

• 论 著 •

# Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在 TNF- $\alpha$ 诱导的心肌细胞损伤和凋亡中的作用研究\*

刘 熔, 崔彦杰, 宋金萍<sup>△</sup>

新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心, 新疆乌鲁木齐 830001

**摘要:**目的 建立心肌细胞炎症损伤模型, 探讨 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在心肌细胞损伤和凋亡中的作用。方法 体外培养大鼠心肌细胞 H9c2, 用含肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的细胞培养基诱导心肌细胞, 建立炎症心肌细胞损伤模型。实验包括对照组、炎症组、DDK1 不同浓度阻断组共 5 组。各组检测细胞活力和凋亡率, 检测相关基因和蛋白表达; 检测细胞培养液中 LDH 和 AST 及细胞中 SOD 浓度。结果 TNF- $\alpha$  诱导 H9c2 心肌细胞  $\beta$ -catenin、TCF7L2 和 CyclinD1 基因和蛋白表达显著上调, 细胞增殖受到抑制、细胞损伤和凋亡增加( $P < 0.05$ )。而在 DDK1 阻断 Wnt 通路后, 相对于炎症组,  $\beta$ -catenin、TCF7L2 和 CyclinD1 基因和蛋白表达显著下调, 细胞活力上升、细胞损伤减轻、凋亡率降低( $P < 0.05$ )。相关性分析显示,  $\beta$ -catenin 基因表达与细胞活力呈负相关, 与 LDH、AST 活性呈正相关( $P < 0.05$ )。结论 在 TNF- $\alpha$  刺激下, 心肌细胞 Wnt 通路被显著激活, 抑制 Wnt 通路基因表达可减轻细胞损伤和凋亡。

**关键词:**炎症; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 心肌细胞; 细胞凋亡

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2023.08.005

**中图法分类号:**R36

**文章编号:**1673-4130(2023)08-0920-07

**文献标志码:**A

## Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in TNF- $\alpha$ -induced cardiomyocyte injury and apoptosis\*

LIU Rong, CUI Yanjie, SONG Jinping<sup>△</sup>

Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in inflammation-induced myocardial cell injury and apoptosis. **Methods** The rat cardiomyocytes H9c2 were cultured in vitro, and the cardiomyocytes were induced with the cell culture medium containing tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) to establish inflammatory model. The experiment included 5 groups: control group, inflammation group, and DDK1 blockade group with different concentrations. Cell viability and apoptosis rate were determined by CCK8 assay and flow cytometry, the expressions of  $\beta$ -catenin, TCF7L2, c-Myc and CyclinD1 were detected by RT-PCR, and the expressions of  $\beta$ -catenin, TCF7L2 and CyclinD1 were detected by Western blotting. The activities of LDH and AST in the cell culture medium and the concentration of SOD in the cell were detected with kits. **Results** The gene and protein expressions of  $\beta$ -catenin, TCF7L2 and CyclinD1 were significantly up-regulated, cell proliferation was inhibited, cell injury and apoptosis increased in H9C2 cardiomyocytes induced by TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). After DDK1 blocked the Wnt pathway, compared with the inflammatory group, the expression of Wnt pathway-related genes and proteins was significantly down-regulated and cell viability increased, cell injury alleviated and apoptosis rate decreased ( $P < 0.05$ ). Correlation analysis showed that  $\beta$ -catenin gene expression was negatively correlated with cell viability and positively correlated with LDH and AST activities ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Wnt pathway in cardiomyocytes is significantly activated by TNF- $\alpha$ , inhibition of gene expression of Wnt pathway could alleviate cell injury and apoptosis.

**Key words:**inflammation; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; cardiomyocytes; apoptosis

\* 基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院院内基金项目(20190416)。

作者简介:刘熔,女,副主任技师,主要从事心血管疾病预防研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:18999898689@163.com。

糖尿病心肌病(DCM)定义为在没有其他心血管因素的情况下,如冠状动脉疾病、高血压、先天性和瓣膜性心脏病发生的心肌结构和功能异常,是糖尿病的主要并发症之一<sup>[1]</sup>。糖尿病是一种低度炎症性疾病,患者普遍存在微炎症状态<sup>[2]</sup>。胰岛素抵抗、能量代谢异常、微血管病变、细胞凋亡等均与慢性炎症的发生关系密切<sup>[3]</sup>。基础和临床试验则证实,糖尿病心肌组织和血清中炎症因子[白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]异常高表达<sup>[4-5]</sup>,并导致心肌细胞损伤和凋亡<sup>[6-7]</sup>。近年的研究也认为,DCM主要是由多种炎症因子参与引起的心脏慢性损伤性疾病,炎症是 DCM 发生发展中的一个关键环节<sup>[8]</sup>。

已有研究证实,糖尿病大鼠心肌 Wnt/ $\beta$ -catenin/TCF7L2 被过度激活,可促进心肌损伤和凋亡<sup>[9]</sup>。但是炎症因子诱导的心肌细胞损伤中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活机制及其对心肌细胞损伤和凋亡的影响却鲜见报道。本课题建立心肌细胞炎症损伤模型,探讨炎症对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活机制,探索心肌细胞凋亡和功能异常的病理机制,为筛选 DCM 的治疗靶点提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料来源及分组** H9c2 大鼠心肌细胞来源于雅吉生物公司,细胞培养条件为 DMEM(高糖)培养基+10%FBS+1%PS,37 °C,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度,生长至对数期用于实验。取生长状态良好汇合率达 90%的细胞消化传代。

实验分为 5 组,(1)对照组:H9c2 细胞培养基葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L 常规培养 24 h;(2)TNF- $\alpha$  组:H9c2 细胞使用 20 ng/mL TNF- $\alpha$  干预 24 h;(3)TNF- $\alpha$ +DKK1 A 组:H9c2 细胞给予 20 g/L TNF- $\alpha$  处理,同时添加 10 ng/mL DKK-1;(4)TNF- $\alpha$ +DKK1 B 组:H9c2 细胞给予 20 g/L TNF- $\alpha$  处理,同时添加 50 ng/mL DKK-1;(5)TNF- $\alpha$ +DKK1 C 组:H9c2 细胞给予 20 g/L TNF- $\alpha$  处理,同时添加 100 ng/mL DKK-1,共同干预 24 h。

**1.2 仪器与试剂** DMEM(高糖,货号:11965092)培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清(FBS,货号:FND500)购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司,青霉素-链霉素双抗(10 000 U,货号:15070-063)和胰酶(0.25% Trypsin-EDTA,货号:25200-056)购自美国 GIBCO 公司;CCK-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒(货号:FC101-03)购自北京全式金生物公司;TRIzol<sup>TM</sup> Reagent(货号:15596026)购自美国 Ambion 公司;反转录试剂盒 5 $\times$ All-In-One RT MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit,货号:G492)和基

因扩增试剂盒 EvaGreen Express 2 $\times$ qPCR Master-Mix-Low Rox(货号:MasterMix-LR)购自美国 Abcam 公司;Annexin V PE/7AAD Kit(货号:559763)购自美国 BD 公司;重组 Anti- $\beta$ -Catenin 抗体(货号:8480S)、AntiHistone H3 (D1H2) 抗体(货号:4499S)、重组 Anti-Cyclin D1 抗体(货号:2978s)购自美国 CST 公司;Anti-TCF-4/TCF7L2 抗体(货号:MA5-32240)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;二抗山羊抗兔 IgG H&L (HRP,货号:ab205718)、山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP,货号:ab205719)、重组大鼠 TNF- $\alpha$  蛋白(货号:ab229366)购自美国 Abcam 公司;核和胞浆蛋白提取试剂盒(货号:20929)购自北京全式金生物公司;重组大鼠 Dkk-1 蛋白(货号:4010-DK-010)购自美国 R&D 公司;乳酸脱氢酶(LDH,货号:C010-2-1)、超氧化物歧化酶(SOD,货号:A001-3)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST,货号:A020-2-1)购自南京建成;Easy II Protein Quantitative Kit (BCA,货号:DQ111-01)购自北京全式金生物公司。Real-Time PCR 仪(型号:ABI 7500 Fast)购自美国 ABI 公司;酶标仪(型号:xMark<sup>TM</sup>)购自美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪(型号:LSRFortessa)购自美国 BD 公司;凝胶成像系统(型号:2500)购自上海天能公司;化学发光成像仪系统(型号:Chemiscope 3000)购自上海勤翔科学仪器有限公司。

**1.3 CCK-8 检测细胞增殖** 取生长状态良好汇合率达 90%的 H9c2 细胞,胰酶消化细胞后,用完全培养基制备成 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/毫升单细胞悬液,接种至 96 孔板中(100 微升/孔,即 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 贴壁后,弃去培养基,按照实验分组进行干预。干预完成后,弃去培养基,每孔加入 100  $\mu$ L 配置好的 10% CCK-8 溶液,继续在培养箱中孵育,1 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,实验重复 5 次。

**1.4 细胞凋亡检测** 将每组细胞瓶内的培养液吸出至离心管内(内含已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞);PBS 洗涤贴壁细胞两次,将 PBS 液一并收集至离心管内;胰酶消化细胞,将细胞转移到离心管内,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用预冷的 PBS 洗涤 2 遍,弃干净上清。加入 500  $\mu$ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞,过 200 目筛网,制成单细胞悬液。每管加入 5  $\mu$ L Annexin V-PE 和 10  $\mu$ L 7-AAD,轻轻混匀,4 °C 避光放置 10 min。在 30 min 内用流式细胞仪检测。

**1.5 细胞损伤指标检测** 各组干预实验完成后,收集细胞培养液,用试剂盒测定 LDH 和 AST 活性。同时收集细胞,行 SOD 测定。

**1.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测**

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因表达水平 弃去每组细胞瓶中的培养基,按 Trizol 试剂盒提取程序提取细胞 RNA。核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度,琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。采用反转录试剂盒进行 cDNA 合成,25 °C 反应 10 min,85 °C 反应 5 s,合成的 cDNA 用于后续实验。以 cDNA 为模板,使用扩增试剂,采用 20  $\mu$ L 的反应体系,使用 ABI 7500 基因扩增仪,进行 qRT-PCR,每孔设置 3 个复孔。反应条件:预变性 95 °C,10min,变性 95 °C 5 s,退火和延伸 60 °C 30 s,循环 40 次。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算  $\beta$ -catenin、TCF7L2、Caspase-3、c-Myc、CyclinD1 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
hsa GAPDH_F	TGTTGCCATCAATGACCCCTT
hsa GAPDH_R	CTCCACGACGTA CTACTCAGCG
CTNNB1_F	CATCTACACAGTTTGATGCTGCT
CTNNB1_R	GCAGTTTTGTCAGTTCAGGGA
TCF7L2_F	GAAGGAGCGACAGCTTCATA
TCF7L2_R	GGGGGAGGCGAATCTAGTAA
Caspase-3_F	GAAATTGTGGAATTGATGCGTGA
Caspase-3_R	CTACAACGATCCCCTCTGAAAAA
c-Myc_F	GTCAAGAGGCGAACACACAAC
c-Myc_R	TTGGACGGACAGGATGTATGC
CCND1_F	GGAGGAGGGTTGTGCTACAG
CCND1_R	GCCTAGAACCCCACTACAGC

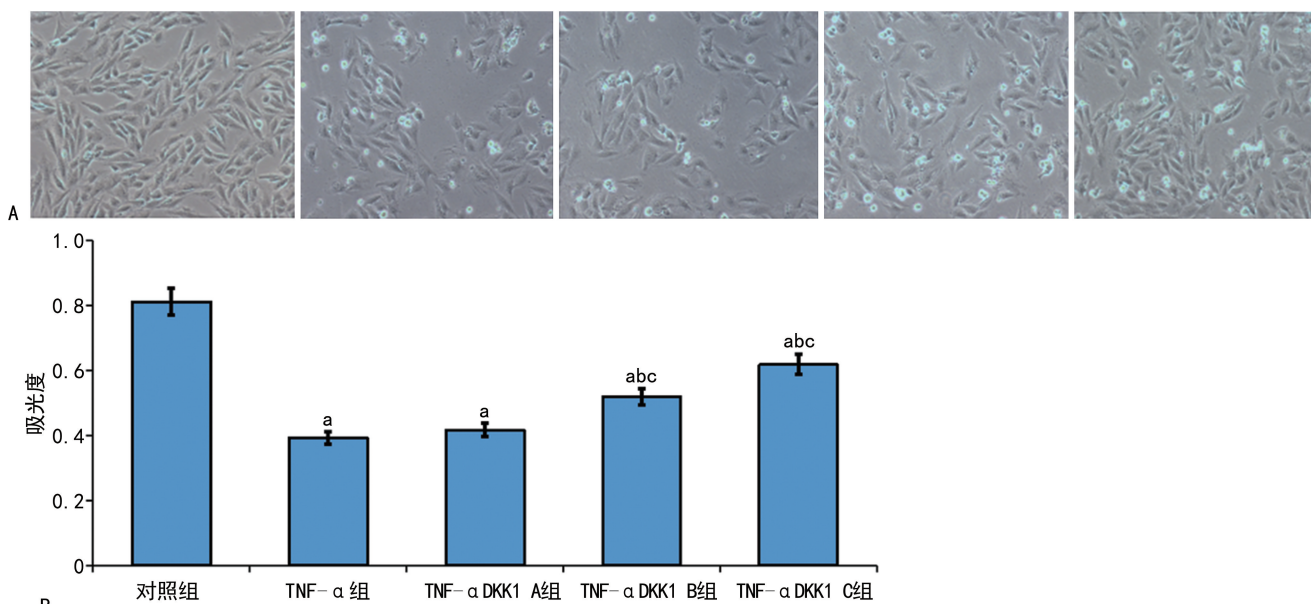
1.7 Western blot 检测 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平 干预细胞后,使用全式金核和胞浆蛋白提取试剂盒,分别提取得到胞浆蛋白和核蛋白。使用全式金蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。25  $\mu$ g 蛋白样品用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。PBS 缓冲液清洗膜 3 次,将膜与  $\beta$ -catenin、TCF7L2、CyclinD1 抗体孵育过夜。室温下与二抗孵育 2 h,加入显色液,进行检测。

1.8 统计学处理 实验数据采用 SPSS19.0 进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析;Pearson 相关性分析基因相对表达量与细胞活力、凋亡率、细胞损伤指标的相关性。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞活力的影响 CCK-8 检测结果显示,与对照组相比,TNF- $\alpha$  组细胞增殖受到明显抑制,细胞活力降低( $P < 0.05$ )。结果发现,添加 DDK1 后,细胞增殖抑制缓解,且随 DDK1 水平的增加,细胞活力上升。TNF- $\alpha$  组相比,DDK1 水平为 10 ng/mL 时,细胞活力差异无统计学意义( $P > 0.05$ );DDK1 水平为 50 ng/mL 和 100 ng/mL 时,细胞活力显著升高( $P < 0.05$ )。但与对照组相比,添加 DDK1 后细胞增殖抑制无法完全缓解( $P < 0.05$ ),结果见图 1。

对照组 TNF- $\alpha$  组 TNF- $\alpha$  DDK1 A组 TNF- $\alpha$  DDK1 B组 TNF- $\alpha$  DDK1 C组



注:A为细胞增殖图(100 $\times$ );B为 CCK-8 检测细胞活力;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ +DDK1 A 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞活力的影响

**2.2 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞损伤的影响** 结果显示,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可减轻心肌细胞的损伤程度,且呈 DDK1 水平依赖性,结果见表 2。

**2.3 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞凋亡的影响** 为了探讨 Wnt/ $\beta$ -catenin 在炎症环境下对 H9c2 细胞的凋亡的影响,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。结果显示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号抑制剂 DKK1 可降低炎症诱导的心肌细胞的凋亡,且随 DDK1 水平

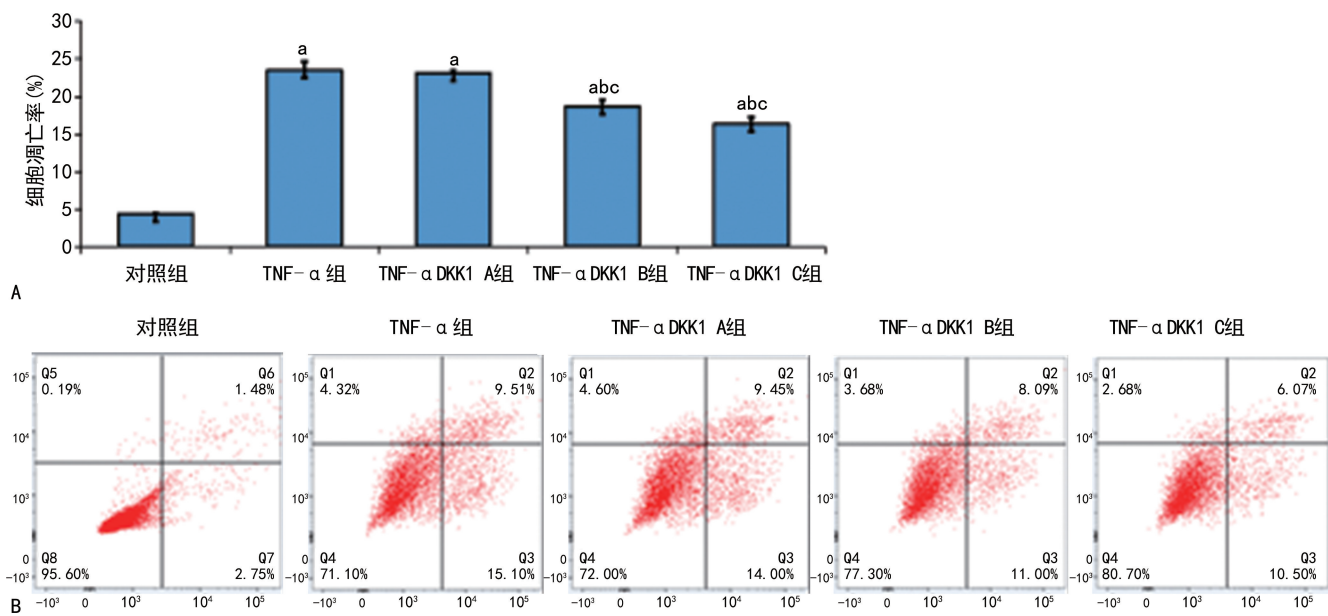
的增加,凋亡率下降( $P < 0.05$ ),结果见图 2。

**2.4 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的基因表达的影响** 结果显示,TNF- $\alpha$  诱导后,心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关基因 ( $\beta$ -catenin、TCF7L2、c-Myc、CyclinD1、Caspase-3)显著激活,表达上调( $P < 0.05$ )。Wnt 通路抑制剂和 TNF- $\alpha$  共同干预后,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路受到显著抑制,且随着抑制剂 DKK1 水平的增加,信号通路相关基因的下调更加显著。结果见图 3。

表 2 炎症条件下抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对细胞损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LDH(U/L)	AST(U/L)	SOD(U/mgprot)
对照组	3	155.734 $\pm$ 24.557	17.014 $\pm$ 2.978	19.742 $\pm$ 2.848
TNF- $\alpha$ 组	3	374.400 $\pm$ 48.096 <sup>a</sup>	50.153 $\pm$ 7.170 <sup>a</sup>	9.381 $\pm$ 1.402 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ +DDK1 A 组	3	357.445 $\pm$ 30.198 <sup>ab</sup>	46.601 $\pm$ 7.159 <sup>ab</sup>	9.671 $\pm$ 1.882 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ +DDK1 B 组	3	341.225 $\pm$ 27.872 <sup>abc</sup>	41.209 $\pm$ 4.545 <sup>abc</sup>	10.237 $\pm$ 2.076 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ +DDK1 C 组	3	322.133 $\pm$ 31.121 <sup>abc</sup>	34.804 $\pm$ 8.392 <sup>abc</sup>	11.710 $\pm$ 1.394 <sup>abc</sup>
F		50.348	31.568	36.877
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ +DDK1 A 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



注:A 为流式细胞仪检测细胞凋亡;B 为细胞凋亡图;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$  比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ +DDK1 A 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

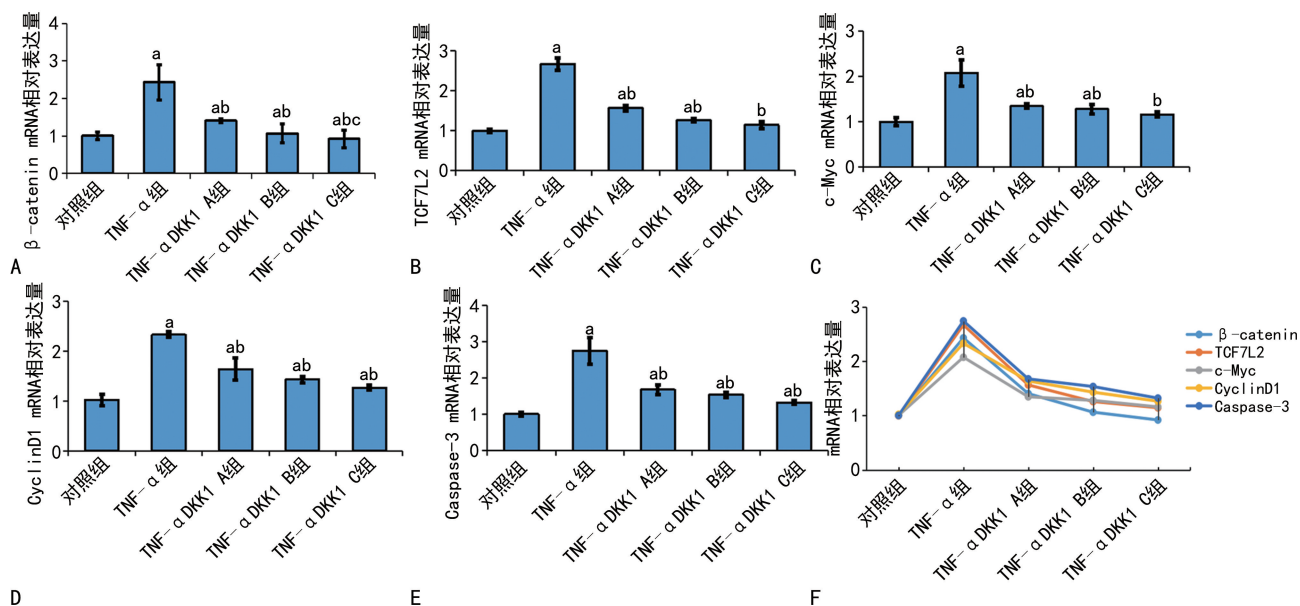
图 2 炎症条件下抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对心肌细胞凋亡的影响

**2.5 TNF- $\alpha$  和 DDK1 体外干预对心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键基因蛋白表达的影响** 结果显示,Wnt 通路在炎症刺激下被激活,相较于对照组, $\beta$ -catenin、TCF7L2、CyclinD1 的蛋白表达量显著上调( $P < 0.05$ )。而被 Wnt 通路抑制剂 DKK1 干预后, $\beta$ -catenin、TCF7L2、CyclinD1 的表达被抑制,相比于炎症组,其蛋白表达量显著下调( $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.6 心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因表达与细胞损伤和凋亡的相关性分析** 实验结果表明,在 TNF- $\alpha$  刺激后,心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关基因 TCF7L2、 $\beta$ -catenin、c-Myc、CyclinD1、Caspase-3 mRNA 表达显著上调( $P < 0.05$ ),细胞活力显著下降,细胞损伤和凋亡率显著上升( $P < 0.05$ )。结果显示,Wnt 通路与细胞活力及 LDH、AST 密切相

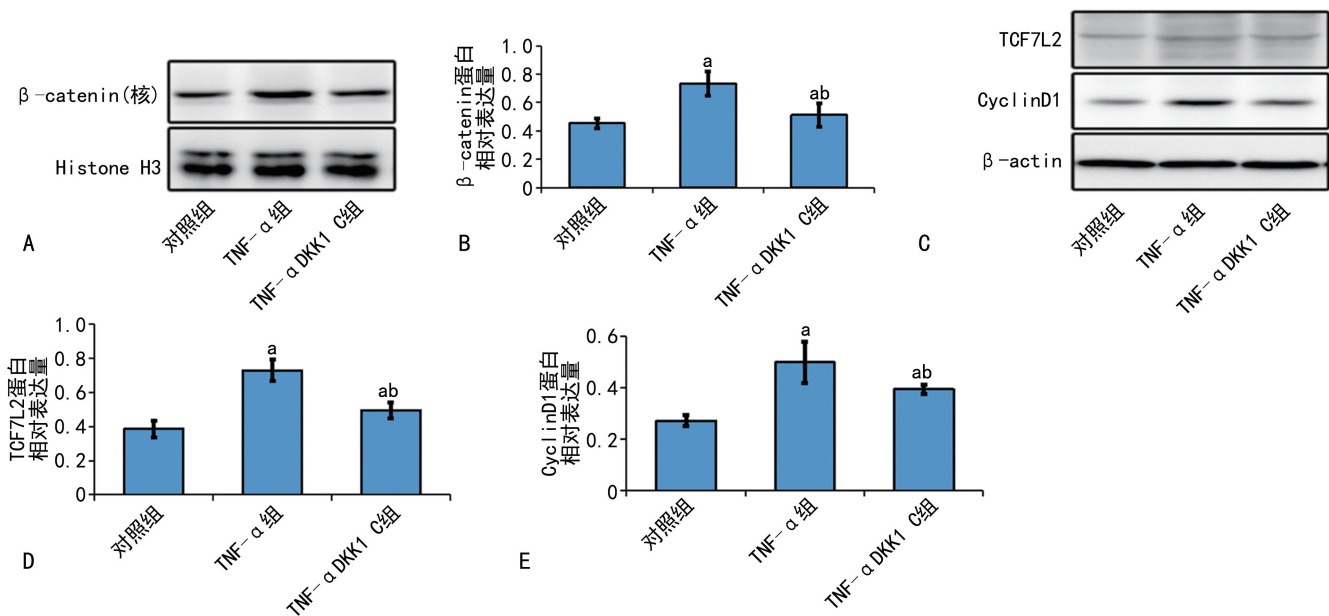
关。其中,有 3 个基因 TCF7L2、 $\beta$ -catenin、CyclinD1 的表达与心肌细胞活力呈负相关( $P < 0.05$ )。 $\beta$ -catenin、CyclinD1 的基因表达与 AST 呈正相关( $P <$

0.05)。除了 TCF7L2,其余相关基因均与 LDH 呈正相关( $P < 0.05$ )。见表 3。



注:A~E为各组  $\beta$ -catenin、TCF7L2、c-Myc、CyclinD1、Caspase-3 基因的 mRNA 相对表达量;F为各组  $\beta$ -catenin、TCF7L2、c-Myc、CyclinD1、Caspase-3 mRNA 表达的曲线图;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ +DKK1 A组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 炎症条件下心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因表达的改变



注:A~B为  $\beta$ -catenin 蛋白相对表达量;C~E为 TCF7L2、CyclinD1 蛋白相对表达量;与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 TNF- $\alpha$ 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 炎症条件下心肌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白表达的改变

表 3 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因 mRNA 相对表达量与心肌细胞损伤和凋亡的相关性分析

基因	凋亡率(%)		细胞活力(吸光度)		LDH(U/L)		AST(U/L)		SOD(U/mgprot)	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
$\beta$ -catenin	-0.922	0.078	-0.952	0.048	0.959	0.041	0.958	0.042	-0.753	0.247
TCF7L2	-0.906	0.094	-0.951	0.049	0.948	0.104	0.944	0.154	-0.725	0.275

续表 3 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路基因 mRNA 相对表达量与心肌细胞损伤和凋亡的相关性分析

基因	凋亡率(%)		细胞活力(吸光度)		LDH(U/L)		AST(U/L)		SOD(U/mgprot)	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
c-Myc	-0.855	0.145	-0.906	0.094	0.943	0.050	0.921	0.079	-0.702	0.298
CyclinD1	-0.922	0.078	-0.960	0.040	0.973	0.032	0.968	0.032	-0.785	0.215
Caspase3	-0.875	0.125	-0.924	0.076	0.954	0.046	0.938	0.062	-0.733	0.267

### 3 讨论

糖尿病患者体内促炎因子被激活,导致了全身慢性、低度炎症的发生<sup>[10]</sup>。循环中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等进一步增加糖尿病患者的胰岛素抵抗,并促进巨噬细胞和淋巴细胞在心脏的积累和浸润,直接导致了糖尿病患者心肌组织中炎症的发生,进而加剧心脏损伤<sup>[11]</sup>。

TNF- $\alpha$  以受体介导的方式驱动炎症,是心血管疾病引起心肌损伤的关键炎症因子。张朝华等<sup>[12]</sup>的研究证实,抑制 NF- $\kappa$ B 通路激活可以减轻 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞损伤。ASHMEETHA 等<sup>[13]</sup>的研究发现,在全身炎症模型中 TNF- $\alpha$  可诱导心肌纤维化和心室细胞外基质重塑。本研究也通过体外心肌细胞炎症模型证实,TNF- $\alpha$  处理可导致心肌细胞增殖抑制,细胞活力显著降低,细胞凋亡率显著升高。心肌细胞损伤标志物 LDH、AST 水平升高,SOD 水平降低。这说明 TNF- $\alpha$  可诱导 H9c2 心肌细胞损伤和凋亡。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与许多生理病理过程,如胚胎发生、细胞增殖、迁移和极性、细胞凋亡和器官发生等<sup>[14]</sup>。有研究证实,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在炎症的发生、发展中也发挥重要作用。有研究表明,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以阻断 TNF- $\alpha$  诱导的大鼠关节炎模型中软骨降解<sup>[15]</sup>。有研究还证实,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以靶向修复由神经炎症引起的脑损伤<sup>[16]</sup>。同时有研究证实,糖尿病大鼠心肌中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路被激活,且与心肌损伤密切相关<sup>[9,17]</sup>。然而 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在不同的细胞和疾病中的调控功能具有很大的变异性。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在 TNF- $\alpha$  诱导心肌细胞损伤中的作用鲜见报道。本研究发现,H9c2 心肌细胞在 TNF- $\alpha$  刺激后,Wnt 通路激活因子  $\beta$ -catenin 及其转录因子 TCF7L2 显著上调及通路下游基因 Cyclin D1 基因和蛋白均显著上调。这证明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在 H9c2 心肌细胞中被 TNF- $\alpha$  显著激活。

而 Wnt 通路抑制剂 DKK1 与 TNF- $\alpha$  同时干预心肌细胞时,该通路相关基因  $\beta$ -catenin、TCF7L2 及 CyclinD1 则被显著抑制,且基因表达下调呈 DKK1 水平依赖性。同时,与 TNF- $\alpha$  组相比,用 DKK1 干预

后,心肌细胞活力显著增加,而凋亡率显著下降,且细胞活力和凋亡率随 DKK1 水平的增加而增加。这一结果提示,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可减轻 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞损伤。

以上研究结果提示,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞损伤和凋亡有关。相关性分析进一步提示, $\beta$ -catenin、CyclinD1 基因 mRNA 相对表达量与心肌细胞活力呈负相关,与 LDH、AST 水平呈正相关。

综上所述,炎症反应是心肌病发生、发展过程中的关键因素,淋巴细胞、炎症因子和炎症相关的信号通路都参与其中。因此,调控相关的炎症通路可能预防或者改善糖尿病心肌病的进程和病理过程。本研究揭示了 TNF- $\alpha$  诱导的心肌细胞炎症损伤模型中,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的表达变化,以及其对心肌细胞损伤和凋亡的影响,为心肌细胞炎症损伤机制提供了一定的理论依据。然而,本研究存在不足之处,虽然抑制剂设立了水平梯度,但没有评估 DKK1 本身的心肌细胞毒性,无法完全排除 DKK1 对心肌细胞可能造成的损伤。其次,TNF- $\alpha$  水平没有设置梯度,无法观察到不同水平 TNF- $\alpha$  诱导心肌细胞损伤的情况。另外,还需要进一步研究 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在激活剂的作用下,对 TNF- $\alpha$  诱导心肌细胞的影响,这更有助于探讨 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在心肌细胞炎症模型中的作用机制。

### 参考文献

[1] KAZUFUMI N, TORU M, MASASHI Y, et al. Pathophysiology and treatment of diabetic cardiomyopathy and heart failure in patients with diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 3587-3600.

[2] ALESSANDRA P, ANNA G, VITTORIA I, et al. Auto-immune inflammation and insulin resistance: hallmarks so far and yet so close to explain diabetes endotypes[J]. Curr Diabetes Rep, 2021, 21(12): 54-63.

[3] FATIN F J, SATIRAH Z D, IZATUS S T, et al. The potential role of flavonoids in ameliorating diabetic cardiomyopathy via alleviation of cardiac oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22

(10):5094-5116.

- [4] 戎李,孙硕,朱飞宇,等. NLRP1 炎症体在糖尿病大鼠心肌组织内的表达[J]. 南方医科大学学报,2020,40(1):87-92.
- [5] 李静,常盼,张静,等. MiR-146a 通过炎症参与小鼠糖尿病心肌病的机制研究[J]. 生物医学进展,2020,20(5):848-852.
- [6] SUN X C, SUN X D, MENG H L, et al. Krill oil inhibits NLRP3 inflammasome activation in the prevention of the pathological injuries of diabetic cardiomyopathy[J]. *Nutrients*,2022,14(2):368-382.
- [7] PRANAV R, JIAN L Y, EMER M. Role of inflammation in diabetic cardiomyopathy [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*,2022,13:1-13.
- [8] 庄儒麟,周晓慧. 干预炎症反应改善糖尿病心肌病的作用研究进展[J]. 中国循环杂志,2018,33(11):1128-1130.
- [9] LIU J J, SHENTU L M, MA N, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin/GSK3 $\beta$  signaling pathways ameliorates cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetic rats[J]. *Curr Med Sci*,2020,40(1):35-47.
- [10] TAN Y, ZHANG Z G, ZHENG C, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence[J]. *Nat Rev Cardiol*,2020,17(9):585-607.
- [11] ANAMIKA B, DOUGLAS G T. The Role of leukocytes

in diabetic cardiomyopathy[J]. *Front Physiol*,2018,9:1547-1559.

- [12] 张朝华,刘旭帮,朱银川,等. MicroRNA-9 通过 SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路促进 TNF- $\alpha$  诱导心肌细胞损伤的机制研究[J]. 中国循证心血管医学杂志,2021,13,(7):803-806.
- [13] ASHMEETHA M, LEOGANG M, SULÈ G, et al. Inflammation-induced left ventricular fibrosis is partially mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Physiol Rep*,2021,9(21):15062-15072.
- [14] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. *Sign Transd Targ Ther*,2022,7(1):3-25.
- [15] YANG T, SUN W, DUAN Y H, et al. Vitamin D3 protects articular cartilage by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*,2020,20(2):1775-1781.
- [16] ALEXANDRE V. Neuroinflammation in Schizophrenia: the key role of the WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(5):2810-2824.
- [17] ZHANG M, MAO Y M. Hydrogen sulfide attenuates high glucose-induced myocardial injury in rat cardiomyocytes by suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Curr Med Sci*,2019,39(6):938-946.

(收稿日期:2022-05-09 修回日期:2023-01-23)

(上接第 919 页)

- [13] ARMAROLI G, VERWEYEN E, PRETZER C, et al. Monocyte-derived interleukin-1 $\beta$  as the driver of S100A12-induced sterile inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells: implications for the pathogenesis of Kawasaki disease[J]. *Arthritis Rheumatol*,2019,71(5):792-804.
- [14] GAO F, SI F, FENG S, et al. Resistin enhances inflammatory cytokine production in coronary artery tissues by activating the NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Biomed Res Int*,2016,2016:3296437.
- [15] SHEN Y, LU H, SONG G. MiR-221-3p and miR-92a-3p enhances smoking-induced inflammation in COPD[J]. *J Clin Lab Anal*,2021,35(7):e23857.
- [16] WANG C, QU Z, KONG L, et al. Quercetin ameliorates lipopolysaccharide-caused inflammatory damage via down-regulation of miR-221 in WI-38 cells[J]. *Exp Mol Pathol*,2019,108:1-8.
- [17] PENG H, YANG H, XIANG X, et al. MicroRNA-221

participates in cerebral ischemic stroke by modulating endothelial cell function by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *Exp Ther Med*,2020,19(1):443-450.

- [18] LI Y, YAN C, FAN J, et al. MiR-221-3p targets Hif-1 $\alpha$  to inhibit angiogenesis in heart failure[J]. *Lab Invest*,2021,101(1):104-115.
- [19] 魏薇,吴月,程中乐,等. IL-6 与经典炎症指标预测川崎病患儿丙种球蛋白敏感性及其对冠状动脉损害的对比研究[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(2):306-310.
- [20] DAI L, LI Z, TAO Y, et al. Emerging roles of suppressor of cytokine signaling 3 in human cancers [J]. *Biomed Pharmacother*,2021,144:112262.
- [21] LIN J. C1QTNF1-AS1 regulates the occurrence and development of hepatocellular carcinoma by regulating miR-221-3p/SOCS3[J]. *Hepatol Int*,2021,15(2):526.

(收稿日期:2022-06-25 修回日期:2022-12-16)