

本文引用: 王昭月, 郑红玉, 王燕霞, 等. CRTC2 通过抑制心肌细胞铁死亡减轻心肌细胞肥大[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(10): 849-858. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.10.003.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-10-0849-10

· 实验研究 ·

CRTC2 通过抑制心肌细胞铁死亡减轻心肌细胞肥大

王昭月¹, 郑红玉¹, 王燕霞¹, 赵元琴¹, 邓伟¹, 周坤¹, 徐倩¹,
刘慧婷¹, 欧阳劭¹, 姜淼¹, 杨中州², 姜志胜¹

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 动脉硬化性疾病湖南省国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001; 2. 南京大学医学院 药物生物技术国家重点实验室 疾病研究模式动物教育部重点实验室 江苏省分子医学重点实验室, 江苏省南京市 210093

[摘要] [目的] 探究 CREB 调节转录共激活因子 2(CRTC2) 在心肌细胞肥大中的作用及其调控机制。[方法] 通过腹腔注射异丙肾上腺素(ISO)构建 C57BL/6 小鼠病理性心肌细胞肥大模型, 并采用 Western blot 检测心脏组织中 CRTC2 的表达。构建 CRTC2 基因敲除小鼠模型, 利用小动物心动超声仪检测小鼠心功能, 通过 Masson 染色检测小鼠心脏组织中胶原纤维含量, 采用 Western blot 检测小鼠心脏组织中心肌细胞肥大相关蛋白——骨骼肌 α 1-肌动蛋白(ACTA1)、脑钠肽(BNP)和铁死亡相关蛋白——酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)及谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)表达, 使用铁离子试剂盒检测小鼠心脏组织中铁离子含量, 评估 CRTC2 与心肌细胞肥大和铁死亡的相关性。用 ISO 诱导 H9c2 细胞构建心肌细胞肥大体外模型, 使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(Fer-1)干预后, 检测 CRTC2、ACTA1、BNP、ACSL4、SLC7A11 及 GPX4 的蛋白表达。通过 ISO 诱导 CRTC2 过表达的 H9c2 细胞构建心肌细胞肥大体外模型, 检测与心肌细胞肥大及铁死亡相关的指标, 以探究 CRTC2 在心肌细胞肥大中的作用机制。[结果] 与对照组相比, ISO 诱导的心肌细胞肥大小鼠心脏组织中 CRTC2 蛋白的表达增加 ($P < 0.05$)。与野生型小鼠相比, CRTC2^{-/-}小鼠心功能恶化, 表现为左心室舒张末内径(LVEDD)、左心室收缩末内径(LVESD)、左心室后壁厚度(LVPWT)、心重/胫骨长度(HW/TL)和心重/体重(HW/BW)增加, 短轴缩短率(FS)和射血分数(EF)降低, 心脏组织中胶原纤维含量增加, 心肌细胞肥大相关蛋白 ACTA1 和 BNP 的表达升高, 铁死亡相关蛋白 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达升高, SLC7A11 和 GPX4 的 mRNA 和蛋白表达降低, 心脏组织中铁离子含量升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。体外实验显示, 与 ISO 组相比, ISO+Fer-1 组 CRTC2 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$), ACTA1 和 BNP 蛋白的表达降低, 心肌细胞表面积减少, ACSL4 蛋白的表达降低, SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 ISO 组相比, LV-CRTC2+ISO 组心肌细胞表面积减少 ($P < 0.01$), ACTA1、BNP 和 ACSL4 蛋白的表达降低, SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达增加, ROS 和铁离子含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。[结论] CRTC2 可通过抑制心肌细胞铁死亡减轻心肌细胞肥大, 保护心功能。

[关键词] CREB 调节转录共激活因子 2; 心肌细胞肥大; 铁死亡; 异丙肾上腺素

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

CRTC2 attenuates cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting cardiomyocyte ferroptosis

WANG Zhaoyue¹, ZHENG Hongyu¹, WANG Yanxia¹, ZHAO Yuanqin¹, DENG Wei¹, ZHOU Kun¹, XU Qian¹, LIU Huiting¹, OUYANG Shao¹, JIANG Miao¹, YANG Zhongzhou², JIANG Zhisheng¹

1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Nanjing University Medical School & State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology & MOE Key

[收稿日期] 2025-04-23

[修回日期] 2025-05-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(91839103 和 81670429); 湖南省重点研发计划项目(2020SK2105); 2021 年湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51712); 湖南省教育厅科学研究重点项目(23A0318)

[作者简介] 王昭月, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化和心肌损伤的发病机制及防治研究, E-mail: dawanguaiguai@163.com。并列第一作者郑红玉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化和心肌损伤的发病机制及防治研究, E-mail: 3231641660@qq.com。通信作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和心肌损伤的发病机制及防治研究, E-mail: zsjiang2005@163.com。

Laboratory of Model Animal for Disease Study & Jiangsu Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanjing, Jiangsu 210093, China

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the role and regulatory mechanism of CREB regulated transcription coactivator 2 (CRTC2) in cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** A pathological cardiomyocyte hypertrophy model was established in C57BL/6 mice by intraperitoneal injection of isoproterenol (ISO), the expression of CRTC2 in cardiac tissue was detected by Western blot. The CRTC2 knockout mice model was constructed, the cardiac function of mice was detected by small animal echocardiography, the collagen fiber content in mice cardiac tissue was detected by Masson staining, the cardiomyocyte hypertrophy related proteins: skeletal muscle α 1-actin (ACTA1) and brain natriuretic peptide (BNP), as well as ferroptosis related proteins: acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in mice cardiac tissue were detected by Western blot, the iron ion content in mice cardiac tissue was detected by iron ion kit, to evaluate the correlation between CRTC2 and cardiomyocyte hypertrophy and ferroptosis. H9c2 cells were induced by ISO to construct an *in vitro* model of cardiomyocyte hypertrophy, the protein expressions of CRTC2, ACTA1, BNP, ACSL4, SLC7A11 and GPX4 were detected after intervention with ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1). H9c2 cells with CRTC2 overexpression induced by ISO were used to construct an *in vitro* model of cardiomyocyte hypertrophy, the related indicators of cardiomyocyte hypertrophy and ferroptosis were detected to explore the mechanism of CRTC2 in cardiomyocyte hypertrophy. **Results** Compared with the control group, the expression of CRTC2 protein in the cardiac tissue of ISO induced cardiomyocyte hypertrophy mice was increased ($P < 0.05$). Compared with wild-type mice, CRTC2^{-/-} mice showed worsened cardiac function, manifested as increased left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular posterior wall thickness (LVPWT), heart weight/tibia length (HW/TL) and heart weight/body weight (HW/BW), decreased short axis shortening (FS) and ejection fraction (EF), increased collagen fiber content in cardiac tissue, upregulated expression of cardiomyocyte hypertrophy-related proteins ACTA1 and BNP, increased mRNA and protein expression of ferroptosis-related protein ACSL4, decreased mRNA and protein expression of SLC7A11 and GPX4, and elevated iron ion content in cardiac tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). *In vitro* experiments showed that compared with ISO group, the ISO+ Fer-1 group had no significant change in CRTC2 protein expression ($P > 0.05$), the expression of ACTA1 and BNP protein decreased, the surface area of cardiomyocyte reduced, the expression of ACSL4 protein decreased, and the expression of SLC7A11 and GPX4 proteins increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the ISO group, the LV-CRTC2+ISO group showed a decrease in surface area of cardiomyocytes ($P < 0.01$), a decrease in ACTA1, BNP and ACSL4 protein expression, an increase in SLC7A11 and GPX4 protein expression, and a decrease in ROS and iron ion content ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** CRTC2 alleviates cardiomyocyte hypertrophy and protect cardiac function by suppressing ferroptosis in cardiomyocytes.

[**KEY WORDS**] CREB regulated transcription coactivator 2; cardiomyocyte hypertrophy; ferroptosis; isoproterenol

心肌细胞肥大是心脏在长期承受过重负荷、氧化应激、缺血缺氧或心肌细胞损伤等刺激下,产生的一种代偿性增生现象。其特征表现为心脏体积增大、顺应性降低及功能衰退。依据病理生理学的特性,心肌细胞肥大可以划分为生理性和病理性两种类型:当生理性肥大时,心肌组织的结构和收缩功能保持正常;相反,病理性肥大与心肌细胞的死亡、心肌纤维化紧密相关,通常伴随着收缩和舒张功能的障碍,最终可能导致心力衰竭^[1]。作为心血管疾病的独立危险因素,病理性心肌细胞肥大的关键病理特征涉及心肌细胞肥大和肌节结构紊乱等变化^[2]。目前临床上治疗心肌细胞肥大的药物以血管紧张素转化酶抑制剂、 β 受体阻滞剂等为主,但疗效有限。因此,深入探究心肌细胞肥大的发病机

制并寻找新的治疗靶点具有重要的意义。

近年来的研究表明,病理性心肌细胞肥大的发展过程涉及多种病理环节,包括代谢重编程、细胞死亡(如凋亡、坏死性凋亡和铁死亡)、氧化应激、线粒体功能障碍等^[3-5]。其中,铁死亡是一种铁依赖性细胞程序性死亡方式,近年来其在心血管疾病发病机制中的重要作用逐渐被揭示。这种死亡方式具有以下典型特征:铁代谢紊乱、脂质过氧化物的积累和谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的活性受抑制,其分子标志物包括酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)和GPX4等^[6]。多项研究证实,铁死亡途径的异常激

活显著参与心血管疾病的发生,尤其是促进动脉粥样硬化的发展和心力衰竭的恶化^[7-10]。在大鼠心肌细胞肥大模型中,心肌肥厚的发展伴随着心肌氧化还原平衡的破坏、心肌铁蓄积以及心肌重构等病理性变化。心脏铁蛋白的铁储存功能在维持心脏铁稳态和抗氧化应激方面发挥着至关重要的作用^[11-12]。例如,心肌细胞特异性铁蛋白重链敲除小鼠表现出明显的心肌细胞肥大和损伤,而这种病理改变可以通过 SLC7A11 过表达得到逆转^[13],这提示靶向铁死亡的调控可能成为防治心肌细胞肥大的新策略。

CREB 调节转录共激活因子 2 (CREB regulated transcription coactivator 2, CRTC2) 作为能量代谢的关键调控因子,在糖脂代谢中发挥着重要作用^[14]。此外,CRTC2 可以诱导过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 的表达,而 PPAR α 已被证实能够抑制铁死亡的发生^[15-16]。在心血管系统中,胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 通过 ROCK/PPAR α 通路发挥心脏保护作用^[17-18],并能改善心力衰竭患者的左心室射血分数 (ejection fraction, EF)^[19],这提示 CRTC2/PPAR α 信号轴可能参与心肌保护。

基于前述研究背景,本项研究致力于探索 CRTC2 在心肌细胞肥大过程中的作用及其潜在机制,为心力衰竭的病理机制提供新的理论视角,并识别潜在的治疗靶标,为临床防治策略的优化提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

H9c2 细胞,购自中国科学院上海分子细胞科学中心。

1.2 主要试剂和仪器

异丙肾上腺素 [(isoproterenol, ISO), 上海阿达玛斯试剂有限公司]; CRTC2 慢病毒载体 (长沙奥诺基因有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒、SYBR qPCR Mix 和 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒 (北京康为世纪生物科技公司); Masson 染色试剂盒和麦胚凝集素 (wheat-germ agglutinin, WGA) 红色荧光标记试剂染色液 (北京索莱宝科技有限公司); β -actin、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、骨骼肌 α 1-肌动蛋白 (skeletal muscle α 1-actin, ACTA1)、ACSL4、SLC7A11、GPX4 及 CRTC2 多克隆抗体 (美

国 Proteintech Group 公司); 小动物心动超声仪 (飞依诺科技股份有限公司); 小动物心电图机 (浙江康泰医疗器械有限公司); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); PCR 仪和正置倒置一体荧光显微镜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

1.3 实验动物

将 C57BL/6 小鼠使用 CRISPR/Cas9 技术构建 CRTC2 基因敲除纯合子小鼠模型,由剑桥-苏大基因组资源中心构建,并由南京大学杨中州实验室赠送,均为雄性,饲养至 12 月龄,体重 (40 \pm 5) g。野生型 C57BL/6 小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司,所有 C57BL/6 小鼠均饲养于南华大学实验动物中心,环境参数严格控制在以下范围:温度维持在 18~22 $^{\circ}$ C,湿度保持在 50%~60% 的 SPF 级屏障系统内;实行 12 h 昼夜交替照明,并以普通小鼠饲料进行喂养。本研究所采用的实验程序均经南华大学实验动物福利伦理委员会审核及监督 (批准号: SYXK2020-0002)。

1.4 细胞培养

H9c2 细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5 ISO 诱导的小鼠病理性心肌细胞肥大模型的构建

C57BL/6 小鼠在适应性喂养 1 周后,随机分为两组:对照组腹腔注射等体积的生理盐水;模型组腹腔注射 ISO [5 mg/(kg \cdot d)] 14 天,复制小鼠病理性心肌细胞肥大模型^[20-21]。

1.6 小鼠心功能检测

小鼠经三溴乙醇 (350 mg/kg) 麻醉后,左胸前区脱毛并清洁。仰卧位涂抹超声耦合剂,采用高频小动物心动超声仪获取左心室乳头肌短轴切面 M 型超声图像,并测量左心室舒张末内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左心室后壁厚度 (left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、EF 及短轴缩短率 (fractional shortening, FS)。

1.7 Masson 染色

经过梯度乙醇和二甲苯处理的石蜡切片,首先使用 Weigert 铁苏木精对细胞核进行染色,随后通过酸性乙醇分化并蓝化处理。接着,丽春红品红染液被用来显现胞质成分,呈现为红色。磷钼酸的处理步骤用于区分胶原与非胶原结构,而苯胺蓝染液

则使得胶原纤维染成蓝色。最后,通过梯度乙醇脱水和二甲苯透明处理,使用中性和树胶进行封片;在完成切片扫描后,利用 Image-pro plus 6.0 软件计算出胶原容积分数 (collegen volume fraction, CVF), 即胶原面积与组织总面积的比值。

1.8 Western blot 检测

用 PIPA 和 PMSF 裂解细胞或者心脏组织,提取蛋白质,用 BCA 法检测蛋白总浓度。接着,以蛋白量为 25 μg /孔进行电泳 (110 V, 90 min), 转膜 (400 mA, 35 min), 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。之后, 孵育一抗 (4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜), 孵育二抗 (室温摇床 2 h)。最后, 用全自动化学发光图像分析系统显影, 并用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行统计分析。

1.9 RT-qPCR 检测

提取细胞或组织总 RNA, 对提取的 RNA 进行纯度和浓度测定后, 用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 以 β -actin 为内参, 进行 qPCR 检测, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 mRNA 水平。引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

引物名称	引物序列
β -actin	正向 5'-TATGCTCTCCCTCAGCCATCC-3' 反向 5'-GTCACGCACGATTTCCCTCTCAG-3'
CRTC2	正向 5'-CCTACCTGACCTCACCAACCTAC-3' 反向 5'-GACCTCCACTGATGCCCAAATG-3'
ACSL4	正向 5'-CTTCCTCTTAAGCCGGGAC-3' 反向 5'-TGCCATAGCGTTTTTCTTAGATTT-3'
SLC7A11	正向 5'-GTTTCGCTGTCTCCAGTTATTCTAC-3' 反向 5'-AGAGCATCACCATCGTCAGAGG-3'
GPX4	正向 5'-ATACGCTGAGTGTGTTTGC-3' 反向 5'-CTTCATCCACTTCCACAGCG-3'

1.10 活性氧检测

根据活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒的说明书, 将 DCFH-DA 用无血清培养液按照 1 : 1 000 的比例稀释, 终浓度调整至 10 $\mu\text{mol/L}$ 。移除细胞培养液, 加入已稀释的 DCFH-DA 溶液, 确保溶液能够完全覆盖细胞表面。随后, 将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育 20 min, 再使用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以彻底清除未被细胞吸收的 DCFH-DA。最后, 通过荧光显微镜进行观察。

1.11 WGA 染色

使用 HBSS 缓冲液清洗细胞 2 次, 添加 100 μL

iFluor 594-WGA 工作溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 ~ 30 min, 再次用 HBSS 缓冲液清洗细胞 2 次。接着, 用 DAPI 工作液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞 3 min, 用 HBSS 缓冲液清洗 3 次后, 使用荧光显微镜观察并拍照。使用 Image-pro plus 6.0 软件对细胞表面积进行统计分析。

1.12 铁离子含量检测

取裂解后离心的细胞上清液或组织匀浆后离心的上清液作为待测样本, 将 0.5 mL 双蒸水和 1.5 mL 铁显色液置于空白管中, 将 0.5 mL 2 mg/L 铁标准应用液和 1.5 mL 铁显色液置于标准管中, 将 0.5 mL 待测样本和 1.5 mL 铁显色液置于测定管中, 混匀后, 沸水浴 5 min, 流水冷却, 取离心后的上清液 100 μL 放入 96 孔板中, 使用酶标仪测 520 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。铁离子含量 = [(测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值)] \times 标准品浓度 \div 待测样本蛋白浓度。

1.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析, 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 非正态分布数据以中位数 (四分位间距) 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞肥大小鼠心脏组织中 CRTC2 的表达上调

超声心动图结果显示, 与对照组相比, ISO 组小鼠的 EF 降低 ($P < 0.05$), 心重/胫骨长度 (heart weight/tibia length, HW/TL) 和心重/体重 (heart weight/body weight, HW/BW) 增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与对照组相比, ISO 组心脏组织中 ACTA1 和 BNP 蛋白的表达增加 ($P < 0.05$), 提示心肌细胞肥大模型构建成功; 心脏组织中 CRTC2 蛋白的表达增加 ($P < 0.01$), 提示 CRTC2 可能参与心肌细胞肥大的病理生理过程 (图 1)。

2.2 CRTC2^{-/-}小鼠心功能降低且心肌细胞肥大

Western blot 和 RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, CRTC2^{-/-}组小鼠心脏组织中 CRTC2 mRNA 和蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$; 图 2), 这表明 CRTC2^{-/-}小鼠构建成功。

以 C57BL/6 小鼠为对照, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠的心电图显示 ST 段压低, 提示心肌细胞肥大, 心肌相对缺血。超声图像显示, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心功能变化明显, 表现为 $CRTC2^{-/-}$ 小鼠 LVEDD 和 LVESD 增加, FS 和 EF 降低, LVPWT、HW/TL 和 HW/BW 增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 WT 小鼠相比, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心脏体积明显增大 ($P < 0.05$)。Masson 染色显示, 与 WT 组小鼠相比, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心脏组织胶原纤维含量升高 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与 WT 型小鼠相比, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠的心脏组织中 ACTA1 和 BNP 蛋白的表达增加 ($P < 0.01$; 图 3)。以上结果表明, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠发生心肌细胞肥大, 心

功能显著降低。

2.3 $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心肌细胞明显发生铁死亡

RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, ISO 组小鼠 ACSL4 mRNA 的表达升高, SLC7A11 和 GPX4 mRNA 的表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示 ISO 诱导的心肌细胞肥大小鼠心肌细胞发生铁死亡。与 WT 小鼠相比, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心肌铁离子含量升高 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 与 WT 小鼠相比, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠 ACSL4 蛋白的表达升高, SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 4)。以上结果表明, $CRTC2^{-/-}$ 小鼠心肌细胞肥大的发生可能与铁死亡有关。

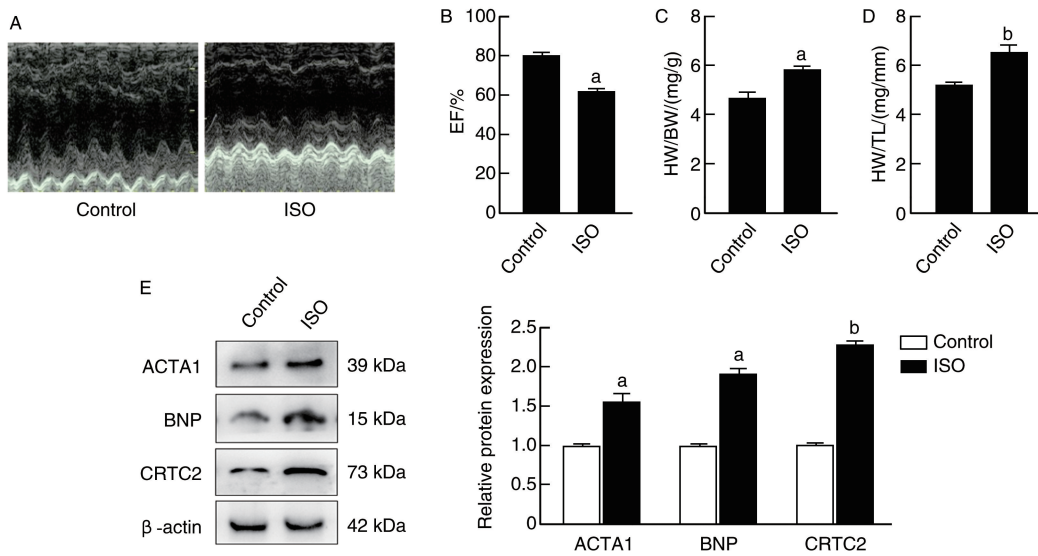


图 1. ISO 诱导小鼠心肌细胞肥大及 $CRTC2$ 表达上调

A 为小鼠超声心动图, B、C 和 D 分别为小鼠 EF、HW/BW 和 HW/TL 统计分析图, E 为 Western blot 检测小鼠心脏组织 ACTA1、BNP 和 $CRTC2$ 蛋白表达及其统计分析图。n=3。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. ISO induced cardiomyocyte hypertrophy and upregulation of $CRTC2$ expression in mice

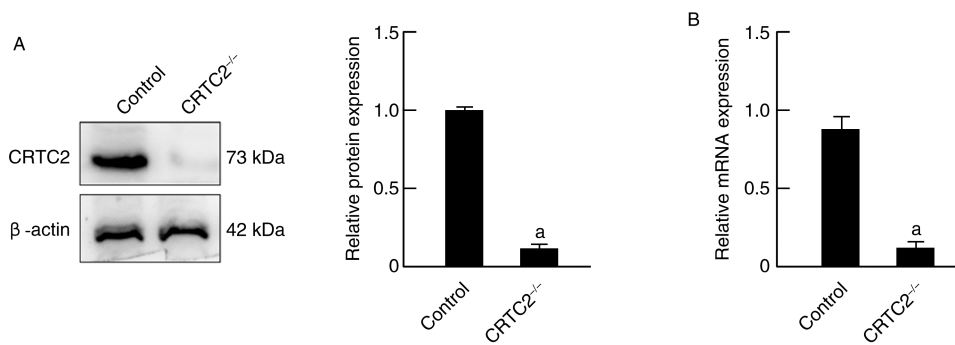


图 2. 小鼠心脏组织 $CRTC2$ 的 mRNA 和蛋白表达

A 为 Western blot 检测小鼠心脏组织 $CRTC2$ 蛋白表达及其统计分析图, B 为 RT-qPCR 检测小鼠心脏组织 mRNA 表达。n=3。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. The expression of $CRTC2$ mRNA and protein in mice cardiac tissue

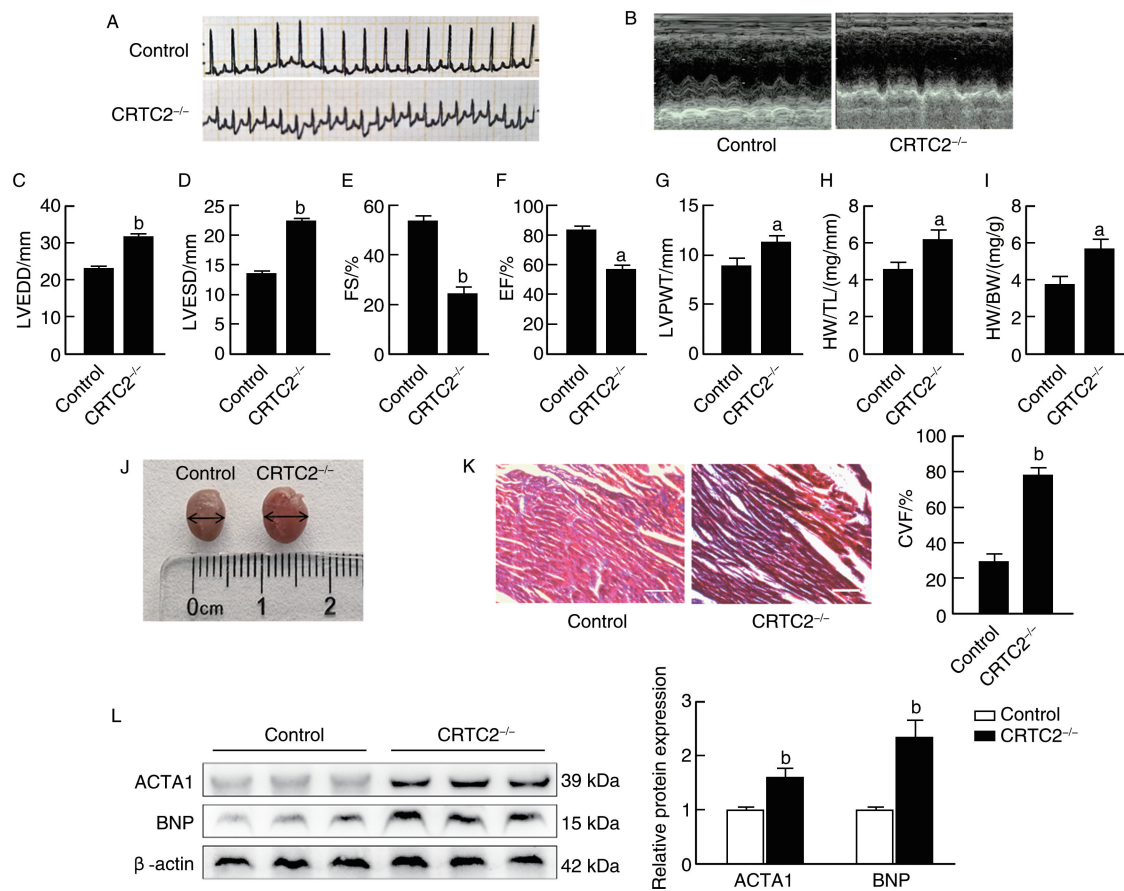


图 3. CRTC2 敲除促进小鼠心肌细胞肥大

A 为小鼠心电图(Ⅱ导联),B 为小鼠超声心动图,C-I 为小鼠 LVEDD、LVESD、FS、EF、LVPWT、HW/TL 及 HW/BW 统计分析图,J 为小鼠心脏整体形态和大小,K 为心脏组织 Masson 染色及其统计分析图(Bar=150 μ m),L 为 Western blot 检测小鼠心脏组织 ACTA1 和 BNP 蛋白表达及其统计分析图。 $n=3$ 。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 3. CRTC2 knockout promoted cardiomyocyte hypertrophy in mice

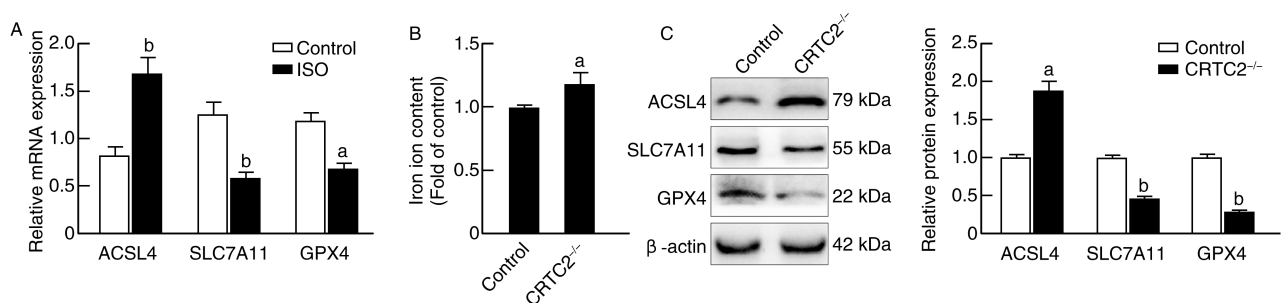


图 4. CRTC2 敲除促进小鼠心肌细胞铁死亡

A 为 RT-qPCR 检测小鼠心脏组织铁死亡相关指标 mRNA 表达,B 为铁离子含量检测,C 为 Western blot 检测小鼠心脏组织中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达及其统计分析图。 $n=3$ 。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 4. CRTC2 knockout promoted cardiomyocyte ferroptosis in mice

2.4 Ferrostatin-1 抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大

为了进一步验证心肌细胞肥大与铁死亡的关系,使用 ISO(25 mg/L)联合铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1,10 μ mol/L)处理 H9c2 细胞,并将细胞分为 3 组:对照组、ISO 组和 ISO+Fer-1 组。Western blot 结

果显示,与对照组相比,ISO+Fer-1 组 CRTC2 蛋白的表达降低($P<0.05$);与 ISO 组相比,ISO+Fer-1 组 CRTC2 蛋白的表达无明显变化,ACTA1 和 BNP 蛋白的表达降低($P<0.01$),心肌细胞表面积减少($P<0.01$)。与 ISO 组相比,ISO+Fer-1 组 ACSL4 蛋白的

表达降低, SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 5)。以上结果表明, 抑制铁死亡可以减轻 ISO 诱导的心肌细胞肥大。

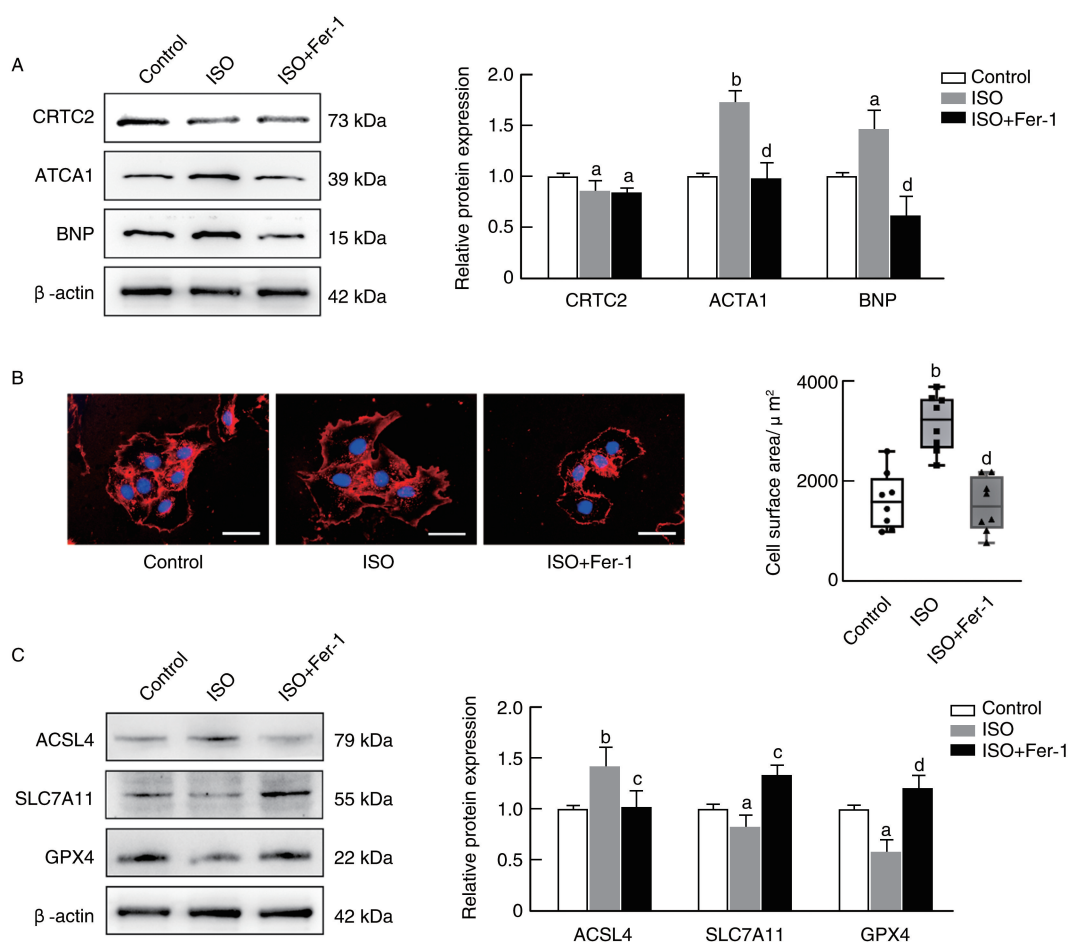


图 5. Fer-1 减轻 ISO 诱导的 H9c2 细胞肥大和铁死亡

A 为 Western blot 检测 H9c2 细胞中 CRTC2、ACTA1 和 BNP 蛋白表达及其统计分析图 ($n=3$), B 为 WGA 染色检测 H9c2 细胞表面积及其统计分析图 ($n=8$, Bar=50 μm), C 为 Western blot 检测 H9c2 细胞中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达及其统计分析图 ($n=3$)。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 ISO 组比较。

Figure 5. Fer-1 alleviated ISO induced hypertrophy and ferroptosis in H9c2 cells

2.5 CRTC2 过表达减轻 ISO 诱导的心肌细胞肥大

为了进一步探究 CRTC2 是否可以调控心肌细胞肥大, 构建了 CRTC2 过表达的 H9c2 细胞模型, 并将细胞分为 3 组: ISO 组、LV-NC + ISO 组和 LV-CRTC2 + ISO 组。WGA 染色结果显示, 与 ISO 组相比, LV-CRTC2 + ISO 组细胞表面积减少 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与 ISO 组相比, LV-CRTC2 + ISO 组 ACTA1 和 BNP 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$; 图 6)。

2.6 CRTC2 过表达减轻 ISO 诱导的 H9c2 细胞铁死亡

为了探究过表达 CRTC2 是否可以减轻心肌细胞铁死亡, 检测了 ISO 诱导的过表达 CRTC2 的 H9c2 细胞铁死亡相关蛋白的表达、铁离子和 ROS

含量。Western blot 结果显示, 与 ISO 组相比, LV-CRTC2 + ISO 组 ACSL4 蛋白的表达降低, SLC7A11 和 GPX4 蛋白的表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。荧光显微镜观察结果显示, 与 ISO 组相比, LV-CRTC2 + ISO 组 ROS 和铁离子含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 7)。以上结果说明, 过表达 CRTC2 可以在一定程度上减轻 H9c2 细胞铁死亡的发生。

3 讨论

病理性心肌细胞肥大是高血压、冠心病和瓣膜病等多种心血管疾病进展中的代偿性改变^[22], 同时也是心血管事件发生和发展的独立危险因素^[23]。

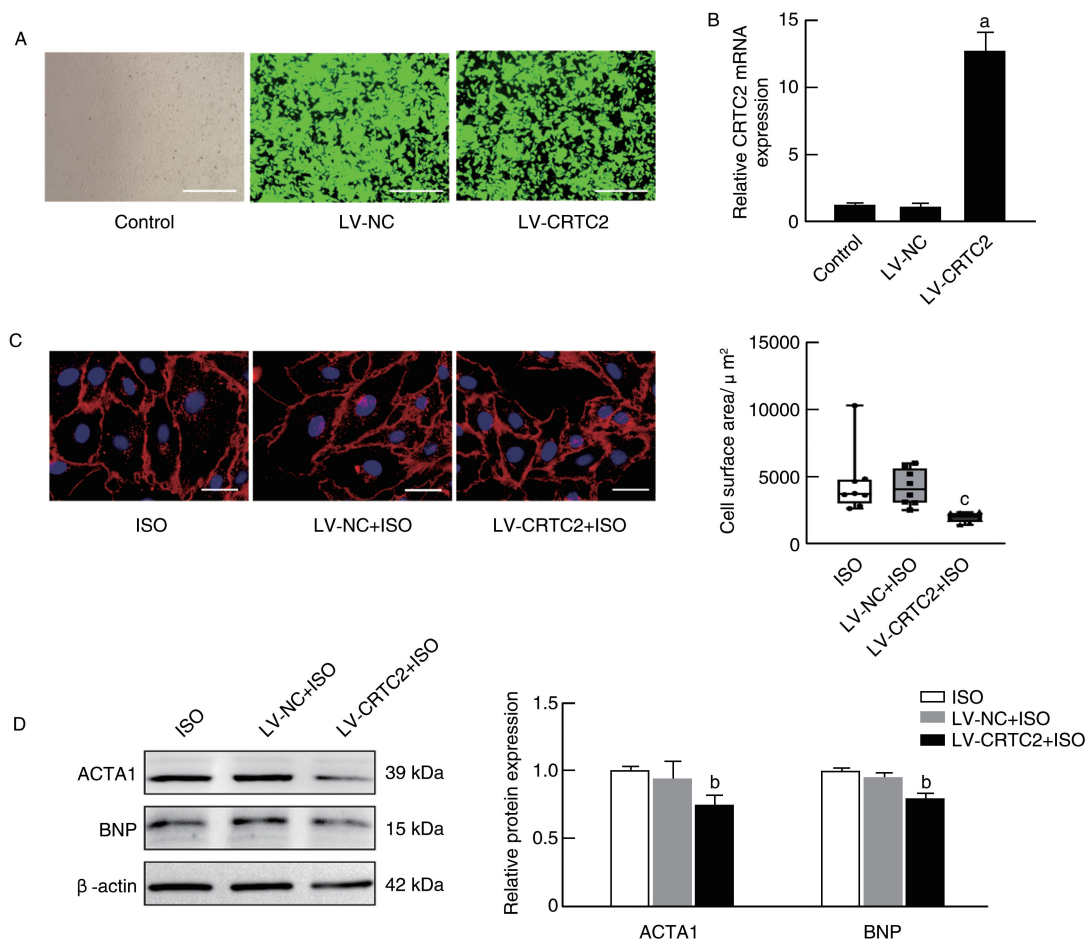


图 6. CRTC2 过表达减轻 ISO 诱导的 H9c2 细胞肥大

A 为荧光检测 H9c2 细胞经 CRTC2 慢病毒空载体和慢病毒感染情况 ($n=3$, Bar=750 μm), B 为 RT-qPCR 检测 CRTC2 mRNA 表达及其统计分析图 ($n=3$), C 为 WGA 染色检测 H9c2 细胞表面积及其统计分析图 ($n=8$, Bar=50 μm), D 为 Western blot 检测 H9c2 细胞中 ACTA1 和 BNP 蛋白表达及其统计分析图 ($n=3$)。a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 ISO 组比较。

Figure 6. Overexpression of CRTC2 alleviated ISO induced hypertrophy in H9c2 cells

若病理性刺激持续存在,最终可能导致心力衰竭或心源性猝死^[24]。因此,探索病理性心肌细胞肥大的调控机制对心血管疾病的早期防治具有重要意义。

CRTC2 是一种关键的蛋白质编码基因,作为反应元件结合蛋白的重要转录共激活因子,可以增强 CREB 的转录活性,调控下游靶基因的表达,参与多种细胞过程^[15]。为探究 CRTC2 在心肌细胞肥大中的作用,首先,以腹腔注射 ISO 构建心肌细胞肥大小鼠模型,发现 CRTC2 的表达上调。随后,利用 CRTC2^{-/-}小鼠进行长期观察,发现 12 月龄 CRTC2^{-/-}小鼠心功能降低,表现为 EF 降低、LVPWT 增厚、HW/BW 升高。此外,心肌细胞肥大相关蛋白 ACTA1、BNP 和 HW/TL 的表达增加,提示 CRTC2 敲除可促进心肌细胞肥大的发生。

近年研究表明,铁死亡在心血管疾病的发生发展中扮演着关键角色。CRTC2 的转录共激活因子

PPAR α 已被证实能够减轻铁过载诱导的小鼠肝脏铁死亡程度^[16,25]。一项基于人群的研究显示,血清铁水平与心力衰竭风险呈显著正相关^[26]。此外,混合谱系激酶 3 作为 MAP3K 的家族成员,可通过诱导细胞焦亡和铁死亡加剧心肌细胞肥大和纤维化进程^[27]。这些发现共同表明,铁死亡可能是调控心肌细胞肥大的一个重要机制。CRTC2 敲除是否通过促进铁死亡导致心肌细胞肥大? 为验证这一假设,本研究首先检测了 CRTC2^{-/-}小鼠心脏组织的铁死亡和心肌细胞肥大相关指标,结果发现,与野生型小鼠相比,CRTC2^{-/-}小鼠心脏组织发生了铁死亡和心肌细胞肥大。

为了深入探究 CRTC2 与铁死亡以及心肌细胞肥大的关联,本研究通过 ISO 诱导 H9c2 细胞构建了心肌细胞肥大模型,并设立了 ISO 与 Fer-1 共同作用的实验组。结果发现,在 Fer-1 的作用下,

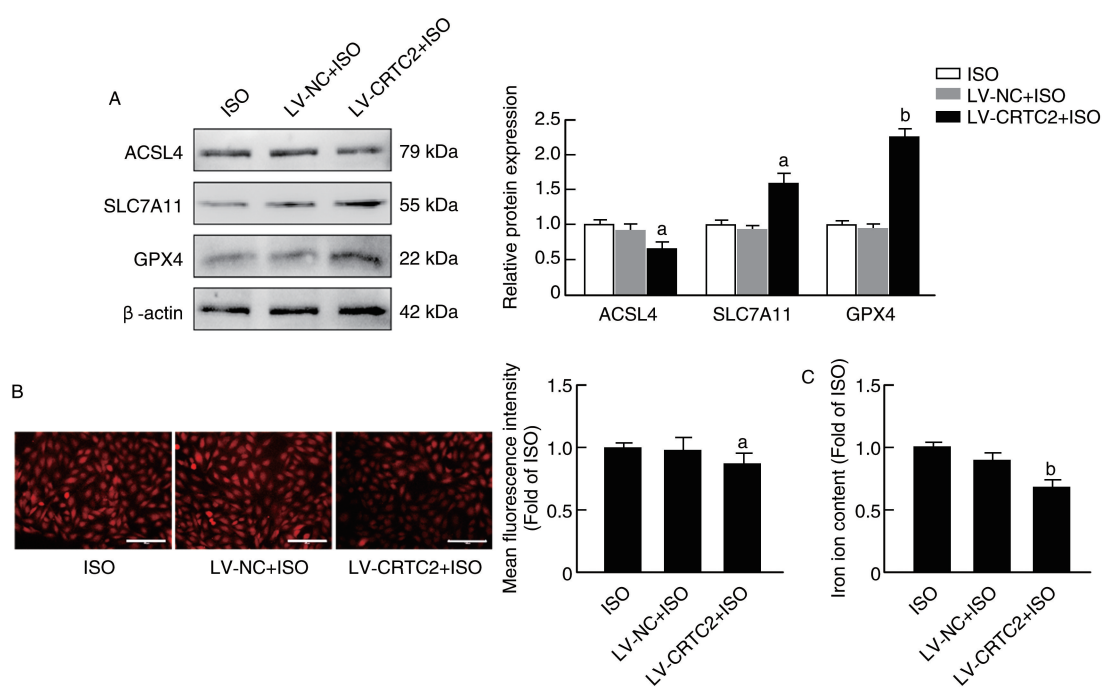


图 7. CRTC2 过表达减轻 ISO 诱导的 H9c2 细胞铁死亡

A 为 Western blot 检测细胞中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达及其统计分析图, B 为 H9c2 细胞中 ROS 含量及其统计分析图 (Bar=150 μ m), C 为铁离子含量检测。n=3。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 ISO 组比较。

Figure 7. Overexpression of CRTC2 alleviated ISO induced ferroptosis in H9c2 cells

CRTC2 的表达未见显著变化,然而心肌细胞肥大和铁死亡现象均得到了明显缓解。此外,通过构建 CRTC2 过表达的大鼠心肌细胞模型,发现过表达 CRTC2 能够减轻由 ISO 诱导的心肌细胞肥大和铁死亡。这些结果表明,CRTC2 在铁死亡的上游调控中扮演着重要角色,抑制铁死亡的发生有助于缓解心肌细胞肥大。

综上所述,本研究表明 CRTC2 敲除可以诱导小鼠心肌细胞肥大的发生,并且这种心肌细胞肥大与铁死亡有关,铁死亡可能是 CRTC2 调控心肌细胞肥大的关键下游机制。这一发现为心肌细胞肥大的病理生理进程提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 杨钦, 杜冰鑫, 杨晔颖, 等. 环状 RNA 在心力衰竭中的研究进展及现状[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(9): 737-746.
YANG Q, DU B X, YANG Y Y, et al. Research progress and current status of circular RNA in heart failure [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(9): 737-746.
- [2] REN J, WU N N, WANG S, et al. Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications [J]. Physiol Rev, 2021, 101(4): 1745-1807.
- [3] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physio-

logical and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7): 387-407.

- [4] ZHANG X, HAO C, LI T, et al. Leptin attenuates diabetic cardiomyopathy-induced cardiac remodeling via regulating cGAS/STING signaling and Opa1-mediated mitochondrial fusion [J]. Cell Signal, 2025, 132: 111805.
- [5] CHOI Y, NO M H, HEO J W, et al. Resveratrol attenuates aging-induced mitochondrial dysfunction and mitochondria-mediated apoptosis in the rat heart [J]. Nutr Res Pract, 2025, 19(2): 186-199.
- [6] 孔湘柠, 兰玥, 严文静, 等. 铁死亡在代谢性心血管疾病中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(5): 369-374.
KONG X N, LAN Y, YAN W J, et al. The role of ferroptosis in metabolic cardiovascular diseases [J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(5): 369-374.
- [7] 王琼, 冯安妮, 牙侯弟, 等. 巨噬细胞铁死亡与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(3): 257-262.
WANG Q, FENG A N, YA H D, et al. Macrophage ferroptosis and atherosclerosis [J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(3): 257-262.
- [8] 廖韦, 夏梦蝶, 向琼, 等. 铁死亡在心力衰竭中的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(9): 821-828.

- LIAO W, XIA M D, XIANG Q, et al. Research progress of ferroptosis in heart failure [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(9): 821-828.
- [9] 甘霓, 崔雨婷, 周雅婷, 等. 铁死亡在高血压发病中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(5): 441-448.
- GAN N, CUI Y T, ZHOU Y T, et al. The role of ferroptosis in the pathogenesis of hypertension[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(5): 441-448.
- [10] 韩震海, 王飞飞, 潘立栋. 银杏素通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞铁死亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(3): 231-237.
- HAN Z H, WANG F F, PAN L D. Influences of ginkgetin on ox-LDL-induced ferroptosis in vascular endothelial cells by regulating Nrf2/SLC7 A11/GPX4 signaling pathway[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(3): 231-237.
- [11] LOPASCHUK G D, KARWI Q G, TIAN R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure[J]. *Circ Res*, 2021, 128(10): 1487-1513.
- [12] LUPU M, COADA C A, TUDOR D V, et al. Iron chelation alleviates multiple pathophysiological pathways in a rat model of cardiac pressure overload [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 200: 1-10.
- [13] FANG X, CAI Z, WANG H, et al. Loss of cardiac ferritin H facilitates cardiomyopathy via SLC7A11-mediated ferroptosis[J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 486-501.
- [14] WU F, LU F, DONG H, et al. Oxyberberine inhibits hepatic gluconeogenesis via AMPK-mediated suppression of FoxO1 and CRTC2 signaling axes [J]. *Phytother Res*, 2024. DOI: 10.1002/ptr.8381.
- [15] HAN H S, CHOI B H, KIM J S, et al. Hepatic CRTC2 controls whole body energy metabolism via a miR-34a-Fgf21 axis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1878.
- [16] TSCHUCK J, THEILACKER L, ROTHENAIIGNER I, et al. Farnesoid X receptor activation by bile acids suppresses lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6908.
- [17] WU L, WANG K, WANG W, et al. Glucagon-like peptide-1 ameliorates cardiac lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy via the PPAR α pathway [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(4): e12763.
- [18] 索斯琪, 刘晓燕, 高宇. GLP-1 受体激动剂对心脏保护机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(3): 264-268.
- SUO S Q, LIU X Y, GAO Y. Research of glucagon-like peptide-1receptor agonists in cardioprotective mechanism [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(3): 264-268.
- [19] WANG P, GUO Z, KONG C Y, et al. Danuglipron ameliorates pressure overload-induced cardiac remodelling through the AMPK pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(5): e70488.
- [20] LIU H, ZHOU Z, DENG H, et al. Trim65 attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by promoting autophagy and ameliorating mitochondrial dysfunction via the Jak1/Stat1 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175735.
- [21] 李梦婷, 彭成, 谢晓芳. 心力衰竭小型动物模型研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(5): 213-219.
- LI M T, PENG C, XIE X F. Small animal models of heart failure [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(5): 213-219.
- [22] 程培培, 王新婷, 刘茜, 等. 鹿芪方调控 PAM 信号通路抑制 HIF-1 α 介导的心肌细胞自噬改善病理性心肌肥大的机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(10): 5442-5447.
- CHENG P P, WANG X T, LIU Q, et al. Mechanism research of Luqi Formula regulating PAM signaling pathway to suppress HIF-1 α -mediated autophagy in cardiomyocytes to ameliorate pathological cardiac hypertrophy[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(10): 5442-5447.
- [23] YAN W, DONG Z C, WANG J J, et al. Deficiency of the immunoproteasome LMP10 subunit attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophic remodeling via autophagic degradation of gp130 and IGF1R [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 625.
- [24] LIAO H, GAO W, MA J, et al. GPR39 promotes cardiac hypertrophy by regulating the AMPK-mTOR pathway and protein synthesis [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(6): 1211-1219.
- [25] XING G, MENG L, CAO S, et al. PPAR α alleviates iron overload-induced ferroptosis in mouse liver [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(8): e52280.
- [26] JANKOWSKA E A, KASZTURA M, SOKOLSKI M, et al. Iron deficiency defined as depleted iron stores accompanied by unmet cellular iron requirements identifies patients at the highest risk of death after an episode of acute heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(36): 2468-2476.
- [27] WANG K, CHEN X Z, WANG Y H, et al. Emerging roles of ferroptosis in cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 394.

(此文编辑 文玉珊)