

· 论著 ·

tirzepatide 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大的抑制作用及机制研究

李岚岚 谢赛阳 邓伟

(武汉大学人民医院心血管内科 代谢与相关慢病湖北重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探讨 tirzepatide (TZP) 对血管紧张素 II (Ang II) 诱导新生大鼠心肌细胞肥大的影响及机制研究。**方法** 分离新生大鼠心肌细胞并进行体外培养, 采用 Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) 刺激心肌细胞 24 h 建立心肌细胞肥大模型, 使用 TZP (100 nmol/L) 和 Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵育新生大鼠心肌细胞 24 h。实验随机分为 4 组: 正常对照组、TZP 组、Ang II 组和 Ang II + TZP 组。采用鬼笔环肽染色评估单个心肌细胞肥大程度; TUNEL 检测心肌细胞凋亡情况; CCK-8 法检测心肌细胞活力; 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光探针检测活性氧水平; 逆转录聚合酶链反应检测新生大鼠心肌细胞中心房利尿钠肽、脑钠肽、 β -肌球蛋白重链、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、NADPH 氧化酶 (Nox) 2、Nox4 和 NADPH 氧化酶活化蛋白 1 (NOXA2)、超氧化物歧化酶 2 (SOD2)、NADPH 醌氧化还原酶 1 (NQO1) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的 mRNA 表达水平; Western blot 检测新生大鼠心肌细胞中脑钠肽、Bax、Bcl-2、SOD2、NQO1 和 GSH-Px 蛋白质的表达水平。此外, 逆转录聚合酶链反应和 Western blot 检测各组心肌细胞中的 Beclin-1 和 p62 的 mRNA 和蛋白质表达水平。**结果** TZP 可显著降低 Ang II 诱导的心肌细胞肥大标志物和凋亡标志物的蛋白质及 mRNA 表达水平的升高, 下调促氧化因子 Nox2、Nox4 和 NOXA2 的 mRNA 表达水平, 促进抗氧化因子 SOD2、NQO1 和 GSH-Px 的 mRNA 表达水平。以上作用与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, Western blot 和自噬小体检测证实了 TZP 主要通过抑制细胞内自噬途径来拮抗 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。**结论** TZP 可缓解 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 并通过抑制自噬途径改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大作用。

【关键词】 tirzepatide; 血管紧张素 II; 心肌细胞肥大; 细胞自噬

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.09.017

Inhibitory Effect and Mechanism of Tirzepatide on Angiotensin II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy

LI Lanlan, XIE Saiyang, DENG Wei

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Metabolism and Related Chronic Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of tirzepatide (TZP) in angiotensin II (Ang II)-induced neonatal rat cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were isolated and cultured in vitro, Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) was used to stimulate cardiomyocytes for 24 h to establish a cardiomyocyte hypertrophy model, and neonatal rat cardiomyocytes were co-incubated using TZP (100 nmol/L) and Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The experiment will be randomly divided into four groups: control group, TZP group, Ang II group, and Ang II + TZP group. Phalloidin staining was used to assess the degree of hypertrophy of individual cardiomyocytes; TUNEL staining was used to detect cardiomyocyte apoptosis; CCK-8 was used to detect cardiomyocyte activity; DCFH-DA fluorescent probe was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS); and reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect the mRNA levels of atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and β -myosin heavy chain (β -MHC), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox) 2, Nox4, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activator 2 (NOXA2), superoxide dismutase 2 (SOD2), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione peroxidase (GSH-Px). The expression levels of brain natriuretic peptide, Bax, Bcl-2, SOD2, NQO1 and GSH-Px proteins were detected by Western blot in neonatal rat cardiomyocyte. In addition, reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot were performed to detect the mRNA and protein expression levels of Beclin-1 and p62 in cardiomyocytes of each group. **Results** TZP can significantly reduce the increase in protein and mRNA expression levels of cardiomyocyte hypertrophy markers and apoptosis markers induced by Ang II, down-regulate the mRNA expression levels of pro-oxidant factors Nox2, Nox4 and NOXA2, and promote the antioxidant factors SOD2, NQO1 and GSH-Px mRNA expression levels. Compared with the control group, the above effects were statistically significant ($P <$

基金项目: 国家自然科学基金 (82170245)

通信作者: 邓伟, E-mail: vivideng1982@whu.edu.cn

0.05)。Meanwhile, Western blot and autophagosome assay confirmed that TZP antagonized Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy mainly by inhibiting intracellular autophagy pathway. **Conclusion** TZP can alleviate Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy and improve the effect of Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting autophagy.

【Keywords】Tirzepatide; Angiotensin II; Cardiomyocyte hypertrophy; Cell autophagy

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)在全球范围内有很高的发病率和死亡率,是各种心血管疾病发展的终末阶段,且预后不良^[1]。而在各种复杂的病因中,心肌细胞肥大及其导致的心肌重构是致 CHF 发生发展的主要病理学基础^[2]。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)是肾素-血管紧张素-醛固酮系统中最重要的活性激素,也是导致心肌肥厚和心肌重构的重要原因^[3]。因此抑制 Ang II 导致的心肌细胞肥大对于临床改善 CHF 具有重要意义。

tirzepatide(TZP)是一种结合葡萄糖依赖性促胰岛素多肽和胰高血糖素样肽-1 的双受体激动剂,目前正处于治疗 2 型糖尿病和肥胖的动物实验和临床试验中^[4-5]。一项关于在 TZP 治疗过程中对心血管系统风险评估的临床研究^[6]证明,TZP 不会增加 2 型糖尿病患者发生严重心血管不良事件的风险。不仅如此,其在 2 型糖尿病相关的心力衰竭和发展到终末期的心血管疾病的临床治疗中也取得一定的进展^[7]。然而,目前关于 TZP 是否能减轻心肌细胞肥大以延缓心力衰竭发生发展的研究还处于空白领域。本研究在 Ang II 诱导新生大鼠心肌细胞肥大的基础上,观察 TZP 对 Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞重构作用的影响及其影响的作用机制,旨在为防治临床心肌重构及其诱导的心血管疾病作出贡献。

1 材料与方法

1.1 细胞准备

准备出生 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠,麻醉并用 75% 酒精消毒后剪开胸腔,取出心脏,剔除周围结缔组织,并用预冷的平衡盐溶液洗涤心脏。在 DMEM/F12 培养液中将心室剪碎,加入 0.125% 的胰蛋白酶,于 37℃ 培养箱中分次消化,每次 5 min,共消化 3 次。每次消化后取上清液,并加入含 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 培养液中中止消化。用 200 目细胞过滤筛子过滤细胞混合液,置于离心机中并以转速 1 000 r/min 离心 5 min 后收集沉淀,如此重复离心 3 次后,用 DMEM/F12 培养液重悬细胞,接种于 10 cm 细胞培养皿中培养 90 min,将未贴壁细胞悬液放入新的培养皿,于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养使其贴壁。实验过程应在严格的无菌条件下进行。本实验获得武汉大学动物伦理审查委员会批准(20210902)。

1.2 主要试剂及仪器

TZP 购自 MCE 公司,Ang II 购自 Sigma-Aldrich 公

司,二甲亚砜购自 MCE 公司,FBS 和 DMEM/F12 培养液购自 Gibco 公司,Trizol 和反转录试剂盒购自 Roche 公司,TUNEL 试剂盒、CCK-8 试剂盒、鬼笔环肽荧光染色试剂盒、2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针试剂盒和细胞自噬染色检测试剂盒购自上海碧云天公司,聚偏二氟乙烯膜购自 Millipore 公司,化学发光蛋白显影液购自 Borad 公司,MCO-18AIC(UV)培养箱购自三洋公司,Synergy HT 酶标仪购自 Bio-Tek 公司,F98 荧光分光光度计购自上海棱光公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自武汉塞维尔公司,B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)抗体和 β 微管蛋白(β -tubulin)抗体购自中国 Abmart 公司,Beclin-1 抗体购自 CST 公司;脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、p62 抗体购自 Protein 公司;B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体购自 Abcam 公司。

1.3 实验分组

将分离的新生大鼠心肌细胞接种于 6/24 孔板中,用含 FBS(浓度为 15%)的 DMEM/F12 培养液培养让其贴壁生长 24 h 后,同步化去血清培养 12 h。然后将细胞随机分为 4 组,分别接受不同处理(每组 6 个复孔)。分组如下,正常对照组:15% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养 24 h;TZP 组:15% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养,同时加入 TZP(100 nmol/L)^[8]处理 24 h;Ang II 组:15% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养,同时加入 Ang II(1 μ mol/L)处理 24 h;TZP + Ang II 组:15% FBS 的 DMEM/F12 培养液培养,同时加入 TZP(100 nmol/L)和 Ang II(1 μ mol/L)共同孵育 24 h。TZP 组与正常对照组作比较,排除 TZP 对实验研究指标的干扰,证明 TZP 对细胞没有毒害作用;Ang II 组刺激细胞肥大,能很好地检验细胞肥大造模是否成功;TZP + Ang II 组主要同 Ang II 组作比较,目的是研究 TZP 能否减轻 Ang II 对细胞的药理作用。

1.4 鬼笔环肽荧光染色观察心肌细胞表面积

将接种于 24 孔板中状态良好的 4 组细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次,3.7% 甲醛溶液室温固定 20 min,之后用 PBS 洗涤细胞 3 次,放摇床洗涤,每次 5 min。用 PBS 稀释微丝绿

色荧光探针,比例为 1:200,配置染色工作液。染色工作液为 200 μL /孔滴加到样本上,室温避光孵育 1 h。孵育完成后用 PBS 洗涤 4 次。随后用荧光显微镜观察。保存荧光图片,用 Image J 软件计算出细胞的平均荧光强度,将每组所得数值保存到 Excel 表格,后续用 Graphpad 进行统计学分析。

1.5 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡

将接种于 6 孔板中状态良好的 4 组细胞经饥饿处理加药后,弃培养基,用 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针孵育 1 h。后用 PBS 洗 3 次,尽量洗净未结合的探针,随后用荧光显微镜观察。保存图片,根据阳性细胞的灰度值、颜色等特征,用 Image J 软件将阳性细胞与背景分开,然后进行颗粒分析,从而得到 TUNEL 染色阳性细胞数量,并将数据保存到 Excel 表格中以便进行统计学分析。

1.6 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧水平

将接种于 6 孔板中状态良好的 4 组细胞经饥饿处理加药培养后,弃培养基,再加入 1 mL (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 DCFH-DA 探针于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 1 h;然后用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA;再用荧光显微镜观察,用 Image J 软件计算细胞荧光面积,数据用于后续统计学分析。

1.7 CCK-8 法检测新生大鼠心肌细胞活力

将状态良好的新生大鼠心肌细胞接种于 96 孔板,每孔约 100 μL (细胞浓度为 2×10^4 个/mL),每组 4 个复孔。经饥饿处理加药后吸净培养液,再加入 CCK-8 溶液 10 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育避光 4 h,用酶标仪检测细胞在 450 nm 处的吸光度值。数据分析时,需要先将吸光度数据录入到 Excel 表格中,然后进行数据处理和统计分析。

1.8 逆转录聚合酶链反应法检测相关 mRNA 表达水平

逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法检测各组心肌细胞肥大标志物心房利尿钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、BNP、 β -肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC), 凋亡标志物 Bax、Bcl-2; NADPH 氧化酶活化蛋白 1 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activator 2, NOXA2)、NADPH 氧化酶 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Nox) 4 和 Nox2; 抗氧化因子超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2)、NADPH 醌氧化还原酶 1 (NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和自噬标志物 Beclin-1 的 mRNA 表达变化。吸净细胞培养液,用 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 Trizol 裂解液 1 mL,使细胞裂解,充分裂解后将其收集到除酶离心管中,提取细胞的总 RNA,并用分光光度计检测吸光度比值 (A_{260}/A_{280}),计算 RNA 浓度,将 Mix1 (总 RNA 2.0 μg 、聚合酶链反应水 10.0 μL 、反转录引物 1.0 μL 和随机引物 2.0 μL) 置于 RT-PCR 转录仪中,设置程序为 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,反应结束后取出 EP 反应管置于冰上冷却至少 5 min。待 Mix1 冷却后加入 Mix2 (逆转录缓冲液 4.0 μL 、脱氧核糖核苷三磷酸 2.0 μL 、抑制剂 0.5 μL 和逆转录酶 0.5 μL),整个反应体系混匀后继续置于 RT-PCR 转录仪中,程序设置按以下顺序为 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 90 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,逆转录完成后加入 60 μL 焦碳酸二乙酯水混匀,以 GAPDH 为内参,得出标准化比值,所有逆转录基因所需引物见表 1。

表 1 各基因前后引物

目的基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
ANP	GTAAGTGGGGTCGGTCATGA	TTCGCTACCGGAAGCTGTTGCA
BNP	TTCCTTAATCTGTCGCCGCTGG	CAGCAGCTTCTGCATCGTGGAT
β -MHC	TCTGGACAGCTCCCCATTCT	CAAGGCTAACCTGGAGAAGATG
Bax	CGGCGAATTGGAGATGAACCTG	AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC
Bcl-2	TGAACCGGCATCTGCACAC	CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG
GP91	TGAATCTCAGGCCAATCACTTT	AATGGTCTTGAACCTGTTATCCC
Nox4	ACCTCAGTCAAACAGATGGGATA	TAGAACTGGGTCCACAGCAGA
SOD2	AGCCTCCCTGACCTGCCTTA	CGCCTCGTGGTACTTCTCCTC
NQO1	TCCGAAGCATTTTCAGGCTCG	GGGCAATACAATCAGGGCT
GSH-Px	GGTTTCCCGTGAATCAGTT	GTAAGTGGGGTCGGTCATGA

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

吸弃细胞培养液, PBS 洗涤 3 次,提取细胞蛋白,

行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同分子量的蛋白分离,用电转化法将蛋白转至聚偏二氟乙烯

膜上,膜用 5% 脱脂牛奶摇床室温封闭 1 h,三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤 3 次,裁相应分子量大小的膜,一抗(1:1 000)4 ℃ 摇床孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗涤 3 遍,二抗(1:10 000)孵育 1 h,洗涤后用化学发光显影液处理,扫膜仪扫描各组蛋白条带。

1.10 单丹磺酰尸胺法染色检测细胞自噬

将接种于 6 孔板中状态良好的 4 组细胞经饥饿处理加药后吸净培养液,用 PBS 洗涤 1 次。每孔加入 1 mL 单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)染色液,在细胞培养箱中 37 ℃ 避光孵育 30 min。吸净 MDC 染色液,使用分析缓冲液洗涤 3 次,再加入 1 mL 分析缓冲液。在荧光显微镜下,观察绿色荧光。分析图片中的荧光强度,保存数据用于 4 组细胞自噬情况的统计学分析。

1.11 统计学分析

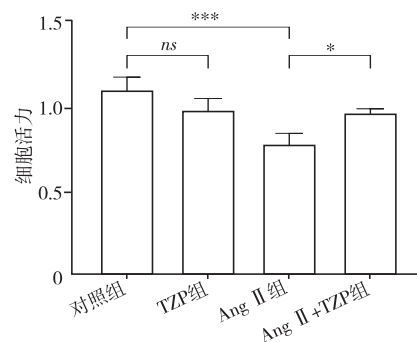
应用 Graphpad 9.5 分析处理数据,绘制柱状图。计量资料以均数 \pm 标准差表示,所有数据采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力测定结果

CCK-8 实验检测显示与对照组相比, TZP (100 nmol/L) 处理后心肌细胞活力没有明显变化($P > 0.05$), Ang II (1 μ mol/L) 处理的心肌细胞活力较

对照组明显降低($P < 0.05$), 而 TZP 能缓解 Ang II 诱导的心肌细胞活力降低($P < 0.05$) (图 1)。

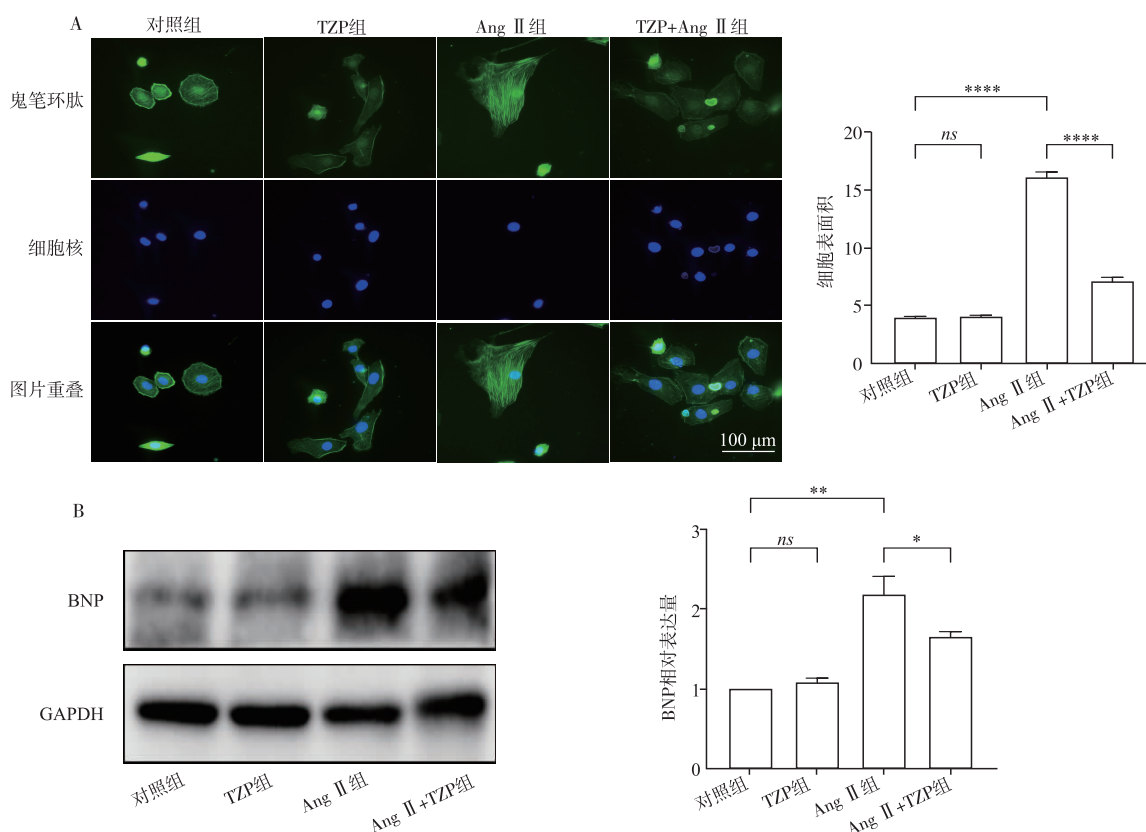


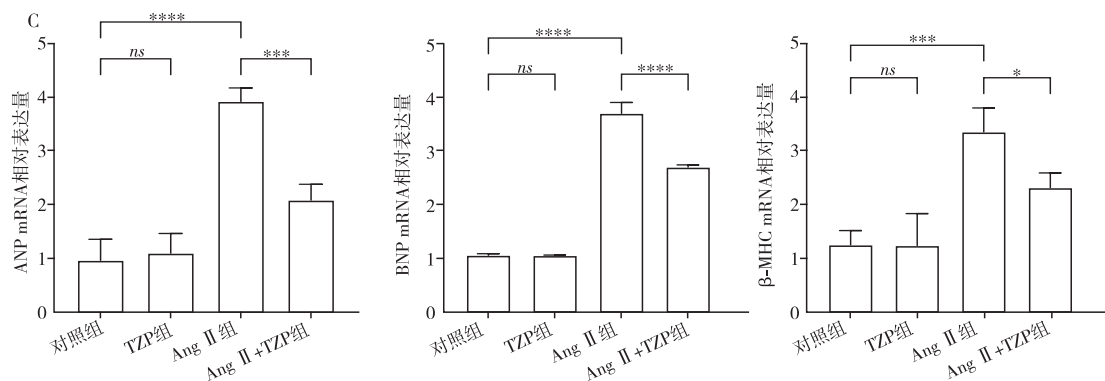
注: ns 表示无统计学差异; * 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.001$, $n = 6$ 。

图 1 新生大鼠心肌细胞活力测定结果

2.2 TZP 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大

鬼笔环肽荧光染色实验表明, Ang II 刺激使心肌细胞面积明显增大, 而 TZP 明显改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大 (图 2A); Western blot 检测结果显示, TZP 显著降低 Ang II 诱导的细胞内 BNP 蛋白表达水平($P < 0.05$) (图 2B); 同时 RT-PCR 提示, 在 Ang II 刺激下, 新生大鼠心肌细胞内 ANP、BNP、 β -MHC mRNA 表达显著上调, 而 TZP 能显著下调 Ang II 刺激下上述标志物的表达($P < 0.05$) (图 2C)。这些结果表明, TZP 能显著抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大 (图 2)。





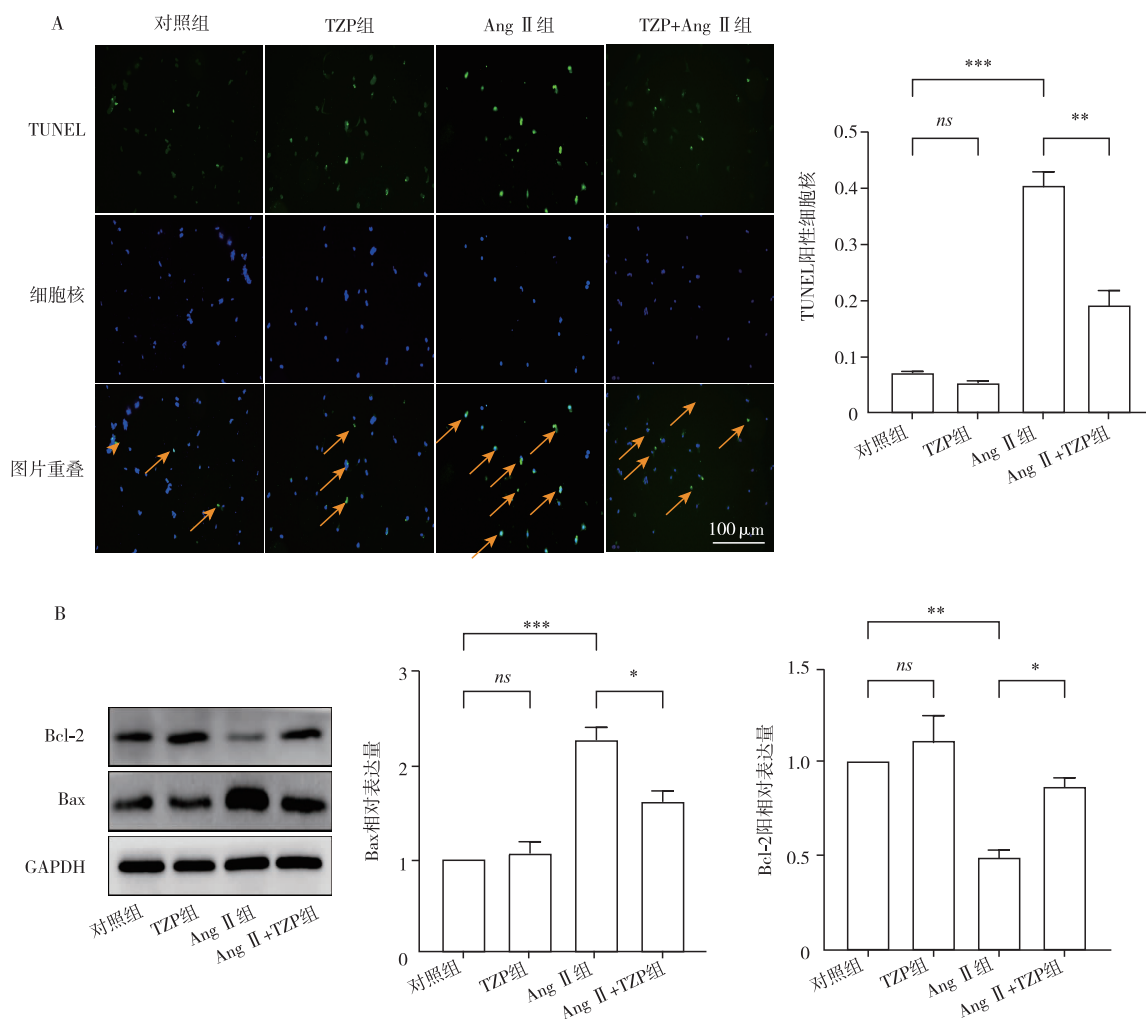
注:A 为细胞表面积荧光图及细胞表面积定量测定结果;B 为 Western blot 测量 BNP 蛋白表达水平($n=6$);C 为 BNP、ANP 及 β -MHC mRNA 表达水平($n=6$),以 GAPDH 为内参。*ns* 表示无统计学差异,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$,**** 表示 $P<0.0001$ 。

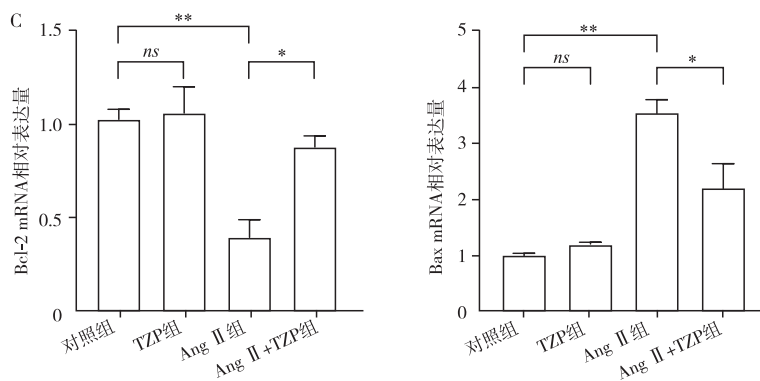
图 2 TZP 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大

2.3 TZP 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡

Western blot 和 RT-PCR 实验证明 Ang II 刺激增加了心肌细胞中凋亡标志物 Bax 和 Bcl-2 的蛋白质和 mRNA 的表达,而 TZP 降低了 Ang II 诱导的 Bax 和 Bcl-2 表达上调的趋势($P<0.05$)(图 3A 和图 3B)。

同时,TUNEL 染色提示,心肌细胞在 Ang II 的刺激下,细胞凋亡明显,而 TZP 的使用使凋亡的阳性反应相较于 Ang II 组有明显降低($P<0.05$)(图 3C)。这些结果表明,TZP 显著抑制 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡。





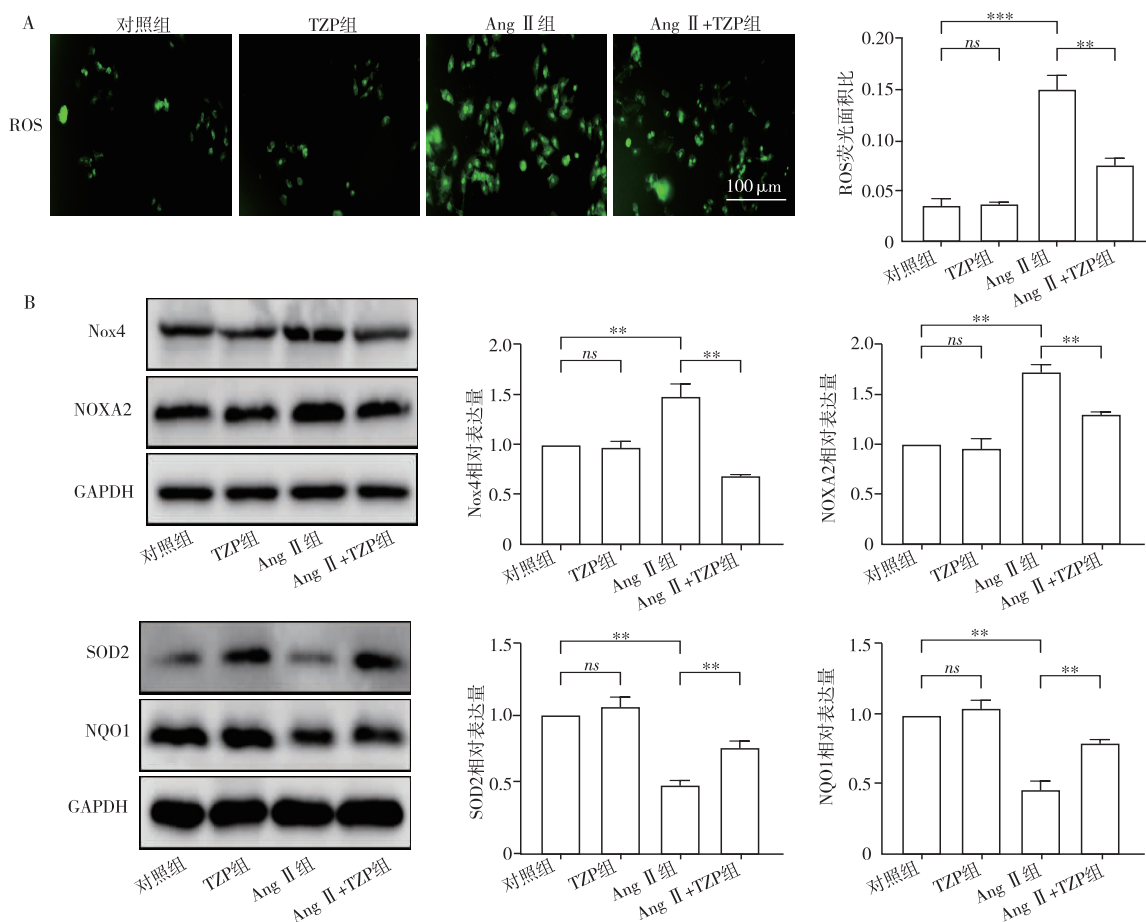
注:A为TUNEL染色检测细胞凋亡以及TUNEL阳性细胞核测定(黄色箭头表示阳性细胞核);B为Western blot测量Bax和Bcl-2蛋白表达水平;C为Bax和Bcl-2 mRNA表达水平($n=6$),以GAPDH为内参。*ns*表示无统计学差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。

图3 TZP抑制Ang II诱导的心肌细胞凋亡

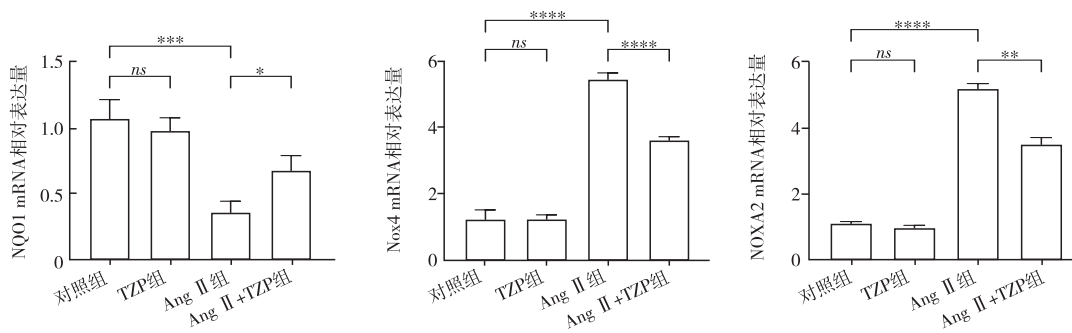
2.4 TZP抑制Ang II诱导的心肌细胞氧化应激

与对照组相比,Ang II组DCFH-DA探针检测新生大鼠心肌细胞的荧光阳性细胞数量显著增多,给予TZP处理后,显著抑制Ang II诱导的活性氧(reactive oxygen species, ROS)表达量,降低了荧光强度($P<0.05$),见图4A。Western blot结果显示,Ang II刺激后促氧化因子Nox4和NOXA2表达上调,而抗氧化因子SOD2和NQO1的表达下调($P<0.05$),TZP能拮抗

Ang II刺激导致的上述改变($P<0.05$),见图4B。同样的,RT-PCR实验结果也显示TZP处理能逆转Ang II刺激导致的促氧化应激相关因子Nox2、Nox4和NOXA2的mRNA上调($P<0.05$),以及Ang II刺激导致的抗氧化因子SOD2、NQO1和GSH-Px的mRNA下调($P<0.05$),见图4C和图5A。这些结果表明,TZP能逆转Ang II诱导的心肌细胞氧化应激。



C



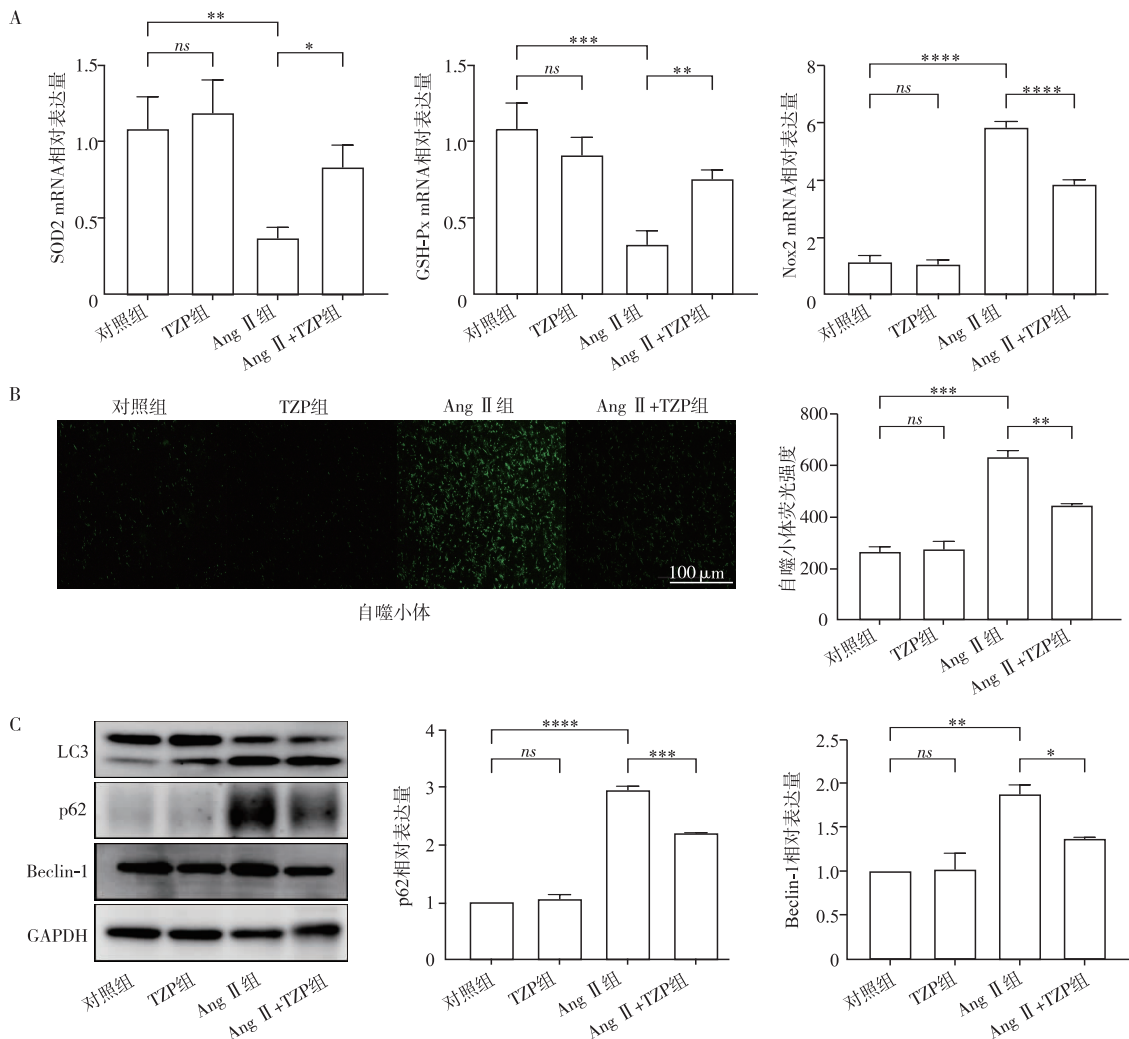
注:A为ROS表达水平;B为Nox4、NOXA2、SOD2和NQO1蛋白表达水平($n=6$);C为NQO1、Nox4、NOXA2的mRNA水平($n=6$),以GAPDH为内参。*ns*表示无统计学差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$ 。

图4 TZP抑制Ang II诱导的心肌细胞氧化应激

2.5 TZP抑制Ang II诱导的心肌细胞自噬

MDC法染色检测新生大鼠心肌细胞的自噬小体,与对照组相比,Ang II刺激组自噬小体明显增多,给予TZP处理后,显著抑制Ang II诱导的自噬小体产生

($P<0.05$)(图5A);Western blot结果显示,Ang II刺激后自噬指标Beclin-1和p62表达明显上调,而TZP能缓解这种改变($P<0.05$)(图5B)。这些结果表明,TZP能缓解Ang II诱导的心肌细胞自噬激活。



注:A为SOD2、GSH-Px和Nox2的mRNA水平($n=6$);B为MDC法染色检测细胞自噬,绿色荧光为自噬小体($n=6$);C为微管相关蛋白1轻链3(LC3)、Beclin-1和p62蛋白表达水平($n=6$),以GAPDH为内参。*ns*表示无统计学差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$ 。

图5 TZP抑制Ang II诱导的心肌细胞自噬

3 讨论

本次研究首次发现 TZP 能通过抑制自噬途径缓解 Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大、凋亡和氧化应激。主要表现为 Ang II 刺激后新生大鼠心肌细胞的表面积增大,心肌细胞肥大标志物 ANP、BNP 和 β -MHC 表达上调。此外,对凋亡相关因子和氧化应激相关因子的检测发现,Ang II 刺激后新生大鼠心肌细胞的凋亡指标 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调,促氧化应激指标 Nox4、Nox2 和 NOXA2 表达水平升高;抗氧化应激指标 SOD2、NQO1 和 GSH-Px 表达水平下降。关于对其机制的研究显示,自噬相关因子 Beclin-1 和 p62 的表达水平升高。本研究从病理学和分子生物学两方面证实了 TZP 能抑制心肌重构,对抗凋亡和抗氧化应激具有积极意义。

早期的心肌细胞肥大是代偿心脏负荷增加的主要机制之一,随着心脏负荷的持续增加,会逐渐发展为肥厚性心肌重构甚至心力衰竭,而循环中增多的 Ang II 是诱导心肌重构、促进心力衰竭发生的主要原因之一^[9]。Ang II 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统的主要效应分子,激活 Ang II 1 型受体,在炎症、血管收缩、成纤维细胞增殖和心肌重构过程中起重要作用。因此,Ang II 会促进心肌细胞肥大、凋亡、心肌纤维化等过程^[10],所以阻断心肌细胞肥大的信号通路对延缓心力衰竭的发展有重大意义^[9]。

有趣的是,近年来的研究发现细胞自噬参与 Ang II 诱导的多种病理过程。如自噬参与 Ang II 诱导的人脐静脉内皮细胞功能障碍^[11];Ang II 引起的自噬作用可加速新生大鼠心肌细胞的死亡,从而进一步加速动脉粥样硬化病变^[12];在肾小球疾病的研究^[13]中发现 Ang II 诱导的高血压会抑制小鼠肾小球自噬通量,在这期间自噬是 Ang II 诱导足细胞病的关键保护机制。

此外关于自噬与心肌细胞肥大、氧化应激和凋亡的关系,目前也有大量报道。有研究^[14]表明自噬在维持心脏稳态中起着复杂但不可或缺的作用。自噬作为一种保护心肌细胞免于衰老的防御机制,在改善衰老相关的心脏肥大中起关键作用^[15]。当自噬活性受到抑制时,心脏随着年龄的增长而发生心脏肥大和舒张功能障碍^[15]。不仅如此,自噬水平在横向主动脉缩窄手术诱导心肌细胞肥大的不同时期发生变化:其在主动脉缩窄手术后 1 周的肥大心脏中被抑制,而在主动脉缩窄手术后 4 周的衰竭心脏中被上调,这可通过微管相关蛋白 1 轻链 3-II 型表达水平的改变来证实^[16]。自噬可改善压力相关性的心肌细胞肥大^[17]。氧化应激与线粒体功能障碍密切相关,而线粒体的周转依赖于自噬^[18]。ROS 诱导的线粒体损伤与自噬体

和溶酶体数量的增加有关^[18]。还有报道^[19]表明,鸢尾素可通过自噬改善 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡。这些研究结果说明 Ang II 诱导的心肌细胞肥大、氧化应激、凋亡和内皮细胞损伤等相关生理过程都有细胞自噬的参与。

TZP 作为一种新型胰高血糖素样肽-1 受体和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽双重激动剂,以天然葡萄糖依赖性促胰岛素多肽序列为基础,配制为含有 39 个氨基酸的合成肽^[20]。临床前试验以及 1 期和 2 期临床试验^[21]表明,TZP 具有有效的降血糖和减肥作用,其不良反应与目前已有的胰高血糖素样肽-1 受体激动剂相似。目前对于 TZP 在糖尿病以外领域的研究很少见报道,本研究发现 TZP 能减轻 Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞自噬水平的增加。鉴于目前对自噬与 Ang II 的研究,猜测 TZP 通过抑制自噬改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大、凋亡以及氧化应激损伤。

本研究已证明自噬参与 Ang II 诱导的心肌细胞重构过程,并且 TZP 能缓解自噬从而缓解心肌重构。但本研究并未深入探究自噬参与心肌重构的机制通路。目前,关于自噬对于心肌重构的研究结论仍存在许多争议。如有研究^[22]发现槲皮素通过调节 miR-223-3p/FOXO3 增加自噬来阻止异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化。相反,另一项研究^[23]表明二甲双胍能减轻巨噬细胞自噬-ROS-NLRP3 介导的炎症反应对缺血性心肌损伤的保护作用。所以自噬的增加或减轻在不同的机制通路中有不同的意义。从心力衰竭发展的初期和晚期来看,自噬起到的作用是否具有积极意义仍不明确。而本研究只验证了自噬对于 Ang II 诱导的心肌细胞肥大等表型的改善作用,并未深入探讨其通路,接下来将继续深入研究自噬机制的通路,致力于为临床上压力诱导型心脏肥大患者提供新的治疗方案。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ziaeean B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(6):368-378.
- [2] Oka T, Akazawa H, Naito AT, et al. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure[J]. *Circ Res*, 2014, 114(3):565-571.
- [3] 冯梦,朱欣然,郑盈盈,等. 血管紧张素 II 诱导小鼠心肌肥大差异表达蛋白的鉴定与分析[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2018, 41(3):78-84.
- [4] Samms RJ, Christie ME, Collins KA, et al. GIPR agonism mediates weight-independent insulin sensitization by tirzepatide in obese mice[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(12):e146353.
- [5] Heise T, Mari A, DeVries JH, et al. Effects of subcutaneous tirzepatide versus placebo or semaglutide on pancreatic islet function and insulin sensitivity in adults with type 2 diabetes: a multicentre, randomised, double-blind, parallel-arm, phase 1 clinical trial[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(6):

- 418-429.
- [6] Sattar N, McGuire DK, Pavo I, et al. Tirzepatide cardiovascular event risk assessment; a pre-specified meta-analysis[J]. *Nat Med*, 2022, 28(3):591-598.
- [7] Syed YY. Tirzepatide: first approval[J]. *Drugs*, 2022, 82(11):1213-1220.
- [8] Willard FS, Douros JD, Gabe MB, et al. Tirzepatide is an imbalanced and biased dual GIP and GLP-1 receptor agonist[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(17):e140532.
- [9] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7):387-407.
- [10] 于永丽, 李艳, 高奋. 铁死亡在血管紧张素 II 诱导的心肌肥大中的作用研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2023, 44(12):1116-1119.
- [11] Liu D, Sun WP, Chen JW, et al. Autophagy contributes to angiotensin II induced dysfunction of HUVECs [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2021, 43(5):462-473.
- [12] Zhang YY, Shi YN, Zhu N, et al. Autophagy: a killer or guardian of vascular smooth muscle cells[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(5):449-455.
- [13] Bensaada I, Robin B, Perez J, et al. Calpastatin prevents angiotensin II-mediated podocyte injury through maintenance of autophagy[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(1):90-106.
- [14] Lavandero S, Troncoso R, Rothermel BA, et al. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives [J]. *Autophagy*, 2013, 9(10):1455-1466.
- [15] Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, et al. This old heart: cardiac aging and autophagy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 83:44-54.
- [16] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):619-624.
- [17] Jin YG, Zhou H, Fan D, et al. TMEM173 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy by modulating autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(7):5176-5192.
- [18] Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling[J]. *Biochem J*, 2012, 441(2):523-540.
- [19] Li R, Wang X, Wu S, et al. Irisin ameliorates angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis through autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):17578-17588.
- [20] Thomas MK, Nikoienjad A, Bray R, et al. Dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide improves beta-cell function and insulin sensitivity in type 2 diabetes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(2):388-396.
- [21] Min T, Bain SC. The role of tirzepatide, dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in the management of type 2 diabetes: the SURPASS clinical trials[J]. *Diabetes Ther*, 2021, 12(1):143-157.
- [22] Hu J, Wang X, Cui X, et al. Quercetin prevents isoprenaline-induced myocardial fibrosis by promoting autophagy via regulating miR-223-3p/FOXO3 [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(13):1253-1269.
- [23] Fei Q, Ma H, Zou J, et al. Metformin protects against ischaemic myocardial injury by alleviating autophagy-ROS-NLRP3-mediated inflammatory response in macrophages[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 145:1-13.

收稿日期:2023-11-01

(上接第 833 页)

- [32] Vest KE, Hashemi HF, Cobine PA. The copper metallome in eukaryotic cells [J]. *Met Ions Life Sci*, 2013, 12:451-478.
- [33] Jiang Y, Wang LP, Dong XH, et al. Trace amounts of copper in drinking water aggravate cerebral ischemic injury via impairing endothelial progenitor cells in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(8):677-680.
- [34] Xu J, Xu G, Fang J. Association between serum copper and stroke risk factors in adults: evidence from the National Health and Nutrition Examination survey, 2011—2016[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(3):1089-1094.
- [35] Bueno H, Moura B, Lancellotti P, et al. The year in cardiovascular medicine 2020: heart failure and cardiomyopathies [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(6):657-670.
- [36] Zhang S, Liu H, Amarsingh GV, et al. Restoration of myocellular copper- trafficking proteins and mitochondrial copper enzymes repairs cardiac function in rats with diabetes-evoked heart failure[J]. *Metallomics*, 2020, 12(2):259-272.
- [37] Liu J, Chen C, Liu Y, et al. Trientine selectively delivers copper to the heart and suppresses pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(14):1141-1152.
- [38] Liu S, Zhao Y, Shen M, et al. Hyaluronic acid targeted and pH-responsive multifunctional nanoparticles for chemo-photothermal synergistic therapy of atherosclerosis[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(4):562-570.
- [39] Li SR, Bu LL, Cai L. Cuproptosis: lipoylated TCA cycle proteins-mediated novel cell death pathway[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):158.

收稿日期:2024-02-27