

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.11.024

过表达整合素连接激酶+间充质干细胞移植对心肌梗死后心室重构的改善作用及作用机制*

梁秀琳¹, 章传龙², 张庆华³, 桑鹏程², 毛 庆^{2△}

南京市溧水区人民医院/东南大学附属中大医院溧水分院:1. 神经内科;
2. 心内科;3. 影像科, 江苏南京 211200

摘要:目的 探讨过表达整合素连接激酶(ILK)+间充质干细胞(MSCs)移植对心肌梗死后心室重构的改善作用及作用机制。方法 选取 80 只 SD 大鼠,随机分为 A~H 组,每组 10 只,均建立急性心肌梗死模型。在结扎缺血 45 min、再灌注 2 h 后,A 组大鼠心室内注射磷酸盐缓冲液(PBS)200 μ L,B 组心室内注射 MSCs PBS 悬液,C、G 组心室内注射转染过表达 ILK 载体的 MSCs PBS 悬液,D 组心室内注射转染低表达 ILK 载体的 MSCs PBS 悬液;E、H 组心室内注射过表达 ILK 载体+长链非编码 RNA 转录因子 7(LncTCF7)shRNA 载体共转染的 MSCs PBS 悬液;F 组心室内注射低表达 ILK 载体+LncTCF7 shRNA 载体共转染的 MSCs PBS 悬液,G、H 组在左侧颈上神经节注射 2 μ L TCZ。在干预后第 4 周时采用心脏超声和心导管法检测大鼠心功能和血流动力学指标;将心肌组织分别进行 HE 染色、Masson 染色,观察心肌组织损伤、胶原沉积情况;采用免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、血小板内皮细胞黏附分子(CD31)表达水平;采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测心肌组织中 LncTCF7 mRNA 表达水平;采用 Western blot 实验检测心肌组织中白细胞介素-6(IL-6)、Janus 激酶-2(JAK2)、信号传导及转录激活蛋白-3(STAT3)、转录因子 7(TCF7)、Wnt 家族成员 7a(Wnt7a)、 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平。**结果** 剔除造模及干预过程中死亡的大鼠,最终 A、F、G 组各 9 只,B、D、E、H 组各 8 只,C 组 7 只。与 A 组比较,B、C 组左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短分数(LVFS)、PCNA 和 CD31 阳性率、LncTCF7 mRNA、IL-6、TCF7、Wnt7a、 β -catenin 蛋白表达水平及磷酸化(p)-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 升高,左心室舒张末期内径(LVEDD)、右心室收缩压(RVSP)、右心室舒张压(RVEDP)、右心室内压最大上升速率(RV+dp/dtmax)、右心室内压最大下降速率绝对值(|RV-dp/dtmax|)、细胞凋亡率降低,D 组 LVEDD、RVSP、RVEDP、|RV-dp/dtmax|降低,TCF7 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。E 组 LVFS、TCF7 蛋白表达水平低于 A 组,PCNA 阳性率低于 B、D 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。F 组 LVEF、RVSP 低于 A 组,PCNA 及 CD31 阳性率低于 B、C 组,LncTCF7 mRNA、IL-6、TCF7 蛋白表达水平以及 p-JAK2/JAK2 低于 A 组,凋亡率高于 B、E、G 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。G 组 LVFS,以及 IL-6、TCF7、Wnt7a、 β -catenin 蛋白表达水平低于 A 组,LncTCF7 mRNA 表达水平高于 A、D、E、F、H 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。C 组心功能指标以及 PCNA 阳性率,LncTCF7 mRNA、IL-6、TCF7、p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平均优于其余各组,H 组心功能指标、细胞凋亡率,以及 PCNA、CD31 阳性率、LncTCF7 mRNA、IL-6、TCF7、Wnt7a、 β -catenin 蛋白水平均显著劣于其余各组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 过表达 ILK+MSCs 移植可能通过激活 IL-6/STAT3 信号轴,并上调下游 LncTCF7/TCF7-Wnt 通路,从而改善心室重构。

关键词: 心肌梗死; 整合素连接激酶; 间充质干细胞; 细胞移植; 心室重构; 长链非编码 RNA 转录因子 7

中图法分类号:R542.2+2;R457.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)11-1566-08

Improvement effects and mechanism of overexpression of integrin-linked kinase combined with mesenchymal stem cell transplantation to post-myocardial infarction ventricular remodeling*

LIANG Xiulin¹, ZHANG Chuanlong², ZHANG Qinghua³, SANG Pengcheng², MAO Qing^{2△}

1. Department of Neurology; 2. Department of Cardiology; 3. Department of Medical Imaging, Lishui District People's Hospital of Nanjing/ Lishui Branch of Zhongda Hospital, Affiliated to Southeast University, Nanjing, Jiangsu 211200, China

* 基金项目:国家中医临床研究基地(江苏省中医院)开放课题(JD2019SZ16);江苏省卫生健康委员会科研项目(Z2020026);江苏省南京市卫生科技发展项目(YKK22238)。

作者简介:梁秀琳,女,副主任医师,主要从事神经影像学相关研究。△ 通信作者,E-mail:peakman23@163.com。

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of intramyocardial transplantation of integrin-linked kinase (ILK)-overexpressing mesenchymal stem cells (MSCs) on ventricular remodeling after myocardial infarction. **Methods** A total of 80 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into eight groups, with 10 rats in each group. After 45 min of ischemia and 2 h of reperfusion, rats were assigned to eight groups. Group A received an intracardiac injection of 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS). Group B received an injection of MSCs suspended in PBS. Groups C and G were administered MSCs transfected with ILK-overexpressing vectors. Group D received MSCs transfected with ILK knockdown vectors. Groups E and H were treated with MSCs co-transfected with ILK-overexpressing vectors and LncTCF7 shRNA vectors, while Group F was injected with MSCs co-transfected with ILK knockdown vectors and LncTCF7 shRNA vectors. Groups G and H were injected with 2 μ L of TCZ in the left superior cervical ganglion. At the fourth week after intervention, cardiac function and hemodynamic parameters were assessed using echocardiography and cardiac catheterization. Myocardial tissues were subjected to hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson's trichrome staining to evaluate myocardial injury and collagen deposition. Immunohistochemistry was performed to detect the expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). Myocyte apoptosis was examined using the TUNEL assay. The expression level of LncTCF7 in myocardial tissue was quantified by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). Western blot analysis was conducted to determine the protein expression levels of interleukin-6 (IL-6), Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), transcription factor 7 (TCF7), Wnt family member 7a (Wnt7a) and β -catenin in myocardial tissue. **Results** After excluding rats that died during modeling or intervention, the final number of surviving rats was 9 in Groups A, F and G; 8 in Groups B, D, E and H; and 7 in Group C. Compared with Group A, left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), positive expression rates of PCNA and CD31, LncTCF7 mRNA expression level, IL-6, TCF7, Wnt7a and β -catenin protein expression levels, as well as the ratios of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were significantly increased in Groups B and C, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). In contrast, left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), right ventricular systolic pressure (RVSP), right ventricular end-diastolic pressure (RVEDP), maximum rate of rise of right ventricular pressure (RV+dp/dtmax), absolute value of maximum rate of decline of right ventricular pressure ($|RV - dp/dtmax|$) and the apoptosis rate were significantly decreased in these groups ($P < 0.05$). LVEDD, RVSP, RVEDP and $|RV - dp/dtmax|$ in Group D were reduced, while TCF7 protein expression level was elevated, with all differences reaching statistical significance ($P < 0.05$). LVFS and TCF7 protein expression level in Group E were significantly lower than those in Group A, and the PCNA-positive rate was significantly lower than that in Groups B and D, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). LVEF, RVSP in Group F were significantly reduced compared with Group A ($P < 0.05$). The positive rates of PCNA and CD31 were significantly lower than those in Groups B and C. LncTCF7 mRNA expression level, IL-6 and TCF7 protein expression levels, as well as the p-JAK2/JAK2, were also decreased compared with Group A, whereas the apoptosis rate was significantly higher than that in Groups B, E, and G, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). LVFS and IL-6, TCF7, Wnt7a, β -catenin protein expression levels in Group G were significantly lower than those in Group A. However, LncTCF7 mRNA expression level was significantly higher than that in Groups A, D, E, F and H, with all differences being statistically significant ($P < 0.05$). Cardiac function parameters, the PCNA-positive rate, LncTCF7 mRNA expression level, IL-6, TCF7 protein expression levels and p-STAT3/STAT3 ratio in Group C were superior to all other groups ($P < 0.05$). Cardiac function indices and PCNA/CD31-positive rates in Group H were markedly decreased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$). In addition, LncTCF7 mRNA expression level, IL-6, TCF7, Wnt7a, β -catenin protein expression levels were significantly lower than those in all other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Transplantation of ILK-overexpressing MSCs may improve ventricular remodeling by activating the IL-6/STAT3 signaling axis and upregulating the downstream LncTCF7/TCF7-Wnt pathway.

Key words: myocardial infarction; integrin-linked kinase; mesenchymal stem cells; cell transplantation; ventricular remodeling; long non-coding RNA transcription factor 7

据报道,全球心肌梗死的发病率不断上升^[1],该病不仅损害心脏的收缩和舒张功能,还显著增加了心力衰竭及相关并发症的发生风险。因此,寻找有效的治疗策略以抑制心室重构、改善心脏功能具有重要的临床意义。间充质干细胞(MSCs)因具有多向分化潜能、自我更新能力以及在组织修复中的免疫调节作用,成为治疗心肌梗死后心肌损伤的重要手段之一,有报道称,MSCs 移植可显著降低心肌梗死小鼠的心肌细胞凋亡率,缩小梗死面积,改善心脏纤维化和心功能^[2]。MSCs 移植可能是治疗急性心肌梗死的潜在疗法。然而,MSCs 体内移植后因病理环境复杂且存活率较低,导致临床疗效受限^[3]。因此,增强 MSCs 的生物活性和治疗效果已成为研究的热点。近年来,整合素连接激酶(ILK)因其在细胞增殖、分化、迁移及存活中的关键作用^[4],引起了广泛关注。ILK 通过与细胞膜整合素及细胞内多种信号分子的相互作用,调控细胞外基质与细胞骨架的连接,从而在细胞信号转导和基质稳态中发挥核心作用^[5]。本课题组前期研究结果表明,ILK 通过促进 MSCs 存活和自我更新,可能在治疗缺血性心脏病方面具有潜在价值^[6-7]。因此,本研究探讨了过表达 ILK+MSCs 移植对心肌梗死后心室重构的改善作用及其具体作用机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 SPF 级 SD 大鼠 80 只,8 周龄,体质量(220±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。MSCs 由成年 SD 大鼠股骨和胫骨骨髓中分离而来,且经流式细胞术鉴定,均为 CD29、CD44、CD90 阳性,CD45 阴性,实验经本院实验动物伦理委员会批准(20200817-01)。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括小动物呼吸机(美国 KENT 公司)、小动物超声心动仪(荷兰飞利浦公司)、压力换能器(新西兰 Kaha Sciences 公司)、ABI7500 PCR 仪(美国应用生物系统公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、化学发光系统(美国 Bio-Rad 公司)、光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。主要试剂包括 α -MEM 培养液、胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司),TRIzol 试剂、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(美国 Sigma 公司),Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),TUNEL 试剂盒(美国 Promega 公司),一步法实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒(美国赛默飞世尔公司),SYBR Green 荧光探针(日本 takara 公司),RapidStepTM 增强型化学发光(ECL)试剂(美国 EMD Millipore 公司),增殖细胞核抗原(PCNA)、血小板内皮细胞黏附分子(CD31)、白细胞介素-6(IL-6)、Janus 激酶-2(JAK2)、信号传导及转录激活蛋白-3(STAT3)、转录因子 7

(TCF7)、Wnt 家族成员 7a(Wnt7a)、 β -连环蛋白(β -catenin)、 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司)。药品为托珠单抗(TCZ)注射液(日本 Chugai Pharma Manufacturing Co., Ltd,国药准字 SJ20171024,规格:80 mg/4 mL)。过表达 ILK 载体、长链非编码 RNA 转录因子 7(LncTCF7) shRNA 载体均根据课题组既往构建^[7],低表达 ILK 载体(ILK RNAi)由吉凯生物设计构建;LncTCF7 引物由上海生工生物工程有限公司生产。

1.3 MSCs 培养和载体转染 制备 MSCs 悬液接种于 6 孔板,在含 10%胎牛血清和 100 μ g/mL 青霉素-链霉素的 α -MEM 培养液中培养,培养条件 37 $^{\circ}$ C,CO₂ 体积分数为 5%。载体转染的最佳感染倍数为 150。转染 2 h 后加入等体积的含 20%胎牛血清的 α -MEM 培养液继续培养,24 h 后采用 RT-PCR 检测 ILK、LncTCF7 的 mRNA 表达水平以验证转染效果。动物造模前,分别制备 MSCs 磷酸盐缓冲液(PBS)悬液(5×10^5 /mL)备用。

1.4 动物分组、造模及干预 将 80 只 SD 大鼠适应性喂养 5 d,采用随机数字表法分为 8 组(A~H 组),每组 10 只。所有大鼠均采用左前降支冠状动脉结扎法建立心肌梗死模型,大鼠用 2%异氟烷吸入麻醉后固定在手术台上,备皮,气管插管后连接呼吸机,切开左侧第 4 肋间皮肤,分离肌肉、暴露心脏,将心脏挤出胸腔,识别并分离左前降支冠状动脉并结扎,心电图显示胸前导联 ST 段抬高提示模型成功建立。结扎 45 min 后剪断眼科线恢复心脏灌注,灌注 2 h 后,A 组大鼠心室内注射 PBS 200 μ L,B~H 组分别注射转染不同载体的 MSCs PBS 悬液 200 μ L,具体方法:B 组心室内注射未干预的 MSCs PBS 悬液,C、G 组心室内注射转染过表达 ILK 载体的 MSCs PBS 悬液,D 组心室内注射转染低表达 ILK 载体的 MSCs PBS 悬液;E、H 组心室内注射过表达 ILK 载体+LncTCF7 shRNA 载体共转染的 MSCs PBS 悬液;F 组心室内注射低表达 ILK 载体+LncTCF7 shRNA 载体共转染的 MSCs PBS 悬液。注射完成后,将心脏回纳胸腔,缝合。G、H 组在左侧颈上神经节注射 2 μ L TCZ(IL-6 抑制剂,20 mg/mL)。大鼠继续饲养,干预后第 4 周进行超声心动图等后续检查。

1.5 指标检测

1.5.1 超声心动图检查心功能 大鼠禁食 8 h,用 2%异氟烷吸入麻醉后,固定后备皮,用小动物超声心动仪测量大鼠左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短分数(LVFS)和左心室舒张末期内径(LVEDD)。

1.5.2 心导管法检测血流动力学指标 将 PE 导管用热水浸泡软化,导管尖端每隔 1 cm 弯曲 120 $^{\circ}$,以利于插入右心室,保持弯曲至冷却定性,尾端连接针头。

将压力换能器连接 Lab Scribe 数据采集系统,并用三通管将导管连接压力换能器,肝素钠冲管。在大鼠麻醉状态下,剪开右颈部皮肤,暴露并游离颈外静脉,于远心端结扎,在颈外静脉向心方向剪 1 个 V 型口插入导管,沿静脉进入右心室,观察心室波信号,待其稳定后记录心室波,连续测量 5 个稳定的心动周期,测量指标为右心室收缩压(RVSP)、右心室舒张压(RV-EDP)、右心室内压最大上升速率($RV+dp/dt_{\max}$)和右心室内压最大下降速率($RV-dp/dt_{\max}$),计算右心室内压最大下降速率绝对值($|RV-dp/dt_{\max}|$)。

1.5.3 心肌组织 HE 染色 大鼠在麻醉状态下,剪开胸腔、腹腔皮肤,剪断横膈膜和肋骨,暴露并取出心脏,用生理盐水冲洗表面血迹,部分心脏组织固定于 4%多聚甲醛中,剩余部分用液氮速冻,保存于 -80°C 冰箱中。将用 4%多聚甲醛固定 24 h 的心脏取出,用梯度乙醇脱水[70%、80%、90%乙醇各 30 min,95%乙醇 2 次(各 20 min),无水乙醇 2 次(各 20 min)],二甲苯透明,浸蜡、包埋、切片、摊片,用二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱蜡至水,其中部分用于免疫组织化学染色,部分用于 HE 染色。苏木精染色 10 min,自来水冲洗,部分切片用于 Masson 染色,剩余部分继续进行 HE 染色。盐酸乙醇分化 3 s,自来水冲洗,反蓝 3 min,冲洗 3 次,伊红复染 10 min,70%乙醇清洗 60 s,再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封固。在光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织损伤情况。

1.5.4 心肌组织 Masson 染色 在上述切片用苏木精染色后,选取部分切片用于 Masson 染色。丽春红染色 10 min,磷钼酸水溶液处理 4 min,苯胺蓝染色 5 min,1%冰醋酸分化 60 s,脱水、透明、封固,显微镜下进行观察。

1.5.5 心肌组织免疫组织化学染色 用枸橼酸盐缓冲液+微波处理法修复心肌组织石蜡切片抗原,去离子水清洗 3 次,3%过氧化氢温育 10 min,去离子水清洗 2 次,PBS 清洗 1 次,滴加血清,室温封闭 30 min,分别滴加 PCNA、CD31 一抗, 37°C 温育 2 h,PBS 清洗 2 次,滴加生物素化二抗 37°C 温育 40 min,PBS 清洗 2 次,滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 37°C 温育 40 min,PBS 清洗 2 次,用 DAB 显色,在镜下观察显色满意后自来水冲洗终止显色,苏木精复染 30 s,自来水冲洗,反蓝 15 min,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封固。染色为棕黄色即为阳性。选取 5 个不同视野,在光学显微镜下拍照,用 Image J 软件分析阳性累积光密度(IOD)。

1.5.6 TUNEL 实验检测心肌细胞凋亡情况 将脱蜡至水的石蜡切片浸于 0.85%氯化钠溶液中 5 min,PBS 清洗 5 min,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 2 次,滴加 100 μL 蛋白酶 K 温育 20 min,PBS 清洗 5 min,4%多聚甲醛固定 5 min,PBS 清洗 2 次,滴加

100 μL 平衡缓冲液,室温放置 10 min,滴加 100 μL rTdT 反应混合液(试剂盒中包含),在湿盒中 37°C 避光温育 1 h 后终止反应,PBS 清洗 2 次,将切片浸于 0.3%过氧化氢 PBS 3 min,PBS 清洗 3 次,滴加 Streptavidin HRP 溶液 100 μL (1:500),室温温育 30 min,PBS 清洗 3 次,用 DAB 显色,在镜下观察显色满意,即可终止显色。染色为棕黄色即为阳性。

1.5.7 RT-PCR 检测心肌组织中 LncTCF7 的 mRNA 表达 使用 TRIzol 提取心肌组织总 RNA,利用一步法 RT-PCR 试剂盒将总 RNA 反转录,用 SYBR Green 荧光探针配置 PCR 反应体系,在 PCR 仪上进行扩增,扩增条件: 94°C ,15 min,1 次; 95°C ,30 s, 60°C ,30 s, 75°C ,30 s,循环 40 次。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 LncTCF7 mRNA 的相对表达水平。引物序列,LncTCF7 正向:5'-CCTCTGCCTC-CCTAGCTTTT-3';反向:5'-GAGCTTTGTGCTT-GTGACCA-3'; β -actin 正向:5'-TGGCTCTAA-CAGTCCGCCTAG-3';反向:5'-AGTGCGACGTG-GACATCCG-3'。

1.5.8 Western blot 检测心肌组织中蛋白表达 从心肌组织中提取总蛋白,用 BCA 法进行定量,凝胶电泳分离蛋白、转膜,5%脱脂奶封闭 1 h。 4°C 温育 IL-6、JAK2、STAT3、TCF7、Wnt7a、 β -catenin、 β -actin 一抗稀释液(1:800),含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水洗膜 3 次,用辣根过氧化物酶结合的二抗稀释液(1:2 000)室温温育 1 h,用 ECL 试剂显影蛋白条带,并用化学发光系统显像。以 β -actin 作为内参,分析蛋白表达水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行统计处理和分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠心功能和血流动力学指标比较 RT-PCR 结果显示,转染过表达 ILK 载体后,MSCs 细胞中 ILK mRNA 表达上调 3 倍,低表达 ILK 载体和 LncTCF7 shRNA 载体的沉默效率约为 79%,转染效率较好。实验过程中,A、B、E、F、G 组各有 1 只大鼠死亡,C、D、H 组各有 2 只大鼠死亡。此外,在干预后的 4 周内,B、C、E 组各有 1 只大鼠死亡,在后续实验中予以剔除。最终 A、F、G 组各 9 只,B、D、E、H 组各 8 只,C 组 7 只。

各组大鼠 LVEF、LVFS、LVEDD、RVSP、RV-EDP、 $RV+dp/dt_{\max}$ 、 $|RV-dp/dt_{\max}|$ 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 A 组比较,B、C 组 LVEF、LVFS 升高,LVEDD、RVSP、RV-EDP、 $RV+dp/dt_{\max}$ 、 $|RV-dp/dt_{\max}|$ 降低,F 组 LVEF、RVSP 降低,E、G 组 LVFS 降低,D 组 LVEDD、

RVSP、RVEDP、|RV-dp/dtmax|降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。C组各项指标与其他组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。H组指标与其他组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 大鼠心肌组织染色观察 HE染色结果显示,A组大鼠心肌组织可见组织结构紊乱,肌纤维断裂,且

伴随炎症细胞浸润和纤维化,血管周围出现纤维增生,其余各组心肌细胞排列、肌纤维断裂情况以及纤维化和炎症浸润区域均有不同程度的改善。Masson染色结果显示,A组可见大量蓝色染色的胶原纤维沉积,其余各组红色肌纤维比例存在不同程度增加。见图1、2。

表 1 各组大鼠心功能和血流动力学指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别 <i>n</i>	LVEF (%)	LVFS (%)	LVEDD (mm)	RVSP (mmHg)	RVEDP (mmHg)	RV+dp/dtmax (mmHg/s)	RV-dp/dtmax (mmHg/s)
A组 9	46.62±5.24	24.55±2.52	7.60±0.28	74.66±9.34	17.37±4.20	2 584.12±316.18	2 475.00±337.27
B组 8	62.06±6.72 ^a	32.80±4.56 ^a	6.91±0.36 ^a	60.12±7.70 ^a	13.67±1.59 ^{ac}	2 007.94±389.13 ^a	1 712.88±565.77 ^a
C组 7	74.27±8.40 ^{ab}	50.52±7.00 ^{ab}	6.27±0.41 ^{ab}	47.28±9.10 ^{ab}	11.88±2.34 ^{ab}	1 440.51±379.04 ^{ab}	1 055.68±417.52 ^{ab}
D组 8	51.21±5.91 ^{bc}	27.22±2.49 ^c	7.03±0.40 ^{ac}	58.29±7.04 ^{ac}	15.19±2.05 ^{ac}	2 197.56±371.65 ^c	2 056.75±376.47 ^{ac}
E组 8	45.35±5.10 ^{bc}	20.07±3.22 ^{abcd}	7.83±0.59 ^{bcd}	75.01±10.15 ^{bcd}	18.10±1.94 ^{bcd}	2 801.56±571.91 ^{bcd}	2 546.36±385.96 ^{bc}
F组 9	37.05±5.49 ^{abcde}	22.48±1.64 ^{bcd}	7.62±0.27 ^{bcd}	64.40±7.61 ^{ace}	16.38±2.13 ^c	2 637.28±387.30 ^{bcd}	2 358.74±388.11 ^{bde}
G组 9	44.65±6.36 ^{bcdif}	19.13±2.85 ^{abcif}	7.78±0.34 ^{bcd}	77.38±8.43 ^{bcdif}	19.43±2.69 ^{bcdif}	2 891.80±589.15 ^{bcd}	2 623.43±342.25 ^{bcdif}
H组 8	30.20±5.07 ^{abcdefg}	15.69±1.38 ^{abcdefg}	8.25±0.29 ^{abcdefg}	86.09±7.52 ^{abcdefg}	23.37±2.35 ^{abcdefg}	3 247.58±86.63 ^{abcdefg}	3 101.10±433.45 ^{abcdefg}
<i>F</i>	39.976	73.654	21.433	17.314	15.044	12.372	18.394
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与A组比较,^a $P<0.05$;与B组比较,^b $P<0.05$;与C组比较,^c $P<0.05$;与D组比较,^d $P<0.05$;与E组比较,^e $P<0.05$;与F组比较,^f $P<0.05$;与G组比较,^g $P<0.05$ 。

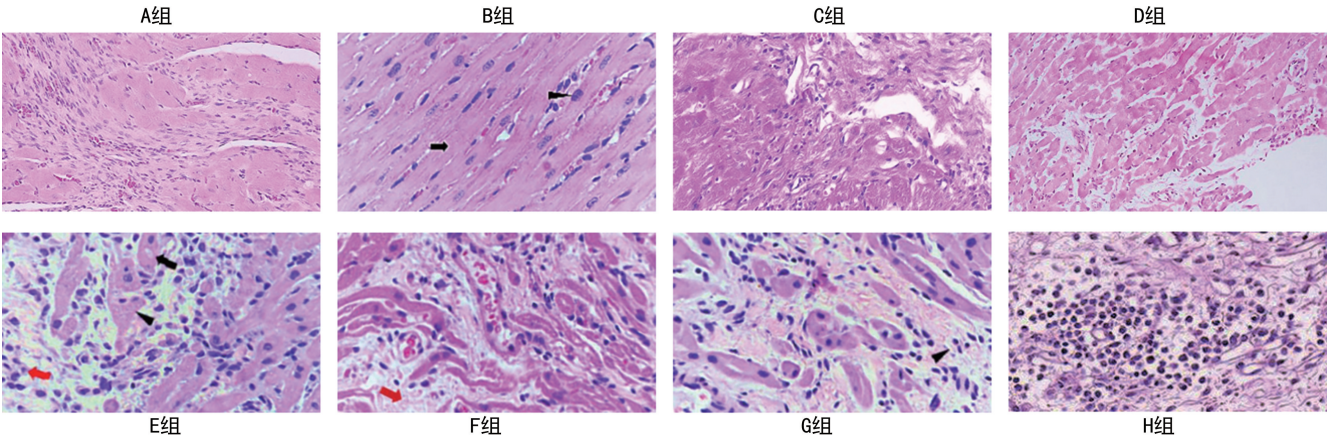


图 1 大鼠心肌组织 HE 染色(400×)

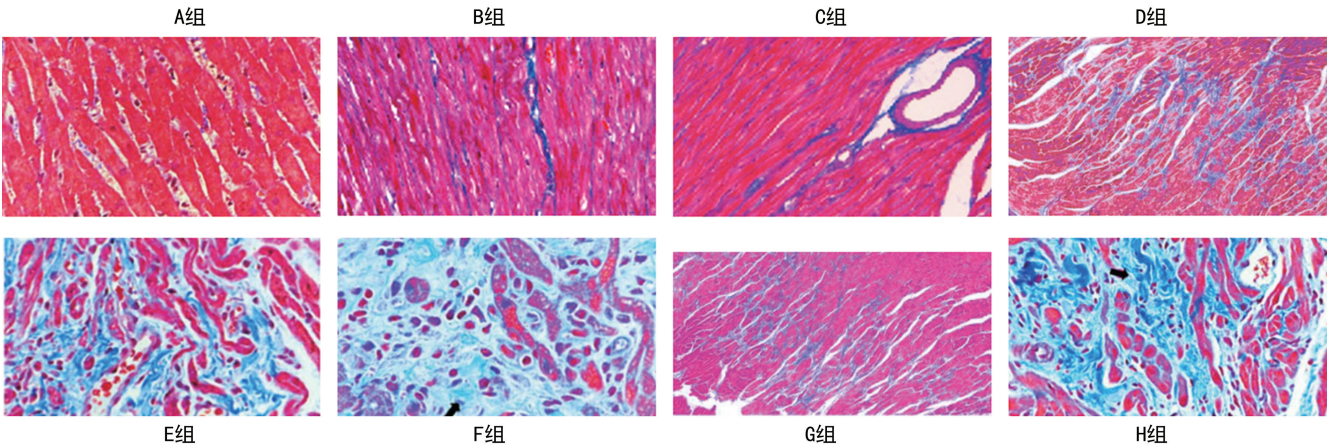


图 2 大鼠心肌组织 Masson 染色(400×)

2.3 大鼠心肌组织 PCNA、CD31 阳性率比较 免疫组织化学染色结果显示,C 组 PCNA 阳性率高于其余各组($P<0.05$),CD31 阳性率高于 A、F、G、H 组($P<0.05$);H 组 PCNA、CD31 阳性率均低于其余各组($P<0.05$);F 组 PCNA、CD31 阳性率低于 B、C 组($P<0.05$);E 组 PCNA 阳性率低于 B、D 组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 PCNA、CD31 阳性率比较($\bar{x}\pm s, \%$)			
组别	<i>n</i>	PCNA	CD31
A 组	9	0.17±0.06	0.35±0.10
B 组	8	0.23±0.04 ^a	0.39±0.07 ^a
C 组	7	0.29±0.05 ^{ab}	0.42±0.06 ^a
D 组	8	0.20±0.05 ^c	0.37±0.06
E 组	8	0.15±0.04 ^{bcd}	0.36±0.09
F 组	9	0.19±0.06 ^{bc}	0.31±0.05 ^{bc}
G 组	9	0.14±0.03 ^{bcd^f}	0.32±0.05 ^{bc}
H 组	8	0.10±0.03 ^{abcde^{fg}}	0.23±0.05 ^{abcde^{fg}}
<i>F</i>		11.993	5.549
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;与 D 组比较,^d $P<0.05$;与 E 组比较,^e $P<0.05$;与 F 组比较,^f $P<0.05$;与 G 组比较,^g $P<0.05$ 。

2.4 大鼠心肌组织凋亡情况比较 TUNEL 实验结果显示,A~H 组细胞凋亡率分别为(42.37±11.34)%、(35.78±7.51)%、(23.50±6.20)%、(40.94±8.44)%、(37.38±7.91)%、(52.44±8.48)%、(33.72±4.33)%、(51.59±4.52)%,组间

差异有统计学意义($F=11.934, P<0.05$)。C 组细胞凋亡率低于其余各组($P<0.05$),B、C 组细胞凋亡率低于 A 组($P<0.05$),F、H 组细胞凋亡率高于 B、E、G 组($P<0.05$)。

2.5 大鼠心肌组织 LncTCF7 的 mRNA 表达水平比较 RT-PCR 结果显示,A~H 组 LncTCF7 的 mRNA 表达水平分别为 1.00±0.04、2.02±0.16、3.42±0.34、1.26±0.09、1.50±0.24、0.84±0.06、1.98±0.17、0.35±0.14,组间差异有统计学意义($F=224.655, P<0.05$)。C 组 LncTCF7 mRNA 表达水平最高($P<0.05$),H 组最低($P<0.05$),B、G 组 LncTCF7 mRNA 表达水平高于 A、D、E、F、H 组($P<0.05$),F 组低于 A 组($P<0.05$)。

2.6 大鼠心肌组织 IL-6/STAT3 轴相关蛋白表达水平比较 Western blot 实验结果显示,各组 IL-6/STAT3 轴相关蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 A 组比较,B、C 组的 IL-6、TCF7、Wnt7a、 β -catenin 蛋白表达水平及磷酸化(p)-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 均显著升高($P<0.05$),D 组 TCF7 蛋白表达水平升高($P<0.05$),E、F 组 TCF7 蛋白表达水平降低($P<0.05$),F 组 IL-6 蛋白表达水平、p-JAK2/JAK2 降低($P<0.05$),G、H 组 IL-6、TCF7、Wnt7a、 β -catenin 蛋白表达水平降低且 H 组低于其余各组($P<0.05$)。C 组 IL-6、TCF7 蛋白表达水平及 p-STAT3/STAT3 高于其余各组($P<0.05$)。见表 3。

表 3 大鼠心肌组织 IL-6/STAT3 轴相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)							
组别	<i>n</i>	IL-6	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	TCF7	Wnt7a	β -catenin
A 组	9	0.55±0.06	0.46±0.10	0.66±0.15	0.37±0.08	0.52±0.13	0.65±0.10
B 组	8	0.67±0.13 ^a	0.59±0.11 ^a	0.90±0.12 ^a	0.80±0.15 ^a	0.72±0.14 ^a	0.76±0.10 ^a
C 组	7	0.84±0.10 ^{ab}	0.64±0.09 ^{ab}	1.58±0.22 ^{ab}	0.99±0.19 ^{ab}	0.86±0.17 ^a	0.84±0.13 ^a
D 组	8	0.62±0.07 ^c	0.53±0.08 ^c	0.77±0.11 ^{bc}	0.53±0.05 ^{abc}	0.54±0.08 ^{bc}	0.78±0.08 ^a
E 组	8	0.56±0.07 ^{bc}	0.54±0.09 ^c	0.81±0.11 ^{ac}	0.23±0.04 ^{abcd}	0.46±0.12 ^{bc}	0.63±0.09 ^{bcd}
F 组	9	0.39±0.05 ^{abcde}	0.27±0.06 ^{abcde}	0.43±0.10 ^{abcde}	0.29±0.05 ^{abcde}	0.36±0.06 ^{abcde}	0.71±0.11 ^c
G 组	9	0.42±0.05 ^{abcde}	0.45±0.10 ^{bce^f}	0.58±0.12 ^{bcd^{ef}}	0.22±0.03 ^{abcd^{fg}}	0.40±0.08 ^{abcde}	0.41±0.10 ^{abcde^f}
H 组	8	0.26±0.06 ^{abcde^{fg}}	0.31±0.05 ^{abcde^g}	0.33±0.04 ^{abcde^g}	0.17±0.03 ^{abcd^{fg}}	0.18±0.04 ^{abcde^{fg}}	0.29±0.07 ^{abcde^{fg}}
<i>F</i>		43.108	17.928	67.257	82.185	29.232	30.049
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;与 D 组比较,^d $P<0.05$;与 E 组比较,^e $P<0.05$;与 F 组比较,^f $P<0.05$;与 G 组比较,^g $P<0.05$ 。

3 讨 论

MSCs 能够分化为心肌细胞和血管内皮细胞,从而在心肌梗死后促进内源性修复机制的激活以及心

肌和血管的再生,并分泌多种生长因子和抗炎细胞因子,抑制心肌纤维化进程、胶原沉积和心肌梗死后的炎症反应,从而减轻心室重构和心肌损伤^[8-9]。ILK

通过与细胞外基质的整合素受体相互作用,参与调控细胞的黏附、自噬、增殖等多种生物学过程^[10]。ILK 及其下游效应蛋白在移植区域的干细胞增殖、迁移和血管生成过程中起主要作用,亦具有抑制细胞凋亡,减轻氧化应激反应的功能^[11]。既往报道称,过表达 ILK 可以促进干细胞的增殖和血管分化,并改善肌肉收缩功能^[12]。课题组前期研究证实过表达 ILK 可提升 MSCs 的存活力和自我更新能力^[7]。本研究发现,经过 MSCs 或过表达 ILK+MSCs 移植的大鼠心功能、心脏血流动力学指标、心肌组织病理损伤以及心肌组织胶原纤维沉积均得到了显著改善,且过表达 ILK+MSCs 干预后的改善效果更佳,而敲低 ILK 表达可一定程度逆转 MSCs 移植的干预效果。上述结果表明 MSCs 的心脏修复能力与 ILK 表达水平存在密切关联,过表达 ILK+MSCs 移植能够有效抑制心室重构,改善心脏的收缩和舒张功能,不仅能够通过调控细胞外基质改善心肌纤维化,还可能通过调控炎症反应,进一步减轻心肌损伤。此外,本研究结果显示,C 组心肌组织中 PCNA、CD31 阳性率更高,而低表达 ILK 则得到了相反的实验结果,表明过表达 ILK+MSCs 移植可促进心肌细胞增殖和心肌组织中血管生成以促进心脏修复,改善心肌血供。这可能与过表达 ILK 增强了 MSCs 与细胞外基质的黏附^[13],从而促进 MSCs 存活和增殖相关。

IL-6/STAT3 轴广泛参与炎症反应、细胞增殖、分化及生存等多种生理和病理过程。IL-6 与细胞膜上的 IL-6 受体以及糖蛋白 130 结合后形成信号转导复合物,激活 JAK,使糖蛋白 130 磷酸化并与 STAT3 结合,激活下游凋亡相关基因^[14-15]。WU 等^[16]研究发现,缺乏 IL-6 可能会加重心肌缺血再灌注损伤,重组 IL-6 可发挥心肌保护作用,采用 STAT3 抑制剂干预则进一步加剧小鼠的心肌缺血再灌注损伤,提示 IL-6/STAT3 轴参与心肌梗死发展过程。LncTCF7 是一种长链非编码 RNA,TCF7 是其编码的转录因子家族成员,LncTCF7 可调节 TCF7 表达,从而激活 Wnt 信号通路,参与调节细胞增殖、分化等过程^[17-18]。WANG 等^[18]发现 LncTCF7 可激活 Wnt 信号通路进而增强肝癌细胞自我更新的干细胞特性,提示 LncTCF7 的表达水平可能与干细胞功能相关,但目前仍缺乏研究证实 LncTCF7/TCF7 轴在心肌梗死病情进展中的作用。既往研究发现,在肝癌细胞中 IL-6 通过激活 STAT3 转录上调 LncTCF7 的表达水平,而敲低 STAT3 可降低 LncTCF7 表达水平^[19-20],提示 IL-6/STAT3 轴可能具有调控 LncTCF7 的作用。本研究发现,采用 TCZ 可逆转过表达 ILK+MSCs 移植对心肌梗死大鼠的改善作用,在低表达 ILK+MSCs 移植或抑制 IL-6/STAT3 轴的基础上沉默 LncTCF7

可进一步加剧大鼠心肌梗死的病理损伤,表明 ILK 可能通过调控 IL-6/STAT3 轴发挥作用。Western blot 实验结果证实了 ILK 对 IL-6/STAT3 轴的调控作用,过表达 ILK 通过激活 IL-6/STAT3 轴,提高 TCF7 及其下游的 Wnt7a、 β -catenin 蛋白表达水平,而沉默 LncTCF7 则抑制了 ILK 的调控作用,表明过表达 ILK+MSCs 移植可能通过调控 IL-6/STAT3 轴,进而作用于下游 LncTCF7/TCF7 轴来发挥改善心肌梗死后心室重构的作用。

综上所述,过表达 ILK+MSCs 移植可能通过调控 IL-6/STAT3 轴,进而作用于下游 LncTCF7/TCF7 轴来发挥改善心肌梗死后心室重构的作用。未来 MSCs 移植治疗有望成为心肌梗死患者心室重构干预的重要手段。本研究仍存在一定不足,未能证明其他信号通路是否参与了过表达 ILK+MSCs 移植在心肌梗死后的修复过程,日后将进一步探讨 MSCs 移植疗法临床应用的安全性和稳定性。

参考文献

- [1] SALARI N, MORDDARVANJOGHI F, ABDOLMA-LEKI A, et al. The global prevalence of myocardial infarction: a systematic review and Meta-analysis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2023, 23(1): 206.
- [2] TRIPATHI H, DOMINGUES A, DONAHUE R, et al. Combined transplantation of human MSCs and ECFCs improves cardiac function and decrease cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction[J]. Stem Cell Rev Rep, 2023, 19(2): 573-577.
- [3] ALA M. The beneficial effects of mesenchymal stem cells and their exosomes on myocardial infarction and critical considerations for enhancing their efficacy[J]. Ageing Res Rev, 2023, 89: 101980.
- [4] JI C B, ZHANG M L, HU J J, et al. The kinase activity of integrin-linked kinase regulates cellular senescence in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 577.
- [5] SÁNCHEZ E S, CASTRO P M, COOK C A, et al. Integrin-linked kinase expression[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(9): 1736.
- [6] MAO Q, LIN C, GAO J, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate left ventricular remodeling and improve cardiac function after myocardial infarction[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 397(1/2): 203-214.
- [7] MAO Q, LIANG X L, WU Y F, et al. ILK promotes survival and self-renewal of hypoxic MSCs via the activation of LncTCF7-Wnt pathway induced by IL-6/STAT3 signaling[J]. Gene Ther, 2019, 26(5): 165-176.
- [8] 王巧敏, 刘洋, 吕洋, 等. bFGF 和 IGF-1 对骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化促进作用及相关机制探讨[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(4): 715-722. (下转第 1579 页)

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.11.025

重症肺炎 BALF 内 TLR4、sTREM-1、IL-17A、IL-8 水平与疗效和预后的关系*

王彬阶¹, 陈 丹¹, 邓世鑫¹, 熊 莉², 王 度³, 方红育³, 胡 丽^{1△}

1. 湖北省麻城市人民医院检验科, 湖北黄冈 438300; 2. 湖北省麻城市人民医院风湿免疫科, 湖北黄冈 438300; 3. 湖北省武汉市第三医院骨科, 湖北武汉 430060

摘要:目的 探讨重症肺炎患者肺泡灌洗液(BALF)中 Toll 样受体 4(TLR4)、可溶性髓样细胞触发受体-1(sTREM-1)、白细胞介素-17A(IL-17A)、白细胞介素-8(IL-8)水平与疗效和预后的关系。方法 选择 2022 年 2 月至 2024 年 2 月湖北省麻城市人民医院收治的 100 例重症肺炎患者纳入观察组, 收集同期于湖北省麻城市人民医院治疗的 124 例普通肺炎患者纳入对照组。采集所有患者 BALF, 采用酶联免疫吸附试验检测 2 组患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平。根据治疗效果将重症肺炎患者分为有效组、无效组; 根据急性生理学与慢性健康状况评分 II (APACHE II 评分) 将重症肺炎患者分为非危重组、危重组; 根据重症肺炎患者入院 28 d 的生存情况, 将其分为生存组及死亡组。分析重症肺炎患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A、IL-8 水平与 APACHE II 评分的相关性。采用受试者工作特征(ROC)曲线评估重症肺炎患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 预测预后的价值。结果 观察组 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平均高于对照组($P < 0.05$)。非危重组 54 例, 危重组 46 例。危重组患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平均高于非危重组($P < 0.05$)。有效组 56 例, 无效组 44 例。无效组患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平均高于有效组($P < 0.05$)。100 例重症肺炎患者入院 28 d, 转院 3 例, 共有 97 例患者有完整的预后数据, 其中死亡组 30 例, 存活组 67 例。死亡组患者重症监护室(ICU)总监护时间长于存活组($P < 0.05$), 发生误吸、发生谵妄的比例高于存活组($P < 0.05$)。死亡组 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平均高于存活组($P < 0.05$)。重症肺炎患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平与 APACHE II 评分均呈正相关($r = 0.312, 0.343, 0.331, 0.306$, 均 $P < 0.05$)。重症肺炎患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 单独及联合预测预后的曲线下面积(AUC)均较大, 其中联合检测的 AUC 最大, 当约登指数为 0.788 时, 预测重症肺炎患者死亡的 AUC 为 0.875, 灵敏度为 96.67%, 特异度为 82.09%。结论 重症肺炎患者 BALF 中 TLR4、sTREM-1、IL-17A 及 IL-8 水平较高, 且均可作为评估重症肺炎病情严重程度、疗效及预测预后的有效指标。

关键词:重症肺炎; 肺泡灌洗液; Toll 样受体 4; 可溶性髓样细胞触发受体-1; 白细胞介素-17A; 白细胞介素-8

中图法分类号: R563.1; R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2025)11-1573-07

Association of TLR4, sTREM-1, IL-17A and IL-8 levels in bronchoalveolar lavage fluid with treatment efficacy and prognosis in severe pneumonia*

WANG Binjie¹, CHEN Dan¹, DENG Shixin¹, XIONG Li², WANG Du³, FANG Hongyu³, HU Li^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, Macheng People's Hospital, Huanggang, Hubei 438300, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Macheng People's Hospital, Huanggang, Hubei 438300, China; 3. Department of Orthopedics, Wuhan Third Hospital, Wuhan, Hubei 430060, China

Abstract: **Objective** To investigate the association of Toll-like receptor 4 (TLR4), soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), interleukin-17A (IL-17A) and interleukin-8 (IL-8) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) with treatment efficacy and prognosis in patients with severe pneumonia. **Methods** A total of 100 patients with severe pneumonia admitted to Macheng People's Hospital from February 2022 to February 2024 were enrolled as the observation group. Additionally, 124 patients with general pneumonia treated during the same period were included as the control group. BALF samples were collected from all patients, and the levels of TLR4, sTREM-1, IL-17A and IL-8 were measured using enzyme-linked im-

* 基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019F005); 湖北省武汉市医学科研项目(WX20D11)。

作者简介: 王彬阶, 男, 副主任技师, 主要从事实验室诊断学方向的研究。△ 通信作者, E-mail: 364645239@qq.com。