



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: Trpc6 敲除抑制炎症小体减轻小鼠心肌炎症损伤的作用
作者: 梁浩宇, 樊嫒, 朱幸, 黄蕾, 李卫平, 李维祖
网络首发日期: 2026-02-09
引用格式: 梁浩宇, 樊嫒, 朱幸, 黄蕾, 李卫平, 李维祖. Trpc6 敲除抑制炎症小体减轻小鼠心肌炎症损伤的作用[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260209.1627.016>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

Trpc6 敲除抑制炎症小体减轻小鼠心肌炎症损伤的作用

梁浩宇, 樊 嫫, 朱 幸, 黄 蕾, 李卫平, 李维祖

(安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032)

摘要 目的 探究 *Trpc6* 敲除对慢性脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠心肌慢性炎症损伤及纤维化的影响及其潜在机制。**方法** 选用雄性 C57BL/6 野生型 (WT) 小鼠及同背景 *Trpc6* 基因敲除 (*Trpc6*^{-/-}) 小鼠, 随机分为 4 组: WT 对照组、WT+LPS (200 μg/kg) 组、*Trpc6*^{-/-} 对照组和 *Trpc6*^{-/-}+LPS (200 μg/kg) 组。含 LPS 组连续 21 d 腹腔注射 LPS 诱导慢性心肌炎症损伤。心脏超声检测左室射血分数 (EF)、左室缩短分数 (FS) 和心输出量 (CO) 的变化; HE 和高碘酸希夫染色 (PAS) 检测小鼠心肌组织形态学变化; Masson 染色检测小鼠心肌纤维变化; Western blot 检测小鼠心肌组织瞬时受体电位经典通道 6 (TRPC6)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体 (NLRP3)、干扰素诱导蛋白 2 炎症小体 (AIM2)、半胱天冬酶 1 (Caspase-1)、白细胞介素 6 (IL-6) 及白细胞介素 1β (IL-1β) 等相关蛋白的表达。**结果** 与 WT 对照组比较, WT+LPS 组小鼠心脏 EF ($P < 0.01$)、FS ($P < 0.01$)、CO ($P < 0.05$) 降低, 心肌组织损伤、糖蛋白沉积及纤维化程度均增加 ($P < 0.01$)。进一步研究显示, 与 WT 对照组比较, WT+LPS 组小鼠心肌组织 TRPC6、NLRP3、AIM2、Caspase-1、IL-6 及 IL-1β 的蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。与 WT+LPS 组相比, *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠的 EF ($P < 0.01$)、FS ($P < 0.05$) 升高, 心肌组织损伤、糖蛋白沉积及纤维化程度均减轻 ($P < 0.05$)。**结论** 慢性 LPS 处理可通过上调 TRPC6 表达激活 NLRP3/AIM2 炎症小体, 进而导致心肌慢性炎症损伤及纤维化, 而 *Trpc6* 敲除能减轻心肌炎症损伤及纤维化, 其机制与抑制 NLRP3/AIM2 炎症小体激活有关。

关键词 *Trpc6*; 脂多糖; 心肌损伤; 炎症小体; 心肌纤维化; NLRP3; AIM2

中图分类号 R542.2

文献标志码 A

Trpc6 knockout suppresses inflammasome activity and alleviates myocardial inflammatory damage in mice

Liang Haoyu, Fan Lei, Zhu Xing, Huang Lei, Li Weiping, Li Weizu

(Dept of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81970630); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2208085MH219)

作者简介: 梁浩宇, 女, 硕士研究生;

李卫平, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: lwp19@126.com;

李维祖, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: liweizu@126.com

Abstract Objective To investigate the effects of *Trpc6* knockout on chronic lipopolysaccharide (LPS)-induced myocardial inflammation and fibrosis in mice and its potential mechanisms.

Methods Male C57BL/6 wild-type (WT) mice and *Trpc6* knockout (*Trpc6*^{-/-}) mice of the same background were randomly divided into four groups: WT control, WT+LPS (200 µg/kg), *Trpc6*^{-/-} control, and *Trpc6*^{-/-}+LPS (200 µg/kg). Group with LPS received intraperitoneal LPS injections for 21 consecutive days to induce chronic myocardial inflammatory injury. Cardiac ultrasound assessed changes in left ventricular ejection fraction (EF), left ventricular shortening fraction (FS), and cardiac output (CO). Hematoxylin and eosin (HE) staining and periodic acid-Schiff (PAS) staining were used to examine morphological alterations in myocardial tissue. Masson's trichrome staining was used to assess myocardial fiber alterations; Western blot analysis was used to measure myocardial tissue expression of transient receptor potential calcium channel 6 (TRPC6), nucleotide-binding domain-containing receptor 3 inflammasome (NLRP3), interferon-induced molecule 2 inflammasome (AIM2), caspase-1, Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-1β (IL-1β) in mouse myocardial tissue.

Results Compared with the WT control group, the WT+LPS group exhibited decreased cardiac EF ($P < 0.01$), FS ($P < 0.01$), and CO ($P < 0.05$), along with significantly increased myocardial tissue damage, glycoprotein deposition, and fibrosis ($P < 0.01$). Further analysis revealed that compared with the WT control group, the WT+LPS group exhibited markedly increased myocardial tissue expression of TRPC6, NLRP3, AIM2, Caspase-1, IL-6, and IL-1β ($P < 0.01$). Compared with the WT+LPS group, mice in the *Trpc6*^{-/-} +LPS group exhibited elevated EF ($P < 0.01$) and FS ($P < 0.05$), along with reduced myocardial tissue injury, glycoprotein deposition, and fibrosis ($P < 0.05$).

Conclusion Chronic LPS treatment can activate NLRP3/AIM2 inflammasomes through the up-regulation of TRPC6 expression, and then lead to chronic myocardial inflammatory injury and fibrosis, while *Trpc6* knockdown can reduce myocardial inflammatory injury and fibrosis, and the mechanism is related to inhibiting the activation of NLRP3/AIM2 inflammasomes.

Keywords *Trpc6*; lipopolysaccharide (LPS); myocardial injury; inflammasome; myocardial fibrosis; NLRP3; AIM2

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81970630); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH219)

Corresponding authors Li Weiping , E-mail:lwp19@126.com ; Li Weizu , E-mail:

心肌纤维化是心脏疾病发展的关键病理基础，与持续炎症和异常重构密切相关。脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）作为革兰氏阴性菌的关键成分^[1]，其慢性暴露可过度激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体（NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 inflammasome, NLRP3），促进白细胞介素 1 β （interleukin - 1 β , IL-1 β ）等因子释放，加剧心肌损伤^[2]。瞬时受体电位通道 6 (transient receptor potential canonical 6, TRPC6) 是一种广泛分布于心血管细胞中的非选择性阳离子通道，其介导的钙离子内流可激活钙调磷酸酶-NFAT、CaMKII 等下游通路^[3]，进而调控心肌炎症反应、成纤维细胞活化及纤维化进程^[4]。但 TRPC6 是否介导慢性 LPS 暴露所致的心肌损伤，尚不明确。该研究通过构建慢性 LPS 暴露小鼠模型，探究 *Trpc6*^{-/-} 对心肌炎症反应及纤维化的影响，以期为靶向 TRPC6 的抗心肌纤维化治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 *Trpc6*^{-/-} (C57BL/6N 背景) 小鼠购自苏州 Cyagen 生物技术公司，在安徽医科大学动物实验中心饲养。实验选用 8 周龄 C57BL/6N 野生型 (WT) 及同背景 *Trpc6* 基因敲除 (*Trpc6*^{-/-}) (雄性, 18~22 g) 的后代进行。小鼠饲养于清洁级环境中 (12 h 光暗循环, 22~24 °C, 湿度 40%~60%)，自由摄食饮水。所有动物实验均遵循安徽医科大学实验动物伦理委员会要求完成(编号: LLSC 20232095)。

1.1.2 主要试剂 LPS (货号: L2880) 购自美国 Sigma Aldrich 公司; 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号: C0105S)、高碘酸希夫染色 (periodic acid-Schiff staining, PAS) 试剂盒 (货号: C0142S) 购自上海碧云天生物科技有限公司; TRPC6 抗体 (货号: BA3394) 购自武汉博士德生物; AIM2 抗体 (货号: DF-3514)、Caspase-1 多克隆抗体 (货号: AF-5418)、兔源 IL-1 β 多克隆抗体 (货号: AF-5103)、兔源 p-Smad 2/3 (货号: AF3367)、兔源 Smad 2/3 (货号: AF6367)、兔源 NLRP3 多克隆抗体 (货号: BF8029)、 β -actin 抗体 (货号: AF7018) 均购自溧阳亲科生物研究中心有限公司; 兔源 IL-6 多克隆抗体 (货号: WL02841) 购自沈阳万类生物科技有限公司; Masson 三色染色试剂盒 (货号: BL1059B)、山羊抗小鼠 IgG-HRP (货号: BL001A)、山羊抗兔 IgG-HRP (货号: BL003A) 均购自合肥白鲨生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 Vevo 2100 超声系统 (型号: Vevo®2100, 购自苏州威诺科技有限公司); 组织包埋机 (型号: HistoCoreArcadia)、组织脱水机 (型号: HistoCore pearl)、全自动轮

转切片系统（型号：RM2255，购自德国莱卡公司）；Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、ChemiDoc 成像系统（购自美国 Bio-Rad 公司）；自动数字玻片扫描仪（型号：Pannoramic MIDI，购自匈牙利 3DHISTECH 公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

实验选用雄性 C57BL/6 背景的野生型（WT）小鼠与 *Trpc6* 基因敲除（*Trpc6*^{-/-}）小鼠。将 WT 小鼠随机分为 2 组（每组 $n = 8$ ）：WT 对照组、WT+LPS (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)组；将 *Trpc6*^{-/-} 小鼠随机分为 2 组（每组 $n = 8$ ）：*Trpc6*^{-/-}对照组、*Trpc6*^{-/-}+LPS (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)组，共计 4 组。其中，WT+LPS 组与 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组每日腹腔注射 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS 以造模，两个对照组则注射等体积生理盐水，连续干预 21 d。干预结束后，每组 8 只小鼠中的 4 只取心脏组织进行固定、石蜡包埋及 HE、PAS 与 Masson 染色分析；其余 4 只小鼠的心脏组织则用于提取蛋白，进行 Western blot 等分子检测。

1.2.2 超声心动图检测

在末次给药 24 h 后，以 1.5%异氟烷吸入麻醉小鼠，固定于加热平台（37 $^{\circ}\text{C}$ ）；使用 Vevo 2100 超声系统，配备 30 MHz 探头，获取左心室长轴及短轴 M 型超声图像。测量以下参数：射血分数[ejection fraction, EF(%)]、短轴缩短率[fractional shortening, FS(%)]和心输出量[cardiac output, CO(ml/min)]。

1.2.3 HE 染色

取小鼠的心肌组织固定在 4%多聚甲醛中至少 24 h。脱水包埋在石蜡中，用石蜡切片机将心肌组织切成 4 μm 厚度切片。石蜡切片经梯度脱蜡及水化处理，将组织切片用 HE 染色，通过自动数字玻片扫描仪玻片扫描仪进行常规组织病理学检查。

1.2.4 PAS 染色

将心肌组织切片（ $n = 4$ ）常规脱蜡至水，然后使用 PAS 染色试剂盒按照说明书进行染色，最后放入苏木精溶液中 20 s 进行染核并密封。采用自动数字玻片扫描仪采集图像。每张切片随机选取 3 个阳性区域使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量的平均吸光度值，以评估小鼠心脏中糖蛋白沉积的相对变化。

1.2.5 Masson 染色

将心肌组织切片（ $n = 4$ ）常规脱蜡至水，参照 Masson 染色试剂盒说明书进行染色，然后使用自动数字玻片扫描仪进行拍照。最后，利用 Image-Pro Plus 6.0 软件对每张切片中随机选取的 3 个蓝色区域光密度进行测量，评估心脏组织的纤维化损伤程度。

1.2.6 Western blot 分析

称取心脏组织，将现配 RIPA 裂解液加入后置于冷冻研磨仪中研磨，置于冰浴中裂解，使用低温冷冻离心机离心，其上清液即为总蛋白。在进行蛋白质浓度定量以及蛋白变性后，通过 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜（PVDF）上。用 TBST 缓冲液配制 5% 脱脂奶粉，在室温下封闭膜 2 h，接着用 TBST 将膜摇床上摇洗 3 次。然后将膜放进 TRPC6、AIM2、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-6、Smad2/3、磷酸化 Smad2/3(phosphorylated Smad2/3,p-Smad2/3)及 β -actin 特异性一抗（均 1:1 000），4 $^{\circ}$ C 慢摇床过夜。然后用 TBST 洗涤 PVDF 膜，将膜放进相应的二抗（1:10 000）室温孵育。添加增强化学发光试剂后显影拍照，并使用 ImageJ 软件定量分析条带密度。

1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对所收集的数据进行统计检验。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），组间比较采用 Tukey's 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性 LPS 暴露对小鼠心肌组织 TRPC6 表达的影响

Western blot 分析显示与 WT 对照组相比，WT+LPS 组心肌组织 TRPC6 蛋白的表达水平升高 ($P < 0.01$)；而在 *Trpc6*^{-/-}小鼠中，对照组及 LPS 处理组均未检测到 TRPC6 蛋白表达，这进一步证实了敲除模型的有效。上述结果表明，慢性 LPS 暴露能特异性上调 WT 小鼠心肌组织的 TRPC6 蛋白表达。见图 1。

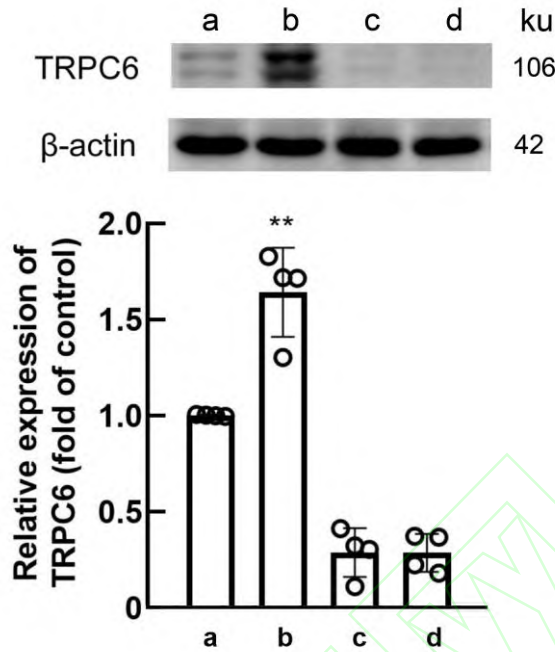


图1 Western blot 分析各组小鼠心肌 TRPC6 蛋白条带表达及其定量直方图结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 1 Western blot analysis of TRPC6 protein expression in the myocardium of mice in each group and corresponding quantitative histogram ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

a: WT control group; b: WT + LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-} + LPS group;

** $P < 0.01$ vs WT control group.

2.2 *Trpc6* 敲除对慢性 LPS 诱导小鼠心功能损伤的影响

超声心动图结果显示: WT 对照组与 *Trpc6*^{-/-} 对照组小鼠心功能参数差异无统计学意义; 与 WT 对照组相比, WT+LPS 组小鼠 EF ($P < 0.01$)、FS ($P < 0.01$) 及 CO ($P < 0.05$) 均降低; 而与 WT+LPS 组相比, *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠的 EF ($P < 0.01$) 和 FS ($P < 0.05$) 均升高, 心功能损伤情况得到改善。这些结果表明, 慢性 LPS 暴露可导致小鼠心功能损伤, 而 *Trpc6* 敲除能够改善此类损伤。见图 2。

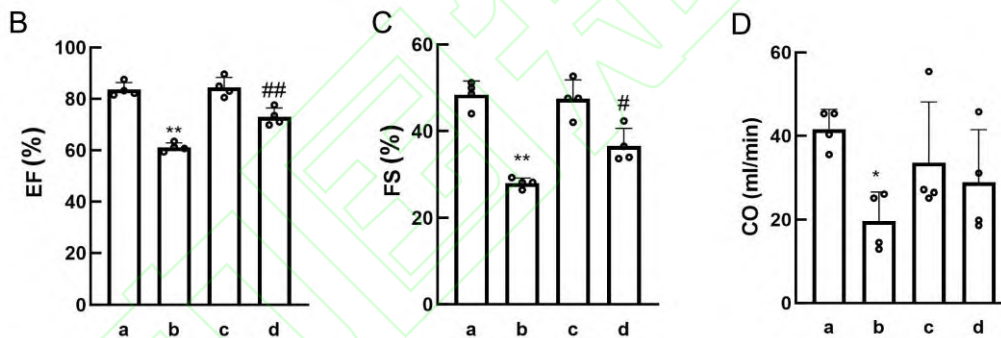
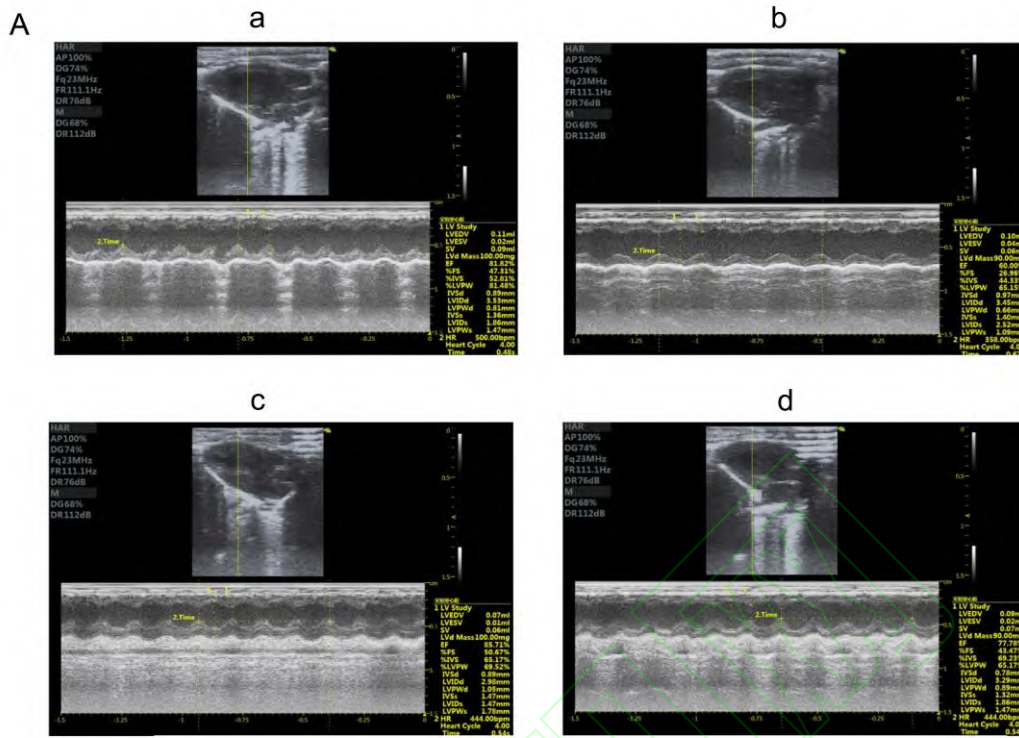


图 2 超声心动图分析各组小鼠心功能代表性图像及其 EF、FS、CO 定量统计结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig.2 Representative echocardiographic images of cardiac function of mice in each group and quantitative statistical results of EF, FS, and CO ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

A: Representative echocardiographic images; B-D: Quantification of cardiac function parameters (EF, FS, CO); a: WT control group; b: WT + LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-} + LPS group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs WT+LPS group.

2.3 *Trpc6* 敲除对慢性 LPS 诱导小鼠心肌组织结构损伤的影响

HE 染色结果显示: WT 对照组与 *Trpc6*^{-/-} 对照组小鼠心肌结构正常, 细胞排列整齐, 横

纹清晰，两组间差异无统计学意义；与 WT 对照组相比，WT+LPS 组小鼠心肌组织出现肌束排列紊乱、间质增宽及炎性细胞浸润；而 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠心肌的上述病理改变较 WT+LPS 组减轻，表现为肌纤维排列相对整齐，间质水肿与炎性细胞浸润减少。上述形态学观察结果表明，慢性 LPS 暴露可能诱导小鼠心肌组织结构损伤及炎症反应。同时，*Trpc6* 敲除似乎能在一定程度上缓解 LPS 诱导的心肌病理损伤。见图 3。

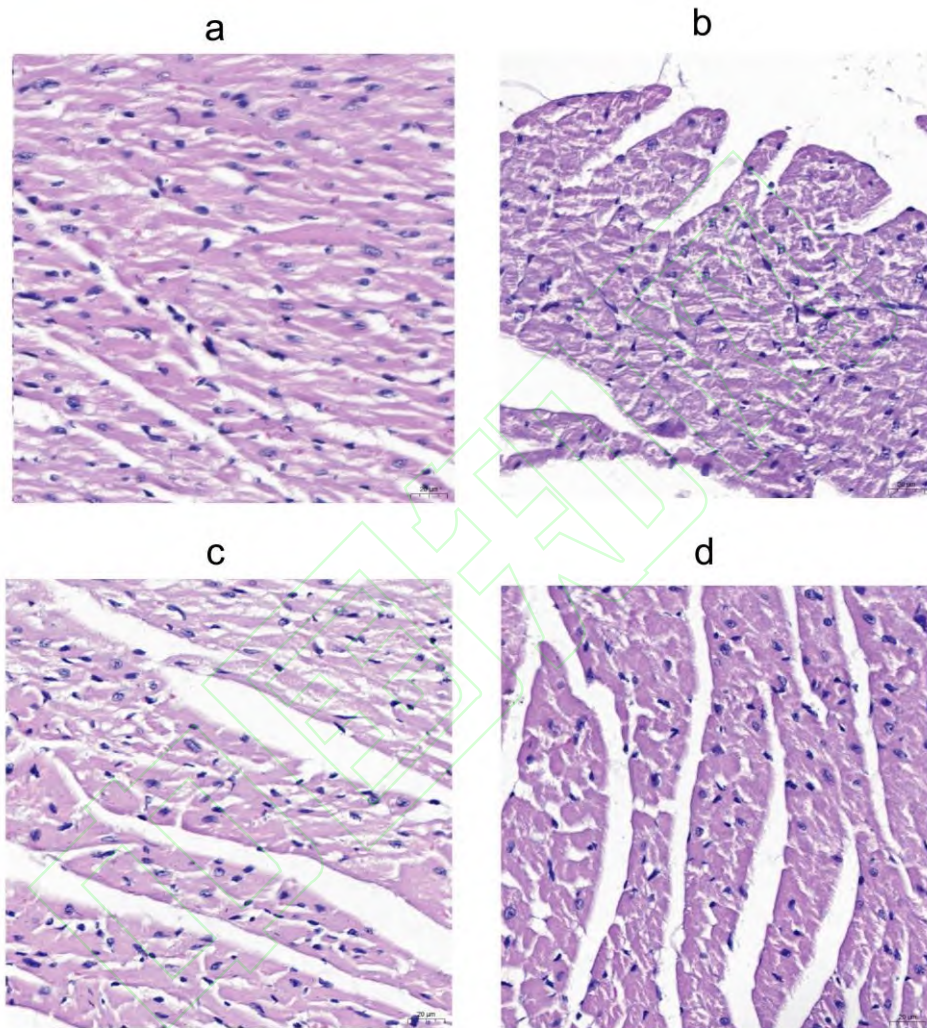


图 3 HE 染色分析各组小鼠心肌组织结构形态学图像 ($\bar{x} \pm s, n = 4$) $\times 400$

Fig.3 HE-stained morphological images of myocardial tissue structure of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$) $\times 400$

a: WT control group; b: WT + LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-} + LPS group.

2.4 *Trpc6* 敲除对慢性 LPS 诱导小鼠心肌糖蛋白沉积的影响

PAS 结果显示：WT 对照组与 *Trpc6*^{-/-} 对照组心肌中仅见少量、均匀分布的 PAS 阳性信

号，两组间糖蛋白沉积水平差异无统计学意义；与 WT 对照组相比，WT+LPS 组小鼠心肌组织中糖蛋白沉积增加 ($P < 0.01$)，表现为广泛分布的深红色阳性区域，提示糖蛋白在间质及血管周围异常聚集；而 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠心肌中 PAS 阳性沉积面积较 WT+LPS 组减少 ($P < 0.05$)，且阳性信号强度减弱、分布更为局限。上述结果表明，*Trpc6* 敲除能够减轻慢性 LPS 引起的心肌糖蛋白异常沉积。见图 4。

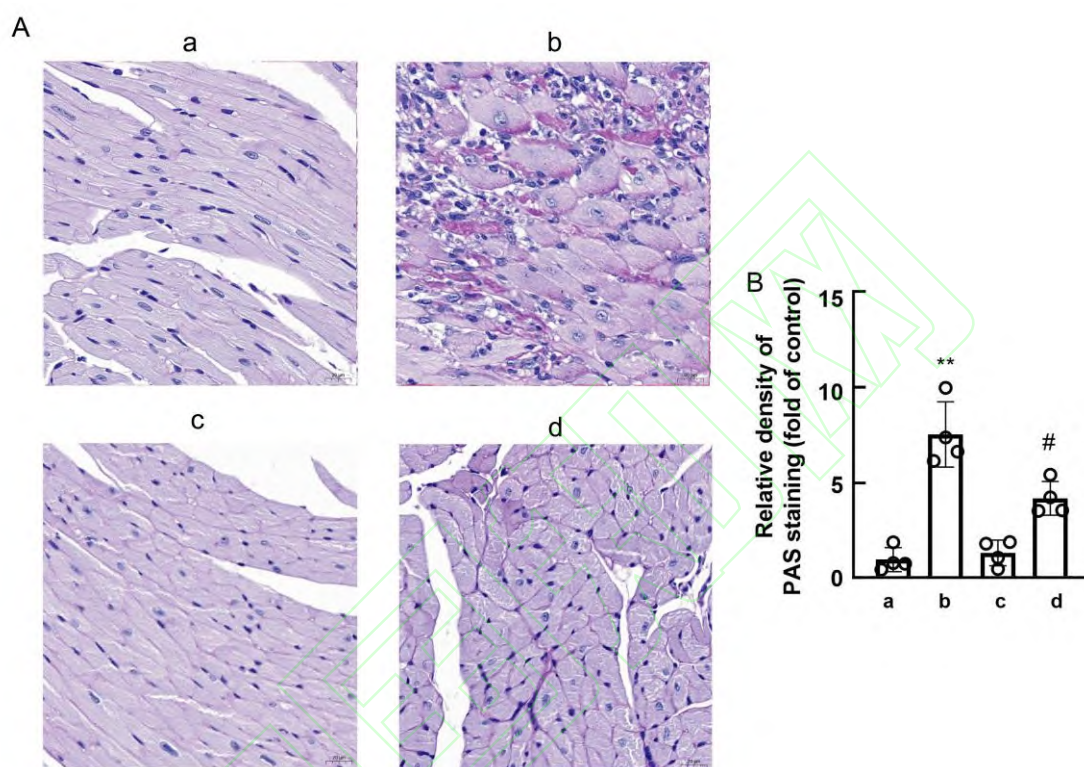


图 4 PAS 染色分析各组小鼠心肌糖蛋白沉积图像及其阳性面积定量统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.4 PAS staining analysis of glycoprotein deposition in the myocardium of mice in each group and quantitative statistical results of positive areas ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

A: Representative images of myocardial PAS staining $\times 400$; B: Quantitative analysis of PAS-positive area (relative density, fold of control); a: WT control group; b: WT + LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-} + LPS group; ** $P < 0.01$ vs WT control group; # $P < 0.05$ vs WT+LPS group.

2.5 *Trpc6* 敲除对慢性 LPS 诱导的小鼠心肌纤维化的影响

Masson 染色结果显示：WT 对照组与 *Trpc6*^{-/-} 对照组间心肌胶原沉积水平差异无统计学意义；与 WT 对照组相比，WT+LPS 组小鼠心肌间质纤维化加重，胶原沉积较对照组增加

($P < 0.01$), 而 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠心肌胶原沉积较 WT+LPS 组减少 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, WT+LPS 组心肌组织中 P-Smad2/3 蛋白表达水平较 WT 对照组上调 ($P < 0.01$), 而 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组小鼠心肌 P-Smad2/3 表达水平较 WT+LPS 组明显降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 慢性 LPS 暴露伴随着心肌 Smad2/3 信号磷酸化水平升高与胶原异常沉积, 而 *Trpc6* 敲除可降低 Smad2/3 磷酸化水平, 并减轻相应的心肌纤维化改变。见图 5。

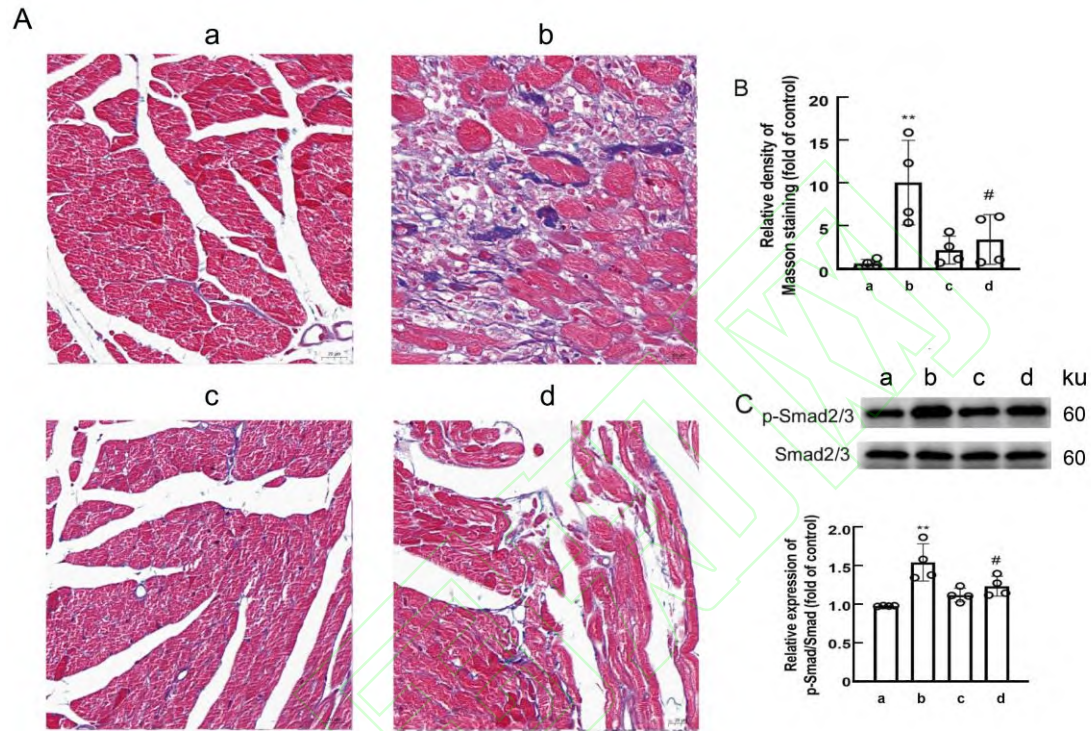


图 5 Masson 染色及 Western blot 分析各组小鼠心肌胶原沉积图像、p-Smad2/3 蛋白条带及其定量统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.5 Masson staining and Western blot analysis of myocardial collagen deposition images of mice in each group, p-Smad2/3 protein bands, and their quantitative statistical results

($\bar{x} \pm s, n = 4$)

A: Representative images of myocardial Masson staining $\times 400$; B: Quantitative analysis of collagen deposition; C: Relative protein expression of p-Smad2/3 to total Smad2/3 measured by Western blot; a: WT control group; b: WT + LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-} + LPS group; ** $P < 0.01$ vs WT control group; # $P < 0.05$ vs WT+LPS group.

2.6 *Trpc6* 敲除对慢性 LPS 诱导的心肌炎症小体活化的影响

Western blot 结果显示, WT 对照组与 *Trpc6*^{-/-}对照组小鼠心肌组织中 AIM2、NLRP3、

活化的 Caspase 1、IL-1 β 及 IL-6 蛋白表达水平差异无统计学意义；与 WT 对照组相比，WT+LPS 组心肌上述各蛋白表达均上调（ $P < 0.01$ ）；而 *Trpc6*^{-/-}+LPS 组心肌中上述各蛋白的表达水平较 WT+LPS 组均降低（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。这些结果表明，*Trpc6* 敲除减轻慢性 LPS 诱导的心肌炎症，其机制可能与抑制 AIM2/NLRP3 炎症小体激活有关。见图 6。

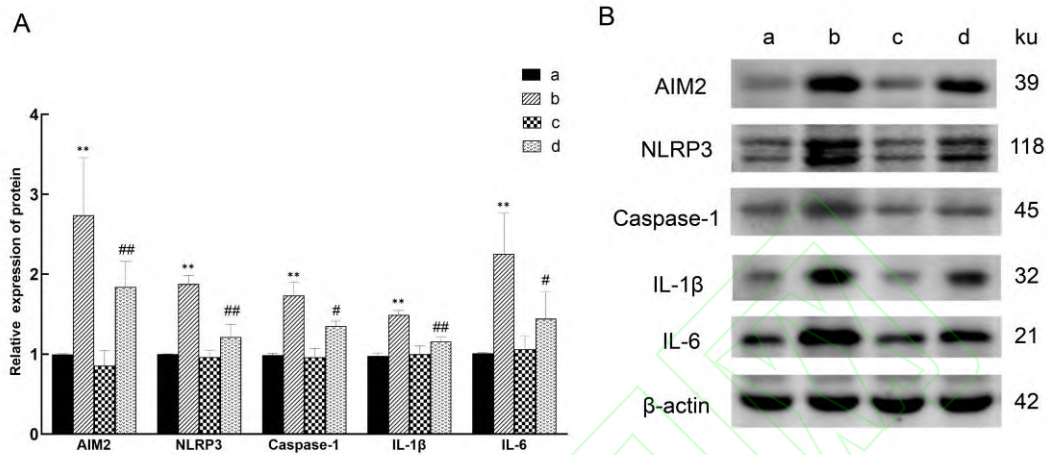


图 6 Western blot 分析各组小鼠心肌 AIM2、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-6 蛋白条带表达及其定量统计结果($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig.6 Western blot analysis of AIM2, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-6 protein expression in myocardial of mice in each group and corresponding quantitative statistical results ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

A: Quantitative analysis of the relative protein expression levels of AIM2, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-6, respectively; B: Representative Western blot images showing AIM2, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and IL-6 protein expression; a: WT control group; b: WT+LPS group; c: *Trpc6*^{-/-} control group; d: *Trpc6*^{-/-}+LPS group; ** $P < 0.01$ vs WT control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs WT+LPS group.

3 讨论

研究^[5]表明，慢性炎症是心脏疾病发生与进展的关键驱动因素。革兰氏阴性菌感染引发的持续性炎症反应，是导致心脏功能障碍、心肌损伤的重要诱因之一。LPS 作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分，其慢性暴露可通过激活 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路引发心脏病变^[6]。本研究通过构建慢性低浓度 LPS (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 暴露小鼠模型，探讨慢性炎症对心肌损伤的作用和机制。建模后模型小鼠出现显著心功能减退、心肌结构破坏及纤维化，这些典型

的病理特征表明慢性 LPS 暴露成功诱发了预期的心脏损伤，验证了该模型的可靠性。采用 *Trpc6* 基因敲除干预后，与正常小鼠对比观察，*Trpc6* 敲除小鼠，慢性 LPS 暴露所致的小鼠心脏损伤得到改善，提示 TRPC6 可能作为炎症性心脏疾病的潜在治疗靶点。

心肌损伤及其所导致的心功能下降是慢性心脏病变的核心表现^[7]。临床上，LPS 暴露对心脏功能影响显著。在脓毒症患者中，急性高浓度 LPS 释放可引发心肌抑制综合征，致使左心室收缩功能在数小时内急剧下降，EF 降低，这表明急性 LPS 暴露会对心肌造成严重损伤^[8]。动物实验^[9]进一步证实，LPS 通过激活 TLR4 信号通路，TNF- α 、IL-6 等促炎因子大量释放，引发心肌细胞急性水肿和线粒体功能障碍。基于此，本研究提出假设：慢性低浓度 LPS 暴露虽不引发急性炎症风暴，但持续炎症微环境可刺激心肌成纤维细胞活化，促进胶原沉积，最终导致心肌纤维化与心功能恶化。为检验上述假设，本研究构建了慢性 LPS 暴露模型。本实验结果显示，慢性低浓度 LPS 暴露 21 d 后，小鼠 EF、FS 及 CO 均显著降低，证实心脏收缩功能与泵血能力受损。同时，HE 染色可见心肌细胞出现损伤及间质大量炎性细胞浸润，Masson 染色显示胶原纤维沉积面积明显增加，PAS 染色证实心肌细胞糖蛋白异常沉积，这些结果从细胞、组织和功能层面，共同表明慢性 LPS 暴露与心肌损伤、纤维化及心功能下降密切相关。因此，本研究结果表明，慢性 LPS 暴露通过上调 TRPC6，激活 NLRP3/AIM2 炎症小体，驱动了心肌炎症、纤维化与功能障碍的连锁反应。提示“慢性炎症微环境”是贯穿上述病理进程的核心驱动因素。因此，针对慢性炎症微环境及其中 TRPC6 介导的 NLRP3/AIM2 炎症小体活化这一核心病理环节进行干预，可能为延缓心肌纤维化、改善心功能提供关键的治疗策略。

钙超载是心肌损伤核心病理机制，源于钙稳态失衡，可致线粒体功能紊乱、钙依赖性酶激活及氧化应激加剧，最终引发心肌细胞凋亡与心脏结构破坏^[10]。TRPC6 作为调控钙内流关键通道，在正常心肌细胞为低表达状态，但病理状态下其表达上调，通过促进钙内流等途径放大钙超载效应，加重心肌损伤^[11]。炎症微环境对 TRPC6 的调节在心肌损伤中起重要推动作用，多种促炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 等可通过激活转录通路促进 TRPC6 基因表达^[12]。有文献^[13-14]报道，异常激活的 TRPC6 导致细胞外钙离子大量内流，引发细胞内钙超载，破坏心肌兴奋收缩偶联与舒缩功能，还诱发线粒体功能障碍，激活炎症信号通路，促进活性氧生成，激活下游炎症信号通路。基于以上机制，本研究推测，慢性低浓度 LPS 暴露可能通过维持持续的炎症状态，上调心肌 TRPC6 的表达，从而潜在加剧钙超载，最终驱动心肌纤维化的发生。本研究的实验结果支持了这一推测：慢性 LPS 暴露显著上调了心肌组织中 TRPC6 的蛋白表达水平。并且功能干预实验表明，*Trpc6* 基因敲除能够有效改善慢性 LPS

暴露所致的心肌细胞损伤与心脏功能下降，并减轻心肌组织中糖蛋白和胶原蛋白的异常沉积。这些结果共同支持了上述假设，即 TRPC6 在慢性 LPS 暴露诱导的心肌纤维化进程中扮演了关键角色。因此，TRPC6 可能是连接炎症刺激与心肌损伤的关键节点，其异常激活在慢性炎症性心脏疾病进展中至关重要，但 TRPC6 激活如何促进心肌的炎症损伤尚不完全清楚。本研究虽然提出了 TRPC6 介导的钙信号可能在其中发挥作用，但缺乏对慢性 LPS 暴露后心肌细胞内钙离子浓度变化的直接检测数据，未来研究需通过钙成像等技术进一步验证钙超载的存在及其在 TRPC6 调控炎症小体激活中的核心作用。

炎性小体是先天免疫系统识别危险信号的关键蛋白复合物，其中 NLRP3 炎性小体能广泛响应多种刺激，与多种炎症性疾病密切相关。其经典激活过程分为两步：首先，由 TLR 或细胞因子受体等信号启动，上调 NLRP3 及 Caspase-1 等组分表达^[15]；随后，可通过线粒体 ROS 生成、钾离子外流、溶酶体破裂等多重刺激下，NLRP3 寡聚化并招募 ASC 适配器和 Caspase-1，形成活性复合物，进而切割 IL-1 β 和 IL-18 使其成熟，同时裂解 Gasdermin D 引发细胞焦亡，从而促进炎症反应^[16]。临床研究^[17]显示，人类心力衰竭患者心肌组织中 NLRP3 表达与心功能呈负相关，与胶原沉积呈正相关，且 NLRP3 基因敲除小鼠在 LPS 暴露后心肌纤维化面积减少，心功能显著改善。AIM2 是一种新型模式识别受体，能够识别病原体或宿主自身的双链 DNA (dsDNA)。当线粒体受损使细胞质中的 dsDNA 与 AIM2 结合后，会招募适配蛋白 ASC 并聚集 pro Caspase-1，形成炎症小体复合物，进而激活 Caspase-1，促进炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与释放^[18]。因此推测，NLRP3 与 AIM2 炎症小体的过度激活可能是慢性 LPS 暴露引发的心肌炎症反应中的核心致病环节。研究表明，慢性 LPS 暴露明显上调了心肌组织中 AIM2、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-6 的表达，表明 AIM2 和 NLRP3 炎症小体激活与 LPS 暴露导致的心肌慢性炎症损伤密切相关。钙超载一方面诱导线粒体损伤，释放 mtDNA 激活 AIM2；另一方面，钙离子及其诱导产生的 ROS 直接激活 NLRP3，并可能通过促进 K⁺外流协同放大炎症小体活化。因此，TRPC6 介导的钙超载通过诱导线粒体 DNA 释放、促进 ROS 生成与钾离子外流，构成驱动 AIM2/NLRP3 炎症小体活化的核心通路。研究表明，*Trpc6* 敲除可阻止 NLRP3 与 AIM2 炎症小体的激活，减少炎症因子释放。本研究揭示 TRPC6 介导的钙内流及钙超载是激活 AIM2 和 NLRP3 炎症小体的关键。该结果与 TRPC6 通过钙信号通路诱导 NLRP3 激活等机制相互印证，表明 TRPC6 信号通路可参与“钙超载-炎症小体”恶性循环。而靶向 TRPC6 可能从阻断钙内流及炎症小体激活途径，抑制这种恶性循环，为慢性炎症性心脏疾病治疗提供新方向。

综上所述，慢性 LPS 暴露会导致小鼠心功能下降、心肌损伤及纤维化，同时激活心肌

的 NLRP3 炎症小体, 增加炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放, 从而引发心肌炎症损伤。而 *Trpc6* 基因敲除伴随着 NLRP3 炎症小体激活的抑制, 降低 IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子的水平, 同时减轻慢性 LPS 暴露导致的心功能下降、心肌损伤及纤维化程度, 进而改善心肌炎症损伤。但该研究仅采用基因敲除动物模型, 缺乏 TRPC6 特异性抑制剂或激动剂的药理学验证, 可能影响结论的普适性; 研究主要聚焦于 NLRP3 和 AIM2 炎症小体通路, 未考察其他潜在参与 LPS 致心肌损伤的关键信号通路是否受 TRPC6 调控。这些不足可在后续研究中加以完善。

参考文献

- [1] Brown G C, Heneka M T. The endotoxin hypothesis of Alzheimer' s disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2024, 19(1): 30. doi:10.1186/s13024-024-00722-y.
- [2] de Carvalho Ribeiro M, Szabo G. Role of the inflammasome in liver disease[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2022, 17: 345-65. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-032521-102529.
- [3] 谈远佳, 张世忠. TRPC6 与心血管疾病关系的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(9): 1869-75. doi:10.11844/cjcb.2021.09.0018.
Tan Y J, Zhang S Z. Research progress on the relationship between TRPC6 and cardiovascular diseases[J]. *Chin J Cell Biol*, 2021, 43(9): 1869-75. doi:10.11844/cjcb.2021.09.0018.
- [4] Li J, Zhang J, Zhong Y, et al. TRPC6 regulates necroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury via Ca²⁺/CaMKII signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2024, 122: 111344. doi:10.1016/j.cellsig.2024.111344.
- [5] Liu H, Hu Q, Ren K, et al. ALDH2 mitigates LPS-induced cardiac dysfunction, inflammation, and apoptosis through the cGAS/STING pathway[J]. *Mol Med*, 2023, 29: 171. doi:10.1186/s10020-023-00769-5.
- [6] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-61. doi:10.1007/s00018-020-03656-y.
- [7] 柯乐斌, 金焕治, 王 蕾. FOXO1 调控 PGC-1 β /ERR α 减轻 LPS 诱导的心肌细胞损伤[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2024, 34(12): 1099-105. doi:10.3969/j.issn.1005-4561.2024.12.005.
Ke L B, Jin H Z, Wang L. FOXO1 regulates PGC-1 β /ERR α to alleviate LPS-induced cardiomyocyte damage[J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2024, 34(12): 1099-105. doi:10.3969/j.issn.1005-4561.2024.12.005.
- [8] 张银涛, 杨 萍, 臧丹丹, 等. GPR108 缺失对脂多糖诱发脓毒症小鼠的炎症反应[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(11): 1896-902. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.002.
Zhang Y T, Yang P, Zang D D, et al. The absence of GPR108 results in decreased inflammatory response in lipopolysaccharide-induced sepsis mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(11): 1896-902. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.002.
- [9] Fang D, Li Y, He B, et al. Gastrin attenuates sepsis-induced myocardial dysfunction by down-regulation of TLR4 expression in macrophages[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(9): 3756-69. doi:10.1016/j.apsb.2023.06.012.
- [10] Luo Y, Zhou S, Xu T, et al. SENP2-mediated SERCA2a deSUMOylation increases calcium overload in cardiomyocytes to aggravate myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Chin*

Med J, 2023, 136(20): 2496-507. doi:10.1097/CM9.0000000000002757.

- [11] Guo W, Tang Q, Wei M, et al. Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites[J]. *Neuron*, 2022, 110(6): 1023-35.e5. doi:10.1016/j.neuron.2021.12.023.
- [12] Yang J, Tang L, Zhang F, et al. Sevoflurane preconditioning promotes mesenchymal stem cells to relieve myocardial ischemia/reperfusion injury *via* TRPC6-induced angiogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 584. doi:10.1186/s13287-021-02649-3.
- [13] Walkon L L, Strubbe-Rivera J O, Bazil J N. Calcium overload and mitochondrial metabolism[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(12): 1891. doi:10.3390/biom12121891.
- [14] Chang G J, Yeh Y H, Chen W J, et al. Candesartan cilexetil attenuates arrhythmogenicity following pressure overload in rats *via* the modulation of cardiac electrical and structural remodeling and calcium handling dysfunction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(15): e024285. doi:10.1161/JAHA.121.024285.
- [15] Chen Y, Ye X, Escames G, et al. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 51. doi:10.1186/s11658-023-00462-9.
- [16] Zhang Z, Venditti R, Ran L, et al. Distinct changes in endosomal composition promote NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(1): 30-41. doi:10.1038/s41590-022-01355-3.
- [17] Zhang X, Lan Q, Zhang M, et al. Inhibition of AIM2 inflammasome activation by SOX/ORF37 promotes lytic replication of Kaposi' s sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(27): e2300204120. doi:10.1073/pnas.2300204120.
- [18] 陈 英, 朱静静, 左 琦, 等. AIM2 炎症小体介导细胞焦亡的研究进展[J]. *生命科学*, 2023, 35(9): 1200-6. doi:10.13376/j.cbbs/2023132.
- Chen Y, Zhu J J, Zuo Q, et al. Research progress on AIM2 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Chin Bull Life Sci*, 2023, 35(9): 1200-6. doi:10.13376/j.cbbs/2023132.