

# G蛋白偶联胆汁酸受体1通过抑制内质网应激减轻内皮素-1介导的乳鼠心肌细胞凋亡

陈德秀<sup>1</sup>, 雷贤英<sup>1</sup>, 李家富<sup>2</sup>

1. 西南医科大学附属第一医院 重症医学科(泸州 646000); 2. 西南医科大学附属第一医院 心血管内科; 心血管医学研究所, 医学电生理学教育部重点实验室, 医学电生理学四川省重点实验室(四川省心血管疾病防治协同创新中心)(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)被激活后对内皮素-1(endothelin-1, ET-1)介导的心肌细胞凋亡的作用,并探讨其机制。**方法** 首先分对照组和ET-1组,ET-1浓度分别为 $10^{-6}$  mmol/L、 $10^{-7}$  mmol/L、 $10^{-8}$  mmol/L,分别培养12 h、24 h、36 h、48 h,流式细胞术检测各组各时段凋亡率。选择凋亡率较高的ET-1浓度及时间,进行后续实验。后续实验分为对照组、ET-1组、TGR5激动组、TGR5表达抑制组、TGR5空病毒组,流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡率,CCK-8测心肌细胞存活率,RT-PCR检测TGR5 mRNA,Western blot检测TGR5、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun-N-terminal protein kinase, JNK)、磷酸化JNK(phosphorylated JNK, p-JNK)及门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(casepase-12)表达。**结果** ET-1在 $10^{-8}$  mmol/L ~  $10^{-6}$  mmol/L的浓度范围呈浓度依赖性,48 h内呈时间依赖性介导心肌细胞凋亡(均 $P < 0.05$ )。后续实验发现激活TGR5后,相较于ET-1组,心肌细胞凋亡率下降,心肌细胞存活率提高,且CHOP、p-JNK、Caspase12蛋白表达受到抑制( $P < 0.05$ )。而抑制TGR5表达后可阻断TGR5对心肌细胞凋亡的抑制作用,降低心肌细胞存活率,CHOP、p-JNK、Caspase12蛋白表达增加( $P < 0.05$ )。**结论** ET-1可介导心肌细胞凋亡,其机制可能与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)过度激活有关,而TGR5可能通过抑制ERS,拮抗ET-1对心肌细胞介导的凋亡作用。

**【关键词】** G蛋白偶联胆汁酸受体1; 心肌细胞凋亡; 内皮素-1; 内质网应激

**【中图分类号】** R541.3

文献标志码 A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.05.012

## G protein-coupled bile acid receptor 1 reduces endothelin-1-mediated apoptosis in murine cardiac myocytes by inhibiting endoplasmic reticulum stress

CHEN Dexiu<sup>1</sup>, LEI Xianying<sup>1</sup>, LI Jiafu<sup>2</sup>

1. Department of Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital, Southwest Medical University; Key Laboratory of Medical Electrophysiology, Ministry of Education & Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province (Collaborative Innovation Center for Prevention of Cardiovascular Diseases), Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

**【Abstract】Objective** The purpose of this study was to observe the effects of the activation of G protein-coupled bile acid receptor 1 (TGR5) on endothelin-1 (ET-1)-mediated apoptosis in cardiac muscle cells and to explore its underlying mechanisms. **Methods** Initially, the study was divided into a control group and an ET-1 group. ET-1 concentrations were set at  $10^{-6}$  mmol/L,  $10^{-7}$  mmol/L, and  $10^{-8}$  mmol/L, and cells were cultured for 12 hours, 24 hours, 36 hours, and 48 hours, respectively. Flow cytometry was used to measure the apoptosis rate at different time points for each group. The concentration and time of ET-1 with higher apoptosis rate were selected for subsequent experiments. Follow-up experiments included the control group, ET-1 group, TGR5 agonist group, TGR5 expression inhibition group, and TGR5 empty virus group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of cardiomyocytes in each group, CCK8 was used to measure the survival rate of cardiomyocytes, and RT-PCR was used to detect TGR5 mRNA. Western blot detection of TGR5, C/EBP homologous protein (CHOP), C-jun-n-terminal protein kinase (JNK), phosphorylated JNK (p-JNK), and aspartate-specific cysteine protease (Casepase-12). **Results** ET-1 induced cardiomyocyte apoptosis in a concentration-dependent manner within the range of  $10^{-8}$  mmol/L -  $10^{-6}$  mmol/L and in a time-dependent manner within 48 h ( $P < 0.05$ ). Subsequent experiments showed that after activation of TGR5, compared with the ET-1 group, the apoptosis rate of cardiomyocytes was decreased, the survival rate of cardiomyocytes was increased, and the expression of CHOP, p-JNK, and Caspase12 protein was inhibited ( $P < 0.05$ ). However, inhibition of TGR5 expression could block the inhibitory effect of TGR5 on apoptosis of cardiomyocytes, reduce the survival rate of car-

基金项目:西南医科学学校科研基金(2021ZKQN092)

通信作者:李家富, E-mail: Ljfl98@126.com

引用本文:陈德秀,雷贤英,李家富. G蛋白偶联胆汁酸受体1通过抑制内质网应激减轻内皮素-1介导的乳鼠心肌细胞凋亡[J]. 西南医科大学学报, 2024, 47(2): 527-533. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3351.2024.06.012.

diomyocytes, and increase the expression of CHOP, p-JNK, and Caspase12 proteins ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ET-1 could induce myocardial cell apoptosis in suckling mice. Mechanisms may be related to endoplasmic reticulum stress (ERS) hyperactivation. TGR5 might antagonize the apoptosis-promoting effect of ET-1 on cardiomyocytes by inhibiting ERS.

**【Key words】** G protein-coupled bile acid receptor 1; Myocardial apoptosis; Endothelin-1; Endoplasmic reticulum stress

心肌细胞凋亡在多种心血管疾病中被发现,它参与心脏的重塑过程。过度的心肌细胞凋亡促进心力衰竭,是心源性死亡的原因之一<sup>[1]</sup>。内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是内皮素肽家族的主要成员之一,含有21个氨基酸,具有疏水C端和2个半胱氨酸桥的N端。几乎在所有类型细胞中都能合成成熟的ET-1肽,而正常心肌中的ET-1主要由心内膜内皮细胞及心肌内毛细血管内皮细胞合成。ET-1参与并促进不同类型高血压、冠状动脉疾病、自发性冠状动脉夹层、应激性心脏病、心衰等心血管疾病的进展<sup>[2]</sup>,可能与ET-1能参与血管的舒缩、调控动脉粥样斑块中炎症反应<sup>[3]</sup>、促进心肌纤维化<sup>[4]</sup>、促进心肌细胞肥大<sup>[5-6]</sup>等机制相关。目前,关于ET-1是否诱导心肌细胞凋亡存在争议。有学者提出ET-1是对抗心肌细胞凋亡的一种有效生存因子<sup>[7]</sup>,也有人认为ET-1是细胞凋亡的诱导剂<sup>[8]</sup>。因此本课题组予以外源性ET-1作用于乳鼠原代心肌细胞,探索ET-1是否会诱导乳鼠心肌细胞凋亡。

TGR5是G蛋白偶联受体,表达于多种组织器官,其在调节代谢稳态方面的作用已被充分证明,是治疗糖尿病<sup>[9]</sup>、预防动脉粥样硬化、抗炎等的潜在靶点<sup>[10]</sup>。TGR5具有心脏细胞保护作用,可改善小鼠对生理、肌力和血流动力学应激的心肌反应<sup>[11]</sup>,是心力衰竭治疗的一个潜在靶点。研究发现,TGR5激活后可调控ET-1的表达和分泌<sup>[12]</sup>,TGR5过表达可减少缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡率<sup>[13]</sup>。前期本课题组研究发现激活TGR5可以调控ET-1介导的心肌细胞肥大<sup>[6]</sup>及氧化应激反应<sup>[14]</sup>,考虑激活TGR5对ET-1介导的心肌细胞凋亡可能具有调控作用,本课题组以乳鼠原代心肌细胞为研究对象,观察激活TGR5对ET-1介导的心肌细胞凋亡的作用,并探讨其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

湖北省疾控中心提供的0 d~2 d昆明乳小鼠,SPF级已获得SCXK(鄂)2015-0018号生产许可证。本研究经西南医科大学伦理委员会审定(批号:)

### 1.2 主要试剂

ET-1 (Med Chem Express), INT-777 (Med Chem Express), 胰酶-EDTA (HyClone), DMEM高糖培养基 (HyClone), Annexin-FITC细胞凋亡检测试剂盒(天津三箭生物技术有限公司), CCK-8检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司), CHOP抗体(abcam), p-JNK抗体

(abcam), Caspase12抗体(abcam), TGR5抗体(abcam), 胶原酶 II (Sigma), 5-溴脱氧氟尿嘧啶核苷(Sigma), BCA蛋白质浓度测定试剂盒(吉诺生物医药技术有限公司), SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(吉诺生物医药技术有限公司), RIPA总蛋白裂解液(吉诺生物医药技术有限公司), 磷酸化蛋白酶抑制剂(吉诺生物医药技术有限公司), PBS(吉诺生物医药技术有限公司), ECL化学发光检测试剂盒(ASPEN), 100\*PMSF(ASPEN), Protease Inhibitor Cocktail (ROCHE), PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser和SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa), Trizol Reagent (Invitrogen™), TGR5-siRNA三保一套装(南京建成)。三氯甲烷(国药集团化学试剂), 异丙醇(国药集团化学试剂), 无水乙醇(国药集团化学试剂)。

### 1.3 方法

**1.3.1 心肌细胞分离与原代培养** 采用冯健等<sup>[15]</sup>提出的技术,成功地分离和培养出心肌细胞。

**1.3.2 实验分组** 观察48 h内ET-1在各差异浓度下对心肌细胞凋亡率的影响。分组情况:空白对照组( $n = 8$ )、ET-1  $10^{-8}$  mmol/L组( $n = 8$ )、ET-1  $10^{-7}$  mmol/L组( $n = 8$ )、ET-1  $10^{-6}$  mmol/L组( $n = 8$ ),分别干预12 h、24 h、36 h、48 h。之后观察TGR5激活对ET-1介导的心肌细胞凋亡率的作用,分为空白对照组( $n = 8$ )、ET-1组( $n = 8$ )、TGR5激动组( $n = 8$ )、TGR5表达抑制组( $n = 8$ )和TGR5空病毒组( $n = 8$ )。其中ET-1组根据前期实验结果,加入浓度为 $10^{-6}$  mmol/L的ET-1培养48 h;TGR5激动组加入INT-777 30  $\mu$ mol/L与ET-1共同培养48 h;TGR5表达抑制组用TGR5 siRNA转染心肌细胞6 h后,加ET-1和INT-777共同培养48 h;TGR5空病毒组用TGR5 siRNA-NC转染心肌细胞6 h后,加ET-1和INT-777共同培养48 h。

**1.3.3 siTGR5转染心肌细胞** 将对数生长期原代乳鼠心肌细胞调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,接种于六孔板,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、siRNA1-TGR5、siRNA2-TGR5和siRNA3-TGR5,根据Lipofectamine 2000 Transfection Reagent说明书,转染6 h后于荧光显微镜下观测转染效率,再进行WB和PCR实验检测TGR5的蛋白和mRNA表达水平,筛选出siRNA1进行后续实验。

**1.3.4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率** 各组细胞用4  $^{\circ}$ C的PBS预处理,将Binding Buffer稀释至合适浓度, PBS清洗六孔板内细胞一次,1 mL 0.25%的胰酶溶解

细胞,直到细胞完全消化,并出现一定数量的细胞脱落时停止消化。然后将细胞放置在流式管内,通过移液器摇晃细胞,300 g 离心 5 min,去上清;加入 3 mL PBS 重新悬浮细胞,300 g 离心 5 min,弃上清;沉淀用 300  $\mu$ L 的 Binding Buffer 重悬;加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC,混匀,避光孵育 10 min,加入 5  $\mu$ L PI 后混匀,再避光孵育 5 min。1 h 内上机检测,选择相应通道进行观察。

**1.3.5 CCK-8 试剂盒检验心肌细胞存活率** 用胰蛋白酶消化对数生长期细胞,将细胞悬液浓度调为  $1 \times 10^5$  个/mL。10 000 细胞/孔接种于 96 孔板,每孔加 100  $\mu$ L,在 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  培养箱中培养 24 h。将各实验组培养基更换为含有药物的培养基,对照组培养基更换为含溶剂的培养基。各孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,培养箱中孵育 2 h。酶标仪测定 450 nm 光吸收值,溶剂处理的细胞为对照组,按公式计算药物对细胞的抑制率。抑制率%=(对照组-实验组)/对照组\*100%。

**1.3.6 Western blot 印迹检测** 各组细胞经干预后,提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。然后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、抗体孵育、化学发光检测和暗室曝光。将胶片进行扫描存档,应用 AlphaEase FC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

**1.3.7 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,第一链 cDNA 的合成采用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with

gDNA Eraser 进行,然后进行实时荧光定量 PCR,反应条件:预变性,95  $^{\circ}$ C,1 min;40 次循环:95  $^{\circ}$ C,15 s  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C,20 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C,45 s;熔解曲线 60  $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  95  $^{\circ}$ C,每 20 s 升温 1  $^{\circ}$ C。GAPDH 上游 5'-TGAAGGTTGGAGCCAAAAG-3',下游 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3。TGR5 上游 5'-CTGTGTGAGATCCGCCGACT3',下游 5'-CGCTCATAGGCCAAGACTGAC-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。 $\Delta\Delta CT = CT(\text{目的基因,实验样本}) - CT(\text{内标基因,实验样本}) - CT(\text{目的基因,对照样本}) + CT(\text{内标基因,对照样本})$ ,以目的基因的量( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )为定量结果进行统计学分析。

**1.4 统计学处理**

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 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。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 乳鼠心肌细胞的凋亡率与外源性 ET-1 的浓度和作用时间呈正相关**

ET-1 在浓度  $10^{-6}$  mmol/L,作用时间为 48 h 时心肌细胞凋亡率最高,如图 1 所示。对照组、ET-1  $10^{-8}$  mmol/L 组、ET-1  $10^{-7}$  mmol/L 组、ET-1  $10^{-6}$  mmol/L 组凋亡率分别为  $(8.67 \pm 0.11)\%$ 、 $(9.80 \pm 0.07)\%$ 、 $(12.16 \pm 0.07)\%$ 、 $(14.94 \pm 0.10)\%$ 。

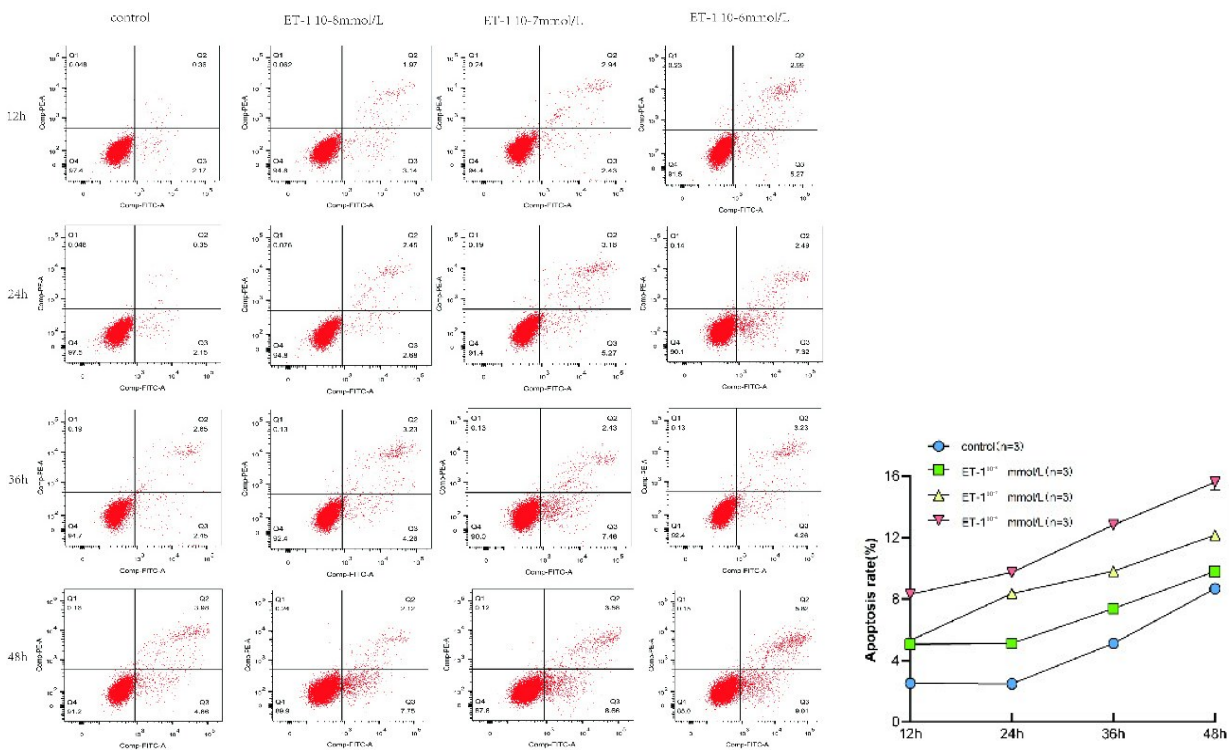


图 1 ET-1 对乳鼠心肌细胞凋亡率的影响

Figure 1 The apoptosis rate of myocardial cells induced by different concentrations of ET-1 in neonatal rat

## 2.2 TGR5-siRNA 转染后乳鼠心肌细胞 TGR5 mRNA 及蛋白表达

验证实验分为对照组, siRNA-NC 组, siRNA1-TGR5 组, siRNA2-TGR5 组和 siRNA3-TGR5 组。如图 2 显示, siRNA-NC 组、siRNA1-TGR5 组、siRNA2-TGR5 组和 siRNA3-TGR5 组的相对表达量分别是对照组的  $0.96 \pm 0.02$ 、 $0.21 \pm 0.01$ 、 $0.60 \pm 0.01$ 、 $0.39 \pm 0.01$  倍。5 组间 TGR5 mRNA 的表达水平具有统计学差异 ( $F = 2162.140, P < 0.05$ )。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 组的心肌细胞 TGR5 蛋白的表达量分别为  $0.843 \pm 0.017$ 、 $0.0843 \pm 0.023$ 、 $0.231 \pm 0.017$ 、 $0.511 \pm 0.012$ 、 $0.366 \pm 0.011$ 。5 组间 TGR5 蛋白表达水平具有统计学差异 ( $F = 848.714, P < 0.05$ )。siRNA1-TGR5 组的 TGR5 表达下降最为明显, 故选择 siRNA1-TGR5 进行后续实验。

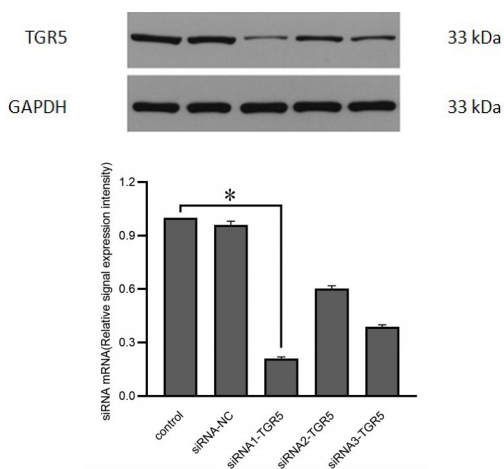


图2 TGR5-siRNA 转染乳鼠心肌细胞后 TGR5 mRNA 及蛋白表达 ( $n = 8$ )

Figure 2 Expression of TGR5 mRNA and protein in cardiomyocytes transfected with TGR5-siRNA ( $n = 8$ )

## 2.3 激活 TGR5 可减少 ET-1 介导的心肌细胞凋亡

如图 3 所示, 空白对照组、ET-1 组、TGR5 激动剂组 (ET-1+INT-777)、TGR5 表达抑制组 (ET-1+ INT-777+ TGR5 siRNA)、TGR5 空病毒组 (ET-1+ INT-777+TGR5 siRNA-NC) 各组心肌细胞凋亡率分别为:  $8.57 \pm 0.35$ 、 $16.54 \pm 0.21$ 、 $12.15 \pm 0.20$ 、 $15.79 \pm 0.33$ 、 $12.47 \pm 0.14$ , 5 组凋亡率的差异有统计学意义 ( $F = 461.2, P < 0.05$ )。与对照组相比, ET-1 组凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ET-1 组相比, TGR5 激动组心肌细胞凋亡率较 ET-1 组下降 ( $P < 0.05$ ); 与 TGR5 激动组比较, TGR5 表达抑制组心肌细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ ); 与 TGR5 表达抑制组比较, TGR5 空病毒组心肌细胞存活率升高 ( $P < 0.05$ ), 与 ET-1+INT-777 组比罗无统计学意义 ( $P = 0.156$ )。

## 2.4 激活 TGR5 增加心肌细胞存活率

如表 1 所示, 与对照组相比, ET-1 组存活率明显下

降 ( $P < 0.05$ ); 与 ET-1 组相比, TGR5 激动剂组心肌细胞存活率较 ET-1 组升高 ( $P < 0.05$ ); 与 TGR5 激动剂组比较, TGR5 表达抑制组心肌细胞存活率减小 ( $P < 0.05$ ), 与 ET-1 组相比无统计学意义 ( $P = 0.650$ ); 与 TGR5 表达抑制组比较, TGR5 空病毒组心肌细胞存活率升高 ( $P < 0.05$ ), 与 TGR5 激动剂组相比无统计学意义 ( $P = 0.842$ )。

## 2.5 TGR5 激活后抑制乳鼠心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK/JNK、Caspase12 蛋白的表达

由图 3 可见, 以 GAPDH 为内参, ET-1 组、ET-1+INT-777 组、ET-1+ INT-777+TGR5 siRNA 组、ET-1+INT-777+TGR5 siRNA-NC 组中 CHOP 蛋白分别是内参蛋白的  $0.148 \pm 0.009$  倍、 $0.503 \pm 0.005$  倍、 $0.283 \pm 0.008$  倍、 $0.503 \pm 0.006$  倍、 $0.253 \pm 0.020$  倍。5 组蛋白表达水平具有统计学差异 ( $F = 625.843, P < 0.05$ )。p-JNK 蛋白分别是内参蛋白的  $0.211 \pm 0.014$  倍、 $1.074 \pm 0.005$  倍、 $0.624 \pm 0.038$  倍、 $1.035 \pm 0.006$  倍、 $0.591 \pm 0.017$  倍。JNK 蛋白分别是内参蛋白的  $1.429 \pm 0.063$ 、 $1.440 \pm 0.068$ 、 $1.445 \pm 0.060$ 、 $1.443 \pm 0.052$ 、 $1.428 \pm 0.068$ 。p-JNK/JNK 进行方差分析, 5 组蛋白表达水平, 有统计学差异 ( $F = 352.253, P < 0.05$ )。Caspase12 蛋白分别为内参蛋白的  $0.033 \pm 0.004$  倍、 $0.440 \pm 0.029$  倍、 $0.200 \pm 0.014$  倍、 $0.407 \pm 0.028$  倍、 $0.186 \pm 0.009$  倍。5 组间蛋白表达水平具有统计学差异 ( $F = 224.609, P < 0.05$ )。与对照组相比, ET-1 组干预 48 小时后心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK 蛋白、Caspase12 蛋白表达明显增多 ( $P < 0.05$ )。激活 TGR5 后, 心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK 蛋白、Caspase12 蛋白表达增加受到抑制 ( $P < 0.05$ )。与激活 TGR5 组比较, 干扰 TGR5 基因后, 心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK 蛋白、Caspase12 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ )。与干扰 TGR5 表达组比较, siTGR5 空病毒组心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK 蛋白、Caspase12 蛋白表达增加受抑制 ( $P < 0.05$ )。而各组 JNK 蛋白表达量无明显差异。表明激活 TGR5 可以影响 CHOP、caspase-12 及 p-JNK/JNK 的表达。

表 1 激活 TGR5 对 ET-1 诱导的乳鼠心肌细胞存活率的影响

Table 1 The effect of activating TGR5 on the survival rate of cardiac myocytes in lacteal mice induced by ET-1

组别	存活率 (%)
对照组 ( $n = 8$ )	$1.014 \pm 0.017$
ET-1 组 ( $n = 8$ )	$0.805 \pm 0.030^a$
ET-1+INT-777 组 ( $n = 8$ )	$0.925 \pm 0.042^b$
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA 组 ( $n = 8$ )	$0.819 \pm 0.063^{ce}$
ET-1+ INT-777+TGR5siRNA-NC 组 ( $n = 8$ )	$0.931 \pm 0.058^{df}$
<i>F</i>	18.349
<i>P</i>	< 0.05

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  $P = 0.001$ , e 与 ET-1 组比较  $P = 0.650$ ; d 与 ET-1+INT-777+TGR5siRNA 组比较  $P = 0.001$ , f 与 ET-1+INT-777 组比较  $P = 0.842$ 。

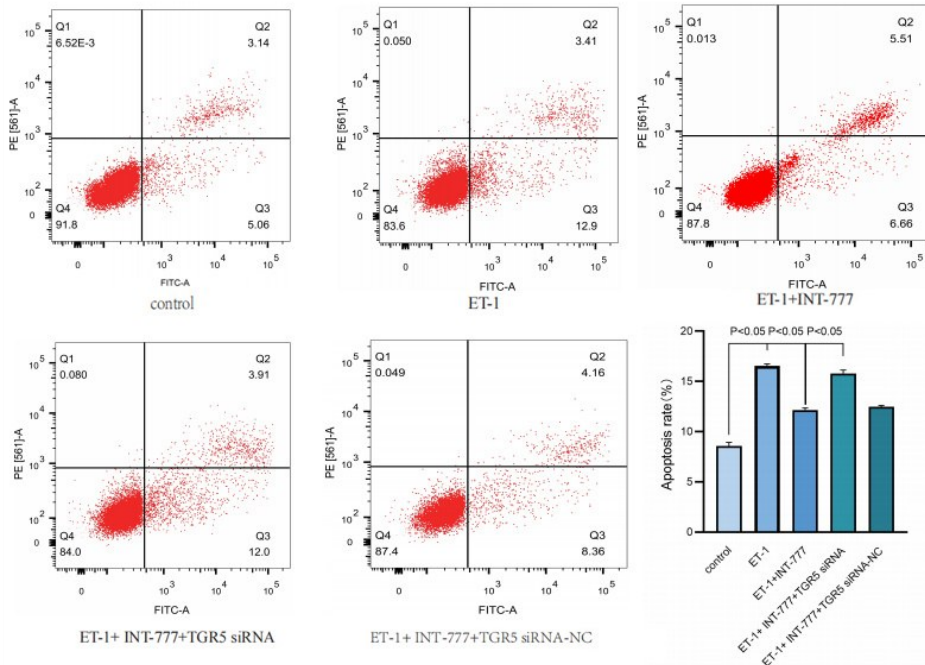


图3 激活 TGR5 对 ET-1 诱导的乳鼠心肌细胞凋亡率的影响 (n = 8)

Figure 3 The effect of activating TGR5 on the apoptosis rate of cardiac myocytes in lacteal mice induced by ET-1 (n = 8)

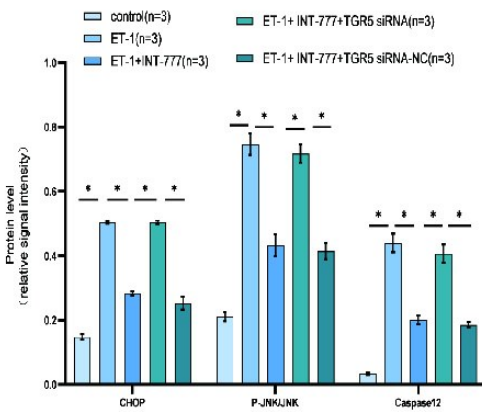
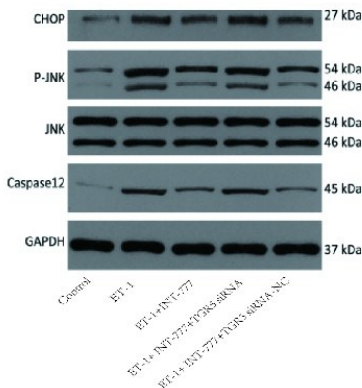


图4 激活 TGR5 对乳鼠心肌细胞 CHOP 蛋白、p-JNK/JNK 和 Caspase12 蛋白表达的影响

Figure 4 The effect of activating TGR5 on the expression of CHOP protein, p-JNK/JNK and Caspase12 protein in cardiac myocytes of lacteal mice

注: \* P < 0.05, 数据表示为平均值 ± 标准差。

### 3 讨论

#### 3.1 乳鼠心肌细胞的凋亡率与外源性 ET-1 的浓度和

#### 作用时间呈正相关

心肌细胞凋亡的增加会导致心肌重构,是心力衰竭恶化的原因之一[16]。早期动物研究表明 ET-1 与心力衰竭的发生和进展之间存在关联,人类血浆 ET-1 水平升高与肺动脉高压的严重程度相关,并与心力衰竭患者的不良预后相关[17]。但 ET-1 是否会诱导心肌细胞凋亡结论尚不统一。有研究发现,ET-1 可抑制 β-肾上腺素和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞凋亡,是一种抗心肌细胞凋亡的保护因子。而在另一项研究中,观察到选择性 ET-A 拮抗剂可减少原代培养的新生大鼠心肌细胞中缺氧诱导的细胞凋亡[18]。这种矛盾的原因可能是外源性 ET-1 的促凋亡或抗凋亡作用取决于 ET-1 浓度、细胞类型以及 ETA/ETB 受体亚型的比例[19]。本实验中可观察到 ET-1 在浓度为 10<sup>-8</sup> mmol/L ~ 10<sup>-6</sup> mmol/L 区间,随浓度增高,乳鼠心肌细胞凋亡率增加;且在 48 h 内,培养的时间越长,心肌细胞凋亡率越高。提示心肌细胞的凋亡率会随着 ET-1 的浓度的增加和时间的延长而增加,提示心肌细胞的凋亡率与 ET-1 相关。

#### 3.2 TGR5 可减轻 ET-1 相关心肌细胞凋亡

TGR5 是细胞表面 G 蛋白偶联受体,受胆汁酸调控,具有调节代谢[10]、减轻动脉硬化、抗炎[20]等作用,是心血管系统中的保护因素。前期研究发现,TGR5 激活后能抑制心肌细胞肥大[6]、抑制氧化应激损伤[14]、抑制缺血再灌注损伤后的心肌细胞凋亡[13]。通过本试验发现 TGR5 激活后对 ET-1 介导的心肌细胞凋亡率有明显抑制作用,存活率较 ET-1 组明显升高。

#### 3.3 TGR5 可能通过抑制内质网应激减轻 ET-1 介导的心肌细胞凋亡

细胞凋亡由三个主要通路介导,分别是ERS、线粒体通路和死亡受体通路<sup>[21]</sup>。ERS是一种进化保守的细胞应激反应,其初始目的是恢复内质网的平衡并保护细胞免于破坏。然而,当外界刺激超出ERS的平衡范围,凋亡信号通路便会启动。ERS启动的凋亡信号通路可通过双链RNA激活蛋白激酶样内质激酶和激活转录因子-6<sup>[22]</sup>、Bak/Bax等通路导致CHOP和Caspase-12的升高以及JNK磷酸化,从而导致心肌细胞凋亡和细胞功能障碍<sup>[23-25]</sup>。本实验发现ET-1组的CHOP蛋白、p-JNK蛋白及Caspase12蛋白表达较对照组明显升高,提示ET-1介导的心肌细胞凋亡率增加可能与内质网应激过度激活相关。

CHOP属于C/EBP转录因子家族,在生理条件下的表达水平非常低,但在严重或持续内质网应激存在时,其表达水平显著升高。升高的CHOP能诱导细胞凋亡的发生<sup>[26]</sup>,敲除CHOP可以抑制ERS诱导的细胞凋亡<sup>[27]</sup>。一般情况下,内质网膜上的Caspase12并没有活性,当ERS发生时,可介导Caspase12活化<sup>[28]</sup>,活化的Caspase12能进入细胞核,直接诱导细胞凋亡<sup>[29]</sup>,而抑制Caspase12的表达,可以减轻由ERS诱导的细胞凋亡<sup>[30]</sup>;Caspase12<sup>-/-</sup>小鼠能够抵抗由ERS诱导的凋亡<sup>[31]</sup>。因此,Caspase12被认为是ERS诱导细胞凋亡标志性蛋白<sup>[32]</sup>。内质网膜传感器在ERS过度激活时会活化JNK<sup>[33]</sup>,而JNK被磷酸化为p-JNK,通过核易位入细胞核,核内相应的转录因子和非转录因子被激活,调控基因转录,介导细胞凋亡<sup>[34]</sup>。本实验研究结果显示:各组p-JNK/JNK与CHOP蛋白及Caspase-12蛋白表达趋势相一致,表明p-JNK/JNK参与心肌细胞促凋亡作用。激活TGR5能降低心肌细胞凋亡率,增加存活率,抑制ERS相关蛋白CHOP、Caspase-12及p-JNK/JNK表达得增加,可抑制ERS过度激活,提示激活TGR5可能通过抑制ERS减少ET-1介导的心肌细胞凋亡。

## 4 结论

本研究发现ET-1可介导心肌细胞凋亡,而ET-1介导心肌细胞凋亡可能与ERS过度激活后诱导CHOP、Caspase12、p-JNK蛋白的表达相关;TGR5可能通过抑制ERS相关信号通路中CHOP、Caspase12、p-JNK蛋白的表达来减轻ET-1对心肌细胞的促凋亡作用。但由于本研究为探索性研究,关于心肌细胞凋亡仅检测了凋亡率,缺乏心肌细胞凋亡的一些生物标志物的检测;对于ET-1诱导心肌细胞凋亡的机制缺乏深入的探讨;在探索内质网应激3条通路的机制时,每条通路上都缺乏其他生物标志物,没有进行恢复实验。我们将在后续实验进一步深入研究ET-1诱导心肌细胞凋亡的机制及TGR5诱导心肌细胞凋亡的机制。

## 5 参考文献

- [1] PAHLAVANI HA. Exercise-induced signaling pathways to counteracting cardiac apoptotic processes[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 950927.
- [2] BARTON M, YANAGISAWA M. Endothelin: 30 years from discovery to therapy[J]. *Hypertension*, 2019, 74(6): 1232-1265.
- [3] BANECKI KMRM, DORA KA. Endothelin-1 in health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11295.
- [4] DUANGRAT R, PARICHATIKANOND W, LIKITNUKUL S, *et al*. Endothelin-1 induces cell proliferation and myofibroblast differentiation through the ET(a)R/G(aq)/ERK signaling pathway in human cardiac fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4475.
- [5] TAGASHIRA H, BHUIYAN MS, SHINODA Y, *et al*. Sigma-1 receptor is involved in modification of ER-mitochondria proximity and Ca(2+) homeostasis in cardiomyocytes[J]. *J Pharmacol Sci*, 2023, 151(2): 128-133.
- [6] 陈德秀,李家富,冯健. 激活TGR5通过抑制CaN/NAFT3减轻ET-1诱导的心肌细胞肥大[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(10): 939-946.
- [7] IWAI-KANAI E, HASEGAWA K. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 259(1-2): 163-168.
- [8] PARK JH, NHO KJ, LEE JY, *et al*. Anti-ischemic effects of PIK<sub>3</sub>IP<sub>1</sub> are mediated through its interactions with the ET(A)-PI3Kγ-AKT axis[J]. *Cells*, 2022, 11(14): 2162.
- [9] CAI ZY, YUAN SX, ZHONG Y, *et al*. Amelioration of endothelial dysfunction in diabetes: role of takeda G protein-coupled receptor 5[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 637051.
- [10] GOU XM, QIN L, WU D, *et al*. Research progress of takeda G protein-coupled receptor 5 in metabolic syndrome[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5870.
- [11] ZHANG SW, ZHOU JT, WU WC, *et al*. The role of bile acids in cardiovascular diseases: from mechanisms to clinical implications[J]. *Aging Dis*, 2023, 14(2): 261-282.
- [12] KLINDT C, REICH M, HELLWIG B, *et al*. The G protein-coupled bile acid receptor TGR5 (Gpbar1) modulates endothelin-1 signaling in liver[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1467.
- [13] LI JZ, CHENG RN, WAN H. Overexpression of TGR5 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via AKT/GSK-3β mediated inflammation and mitochondrial pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1): BSR20193482.
- [14] 陈德秀,李家富,冯健,等. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2020, 45(4): 442-447.
- [15] 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.
- [16] FAN MY, ZHANG J, ZENG L, *et al*. Non-coding RNA mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in heart disease[J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e16246.
- [17] LTAIEF Z, YERLY P, LIAUDET L. Pulmonary hypertension in left heart diseases: pathophysiology, hemodynamic assessment and therapeutic management[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 9971.
- [18] REHSIA NS, DHALLA NS. Potential of endothelin-1 and vasopressin antagonists for the treatment of congestive heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(1): 85-101.
- [19] REN AJ, YAN XH, LU H, *et al*. Antagonism of endothelin-1 inhibits hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008, 86(8): 536-540.
- [20] GUAN BY, TONG JL, HAO HP, *et al*. Bile acid coordinates mi-

- crobiota homeostasis and systemic immunometabolism in cardiometabolic diseases[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(5): 2129-2149.
- [21] MORA MT, FERRERO JM, GOMEZ JF, *et al.* Ca<sup>(2+)</sup> cycling impairment in heart failure is exacerbated by fibrosis: insights gained from mechanistic simulations[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1194.
- [22] HAO Y, GUO F, HUANG Z, *et al.* 2-Methylquinazoline derivative 23BB as a highly selective histone deacetylase 6 inhibitor alleviated cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1): BSR20191538.
- [23] AMEN OM, SARKER SD, GHILDYAL R, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response signaling and mediates inflammation, obesity, and cardiac dysfunction: therapeutic and molecular approach[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 977.
- [24] HE Y, ZHOU LY, FAN ZQ, *et al.* Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by N-acetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 568.
- [25] ZHANG Q, LIU JN, CHEN SL, *et al.* Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(4): 432-442.
- [26] QIN S, WANG R, TANG D, *et al.* Manganese Mitigates Heat Stress-Induced Apoptosis by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress and Activating the NRF2/SOD2 Pathway in Primary Chick Embryonic Myocardial Cells[J]. *Biol Trace Elem Res*. 2022; 200(5):2312-2320.
- [27] OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- [28] LI X, GOU F, XIAO K, *et al.* Effects of DON on Mitochondrial Function, Endoplasmic Reticulum Stress, and Endoplasmic Reticulum Mitochondria Contact Sites in the Jejunum of Piglets[J]. *J Agric Food Chem*. 2023; 71(36):13234-13243.
- [29] FUJITA E, KOUROKU Y, JIMBO A, *et al.* Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(10): 1108-1114. [PubMed]
- [30] ZHANG JS, ZHANG ZN, BAO J, *et al.* Jia-Jian-Di-Huang-Yin-Zi decoction reduces apoptosis induced by both mitochondrial and endoplasmic reticulum caspase12 pathways in the mouse model of Parkinson's disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 69-79.
- [31] WU LX, XU YY, YANG ZJ, *et al.* Hydroxytyrosol and olive leaf extract exert cardioprotective effects by inhibiting GRP78 and CHOP expression[J]. *J Biomed Res*, 2018, 32(5): 371-379.
- [32] WU H, TANG QZ, YANG J, *et al.* Atorvastatin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4915-4923.
- [33] AGUILAR C, COSTA S, MAUDET C, *et al.* Reprogramming of microRNA expression via E2F1 downregulation promotes *Salmonella* infection both in infected and bystander cells[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3392.
- [34] KIM SH, KWON D, LEE S, *et al.* Polyhexamethyleneguanidine phosphate-induced cytotoxicity in liver cells is alleviated by tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) via a reduction in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1023.

(利益冲突:无)

(收稿日期:2024-02-22;修回日期:2024-08-26)