

本文引用: 梁震峰, 王兴, 韩文宝, 等. PACS-2 调控巨噬细胞功能参与高血压诱导心脏功能障碍的分子机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(2): 111-121. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.02.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-02-0111-11

• 实验研究 •

PACS-2 调控巨噬细胞功能参与高血压诱导心脏功能障碍的分子机制

梁震峰, 王兴, 韩文宝, 于雷, 孟祥敏, 李清

迁安市中医医院内科, 河北省迁安市 064400

[摘要] **[目的]** 探讨磷酸化弗林酸性簇分选蛋白 2 (PACS-2) 在高血压相关心脏重构和心功能障碍中的作用及其分子机制。**[方法]** 采用血管紧张素 II (Ang II) 持续输注建立小鼠高血压模型, 并结合 PACS-2 敲除小鼠分组观察。通过收缩压 (SBP) 和超声心动图检测评估心功能, 采用心脏重量/体重比 (HW/BW)、心脏重量/胫骨长度比 (HW/TL) 及心肌细胞横截面积评价心肌肥厚, 行 Masson 染色和免疫组织化学染色检测心肌纤维化, 免疫荧光检测巨噬细胞亚群分布, Western blot 检测心肌纤维化及炎症信号蛋白表达, qPCR 检测炎症及心肌纤维化相关基因表达。同时在体外构建 Ang II 诱导的巨噬细胞模型, 结合 PACS-2 siRNA 转染, 检测 M1/M2 极化及相关功能。**[结果]** 与对照组相比, 高血压组小鼠 PACS-2 及巨噬细胞标志基因 Mac-2 显著升高, 并与 Mac-2 信号共定位 ($P < 0.05$)。高血压组 SBP 升高 ($P < 0.05$), 左心室射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS) 升高 ($P < 0.05$), HW/BW、HW/TL 及心肌细胞横截面积增大, 心房钠尿肽 (ANP) 和脑钠肽 (BNP) 表达增加 ($P < 0.05$)。心肌纤维化检测结果显示, 胶原沉积及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达显著升高, 转化生长因子 β (TGF- β) 和 p-Smad2 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。炎症检测结果显示, 高血压组 M1 型巨噬细胞数量增加, 白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) mRNA 表达上调, I κ B 激酶 α (IKK α) 和 p65 磷酸化增强 ($P < 0.05$), 而 M2 型巨噬细胞相关因子精氨酸酶 1 (Arg1)、几丁质酶 3 样蛋白 3 (Ym1) 和白细胞介素 10 (IL-10) 无明显变化。PACS-2 敲除显著降低 SBP、EF、FS、心肌肥厚及纤维化指标, 抑制 M1 极化及相关炎症因子分泌, 并下调 TGF- β /Smad 和核因子 κ B (NF- κ B) 信号 ($P < 0.05$)。体外实验显示, Ang II 诱导 M1 型巨噬细胞比例及炎症因子表达增加, 而 PACS-2 敲除能有效抑制上述效应 ($P < 0.05$), 但对 M2 型巨噬细胞相关因子表达无显著影响。此外, PACS-2 敲除能降低巨噬细胞对人脐静脉内皮细胞的黏附和迁移能力 ($P < 0.05$)。**[结论]** PACS-2 通过促进 M1 型巨噬细胞极化和炎症因子分泌并协同激活 TGF- β /Smad 及 NF- κ B 信号, 加重高血压相关心肌肥厚与心肌纤维化。抑制 PACS-2 可显著减轻心脏重构和炎症反应, 提示其为潜在干预靶点。

[关键词] 高血压; 磷酸化弗林酸性簇分选蛋白 2; 巨噬细胞极化; 心肌肥厚; 心肌纤维化; 炎症反应

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Molecular mechanism of PACS-2 in regulating macrophage function and contributing to hypertension-induced cardiac dysfunction

LIANG Zhenfeng, WANG Xing, HAN Wenbao, YU Lei, MENG Xiangmin, LI Qing

Department of Cardiology, Qian'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qian'an, Hebei 064400, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and molecular mechanism of phosphofurin acidic cluster sorting protein-2 (PACS-2) in hypertension-related cardiac remodeling and dysfunction. **Methods** A mouse hypertension model was established by continuous infusion of angiotensin II (Ang II), combined with PACS-2 knockout mice for group comparison. Systolic blood pressure (SBP) and echocardiography were used to evaluate cardiac function. Myocardial hypertrophy was assessed by heart weight/body weight ratio (HW/BW), heart weight/tibia length ratio (HW/TL), and cardiomyocyte cross-sectional area. Masson staining and immunohistochemistry staining were performed to assess myocardial fibrosis. Immunofluorescence was used to detect macrophage subsets, Western blot was used to detect myocardial fibrosis- and in-

[收稿日期] 2025-06-27

[修回日期] 2025-12-12

[基金项目] 河北省中医药管理局 2022 年度中医药类科研计划项目 (2022550)

[作者简介] 梁震峰, 副主任医师, 研究方向为慢性心力衰竭的发病机制及治疗研究, E-mail: pdwobuaw@163.com。

inflammation-related protein expression, and qPCR was used to measure inflammatory and fibrotic gene expression. In parallel, an *in vitro* Ang II-induced macrophage model combined with PACS-2 siRNA transfection was used to evaluate M1/M2 polarization and related functions.

Results Compared with the control group, PACS-2 and the macrophage marker gene Mac-2 were significantly upregulated in the hypertension group, showing co-localization with Mac-2 ($P < 0.05$).

SBP was elevated ($P < 0.05$), left ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) increased ($P < 0.05$), HW/BW, HW/TL and cardiomyocyte cross-sectional area were enlarged, and the expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) was increased ($P < 0.05$). Myocardial fibrosis analysis revealed significant collagen deposition and increased α -smooth muscle actin (α -SMA) expression, accompanied by elevated transforming growth factor- β (TGF- β) and p-Smad2 protein levels ($P < 0.05$). Inflammatory assessment showed an increase in M1 macrophages, upregulation of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA, and enhanced phosphorylation of I κ B kinase α (IKK α) and p65 ($P < 0.05$), whereas M2 macrophage-related factors arginase 1 (Arg1), chitinase 3-like protein 3 (Ym1) and interleukin-10 (IL-10) remained unchanged. PACS-2 knockout significantly reduced SBP, EF, FS, myocardial hypertrophy and fibrosis indices, suppressed M1 polarization and pro-inflammatory cytokine secretion, and downregulated TGF- β /Smad and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling ($P < 0.05$). *In vitro*, Ang II induced an increase in M1 macrophages and inflammatory cytokine expression, while PACS-2 knockout effectively inhibited these effects ($P < 0.05$) without significantly affecting M2 macrophage-related factors. Moreover, PACS-2 knockout reduced macrophage adhesion to and migration toward human umbilical vein endothelial cells ($P < 0.05$).

Conclusions PACS-2 aggravates hypertension-related myocardial hypertrophy and fibrosis by promoting M1 macrophage polarization and inflammatory cytokine production and co-activating the TGF- β /Smad and NF- κ B pathways. Inhibition of PACS-2 markedly attenuates cardiac remodeling and inflammatory responses, highlighting its potential as a therapeutic target.

[**KEY WORDS**] hypertension; phosphofurin acidic cluster sorting protein-2; macrophage polarization; myocardial hypertrophy; myocardial fibrosis; inflammatory response

高血压是全球最常见的心血管疾病之一,其患病率持续升高,是诱发心力衰竭、心肌梗死和卒中的主要危险因素^[1]。长期高血压可导致心脏压力负荷增加,进而引起心肌肥厚、纤维化和心功能不全,严重危害健康^[2]。心脏重构的发生机制复杂,除血流动力学负荷和神经内分泌激活外,免疫炎症反应,尤其是心脏巨噬细胞的作用,日益受到重视^[3]。巨噬细胞是维持心脏免疫稳态的核心细胞,可极化为 M1 型和 M2 型:M1 型分泌白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),进而加剧炎症反应和加重组织损伤;M2 型则分泌精氨酸酶 1 (arginase 1, Arg1)、几丁质酶 3 样蛋白 3 (chitinase 3-like protein 3, Ym1) 和白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10),发挥促进修复和抗炎的作用^[4]。在高血压相关心脏病中,M1/M2 型巨噬细胞比例失衡被认为是驱动心肌肥厚与纤维化进程的关键因素^[5]。

磷酸化弗林酸性簇分选蛋白 2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein-2, PACS-2) 是一种胞内转运调控蛋白,参与线粒体-内质网互作、细胞凋亡及代谢稳态等生物学过程^[6]。最新研究表明,

PACS-2 可能对免疫细胞功能产生影响,但其在心脏巨噬细胞极化及高血压心肌损伤中的具体作用尚不明确。据此推测,PACS-2 或许可通过调控巨噬细胞炎症因子的分泌及极化方向,参与高血压相关心脏功能障碍的发生发展。

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是诱导高血压的关键因子,可通过氧化应激与炎症反应直接促进心脏重构^[7]。因此,Ang II 模型常被用于高血压心脏损伤机制的研究^[8]。在此背景下,本研究采用 Ang II 诱导的小鼠模型,结合 PACS-2 基因敲除与细胞转染实验,探究 PACS-2 在巨噬细胞功能调控及心脏重构中的作用,旨在为阐明高血压相关心脏损伤的机制提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立及分组

雄性 C57BL/6 小鼠(8~10 周龄,体重 23~27 g)和通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建的 PACS-2 敲除小鼠,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK2021-0006)。共选取 40 只小鼠,采用随机数字表法分为四组,每组 10 只,分别为对照组(野生型小鼠,生理盐水处理)、PACS-2

敲除组(PACS-2 敲除小鼠,生理盐水处理)、高血压组(野生型小鼠,Ang II 处理)、PACS-2 敲除+高血压组(PACS-2 敲除小鼠,Ang II 处理)。Ang II 以 1 000 ng/(kg·min)的剂量经渗透微泵持续输注 14 天,对照组给予等量生理盐水。处理 14 天后通过尾套法检测收缩压(systolic blood pressure,SBP),若高血压组小鼠 SBP 较对照组升高 ≥ 30 mmHg,则认定为建模成功^[9]。所有动物实验均符合国家实验动物管理和使用指南,并经本院动物护理和使用委员会批准(协议编号:00013534)。

1.2 SBP 和心脏功能的检测

小鼠的 SBP 和心率采用尾套装置(BP-98,Soft-ron,日本)进行检测。将小鼠置于固定器内,完全暴露尾部后套入袖套,每只小鼠连续测量 3 次并取平均值。心脏功能检测采用高频超声心动图系统(Vevo 1100,Visual Sonics),使用 30 MHz 探头获取 M 型超声图像,记录舒张末期与收缩末期的左心室前壁厚度(left ventricle anterior wall,LVAW)、左心室后壁厚度(left ventricle posterior wall,LVPW)、心室内径(ventricular inner diameter,ID)、左心室射血分数(ejection fraction,EF)和短轴缩短率(shortening fraction,FS)。同时称量小鼠心脏重量,计算心脏重量/体重比(heart weight/body weight,HW/BW)和心脏重量/胫骨长度比(heart weight/tibia length,HW/TL),并结合心肌细胞横截面积评估心肌肥厚程度。

1.3 组织病理学和免疫荧光检测

1.3.1 常规染色 取新鲜心脏组织,经 4% 多聚甲醛固定过夜后,部分组织经石蜡包埋,切片厚度 4 μ m,行 HE 染色用于观察心肌结构,行 Masson 三色染色用于观察胶原沉积和纤维化程度,在左心室心肌区域随机选取至少 5 个不重叠的视野,使用图像分析软件,测量每个视野内胶原蛋白阳性染色像素面积以及所选取的心肌组织区域的总像素面积,计算每个视野的纤维化百分比,并取所有视野的平均值作为该样本的最终纤维化区域百分比;部分组织经 OCT 包埋剂嵌入,切片厚度 8 μ m,用于免疫学检测。

1.3.2 免疫组织化学染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,于柠檬酸缓冲液中高温修复抗原。随后,用 3% H₂O₂ 室温封闭内源性过氧化物酶 10 min,再以 5% BSA 室温封闭 30 min。切片滴加一抗,包括抗 PACS-2(1:200,购自武汉 Proteintech 公司)、抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(1:400,购自 Abcam 公司),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;次日,用 PBS 洗涤 3 次,滴加 HRP 标

记的二抗,室温孵育 30 min,PBS 洗涤后采用 DAB 显色,苏木精复染,脱水透明,中性树脂封片。在奥林巴斯 BX53 显微镜下观察切片,用 Image-Pro Plus 软件对阳性表达面积进行半定量分析。

1.3.3 免疫荧光检测 冷冻切片或细胞爬片经 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 后,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,再用 0.3% Triton X-100 室温通透 10 min,用 PBS 洗涤 3 次后用 5% BSA 室温封闭 30 min。随后滴加一抗,包括抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)、抗 Mac-2、抗 CD68、抗 CD206(均购自 Abcam 公司),稀释比例为 1:200,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,用 PBS 洗涤 3 次,滴加荧光标记的二抗(1:500),室温避光孵育 30 min,再用 PBS 洗涤 3 次后,以 DAPI 染核 3 min,抗荧光淬灭剂封片。使用奥林巴斯 BX53 荧光显微镜采集图像,用 Image-Pro Plus 软件对阳性细胞数目及荧光强度进行分析。

1.3.4 小麦胚芽凝集素染色 取新鲜心脏组织,经 OCT 包埋,制成 8 μ m 厚冰冻切片,复温后,以 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,用含有荧光素标记的小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin,WGA)工作液室温避光孵育 1 h,PBS 充分洗涤后,用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察并采集图像,用 Image-Pro Plus 或 Image J 软件随机测量至少 100 个心肌细胞的横截面积,并计算其平均值。

1.4 RNA 提取与 qPCR 检测

取新鲜心脏组织或细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,并反转录为 cDNA。qPCR 采用 SYBR Green Premix Pro Taq HS 试剂盒,以 GAPDH 为内参,检测 PACS-2、心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide,ANP)、脑钠肽(brain natriuretic peptide,BNP)、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1、Arg1、Yml、IL-10、Mac-2、 α -SMA、胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III 的 mRNA 表达。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.5 Western blot 检测

取新鲜心脏组织,经 RIPA 裂解后提取总蛋白,取 25 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE,电转移至 PVDF 膜,在室温下以 5% 脱脂牛奶封闭 30 min,随后于 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗[包括转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,TGF- β)、Smad2、p-Smad2、I κ B 激酶 α (I κ B kinase α ,IKK α)、p-IKK α 、p65、p-p65 和 GAPDH,均购自 Abcam]过夜;次日,用 TBST 洗涤 3 次后,孵育 HRP 标记的二抗(Cell Signaling Technology)1 h,稀释比为 1:3 000,采用化学发光法检测条带灰度值。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
PACS-2	ACTGGTGGTGGAGATGAAGC	TCCAGGTTCTCACTGTCCAG
ANP	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT
BNP	GAGGTCACCTCTATCTCTGG	GCCATTTCCTCCGACTTTTCTC
IL-1 β	GCAACTGTTCTGAACCTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF- α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
MCP-1	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
Arg1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCTATTAGGGACATC
Ym1	CAGGTCTGGCAATTCTTCTGAA	GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
Mac-2	TCCACGGTGGTGAAGAAAG	CTGGAAGTGCGAGGGATGTA
α -SMA	GTCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
胶原蛋白 I	GCTCCTCTTAGGGGCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
胶原蛋白 III	CTGTAACATGGAAGTGGGGAAA	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC

1.6 细胞实验

1.6.1 细胞准备 巨噬细胞来源于野生型小鼠胫骨和股骨骨髓,冲洗骨髓腔后获得骨髓细胞,置于 1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素、20 μ g/L M-CSF)中培养 7 天,诱导分化为巨噬细胞,台盼蓝染色显示存活细胞 $\geq 95\%$ 。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购自美国 ATCC 细胞库(编号:CRL-1730TM),采用内皮细胞培养基(含 5% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长添加剂及 1% 双抗)培养,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温箱。每日观察细胞形态,细胞融合达

80% ~ 90% 时传代,选取第 3 ~ 5 代细胞用于实验。

1.6.2 细胞转染 将巨噬细胞分为空白组、PACS-2 敲除组、AngII 组和 PACS-2 敲除 + AngII 组。PACS-2 敲除通过 siRNA 介导的基因沉默实现。PACS-2 siRNA 和阴性对照 siRNA 均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,具体序列见表 2。当细胞融合达 60% ~ 70% 时,采用 Lipofectamine 3000(购自 Invitrogen)将 50 nmol/L PACS-2 siRNA 或阴性对照 siRNA 转染至细胞中,转染 48 h 后通过 qPCR 检测 PACS-2 mRNA 水平,以阴性对照 siRNA 组为参照,当 PACS-2 mRNA 水平降低 $\geq 70\%$ 时,视为转染有效。

表 2. siRNA 序列信息

Table 2. siRNA sequence information

siRNA 类型	正义链(5'→3')	反义链(5'→3')
PACS-2 siRNA	GCAUUGAGAUCCUGAAGAATT	UUCUUCAGGAUCUCAAGCTT
阴性对照 siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.6.3 细胞黏附实验 提前 24 h 将 HUVEC 接种于 24 孔板(5×10^4 /孔),培养至细胞融合达 80%。巨噬细胞经 PKH-26 荧光染料(购自 Sigma)标记 30 min, PBS 洗涤后,按巨噬细胞: HUVEC 为 10:1 的比例加入共培养体系,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次去除未黏附的巨噬细胞。在荧光显微镜下随机选取 5 个视野,计数贴壁的 PKH-26⁺ 巨噬细胞数,并取平均值进行统计分析。

1.6.4 细胞迁移实验 采用 24 孔 Transwell 小室(8 μ m 孔径),下腔加入 500 μ L HUVEC 条件培

养基(培养 48 h 的上清),上腔加入 5×10^4 巨噬细胞悬液(100 μ L 无血清 1640 培养基),37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h。孵育结束后,用棉签轻轻去除上腔未迁移细胞,下腔细胞经 4% 多聚甲醛固定 15 min 并以 DAPI 染核。在荧光显微镜下随机选取 5 个视野,计数迁移细胞数,并取平均值进行统计分析。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 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,组间两两比

较采用 Bonferroni 法进行校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高血压小鼠心脏组织中 PACS-2 表达升高并与巨噬细胞标志物 Mac-2 共定位

qPCR 和免疫组织化学染色结果显示,高血压组小鼠心脏组织中 PACS-2 mRNA 的表达较对照组升高,阳性染色区域百分比较对照组增加(均 $P < 0.05$)。qPCR 分析同时显示,高血压组心脏组织中巨噬细胞标志基因 Mac-2 mRNA 的表达上调($P <$

0.05)。免疫荧光检测结果进一步表明,高血压组心脏组织中 PACS-2 与 Mac-2 信号存在明显共定位,而对照组未见明显共定位(图 1)。

2.2 PACS-2 敲除对 Ang II 诱导的高血压及心功能的影响

高血压组小鼠 SBP 较对照组显著升高,而 PACS-2 敲除+高血压组小鼠 SBP 较高血压组下降(均 $P < 0.05$),心率在各组间差异无统计学意义。超声心动图结果显示,高血压组左心室收缩功能增强,其 EF 和 FS 较对照组分别提高约 31% 和 32% ($P < 0.05$);而 PACS-2 敲除+高血压组的 EF 和 FS 较高血压组则分别下降约 14% 和 17% ($P < 0.05$;图 2)。

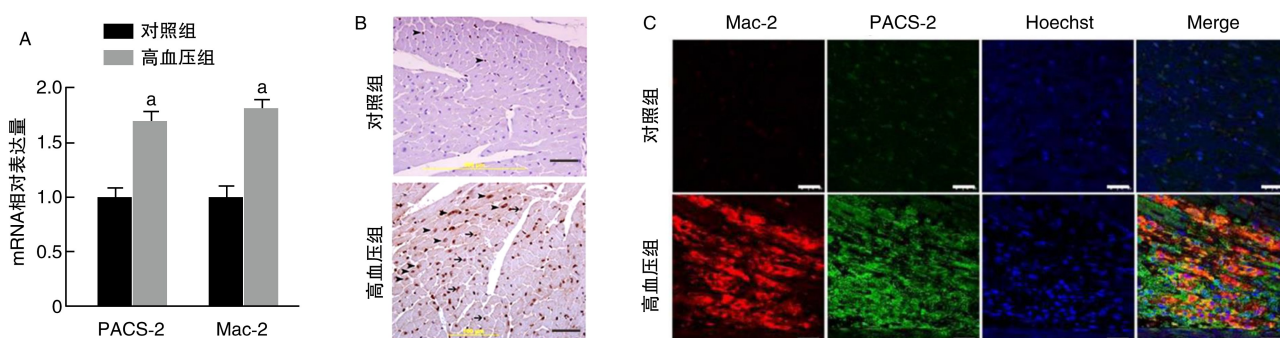


图 1. 高血压小鼠心脏组织中 PACS-2 表达升高并与巨噬细胞标志物 Mac-2 共定位

A: PACS-2 和 Mac-2 mRNA 表达定量分析; B: 心脏组织中 PACS-2 的免疫组织化学染色(比例尺=200 μm); C: 心脏巨噬细胞中 Mac-2(红色)与 PACS-2(绿色)双重免疫荧光染色, Hoechst 染色为蓝色(比例尺=25 μm)。n=6。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Upregulation and co-localization of PACS-2 with the macrophage marker Mac-2 in the heart tissue of hypertensive mice

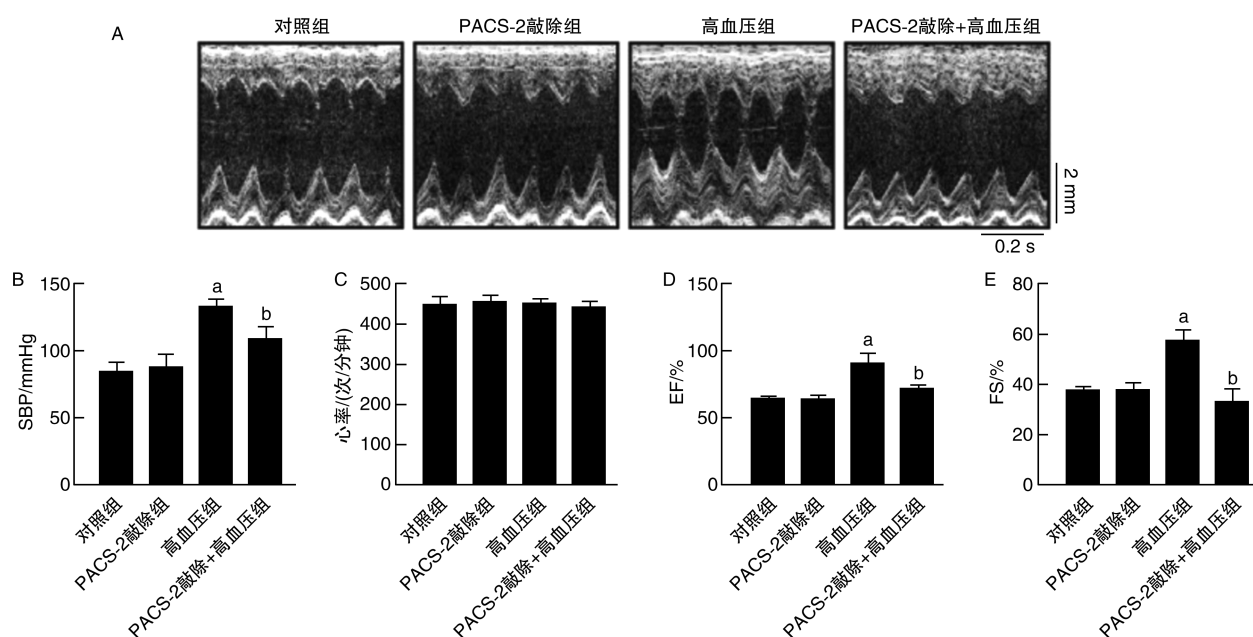


图 2. PACS-2 敲除对 Ang II 诱导的高血压及心功能的影响

A: M 型超声心动图检查左心功能; B-E: 组间 SBP、心率、EF 和 FS 的比较。n=6。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高血压组比较。

Figure 2. Effect of PACS-2 knockout on Ang II-induced hypertension and cardiac function

2.3 PACS-2 敲除对高血压小鼠心肌肥厚的影响

与对照组相比,高血压组小鼠表现出明显的心肌肥厚特征,其中 HW/BW 和 HW/TL 分别增加约 32% 和 50% ($P<0.05$),心肌细胞横截面积增加约 3.1 倍($P<0.05$),ANP 和 BNP mRNA 的表达量分别

上升约 150% 和 90% ($P<0.05$)。而 PACS-2 敲除+高血压组上述指标均较高血压组显著降低,其中 HW/BW 和 HW/TL 分别降低约 13% 和 21%,心肌细胞横截面积降低约 39%,ANP 和 BNP mRNA 的表达量分别下降约 40% 和 34% (均 $P<0.05$;图 3)。

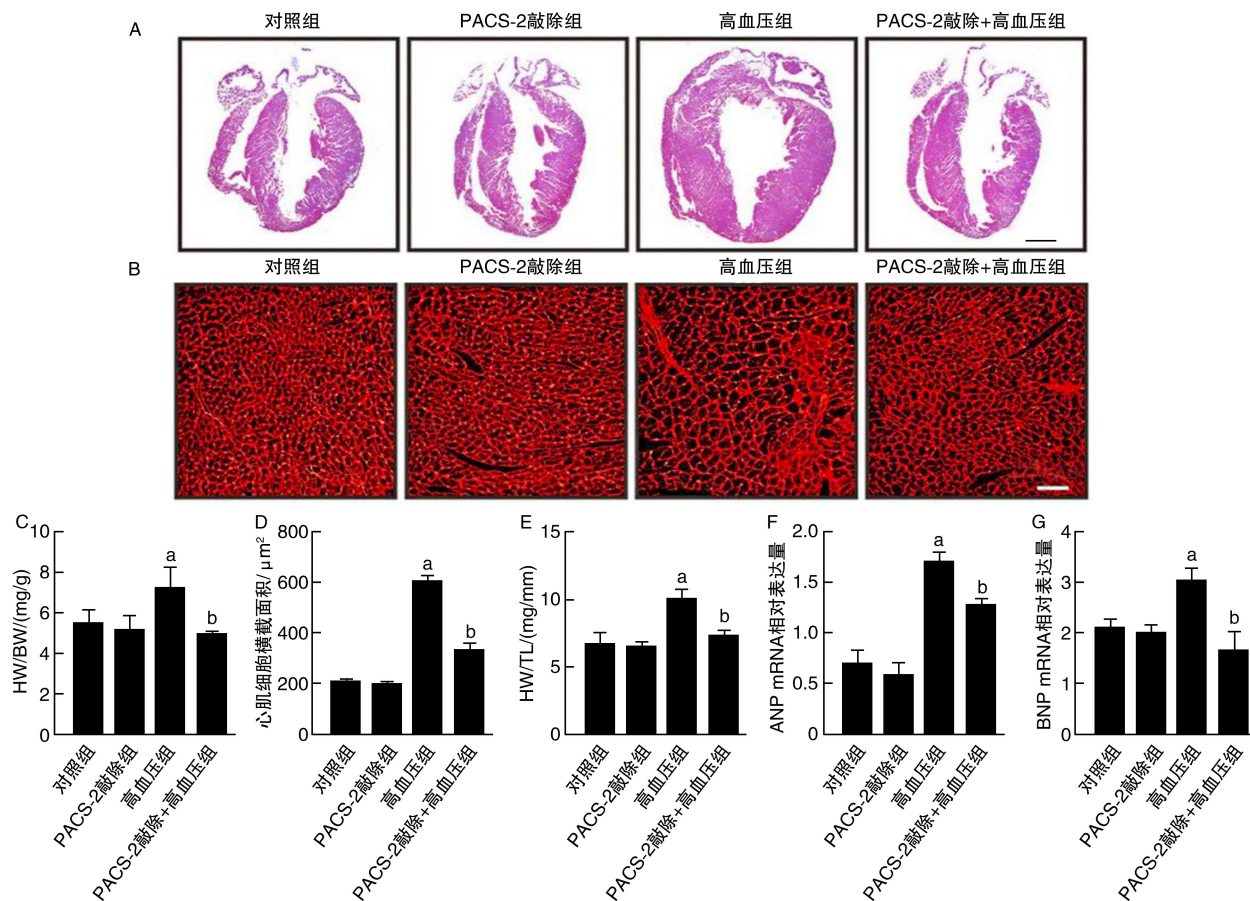


图 3. PACS-2 敲除对高血压小鼠心肌肥厚的影响

A: 心脏组织 HE 染色 (比例尺=0.5 mm); B: WGA 染色 (比例尺=20 μm); C: 组间 HW/BW 的比较; D: 组间心肌细胞横截面积的比较;

E: 组间 HW/TL 的比较; F: ANP mRNA 表达定量分析; G: BNP mRNA 表达定量分析。n=6。

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高血压组比较。

Figure 3. Effect of PACS-2 knockout on myocardial hypertrophy in hypertensive mice

2.4 PACS-2 敲除对高血压小鼠心肌纤维化的影响

Masson 染色显示,心肌胶原沉积面积在高血压组较对照组增加,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$)。免疫组织化学染色显示, α -SMA 阳性面积在高血压组较对照组增加,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组减少 (均 $P<0.05$)。 α -SMA mRNA 的表达在高血压组较对照组升高,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$)。胶原蛋白 I 和 III mRNA 的表达在高血压组较对照组升高,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$)。Western blot 结果表明, TGF- β 和 Smad2 的表达在高血压组较对照组增加,在 PACS-2

敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$;图 4)。

2.5 PACS-2 敲除对 Ang II 诱导的小鼠心脏炎症反应的影响

免疫荧光检测结果显示,小鼠心脏组织中 CD68⁺iNOS⁺M1 型巨噬细胞数量在高血压组较对照组增加,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组减少 (均 $P<0.05$)。CD68⁺CD206⁺M2 型巨噬细胞数量在各组间的差异无统计学意义。炎症因子检测结果显示, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 mRNA 的表达在高血压组较对照组升高,在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$)。M2 型巨噬细胞相关因子 Arg1、Ym1 和 IL-10 mRNA 在各组间的差

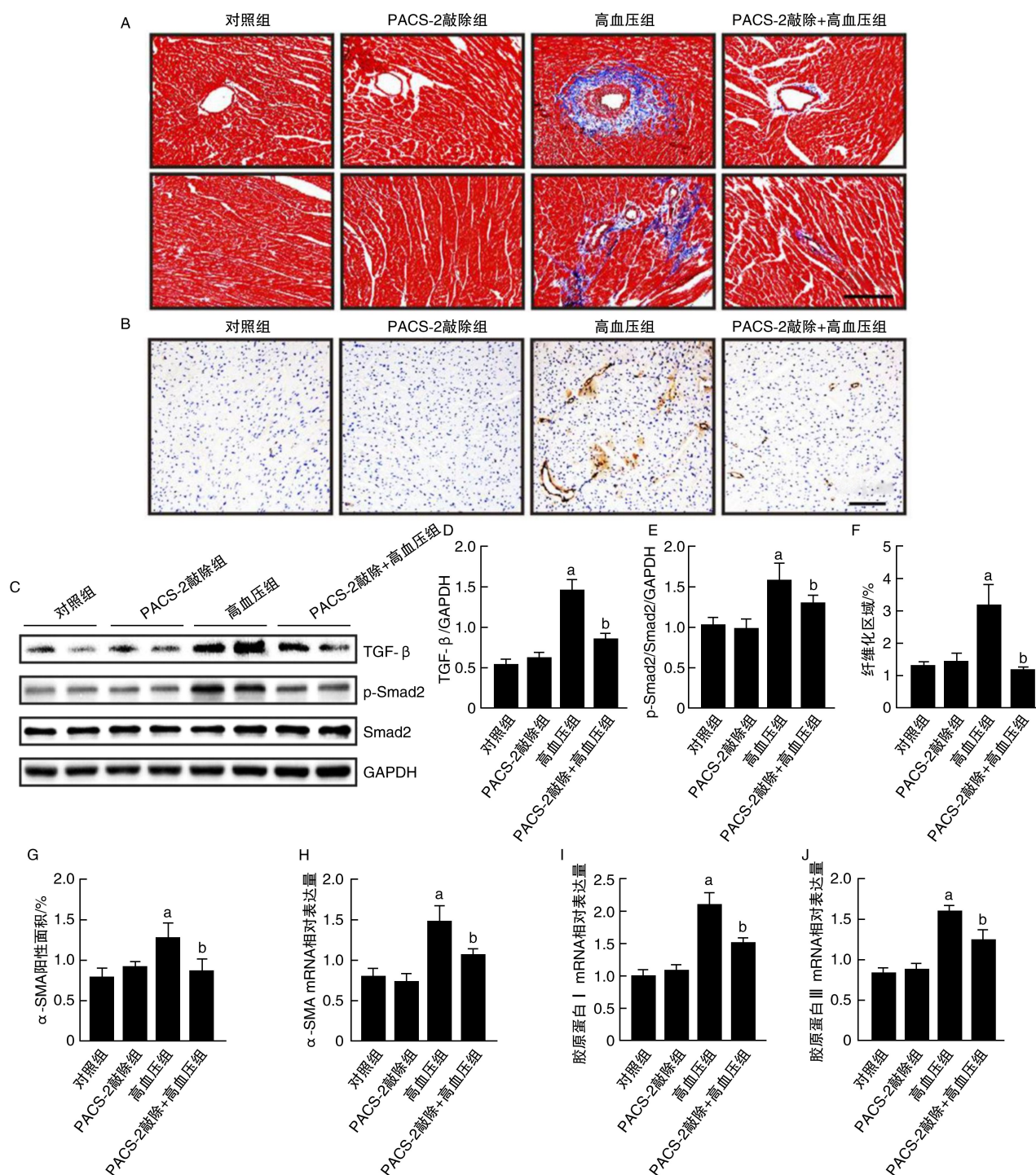


图 4. PACS-2 敲除对高血压小鼠心肌纤维化的影响

A: 心脏组织 Masson 染色 (比例尺 = 50 μm); B: α -SMA 免疫组织化学染色 (比例尺 = 20 μm); C-E: 心脏组织中 TGF- β 、p-Smad2 和 Smad2 蛋白表达及定量分析; F-J: 纤维化区域、 α -SMA 阳性面积及 α -SMA、胶原蛋白 I 和胶原蛋白 III mRNA 表达定量分析。n=6。
a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与高血压组比较。

Figure 4. Effect of PACS-2 knockout on myocardial fibrosis in hypertensive mice

异无统计学意义。Western blot 检测结果显示, p-IKK α /IKK α 和 p-p65/p65 蛋白的表达在高血压组较对照组升高, 在 PACS-2 敲除+高血压组较高血压组降低 (均 $P<0.05$; 图 5)。

2.6 PACS-2 敲除对 Ang II 诱导的 M1 型巨噬细胞活化的影响

免疫荧光检测结果显示, Ang II 组 iNOS⁺ M1 型巨噬细胞荧光强度较空白组增加, 而 PACS-2 敲除+

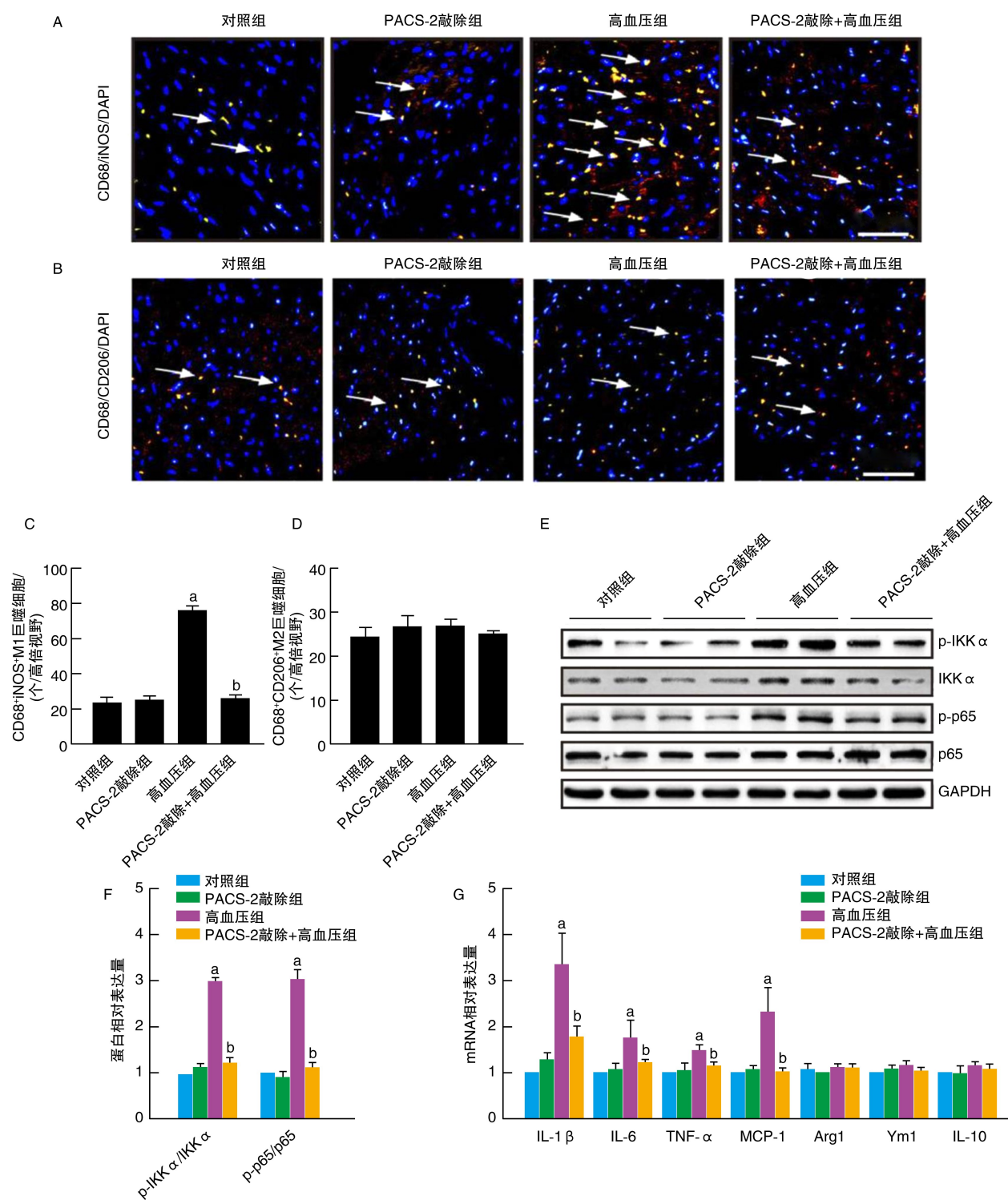


图 5. PACS-2 敲除对 Ang II 诱导的小鼠心脏炎症反应的影响

A: 免疫荧光染色检测 CD68⁺iNOS⁺M1 型巨噬细胞 (比例尺=50 μm); B: 免疫荧光染色检测 CD68⁺CD206⁺M2 型巨噬细胞 (比例尺=50 μm);

C: M1 型巨噬细胞数比较; D: M2 型巨噬细胞数比较; E, F: Western blot 检测心脏组织 p-IKKα、IKKα、p-p65 和 p65 蛋白表达及定量分析;

G: IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、Arg1、Ym1 和 IL-10 mRNA 表达定量分析。箭头所示为双阳性细数。n=6。

a 为 P<0.05, 与对照组比较; b 为 P<0.05, 与高血压组比较。

Figure 5. Effect of PACS-2 knockout on Ang II-induced cardiac inflammatory response in mice

Ang II 组 iNOS⁺M1 型巨噬细胞荧光强度较 Ang II 组降低 (均 P<0.05)。qPCR 结果显示, 与空白组比

较, Ang II 组 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 MCP-1 mRNA 的表达量分别升高约 82%、92%、91% 和 118% (均 P<

0.05), 而 PACS-2 敲除+Ang II 组的上述指标显著降低(均 $P < 0.05$)。M2 型巨噬细胞相关因子 Arg1、

Ym1 和 IL-10 mRNA 的表达在各组间的差异无统计学意义(图 6)。

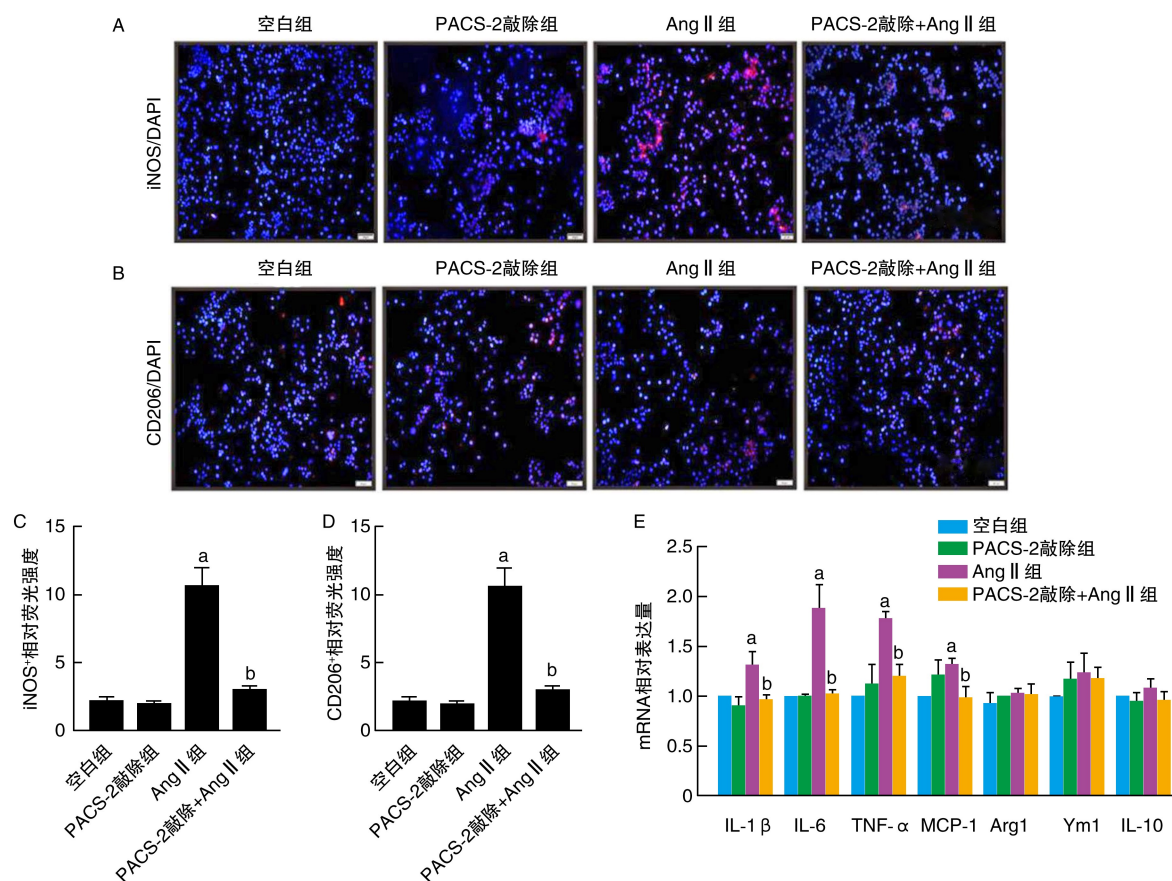


图 6. PACS-2 敲除对体外 Ang II 诱导的 M1 型巨噬细胞活化的影响

A: 免疫荧光检测 CD68 和 iNOS (比例尺=50 μm); B: 免疫荧光检测 CD68 和 CD206 (比例尺=50 μm);

C、D: CD206⁺ 和 iNOS⁺ 荧光强度定量分析; E: IL-1β、IL-6、TNF-α、MCP-1、Arg1、Ym1 和 IL-10 mRNA 表达定量分析。n=6。

a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Ang II 组比较。

Figure 6. Effect of PACS-2 knockout on Ang II-induced activation of M1 macrophages *in vitro*

2.7 PACS-2 敲除对巨噬细胞黏附和迁移能力的影响

与空白组相比, Ang II 处理显著增加巨噬细胞黏附数和迁移数 ($P < 0.05$); PACS-2 敲除+Ang II 组巨噬细胞黏附数和迁移数显著低于 Ang II 组 ($P < 0.05$), 但在 PACS-2 敲除组与空白组间无显著差异(图 7)。

3 讨论

本研究通过 Ang II 诱导的高血压模型和体外实验, 系统评价了 PACS-2 在心脏重构过程中的作用。结果发现, 高血压组小鼠心脏组织中 PACS-2 显著升高, 并与巨噬细胞标志物 Mac-2 共定位, 同时伴随

SBP 升高、EF 和 FS 异常增加, 以及心肌肥厚、纤维化及炎症反应加重; 而 PACS-2 敲除显著降低了高血压小鼠的心功能损伤, 表现为心肌肥厚、纤维化减轻炎症因子表达下调, M1 型巨噬细胞数量减少。这提示 PACS-2 在高血压诱导的心脏重构和心功能障碍中发挥着重要作用。

已有研究表明, 巨噬细胞在心血管疾病的进展中具有双重作用, 其中 M1 型通过分泌 IL-1β、IL-6、TNF-α 等促炎因子加重心肌损伤, 而 M2 型通过分泌 IL-10、Arg1 等抗炎因子参与修复过程^[10]。在高血压相关性心脏病中, M1/M2 型巨噬细胞失衡被认为是导致心肌纤维化与心功能障碍的重要机制^[11]。本研究发现, 高血压组 M1 型巨噬细胞数显著增加, 炎症因子的表达升高, 而 M2 型巨噬细胞相关因子

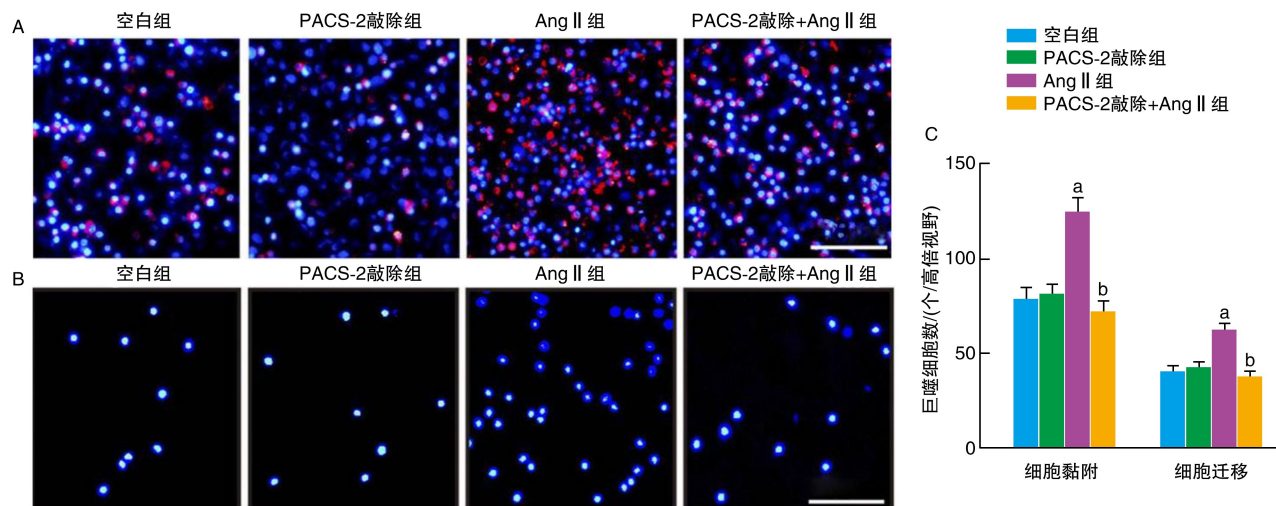


图 7. PACS-2 敲除对巨噬细胞黏附和迁移能力的影响

A: PKH-26 染色, 红色荧光为标记的 PKH-26, 蓝色荧光为标记的 DAPI (比例尺 = 100 μm); B: DAPI 染色 (比例尺 = 100 μm); C: 巨噬细胞黏附数和迁移数的定量分析。n=6。a 为 $P<0.05$, 与空白组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Ang II 组比较。

Figure 7. Effect of PACS-2 knockout on macrophage adhesion and migration ability

表达未见明显变化, 这与高血压模型中炎症反应失衡的结论相一致^[12]。更为重要的是, PACS-2 敲除可显著抑制 M1 极化及炎症因子的分泌, 这提示该蛋白可能在巨噬细胞功能调控中发挥着关键作用。在机制层面, TGF- β /Smad 信号通路被认为是心肌纤维化的核心通路, 能促进成纤维细胞活化和胶原沉积^[13]。此外, NF- κ B 信号在炎症过程中也被广泛证实能够通过上调 IL-6、MCP-1 等因子, 加剧心脏局部的炎症反应^[14]。本研究发现, 高血压组小鼠心脏组织中 TGF- β 、p-Smad2、 α -SMA 和胶原蛋白表达增加, 而 PACS-2 敲除则显著降低这些指标; 同时, IKK α 和 p65 磷酸化水平在高血压组升高, 而 PACS-2 敲除能有效抑制其活化。这一结果提示, PACS-2 可能通过协同调控 TGF- β /Smad 与 NF- κ B 信号通路, 促进纤维化进程与炎症反应的发生。已有体外实验报道, PACS-2 与线粒体-内质网相互作用及细胞凋亡调控密切相关^[15]。结合本研究结果推测, PACS-2 在巨噬细胞活化过程中, 或许通过代谢稳态与信号转导的交叉调控来参与炎症反应的调节。

此外, 本研究还发现, PACS-2 敲除不仅在体内模型中显著减轻心肌肥厚与纤维化程度, 在体外实验中也能降低 Ang II 诱导下 iNOS⁺ 巨噬细胞的比例, 以及 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子的水平, 而对 M2 型巨噬细胞相关因子则未产生显著影响。这与既往研究中“PACS-2 可调控免疫细胞功能”^[16]的推测相吻合, 而本研究进一步提供了高血压心脏损伤背景下的直接证据, 提示 PACS-2 可能偏向性调控 M1

型而非 M2 型巨噬细胞极化。这一发现为解析 M1/M2 失衡的新机制提供了全新切入点。从临床角度来看, 高血压性心脏病的进展与持续性炎症反应密切相关。传统降压治疗虽可延缓心脏重构, 但在炎症与纤维化的干预方面作用有限^[17]。本研究结果表明, 靶向 PACS-2 或可成为干预高血压心脏损伤的新策略。通过抑制 M1 极化及炎症因子分泌, 调控 PACS-2 有望在维持血压控制的同时, 改善心肌纤维化与心功能障碍。不过, 目前相关临床数据仍较为缺乏, 且 PACS-2 作为细胞内转运蛋白, 对其进行系统性抑制可能存在不良作用。因此, 未来需进一步明确 PACS-2 在心脏以外组织中的功能, 深入探索其作为治疗靶点的可行性与安全性。

本研究亦存在一定局限性: 首先, 本研究主要基于小鼠模型与体外实验开展, 因缺乏临床样本验证, 其结果的外推性可能受到一定影响。其次, 尽管研究结果提示 PACS-2 或许通过 TGF- β /Smad 和 NF- κ B 信号通路发挥作用, 但尚未通过通路抑制剂或激活剂等更直接的干预实验进行验证。此外, 本研究未深入探究 PACS-2 与代谢信号通路的交叉调控机制, 而既往研究已明确代谢稳态对巨噬细胞极化具有重要影响^[18]。因此, 未来研究应结合代谢组学与转录组学技术手段, 更全面地阐明 PACS-2 的作用机制。

综上, 本研究系统阐明了 PACS-2 在高血压相关心脏损伤中通过调控巨噬细胞 M1 极化及炎症反应发挥关键作用, 并可能通过 TGF- β /Smad 与 NF- κ B 信

号通路加剧心肌纤维化和心功能障碍。这不仅深化了对高血压性心脏病免疫炎症机制的认识,也为靶向 PACS-2 的干预策略提供了新的理论支撑,但其临床应用价值仍需进一步探索。

[参考文献]

- [1] MASENGA S K, KIRABO A. Hypertensive heart disease: risk factors, complications and mechanisms[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1205475.
- [2] DÍEZ J, BUTLER J. Growing heart failure burden of hypertensive heart disease: a call to action[J]. *Hypertension*, 2023, 80(1): 13-21.
- [3] YAP J, IREI J, LOZANO-GERONA J, et al. Macrophages in cardiac remodelling after myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(6): 373-385.
- [4] KIM Y, NURAKHAYEV S, NURKESH A, et al. Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2715.
- [5] KANG M, JIA H, FENG M, et al. Cardiac macrophages in maintaining heart homeostasis and regulating ventricular remodeling of heart diseases[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1467089.
- [6] LI C, LI L, YANG M, et al. PACS-2 ameliorates tubular injury by facilitating endoplasmic reticulum-mitochondria contact and mitophagy in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2022, 71(5): 1034-1050.
- [7] BHULLAR S K, DHALLA N S. Angiotensin II-induced signal transduction mechanisms for cardiac hypertrophy[J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3336.
- [8] SHEN S, WU G, LUO W, et al. Leonurine attenuates angiotensin II-induced cardiac injury and dysfunction via inhibiting MAPK and NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154519.
- [9] POTTHOFF S A, QUACK I, MORI Y, et al. Role of ciliary neurotrophic factor in angiotensin II-induced hypertension[J]. *Hypertension*, 2025, 82(4): 652-664.
- [10] ZHANG J, HUANG F, CHEN L, et al. Sodium lactate accelerates M2 macrophage polarization and improves cardiac function after myocardial infarction in mice[J]. *Cardiovasc Ther*, 2021, 2021: 5530541.
- [11] WONG N D, SATTAR N. Cardiovascular risk in diabetes mellitus: epidemiology, assessment and prevention[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(10): 685-695.
- [12] DOUSDAMPANIS P, AGGELETOPOULOU I, MOUZAKI A. The role of M1/M2 macrophage polarization in the pathogenesis of obesity-related kidney disease and related pathologies[J]. *Front Immunol*, 2025, 15: 1534823.
- [13] LI C, MENG X, WANG L, et al. Mechanism of action of non-coding RNAs and traditional Chinese medicine in myocardial fibrosis: focus on the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1092148.
- [14] MATSUMORI A. Nuclear factor- κ B is a prime candidate for the diagnosis and control of inflammatory cardiovascular disease[J]. *Eur Cardiol*, 2023, 18: e40.
- [15] XUE M, FANG T, SUN H X, et al. PACS-2 attenuates diabetic kidney disease via the enhancement of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane formation[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1107.
- [16] YANG J, LI L, LI C, et al. PACS-2 deficiency aggravates tubular injury in diabetic kidney disease by inhibiting ER-phagy[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 649.
- [17] MURRAY E C, NOSALSKI R, MACRITCHIE N, et al. Therapeutic targeting of inflammation in hypertension: from novel mechanisms to translational perspective[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(13): 2589-2609.
- [18] WCULEK S K, DUNPHY G, HERAS-MURILLO I, et al. Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(3): 384-408.

(此文编辑 文玉珊)