

心脏疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002294

激活 TGR5 受体减轻 ET-1 致乳小鼠心肌细胞氧化应激损伤的作用及机制

陈德秀,李家富,冯 健,范欣荣

(西南医科大学附属第一医院心血管内科、医学电生理学教育部重点实验室,泸州 646000)

【摘要】目的:观察 G 蛋白偶联胆汁酸受体-1(G protein-coupled bile acid receptor 1,TGR5)激活后对内皮素-1(endothelin-1,ET-1)所致的乳小鼠心肌细胞氧化应激损伤的作用,并探讨其可能的机制。**方法:**原代培养心肌细胞,ET-1 浓度分别为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mmol/L,分别作用 12、24、36、48 h,建立心肌细胞氧化应激损伤模型。建立氧化应激损伤模型后,分别给予 INT-777(TGR5 激动剂)、TGR5 siRNA(病毒干扰 TGR5 表达)及 TGR5 空病毒处理 48 h。采用 CCK-8 法观察心肌细胞的存活率,生化试剂盒法检测丙二醛(malonaldehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase,LDH)含量,Western blot 检测细胞核中核因子相关因子-2(nuclear factor erythroid 2-related factor-2,Nrf2)蛋白的表达,Real-time PCR 检测 Nrf2 下游抗氧化基因血红素加氧酶(heme oxygenase,HO-1)mRNA、醌氧化还原酶(quinone oxidoreductase,NQO-1)mRNA、硫氧化蛋白还原酶-1(thioredoxin reductase-1,Txnrd-1)mRNA 的表达水平。**结果:**浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mmol/L 的 ET-1 均可诱导 SOD 活力下降($P=0.000$),MDA 生成增加($P=0.000$);且随着 ET-1 浓度增加和培养时间延长,心肌细胞氧化应激损伤程度越严重。ET-1(10^{-6} mmol/L)组 MDA 及 LDH 明显增加(均 $P=0.000$),SOD 活性明显下降($P=0.000$),Nrf2、HO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达增加(均 $P=0.000$)。予以 30 μ mol/L INT-777 可有效改善 ET-1 诱导的氧化应激损伤,与 ET-1 组相比,心肌细胞存活率明显增加($P=0.000$),MDA 及 LDH 减少(均 $P=0.000$),SOD 活性增加($P=0.000$),Nrf2、HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达明显增加(均 $P=0.000$);而病毒干扰 TGR5 组可部分阻断 TGR5 激动剂对心肌细胞损伤的改善作用,Nrf2、HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达下降(均 $P=0.000$)。**结论:**激活 TGR5 可能通过激活 Nrf2 其下游抗氧化基因 HO-1、NQO-1 及 Txnrd-1 减轻 ET-1 对心肌细胞的损伤作用。

【关键词】G 蛋白偶联胆汁酸受体-1;内皮素-1;氧化应激;核因子相关因子-2;血红素加氧酶;醌氧化还原酶;硫氧化蛋白还原酶-1

【中图分类号】R541.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-11-18

Attenuation of endothelin-1-induced oxidative stress in mouse cardiomyocytes by activation of G protein-coupled bile acid receptor-1 and its mechanism

Chen Dexiu, Li Jiafu, Feng Jian, Fan Xinrong

(Cardiovascular Department, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

Key Laboratory of Medical Electrophysiology, Ministry of Education)

【Abstract】Objective: To observe the effect of G protein-coupled bile acid receptor-1 (TGR5) activation on endothelin-1 (ET-1)-induced oxidative stress in neonatal mouse cardiomyocytes, and to explore its possible mechanism. **Methods:** Primary cultured cardiomyocytes were treated with ET-1 at concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} , and 10^{-6} mmol/L for 12, 24, 36, and 48 hours to establish a cardiomyocyte model of oxidative stress. After model establishment, cells were treated with INT-777 (TGR5 agonist), TGR5 siRNA (TGR5 expression inhibition), or empty virus for 48 hours. The survival rate of cardiomyocytes was observed by CCK-8 assay. The content of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and lactate dehydrogenase (LDH) was determined by biochemical kits. The protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in the nucleus was measured by Western blot. Real-time PCR was used to determine the mRNA expression levels of Nrf2 downstream antioxidant genes such as heme oxy-

作者介绍:陈德秀, Email: 646442993@qq.com,

研究方向:原发性高血压的治疗。

通信作者:李家富, Email: Ljfl98@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31300946)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1140.052.html>

(2019-09-18)

genase(HO-1),quinone oxidoreductase(NQO-1),and thioredoxin reductase-1(Txnrd-1). **Results:**ET-1 at concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} ,and 10^{-6} mmol/L significantly reduced SOD activity and increased MDA expression(all $P=0.000$);the oxidative stress of cardiomyocytes was enhanced with the increases in ET-1 concentration and culture time. In the cells treated with 10^{-6} mmol/L ET-1,the content of MDA and LDH was significantly increased,SOD activity was significantly reduced,and the protein expression of Nrf2 and the mRNA expression of HO-1 and Txnrd-1 were significantly increased(all $P=0.000$). The treatment with 30 μ mol/L INT-777 effectively improved ET-1-induced oxidative stress;compared with the ET-1 group,the cardiomyocytes treated with INT-777 had a significantly higher survival rate ($P=0.000$),significantly reduced MDA and LDH,a significantly higher SOD activity,and significantly higher protein expression of Nrf2 and mRNA expression of HO-1,NQO-1,and Txnrd-1(all $P=0.000$). Inhibition of TGR5 expression by virus partially blocked the improvement of cardiomyocyte injury by the TGR5 agonist,suggested by significantly reduced protein expression of Nrf2 and mRNA expression of HO-1,NQO-1,and Txnrd-1(all $P=0.000$). **Conclusion:**TGR5 activation attenuates ET-1-induced oxidative stress of cardiomyocytes probably by activating Nrf2 downstream antioxidant genes such as HO-1,NQO-1,and Txnrd-1.

[Key words]G protein-coupled bile acid receptor-1;endothelin-1;oxidative stress;nuclear factor erythroid 2-related factor-2;heme oxygenase;quinone oxidoreductase;thioredoxin reductase-1

心血管系统疾病的发病机制比较复杂,氧化应激损伤是重要机制之一,与其他病理生理过程相互影响、共同促进心血管疾病的发生发展^[1]。内皮素-1(endothelin-1,ET-1)是ET家族中表达最多的成员,具有多种生物学活性,在心脏、血管中表达量多,是心血管系统重要的调节因子之一。研究表明,ET-1不仅参与动脉粥样硬化、缺血性心脏病的发生发展^[2-3]、诱导心肌细胞的肥大^[4],还可引起心肌细胞氧化应激损伤^[5],具体机制尚不明确。G蛋白偶联胆汁酸受体-1(G protein-coupled bile acid receptor 1,TGR5)是一种由胆汁酸(bile acid,BA)调控的细胞表面G蛋白偶联受体,由7个跨膜结构域的肽链组成,具有调节能量平衡、降血糖、改善胰岛素抵抗、抗动脉粥样硬化、抗炎、抑制肝癌细胞生长等作用^[6-10]。TGR5是否具有抗氧化应激损伤有待进一步探索。本研究以ET-1诱导的心肌细胞损伤为对象,探索TGR5对氧化应激损伤的作用,为进一步了解TGR5的生理功能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 日龄1~2 d新生昆明乳小鼠,生产许可证:SCXK(鄂)2015-0018,由湖北省疾控中心提供。

1.1.2 主要试剂 ET-1、INT-777(Med Chem Express),MDA测定试剂盒、SOD测定试剂盒、LDH测定试剂盒(南京建成),CCK-8检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司),胰酶-EDTA和DMEM低糖(HyClone),D-Hanks、PBS(吉诺生物医药技术

有限公司),BCA蛋白质浓度测定试剂盒、100 $\times$ PMSF(AS-PEN),蛋白酶抑制剂(ROCHE),PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser和SYBR[®] Premix Ex TaqTM(Takara)Nrf2抗体(Cell Signaling Technology),TGR5抗体(Abcam),Trizol Reagent(InvitrogenTM),TGR5-siRNA三保一套装(南京建成)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代培养心肌细胞 参照吴丹等^[11]的研究进行原代培养乳鼠心肌细胞。

1.2.2 分组 将心肌细胞分为空白对照组和ET-1组,加入不同浓度ET-1(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mmol/L),分别作用12、24、36、48 h,测定细胞内丙二醛(malonaldehyde,MDA)含量和培养液超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性,建立氧化应激损伤模型。之后将心肌细胞分为空白对照组;ET-1组:根据实验1的结果,加入浓度为 10^{-6} mmol/L的ET-1培养48 h;ET-1+INT-777组:加入TGR5特异性激动剂INT-777 30 μ mol/L与ET-1共同培养48 h;ET-1+INT-777+TGR5 siRNA组:先予以TGR5 siRNA转染心肌细胞6 h后,给予ET-1和INT-777共同培养48 h;ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC组:先予以TGR5 siRNA-NC转染心肌细胞6 h后,给予ET-1和INT-777共同培养48 h。

1.2.3 siTGR5转染心肌细胞 先将对数生长期原代小鼠心肌细胞浓度调整为 5×10^4 个/mL,接种于6孔板,24 h细胞贴壁,转染时要求细胞汇合度为30%~50%。分为对照组、siRNA-NC组、siRNA1-TGR5组、siRNA2-TGR5组和siRNA3-TGR5组,根据Lipofectamine 2000 Transfection Reagent说明书转染6 h后,采用Western blot和PCR实验检测TGR5的蛋白和mRNA表达水平,选择出siRNA1。然后按照课题实验分组进行后续实验。

1.2.4 CCK-8试剂盒检验心肌细胞存活率 根据实验2分组分别予以相应试剂处理细胞,培养48 h后,所有孔中加入

10 μ L CCK-8 溶液,培养箱中孵育 1~4 h。酶标仪测定 450 nm 光密度值,并计算抑制率。抑制率(%)=(空白组-实验组)/空白组 $\times$ 100%。

1.2.5 MDA 含量、LDH 及 SOD 活性检测 根据上述相应分组分别处理各组细胞,48 h 后根据 MDA 测定试剂盒、SOD 测定试剂盒及 LDH 测定试剂盒说明书,检测每组培养液中 MDA 含量、SOD 及 LDH 活性。

1.2.6 Western blot 检测 各组细胞干预后收集细胞,提取细胞核蛋白,用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。根据测得浓度取相应体积样品进一步制胶—上样—电泳—转膜—封闭 1 h—一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜—二抗室温 30 min—ECL 反应—暗室曝光。应用 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.2.7 Real-time PCR 用预冷 PBS 洗涤各组干预后的细胞,提取总 RNA。进行逆转录及聚合酶链反应,反应条件:预变性,95 $^{\circ}$ C,1 min;95 $^{\circ}$ C,15 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C,20 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,45 s,40 次循环;熔解曲线 60 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C,每 20 s 升温 1 $^{\circ}$ C。GAPDH 上游 5'-TGAAGGTGGAGCCAAAAG-3',下游 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3';TGR5 上游 5'-CTGTGTGAGATC-CGCCGACT-3',下游 5'-CGCTCATAGGCCAAGACTGAC-3';HO-1 上游 5'-GTGACAGAAGAGGCTAAGACCG-3',下游 5'-CAACAGGAAGCTGAGACTGAGG-3';NQO-1 上游 5'-GAGAAGAGCCCTGATTGTACTGG-3',下游 5'-GATGACTC-GGAAGGATACTGAAAG-3';Txnrd1 上游 5'-CTCGGACAA-GCTCTGAAAGACTC-3',下游 5'-GATGAGGAACCGCTCTG-CTG-3'。结果分析:以 GAPDH 为内参,计算各组细胞中相应基因的 $\Delta\Delta Ct$ 值。 $\Delta\Delta Ct = Ct_{目的基因,实验样本} - Ct_{内标基因,实验样本} - Ct_{目的基因,对照样本} + Ct_{内标基因,对照样本}$,以目的基因的量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为定量结果进行统计学分析。

1.3 统计学处理

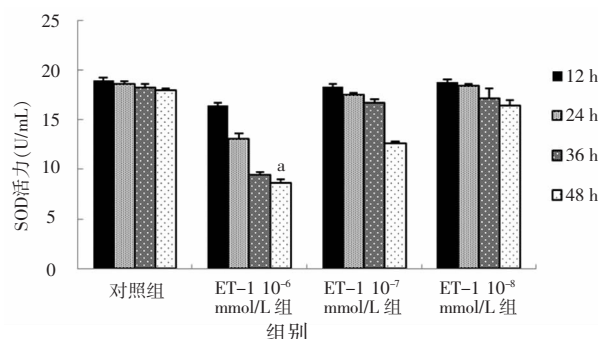
所有资料采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理,所得数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ET-1 诱导乳鼠心肌细胞 SOD 活性减弱,MDA 含量增加

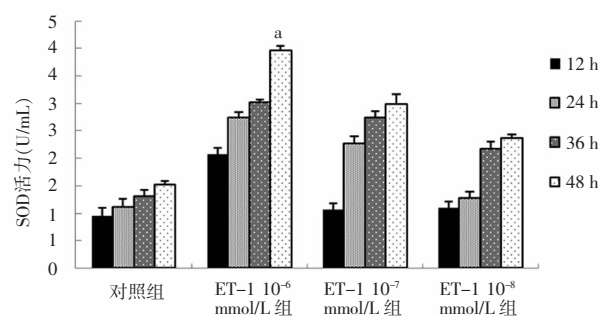
与对照组相比,ET-1 在 10^{-8} ~ 10^{-6} mmol/L 浓度范围内浓度越高,48 h 内培养时间越长,心肌细胞 SOD 活性越弱,MDA 含量越高。由图 1 所见,ET-1 作用于心肌细胞 48 h 损伤效果最为显著,而且随着 ET-1 浓度增加,对照组、ET-1 10^{-6} mmol/L 组、ET-1 10^{-7} mmol/L 组、ET-1 10^{-8} mmol/L 组 SOD 活性分别为(17.956 ± 0.20)、(8.578 ± 0.41)、(12.600 ± 0.20)、(16.378 ± 0.56) U/mL,方差分析 SOD 表达具有统计学意义($F=197.054$, $P=0.000$);MDA 含量分别为(1.523 ± 0.07)、(2.362 ± 0.07)、

(2.991 ± 0.18)、(3.962 ± 0.08) nmol/mL,方差分析 MDA 表达均具有统计学意义($F=168.159$, $P=0.000$)。



注:a,与对照组中培养 48 h 的心肌细胞比较, $P=0.000$

A. SOD 活力



注:a,与对照组中培养 48 h 的心肌细胞比较, $P=0.000$

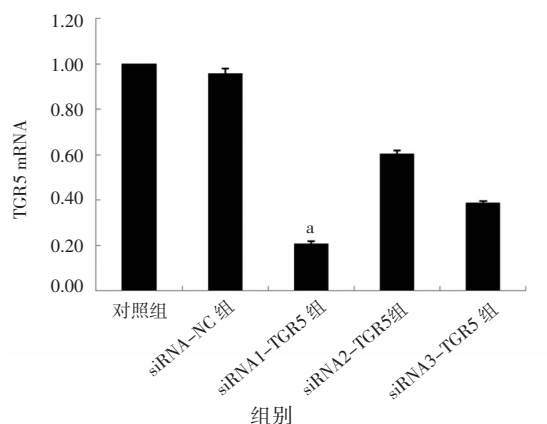
B. MDA 含量

图 1 不同浓度 ET-1 诱导乳鼠心肌细胞 SOD 活性和 MDA 含量 ($n=3$)

2.2 TGR5 激动剂对 ET-1 诱导的乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的影响

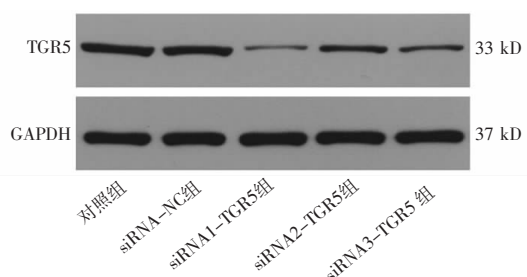
2.2.1 TGR5-siRNA 转染后乳鼠心肌细胞 TGR5 mRNA 及蛋白表达 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较 TGR5 mRNA 水平定量检测结果,以对照组中的 TGR5 mRNA 水平为对照(100%),如图 2 结果显示,siRNA-NC 组、siRNA1-TGR5 组、siRNA2-TGR5 组和 siRNA3-TGR5 组的表达量分别是对照组的(0.96 ± 0.02)%、(0.21 ± 0.01)%、(0.60 ± 0.01)%、(0.39 ± 0.01)%,表达水平具有统计学差异($F=2162.140$, $P=0.000$)。心肌细胞 TGR5 蛋白的表达以 GAPDH 为内参,对照组、siRNA-NC 组、siRNA1-TGR5 组、siRNA2-TGR5 组和 siRNA3-TGR5 组分别为 0.843 ± 0.017 、 0.084 ± 0.023 、 0.231 ± 0.017 、 0.511 ± 0.012 、 0.366 ± 0.011 ,表达水平具有统计学差异($F=848.714$, $P=0.000$)。根据结果选择 siRNA1-TGR5 进行后续实验。

2.2.2 激活 TGR5 对心肌细胞存活率的影响 空白对照组、ET-1 组、ET-1+INT-777 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组心肌细胞存活率分别为(1.014 ± 0.017)%、(0.805 ± 0.003)%、(0.925 ± 0.042)%、(0.819 ± 0.063)%、(0.931 ± 0.058)%,存活率差异有统计学意义($F=18.349$, $P=0.000$)。见表 1。



注:a,与对照组比较, $P=0.000$

A. TGR5 mRNA



B. TGR5 蛋白

图 2 乳鼠心肌细胞 TGR5 mRNA 及蛋白表达 ($n=3$)

表 1 激活 TGR5 对 ET-1 对乳鼠心肌细胞存活率的影响 ($n=3$)

组别	存活率 (%)
对照组	1.014 ± 0.017
ET-1 组	0.805 ± 0.030 ^a
ET-1+INT-777 组	0.925 ± 0.042 ^b
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA 组	0.819 ± 0.063 ^{ce}
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA-NC 组	0.931 ± 0.058 ^{de}
<i>F</i> 值	18.349
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与对照组比较, $P=0.000$;b,与 ET-1 组比较, $P=0.000$;c,与 ET-1+INT-777 组比较, $P=0.001$;d,与 ET-1+INT-777+TGR5siRNA 组比较, $P=0.001$;e,与 ET-1 组比较, $P=0.650$;f,与 ET-1+INT-777 组比较, $P=0.842$

表 2 激活 TGR5 对 ET-1 对乳鼠心肌细胞 MDA、LDH、SOD 的影响

组别	MDA (nmol/mL)	LDH (U/L)	SOD (U/mL)
对照组	1.496 ± 0.083	45.926 ± 1.850	18.352 ± 0.166
ET-1 组	3.916 ± 0.050 ^a	216.593 ± 3.122 ^a	12.549 ± 0.529 ^a
ET-1+INT-777 组	2.893 ± 0.269 ^b	145.185 ± 3.122 ^b	15.604 ± 1.989 ^b
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA 组	3.773 ± 0.101 ^{ce}	209.185 ± 4.008 ^{ce}	14.791 ± 2.755 ^{ce}
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA-NC 组	2.772 ± 0.119 ^{de}	140.148 ± 2.716 ^{de}	16.549 ± 0.238 ^{de}
<i>F</i> 值	132.937	1 527.279	5.802
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.011

注:a,与对照组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.001$;b,与 ET-1 组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.036$;c,与 ET-1+INT-777 组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.533$;d,与 ET-1+INT-777+TGR5siRNA 组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.193$;e,与 ET-1 组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.257$ 、 $P=0.014$ 、 $P=0.106$;f,与 ET-1+INT-777 组比较,MDA、LDH、SOD 分别 $P=0.333$ 、 $P=0.07$ 、 $P=0.471$

2.2.3 激活 TGR5 对 MDA 含量、LDH 及 SOD 活性的影响

空白对照组、ET-1 组、ET-1+INT-777 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组 MDA 分别为(1.496 ± 0.083)、(3.916 ± 0.050)、(2.893 ± 0.269)、(3.773 ± 0.101)、(2.772 ± 0.119) nmol/mL,含量差异有统计学意义($F=132.937$, $P=0.000$)。LDH 活力分别为(45.926 ± 1.851)、(216.593 ± 3.122)、(145.185 ± 3.122)、(209.185 ± 4.008)、(140.148 ± 2.715) U/L,活力差异有统计学意义($F=1 527.279$, $P=0.000$)。SOD 活性分别为(18.352 ± 0.166)、(12.549 ± 0.529)、(15.604 ± 1.989)、(14.791 ± 2.755)、(16.549 ± 0.237) U/mL,活性差异有统计学意义($F=5.802$, $P=0.011$)。见表 2。

2.3 TGR5 激活后对 ET-1 诱导心肌细胞核中 Nrf2 表达的影响

以 Histone H3 为内参,图 3 显示对照组、ET-1 组、ET-1+INT-777 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组心肌细胞核中 Nrf2 表达分别为 0.061 ± 0.002、0.178 ± 0.004、0.486 ± 0.015、0.231 ± 0.016、0.510 ± 0.016,表达水平具有统计学差异($F=799.87$, $P=0.000$)。两组间比较,与对照组相比,ET-1 组 Nrf2 核蛋白表达增加($P=0.000$);与 ET-1 组相比,ET-1+INT-777 组 Nrf2 核蛋白表达增加($P=0.000$);ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组与 ET-1+INT-777 组比较,Nrf2 核蛋白表达减少($P=0.000$),与 ET-1 组比较,Nrf2 核蛋白表达增加($P=0.000$);ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组与 ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组比较,Nrf2 核蛋白表达增加($P=0.000$),与 ET-1+INT-777 组比较,Nrf2 核蛋白表达增加($P=0.033$)。

2.4 TGR5 激活后对 ET-1 诱导心肌细胞 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达的影响

以 2- $\Delta\Delta C_t$ 比较 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 水平,定量检测结果如图 4 所示,对照组、ET-1 组、ET-1+INT-777 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组中 HO-1 mRNA 分别是 1.131 ± 0.154、1.518 ± 0.121、2.023 ± 0.085、1.491 ± 0.091、1.977 ± 0.043,表达水平具有统计学差异($F=37.349$, $P=0.000$)。NQO-1 mRNA

分别为 1.068 ± 0.082 、 1.082 ± 0.101 、 1.486 ± 0.075 、 1.142 ± 0.069 、 1.588 ± 0.088 , 表达水平具有统计学差异 ($F=25.654$, $P=0.000$)。Txnrd-1 mRNA 分别为 1.057 ± 0.068 、 1.389 ± 0.104 、 1.868 ± 0.152 、 1.504 ± 0.132 、 2.045 ± 0.186 , 表达水平具有统计学差异 ($F=20.524$, $P=0.000$)。

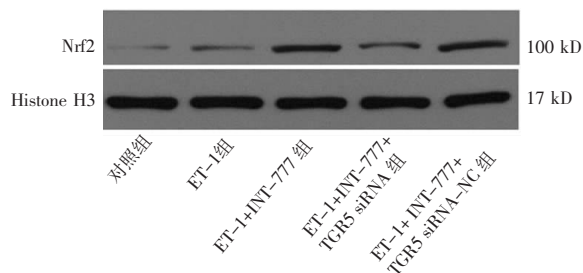
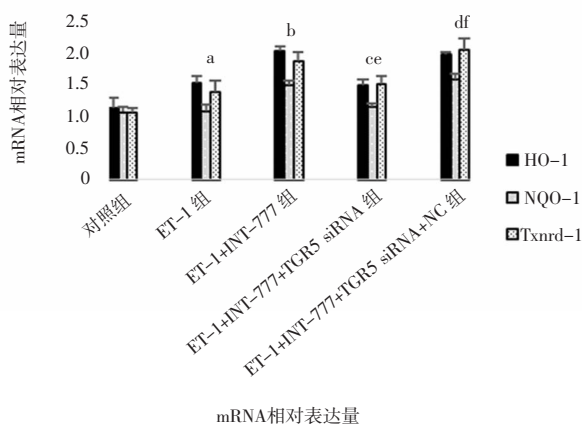


图3 TGR5 激活后对 ET-1 诱导心肌细胞 Nrf2 表达的影响



注:a,与对照组比较,HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达分别 $P=0.001$ 、 $P=0.839$ 、 $P=0.022$;b,与 ET-1 组比较 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.003$;c,与 ET-1+INT-777 组比较 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达分别 $P=0.000$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.014$;d,与 ET-1+INT-777+TGR5 siRNA 组比较,HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达增加分别 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.001$;e,与 ET-1 组比较 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 分别 $P=0.763$ 、 $P=0.404$ 、 $P=0.365$;f,与 ET-1+INT-777 组比较 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达分别 $P=0.611$ 、 $P=0.167$ 、 $P=0.178$

图4 TGR5 激活后对 ET-1 诱导心肌细胞 HO-1 mRNA、NQO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

3 讨论

生理情况下,心肌细胞中氧化系统和抗氧化系统处于平衡状态,当受到缺血缺氧、再灌注等因素作用下,氧化物产生程度大于清除速度,导致体内氧化系统和抗氧化系统平衡失调,从而致氧化应激损伤^[12]。ET-1 是内皮衍生的血管收缩肽,广泛表达

于人体血管平滑肌细胞、心肌细胞、成纤维细胞等组织中,是心血管系统中重要的调节因子^[13]。研究表明,ET-1 在人体有诱导心肌细胞肥大、促进血管重构、促进心肌梗死的发生发展^[14],还可致心肌细胞氧化应激损伤^[5]。ET-1 诱导心肌细胞氧化应激损伤可促进心肌细胞重构,导致心功能减退,故探索可改善 ET-1 诱导心肌细胞氧化应激损伤的物质意义重大。

TGR5 在心血管中的作用研究有限,已知齐墩果酸(oleanolic acid,OA)是 TGR5 的天然激动剂,对羟自由基具有较强的清除作用和较强的抗氧化作用。OA 可促进过氧化物酶体增殖子激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor,PPAR)的表达和激活、抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(protein tyrosine phosphatase 1B,PTP1B)活性等作用^[15-16],其抗氧化作用是否与激活 TGR5 相关,还需进一步探索。故本研究假设 TGR5 具有抗氧化作用,并探讨可能的机制。

3.1 ET-1 对心肌细胞氧化应激损伤具有时间和浓度依赖性

LDH 是心肌细胞内酶,当心肌细胞膜破裂后释放入培养液中,其活性增加,提示心肌细胞膜受损。SOD 可清除自由基,其活性越高,提示机体抗氧化能力越强。MDA 是细胞脂质过氧化的产物,可反映心肌细胞受自由基攻击的程度^[17]。试验 1 和试验 2 结果显示,随着 ET-1 浓度增加,MDA 含量增加,SOD 活性下降,LDH 活性增加,提示 ET-1 可诱导心肌细胞氧化应激损伤,与既往研究结果一致^[5]。

3.2 TGR5 激活后能减轻 ET-1 对心肌细胞的损伤作用

研究结果显示,给予 TGR5 激动剂处理后,MDA 含量减少,LDH 活性下降,SOD 活性增加,而干扰 TGR5 蛋白表达后消除了大部分改善心肌氧化应激损伤的作用,未完全消除可能与 TGR5 表达未完全阻断相关,表明激活 TGR5 可提高心肌细胞抗氧化能力,减轻氧化应激所致的损伤。

3.3 TGR5 通过激活 Nrf2 诱导 HO-1、NQO-1 及 Txnrd-1 表达减轻 ET-1 对心肌细胞的氧化应激损伤

Nrf2 表达于心、肝、脾等器官,具有抗氧化应激损伤、维持细胞氧化还原稳态等作用。在生理情况下,Nrf2 与 Keap1 结合存在于细胞质中,当细胞处于氧化应激状态时,大部分 Nrf2 与 Keap1 解离,进入细胞核,与小 Maf 蛋白形成异二聚体,再结合抗氧

化反应元件,激活 Nrf2 下游信号通路发挥心肌保护作用。Nrf2 下游抗氧化因子较多,已知的包括 SOD、HO-1、NQO-1、Txnrd-1 等,Nrf2 还可调控谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 氧化还原系统^[18-19]。其中 SOD 和 HO-1 是 Nrf2 调控的抗氧化酶,SOD 分别分布于细胞胞浆、线粒体及细胞外,通过歧化反应将超氧自由基转变为过氧化氢和水,之后经一系列反应使过氧化氢转化为水,从而发挥抗氧化作用^[20]。本研究中,ET-1 可使 SOD 活性明显下降,而 TGR5 激动剂组、干扰 TGR5 表达组和空病毒组 SOD 活性无统计学差异,但较 ET-1 组活性升高,TGR5 激活可能改善 SOD 活性,但不能证明激活 TGR5 与 SOD 活性的关系。HO-1 是血红素降解的限速酶,多种应激因素可诱导其表达并增强其活性。研究表明,Nrf2 基因沉默的模型中,HO-1 蛋白及基因表达明显减少,可见 HO-1 表达受 Nrf2 调控^[21]。受 Nrf2 调控的还有 NQO-1 及 Txnrd-1, NQO-1 是黄素蛋白酶,通过 NADH 和 NADPH 提供电子,催化醌类及其衍生物还原,使其毒性降解,发挥抗氧化作用^[20]。Txnrd-1 需在充足硒含量下发挥作用^[22]。本研究 ET-1 组中 Nrf2 核蛋白、HO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 表达增加,故推测 ET-1 在诱导心肌细胞氧化应激损伤的同时也可能激活 Nrf2,并诱导下游信号通路 HO-1、Txnrd-1 的表达发挥抗氧化作用,但其抗氧化作用明显小于其损伤作用,ET-1 诱导氧化应激损伤的机制还需进一步研究。在 TGR5 激动剂组中,Nrf2 核蛋白明显增多,HO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 及 NQO-1 mRNA 表达明显增加,干扰 TGR5 蛋白表达后上述基因表达部分被抵消。上述基因未完全抵消可能与 TGR5 受体未完全阻断有关,提示 TGR5 可能是通过激活 Nrf2 诱导下游 HO-1 mRNA、Txnrd-1 mRNA 及 NQO-1 mRNA 的表达来改善 ET-1 诱导的氧化应激损伤。

综上所述,激活 TGR5 受体可能通过激活 Nrf2 下游抗氧化基因 HO-1、NQO-1 及 Txnrd-1 减轻 ET-1 对心肌细胞的损伤作用。

参 考 文 献

[1] 游 琪,蔡久英. 氧化应激与心肌损伤的研究进展[J]. 临床荟萃,2005,20(19):1127-1129.
[2] 董化江,徐鹏霄. 血管内皮素的研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版),2009,18(6):557-560.

[3] Pernow J, Shemyakin A, Böhm F. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus[J]. Life Sci, 2012, 91(13-14): 507-516.
[4] Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system[J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61(1): 391-415.
[5] 朱肖星, 陈定章, 王文清, 等. 吡格列酮通过抑制脂质过氧化减轻内皮素-1 引起大鼠心肌细胞的损伤[J]. 心脏杂志, 2015, 27(1): 7-10.
[6] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis[J]. Cell Metab, 2009, 10(3): 167-177.
[7] Watanabe M, Houten SM, Matak C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation[J]. Nature (London), 2006, 439(7075): 484-489.
[8] 张秉全, 禹 晶, 梁 波, 等. 胆汁酸衍生物 INT-767 激活 FXR 及 TGR5 降低小鼠动脉粥样硬化风险[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(16): 4488-4491.
[9] Perino A, Pols TWH, Nomura M, et al. TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBP β differential translation[J]. J Clin Invest, 2014, 124(12): 5424-5436.
[10] Chen WD, Yu D, Forman BM, et al. Deficiency of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) enhances chemically induced liver carcinogenesis[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 656-666.
[11] 吴 丹, 冯 健, 莫显刚, 等. 改良的乳小鼠心肌细胞原代培养方法[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 62-67.
[12] 任 宁, 唐惠芳. 氧化应激研究进展及其在缺血性心脏病发病中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(10): 1998-2000.
[13] Lukasz L, Janusz S, Natalia T, et al. Elevated serum tryptase and endothelin in patients with ST segment elevation myocardial infarction: preliminary report[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 1-7.
[14] Kolettis TM, Barton M, Langleben D, et al. Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction[J]. Cardiol Rev, 2013, 21(5): 249-256.
[15] 盛 侠. 宣木瓜中齐墩果酸的提取分离及其抗氧化作用的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
[16] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸对心脏保护作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2016, 13(3): 489-493.
[17] 杨兴鑫, 史婷婷, 董金材, 等. 苦参醇 A 对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(3): 54-57.
[18] 李 慧, 杨 林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制[J]. 生物信息学, 2018, 16(1): 1-6.
[19] 赵婷婷. 硫化氢对钆致大鼠肝肾毒性的保护作用[D]. 衡阳: 南华大学, 2015.
[20] 胡流芳, 王 迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152.
[21] Tanaka Y, Maher JM, Chen C, et al. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice[J]. Mol Pharmacol, 2006, 71(3): 817-825.
[22] Kiermayer C, Michalke B, Schmidt J, et al. Effect of selenium on thioredoxin reductase activity in Txnrd1 or Txnrd2 hemizygous mice[J]. Biol Chem, 2007, 388(10): 1091-1097.

(责任编辑: 冉明会)