

· 基础研究 ·

增龄对大鼠心脏组织炎症小体信号通路的改变

刘艳¹, 邢莎莎^{1*}, 杨进², 雷霞¹, 杨雨婷¹, 陈林², 王凯²

(成都大学附属医院:¹ 药物临床试验中心,² 泌尿外科,成都 610081)

【摘要】 目的 观察衰老所致的心脏纤维化和炎症小体活化的变化,研究增龄对大鼠心脏形态学变化的影响及机制。**方法** 老年组为正常饲养20月龄的SD大鼠,青年组为正常饲养8周龄的SD大鼠,每组5只。取大鼠心脏组织,通过Masson染色法检测心脏组织胶原沉积,通过免疫组织化学法评价心脏组织衰老标志物p16和p21的表达,通过免疫组织化学和免疫荧光法评价心脏组织炎症小体相关蛋白半胱天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)和白介素-1 β (IL-1 β)的表达。采用Image-pro plus 6.0软件对图像进行分析,SPSS 13.0软件进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析。**结果** 与青年组相比,老年组大鼠心脏组织胶原沉积增加[(12.54 $\pm$ 2.8)%和(45.12 $\pm$ 7.63)%]、衰老标志物p16[(21.45 $\pm$ 5.21)%和(38.71 $\pm$ 6.89)%]和p21[(19.23 $\pm$ 7.32)%和(41.01 $\pm$ 10.21)%]表达增加,NLRP3炎症小体相关蛋白Caspase-1[(10.23 $\pm$ 7.12)%和(42.01 $\pm$ 8.91)%]和IL-1 β [(5.27 $\pm$ 1.02)%和(14.62 $\pm$ 3.87)%]表达上调,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 老年大鼠心脏组织纤维化反应发生与炎症小体信号通路激活密切相关。

【关键词】 增龄;炎症小体;胶原沉积;心脏

【中图分类号】 R541 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.05.086

Effect of aging on changes of cardiac inflammasome signaling pathway in rats

LIU Yan¹, XING Sha-Sha^{1*}, YANG Jin², LEI Xia¹, YANG Yu-Ting¹, CHEN Lin², WANG Kai²

(¹Center of Clinical Drug Trial, ²Department of Urology, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of aging on cardiac morphological changes in rats by observing the changes of cardiac fibrosis and activation of inflammatory bodies. **Methods** A total of 10 SD rats were divided into young group (8 weeks old) and old group (20 months old), with 5 rats in each group. The rats were sacrificed at corresponding time, and the cardiac tissue was harvested respectively. The collagen deposition was detected by Masson staining. The expression of aging markers p16 and p21 was evaluated by immunohistochemical assay. The expression of inflammasome associated proteins Caspase-1 and interleukin-1 (IL-1 β) was evaluated by immunohistochemistry and immunofluorescence assays. Image-pro plus 6.0 software was used to analyze the image. SPSS statistics 13.0 was employed to analyze the data, and one-way ANOVA was applied for the comparison between groups. **Results** Compared with the young group, the collagen deposition was increased [(12.54 $\pm$ 2.8)% vs (45.12 $\pm$ 7.63)%], the expression of p16 [(21.45 $\pm$ 5.21)% vs (38.71 $\pm$ 6.89)%] and p21 [(19.23 $\pm$ 7.32)% vs (41.01 $\pm$ 10.21)%] was enhanced, and the levels of Caspase-1 [(10.23 $\pm$ 7.12)% vs (42.01 $\pm$ 8.91)%] and IL-1 β [(5.27 $\pm$ 1.02)% vs (14.62 $\pm$ 3.87)%] were elevated in the old group (all $P<0.05$). **Conclusion** The occurrence of cardiac fibrosis in aged rats is closely related to the activation of inflammasome signaling pathway.

【Key words】 aging; inflammasome; collagen deposition; heart

This work was supported by the Project of Sichuan Provincial Science and Technology Plan (2019YJ0654) and the Project of Chengdu Municipal Bureau of Science and Technology (2015-HM01-00434-SF, 2015-HM01-00580-SF).

Corresponding author: XING Sha-Sha, E-mail: xingshasha1230@126.com

心血管疾病是发达国家主要的致死性疾病。随着年龄增加,心血管疾病的发病率呈显著上升趋势^[1]。心脏的老化是一个复杂的病理生理过程,伴随着多种生物学现象的发生,主要表现为心脏舒张

收稿日期:2019-06-10;接受日期:2019-08-16

基金项目:四川省科技计划资助项目(2019YJ0654);成都市科技局项目(2015-HM01-00434-SF,2015-HM01-00580-SF)

通信作者:邢莎莎, E-mail: xingshasha1230@126.com

功能紊乱、心脏肥大、纤维化和收缩功能受损^[2]。心脏纤维化伴随衰老进程,加速心脏损伤^[3]。在衰老的小鼠和人的心脏中,纤维连接蛋白和胶原显著增加,衰老的心肌成纤维细胞纤维化信号和胶原形成显著增加^[4]。心脏胶原堆积引起心室过度纤维化,进一步引起心肌硬化,导致了心脏舒张功能障碍^[5]。炎症小体作为慢性、低水平、无菌性炎症的主要感受器,在衰老相关心血管疾病中的作用受到广泛关注^[6]。但是,在老年大鼠心脏中,缺乏炎症小体活化的直接证据。本研究旨在观察衰老所致大鼠心脏的胶原沉积和炎症小体活化的变化,旨在为衰老导致的心脏组织肥大和炎症提供直接的实验证据。

1 材料与方法

1.1 试剂

半胱天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 抗体、白介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 抗体购于德国 Abcam 公司;p16 抗体、p21 抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗购于武汉三鹰生物技术有限公司;苏木素、丽春红、二氨基联苯胺染色液 (diaminobenzidine, DAB) 染色液购于武汉塞维尔生物科技有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物

SD 大鼠 10 只,均为雌性^[7];正常饲养 20 个月的大鼠作为老年组,正常饲养 8 周龄的大鼠作为青年组,每组 5 只。采用异氟烷进行麻醉,取大鼠心脏组织,冰磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗后,4% 多聚甲醛固定 24 h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,检测相关指标。

1.3 方法

1.3.1 Masson 染色 切片经苏木素染细胞核、丽春红染色、磷钼酸处理,苯胺蓝染色,分化,脱水封片。采用 Panoramic MIDI 扫描仪行全波长扫描 (3D HISTECH, 匈牙利),胶原纤维呈蓝色,观察心脏组织胶原沉积情况。

1.3.2 免疫组织化学染色 切片脱石蜡后,行免疫组织化学染色,具体步骤如下:抗原修复后阻断内源性过氧化物酶,加入牛血清蛋白 (bull serum albumin, BSA) 封闭,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗孵育后,加入 DAB 显色。苏木素复染后脱水封片, Panoramic MIDI 扫描仪行全波长扫描。苏木素染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。浓度为:IL-1 β 抗体 1 : 100;p16 抗体 1 : 50;p21 抗体 1 : 50。

1.3.3 免疫荧光染色 切片脱蜡至水、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗原修

复、血清封闭,加一抗 4℃ 孵育过夜,洗涤一抗后,加二抗室温孵育 50 min,4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核,封片,切片,于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像 (红光激发波长 510~560 nm,发射波长 590 nm)。

1.4 图像分析

采用 Image-pro plus 6.0 软件对图像进行分析,每张切片随机选择 5 个视野进行分析,自动计算光密度值,取平均光密度值用于各组之间比较。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,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 增龄对大鼠心脏组织肥大和胶原沉积

与青年大鼠相比,老年大鼠的心脏体积显著增大 (图 1A)。Masson 染色结果显示,衰老大鼠心脏组织胶原沉积明显增加 [(12.54 $\pm$ 2.8)% 和 (45.12 $\pm$ 7.63)%],提示随着衰老进程,心肌组织胶原沉积,纤维化导致心脏组织肥大 (图 1B,C)。

2.2 增龄对大鼠 p16 和 p21 蛋白表达的影响

与青年组大鼠相比,老年组大鼠心脏组织衰老标志 p16 [(21.45 $\pm$ 5.21)% 和 (38.71 $\pm$ 6.89)%] 和 p21 [(19.23 $\pm$ 7.32)% 和 (41.01 $\pm$ 10.21)%] 蛋白的表达均显著增加 ($P<0.05$;图 2),提示随着年龄增长,心脏细胞呈现衰老的特性。

2.3 增龄对大鼠心脏组织 IL-1 β 表达的影响

与青年组大鼠相比,老年组大鼠心脏组织炎症标志蛋白 IL-1 β 表达显著增加 [(5.27 $\pm$ 1.02)% 和 (14.62 $\pm$ 3.87)%],差异具有统计学意义 ($P<0.05$;图 3),提示随着年龄增长,心脏细胞呈现炎症特性。

2.4 增龄对大鼠心脏组织 Caspase-1 蛋白表达的影响

随着衰老进程,大鼠心脏组织 Caspase-1 蛋白表达显著增加 [(10.23 $\pm$ 7.12)% 和 (42.01 $\pm$ 8.91)%],差异具有统计学意义 ($P<0.05$;图 4),提示炎症小体活化是诱导心脏组织衰老的关键机制。

3 讨论

心脏纤维化是指心脏组织内结缔组织增多和实质细胞减少的病理变化,是多种心血管疾病的共同病理特征,纤维化导致的心脏功能衰竭是患者致死和致残的主要原因^[8]。衰老是心肌组织纤维化和组织重构的关键风险因子,在增龄相关的高血压、肥厚

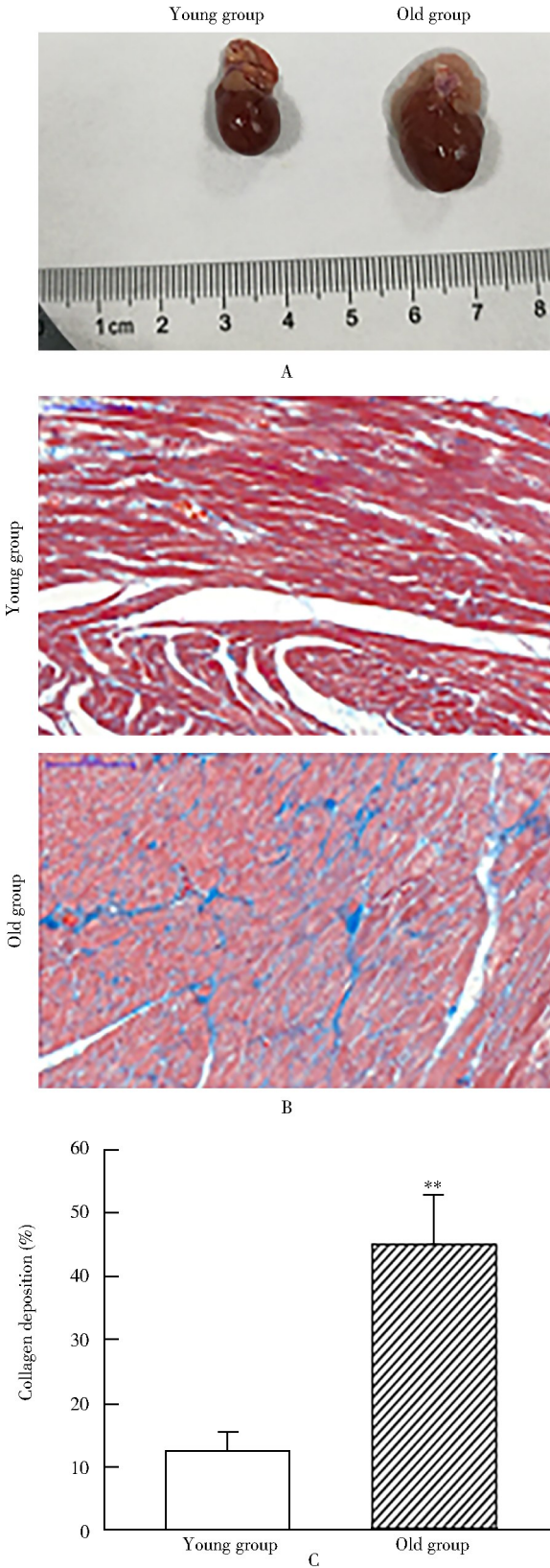


图1 增龄诱导大鼠心脏组织肥大和胶原沉积
Figure 1 Aging-induced cardiac hypertrophy and collagen deposition in rats ($n=4$)

A: representative image for rat heart; B, C: Masson-trichrome stain images (scale bar=100 μ m) and quantitative analysis of collagen deposition in cross sections of rat heart, respectively. Compared with young group, ** $P<0.01$.

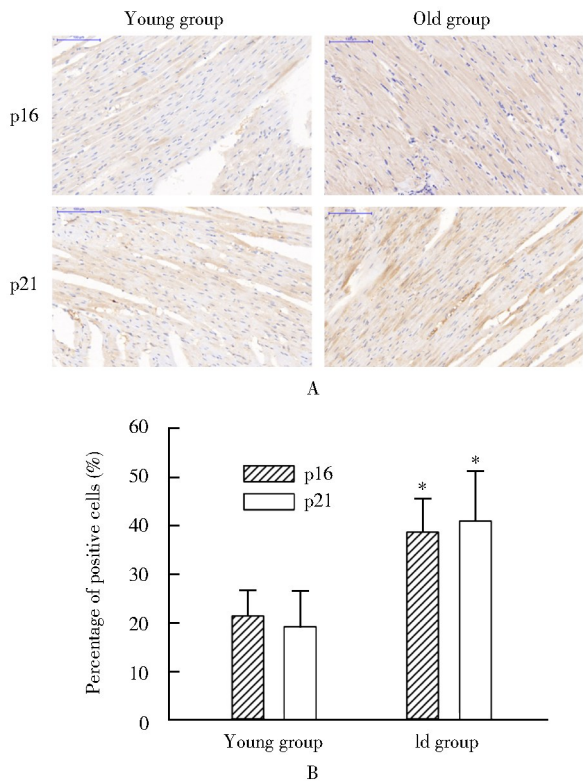


图2 2组大鼠 p16 和 p21 蛋白表达的比较
Figure 2 Comparison of expression of p16 and p21 between two groups ($n=4$)

A: representative immunohistochemical staining images (scale bar=100 μ m); B: quantitative analysis in cross sections. Compared with young group, * $P<0.05$.

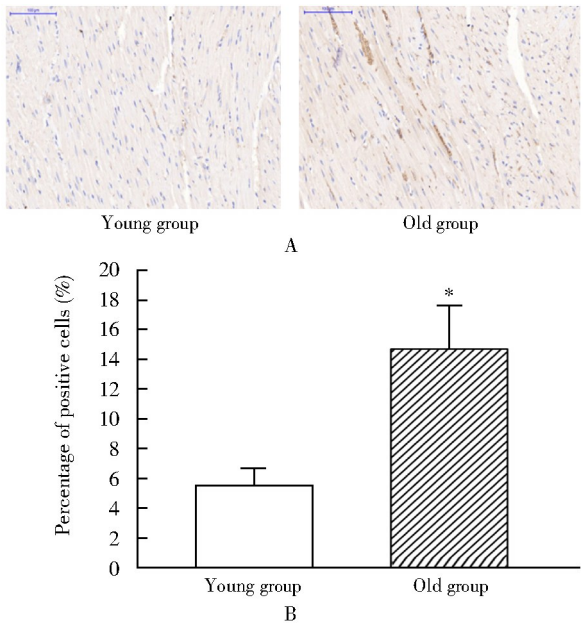


图3 2组大鼠 IL-1 β 蛋白表达的比较
Figure 3 Comparison of expression of IL-1 β between two groups ($n=4$)

A: representative immunohistochemical staining images (scale bar=100 μ m); B: quantitative analysis in cross sections. IL-1 β : interleukin-1 beta. Compared with young group, * $P<0.05$.

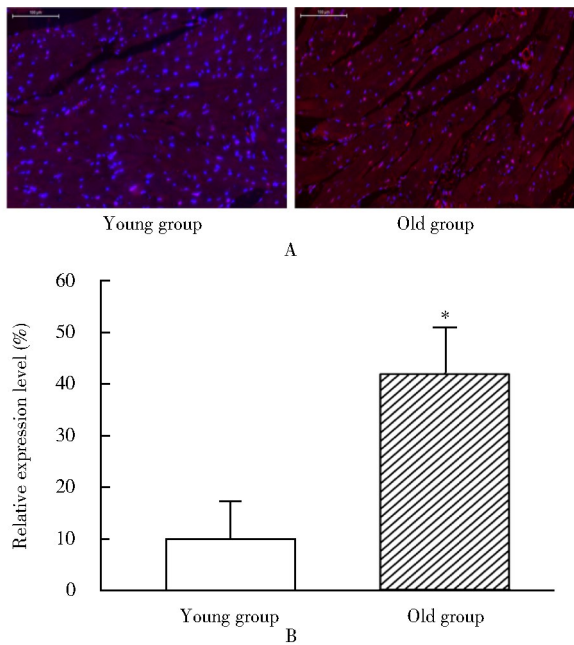


图4 2组大鼠Caspase-1蛋白表达的比较

Figure 4 Comparison of expression of Caspase-1 between two groups (n=4)

A: representative immunofluorescence staining images (scale bar=100 μm);
B: quantitative analysis in cross sections. Compared with young group, *P<0.05.

性心肌病和心肌缺血等心血管疾病中,均存在心脏胶原沉积和纤维化改变^[9]。目前对于自然衰老进程中心脏组织重构的机制尚未被阐明。

衰老机体持续存在低水平、慢性、无菌性炎症,可以通多种作用损害免疫系统活化,因此,调节炎症代谢物可能是干预年龄相关疾病的重要方式^[10]。研究表明,炎症小体是慢性、低水平、无菌性炎症的主要感受器。在机体受到外界病原微生物侵袭或自身发出“危险信号”时,NOD样受体(NOD-like receptor, NLR)或黑素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM2)分子被激活,组成蛋白复合体,并招募 Pro-Caspase-1,导致其局部高浓度,发生自体水解,随后形成异二聚体,进一步聚合形成四聚体,成为有活性的Caspase-1。Caspase-1剪切无活性的 pro-IL-1β,促进其成熟及分泌^[11,12]。在衰老相关的心血管疾病中,均发现了炎症小体的活化,但对于自然衰老的心脏中是否存在炎症小体活化尚未见相关报道。

本研究证实,在自然衰老进程中,存在Caspase-1活化和IL-1β炎症介质释放,提示炎症小体活化导致的炎症可能是导致自然衰老的关键机制,抑制炎症小体活化有望成为干预心脏胶原沉积和心脏老化的新靶点。

【参考文献】

[1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, *et al.* Heart disease and stroke statistics — 2014 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 129(3): e28–e292. DOI: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80.

[2] Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik AF, *et al.* Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(6): 1173–1191. DOI: 10.1007/s00395-011-0222-8.

[3] Sangaralingham SJ, Huntley BK, Martin FL, *et al.* The aging heart, myocardial fibrosis, and its relationship to circulating C-type natriuretic peptide[J]. *Hypertension*, 2011, 57(2): 201–207. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160796.

[4] Wang X, Guo Z, Ding Z, *et al.* Endothelin-1 upregulation mediates aging-related cardiac fibrosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 80: 101–109. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.001.

[5] Burlew BS. Diastolic dysfunction in the elderly — the interstitial issue[J]. *Am J Geriatr Cardiol*, 2004, 13(1): 29–38.

[6] Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(9): 505–522. DOI: 10.1038/s41569-018-0064-2.

[7] Chen L, He PL, Yang J, *et al.* NLRP3/IL1β inflammasome associated with the aging bladder triggers bladder dysfunction in female rats[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2960–2968. DOI: 10.3892/mmr.2019.9919.

[8] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028–1040. DOI: 10.1038/nm.2807.

[9] Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: novel mediators of fibrotic remodelling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 93: 175–185. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.005.

[10] 刘俊乐, 张良成. 线粒体功能障碍及炎症与衰老的相关关系[J]. *中国老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(6): 469–472. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.06.099.

Liu JL, Zhang LC. Correlation of mitochondrial dysfunction and inflammation with aging[J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2019, 18(6): 469–472. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.06.099.

[11] Awad F, Assrawi E, Louvrier C, *et al.* Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 187: 133–149. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.011.

[12] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, *et al.* Inflammasomes in health and disease[J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 278–286. DOI: 10.1038/nature10759.

(编辑: 吕青远)