

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.22.008

基于 NF- κ B 通路探讨 IRAK3 基因表达对脂多糖诱导的 心肌细胞损伤的作用及机制*

李 伟 王龙涛 陈川斌 林 朋 李小蕊

(海南医学院第二附属医院心血管内科 海南 海口 570100)

摘要 目的:探讨白介素 1 受体相关激酶 3(IRAK3)基因表达对脂多糖(LPS)诱导的心肌细胞损伤的作用及机制。**方法:**分离培养 SD 乳鼠原代心肌细胞,随机分为对照组、LPS 组、siIRAK3 组和 siIRAK3+LPS 组。siIRAK3 组和 siIRAK3+LPS 组心肌细胞转染 IRAK3 沉默核糖核酸(siRNA),对照组和 LPS 组转染阴性对照 siRNA。转染 48 h 后 LPS 组和 siIRAK3+LPS 组分别用 LPS (10 μ g/mL)处理心肌细胞 6 h,对照组和 siIRAK3 组加入等量的 PBS 溶液。采用免疫蛋白印迹法(Western blot)检测 LPS 对心肌细胞 IRAK3 表达的影响,采用细胞计数试剂盒 -8(CCK-8)法检测四组心肌细胞增殖,采用原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测四组心肌细胞凋亡。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测四组心肌细胞上清液中炎症因子白介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的水平。Western blot 检测核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白和 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B- α)的表达。**结果:**Western bolt 结果显示,LPS 使原代心肌细胞 IRAK3 的蛋白表达升高($P<0.05$),CCK-8 和 TUNEL 结果显示,与对照组相比,LPS 组心肌细胞活力降低,心肌细胞凋亡比例升高($P<0.05$);siIRAK3 组细胞活力和细胞凋亡比例与对照组相比均无明显差异($P>0.05$)。与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞活力升高,心肌细胞凋亡比例降低($P<0.05$)。与对照组相比,LPS 组心肌细胞分泌的 IL-6、TNF- α 升高,NF- κ B 蛋白表达升高而 I κ B- α 蛋白表达降低($P<0.05$)。与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞炎症因子分泌减少,NF- κ B 蛋白表达降低,I κ B- α 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论:**干扰 IRAK3 基因表达通过负向调控 NF- κ B 通路减轻 LPS 诱导的大鼠原代心肌细胞损伤。

关键词:IRAK3;LPS;心肌细胞损伤;NF- κ B 通路

中图分类号:R-33;Q78;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)22-4242-05

Based on NF- κ B Pathway to Explore the Effect and Mechanism of IRAK3 Gene Expression on Lipopolysaccharide Induced Cardiomyocyte Injury*

LI Wei, WANG Long-tao, CHEN Chuan-bin, LIN Peng, LI Xiao-rui

(Department of Internal Medicine-Cardiovascular, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College,
Haikou, Hainan, 570100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3) gene expression on lipopolysaccharide (LPS)-induced cardiomyocyte injury. **Methods:** Primary cardiomyocyte of SD suckling mice were isolated and cultured, and they were divided into the control group, LPS group, siIRAK3 group and siIRAK3 combined with LPS group. The cardiomyocyte in the siIRAK3 group and siIRAK3 combined with LPS group were transfected with IRAK3 silencing ribonucleic acid (siRNA). Control group and LPS group were transfected with negative control siRNA. 48 h after transfection, cardiomyocyte in the LPS group and siIRAK3 combined with LPS group were treated with LPS (10 μ g/mL) for 6h respectively, and the control group and siIRAK3 group were added with the same amount of PBS solution. The Western blot (Western bolt) was used to detect the effect of LPS on cardiomyocyte IRAK3 expression, The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the proliferation of four groups of cardiomyocyte, and Terminal deoxynucleotidyl transferase-UTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of four groups of cardiomyocyte. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the inflammatory factors interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels in the supernatant of the four groups of cardiomyocyte. The expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein and NF- κ B inhibitor protein α (I κ B- α) were detected by Western Blot. **Results:** Western Blot results showed that LPS increased the protein expression of IRAK3 in primary cardiomyocyte ($P<0.05$), CCK-8 and TUNEL results showed that compared with the control group, the viability of cardiomyocyte in the LPS group was decreased, and the cardiomyocyte apoptosis ratio was increased ($P<0.05$). There were no significant differences in cell viability and cell apoptosis ratio between siIRAK3 group and control group ($P>0.05$). Compared with the LPS group, the viability of cardiomyocyte in the siIRAK3 combined with LPS group was increased, and the cardiomyocyte apoptosis ratio was decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the secretion of IL-6 and TNF- α in the

* 基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200521)

作者简介:李伟(1987-),男,本科,主治医师,从事心血管疾病方向的研究,E-mail: 15103652389@163.com

(收稿日期:2022-05-06 接受日期:2022-05-28)

cardiomyocyte of LPS group was increased, the protein expression of NF- κ B was increased, and the protein expression of I κ B- α was decreased ($P<0.05$). Compared with the LPS group, siIRAK3 combined with LPS group showed decreased secretion of inflammatory cytokines, decreased expression of NF- κ B protein, and increased expression of I κ B- α protein ($P<0.05$). **Conclusion:** Interference of IRAK3 gene expression attenuates LPS-induced injury of primary rat cardiomyocyte by negatively regulating NF- κ B pathway.

Key words: IRAK3; LPS; Myocardial cell injury; NF- κ B pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)22-4242-05

前言

根据 1995 年世界卫生组织对心肌病的定义和分类, 心肌病按病因可分为三类: 特发性、自身免疫性和感染性^[1]。心肌炎是导致急性心力衰竭、慢性扩张型心肌病和猝死的原因之一^[2]。心肌炎大多数是由药物感染、细菌感染、病毒感染和自身免疫性疾病引起^[3]。持续的心肌炎症加重心肌细胞损伤, 最终导致心力衰竭或猝死。因此, 寻找有效的抗炎药物对心肌炎的治疗具有重要意义。脂多糖(LPS)可以诱导大量细胞因子的释放, 例如炎症细胞因子白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等^[4]。有文献报道 IL-6、TNF- α 的分泌可引起心肌细胞收缩性损伤^[5]。因此, LPS 经常被用作研究心肌细胞损伤的诱导剂。白介素 1 受体激酶 (IRAK) 家族蛋白介导固有免疫中的 toll 样受体 (TLR) 和白介素 -1 受体 (IL-1R) 家族的下游信号通路^[6]。Kuo CC^[7]等人的报道称 IRAK3 甲基化与肝癌患者不良预后及肿瘤分期有关, 提示白介素 1 受体相关激酶 3 (IRAK3) 有可能成为评估肝癌患者预后的指标。有研究发现 IRAK3 的表达水平与小鼠结肠炎相关的肿瘤发生相关, 并有望成为预测结肠炎向癌症发展的生物标志物^[8]。此外, IRAK1 作为 IRAK 家族的一员, 有报道称其能够抑制 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B- α) 的磷酸化^[9]。核转录因子 - κ B (NF- κ B) 在炎症反应、免疫应答和细胞生长等过程中发挥着重要的作用^[10]。GE ZW^[11]等人的报道指出 IRAK3 基因沉默通过负调控 NF- κ B 通路减轻了急性心肌梗死模型小鼠心脏破裂和心脏炎症的发生。本研究利用 LPS 诱导大鼠原代心肌细胞损伤, 探究 IRAK3 基因在心肌损伤中的作用及其机制, 现作以下报道。

1 材料与方法

1.1 主要材料

SD 乳鼠购自北京维通利华公司, IRAK3 沉默核糖核酸 (siRNA) 由上海吉玛制药技术有限公司构建, 胶原酶购自北京索莱宝科技有限公司。胰酶购自美国 Gibco 公司, DMEM 培养基、M199 培养基、PBS 溶液、HEPES 溶液和青霉素链霉素溶液均购自中科迈晨科技有限公司。Opti-mem 培养基和胎牛血清 (FBS) 均购自美国 Gibco 公司。lipo2000 购自美国 invitrogen 公司, 细胞计数试剂盒 -8 (CCK-8) 试剂盒购自日本同仁化学研究所, 原位末端转移酶标记技术 (TUNEL) 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 蛋白质定量 (BCA) 试剂盒购自北京康为世纪生物技术有限公司。大鼠 IL-6 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒和大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒均购自上海通蔚科技有限公司。IRAK3、NF- κ B、I κ B- α 抗体均购自美国 Abcam 公司, GAPDH 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 辣根过氧化

物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 原代心肌细胞分离和培养

所有动物实验经我院动物伦理委员会批准。按照文献方法^[12]提取原代心肌细胞, 选取 1-5 天 (最好是出生 72 小时内的) 的 SD 乳鼠 6 只, 用碘伏浸泡后在剑突处剪开胸腔, 取出心脏。立即放入含有 10% 双抗的预冷的无菌 PBS 中剪开心脏, 用含 7% 双抗的 PBS 冲洗一遍心脏, 再放入不含双抗的 PBS 溶液中冲洗两次。将心肌组织放入离心管中剪碎, 加入 5 mL 消化酶 (含胶原酶 0.4 mg/mL、胰酶 0.6 mg/mL、5.4 mM KCl 和 0.8 mM MgSO₄ 的 20 mM HEPES 溶液) 消化。800 rpm 离心 5 分钟, 用细胞完全培养液 (70% DMEM, 15% M199, 15% FBS 和 100 U/mL 青霉素和链霉素) 重悬细胞, 将心肌细胞在提前包被 1% 明胶 (37℃, 30 min) 的 60 mm 原代培养皿上培养。18 h 后, 更换无血清维持培养基 (80% DMEM, 20% M199, 100 U/mL 青霉素和链霉素) 继续培养, 细胞生长至 70-80% 融合时进行传代。

1.3 分组和细胞转染

分离培养 SD 乳鼠原代心肌细胞, 随机分为对照组、LPS 组、siIRAK3 组和 siIRAK3+LPS 组。siIRAK3 组和 siIRAK3+LPS 组心肌细胞转染 IRAK3 siRNA, 对照组和 LPS 组转染阴性对照 siRNA。转染 48 h 后 LPS 组和 siIRAK3+LPS 组分别用 LPS (10 μ g/mL) 处理心肌细胞 6 h, 对照组和 siIRAK3 组加入等量的 PBS 溶液。将处于对数生长期的第 3-4 代原代心肌细胞接种于 24 孔板中, 细胞生长至 50-60% 融合时进行转染。首先取管 1 将 20 pmol siRNA 与 50 μ L opti-mem 培养基混合, 再取管 2 将 1 μ L lipo2000 与 50 μ L opti-mem 培养基混合, 室温放置 5 分钟。将管 1 和管 2 混合, 室温放置 20 分钟。将细胞培养液弃去, 加入 400 μ L 无血清培养基。将混合的 siRNA 和转染试剂加入孔中。4-6 小时更换维持培养基。对照组和 LPS 组转染阴性对照 siRNA, siIRAK3 组和 siIRAK3+LPS 组转染 IRAK3 siRNA。

1.4 Western blot 检测心肌细胞 IRAK3 的蛋白表达

收集 4 组稳定转染的心肌细胞, 加入蛋白裂解液充分裂解, 用 BCA 试剂盒测蛋白浓度, 加入适量蛋白上样缓冲液 100℃煮 5 min 使蛋白变性。根据蛋白浓度定量 40 μ g 蛋白加入上样孔中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 结束后依次进行转膜封闭, 将膜充分浸入 IRAK3 一抗溶液中 4℃孵育过夜, 第二天孵育相对应的 HRP 标记的二抗, 洗膜后滴加 ECL 发光液用凝胶成像系统进行发光。保存图像用 Image J 进行灰度值计算, 用 GAPDH 作为内参, 对目的基因进行半定量统计分析。

1.5 CCK-8 法检测细胞活力

将处于对数生长期的第 3-4 代原代心肌细胞接种于 96 孔

板中,细胞生长至 50-60%融合时进行转染,转染步骤同 1.3(体系同比例减少)。转染 24 小时后,LPS 组和 siIRAK3+LPS 组加入 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS,对照组和 siIRAK3 组加入等量 PBS。6 小时后弃去培养液按照 CCK-8 说明书,加入 10 μL CCK-8 溶液和 100 μL 维持培养基。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 2-4 小时,用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度,每个孔的吸光度代表细胞活力。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

在 24 孔板中放入细胞爬片,细胞进行转染和 LPS 处理后,将细胞用 0.5-1 mL 甲醛室温固定 30 分钟。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 分钟。向爬片上滴加 100 μL 细胞通透液,5 分钟。将 Labeling Solution 和 TdT 以 25:1 的比例混匀滴加在爬片上,放于湿盒中,与 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 小时。向爬片上滴加 100 μL 细胞通透液,室温静置 5 分钟,重复 3 次。滴加适量抗荧光淬灭封片剂,在荧光显微镜下计数阳性细胞。

1.7 ELISA 检测心肌细胞上清液中 IL-6、TNF- α 的水平

取细胞培养上清液转移至新的离心管中。用 ELISA 试剂盒测定 IL-6、TNF- α 的水平。在 ELISA 96 孔板中加入样品和标准品,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。用洗涤液洗板 5 次,加入酶标试剂,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。再次用洗涤液洗板 5 次,加入显色液 A、B 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 分钟。加入终止液,15 分钟内用酶标仪读取 450 nm 波长处的吸光值。根据标准品的浓度计算待测样品的浓度。

1.8 Western blot 检测 NF- κB 、I κB - α 的表达

将处理完的心肌细胞用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液充分裂解,用 BCA 试剂盒测蛋白浓度,加入适量蛋白上样缓冲液 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5min 使蛋白变性。根据蛋白浓度定量 40 μg 蛋白加入上样孔中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,结束后依次进行转膜封闭,将膜充分浸入 NF- κB 、I κB - α 一抗溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,第二天孵育相对应的 HRP 标记的二抗,洗膜后滴加 ECL 发光液用凝胶成像系统进行发光。保存图像用 Image J 进行灰度值计算,用 GAPDH 作为内参,对目的基因进行半定量统计分析。

1.9 统计学处理

采用 Graphpad 8.0 软件进行制图及统计学分析,计量资料符合正态分布以算数平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,两组间比较采用 t 检验,三组或以上整体比较使用单向方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 时被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 使心肌细胞中 IRAK3 表达升高

与对照组相比,LPS 组 IRAK3 的蛋白表达升高($P<0.05$),siIRAK3 组 IRAK3 蛋白表达明显降低($P<0.05$);与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组 IRAK3 蛋白表达有所降低($P<0.05$)。见图 1。

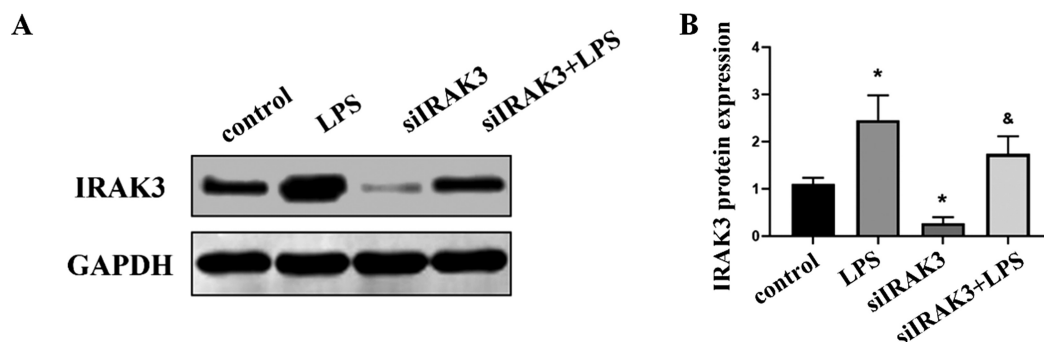


图 1 各组心肌细胞 IRAK3 蛋白的表达

Fig.1 Expression of IRAK3 protein in cardiomyocyte of each group

Note: A: protein expression map of IRAK3 detected by Western blot. B: Statistical analysis protein expression of IRAK3 in cardiomyocyte of each group.

Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the LPS group, & $P<0.05$.

2.2 干扰 IRAK3 对 LPS 诱导的心肌细胞活力的影响

LPS 组心肌细胞活力与对照组相比明显降低($P<0.05$),siIRAK3 组心肌细胞活力与对照组无明显差异($P>0.05$)。与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞活力升高($P<0.05$)。见图 2。

2.3 干扰 IRAK3 降低 LPS 引起的心肌细胞凋亡

与对照组相比,LPS 组心肌细胞凋亡比例明显升高($P<0.05$),siIRAK3 组心肌细胞凋亡比例无明显差异($P>0.05$);与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞凋亡比例降低($P<0.05$)。见图 3。

2.4 干扰 IRAK3 减少 LPS 引起的心肌细胞炎症因子分泌

与对照组相比,LPS 组心肌细胞上清液中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平均升高($P<0.05$),siIRAK3 组心肌细胞上清液中

IL-6 和 TNF- α 水平无明显差异($P>0.05$);与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$)。见图 4。

2.5 干扰 IRAK3 基因表达负向调控 NF- κB 通路

LPS 组 NF- κB 的蛋白表达较对照组升高($P<0.05$),I κB - α 的蛋白表达较对照组降低($P<0.05$),siIRAK3 组与对照组比较无显著差异($P>0.05$);与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组 NF- κB 的蛋白表达降低($P<0.05$),siIRAK3+LPS 组 I κB - α 的蛋白表达升高($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

炎症反应是心脏疾病最常见的发病机制^[13,14]。临床研究表明,TNF- α 、IL-6 等炎症因子参与了心肌炎中心肌细胞损伤的

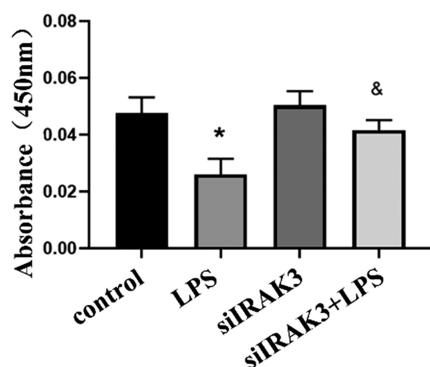


图 2 各组心肌细胞活力比较

Fig. 2 Comparison of cardiomyocyte viability in each group

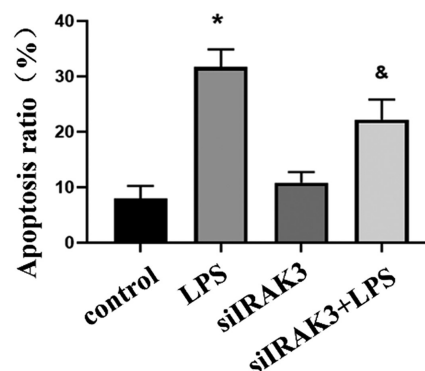
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.Compared with the LPS group, & $P < 0.05$.

图 3 各组心肌细胞凋亡比例比较

Fig. 3 Comparison of cardiomyocyte apoptosis ratio in each group

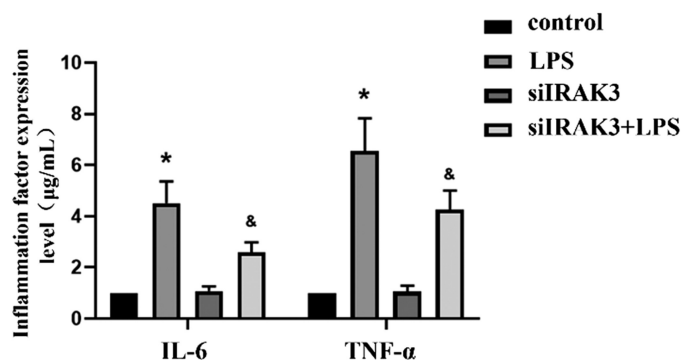
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.Compared with the LPS group, & $P < 0.05$.

图 4 各组心肌细胞上清液中炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平比较

Fig. 4 Comparison of the levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in the supernatant of cardiomyocyte in each group

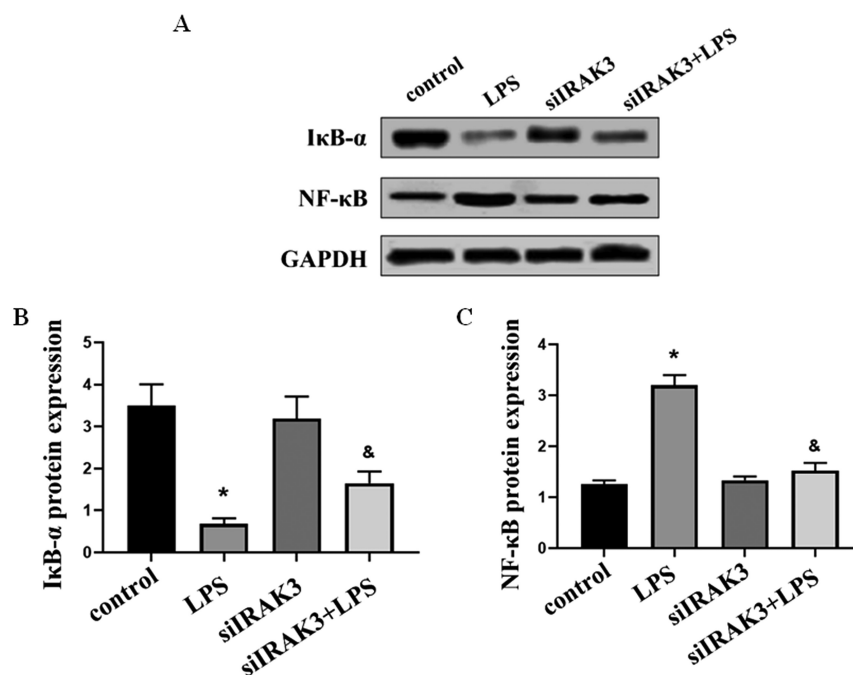
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the LPS group, & $P < 0.05$.

图 5 各组心肌细胞 NF-κB、IκB-α 蛋白表达

Fig. 5 The protein expression of NF-κB and IκB-α in cardiomyocyte of each group

Note: A: Protein expression map of NF-κB and IκB-α detected by Western Bolt. B: Statistical analysis protein expression of IκB-α in cardiomyocyte of each group. C: Statistical analysis protein expression of NF-κB in cardiomyocyte of each group.

Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the LPS group, & $P < 0.05$.

发病机制^[15]。LPS 作为脓毒症心肌炎的体内外模型已在许多研究中被广泛应用^[16-18]。腹腔注射 LPS 可显著增加心肌组织中炎症因子的表达和心脏功能障碍^[19],LPS 可诱导炎症细胞因子的产生和影响心脏输出功能^[20]。本研究中利用 LPS 诱导心肌细胞炎症损伤建立体外心肌炎模型,本研究结果显示:LPS 组心肌细胞活力与对照组相比明显降低($P<0.05$),LPS 组心肌细胞凋亡比例与对照组相比明显升高($P<0.05$),证实 LPS 显著抑制了乳鼠原代心肌细胞的活力,增加了凋亡细胞比例。

有研究显示^[11],在体内沉默 IRAK3 基因能减轻急性心肌梗死模型小鼠心脏破裂和心室重构,提示 IRAK3 基因可能在心脏疾病发病机制中发挥重要作用。IRAK3 蛋白通过调控 TLR/NF- κ B 信号转导间接参与致病因素的固有免疫反应^[21-23]。本研究在细胞水平探究 IRAK3 基因在 LPS 诱导的乳鼠原代心肌细胞损伤中的作用,LPS 处理后的原代心肌细胞中 IRAK3 的表达升高,提示 IRAK3 的表达可能参与 LPS 诱导的心肌细胞损伤。本研究用 siRNA 技术敲低心肌细胞中 IRAK3 基因的表达,发现干扰 IRAK3 基因表达后,LPS 引起的心肌细胞活力降低和凋亡比例增加都有所减轻,表明 IRAK3 在心肌细胞生存和凋亡发挥重要作用。

LPS 能通过激活 Toll 样受体(TLR)进而激活 NF- κ B^[24,25]。活化的 NF- κ B 进入细胞核通过上调一氧化氮、环氧合酶 2 和前列环素 2 等表达介导炎症因子(如 TNF- α 、IL-6 和 IL-18)的分泌^[26-28]。本研究也证实了 LPS 诱导心肌细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 的分泌增加。此外,LPS 也上调了 NF- κ B 的蛋白表达,同时抑制了 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B- α 的表达。为了探究 IRAK3 对细胞凋亡的影响是否通过调控 NF- κ B 的表达而发挥作用,本研究干扰 IRAK3 基因表达后检测 LPS 诱导心肌细胞炎症因子 IL-6、TNF- α 的分泌,结果显示:与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组心肌细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$)。同时,本研究检测了 NF- κ B 及 I κ B- α 的蛋白表达,结果显示:与 LPS 组相比,siIRAK3+LPS 组 NF- κ B 的蛋白表达降低($P<0.05$),siIRAK3+LPS 组 I κ B- α 的蛋白表达升高($P<0.05$),相比于单纯 LPS 刺激,干扰 IRAK3 基因表达后 LPS 刺激能使心肌细胞中 I κ B- α 的蛋白表达增加,NF- κ B 的表达降低,提示干扰 IRAK3 基因表达通过负调控 NF- κ B 的表达减少心肌细胞炎症因子的分泌。

干扰 IRAK3 基因表达后,LPS 诱导的 IL-6 和 TNF- α 的分泌减少,脂多糖诱导的乳鼠原代心肌细胞凋亡比例降低。进一步的实验表明,IRAK3 基因沉默减轻了 LPS 诱导的心肌细胞凋亡和心肌细胞的炎症,NF- κ B 蛋白表达降低,表明干扰 IRAK3 基因表达通过负调控 NF- κ B 的表达减轻 LPS 诱导的心肌细胞损伤。因此,抑制 IRAK3 基因表达可能成为治疗心肌炎的一种潜在的治疗方法。

综上所述,本研究证明了干扰 IRAK3 基因表达可以减轻 LPS 引起的心肌细胞凋亡和炎症反应,进一步研究发现 IRAK3 基因表达降低负调控 NF- κ B 蛋白表达,揭示了 IRAK3 在心肌细胞炎症反应中的分子机制,为临床治疗提供了一个新的靶点。

参考文献(References)

[1] Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995

World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies[J]. Circulation, 1996, 93(5): 841-842

- [2] Baqi A, Ur Rehman F, Memon PS, et al. Prevalence and Outcomes of Myocarditis in Dengue-Infected Patients Admitted to a Tertiary Care Hospital of Low-Middle Income Country[J]. Glob Heart, 2022, 17(1): 44
- [3] Razzano D, Fallon JT. Myocarditis: somethings old and something new[J]. Cardiovasc Pathol, 2020, 44(2): 107155
- [4] Chen Q, Liang Z, Yue Q, et al. A Neuropeptide Y/F-like Polypeptide Derived from the Transcriptome of Turbinaria peltata Suppresses LPS-Induced Astrocytic Inflammation [J]. J Nat Prod, 2022, 85(6): 1569-1580
- [5] 刘怡萍, 毕玫荣, 管长丽. 细胞因子 TNF- α 、IL-6 与病毒性心肌炎的预后[J]. 医学综述, 2006, 12(17): 1054-1055
- [6] Zheng Y, He JQ. Interleukin Receptor Associated Kinase 1 Signaling and Its Association with Cardiovascular Diseases [J]. Rev Cardiovasc Med, 2022, 23(3): 97
- [7] Kuo CC, Shih YL, Su HY, et al. Methylation of IRAK3 is a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(13): 3960-3969
- [8] Xu D, Zhang H, Wang X, et al. Expression of IRAK 3 is associated with colitis associated tumorigenesis in mice[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3): 3415-3420
- [9] Muroi M, Tanamoto K. IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(2): 255-263
- [10] 龚建苗, 陈庆森, 阎亚丽, 等. 生物活性肽调节 NF- κ B 信号通路的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 379-388
- [11] Ge ZW, Wang BC, Hu JL, et al. IRAK3 gene silencing prevents cardiac rupture and ventricular remodeling through negative regulation of the NF- κ B signaling pathway in a mouse model of acute myocardial infarction[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11722-11733
- [12] Sreejit P, Kumar S, Verma RS. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2008, 44(3-4): 45-50
- [13] 宋颖, 丁丁, 刘春晓, 等. IL-1 及家族成员在心肌炎中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(35): 6998-7000, 6922
- [14] Meng YY, Liu Y, Hu ZF, et al. Sanguinarine Attenuates Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Apoptosis by Inhibiting the TLR4/NF- κ B Pathway in H9c2 Cardiomyocytes [J]. Curr Med Sci, 2018, 38(2): 204-211
- [15] 王仲华, 周荣靓, 方永祥, 等. 病毒性心肌炎血清 IL-18、IL-6、TNF- α 水平的变化及意义研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(11): 1563-1564
- [16] Tung CL, Hsieh DJ, Baskaran R, et al. LPS-enhanced IGF-1IR pathway to induce H9c2 cardiomyoblast cell hypertrophy was attenuated by Carthamus tinctorius extract via IGF-1R activation[J]. Environ Toxicol, 2020, 35(2): 145-151
- [17] Chen L, Liu P, Feng X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway in vitro and in vivo[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3178-3189

(下转第 4278 页)

- [16] Dai W, Wang X, Xie R, et al. Acupotomy combined with massage for cervical spondylotic radiculopathy: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(32): e21587
- [17] Cao S, Chen Y, Zhang F, et al. Clinical Efficacy and Safety of "Three-Dimensional Balanced Manipulation" in the Treatment of Cervical Spondylotic Radiculopathy by Finite Element Analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 55(13): 632-638
- [18] Du J, Liu H, Xu J, et al. Post-stroke constipation treated with acupoint embedding therapy: a multi-center randomized controlled trial[J]. *Chin Acup Moxibust*, 2020, 40(5): 493-497
- [19] Dai L, Ooi VV, Zhou W, et al. Acupoint embedding therapy improves nonalcoholic fatty liver disease with abnormal transaminase: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(3): e18775
- [20] McCartney S, Baskerville R, Blagg S, et al. Cervical radiculopathy and cervical myelopathy: diagnosis and management in primary care [J]. *Br J Gen Pract*, 2018, 68(666): 44-46
- [21] Savva C, Korakakis V, Efstathiou M, et al. Cervical traction combined with neural mobilization for patients with cervical radiculopathy: A randomized controlled trial [J]. *J Bodyw Mov Ther*, 2021, 26(5): 279-289
- [22] Wu JS, Liu YJ, Wu JR, et al. Experience in treatment of cervical spondylotic radiculopathy by relaxing the sinew of hand three yang meridians with the tendon-bone needling therapy of Chinese medicine [J]. *Chin Acup Moxibust*, 2021, 41(2): 197-200
- [23] Cui XJ, Yao M, Ye XL, et al. Shi-style cervical manipulations for cervical radiculopathy: A multicenter randomized-controlled clinical trial[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(31): e7276
- [24] Xie Y, Fan Y, Fan W, et al. Application effect of catgut-embedding therapy combined with minimally invasive surgery for slow transit constipation: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(35): e21875
- [25] Chen T, Wan YJ, Sun DH, et al. Preliminary research of deqi and the tissue depth of acupoint thread embedding therapy on weight reduction under ultrasonic guidance [J]. *Chin Acup Moxibust*, 2021, 41(6): 628-632
- [26] Ko WK, Lee SJ, Kim SJ, et al. Direct Injection of Hydrogels Embedding Gold Nanoparticles for Local Therapy after Spinal Cord Injury[J]. *Biomacromolecules*, 2021, 22(7): 2887-2901
- [27] Young IA, Pozzi F, Dunning J, et al. Immediate and Short-term Effects of Thoracic Spine Manipulation in Patients With Cervical Radiculopathy: A Randomized Controlled Trial [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2019, 49(5): 299-309
- [28] Shin Y, Han K, Lee YH. Temporal Trends in Cervical Spine Curvature of South Korean Adults Assessed by Deep Learning System Segmentation, 2006-2018[J]. *JAMA Netw Open*, 2020, 3(10): e2020961
- [29] Sun W, Chu N, Ma Y, et al. Effective anatomic structures of ultrasound-guide acupoint embedding therapy for cervical spondylosis[J]. *Chin Acup Moxibust*, 2015, 35(10): 1001-1004
- [30] Kim E, Kim YS, Kim YI, et al. Effectiveness and Safety of Polydioxanone Thread-Embedding Acupuncture as an Adjunctive Therapy for Patients with Chronic Nonspecific Neck Pain: A Randomized Controlled Trial[J]. *J Altern Complement Med*, 2020, 25(4): 417-426

(上接第 4246 页)

- [18] Luo M, Yan D, Sun Q, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4): 2994-3004
- [19] 林怡瑄, 郑子赫, 林悄响, 等. 甘草甜素对脂多糖诱导的大鼠心肌炎的保护作用[J]. *福建医科大学学报*, 2018, 52(3): 154-157
- [20] Avlas O, Fallach R, Shainberg A, et al. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1895-909
- [21] Bennett J, Starczynowski DT. IRAK1 and IRAK4 as emerging therapeutic targets in hematologic malignancies [J]. *Curr Opin Hematol*, 2022, 29(1): 8-19
- [22] Singer JW, Fleischman A, Al-Fayoumi S, et al. Inhibition of interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) as a therapeutic strategy[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(70): 33416-33439
- [23] González-Rascón A, Mata-Haro V. MicroRNAs: Regulators of TLR2-Mediated Probiotic Immune Responses [J]. *Microna*, 2015, 4(3): 168-174
- [24] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384
- [25] 于鑫, 王月秋, 李明恒, 等. Toll 样受体 2 和 4 在脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞表达细胞核因子- κ B 受体活化因子配基中的作用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2012, 30(3): 325-328
- [26] Gupta S, Guleria RS. Involvement of Nuclear Factor- κ B in Inflammation and Neuronal Plasticity Associated with Post-Traumatic Stress Disorder[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2034
- [27] Abe J. Role of PKCs and NF- κ B activation in myocardial inflammation: enemy or ally?[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(4): 404-408
- [28] Valaperti A. Drugs Targeting the Canonical NF- κ B Pathway to Treat Viral and Autoimmune Myocarditis[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(4): 440-449