

恩格列净及达格列净对棕榈酸诱导的心肌细胞损伤的保护作用及其机制

魏煜迪¹, 罗圣贺¹, 金红花^{2*} (1.延边大学药学院, 吉林 延吉 133002; 2.延边大学附属医院药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 目的 探讨钠-葡萄糖共转运蛋白-2 抑制剂恩格列净(empagliflozin, EMPA)及达格列净(dapagliflozin, DAPA)对棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用及其可能机制。方法 采用 PA 诱导 H9c2 心肌细胞损伤, CCK-8 法筛选 PA、EMPA 及 DAPA 的最佳给药浓度; Western blotting 检测 TLR4、p-AKT、p-mTOR、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平; ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量; 荧光显微镜和流式细胞术检测 PA 诱导 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平。结果 PA 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 刺激 24 h 可诱导 H9c2 心肌细胞存活率明显下降($P<0.01$), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白表达、p-mTOR 蛋白表达及 ROS 水平明显增加($P<0.01$), p-AKT、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 经 EMPA 及 DAPA 处理后, 细胞存活率明显增加($P<0.01$), IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TLR4 蛋白表达、p-mTOR 蛋白表达及 ROS 水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), p-AKT、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的心肌细胞损伤均具有保护作用, 其机制可能与下调 TLR4、p-mTOR 蛋白表达, 增强 AKT 蛋白磷酸化, 激活 Nrf2/HO-1 通路, 抑制 ROS 的生成有关。

关键词: 恩格列净; 达格列净; 棕榈酸; 心肌细胞

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)20-2884-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223273

引用本文: 魏煜迪, 罗圣贺, 金红花. 恩格列净及达格列净对棕榈酸诱导的心肌细胞损伤的保护作用及其机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(20): 2884-2890.

Protective Effect of Empagliflozin and Dapagliflozin on Palmitic Acid-induced Cardiomyocytes Injury and Its Underlying Mechanism

WEI Yudi¹, LUO Shenhe¹, JIN Honghua^{2*} (1.College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China; 2.Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors empagliflozin (EMPA) and dapagliflozin(DAPA) on palmitic acid(PA)-induced injury of rat H9c2 cardiomyocytes and its possible mechanism. **METHODS** H9c2 myocardial cell injury was induced by PA. CCK-8 method was used to screen the optimal dosage of PA, EMPA and DAPA. The protein expression levels of TLR4, p-AKT, p-mTOR, Nrf2 and HO-1 were detected by Western blotting. The expressions of IL-1 β , IL-6, TNF- α were detected by ELISA. ROS levels in PA-induced H9c2 cardiomyocytes were determined by fluorescence microscopy and flow cytometry. **RESULTS** The survival rate of H9c2 cardiomyocytes decreased significantly after treatment of PA 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h($P<0.01$), the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , TLR4, p-mTOR and ROS were significantly increased($P<0.01$), and the protein expression of p-AKT, Nrf2 and HO-1 was significantly decreased($P<0.01$). Compared with the model group, the cell survival rate was significantly increased after EMPA and DAPA treatment($P<0.01$), the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , TLR4, p-mTOR and ROS levels were significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$), and the protein expression of p-AKT, Nrf2 and HO-1 was significantly up-regulated($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** EMPA and DAPA have protective effects on PA-induced cardiomyocyte injury, and the mechanism may be related to down-regulation of TLR4 and p-mTOR protein expression, enhancement of AKT protein phosphorylation, activation of Nrf2/HO-1 pathway, and inhibition of ROS generation.

KEYWORDS: empagliflozin; dapagliflozin; palmitic acid; cardiomyocytes

脂毒性心肌损伤是指心肌对游离脂肪酸的过度吸收导致组织中的脂质大量沉积, 通常伴有心肌纤维化甚至心力衰竭^[1], 可严重损害心脏的正常功能。棕榈酸(palmitic acid, PA)是一种普遍存在

于生物体中的高级饱和脂肪酸, 约占人体中饱和脂肪酸的 65%。已有研究表明心肌中脂肪酸的过度沉积可以诱发氧化应激和各种炎症反应, 从而导致细胞凋亡^[2-3]。因此, 探究脂毒性心肌损伤的

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860077)

作者简介: 魏煜迪, 女, 硕士 E-mail: weiyudi2019@163.com

*通信作者: 金红花, 女, 博士, 副主任药师 E-mail:

kimflower1988@163.com

发病机制与治疗靶点已经成为当今心血管领域研究的热点与难点。

钠-葡萄糖共转运蛋白-2(sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2)抑制剂是目前广受关注的一类口服降糖药,抑制 SGLT2 蛋白能促使葡萄糖自尿液排出,起到降血糖的效果^[4]。由于 SGLT2 主要在肾表达,并不表达于心,因此其表现出的非靶点心脏保护作用已引起广泛关注。大量研究表明,SGLT2 抑制剂主要通过改善心脏能量代谢、增加心肌细胞 ATP 能量存储、抑制心脏 Na^+/H^+ 交换、调节钙离子水平等方式保护心脏^[5-6]。目前已上市的 SGLT2 抑制剂主要包括恩格列净(empagliflozin, EMPA)、达格列净(dapagliflozin, DAPA)、坎格列净、依格列净和托格列净等。其中,EMPA 与 DAPA 作为 SGLT2 抑制剂的代表药物,已有大量研究报道其具有显著的心血管保护作用。DAPA 可以通过减少氧自由基、减轻纤维化与炎症,调节心脏收缩功能来改善糖尿病心肌病^[7]; EMPA 可通过激活线粒体自噬途径减轻心脏缺血再灌注损伤^[8],但有关 EMPA 及 DAPA 对脂毒性心肌损伤的保护作用机制尚未完全明确。本研究通过 PA 建立脂毒性心肌损伤模型,探讨 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的心肌细胞损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 H9c2 细胞株购自上海富衡生物科技有限公司。用含 10%胎牛血清的高糖培养液进行常规培养,2~3 d 传代 1 次。

1.1.2 药物与试剂 EMPA(美国 APEX BIO 公司,货号:A4601;纯度:99.77%);DAPA(美国 APEX BIO 公司,货号:A5854;纯度:99.77%);PA(美国 Sigma 公司,货号:P5585-10G;纯度 $\geq 99\%$);胎牛血清(美国 Gemini 公司,货号:900-108);DMEM 培养基(以色列 Bioind 公司,货号:01-052-1ACS);活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:ZP328-3);ELISA 试剂盒 IL-1 β (货号:YJ037373)、ELISA 试剂盒 IL-6(货号:YJ102828)、ELISA 试剂盒 TNF- α (货号:YJ002859)均购自上海海联生物有限公司;TLR4 多克隆抗体(货号:AF7017)、Nrf2(货号:AF06339)、HO-1(货号:AF5393)均购自 Affinity 公司;AKT(货号:CST 9272S)、p-AKT(货号:CST 4060S)、mTOR(货号:CST 2983S)、p-mTOR(货号:CST 5536S)均购自美国 CST 公司; β -actin(北京博

奥森生物技术有限公司,货号:bs-0295G);HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:AS014)。

1.1.3 仪器 二氧化碳培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);正倒置一体荧光显微镜(美国 EchoLab 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);Western 印迹电泳及转膜系统(北京韦克斯科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 PA 溶液的配制 称取 25.7 mg 的 PA 放入 15 mL 的 Tube 管中,加入 1 mL 浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液,放入 75°C 的水浴箱中加热 2 h,保证 PA 充分溶解;随后加入 9 mL 配置好的 $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA 溶液,不断震荡直至药液澄清,过滤除菌,分装保存于 -20°C 。

1.2.2 细胞分组和处理 为探究不同浓度 PA 对 H9c2 心肌细胞的影响,将 H9c2 心肌细胞随机分为正常组(常规培养)和不同浓度 PA 组(25, 50, 100, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),刺激 24 h。

为探究不同浓度 EMPA 及 DAPA 对 PA 作用下 H9c2 心肌细胞存活率的影响,将 H9c2 心肌细胞随机分为正常组(常规培养)、模型组($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)、EMPA 组($0.1, 1, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMPA 预处理 2 h 后,再加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)、DAPA 组($0.1, 1, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DAPA 预处理 2 h 后,再加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)。

为探讨 EMPA 及 DAPA 对 PA 作用下 H9c2 心肌细胞中 TLR4、AKT、mTOR 蛋白的表达以及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响,将 H9c2 心肌细胞随机分为正常组(常规培养)、模型组($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)、EMPA 组($1, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMPA 预处理 2 h 后,再加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)、DAPA 组($1, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DAPA 预处理 2 h 后,再加入 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 24 h)。

为探讨 EMPA 及 DAPA 对 PA 作用下 H9c2 心肌细胞中 ROS 含量以及 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响,将 H9c2 心肌细胞随机分为正常组(常规培养)、模型组($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 12 h)、EMPA 组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMPA 预处理 2 h 后,再加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 12 h)、DAPA 组($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DAPA 预处理 2 h 后,再加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PA 刺激 12 h)。

1.2.3 CCK-8 法检测 H9c2 心肌细胞存活率 将

细胞以每孔 1×10^4 个的密度铺在 96 孔板中, 细胞贴壁后脱血清处理 24 h, 按实验设计进行药物处理, 处理完毕后每孔加 CCK8 试剂 $10 \mu\text{L}$, 培养 3 h 后用酶标仪在 450 nm 处测定光密度值。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白表达 将给药后的细胞, 按参考文献^[9]的方法进行蛋白提取, 将提取的全蛋白用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度并定量, 依次进行电泳、转膜、封闭、抗体孵育兔抗 AKT(1 : 1 000)、p-AKT(1 : 2 000)、p-mTOR(1 : 1 000)、mTOR(1 : 1 000)、TLR4(1 : 1 000)、Nrf2(1 : 1 000)、HO-1(1 : 1 000)、 β -actin(1 : 2 500)过夜后, 室温孵育生物素标记的二抗(1 : 2 500), ECL 发光处理, 用 FluorChemFC3 软件分析积分吸光度值。

1.2.5 ELISA 法检测心肌细胞上清 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 的含量 按“1.2.2”项下方法分组培养细胞, 孵育 24 h 后, 取细胞培养上清液, 4°C , $1\,000 \times g$ 离心 15 min, 取上清备用。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测样本中炎症因子的含量。

1.2.6 荧光显微镜观察 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平 将细胞以每皿 4×10^5 个的密度接种于 6 cm 培养皿中, 按实验设计进行处理, 结束后弃去药液, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 避光孵育 20 min, PBS 清洗 3 遍, 立即使用荧光显微镜随机选取视野拍照。

1.2.7 流式细胞术检测 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平 将细胞以每皿 6×10^5 个的密度接种于 6 cm 培养皿中, 按实验设计进行处理, 结束后弃去药液, 胰酶消化收集细胞, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 避光孵育 20 min, PBS 清洗 3 遍, 用流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm, 检测各组细胞平均荧光强度, 选用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.2.8 统计学分析 采取 Graphpad Prism8 进行数据统计, 计量资料采取 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较使用独立样本 t 检验的方法, 多组比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 PA 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响

随着 PA 浓度的升高, H9c2 心肌细胞存活率逐渐下降并呈现浓度依赖性, 其中 50, 100, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组与正常组相比均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 根据实验结果与既往文献报道, 本研究选用 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 作用 24 h 作为建立脂毒性心肌损伤模型的实验条件。结果见图 1。

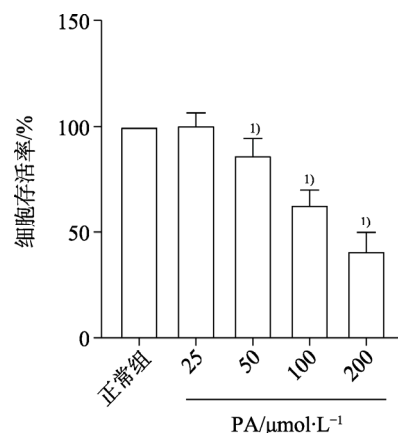


图 1 PA 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$) 与正常组比较, ^b $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of PA on the viability of H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with normal group, ^b $P < 0.01$.

2.2 不同浓度 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞存活率的影响

与正常组比较, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PA 处理 H9c2 心肌细胞 24 h 后, 细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 预处理 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EMPA 及 DAPA 均可以显著增加 H9c2 心肌细胞的存活率 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

2.3 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 TLR4、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 与正常组比较, 模型组 TLR4 和 p-mTOR 蛋白表达水平均明显上调 ($P < 0.01$), p-AKT 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EMPA 或 DAPA 处理后, TLR4 和 p-mTOR 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), p-AKT 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

2.4 ELISA 法检测心肌细胞上清 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 的含量

与正常组比较, H9c2 心肌细胞经过 PA 诱导产生的 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, EMPA 或 DAPA 处理后, 炎症因子 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

2.5 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 含量的影响

2.5.1 荧光显微镜观察 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平的影响 与正常组比较, 模型组细胞呈现高强度绿色荧光; 与模型组比较, EMPA ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组和 DAPA

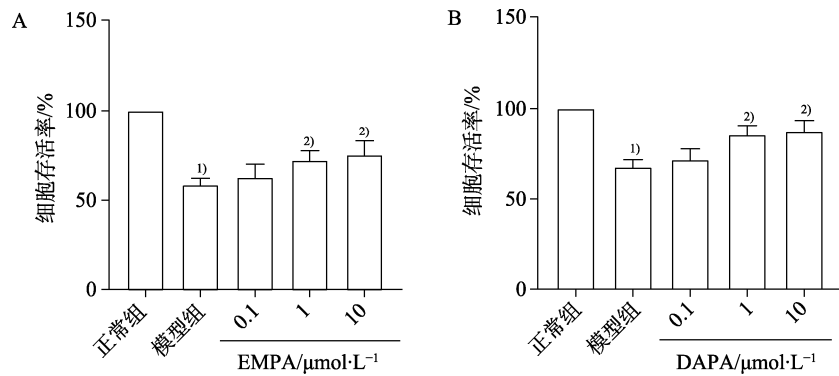


图2 不同浓度 EMPA 及 DAPA 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

A-不同浓度 EMPA 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响; B-不同浓度 DAPA 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响。与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of EMPA and DAPA on the survival rate of H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

A-Effect of EMPA concentration on survival rate of H9c2 cardiomyocytes; B-effect of DAPA concentration on survival rate of H9c2 cardiomyocytes. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$ 。

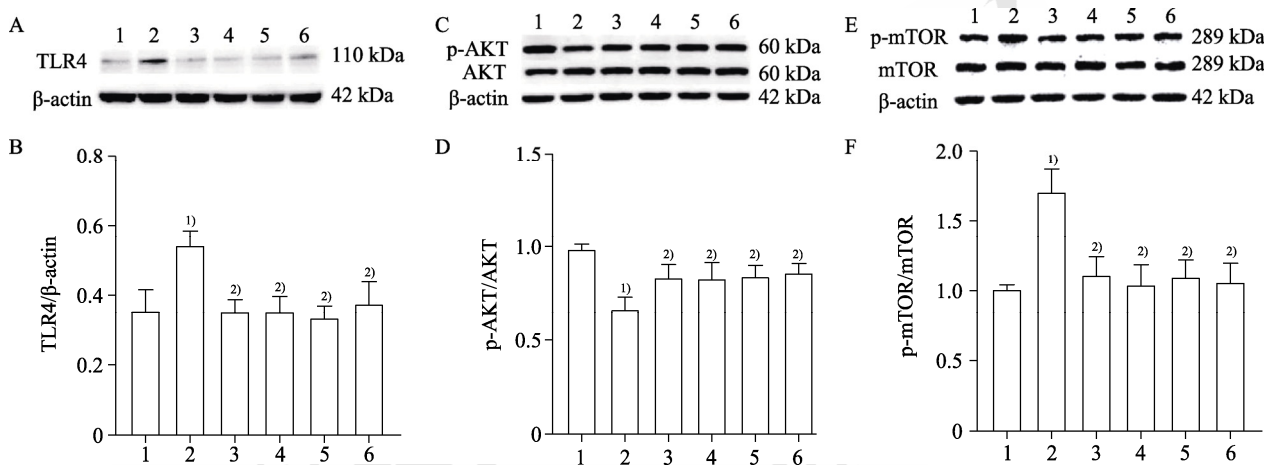


图3 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 TLR4、p-AKT 及 p-mTOR 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A、B-Western blotting 检测 TLR4 的蛋白表达; C、D-Western blotting 检测 p-AKT 以及 AKT 的蛋白表达; E、F-Western blotting 检测 p-mTOR 以及 mTOR 的蛋白表达; 1-正常组; 2-模型组; 3-EMPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; 4-EMPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; 5-DAPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组; 6-DAPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组。与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of EMPA and DAPA on protein expression of TLR4, p-AKT and p-mTOR of PA induced H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A and B-expression of TLR4 protein by Western blotting; C and D-expression of p-AKT and AKT protein by Western blotting; E and F-expression of p-mTOR and mTOR protein by Western blotting; 1-normal group; 2-model group; 3-EMPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; 4-EMPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; 5-DAPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; 6-DAPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$ 。

表1 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导后细胞上清 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Effect of EMPA and DAPA on the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in cell supernatant induced by PA ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	29.49 $\pm$ 2.94	19.57 $\pm$ 2.16	40.39 $\pm$ 4.01
模型组	64.73 $\pm$ 4.58 ¹⁾	46.84 $\pm$ 2.62 ¹⁾	73.96 $\pm$ 3.68 ¹⁾
EMPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组	43.10 $\pm$ 2.63 ²⁾	30.80 $\pm$ 2.11 ²⁾	52.65 $\pm$ 4.23 ²⁾
EMPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组	38.95 $\pm$ 2.61 ²⁾	29.91 $\pm$ 2.32 ²⁾	49.62 $\pm$ 3.72 ²⁾
DAPA($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组	38.19 $\pm$ 2.12 ²⁾	27.62 $\pm$ 1.48 ²⁾	50.69 $\pm$ 3.50 ²⁾
DAPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组	36.06 $\pm$ 2.45 ²⁾	25.81 $\pm$ 2.02 ²⁾	48.41 $\pm$ 3.21 ²⁾

注: 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$ 。

($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组细胞绿色荧光明显减弱, 表明 EMPA 与 DAPA 干预后可显著抑制 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 的产生, 且 DAPA 降低 ROS 效果更明显。结果见图 4。

2.5.2 流式细胞术检测 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平的影响 与正常组比较, 模型组荧光强度明显升高($P<0.01$), 波峰向右偏移; 与模型组比较, EMPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组和 DAPA($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组波峰向左偏移, 荧光强度明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明 EMPA 与 DAPA 可以明显降低细胞内 ROS 含量, 其中 DAPA 降低 ROS 效果更为显著。结果见图 5。

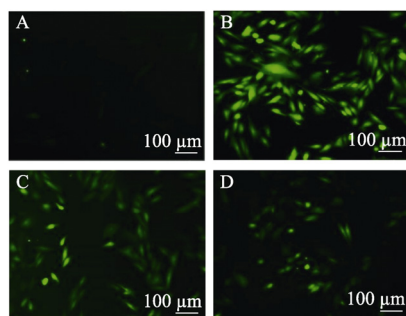


图 4 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 含量的影响

A-正常组；B-模型组；C-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组；D-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。

Fig. 4 Effects of EMPA and DAPA on ROS level in PA-induced H9c2 cardiomyocytes

A-normal group; B-model group; C-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; D-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group.

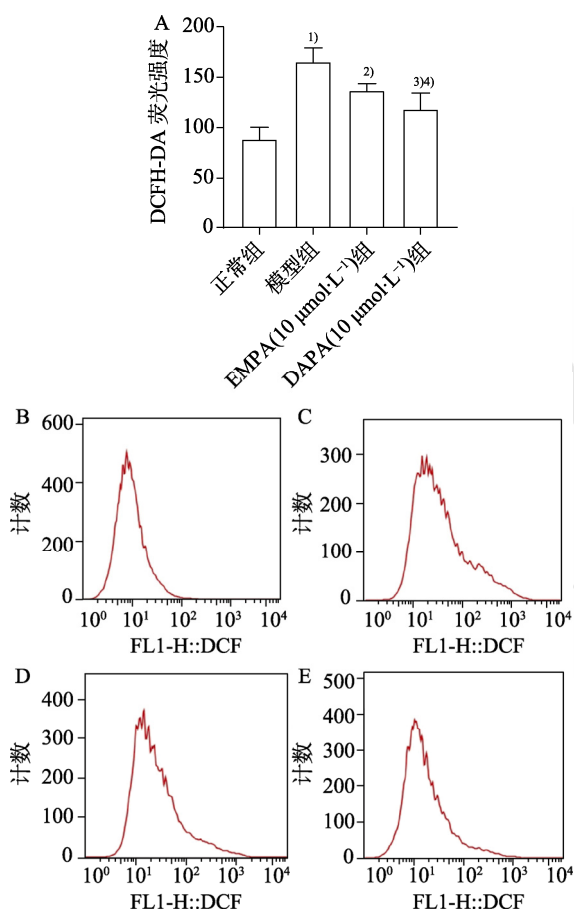


图 5 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

A-各组间 ROS 的表达变化；B-正常组；C-模型组；D-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组；E-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。与正常组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ ；与 EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组比较，⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effects of EMPA and DAPA on ROS level in PA-induced H9c2 cardiomyocytes($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

A-ROS expression changes between groups; B-normal group; C-model group; D-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; E-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, ⁴⁾ $P<0.01$.

2.6 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示，与正常组比较，模型组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$)；与模型组比较，EMPA 或 DAPA 处理后，Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)，且 DAPA 组比 EMPA 组更为显著($P<0.05$)。结果见图 6。

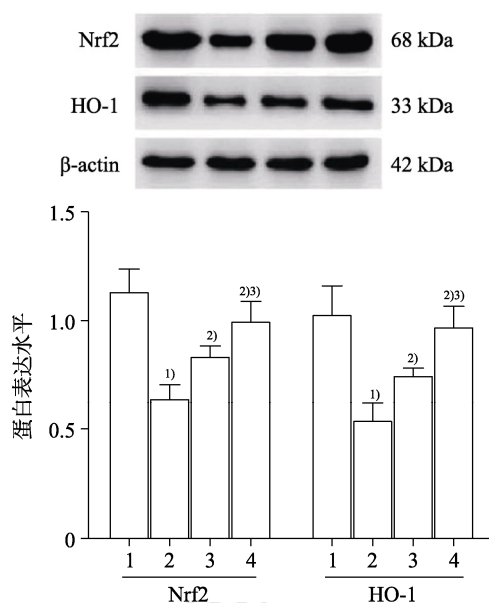


图 6 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞中 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1-正常组；2-模型组；3-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组；4-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。与正常组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ；与 EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组比较，³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effects of EMPA and DAPA on protein expression of Nrf2 and HO-1 of PA induced H9c2 cardiomyocytes($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1-normal group; 2-model group; 3-EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; 4-DAPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with EMPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, ³⁾ $P<0.05$.

3 讨论

目前中国心血管疾病发病率与死亡率的持续上升给社会 and 患者造成了巨大的经济心理负担。脂毒性作为心力衰竭的重要发病因素已受到人们的广泛关注。越来越多研究表明，炎症与氧化应激是脂毒性心肌病发生发展的关键因素。心肌内过多的脂质蓄积会激活炎症反应，诱发氧化应激，加速心肌细胞凋亡，造成脂毒性心肌损伤^[10]。PA 作为人类饮食中最丰富的饱和脂肪酸，在体外实验中被广泛用于诱导细胞脂毒性损伤与细胞凋亡。本实验以大鼠 H9c2 心肌细胞为主要研究对象，

应用 PA 建立脂毒性心肌损伤模型,细胞活性实验结果表明,与正常组比较,模型组细胞存活率明显降低,经一定浓度的 EMPA 及 DAPA 处理后细胞存活率显著增加。这一结果与既往文献报道结果相一致,提示 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡均具有保护作用,为后续机制研究奠定基础。

炎症因子增加、线粒体功能障碍,氧化应激的发生在脂毒性心肌损伤中发挥重要作用。TLR4 是经典的炎症信号转导通路,其过度活化会导致炎症指标上升,是脂肪酸诱导脂毒性的主要途径^[11]。PA 是 TLR4 的内源性配体,可激活 TLR4 的信号传导,进而启动 MYD88 蛋白表达进入细胞内,促进下游炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,造成心肌细胞炎症损伤。AKT/mTOR 信号通路位于 TLR4 的下游,其活性的改变在炎症反应和调节脂肪酸的利用中起着至关重要的作用^[12-14]。研究发现,EMPA 可以通过激活 AKT 信号通路减轻乙醇诱导的心肌细胞损伤^[15],还可以通过调节 mTOR 信号通路减轻肥胖诱导的心脏功能障碍^[16]。因此,TLR4/AKT/mTOR 信号通路可作为 PA 诱导心脏炎症、葡萄糖代谢紊乱和心肌损伤的重要调控因子。

此次研究发现,EMPA 及 DAPA 可以抑制 TLR4、mTOR 信号通路,增强 AKT 的磷酸化,降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子的含量,进而保护 PA 诱导的心肌细胞炎症损伤。氧化应激是脂毒性心肌损伤的重要发病机制,当饱和脂肪酸在心肌内大量蓄积时,会激活 TLR4/AKT/mTOR 等炎症相关信号通路,使细胞内炎症因子过表达,内源性抗氧化剂防御系统之间的平衡受到干扰,ROS 含量升高,导致不规则的血管重塑、心肌肥大和收缩功能障碍^[17]。Nrf2 是身体组织中针对氧化应激保护性反应的主要调节因子,可以调节氧化/异源性应激并减少炎症反应^[18]。HO-1 是 Nrf2 调节的限速酶与主要靶点,Nrf2/HO-1 途径的激活可以降低细胞氧化应激水平,抑制细胞凋亡^[19]。本研究显示,H9c2 心肌细胞经 PA 处理后,ROS 含量显著升高,Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达明显降低,经 EMPA 及 DAPA 处理后,ROS 含量明显下降,Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达显著增强,说明 EMPA 及 DAPA 可以通过激活 Nrf2/HO-1 通路减轻 PA 引起的氧化应激,与既往文献报道一致^[20-21]。以上结果表明,EMPA 及 DAPA 对于 PA 诱导的心肌细胞

损伤具有抗炎、抗氧化的作用。

EMPA 与 DAPA 均为 SGLT2 抑制剂,二者降糖作用机制相同,但在临床治疗效果上略有差异。DAPA 的口服生物利用度高于 EMPA,且能更好地降低 2 型糖尿病患者心力衰竭的发病率。已有研究表明,在临床应用中,DAPA 和 EMPA 均能安全有效地应用于超重/肥胖的 2 型糖尿病患者治疗,但在控制血糖、降低 BMI 及降低血压等诸多方面,DAPA 比 EMPA 更有优势^[22]。本实验结果表明,EMPA 及 DAPA 均可以通过减少氧化应激与炎症因子的表达发挥心肌细胞保护作用,其中 DAPA 的抗氧化应激能力明显强于 EMPA,此结果与既往临床研究结论一致。

综上所述,EMPA 及 DAPA 通过抑制 TLR4 和 mTOR 信号通路,增强 AKT 的活化,激活 Nrf2/HO-1 信号通路,降低 ROS 的生成,从而起到心肌保护作用,机制示意图见图 7。本研究为 EMPA 与 DAPA 在心血管疾病中的应用提供实验依据。

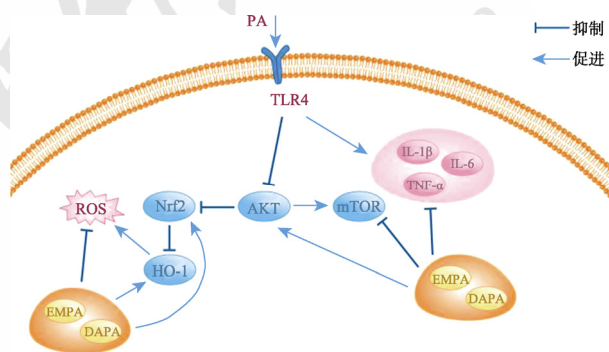


图 7 EMPA 及 DAPA 对 PA 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用机制

Fig. 7 Protective mechanism of EMPA and DAPA against PA-induced H9c2 cardiomyocytes cell injury

REFERENCES

- [1] YANG Z, CHEN Y L, YAN Z Y, et al. Inhibition of TLR4/MAPKs pathway contributes to the protection of salvianolic acid A against lipotoxicity-induced myocardial damage in cardiomyocytes and obese mice[J]. Front Pharmacol, 2021(12): 627123.
- [2] WEN S Y, VELMURUGAN B K, DAY C H, et al. High density lipoprotein (HDL) reverses palmitic acid induced energy metabolism imbalance by switching CD36 and GLUT4 signaling pathways in cardiomyocyte[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(11): 3020-3029.
- [3] GALINDO-HERNANDEZ O, LEIJA-MONTOYA A G, ROMERO-GARCIA T, et al. Palmitic acid decreases cell migration by increasing RGS2 expression and decreasing

- SERCA expression[J]. Genet Mol Biol, 2021, 44(1): e20200279.
- [4] HAN S J, HA K H, LEE N M, et al. Effectiveness and safety of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors compared with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in older adults with type 2 diabetes: A nationwide population-based study[J]. Diabetes Obes Metab, 2021, 23(3): 682-691.
- [5] HASAN R, LASKER S, HASAN A, et al. Canagliflozin attenuates isoprenaline-induced cardiac oxidative stress by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory signaling pathways[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14459.
- [6] HAN X, DAI W J, HAO Z J, et al. Cardiovascular protection of sodium-dependent glucose co-transporter type 2(SGLT2) inhibitors[J]. Int J Cardiovasc Dis(国际心血管病杂志), 2020, 47(4): 234-238.
- [7] COWIE M R, FISHER M. SGLT2 inhibitors: Mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(12): 761-772.
- [8] CAI C, GUO Z, CHANG X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway[J]. Redox Biol, 2022(52): 102288.
- [9] ZHANG W P, JIANG J J, CHEN X F, et al. Gardenoside alleviates diabetic cardiomyopathy via inhibiting VPO₁/ERK1/2 signaling pathway to improve myocardial apoptosis in rats[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2021, 26(2): 129-136.
- [10] LI X H, WU Y D, ZHAO J J, et al. Distinct cardiac energy metabolism and oxidative stress adaptations between obese and non-obese type 2 diabetes mellitus[J]. Theranostics, 2020, 10(6): 2675-2695.
- [11] DOU X B, DING Q C, LAI S L, et al. Salidroside alleviates lipotoxicity-induced cell death through inhibition of TLR4/MAPKs pathway, and independently of AMPK and autophagy in AML-12 mouse hepatocytes[J]. J Funct Foods, 2020(65): 103691.
- [12] LIU L Q, YAN M J, YANG R, et al. Adiponectin attenuates lipopolysaccharide-induced apoptosis by regulating the Cx43/PI3K/AKT pathway[J]. Front Pharmacol, 2021(12): 644225.
- [13] PAN L Y, SUN X C, CHE H X, et al. CTRP9 mitigates vascular endothelial cell injury in patients with hypertensive heart disease by inhibiting PI3K/Akt/mTOR axis[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(9): 6596-6603.
- [14] MORIO A, TSUTSUMI R, SATOMI S, et al. Leucine imparts cardioprotective effects by enhancing mTOR activity and mitochondrial fusion in a myocardial ischemia/reperfusion injury murine model[J]. Diabetol Metab Syndr, 2021, 13(1): 139.
- [15] TIAN G, YU Y, DENG H Y, et al. Empagliflozin alleviates ethanol-induced cardiomyocyte injury through inhibition of mitochondrial apoptosis via a SIRT1/PTEN/Akt pathway[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2021, 48(6): 837-845.
- [16] SUN X D, HAN F, LU Q G, et al. Empagliflozin ameliorates obesity-related cardiac dysfunction by regulating sestrin2-mediated AMPK-mTOR signaling and redox homeostasis in high-fat diet-induced obese mice[J]. Diabetes, 2020, 69(6): 1292-1305.
- [17] HUANG J X, LI J, BAO C Y. Protective effects of honokiol on lipid-induced cardiomyocyte injury and its mechanism[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2021, 56(4): 293-298.
- [18] ZHANG X, JING S, LIN H, et al. Anti-fatigue effect of anwulignan via the NRF₂ and PGC-1 α signaling pathway in mice[J]. Food Funct, 2019, 10(12): 7755-7766.
- [19] MINJ E, UPADHAYAY S, MEHAN S. Nrf2/HO-1 signaling activator acetyl-11-keto-beta boswellic acid (AKBA)-mediated neuroprotection in methyl mercury-induced experimental model of ALS[J]. Neurochem Res, 2021, 46(11): 2867-2884.
- [20] XING Y J, LIU B H, WAN S J, et al. A SGLT2 inhibitor dapagliflozin alleviates diabetic cardiomyopathy by suppressing high glucose-induced oxidative stress *in vivo* and *in vitro*[J]. Front Pharmacol, 2021(12): 708177.
- [21] HSIEH P L, CHU P M, CHENG H C, et al. Dapagliflozin mitigates doxorubicin-caused myocardium damage by regulating AKT-mediated oxidative stress, cardiac remodeling, and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10146.
- [22] ZHANG Y, HAN H Q, ZHOU Y H, et al. Observation of the effectiveness and safety between dapagliflozin and empagliflozin in overweight or obesity patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Community Med(社区医学杂志), 2021, 19(7): 423-427.

收稿日期: 2022-09-20
(本文责编: 沈倩)