

本文引用: 闫拓, 吴婷婷, 姜智慧, 等. KLHL21 基因在小鼠心肌梗死中的作用及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(4): 310-316. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.04.005.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-04-0310-07

KLHL21 基因在小鼠心肌梗死中的作用及机制

闫拓, 吴婷婷, 姜智慧, 郑颖颖, 谢翔

新疆医科大学第一附属医院心血管病中心高血压科, 新疆乌鲁木齐市 830011

[摘要] [目的] 探讨 KLHL21 基因在小鼠心肌梗死(MI)中的作用及机制。[方法] 使用 CRISPR/Cas 技术构建 KLHL21 基因敲除小鼠(KO 小鼠), 并选取 C57BL/6 野生型小鼠作为对照。60 只 KLHL21 基因 KO 小鼠与 60 只野生型小鼠随机分为四组: 野生型假手术组(WT+Sham)、野生型心肌梗死组(WT+MI)、KO 假手术组(KO+Sham)和 KO 心肌梗死组(KO+MI)。术后通过 TTC 及 Evens Blue 双染法计算缺血区和梗死区面积, ELISA 法测量心肌损伤标志物, 心脏超声检测心功能, HE 染色和 Masson 染色观察病理变化, Western blot 检测核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路相关蛋白。[结果] KO 小鼠心肌组织 KLHL21 蛋白表达显著低于 WT 小鼠。KO+MI 组小鼠梗死区面积显著增加, 心功能较 WT+MI 组明显降低。HE 染色显示 KO+MI 组心肌细胞减少, 出现液化性坏死、核碎裂及大量炎症细胞浸润, Masson 染色提示纤维化加重。KO+MI 组血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 水平显著升高。Western blot 结果表明 KO+MI 组磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-IKB α)、P65 和 P50 蛋白水平增高, IKB α 蛋白水平下降。[结论] KLHL21 基因对小鼠心肌梗死具有预防作用, 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活来发挥作用。

[关键词] KLHL21 基因; 心肌梗死; 核因子 κ B 信号通路; CRISPR/Cas 技术

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

The role and mechanism of KLHL21 gene in mouse myocardial infarction

YAN Tuo, WU Tingting, JIANG Zhihui, ZHENG Yingying, XIE Xiang

Department of Hypertension, Cardiovascular Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and mechanism of KLHL21 gene in myocardial infarction (MI) of mice. **Methods** KLHL21 gene knockout (KO) mice were generated using CRISPR/Cas9 technology, and C57BL/6 wild-type mice were used as controls. Sixty KLHL21 KO mice and 60 wild-type mice were randomly divided into four groups: WT+Sham group ($n=30$), WT+MI group ($n=30$), KO+Sham group ($n=30$) and KO+MI group ($n=30$). Postoperative ischemic and infarct areas were assessed using TTC and Evans Blue staining, myocardial injury markers were measured by ELISA, cardiac function was evaluated by ultrasound, and histological changes were examined using HE and Masson staining. Western blot was used to detect proteins related to the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Results** KLHL21 protein expression in the myocardial tissue of KO mice was significantly lower than that in WT mice. The infarct area in KO+MI mice was significantly larger than that in WT+MI group. KO+MI mice showed reduced cardiac function compared with WT+MI mice. HE staining revealed myocardial cell loss, liquefactive necrosis, nuclear fragmentation, and significant neutrophil infiltration, while Masson staining showed aggravated fibrosis in KO+MI group. Serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), creatine kinase-MB (CK-MB), and cardiac troponin I (cTnI) levels were significantly increased in KO+MI mice compared with WT+MI mice. Western blot analysis showed increased levels of phosphorylated inhibitor of nuclear factor- κ B alpha (p-IKB α), P65, and P50, and decreased nuclear factor- κ B alpha (IKB α) in KO+MI mice. **Conclusion** KLHL21 gene plays a preventive role in myocardial infarction in mice, possibly through inhibition of NF- κ B signaling pathway activation.

[KEY WORDS] KLHL21 gene; myocardial infarction; nuclear factor- κ B signaling pathway; CRISPR/Cas technology

[收稿日期] 2024-07-01

[修回日期] 2024-11-26

[基金项目] “天山英才”科技创新领军人才项目-高层次领军人才项目(2022TSYCLJ0029)

[作者简介] 闫拓, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的基础研究与临床, E-mail: ytemxyt@163.com。通信作者谢翔, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的基础研究与临床, E-mail: xiangxie999@sina.com。

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是目前严重危害人类健康的心血管疾病^[1], 其发病率正在增加, 已成为全球死亡的主要原因^[2]。AMI 的发病机制和病情进展受到多种因素的影响, 其中遗传基因的作用越来越受到重视。Kelch-like (KLHL) 家族基因, 是新近发现的具有重要生物功能的基因家族。作为 KLHL-repeat 超家族成员, KLHL 在人、小鼠和大鼠中具有高度同源性^[3]。Northern blot 分析表明, 人类同源基因 KLHL 在骨骼肌和心脏中呈特异性表达^[4]。该家族成员参与了许多细胞和分子过程, 如肿瘤发生、炎症反应、氧化应激反应、胚胎发育和淋巴发生等^[3]。有研究表明^[5] 通过利用多个细胞系, 发现 KLHL21 基因可直接结合 κ B 抑制因子激酶 β (inhibitor of kappa B kinase β , IKK β), 负向调控肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 干预下活化的核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路。同时还发现转染 siKLHL21 后人核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibition of nuclear factor- κ B alpha, IKB α) 被显著激活。多项研究已证实 IKK/IKB α /NF- κ B 信号通路可迅速调节细胞因子、趋化因子、黏附分子、转录因子、应激反应蛋白等一系列特异基因的表达, 在心肌的炎症反应、氧化应激损伤、细胞凋亡、细胞自噬效应等方面发挥非常关键的调控作用, 而这些作用在 AMI 的病理发展过程中扮演重要角色^[6-7]。研究已证实, 小鼠心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后伴有梗死区炎症细胞浸润显著增强及 NF- κ B 信号通路的持续激活^[8]。本课题利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 KLHL21 基因敲除 (knockout, KO) 小鼠, 并构建心肌梗死实验模型, 探索 KLHL21 基因在心肌梗死中的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验仪器与试剂

小动物高分辨率超声成像系统 Vevo3100 (Visual Sonics 公司, 加拿大), 小动物麻醉机 (Matrix 公司, 美国), 小动物呼吸机 (Harvard 公司, 美国), 数字凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国), 多功能酶标仪和高速低温台式离心机 (Thermo 公司, 美国), 手术显微镜 (蔡司公司, 德国), LeicaDM300 光学显微镜 (Leica 公司, 德国)。

HE 染色试剂盒和 Masson 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), Evens Blue 和 TTC (Sigma 公司, 美国), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo 公

司, 美国), GAPDH 抗体 (CST 公司, 美国), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (博奥森公司, 北京), 抗 KLHL21 多克隆抗体 (Abcam 公司), 抗 Phospho-IKK α / β 兔单克隆抗体、抗 IKK β 兔单克隆抗体、抗 IKB α 兔单克隆抗体、抗 Phospho-NF- κ B P65 兔单克隆抗体、抗 NF- κ B P65 兔单克隆抗体和抗 NF- κ B P105/P50 抗体 (CST 公司, 美国), 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (creatin kinase MB, CK-MB) 和 IL-1 β 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物有限公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS 缓冲液, pH = 7.4, NaCl 为 137 mmol/L, KCl 为 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 为 10 mmol/L, KH₂PO₄ 为 2 mmol/L) 由实验室配置。

1.2 实验动物及分组

雄性 C57BL/6 野生型小鼠和 KLHL21 基因 KO 小鼠, 分别由新疆医科大学动物实验中心和上海南方模式生物科技有限公司提供, 采用 CRISPR/Cas9 技术构建 KLHL21 基因全身敲除小鼠模型。分别对野生型小鼠及 KLHL21 基因 KO 小鼠提取心肌组织蛋白, 通过蛋白免疫印迹法检测 KLHL21 蛋白表达水平。本研究已通过新疆医科大学生命科学伦理审查委员会批准。选取 8~12 周、20~24 g C57BL/6 野生型小鼠作为对照。KLHL21 基因 KO 小鼠和野生型小鼠各 60 只随机分为 4 组: 即野生型假手术组 (WT+Sham 组, $n=30$)、野生型心肌梗死组 (WT+MI 组, $n=30$)、KO 假手术组 (KO+Sham 组, $n=30$) 和 KO 心肌梗死组 (KO+MI 组, $n=30$)。

1.3 小鼠心肌梗死模型建立

腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉小鼠, 气管插管后连接呼吸机, 将小鼠固定于循环加热手术台上, 连接标准导联心电图, 手术区域备皮消毒, 于胸骨左侧第 3、4 肋间充分暴露心脏。显微镜下用 7-0 带线缝合针于左心耳下缘 2~3 mm 处穿过左前降支 (left anterior descending, LAD), 在结扎线两端各放置一条长约 5 cm 的缝线圈, 随后结扎 LAD, 可见左心室前壁心肌组织逐渐变白, 心电图 ST 段持续弓背抬高, 表明结扎成功, 逐层关闭胸腔。假手术组只开胸不结扎。术后正常喂养。

1.4 心肌梗死区域染色

采用 Evens Blue 及 TTC 双染法计算缺血区及梗死区面积^[9]。心肌梗死术后 24 h, 麻醉后再次原位结扎 LAD, 通过主动脉弓逆行灌注 2% Evens Blue 溶液 (0.2 mL)。取出心脏后, 用生理盐水冲洗, 剪去右心室, 并将心脏置于干冰上冷冻 15 min。之后, 取出心脏, 沿左心室长轴切成厚度约 1 mm 的心肌

切片,浸入 1.5% TTC 染色液中,在 37 °C 恒温箱中避光孵育 30 min 后取出,用 PBS 溶液冲洗并置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min,最后拍摄照片。使用 Image J 软件对图像进行分析,蓝色区域为正常心肌区,红色和白色区域为缺血危险区 (area at risk, AAR),其中白色区域为心肌梗死区 (infarct area, IA),红色区域为缺血未梗死区。心肌缺血区面积计算为 AAR 占左心室面积的百分比,心肌梗死区面积计算为 IA 占 AAR 的百分比。

1.5 超声心动图检测心功能

利用 Vevo3100 超声成像系统对小鼠进行心功能检查,用 1.5% 异氟烷麻醉小鼠,待其状态稳定后,取胸骨旁长轴和短轴切面,应用 M 型超声模式测量并记录小鼠左心室收缩末内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左心室舒张末内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS),所有数值均测量 3 个周期后计算平均值。

1.6 心肌组织病理学染色

心肌梗死术后 7 天,每组随机取 8 只小鼠,戊巴比妥钠腹腔麻醉处死后取出心脏放入 PBS 缓冲液中冲洗,4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后,进行乙醇分级脱水、石蜡包埋、病理切片等处理。根据试剂盒说明书,常规进行 HE 染色和 Masson 染色,光学显微镜下观察心肌病理形态学变化。

1.7 Western blot 检测心肌组织中 IKB α 、P65 和 P50 的蛋白水平

将各组剩余 6 只小鼠戊巴比妥钠腹腔麻醉处死后,提取心肌坏死周边组织放入研磨管中,加入裂解液研磨至无固态组织,离心后取上清液。使用 BCA 法测定蛋白浓度,取等量 20 μ g 蛋白上样,SDS-PAGE 凝胶电泳后将分离的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入一抗,4 °C 摇床孵育过夜。第 2 天洗膜后加入山羊抗兔 IgG (1 : 10 000),室温孵育 1 h,洗膜后滴加增强超敏发光液 (ECL) 发光获得图像,Image J 软件对条带进行灰度分析,以 GAPDH 作为内参计算相对蛋白表达量。

1.8 ELISA 法检测血清中 cTnI、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

通过下腔静脉取血,室温静置 30 min,1 360 g 离心 15 min,吸取上清,分装标记后储存于 -80 °C 冰箱备用。根据 ELISA 试剂盒说明书检测 cTnI、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析并作图。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种小鼠心肌组织中 KLHL21 蛋白表达情况比较

Western blot 检测小鼠心肌组织中 KLHL21 蛋白的表达水平,与 WT 组相比,KO 组小鼠心肌组织中 KLHL21 蛋白水平降低 55% ($P < 0.001$;图 1)。

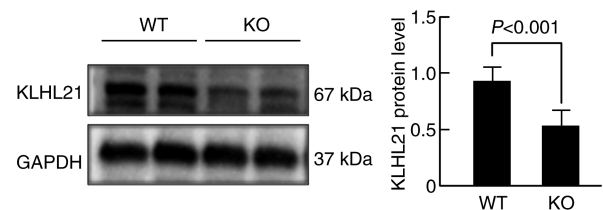


图 1. KLHL21 基因敲除小鼠心肌组织中 KLHL21 蛋白表达 ($n=10$)

Figure 1. KLHL21 protein expression in myocardial tissue of KLHL21 gene knockout mice ($n=10$)

2.2 各组小鼠心肌缺血区和梗死区面积比较

心肌梗死术观察 24 h 后,采用 TTC 及 Evens Blue 双染法评估左心室心肌缺血程度,以缺血区面积和梗死区面积大小为评判标准。结果发现,在冠状动脉结扎情况水平相当的前提下,各组缺血区面积差异无统计学意义;与 WT+MI 组相比,KO+MI 组小鼠心肌梗死区面积增加了 63.6% ($P < 0.05$;图 2 和表 1)。

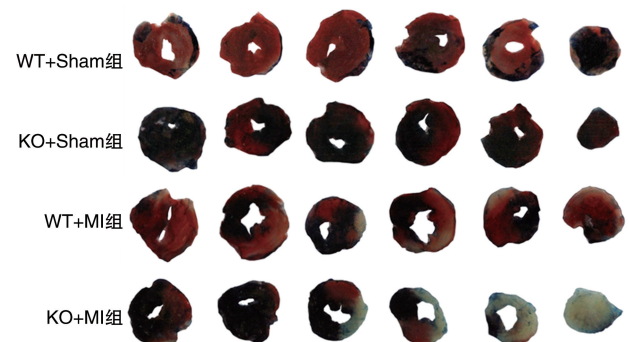


图 2. 小鼠心肌 TTC 和 Evens Blue 双染法染色标本图片
Figure 2. Pictures of specimens stained with mouse myocardial TTC, Evens Blue double staining method

2.3 各组小鼠左心室功能比较

心脏彩超测量小鼠心脏左心室功能,结果发现,基线状态 WT 小鼠与 KO 小鼠 LVEF、LVFS、LVEDD、LVESD 差异无显著性($P>0.05$);造模后 7 天时,与 WT+Sham 组比较,WT+MI 组小鼠 LVEF、LVFS 分别降低了 70% 和 75%,LVEDD、LVESD 分别升高了 98% 和 95%,差异有显著性($P<0.05$);与 KO+Sham 组比较,KO+MI 组小鼠 LVEF、LVFS 分别降低了 81% 和 85%,LVEDD 和 LVESD 分别升高了 120% 和 137%,差异有显著性($P<0.05$)。KO+MI 组小鼠 LVEF 和 LVFS 较 WT+MI 组小鼠分别降低了 38% 和 39%,LVEDD 和 LVESD 分别升高了 20% 和 25%,差异有显著性($P<0.05$;表 2)。

造模后 28 天时,小鼠左心室功能进一步降低。与 WT+Sham 组比较,WT+MI 组小鼠 LVEF 和 LVFS 分别降低了 39% 和 53%,LVEDD、LVESD 分别升高了 73% 与 56%,差异有显著性($P<0.05$)。与 KO+

Sham 组比较,KO+MI 组小鼠 LVEF、LVFS 分别降低了 61% 和 67%,LVEDD、LVESD 分别升高了 86% 和 83%,差异有显著性($P<0.05$);KO+MI 组小鼠 LVEF、LVFS 较 WT+MI 组小鼠分别降低了 37% 和 30%,LVEDD 和 LVESD 分别升高了 14% 和 21%,差异有显著性($P<0.05$;表 2)。

表 1. 各组小鼠心肌缺血区面积及梗死区面积结果比较($n=8$)
Table 1. Comparison of myocardial ischemic area and infarct area in mice of each group ($n=8$) 单位:%

分组	缺血区面积	梗死区面积
WT+Sham 组	50±3	0±0
KO+Sham 组	49±4	0±0
WT+MI 组	48±7	33±10 ^a
KO+MI 组	50±4	54±14 ^{bc}

注:a 为 $P<0.05$,与 WT+Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 KO+Sham 组相比;c 为 $P<0.05$,与 WT+MI 组相比。

表 2. 各组小鼠心肌梗死术后 7 天及 28 天心功能

Table 2. Cardiac function of mice in each group on the 7th and 28th day after myocardial infarction

分组	LVEF/%		LVFS/%		LVEDD/mm		LVESD/mm	
	MI 后 7 天	MI 后 28 天	MI 后 7 天	MI 后 28 天	MI 后 7 天	MI 后 28 天	MI 后 7 天	MI 后 28 天
WT+Sham 组	65.06±7.30	65.15±6.45	36.75±5.67	36.50±5.72	2.39±0.58	2.42±0.60	2.22±0.51	2.24±0.50
KO+Sham 组	64.82±4.30	64.75±4.35	36.53±5.79	36.70±5.84	2.58±0.23	2.57±0.24	2.28±0.31	2.30±0.32
WT+MI 组	19.75±7.43 ^a	39.67±10.35 ^a	9.03±3.67 ^a	17.26±4.48 ^a	4.74±0.72 ^a	4.19±0.92 ^a	4.32±0.73 ^a	3.50±0.89 ^a
KO+MI 组	12.20±4.21 ^{bc}	24.98±5.12 ^{bc}	5.50±1.90 ^{bc}	12.07±4.95 ^{bc}	5.70±0.87 ^{bc}	4.78±0.81 ^{bc}	5.40±0.89 ^{bc}	4.22±0.81 ^{bc}

注:a 为 $P<0.05$,与 WT+Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 KO+Sham 组相比;c 为 $P<0.05$,与 WT+MI 组相比。

2.4 各组小鼠心肌 HE 染色和 Masson 染色结果

HE 染色结果显示,WT+Sham 组和 KO+Sham 组小鼠光镜下心肌组织及结缔组织未见明显病理变化。造模后 7 天时,WT+MI 组出现细胞数目减少,梗死处心肌细胞核及横纹消失。KO+MI 组小鼠心肌细胞数目减少,坏死心肌与正常心肌呈现交错分布,梗死处心肌细胞核及横纹消失,肌原纤维结构不清,梗死灶外围出现充血出血带及纤维化,出现液化性坏死,心肌细胞胞质溶解,胞膜尚存,HE 染色呈空泡状。存在核碎裂、核消失现象,肌质呈不规则颗粒状,间质水肿。梗死区域肌纤维之间及其边缘部位可见大量炎症细胞,以中性粒细胞为主,心肌细胞的轮廓还存在,可以辨认出心肌纤维的组织结构,出现凝固性坏死及收缩带。且出现大量新生血管。造模后 28 天,与 WT+MI 组小鼠比较,KO+MI 组小鼠心肌细胞梗死区的心肌细胞坏死更加彻底,细胞数目大量减少,有肉芽组织形成,梗死区机

化形成瘢痕组织,可见大量炎症细胞浸润(图 3)。

Masson 染色结果显示,WT+Sham 组和 KO+Sham 组小鼠光镜下心肌组织及结缔组织未见胶原沉积。造模后 7 天时,WT+MI 组出现片状分布的蓝色胶原纤维堆积。与 WT+MI 组小鼠比较,KO+MI 组小鼠心脏左心室梗死区均出现大量片状分布的蓝色胶原纤维堆积,心肌细胞明显减少,心肌纤维排列紊乱,正常心肌与纤维细胞交错呈螺旋状分布,且其纤维化程度均随着时间进展加重。造模后 28 天时,与 WT+MI 组小鼠比较,KO+MI 组小鼠左心室梗死区大量细胞核固缩,蓝色胶原纤维堆积明显增加,大量肉芽组织与瘢痕组织形成,纤维化程度明显加重(图 4)。

2.5 各组小鼠血清炎症因子水平比较

心肌梗死后 7 天,采用 ELISA 检测各组小鼠血清炎症因子水平。结果发现,WT+Sham 组与 KO+Sham 组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水

平差异均无显著性 ($P>0.05$); 与 WT+Sham 组比较, WT+MI 组小鼠血清中 TNF- α 水平升高 26%, IL-1 β 水平升高 20%, IL-6 水平升高约 3 倍, 差异有显著性 ($P<0.05$); 与 KO+Sham 组比较, KO+MI 组小鼠血清中 TNF- α 水平升高约 1.15 倍, IL-1 β 升高约

27%, IL-6 水平升高约 5 倍, 差异有显著性 ($P<0.05$); 与 WT+MI 组比较, KO+MI 组小鼠血清中 TNF- α 水平升高 71%, 而 IL-6 水平升高 64%, 差异有显著性 ($P<0.05$), IL-1 β 水平差异无显著性 ($P>0.05$; 表 3)。

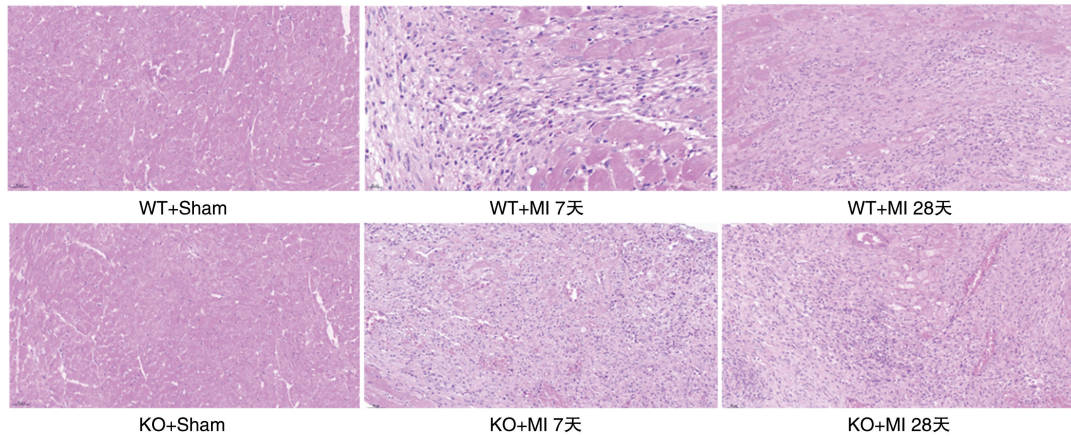


图 3. 小鼠心肌组织 HE 染色结果 (200 \times , $n=8$)

Figure 3. HE staining results of mouse myocardial tissue (200 \times , $n=8$)

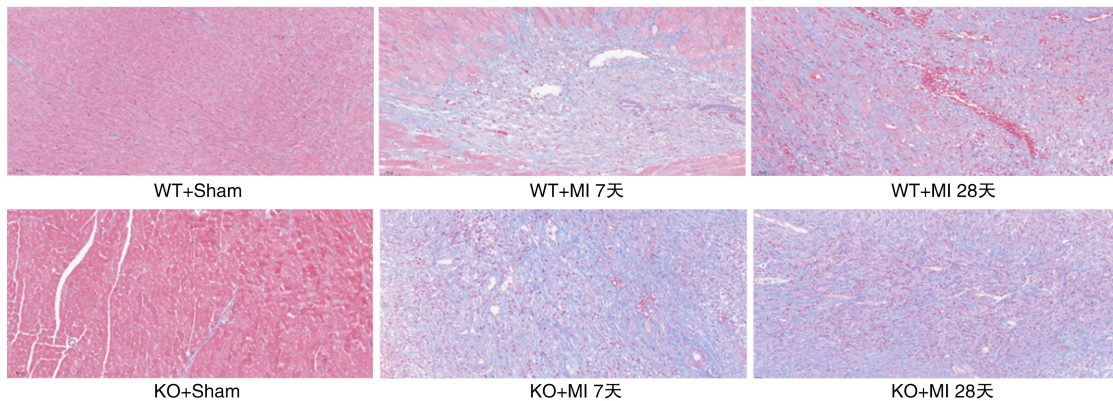


图 4. 小鼠心肌组织 Masson 染色结果 (200 \times , $n=8$)

Figure 4. Masson staining results of mouse myocardial tissue (200 \times , $n=8$)

表 3. 各组小鼠血清炎症因子水平比较

Table 3. Comparison of serum inflammatory factors levels in mice of each group 单位: ng/L

分组	TNF- α	IL-1 β	IL-6
WT+Sham 组	655.99 \pm 190.32	368.75 \pm 63.76	12.24 \pm 1.98
KO+Sham 组	654.68 \pm 162.30	366.48 \pm 46.62	12.77 \pm 1.92
WT+MI 组	823.75 \pm 402.34 ^a	442.81 \pm 61.39 ^a	49.63 \pm 17.33 ^a
KO+MI 组	1407.12 \pm 211.08 ^{bc}	464.48 \pm 70.44 ^b	81.25 \pm 11.30 ^{bc}

注: a 为 $P<0.05$, 与 WT+Sham 组相比; b 为 $P<0.05$, 与 KO+Sham 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 WT+MI 组相比。

2.6 各组小鼠心肌梗死标志物水平比较

心肌梗死 24 h 后, KO+MI 组小鼠血清心肌梗死标志物 CK-MB 较 WT+MI 组升高 21%, 而 cTnI 水

平升高 14%, 差异有显著性 ($P<0.05$; 表 4)。

表 4. 各组小鼠血清心肌损伤标志物水平比较

Table 4. Comparison of serum myocardial injury markers levels in mice of each group

分组	CK-MB/(μ g/L)	cTnI/(ng/L)
WT+MI 组	18.96 \pm 1.46	27.50 \pm 2.79
KO+MI 组	22.88 \pm 4.40 ^a	31.48 \pm 1.86 ^a

注: a 为 $P<0.05$, 与 WT+MI 组比较。

2.7 各组小鼠心肌组织 IKB α 、P65 和 P50 的蛋白水平比较

Western blot 检测结果表明, WT+Sham 组与 KO+Sham 组小鼠 NF- κ B 通路相关蛋白水平差异无显著

性($P>0.05$)。WT+MI 组小鼠 p-IKB α 、IKB α 和 P50 的蛋白水平较 WT+Sham 组分别升高了 60%、37% 和 80%，差异有显著性($P<0.01$)；KO+MI 组小鼠 p-IKB α 、P65 和 P50 的蛋白水平较 KO+Sham 组分别升高了 128%、47% 和 123%，差异有显著性($P<0.01$)；KO+MI 组小鼠 p-IKB α 、P65 和 P50 的蛋白

水平较 WT+MI 组分别升高了 46%、34% 和 36%，IKB α 的蛋白水平降低了 28%，差异有显著性($P<0.01$)；图 5)。以上结果说明 KLHL21 基因敲除导致小鼠心肌组织 IKB α 表达水平降低，促进了 IKB α 磷酸化，从而促进 P65 和 P50 的核转位，证明 KLHL21 基因对 NF- κ B 通路具有负向调节作用。

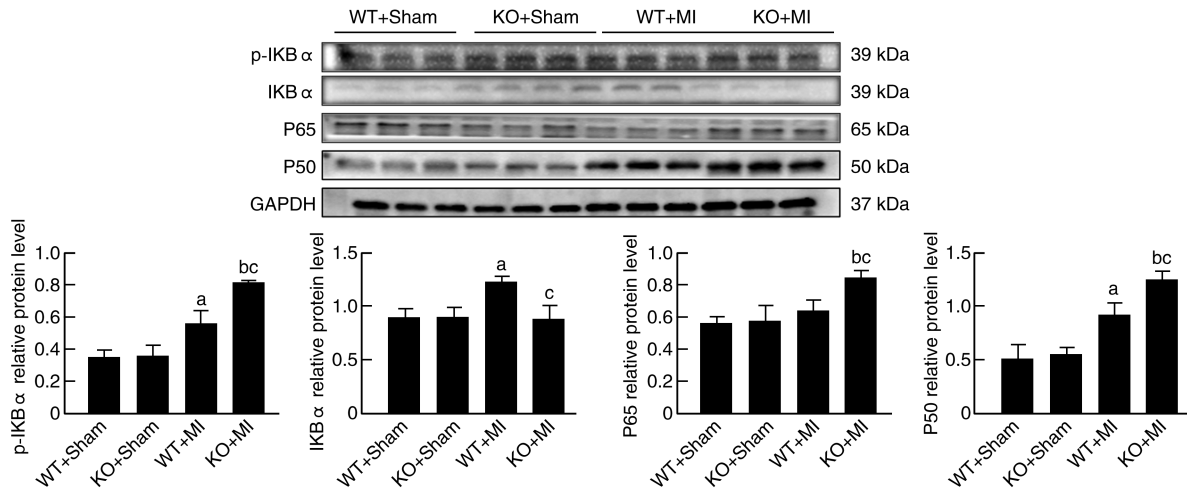


图 5. Western blot 检测各组小鼠心肌组织 IKB α 、P65 和 P50 的蛋白水平($n=6$)

a 为 $P<0.01$, 与 WT+Sham 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 KO+Sham 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 WT+MI 组比较。

Figure 5. Western blot detection of protein levels of IKB α , P65, and P50 in myocardial tissue of mice in each group($n=6$)

3 讨论

AMI 的发生主要与炎症反应、氧化应激损伤、线粒体功能障碍和钙离子超载等机制有关^[10]。KLHL21 是 KLHL 蛋白家族的一员,最近被鉴定为 BTB 蛋白。有研究^[11]指出, KLHL21 蛋白能够与 Cullin3 蛋白相互结合,共同构成 E3 泛素连接酶复合体,促进 Aurora B 蛋白激活泛素化修饰,这一过程涉及细胞有丝分裂的精确控制。有研究表明^[5]通过利用多个细胞系,较为系统地证明了 KLHL21 基因可直接结合 IKK β ,负向调控 TNF- α 干预下活化的 NF- κ B 信号通路。

本研究发现, KLHL21 基因敲除可以增加小鼠心肌梗死后心肌梗死面积,降低小鼠左心室功能,加剧心肌炎症细胞浸润,增加梗死区心肌胶原蛋白沉积,促进心肌纤维化形成,加重心室重塑,同时 KLHL21 基因敲除能提高血清中心肌损伤标志物如 CK-MB 及 cTnI 的水平,同时升高血清炎症因子如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平,证明 KLHL21 基因有抗心肌梗死作用。Western blot 检测结果表明, KLHL21 基因敲除增加心肌缺血再灌注损伤及心肌梗死损伤后 P50 和 P65 的表达,抑制 IKB α 的蛋白表达。表明 KLHL21 蛋白可能通过 IKB α 途径调节

P65 和 P50 核转位发挥作用。

IKK 激酶的激活在 NF- κ B 信号转导通路中处于核心地位^[12]。因此对 IKK 激酶复合物活性的调节作用显得尤为重要^[13]。IKK 复合物的活化是通过由上游激活的 IKB α 或 IKB β 的磷酸化所介导的,包括 NF- κ B 诱导激酶 (NF- κ B-inducing kinase, NIK)^[14] 和丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) 家庭的丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEKK1)^[15]。随后, IKB 通过丝氨酸残基的磷酸化作用被整合进 IKK 复合物中^[16]。虽然 IKB α 和 IKB β 在序列和底物特异性方面存在极高的相似性,但在小鼠中相应基因的靶向破坏分析中,发现 IKK 的功能是不可互换的^[17]。IKB α 在角质细胞分化中扮演十分重要的角色,但它并不是 NF- κ B 细胞因子依赖性激活所必需的^[18]。纯化的 IKK ϵ 仅磷酸化丝氨酸残基中的 S32,而不是 IKB α 中的 S36^[19]。然而,源自佛波酯处理的细胞内源性 IKK ϵ ,可以磷酸化 S32 和 S36,这意味着可能在 IKK 复合物中存在另外一个未知的 IKB 激酶^[20]。IKK α 的表达可以被诱导,尤其在免疫细胞对脂多糖和促炎细胞因子的反应过程中,包括 TNF- α 、IL-1 和 IL-6^[21]。IKK 过表达导致 IKB α S36 首先被磷酸

化^[22]。有研究表明,当细胞内在缺失 NF- κ B 信号转导的核心支架蛋白(NF- κ B essential modulator, NEMO)时,IKK β 不能激活 NF- κ B 信号转导通路,而且 NEMO 通过其羧基末端的锌指结构域与 IKB α 相互结合,对于 IKB α 的磷酸化修饰至关重要^[23]。且有研究表明 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)可以与 NEMO 竞争性结合 IKK β 而抑制 IKK β 的激活,进而抑制 NF- κ B 信号转导通路的激活^[24]。

本研究发现,内源性的 KLHL21 基因敲除可以降低小鼠心肌缺血再灌注损伤及心肌梗死损伤后的左心室收缩功能,促进心室重塑,其机制可能与 NF- κ B 通路中 IKB α 因子相关。但 IKB α 在 IKK β 和 IKK α 的下游,目前还不能确定内源性 KLHL21 蛋白是否直接影响 IKK β 来调节 IKB α ,可能存在其他相关机制。在后续研究中,我们将从以下几方面改进并作进一步的研究。首先应该构建病毒转染 KLHL21 过表达小鼠模型;其次可以完善 IKB α 和 IKK β 药物抑制剂结合细胞实验;再者可完善基因敲除鼠心脏组织直接补充 KLHL21 蛋白,以验证补充 KLHL21 蛋白后病理变化。综上本研究为临床治疗提供了新的方向。

[参考文献]

- [1] 谷春景,朱昌国,孟昭响.中青年冠状动脉疾病患者药物洗脱支架植入术后主要不良心血管事件发生的影响因素分析[J].中国动脉硬化杂志,2024,32(9):771-776.
GU C J, ZHU C G, MENG Z Y. Analysis of influencing factors of major adverse cardiovascular events after drug-eluting stent implantation in young and middle-aged patients with coronary artery disease [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(9): 771-776.
- [2] 于铭,王裕星,杨松,等.炎症因子在支架内再狭窄发生发展中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2024,32(9):805-812.
YU M, WANG Y X, YANG S, et al. Role of inflammatory factors in the development of in-stent restenosis [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(9): 805-812.
- [3] YE G, WANG J, YANG W, et al. The roles of KLHL family members in human cancers [J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(11): 5105-5139.
- [4] LIN Y, LI Q, JIN X. Kelch-like protein 3 in human disease and therapy [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 9813-9824.
- [5] MEI Z Z, CHEN X Y, HU S W, et al. Kelch-like protein 21 (KLHL21) targets I κ B kinase- β to regulate nuclear factor κ -light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling negatively [J]. J Biol Chem, 2016, 291(35): 18176-18189.
- [6] TANG J, XU L, ZENG Y, et al. Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 91: 107272.
- [7] YANG Y, MA Y, HAN W, et al. Age-related differences in postinfarct left ventricular rupture and remodeling [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(4): H1815-H1822.
- [8] SUN Z, MA Y T, CHEN B D, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 with p65 ribozyme protects H9c2 cells from oxidative stress through inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. J Geriatr Cardiol, 2014, 11(4): 311-315.
- [9] WAN Q, XU C, ZHU L, et al. Targeting PDE4B (phosphodiesterase-4 subtype B) for cardioprotection in acute myocardial infarction via neutrophils and microcirculation [J]. Circ Res, 2022, 131(5): 442-455.
- [10] KIM D. LOXL1-AS1/miR-761/PTEN as a novel signaling pathway in myocardial ischemia and reperfusion injury (MIRI): epigenetic regulation by long non-coding RNA (lncRNA) in MIRI [J]. Korean Circ J, 2023, 53(6): 404-405.
- [11] CHEN D, YU M, CHEN H, et al. Identification and functional characterization of NEMO in Crassostrea gigas reveals its crucial role in the NF- κ B activation [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 80: 46-55.
- [12] KARIN M, DELHASE M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B; key elements of proinflammatory signalling [J]. Semin Immunol, 2000, 12(1): 85-98.
- [13] SHEN J, CHENG J, ZHU S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 193-200.
- [14] FANG X, SHI H, SUN F. The microRNA-520a-3p inhibits invasion and metastasis by targeting NF-kappaB signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. Clin Transl Oncol, 2022, 24(8): 1569-1579.
- [15] NAKAYAMA M, NAITO M, OMORI K, et al. Porphyromonas gingivalis/gingipains induce cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production via ERK1/2-activated AP-1 (c-Jun/c-Fos) and IKK/NF- κ B p65 cascades [J]. J Immunol, 2022, 208(5): 1146-1154.
- [16] OZES O N, MAYO L D, GUSTIN J A, et al. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase [J]. Nature, 1999, 401(6748): 82-85.
- [17] XIONG W, LI D, AO F, et al. The role and molecular mechanism of NOP16 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Biochem Funct, 2024, 42(2): e3939.
- [18] PARK J, KIM D, LEE M, et al. Enzyme-treated caviar prevents UVB irradiation-induced skin photoaging [J]. Mar Drugs, 2022, 20(11): 685.
- [19] WILLIAMS L M, GILMORE T D. Looking down on NF- κ B [J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(15): e00104-e00120.
- [20] Al Hamrashdi M, Brady G. Regulation of IRF3 activation in human antiviral signaling pathways [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 200: 115026.
- [21] HAN S, GAO H, CHEN S, et al. Procyanidin a1 alleviates inflammatory response induced by LPS through NF- κ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 pathways in RAW264.7 cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15087.
- [22] ZHANG X, LIU D, YE Z, et al. Gastroprotective effect of the lachnum polysaccharide and polysaccharide-dipeptide conjugates against gastric ulcer [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 174: 113661.
- [23] LI Q, LIU D, PAN F, et al. Ethanol exposure induces microglia activation and neuroinflammation through TLR4 activation and SENP6 modulation in the adolescent rat hippocampus [J]. Neural Plast, 2019, 2019: 1648736.
- [24] CORNEL A M, MIMPEN I L, NIERKENS S. MHC class I down-regulation in cancer: underlying mechanisms and potential targets for cancer immunotherapy [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(7): 1760.

(此文编辑 许雪梅)