DOI:10.16016/j.1000-5404.201501111

论著

Kruppel样因子15对大鼠心脏压力超/卸负荷后脂质沉积及心功能的调节作用

焦蔡领,邹书帆,蹇 朝,唐富琴,肖颖彬,陈 林 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所)

[摘要] **目的** 通过建立大鼠胸骨上小切口升主动脉缩窄及松解模型,探讨心脏压力超/卸负荷后心脏脂质沉积及心功能的变化。**方法** 选用5周龄、体质量150~200 g雄性SD大鼠45只,行非人工通气下胸骨上小切口升主动脉缩窄术致大鼠心脏功能受损,造模成功后分为9组($n=5$):假手术对照组(9、12、15周)分别标记为C1、C2、C3,升主动脉缩窄组(缩窄9、12、15周)分别标记为A1、A2、A3,去缩窄组(缩窄9周后去缩窄当天、3、6周组)分别标记为B1、B2、B3。通过动物超声心动图观察心脏功能,PCR和Western blot检测Kruppel样因子15(kruppel-like factor 15, KLF15),心肌脂质染色观察脂质沉积分别在A1后去缩窄,B1、B2、B3以及A1、A2、A3的变化情况。**结果** ①与C1、C2、C3相比,升主动脉缩窄组随着缩窄时间越长,心功能越低,A1、A2、A3与C1、C2、C3比较EF分别为:[(85.32±3.90) *vs* (54.32±3.88),(85.45±4.26) *vs* (47.91±3.64),(82.83±4.93) *vs* (40.08±4.45), $P<0.01$];②与A1相比,B2、B3心功能有所恢复,并具有统计学差异($P<0.05$);EF%:(54.32±3.88) *vs* (63.28±5.81),(54.32±3.88) *vs* (63.59±6.48);③与C1、C2、C3相比,A1、B2、B3心脏KLF15 mRNA及其蛋白表达降低[mRNA:(0.66±0.09) *vs* (1.76±0.07),(0.52±0.07) *vs* (1.78±0.12),(0.51±0.04) *vs* (1.70±0.13), $P<0.01$];蛋白:[(0.99±0.05) *vs* (1.25±0.04),(0.96±0.05) *vs* (1.30±0.09),(1.01±0.08) *vs* (1.30±0.06), $P<0.01$];④与A1相比,B2、B3 KLF15 mRNA及其蛋白表达无明显变化。⑤与C1、C2、C3相比,A1、B2、B3心脏脂质沉积增多;与A1相比,B2、B3心脏脂质沉积有所减少,但仍明显高于对照组。**结论** 在心脏超/卸负荷中,KLF15可能对心脏脂质沉积具有负向调节作用,参与了卸负荷后心功能的恢复过程。

[关键词] 超/卸压力负荷;Kruppel样因子15;脂质沉积
[中图法分类号] R-332;R331.31;R589.2 [文献标志码] A

Kruppel-like factor 15 regulates myocardial lipid deposition and cardiac function in rats during pressure overload/unload

Jiao Cailing, Zou Shufan, Jian Zhao, Tang Fuqin, Xiao Yinbing, Chen Lin (Department of Cardiac Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine lipid deposition and cardiac function in pressure overload/unload myocardium in rats through banding and debanding of the ascending aorta through small suprasternal incision. **Methods** Forty-five 5-week-old male SD rats were randomly divided into sham operation group (control group, in 9, 12 and 15 weeks after small suprasternal incision respectively as C1, C2 and C3 groups), ascending aortic banding groups (banding for 9, 12 and 15 weeks respectively as A1, A2 and A3 groups), and ascending aortic banding groups (debanding for 0, 3 and 6 weeks respectively after 9 weeks' banding as B1, B2 and B3 groups), and there were 5 animals in each group. Animal ultrasonography was used to evaluate the cardiac function in each group. The expression of Kruppel-like factor 15 (KLF15) at mRNA and protein levels was detected by PCR and Western blotting respectively. Lipid staining was employed to measure the lipid deposition in the myocardium during pressure overload/unload. **Results** Compared with

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170216)
[通信作者] 陈 林,电话:(023)68774107,E-mail:chenlin_xwk@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150715.1033.003.html(2015-07-15)

the control group, the cardiac function was decreased with the increase of banding time, and the ejection fraction (EF%) was significantly lower in the A1, A2 and A3 groups than the C1, C2 and C3 groups (54.32 ± 3.88 *vs* 85.32 ± 3.90, 47.91 ± 3.64 *vs* 85.45 ± 4.26, 40.08 ± 4.45 *vs* 82.83 ± 4.93, $P<0.01$), and it was also decreased in the B1, B2 and B3 groups (53.78 ± 3.58, 63.28 ± 5.81 and 63.59 ± 6.48, $P<0.05$). Compared to the A1 group, the EF% was significant increased in the B2 and B3 (both $P<0.05$). The mRNA and protein levels of KLF15 were significant decreased in the A1, B2 and B3 groups than the C1, C2 and C3 groups (mRNA: 0.66 ± 0.09 *vs* 1.76 ± 0.07, 0.52 ± 0.07 *vs* 1.78 ± 0.12, 0.51 ± 0.04 *vs* 1.70 ± 0.13; Protein: 0.99 ± 0.05 *vs* 1.25 ± 0.04, 0.96 ± 0.05 *vs* 1.30 ± 0.09, 1.01 ± 0.08 *vs* 1.30 ± 0.06, all $P<0.01$). But there were no statistical differences in the levels in the A1 group with the B2 and B3 groups. Myocardial lipid deposition was higher in the A1, B2 and B3 groups than the C1, C2 and C3 groups, and its was decreased in the B2 and B3 than the A1 group, but still higher than the control group. **Conclusion** During cardiac pressure overload/unload, KLF15 may play negative regulative role in the lipid deposition in the heart, and is involved in cardiac function recovery after unloading.

[**Key words**] pressure overload/unload; lipid deposition; Kruppel-like factors 15

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170216). Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68774107, E-mail: chenlin_xwk@yahoo.com

风湿性主动脉瓣狭窄是临床常见的导致左心室超负荷的疾病,左心室肥厚是心脏对压力超负荷的适应性反应[1],通过手术行主动脉瓣膜置换术典型的卸负荷过程。但在临床实践过程中,通过手术解除心室负荷并不能使所有患者心功能得到有效的改善[2]。前期研究发现,Kruppel 样因子 15(kruppel-like factor 15, KLF15)可以调节糖异生[3],调节骨骼肌脂质运用[4],协调生理体内氮平衡[5],心脏脂质代谢的一个重要调节器[6],联系内质网应激和胰岛素抵抗[7],KLF15 缺乏对心力衰竭和动脉瘤形成也有密切关系[8]。

心脏在胎儿时期主要是以糖代谢为主,在成人时期以脂质代谢为主,前期研究发现心力衰竭的患者心脏脂质代谢降低,糖代谢增强,出现"胎儿样"模式心脏能量代谢的变化[9]。前期研究发现脂质在心肌组织中蓄积可以产生毒性作用,从而影响心脏功能[10]。本研究结合前期研究,建立大鼠主动脉瓣上缩窄-松解模型[11],探寻心脏慢性压力超/卸负荷后心脏脂质代谢变化,探讨 KLF15 对心脏脂质代谢变化的调节作用,为临床上左心室超负荷疾病患者术后提供一种新的辅助治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 5 周龄雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 150 ~ 200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,第三军医大学新桥医院实验动物中心喂养,金属棍(直径为 1.4 mm),4-0 prolene 线,小动物超声机(VEVO 2100 Imaging system),Rabbit anti-KLF15 购自 Abcam 公司,KLF15 引物序列 Abcam 公司合成,PMSF 蛋白酶抑制剂、蛋白上样缓冲液 SDS-PAGE 均购自碧云天,三溴乙醇 SIGMA-ALDRICH 等试剂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 A1:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 9 周后行心脏彩超并处死大鼠取心脏。A2:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 12 周后行心脏彩超并处死大鼠取心脏;A3:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 15 周后行心脏彩超并处死大鼠取心脏。B1:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 9 周后去缩窄当天行心脏彩超并处死大鼠取心脏;B2:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 9 周去缩窄 3 周后行心脏彩超并处死大鼠取心脏;B3:SD 大鼠行升主动脉缩窄术 9 周去缩窄 6 周后行心脏彩超并处死大鼠取心脏。C1:SD 大鼠只开胸,游离升主动脉不缩窄处理后又关闭胸腔,饲养 9 周后行心脏彩超并处死取心脏;C2:SD 大鼠只开胸,游离升主动脉不缩窄处理后又关闭胸腔,饲养 12 周后行心脏彩超并处死取心脏;C3:SD大鼠只开胸,游离升主动脉不缩窄处理后又关闭胸腔,饲养 15 周后行心脏彩超并处死取心脏。

1.2.2 大鼠非人工通气下主动脉瓣上缩窄-松解模型制备 大鼠非人工通气下胸骨上小切口主动脉瓣上缩窄术参照本课题组的方法制备[11];去缩窄术手术路径与缩窄术相同,剪开胸骨后仔细寻找结扎线头,并从线头追踪升主动脉结扎部位,用眼科剪剪掉结扎线,即可完成松解。松解后仔细检查升主动脉周围组织,确认对其无粘连压迫后,分层关闭切口。

1.2.3 超声心动图检查 采用小动物超声机(VEVO 2100 Imaging system),选用探头频率 21 MHz,于升主动脉缩窄 9 周后筛选合格左室超负荷模型以及去缩窄 3、6 周后各组通过 M 型超声测量以下数据:射

血分数(EF)、收缩分数(FS)[12-13]。

1.2.4　心肌 KLF15 mRNA 表达水平测定　　根据 TRIzol 试剂(TaKaRa)提取心肌组织总 RNA,按照反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 反应试剂盒说明书操作步骤,获得 cDNA 产物,并进行实时荧光定量 PCR 反应,β-actin 为内参。KLF15 上游引物:5′-CACCAAAAGCAGCCACCTC-3′,下游引物:5′-CTTCTCGCACAGGACAC-3′;β-actin 上游引物:5′-TGGAGCAAACATCCCCCAAA-3′,下游引物:5′-TGCCGTGGATACTTGGAGTG-3′。RT-PCR 检测反应系统根据 TaKaRa 公司 RNA PCR Kit(AMV)Ver 3.0 说明步骤操作进行。

1.2.5　Western blot 检测　　KLF15 在心脏中的表达取适量冻存心肌组织,经液氮研磨后,提取组织蛋白,测定蛋白含量,并统一稀释后加入 SDS-PAGE 上样缓冲液置沸水中煮 8 min,室温冷却后,4 ℃冰箱保存备用;制备 5% 浓缩胶及 10% 分离胶,加人蛋白样品,上样量为 50 μg,电泳分离蛋白质后,转印蛋白于硝酸纤维素膜;载有蛋白的硝酸纤维素膜经 5% 脱脂牛奶封闭后,加入 KLF15(1∶800)一抗 4 ℃过夜,经 TBST 换洗 3 次后,加入(1∶15 000)稀释的二抗,室温孵育 90 min,TBST 换洗 3 次,ECL 发光剂显影,Quantity One 软件分析计算 KLF15/GAPDH 灰度比值。

1.2.6　心肌脂质染色　　心脏经冷冻(−20 ℃)处理后石蜡包埋切片,行油红 O 染色,用显微图像采集系统(Leica DMIRB)观察并采图。

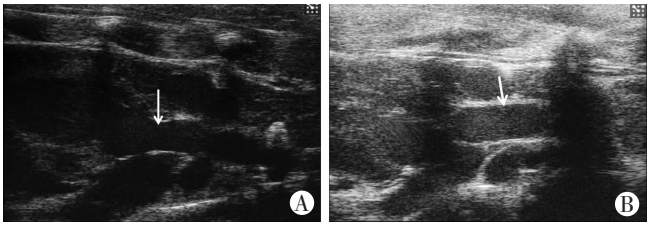
1.3　统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均应用 SPSS 13.0 进行统计学分析,各组采用单因素方差法进行数据分析。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结果

2.1　手术情况

非人工通气下主动脉瓣上缩窄术中死亡 4 只大鼠;去缩窄术中死亡 2 只。卸负荷当天、3、6 周组及假手术组各剩余 5 只,超声心动图可见大鼠升主动脉瓣上缩窄术后明显缩窄;而卸负荷后缩窄部位消失(图 1)。

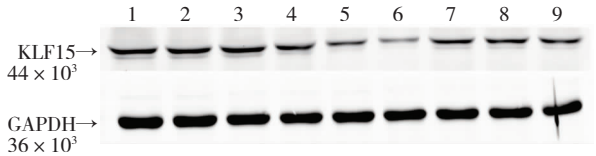


A:大鼠升主动脉缩窄部位　↑:示缩窄部位;B:卸负荷大鼠升主动脉缩窄部位消失　↑:示去缩窄部位

图 1　超-卸负荷大鼠心脏超声心动图表现

2.2　各组大鼠 M 型超声心动图检查

升主动脉缩窄 9 周后 M 型超声心动图显示:与假手术组相比(表 1),随着缩窄时间的延长,心功能(EF、FS)越来越低($P < 0.01$)。与假手术组相比,卸负荷组心功能明显降低($P < 0.05$)。与超负荷组 9 周相比,卸负荷 3 周组与卸负荷 6 周组心功能有所恢复,并具有统计学差异($P < 0.05$)。卸负荷 3 周组与卸负荷 6 周组比较没有统计学差异($n = 5$)。结果见图 2。



1~3:假手术 9、12、15 周组;4~6:压力超负荷 9、12、15 周组;7~9:卸负荷 0、3、6 周组

图 2　Western blot 检测各组大鼠心肌 KLF15 的表达

2.3　大鼠心肌 KLF15 mRNA 表达

压力超负荷组心肌 KLF15 mRNA 表达显著低于假手术组($P < 0.05$),而压力卸负荷组与压力超负荷 9 周组比较无显著性差异($P > 0.05$,表 2)。

2.4　大鼠心肌 KLF15 蛋白表达变化

与假手术组相比,压力超负荷组 KLF15 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与假手术组相比,卸负荷组 KLF15 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与压力超负荷 9 周组相比,卸负荷 3 周组及卸负荷 6 周组 KLF15 蛋白表达无明显变化($n = 5$)。结果见图 2。

表 1　各组大鼠心脏超声检查指标比较($n = 5, \bar{x} \pm s$)

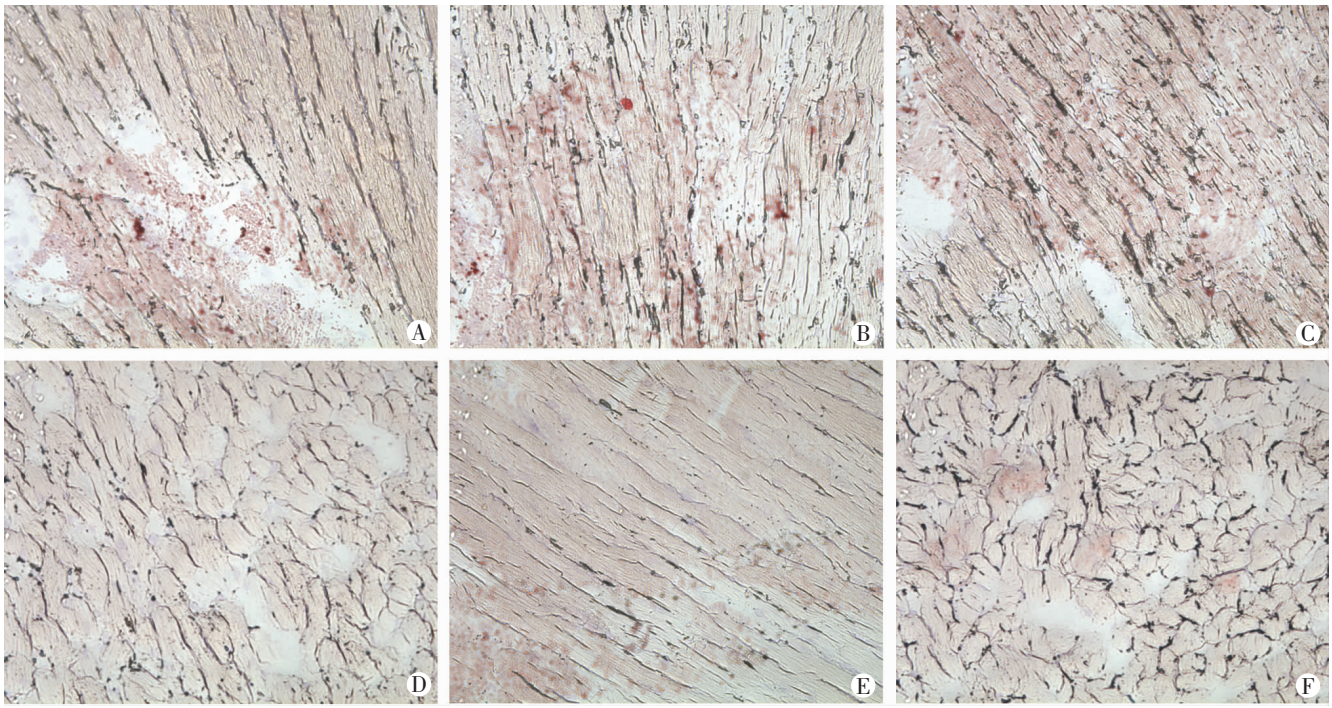
心功能	假手术组			压力超负荷组			卸负荷组		
	9 周	12 周	15 周	9 周	12 周	15 周	0 周	3 周	6 周
射血分数(EF%)	85.32 ± 3.90	85.45 ± 4.26	82.83 ± 4.93	54.32 ± 3.88[a]	47.91 ± 3.64[b]	40.08 ± 4.45[c]	53.78 ± 3.58	63.28 ± 5.81[bd]	63.59 ± 6.48[cd]
收缩分数(FS%)	55.63 ± 4.53	56.69 ± 4.72	52.94 ± 5.16	28.43 ± 3.89[a]	23.05 ± 3.55[b]	16.66 ± 3.21[c]	27.30 ± 3.05	36.38 ± 5.33[bd]	37.19 ± 5.79[cd]

a:$P < 0.05$,与假手术 9 周组比较;b:$P < 0.05$,与假手术 12 周组比较;c:$P < 0.05$,与假手术 15 周组比较;d:$P < 0.05$,与压力超负荷 9 周组比较

表2 RT-PCR检测各组大鼠心肌KLF15 mRNA的表达（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

	假手术组			压力超负荷组			卸负荷组		
	9周	12周	15周	9周	12周	15周	0周	3周	6周
PCR测mRNA（KLF15/β-actin）	1.76±0.07	1.78±0.12	1.70±0.13	0.66±0.09[a]	0.31±0.01[b]	0.20±0.09[c]	0.54±0.08[a]	0.52±0.07[b]	0.51±0.04[c]
Westem blot测蛋白含量（KLF15/GAPDH）	1.25±0.04	1.30±0.09	1.30±0.06	0.99±0.05[a]	0.64±0.15[b]	0.33±0.07[c]	0.97±0.05[a]	0.96±0.05[b]	1.01±0.08[c]

a：$P<0.01$，与假手术9周组比较；b：$P<0.01$，与假手术12周组比较；c：$P<0.01$，与假手术15周组比较



A：超负荷9周组；B：超负荷12周组；C：超负荷15周组；D：假手术组；E：卸负荷3周组；F：卸负荷6周组

图3 各组大鼠心肌组织病理学变化（油红O ×800）

2.5 心肌脂质染色观察

油红O染色可见，与假手术组相比，随着压力超负荷时间越长，心肌组织中脂质（红色区域）沉积越多，与压力超负荷9周组相比，卸负荷3周组中心肌脂质沉积有所减少，但是仍比假手术组脂质沉积更多。结果见图3。

3 讨论

风湿性主动脉瓣狭窄是临床常见的导致左心室超负荷的疾病，通过手术行主动脉瓣膜置换术典型的卸负荷过程。本实验基于临床实践过程中手术解除心室负荷并不能使所有患者心功能得到有效恢复的现象。在前期研究基础上，探讨是否心肌本身代谢变化影响了心功能的有效恢复。

我们建立大鼠非人工通气下升主动脉瓣上缩窄-松解模型，该模型有效的模拟了临床上主动脉瓣置换术前后的左室超负荷、卸负荷过程，研究表明升主动脉缩窄6周可致大鼠左心室肥厚[11]。在左室超负荷模型的建立过程中，大鼠死亡4只，其中3只死于气胸，1只死于出血过多。去缩窄过程中大鼠死亡2只，其中1只死于气胸，1只死于出血过多。由于大鼠胸骨较窄，剪开过程中极易发生偏移，损伤胸膜，因此气胸为缩窄过程中的主要死因。去缩窄因二次手术，新生毛细血管密集，正常解剖结构不清晰，因而出血过多为主要死因。

本实验通过动物超声心动图发现：与假手术组相比，升主动脉瓣上压力超负荷9周开始心功能明显降低（$P<0.05$）。与压力超负荷9周组相比，卸负荷3、6周后心功能有所恢复（$P<0.05$）。但是与假手术组相比，卸负荷组心功能恢复不良。

锌指蛋白转录因子（kruppel-like factors，KLFs）家族，是真核生物中存在的一类调控基因转录的结合蛋

白,它高度保守的羧基末端含3个串联的Cys2His2型锌指结构,用于特异性结合富含GC盒(即CACCC盒)的靶分子启动子的DNA及RNA序列,进而调控基因表达,影响细胞增殖、分化及胚胎发育。KLF15是Kruppel样因子家族中的一员,研究显示,KLF15能够调节脂肪细胞中过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR-γ)和葡萄糖转运蛋白4的表达,是参与糖尿病发生机制的重要物质[14]。KLF15可以通过TGF-介导的p38MAPK路径抑制心肌肥大[15]和调节结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的表达而抑制心肌纤维化的发生[16-17]在肥胖小鼠的脂肪组织中KLF15表达下调;在KLF15转基因的小鼠体内,KLF15通过下调白色脂肪组织中硬脂酰CoA去饱和酶-1(SCD-1)的表达从而增强胰岛素分泌,改善葡萄糖耐量,并且下调氧化性应激水平[18]。KLF15对葡萄糖稳态[3]和脂肪细胞分化[14]都有着重要的作用。前期研究发现KLF15可以通过结合P300促进脂质运用[6],卸负荷后KLF15仍然处于低表达状态,心肌细胞中脂质沉积也没有因为去缩窄后而明显减少,这与心脏功能恢复一致,推测主动脉瓣上缩窄-松解后KLF15的持续低表达,致使脂质在心肌中沉积,产生毒性作用有关。因此,主动脉瓣狭窄置换术后给予KLF15激动剂使KLF15水平升高,促进脂质氧化而提供心脏能量可能有利于心功能恢复。

参考文献:

[1] Bernardo B C, Weeks K L, Pretorius L, *et al*. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies[J]. Pharmacol Ther, 2010, 128(1): 191-227.

[2] Xu R, Lin F, Zhang S, *et al*. Signal pathways involved in reverse remodeling of the hypertrophic rat heart after pressure unloading[J]. Int J Cardiol, 2010, 143(3): 414-423.

[3] Gray S, Wang B, Orihuela Y, *et al*. Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15[J]. Cell Metab, 2007, 5(4): 305-312.

[4] Haldar S M, Jeyaraj D, Anand P, *et al*. Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(17): 6739-6744.

[5] Jeyaraj D, Scheer F A, Ripperger J A, *et al*. Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis[J]. Cell Metab, 2012, 15(3): 311-323.

[6] Prosdocimo D A, Anand P, Liao X, *et al*. Kruppel-like factor 15 is a critical regulator of cardiac lipid metabolism[J]. J Biol Chem, 2014, 289(9): 5914-5924.

[7] Jung D Y, Chalasani U, Pan N, *et al*. KLF15 is a molecular link between endoplasmic reticulum stress and insulin resistance[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77851.

[8] Haldar S M, Lu Y, Jeyaraj D, *et al*. Klf15 deficiency is a molecular link between heart failure and aortic aneurysm formation[J]. Sci Transl Med, 2010, 2(26): 26ra26.

[9] Razeghi P, Young M E, Alcorn J L, *et al*. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart[J]. Circulation, 2001, 104(24): 2923-2931.

[10] Goldberg I J, Trent C M, Schulze P C. Lipid metabolism and toxicity in the heart[J]. Cell Metab, 2012, 15(6): 805-812.

[11] 马杰, 余杨, 蹇召, 等. 胸骨上小切口大鼠主动脉瓣上缩窄模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(5): 1147-1149.

[12] Nakamura A, Rokosh D G, Paccanaro M, *et al*. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(3): H1104-H1112.

[13] Gullace G, Demicheli G, Monte I, *et al*. Reclassification of echocardiography according to the appropriateness of use, function- and competence-based profiles and application[J]. J Cardiovasc Echograph, 2012, 22(3): 91-98.

[14] Gray S, Feinberg M W, Hull S, *et al*. The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 34322-34328.

[15] Fisch S, Gray S, Heymans S, *et al*. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(17): 7074-7079.

[16] Wang B, Haldar S M, Lu Y, *et al*. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(2): 193-197.

[17] 余杨, 邹书帆, 马杰, 等. KLF15基因对心肌纤维化的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(14): 1448-1453.

[18] Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, *et al*. Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion[J]. J Biol Chem, 2011, 286(43): 37458-37469.

(**收稿**:2015-01-17;**修回**:2015-02-17)

(编辑 栾 嘉)