

心肌肥大是原发性高血压、心衰、恶性心律失常、瓣膜病等心血管疾病的独立危险因素,其基本特征包括心肌细胞体积增大、蛋白质合成增多及胚胎基因重新表达^[1]。心肌肥大病因众多、发病分子机制复杂、参与信号通路广泛且高度交联,导致靶向干预研究进展缓慢,目前主要依赖抗高血压药进行早期预防和靶器官保护。因此,研究心肌肥大的分子机制和有效干预措施具有理论价值和应用前景。

研究表明,神经-体液因素及炎症因素在心肌肥大病理生理过程中发挥重要作用^[1,6]。在神经-体液因素中,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)是导致心肌肥大的重要病因,其核心成员 Ang II 在体内外均有诱导心肌肥大作用。炎症因素如 NF- κ B 也是功能明确的心肌肥大致病因子^[7]。NF- κ B 活化后,其 p50/p65 亚基移位入核,激活炎症因子如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等表达,参与心肌肥大过程^[8]。而抑制 NF- κ B 活性,则能改善实验小鼠心肌肥大^[9]。值得注意的是,在心肌细胞中 NF- κ B 可被肥大激活剂如 Ang II、PE 和 ET-1 等激活,从而介导心肌肥大,本研究也支持该结论。因此,NF- κ B 拮抗药成为新的抗心肌肥大候选药物,但已知的 NF- κ B 抑制剂如 Bay11-7082 等因安全性等问题无法进入临床。

VDR 是新发现的能与 NF- κ B 相互作用的抑制性转录因子。在巨噬细胞中的研究表明,VDR 激活后,可直接与 NF- κ B 的 p50 亚基结合,抑制其活化入核,从而发挥抗炎活性^[7]。流行病学证据也表明,V_D 的缺乏或代谢异常人群的心肌肥大发病率显著升高^[5,10]。但是,在心脏组织中激活 VDR 是否具有抗心肌肥大的作用,以及激活 VDR 是否通过抑制 NF- κ B 活性发挥作用尚不明确。在本研究中发现采用 CCT 激活 VDR,确实有抗心肌细胞肥大作用,且该作用与抑制 NF- κ B 活化和移位入核有关。因此,本研究初步证明激活 VDR 从而治疗心肌肥大是可行的,并且从 NF- κ B 的角度初步解析了其作用机制。

综上所述,CCT 通过调节 VDR-NF- κ B 轴抑制炎症因子表达,从而发挥抗心肌细胞肥大作用。

参考文献

[1] THAM Y K, BERNARDO B C, OOI J Y, et al. Patho-

physiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch toxicol, 2015, 89: 1401-1438.

- [2] HAQUE Z K, WANG D Z. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74: 983-1000.
- [3] NORMAN P E, POWELL J T. Vitamin D and cardiovascular disease[J]. Circul Res, 2014, 114: 379-393.
- [4] GOEMAN F, DE NICOLA F, DONORIO DE MEO P, et al. VDR primary targets by genome-wide transcriptional profiling[J]. J Steroid Biochem Molecular Biol, 2014, 143: 348-356.
- [5] DAMORE C, MARSICO F, PARENTE A, et al. Vitamin D deficiency and clinical outcome in patients with chronic heart failure: a review[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dise, 2017, 27: 837-849.
- [6] VAN DER HEIDEN K, CUHLMANN S, LUONG LE A, et al. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease[J]. Clin Sci, 2010, 118: 13-18.
- [7] MA D, ZHANG R N, WEN Y, et al. 1, 25(OH)2D3-induced interaction of vitamin D receptor with p50 subunit of NF-kappaB suppresses the interaction between KLF5 and p50, contributing to inhibition of LPS-induced macrophage proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482: 366-374.
- [8] MA D, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Inhibition of myocardial hypertrophy by magnesium isoglycyrrhizinate through the TLR4/NF-kappaB signaling pathway in mice[J]. Int immunopharmacol, 2018, 55: 237-244.
- [9] YOUNG D, POPOVIC Z B, JONES W K, et al. Blockade of NF-kappaB using IkappaB alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-over-expressed transgenic mice[J]. J Mol Biol, 2008, 381: 559-568.
- [10] SONG J, CHEN X, CHENG L, et al. Vitamin D receptor restricts T helper 2-biased inflammation in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114: 870-879.

(收稿日期:2019-03-10 修回日期:2019-06-08)