

· 基础研究 ·

## 高脂饮食通过小肠上皮组织外泌体促进心脏纤维化

赫义君, 盛云露, 夏凡, 丁国宪\*

南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的: 研究高脂饮食通过小肠上皮组织外泌体对小鼠心脏成纤维细胞增殖、分化、胶原蛋白合成的影响。方法: 分别提取正常饮食/高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体, 与小鼠原代心脏成纤维细胞共培养, PKH26标记外泌体, 示踪观察心脏成纤维细胞对外泌体的摄取情况; 对心脏成纤维细胞进行荧光定量PCR, 观察增殖、分化、纤维化、炎症等基因表达; 利用免疫荧光染色观察心脏成纤维细胞 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I型、III型胶原蛋白表达。结果: 正常/高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体均可被心脏成纤维细胞摄取, 且两者摄取效率无差异。相比正常饮食组, 高脂饮食小鼠小肠上皮组织外泌体可显著增加心脏成纤维细胞增殖分化、细胞外基质积聚、炎症等基因表达, 合成 $\alpha$ -SMA蛋白、I型、III型胶原蛋白能力增强。结论: 高脂饮食可以通过小肠上皮组织外泌体促进心脏成纤维细胞增殖、分化及胶原产生。

**[关键词]** 高脂饮食; 小肠上皮组织外泌体; 心脏纤维化; 心脏成纤维细胞

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2023)05-663-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230511

## Highfat diet promotes cardiac fibrosis through exosomes from small intestinal epithelium

HE Yijun, SHENG Yunlu, XIA Fan, DING Guoxian\*

Department of Geriatric Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of high fat diet on the proliferation, differentiation and collagen synthesis of mouse cardiac fibroblasts through exosomes from small intestinal epithelium. **Methods:** Exosomes from small intestinal epithelium of normal/high fat diet mice were extracted and co-cultured with primary mouse cardiac fibroblasts. Exosomes uptake of cardiac fibroblasts of the two groups was observed by PKH26 labeling, and the gene expressions of proliferation, differentiation, fibrosis and inflammation of cardiac fibroblasts were determined by PCR. Immunofluorescence staining was used to observe the expression of  $\alpha$ -SMA, Col1a1 and Col3a1 in cardiac fibroblasts of the two groups. **Results:** The exosomes from small intestinal epithelium of normal/high-fat diet mice could be absorbed by cardiac fibroblasts, and there was no difference in uptake efficiency between them. Compared with the normal diet group, the small intestinal exosomes of mice fed with high fat diet could significantly increase the gene expression of cardiac fibroblasts, such as genes associated with proliferation, differentiation, extracellular matrix accumulation and inflammation, and enhance the ability to synthesize  $\alpha$ -SMA, Col1a1 and Col3a1 protein. **Conclusion:** High fat diet can promote the proliferation, differentiation and collagen production of cardiac fibroblasts through exosomes from small intestinal epithelium.

**[Key words]** high fat diet; exosomes from small intestinal epithelium; myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05):663-668]

随着当今社会经济快速发展, 人们的饮食习惯也在不断变化, 开始摄入越来越多高能量、高脂肪的食物。这种不良的饮食方式造成的肥胖逐渐成

为全世界的健康难题, 不仅影响美观, 更能引起心脏纤维化, 进而导致病理性心肌重构、心脏舒张功能和收缩功能进行性下降, 最终导致心力衰竭<sup>[1]</sup>。研究发现, 高脂饮食(high fat diet, HFD)饲喂小鼠8周即可诱发小鼠心脏组织中I型、III型胶原沉积, IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症因子表达升高<sup>[2]</sup>; 而饲喂18~

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81801383, 82071579)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dinggx@njmu.edu.cn

24周的小鼠左室壁厚度持续增加,心脏体积明显增大,并出现心室舒张功能下降<sup>[3]</sup>。

小肠上皮是机体营养感受与吸收的首要部位,在机体能量稳态调节中发挥着重要功能。HFD可以改变小肠细胞微环境,导致肠道屏障功能下降,炎症增加,引起吸收和分泌功能异常<sup>[4]</sup>。众所周知,小肠是重要的内分泌器官,可以感受各种饮食成分、微生物及代谢产物,在饮食对机体的调控中也起着重要作用,例如肠道内分泌细胞产生的胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激动剂可以逆转HFD和血管紧张素Ⅱ诱导的心肌重构和心功能下降<sup>[5]</sup>,说明小肠上皮直接参与HFD诱导的心血管疾病的发生,对于维护机体代谢健康具有重要意义。小肠上皮还可以通过分泌包含多种mRNA、microRNA、功能性蛋白质的外泌体<sup>[6]</sup>激活或进入受体细胞,发挥通讯及调控作用。然而,目前还未有小肠上皮组织外泌体对心脏纤维化影响的研究报道。

本研究通过对小肠上皮组织外泌体与心脏成纤维细胞共培养,观察心脏成纤维细胞增殖分化、胶原合成能力的变化,初步探讨HFD通过小肠上皮组织外泌体对心脏纤维化的影响,为进一步研究HFD引起心脏纤维化的机制提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性C57BL/6J小鼠,(南京大学动物模式中心、南京医科大学实验动物中心),SPF级环境,温度(23±1)℃。荧光定量PCR仪ABI7000 StepOne-Plus(ABI公司,美国),荧光显微镜(IX-73, Olympus公司,日本);胎牛血清(Gibco公司,美国),DMEM培养基(Thermo Fisher公司,美国);Ⅱ型胶原酶(SIGMA公司,美国); $\alpha$ -SMA、Col1a1、Col3a1一抗及二抗(Proteintech公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HFD动物模型制备

SPF级雄性3周龄C57BL/6J小鼠(南京大学动物模式中心)在南京大学动物模式中心饲养,SPF级环境,分别设为正常饮食组(NCD组)、高脂饮食组(HFD组)。正常饲料3.8 kcal/g,营养成分配比:碳水化合物70%,脂肪10%,蛋白质20%。高脂饲料5.2 kcal/g,营养配比:碳水化合物20%,脂肪60%,蛋白质20%。HFD共12周。HFD处理结束后颈椎脱臼法处死小鼠。

#### 1.2.2 小肠上皮组织外泌体的提取制备

将HFD及正常饮食小鼠的小肠取下后去除掉粪便及肠道黏液,用EDTA将小肠的上皮层和黏膜层分开,低速离心后去除沉淀和细胞碎片,再经过超速离心(100 000 g)后获得小肠上皮组织来源的外泌体。利用BCA法测定外泌体浓度。

#### 1.2.3 成年鼠原代心脏成纤维细胞培养

3月龄C57BL/6J小鼠(南京医科大学实验动物中心),颈椎脱臼处死后在75%乙醇中消毒后剪开胸腔,快速取出心脏,并去除大血管及心房,将心室组织剪碎后用Ⅱ型胶原酶(0.1%)消化(37℃,200 r/min恒温摇床),反复多次消化干净后将上清通过40  $\mu$ m筛网过滤,1 000 r/min离心10 min,弃上清液,用适量完全培养基重悬沉淀(心肌细胞及成纤维细胞)并铺板,90 min后,通过差速贴壁法留取心脏成纤维细胞。

#### 1.2.4 细胞处理及外泌体示踪

将提取的外泌体进行亲脂性染料PKH26荧光染色,将PKH26荧光染色的外泌体加入用无外泌体血清培养3 d的小鼠原代心脏成纤维细胞中,共培养48 h。采用DAPI进行细胞核染色。荧光显微镜下相同曝光时间拍照,采用Image J软件计算两组相对荧光强度,对结果进行定量分析,评估两组外泌体的心脏成纤维细胞摄取效率。

#### 1.2.5 实时荧光定量PCR

TRIzol法裂解提取心脏成纤维细胞RNA,测定RNA的含量和纯度。将RNA逆转成cDNA,用相关引物进行RT-PCR扩增。实时定量PCR(ABI7000, StepOne-Plus,美国)的总反应体系为10  $\mu$ L,反应条件:95℃预变性5 min;94℃变性15 s,60℃退火延伸15 s,40个循环;72~94℃,每升高0.5℃读1次制备熔解曲线。以 $\beta$ -actin基因作为内参,引物序列详见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对内参基因的扩增倍数。

#### 1.2.6 免疫荧光染色

细胞用4%多聚甲醛固定15 min后,0.1% Triton X-100室温通透10 min,PBS洗涤后用山羊血清封闭30 min,采用抗 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)(1:400)、抗Ⅰ型胶原(1:500)、抗Ⅲ型胶原(1:200)一抗孵育过夜,用相对应的二抗孵育细胞。采用DAPI进行核染色。荧光显微镜下观察并拍照。每组选择5个视野,采用Image J软件计算荧光强度,对结果进行定量分析。

### 1.3 统计学方法

用GraphPad Prism 8统计软件进行分析,数据



表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名	引物序列(5'→3')	基因名	引物序列(5'→3')
β-actin	F:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT R:CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC	MMP-9	F:CCACCACCACAACCTGAACCAC R:ACCAACCGTCTTGAAGAAATG
TGF-β	F:CAACAATTCCTGGCGTTACCT R:GCCCTGTATTCGTCTCCTT	LOX	F:CGTCCACGTACGTGCAGAAG R:CCTGTATGCTGTACTGGCCAGAC
ACTA2	F:AAAAGACAGCTACGTGGGTGA R:GCCATGTTCTATCGGGTACTTC	TNF-α	F:CCCTCACACTCACAAACCACC R:CTTTGAGATCCATGCCGTTG
Col1a1	F:GCAACATCTCCCTTTCGTT R:TCCGATGTTTCTGCTTTGTCTCGT	IL-1β	F:GCATCCAGCTTCAAATCTCGC R:TGTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
Col3a1	F:TTGAAGGAGGATGTTCCCATCT R:ACAGACACATAATTTGGCATGGTT	IL-6	F:CCCCAATTTCCAATGCTCTCC R:CGCACTAGGTTTGCCGAGTA
FN1	F:CGTCATTGCCCTGAAGAACA R:AAGGGTAACCAAGTTGGGGAA	F4/80	F:ATGGACAAACCAACTTTCAAGGC R:GCAGACTGAGTTAGGACCACAA
FGF2	F:AGAAGAGCGACCCTCACATCA R:CGGTTAGCACACACTCCTTTG	MKI67	F:CCACATGGATTTCTGAAC R:GCCATCACACAACAGTAG
Postn	F:CCATTGGAGGCAAACAACCTCC R:TTGCTTCTCTCACCATGCA	CDK1	F:TAGCATCAGATGCACGC R:GTGTCCAGCAGTCGCACTAT
MMP-2	F:GCCATCAGCGTTCACATACTT R:GACCCTGAAACCGTGGATGAT	CCNB1	F:CATGGTGCACCTTTCCTCCTT R:AGGTAATGTTGTAGAGTTGGTGTCC

以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用*t*检验进行两组比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心脏成纤维细胞摄取小肠上皮组织外泌体

为了证实心脏成纤维细胞能够摄取小肠上皮组织外泌体,提取了正常饮食/HFD小鼠小肠上皮组织外泌体与原代心脏成纤维细胞共培养,利用PKH26示踪的方法,观察外泌体被心脏成纤维细胞摄取情况。结果发现,两种小肠上皮组织外泌体均可被心脏成纤维细胞摄取,且二者摄取效率无差异(图1)。

### 2.2 心脏成纤维细胞接受小肠上皮组织外泌体刺激后的功能改变

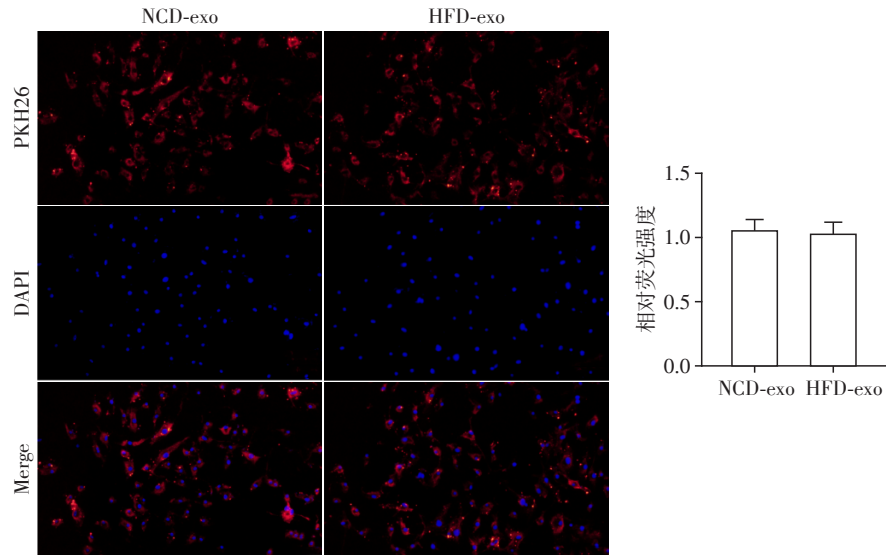
为探究HFD对心脏成纤维细胞纤维化相关基因的影响,我们分别对与高脂/正常饮食小鼠小肠上皮组织外泌体共培养48 h的心脏成纤维细胞纤维化相关基因进行分析。结果显示,HFD组与增殖(MKI67、CDK1、CCNB1)、向肌成纤维细胞分化(TGF-β、ACTA2)、细胞外基质组分合成(Col1a1、Col3a1)、修饰细胞外基质(MMP2、MMP9)、炎症因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)水平等相关基因水平高于NCD组(图2)。以上结果说明HFD鼠小肠上皮组织外泌体可以作用于心脏成纤维细胞可以促进其纤维化相关基因表达。

α-SMA蛋白是肌成纤维细胞的标志,为了进一步证明HFD小鼠小肠上皮组织外泌体促进心脏成纤维细胞分化,利用免疫荧光染色的方法,分别对NCD组及HFD组进行染色,比较两组间相对荧光强度,发现HFD组α-SMA、Col3a1蛋白表达水平显著高于NCD组,Col1a1蛋白表达水平有升高趋势(图3)。

## 3 讨论

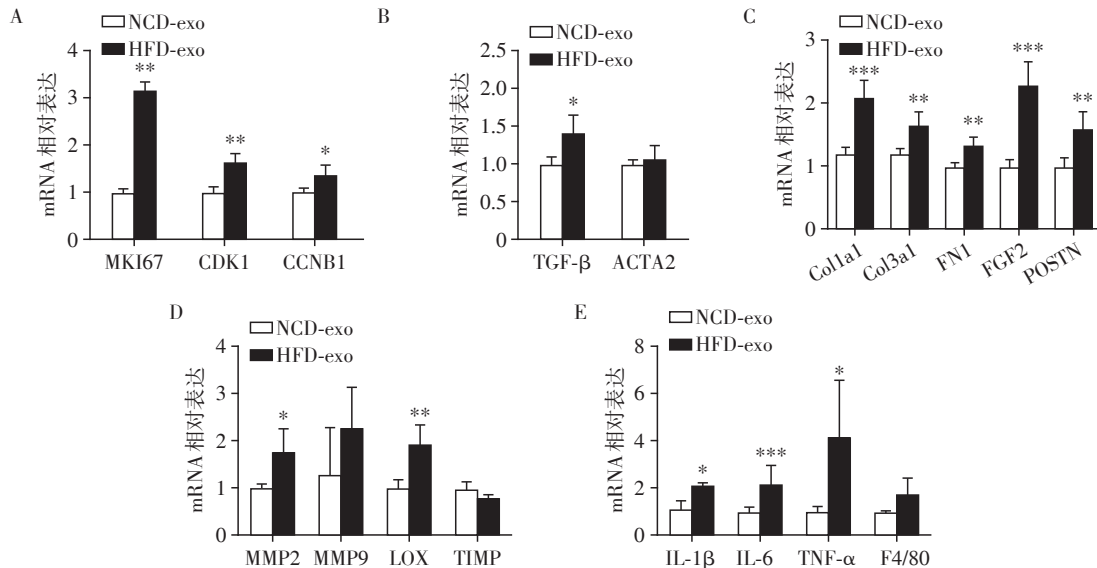
HFD会导致心脏结构和功能发生不良重构,但其潜在机制一直难以明确<sup>[7]</sup>。心脏不良重构主要是由心肌细胞、成纤维细胞功能异常所导致,在正常心脏中,心脏成纤维细胞通过产生与降解细胞外基质,维持心脏结构稳态及正常功能。而当心脏受到损伤,如发生急性心肌梗死时,心肌细胞大量死亡,免疫细胞清除凋亡坏死的心肌细胞并分泌促炎症因子,使静息的成纤维细胞活化增殖成为肌成纤维细胞<sup>[8]</sup>。肌成纤维细胞特异性地表达α-SMA,同时分泌更多I型胶原及III型胶原<sup>[9]</sup>,构建新的细胞外基质以填补死亡细胞丢失留下的空洞,有助于保持心脏结构的完整性<sup>[10]</sup>,其合成细胞外基质的能力远大于成纤维细胞,是心脏纤维化过程中细胞外基质的主要来源。

研究已证实HFD后脂肪组织可以通过脂肪因子、炎症因子、外泌体等方式诱导心肌肥厚、心脏纤



A: 心脏成纤维细胞摄取的小肠上皮组织外泌体( $\times 200$ ), 红色代表PKH26标记的外泌体, 蓝色代表细胞核; B: 两组相对荧光强度定量分析。NCD-exo: 正常饮食外泌体组; HFD-exo: 高脂饮食外泌体组。

图1 心脏成纤维细胞摄取PKH26标记的小肠上皮组织外泌体  
Figure 1 Cardiac fibroblasts uptake PKH26-labeled exosomes



A: 细胞增殖相关基因; B: 心脏成纤维细胞分化基因; C: 细胞外基质组分基因; D: 细胞外基质修饰基因; E: 炎症因子基因; NCD-exo: 正常饮食外泌体组; HFD-exo: 高脂饮食外泌体组。与NCD-exo组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=4$ )。

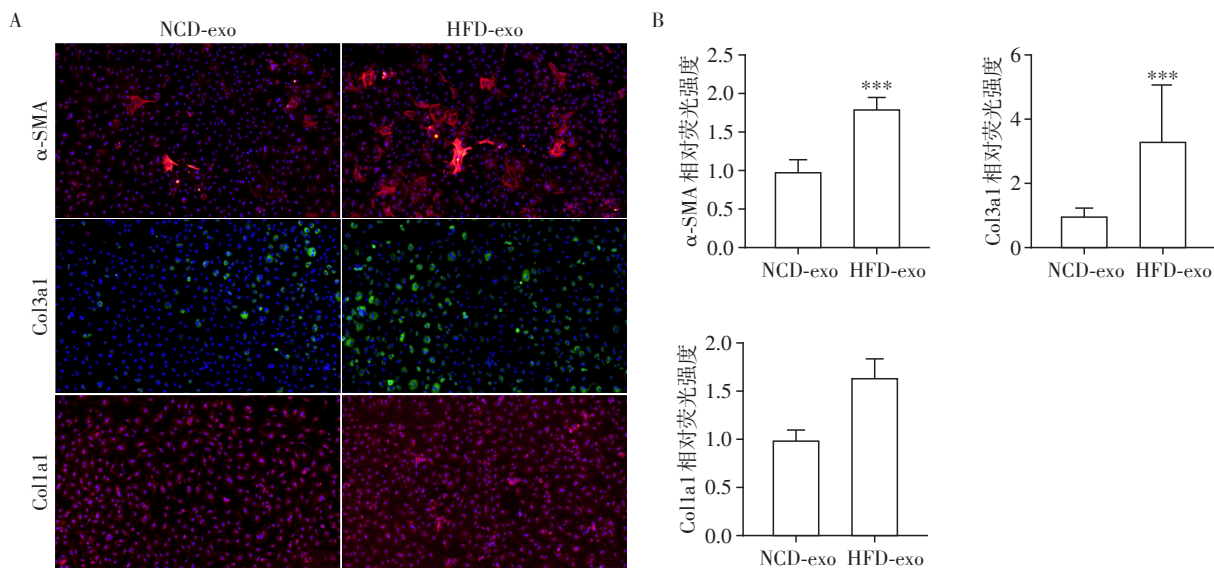
图2 荧光定量PCR检测外泌体影响心脏成纤维细胞基因表达

Figure 2 Exosomes affects gene expression of cardiac fibroblasts by real-time quantitative PCR

维化程度增加,造成心功能下降<sup>[12]</sup>,说明脂肪组织在HFD引起的心脏疾病中起着重要作用。小肠上皮也与心脏功能密切相关,研究发现动脉粥样硬化的发生往往与肠上皮功能障碍有关<sup>[6]</sup>。在HFD导致心血管疾病的研究中,小肠上皮也是关键的一部分,He等<sup>[12]</sup>研究证实,小肠上皮层内的 $\beta 7$ +天然肠上皮内T淋巴细胞(天然IEL)调节全身代谢,而缺失天然IEL的小鼠代谢活跃,摄入HFD后不会出

现肥胖相关心血管疾病。目前尚无针对小肠上皮对HFD后心脏疾病的研究,但其无疑为研究代谢疾病提供了潜在的新靶点。

小肠上皮的生物学功能与其分泌的外泌体密切相关。外泌体包含丰富的生物活性成分,包括核酸、蛋白质、脂类、氨基酸和代谢物,是细胞之间信息和物质交换的基础。目前关于外泌体对心脏病理生理过程的调控的研究正在不断加深,诸多文



A: NCD-exo 组与 HFD-exo 组免疫荧光染色( $\times 200$ ), 红色表示 $\alpha$ -SMA、Col1a1, 绿色表示 Col3a1, 蓝色表示细胞核; B: 蛋白相对荧光强度定量比较。NCD-exo: 正常饮食外泌体组; HFD-exo: 高脂饮食外泌体组。与 NCD-exo 组比较, \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图3 外泌体影响心脏成纤维细胞功能性蛋白质合成

Figure 3 Exosomes affect functional protein synthesis of cardiac fibroblasts

献证实,多种细胞来源的外泌体均对心脏健康产生重要影响<sup>[13]</sup>。来源于间充质干细胞的外泌体抑制心肌纤维化的研究也有报道<sup>[14]</sup>。

本研究中,分离提取小肠上皮组织来源的外泌体,直接刺激心脏成纤维细胞,通过一系列的实验证实了来自 HFD 小鼠小肠组织中的外泌体起到了促进心脏成纤维细胞增殖及向肌成纤维细胞分化并产生 I 型、III 型胶原的能力,同时还使产生赖氨酰氧化酶(LOX)、MMP-2、MMP-9 的基因表达升高,增强了心脏成纤维细胞修饰细胞外基质的能力,升高的 LOX 可以促进胶原蛋白及纤连蛋白形成交织结构,增加细胞外基质刚度<sup>[15]</sup>,进而降低心脏的舒张功能。

本研究结果也证实了与 HFD 小肠上皮组织外泌体共培养的成纤维细胞 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子 mRNA 表达水平显著升高,说明 HFD 小鼠小肠上皮外泌体能够增强原代心脏成纤维细胞炎症功能,炎症因子对成纤维细胞增殖及向肌成纤维细胞分化起至关重要的作用<sup>[16]</sup>,长期的炎症刺激是心脏纤维化发生的重要危险因素。研究也证实肠道是最先响应 HFD 的器官,HFD 引发的肠道炎症反应先于脂肪炎症的发生,且抑制肠道炎症可以缓解脂肪代谢功能异常<sup>[17]</sup>。而 HFD 小肠上皮组织来源的外泌体与原代内脏脂肪细胞的共培养也引起了内脏脂肪细胞炎症因子转录水平升高<sup>[18]</sup>,进一步说明了外泌体在细胞间相互应答中起到关键作用。本

研究推测,小肠上皮细胞可能通过外泌体造成心脏成纤维细胞炎症增加,刺激其增殖分化以及胶原合成,加重细胞外基质沉积,造成心脏纤维化。本研究尚存在一些不足,未进行动物实验观察心脏摄取小肠上皮组织外泌体后的病理生理表现,在未来的研究中可以通过外泌体尾静脉注射等方法进行体内研究,进一步探究小肠上皮组织来源的外泌体在 HFD 引发心脏疾病中的作用。综上,本研究证明了小肠上皮组织外泌体在心脏纤维化中发挥的重要作用,拮抗其作用抑制心脏成纤维细胞功能进而逆转心脏纤维化值得未来进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] REN J, WU NN, WANG S, et al. Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(4): 1745-1807
- [2] 胥军, 毕薇. 高脂饮食引起小鼠心律失常及心肌纤维化[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(3): 216-220
- [3] JINJIN J, YANG L, SHUANG L. Combined exposure of fine particulate matter and high-fat diet aggravate the cardiac fibrosis in C57BL/6J mice [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 12: 2203
- [4] 金焱, 俞静, 夏凡, 等. 高脂饮食影响小鼠空回肠上皮功能的差异性研究[J]. *南京医科大学学报*, 2022, 42(5): 619-624
- [5] WITHAAR C, MEEMS LMG, MARKOUSIS-MAVROGENIS G, et al. The effects of liraglutide and dapagliflozin



- on cardiac function and structure in a multi-hit mouse model of heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(9):2108-2124
- [6] ZHENYU D, CUIYU Z, BAOKUN Z. Unraveling the proteomic landscape of intestinal epithelial cell-derived exosomes in mice[J]. *Front Physiol*, 2022, 77(3):671
- [7] YAN G, GUANGWEI L, JUN T. Double knockout of Akt2 and AMPK accentuates high fat diet - induced cardiac anomalies through acGAS - STING - mediated mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(10):165855
- [8] MAKSIM V P, XIAOJIE W, SARTHAK S, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease[J]. *Cell*, 2021, 184(15):3852-3872
- [9] SIGNE C, JOANN T, CHRISTIAN S, et al. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(1):99-107
- [10] MENGRUI L, BLANCA L, KE C. Cardiac fibrosis: myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 173:504-519
- [11] MIN H, JUAN L, YUNLU S, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor attenuates high-fat diet induced cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 125:106-116
- [12] HE S, KAHLES F, RATTIK S, et al. Gut intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2019, 566(7742):115-119
- [13] JULIA H, WENBIN T, AMANDA C. Roles of exosomes in cardiac fibroblast activation and fibrosis[J]. *Cells*, 2021, 10(11):2933
- [14] ZHAO J, LI X, HU J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7):1205-1216
- [15] BEGOÑA L, RAMÓN Q, ARANTXA G, et al. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure[J]. *Hypertension*, 2009, 53(2):236-242
- [16] FENG B, CHEN S, GORDON A D, et al. miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 105:70-76
- [17] KAWANO M, MIYOSHI M, OGAWA A et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet[J]. *J Nutr Sci*, 2016, 5:e23
- [18] 夏凡. 小肠上皮组织外泌体提取与鉴定及功能研究[D]. 南京:南京医科大学, 2019

[收稿日期] 2023-01-30

(本文编辑:唐震)