

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.02.005
文章编号: 1005-8982 (2023) 02-0025-10

实验研究·论著

尼古丁促进高糖高脂诱导的心肌细胞 凋亡的机制研究*

赵静¹, 郭蕊¹, 孟芝君², 刘彩红¹, 谢耀丽¹, 刘晶³, 曹济民¹, 王亚静¹

(1.山西医科大学基础医学院, 山西太原 030000; 2.山西医科大学附属人民医院检验科, 山西太原 030012; 3.山西医科大学第二医院内分泌科, 山西太原 030001)

摘要: **目的** 探究尼古丁对心肌细胞凋亡的影响及与吸烟密切相关细胞色素酶P4501A1(Cyp1a1)和神经乙酰胆碱受体B4亚基(Chrb4)基因在尼古丁诱导心肌细胞凋亡中的作用机制。**方法** 根据不同方法将细胞分为对照组、尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖高脂模型组、shRNA-NC组、shRNA-Cyp1a1组、AMPK抑制剂组、shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组、shRNA-Chrb4组、shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组。制备H9C2细胞高糖/高脂模型, 转染Cyp1a1或Chrb4干扰质粒, 采用尼古丁或AMPK抑制剂处理。流式细胞术检测细胞凋亡、活性氧、线粒体膜电位, ELISA法检测细胞内超氧化物歧化酶活性和微量丙二醛含量, Western blotting检测细胞中Cyp1a1、Chrb4、Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK的表达。**结果** 尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组SOD较对照组降低($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组降低($P < 0.05$)。尼古丁+高糖/高脂模型组MDA较对照组和高糖/高脂模型组升高($P < 0.05$)。高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组ROS含量较对照组升高($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组升高($P < 0.05$)。尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组线粒体膜电位较对照组降低($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组降低($P < 0.05$)。尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组Cyp1a1和Chrb4 mRNA相对表达量较对照组升高($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组升高($P < 0.05$)。尼古丁组和尼古丁+高糖/高脂模型组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4蛋白相对表达量较对照组升高($P < 0.05$), p-AMPK蛋白相对表达量较对照组降低($P < 0.05$), 高糖/高脂模型组p-AMPK蛋白相对表达量较对照组降低($P < 0.05$), Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4蛋白相对表达量较对照组升高($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4蛋白相对表达量较高糖/高脂模型组升高($P < 0.05$), p-AMPK蛋白相对表达量较高糖/高脂模型组降低($P < 0.05$)。shRNA-Cyp1a1组心肌细胞凋亡率较shRNA-NC组降低($P < 0.05$), AMPK抑制剂组和shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组较shRNA-NC组增加($P < 0.05$), shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组较AMPK抑制剂组降低($P < 0.05$)。shRNA-Cyp1a1组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1蛋白相对表达量较shRNA-NC组降低($P < 0.05$), p-AMPK蛋白相对表达量较shRNA-NC组升高($P < 0.05$), AMPK抑制剂组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1蛋白相对表达量较shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组升高($P < 0.05$), p-AMPK蛋白相对表达量较shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组降低($P < 0.05$), shRNA-Cyp1a1+AMPK抑制剂组Cyp1a1蛋白相对表达量与shRNA-Cyp1a1组无差异($P > 0.05$)。shRNA-Chrb4组心肌细胞凋亡率较shRNA-NC组降低($P < 0.05$), AMPK抑制剂组和shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组较shRNA-NC组增加($P < 0.05$), shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组较AMPK抑制剂组降低($P < 0.05$)。shRNA-Chrb4组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Chrb4蛋白相对表达量较shRNA-NC组降低($P < 0.05$), p-AMPK蛋白相对表达量较shRNA-NC组升高($P < 0.05$), AMPK抑制剂组和shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9蛋白相对表达量较shRNA-NC组升高, p-AMPK蛋白相对表达量较shRNA-NC组降低($P < 0.05$), shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组Chrb4蛋白较shRNA-NC组降低, shRNA-Chrb4+AMPK抑制剂组Caspase-2、Caspase-3、

收稿日期: 2022-03-08

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81670278); 国家自然科学基金青年科学基金(No: 82000799); 山西省应用基础研究项目青年科技研究基金(No: 201801D221397)

[通信作者] 王亚静, E-mail: yajinglove@gmail.com

Caspase-9、Chrn4 蛋白相对表达量较 AMPK 抑制剂组降低 ($P < 0.05$), p-AMPK 蛋白相对表达量较 AMPK 抑制剂组升高 ($P < 0.05$)。shRNA-Chrn4+AMPK 抑制剂组 Chrn4 蛋白相对表达量与 shRNA-Chrn4 组无差异 ($P > 0.05$)。结论 Cyp1a1、Chrn4 参与尼古丁诱导心肌细胞凋亡, 其机制可能是通过抑制 AMPK 磷酸化, 导致线粒体功能障碍, 氧化应激增加, 最终激活 Caspase-2 凋亡途径。

关键词: 糖尿病; 心肌病; 尼古丁; 心肌细胞凋亡; Cyp1a1; Chrn4

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

The mechanism underlying the facilitation of nicotine on high-glucose- and high-fat-induced cardiomyocyte apoptosis*

Zhao Jing¹, Guo Rui¹, Meng Zhi-jun², Liu Cai-hong¹, Xie Yao-li¹, Liu Jing³, Cao Ji-min¹, Wang Ya-jing¹
(1. College of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030012, China; 3. Department of Endocrinology, The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of nicotine on cardiomyocyte apoptosis and the roles of Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1 (Cyp1a1) and Cholinergic Receptor Nicotinic Beta 4 Subunit (Chrn4) genes in nicotine-induced cardiomyocyte apoptosis. **Methods** The cells were divided into control group, nicotine group, high-glucose and high-fat model group, nicotine + high-glucose and high-fat model group, shRNA-NC group, shRNA-Cyp1a1 group, AMPK inhibitor group, shRNA-Cyp1a1 + AMPK inhibitor group, shRNA-Chrn4 group, and shRNA-Chrn4 + AMPK inhibitor group. The high-glucose and high-fat model of H9C2 cells was constructed, transfected with Cyp1a1 or Chrn4 interference plasmids, and treated with nicotine or AMPK inhibitor. Apoptosis, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. The intracellular superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected by ELISA. Besides, Western blotting was used to detect the expressions of Cyp1a1, Chrn4, Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9, and p-AMPK in cells. **Results** Compared with the control group, the SOD activity was lower in nicotine group, high-glucose and high-fat model group, and nicotine + high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The SOD activity was even lower in the nicotine + high-glucose and high-fat model group than that in the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The MDA content in the nicotine + high-glucose and high-fat model group was higher than that in the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The ROS level in the high-glucose and high-fat model group and nicotine + high-glucose and high-fat model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and that in the nicotine + high-glucose and high-fat model group was even higher compared with the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential was lower in the nicotine group, high-glucose and high-fat model group, and nicotine + high-glucose and high-fat model group than that in the control group ($P < 0.05$), while that was even lower in the nicotine + high-glucose and high-fat model group compared with the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The mRNA levels of Cyp1a1 and Chrn4 were higher in the nicotine group, high-glucose and high-fat model group, and nicotine + high-glucose and high-fat model group than those in the control group ($P < 0.05$), and those were even higher in the nicotine + high-glucose and high-fat model group compared with the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9, Cyp1a1, and Chrn4 were higher but the protein level of p-AMPK was lower in the nicotine group and high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). The protein level of p-AMPK was lower but the protein levels of Caspase-9, Cyp1a1, and Chrn4 were higher in the high-glucose and high-fat model group than in the control group ($P < 0.05$). The protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9, Cyp1a1, and Chrn4 were higher but the protein level of p-AMPK was lower in the nicotine + high-glucose and high-fat model group than in the high-glucose and high-fat model group ($P < 0.05$). Compared with the shRNA-NC group, the cardiomyocyte apoptosis rate in the shRNA-Cyp1a1 group was lower ($P < 0.05$), but that in the AMPK inhibitor group and shRNA-Cyp1a1 + AMPK inhibitor group was higher ($P < 0.05$). Besides, the

cardiomyocyte apoptosis rate in the shRNA-Cyp1a1 + AMPK inhibitor group was lower than that in the AMPK inhibitor group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9, and Cyp1a1 were lower ($P < 0.05$), but the protein level of p-AMPK was higher in the shRNA-Cyp1a1 group ($P < 0.05$). Compared with the shRNA-Cyp1a1 + AMPK inhibitor group, the protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9, and Cyp1a1 were higher ($P < 0.05$), but the protein level of p-AMPK was lower in the AMPK inhibitor group ($P < 0.05$). There was no difference in the protein level of Cyp1a1 between the shRNA-Cyp1a1 + AMPK inhibitor group and the AMPK inhibitor group ($P > 0.05$). The cardiomyocyte apoptosis rate in the shRNA-Chrb4 group was lower than that in the shRNA-NC group ($P < 0.05$), while that in the AMPK inhibitor group and the shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group was higher compared with the control group ($P < 0.05$). In addition, the cardiomyocyte apoptosis rate in the shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group was lower than that in the AMPK inhibitor group ($P < 0.05$). The protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9 and Chrb4 in the shRNA-Chrb4 group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), while the protein level of p-AMPK in the shRNA-Chrb4 group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The protein levels of Caspase-2, Caspase-3 and Caspase-9 in the AMPK inhibitor group and shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), whereas the protein level of p-AMPK in the AMPK inhibitor group and shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group was lower than that in the shRNA-NC group ($P < 0.05$). The protein level of Chrb4 in the shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group was lower than that in the shRNA-NC group ($P < 0.05$). Compared with the AMPK inhibitor group, the protein levels of Caspase-2, Caspase-3, Caspase-9 and Chrb4 in the shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group were lower ($P < 0.05$), but the protein level of p-AMPK was higher ($P < 0.05$). There was no difference in the protein level of Chrb4 between the shRNA-Chrb4 + AMPK inhibitor group and the shRNA-Chrb4 group ($P > 0.05$). **Conclusions** Cyp1a1 and Chrb4 are involved in nicotine-induced cardiomyocyte apoptosis. The mechanism may be associated with the inhibition of AMPK phosphorylation that leads to mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress, ultimately activating the Caspase-2 apoptosis pathway.

Keywords: diabetes mellitus; cardiomyopathy; nicotine; cardiomyocyte apoptosis; Cyp1a1; Chrb4

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病患者的一种特殊心脏表现,其特征是早期的左心室肥大和舒张功能障碍,晚期出现明显的心力衰竭和收缩功能降低^[1]。吸烟是心血管疾病和2型糖尿病的独立危险因素^[2-3]。尼古丁是香烟烟雾的主要成分,是最具药理活性的成分之一^[4]。有研究已证明长期暴露于高水平尼古丁是诱发和促发包括心肌病和周围血管疾病在内的心血管疾病的致病因素^[5]。目前尼古丁促进DCM的机制还有待探究。有研究显示,细胞色素酶P4501A1(Cyp1a1)和神经元乙酰胆碱受体 $\beta 4$ 亚基(Chrb4)的表达与突变与吸烟密切相关^[6-7],但这2个基因是否促进DCM进展,目前尚未报道。本研究拟制备高糖/高脂细胞模型(糖尿病模型)进行细胞实验,旨在探讨尼古丁对DCM的影响及Cyp1a1和Chrb4在其中的作用机制,为吸烟人群中DCM患者的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

H9C2细胞(BNCC353655,商城北纳创联生物科

技有限公司),DMEM完全高糖培养基(KGM12800S,江苏凯基生物技术有限公司),胰蛋白酶消化液(T1300,北京索莱宝科技有限公司), $1 \times$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(0.01 mol/L, pH 7.4)(KGB5001,江苏凯基生物技术有限公司),葡萄糖(G116307,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),棕榈酸酯(HY-N2341,美国MCE公司),尼古丁(54-11-5,成都德思特生物技术有限公司),AMPK抑制剂(P5499-5MG,美国Sigma-Aldrich公司),DCFH-DA(HY-D0940,美国MedChemExpress公司),Cyp1a1和Chrb4干扰质粒(上海吉凯基因化学技术公司),凋亡试剂盒(AP105-100kit,杭州联科生物技术股份有限公司),Reactive Oxygen Species Assay Kit(KGT010-1100 assays,江苏凯基生物技术股份有限公司),JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(BB-4105,上海贝博生物科技有限公司),丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒(MM-0385R1,武汉酶免生物科技有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(MM-0386R1,武汉酶免生物科技有限公司),ChamQ Universal SYBR

qPCR Master Mix(Q711-02,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581M)、Trizol Reagent(CW0580S,江苏康为世纪生物科技股份有限公司),HiScript II Q RT SuperMix(R223-01)、SYBR qPCR Master Mix(Q711-02,南京诺唯赞生物科技股份有限公司),50×TAE 缓冲液(T1060,北京索莱宝科技有限公司),6×DNA Loading Buffer(GH101-01,北京全式金生物技术股份有限公司),50 bp DNA Ladder[MD108,天根生化科技(北京)有限公司],Gsafe Red plus 核酸染料(GK20002,美国 GLP BIO 公司),琼脂糖粉(75510-019,美国 Invitrogen 公司),RIPA 细胞裂解液(C1053,北京普利莱基因技术有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒(CW0014S,江苏康为世纪生物科技股份有限公司),GAPDH(TA-09,北京中杉金桥生物技术有限公司,1/2 000),Anti Cyp1a1(DF3565,1/500)、Anti Chrb4(DF9698,1/500)、Anti p-AMPK(AF3423,1/500)、Anti Caspase-2(DF2908,1/500)、Anti Caspase-3(AF6311,1/500)、Anti Caspase-9(AF6348,美国 Affinity 公司,1/500),免疫球蛋白 G(H+L)(ZB-2301,北京中杉金桥生物技术有限公司,1/2 000),流式细胞分析仪[NovoCyte 2060R,艾森生物(杭州)有限公司],PCR 仪[CFX Connect™,伯乐生命医学产品(上海)有限公司],蛋白电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂),化学发光成像系统[Chemi Doc™ XRS+,伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

1.2 细胞分组

根据不同的方法,将细胞分为对照组、尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖高脂模型组。对照组正常培养,不做处理;尼古丁组在对照组基础上添加 6 μmol/L 尼古丁处理 26 h;高糖/高脂模型组在对照组基础上添加 33.3 mmol/L 葡萄糖和 500 μmol/L 棕榈酸酯共同处理 24 h;尼古丁+高糖高脂模型组在对照组基础上添加 6 μmol/L 尼古丁处理 2 h 后,用 33.3 mmol/L 葡萄糖和 500 μmol/L 棕榈酸酯共同处理 24 h^[8]。

用 *Cyp1a1* 基因验证细胞实验分组,将细胞分为 shRNA-NC 组、shRNA-*Cyp1a1* 组、AMPK 抑制剂组、shRNA-*Cyp1a1*+AMPK 抑制剂组。shRNA-NC 组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-NC 质粒 48 h;shRNA-*Cyp1a1* 组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-*Cyp1a1* 质粒 48 h;

AMPK 抑制剂组采用 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin-2HCl 处理 H9C2 细胞 24 h;shRNA-*Cyp1a1*+AMPK 抑制剂组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-*Cyp1a1* 质粒 48 h 后,添加 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin-2HCl 处理细胞 24 h。

用 *Chrb4* 基因验证实验分组,将细胞分为 shRNA-NC 组、shRNA-*Chrb4* 组、AMPK 抑制剂组、shRNA-*Chrb4*+AMPK 抑制剂组。shRNA-NC 组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-NC 质粒 48 h;shRNA-*Chrb4* 组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-*Chrb4* 质粒 48 h;AMPK 抑制剂组采用 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin-2HCl 处理 H9C2 细胞 24 h;shRNA-*Chrb4*+AMPK 抑制剂组采用 H9C2 细胞转染 shRNA-*Chrb4* 质粒 48 h 后,添加 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin-2HCl 处理细胞 24 h。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞术检测细胞活性氧(ROS)水平

按照 1 : 1 000 用无血清培养基稀释 DCFH-DA,使其浓度为 10 μmol/L;收集细胞,加入稀释好的 DCFH-DA,37℃ 培养箱中孵育 20 min;无血清的培养液洗涤,去除多余的 DCFH-DA;PBS 洗涤,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;300 μL PBS 重悬细胞,上机,检测细胞 ROS 水平。

1.3.2 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位

根据 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书,配置 JC-1 工作液;收集细胞,加入 500 μL JC-1 工作液悬浮细胞,培养箱孵育 15 ~ 20 min;以 2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,1×Incubation Buffer 洗涤 2 次;500 μL 1×Incubation Buffer 悬浮细胞,上机。

1.3.3 ELISA 法检测细胞内 SOD 活性和微量 MDA 含量

根据试剂盒说明书配置好相关工作液,设置空白孔、标准孔和样品孔。标准孔依次加入 0.0 u/mL、12.5 u/mL、25.0 u/mL、50.0 u/mL、100.0 u/mL 和 200.0 u/mL 浓度的 50 μL 标准品,样品孔中加入 50 μL 样品混匀,加入 100 μL 酶标试剂。封板膜封板,37℃ 孵育 60 min;揭封板膜,洗涤液洗涤,弃去液体,拍干;先后加入显色剂 A、B 各 50 μL,混匀,37℃,避光显色 15 min;加入 50 μL 终止液;450 nm 波长测定各孔吸光度值。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应检测 *Cyp1a1*、*Chrb4* mRNA 相对表达量

提取各组待测细胞内 RNA,随后根据对应的逆转录试剂盒说明书合成

cDNA, 加入反应体系, 在 PCR 仪上检测。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
β -actin	正向: 5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3'	20
	反向: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'	20
Cyp1a1	正向: 5'-GGCATCCTCTTGCTACTTGG-3'	20
	反向: 5'-CTCTTGCTATCGTGGTCATA-3'	21
Chrb4	正向: 5'-CCCGGTACAACAACCTGATCC-3'	21
	反向: 5'-GATCTGTTCTCGCTATTCACACT-3'	24

1.3.5 Western blotting 检测蛋白表达水平 将各组细胞加入裂解液, 充分研磨, 以 12 000 r/min 离心 15 min, 收集匀浆。取上清液, 根据 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。配置好浓缩胶和分离胶, 加入已变性的蛋白样品, 电泳, 转膜。加入一抗, 4℃ 过夜; 加入二抗, 室温孵育 1~2 h。滴加 ECL 曝光液曝光。用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 收集待测细胞, PBS 洗涤 2 次, 以 1 500 r/min 离心 3 min; 加入预冷的 $1 \times$ Binding Buffer 300 μ L, 重悬细胞; 分别向每管细胞中加入 3 μ L Annexin V-APC 和 5 μ L 7-AAD, 混匀; 室温避光孵育 10 min; 加入预冷的 $1 \times$ Binding Buffer 200 μ L, 混匀, 上机检测。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 SOD、MDA、ROS、线粒体膜电位比较

对照组、尼古丁组、高糖/高脂模型组与尼古丁+高糖/高脂模型组 SOD 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组较对照组降低 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组降低 ($P < 0.05$)。各组 MDA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较对照组和高糖/高脂模型组升高 ($P < 0.05$)。各组 ROS 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组较对照组升高 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组升高 ($P < 0.05$)。各组线粒体膜电位的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组较对照组降低 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组降低 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1、2。

表 1 各组 SOD、MDA、ROS、线粒体膜电位水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/(ng/mL)	MDA/(nmol/mL)	ROS/%	线粒体膜电位/%
对照组	1.71 \pm 0.07	1.01 \pm 0.05	64.1 \pm 15.8	6.91 \pm 0.10
尼古丁组	1.52 \pm 0.12	1.10 \pm 0.01	98.6 \pm 19.3	6.40 \pm 0.23
高糖/高脂模型组	1.49 \pm 0.10	1.20 \pm 0.08	194.7 \pm 17.5	4.39 \pm 0.20
尼古丁+高糖/高脂模型组	1.31 \pm 0.08	1.30 \pm 0.10	218.6 \pm 26.3	3.02 \pm 0.10
F 值	6.871	6.080	107.600	341.000
P 值	0.003	0.004	0.000	0.000

2.2 尼古丁对高糖/高脂 H9C2 细胞内 Cyp1a1、Chrb4 mRNA、蛋白及 p-AMPK、Caspase-2 凋亡途径相关蛋白表达水平的影响

对照组、尼古丁组、高糖/高脂模型组与尼古丁+高糖/高脂模型组 Cyp1a1 和 Chrb4 mRNA 表达比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尼古丁组、高糖/高脂模型组、尼古丁+高糖/高脂模型组较

对照组升高 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组较高糖/高脂模型组升高 ($P < 0.05$)。各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK、Cyp1a1、Chrb4 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尼古丁组和尼古丁+高糖/高脂模型组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4 蛋白相对表达量较对照组升高 ($P < 0.05$), p-AMPK 蛋

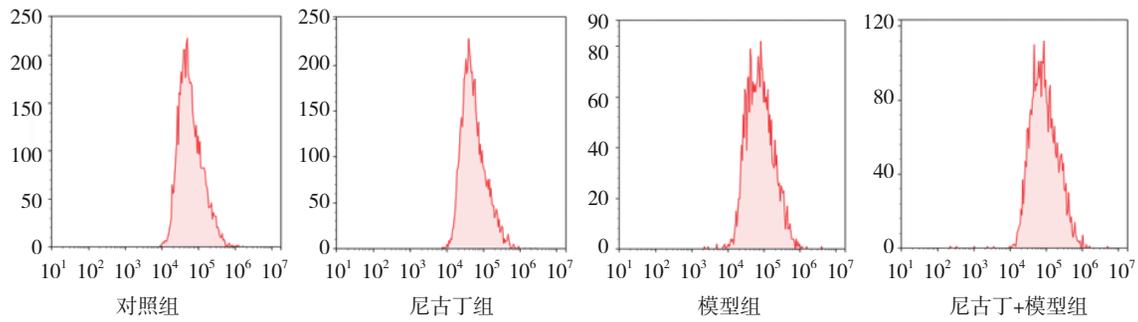


图 1 各组 ROS 含量比较图

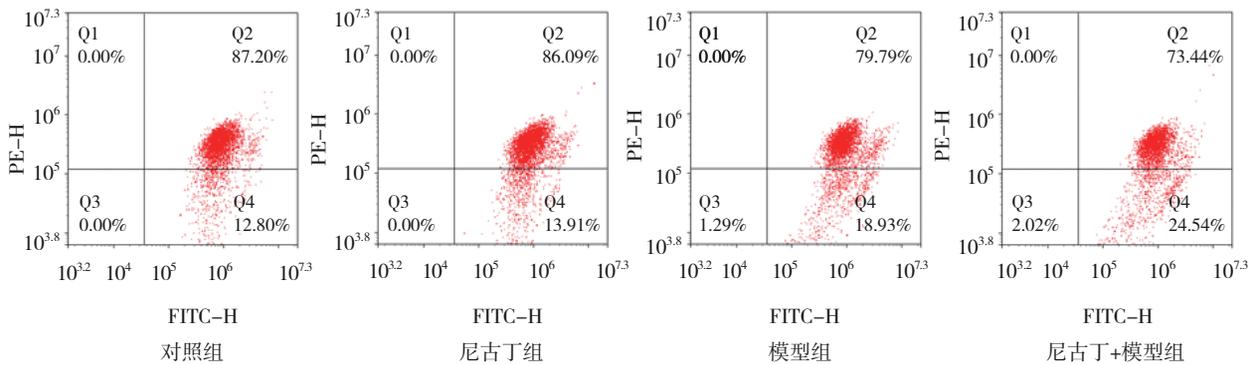


图 2 各组 H9C2 细胞流式细胞图

白相对表达量较对照组降低 ($P < 0.05$), 高糖/高脂模型组 p-AMPK 蛋白相对表达量较对照组降低 ($P < 0.05$), Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4 蛋白相对表达量较对照组升高 ($P < 0.05$), 尼古丁+高糖/高脂模型组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1、Chrb4 蛋白相对表达量较高糖/高脂模型组升高 ($P < 0.05$), p-AMPK 蛋白相对表达量较高糖/高脂模型组降低 ($P < 0.05$)。见表 2、3 和图 3。

2.3 各组 H9C2 细胞凋亡率和 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK、Cyp1a1 蛋白相对表达量比较

shRNA-NC 组、shRNA-Cyp1a1 组、AMPK 抑制剂组与 shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组 H9C2 细胞凋亡率分别为 $(15.90 \pm 1.77)\%$ 、 $(2.38 \pm 0.74)\%$ 、 $(35.90 \pm$

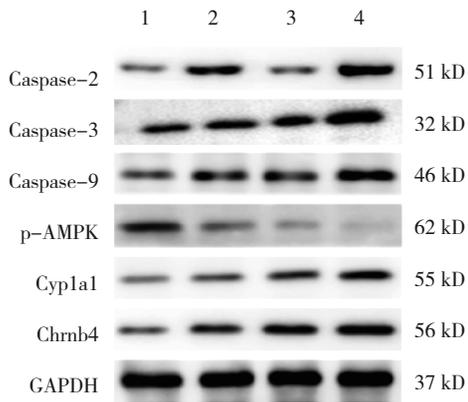
表 2 各组 Cyp1a1、Chrb4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cyp1a1 mRNA	Chrb4 mRNA
对照组	0.96 ± 0.07	1.00 ± 0.05
尼古丁组	4.43 ± 0.68	2.23 ± 0.03
高糖/高脂模型组	6.09 ± 0.94	2.85 ± 0.32
尼古丁+高糖/高脂模型组	9.34 ± 0.96	4.39 ± 0.48
F 值	63.510	70.930
P 值	0.000	0.000

$4.16)\%$ 、 $(27.97 \pm 2.30)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 97.790$, $P = 0.000$), shRNA-Cyp1a1 组较 shRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$), AMPK 抑制剂组和 shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组较 shRNA-NC 组升高 ($P < 0.05$), shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组较 AMPK

表 3 各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK、Cyp1a1、Chrb4 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-2 蛋白	Caspase-3 蛋白	Caspase-9 蛋白	p-AMPK 蛋白	Cyp1a1 蛋白	Chrb4 蛋白
对照组	1.03 ± 0.09	1.01 ± 0.09	1.04 ± 0.23	1.03 ± 0.09	0.98 ± 0.04	1.03 ± 0.09
尼古丁组	1.46 ± 0.11	1.48 ± 0.17	1.53 ± 0.09	0.83 ± 0.09	1.50 ± 0.16	1.35 ± 0.10
高糖/高脂模型组	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.10	1.65 ± 0.07	0.36 ± 0.09	2.05 ± 0.11	1.93 ± 0.09
尼古丁+高糖/高脂模型组	2.06 ± 0.08	2.10 ± 0.18	2.32 ± 0.08	0.15 ± 0.07	2.49 ± 0.15	2.51 ± 0.09
F 值	50.370	38.240	15.670	68.150	85.230	160.400
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 对照组; 2: 尼古丁组; 3: 高糖/高脂模型组; 4: 尼古丁+高糖/高脂模型组。

图 3 各组蛋白相对表达量

表 4 各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK、Cyp1a1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-2 蛋白	Caspase-3 蛋白	Caspase-9 蛋白	p-AMPK 蛋白	Cyp1a1 蛋白
shRNA-NC 组	0.99 ± 0.13	0.99 ± 0.04	0.96 ± 0.08	1.04 ± 0.07	1.04 ± 0.07
shRNA-Cyp1a1 组	0.22 ± 0.09	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.06	1.64 ± 0.07	0.32 ± 0.09
AMPK 抑制剂组	1.49 ± 0.07	1.51 ± 0.14	1.46 ± 0.09	0.25 ± 0.08	1.04 ± 0.07
shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组	1.23 ± 0.08	1.13 ± 0.10	1.24 ± 0.10	0.58 ± 0.12	0.34 ± 0.09
F 值	50.800	106.200	131.100	105.900	76.620
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

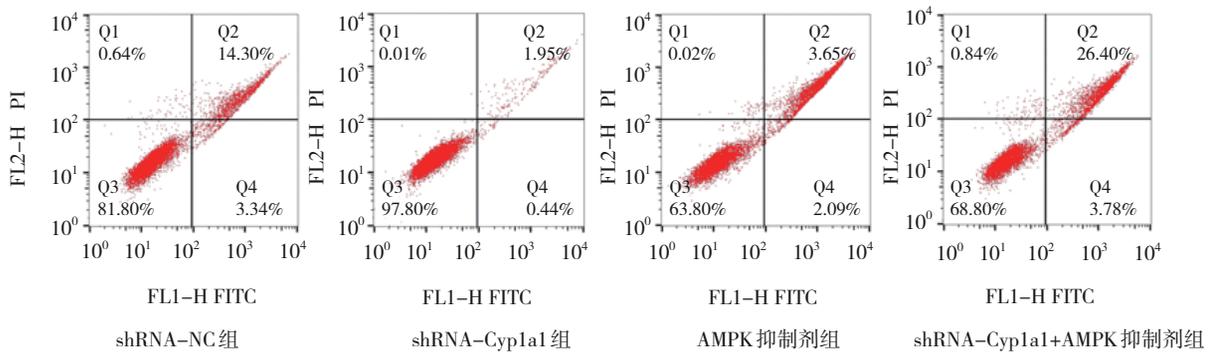


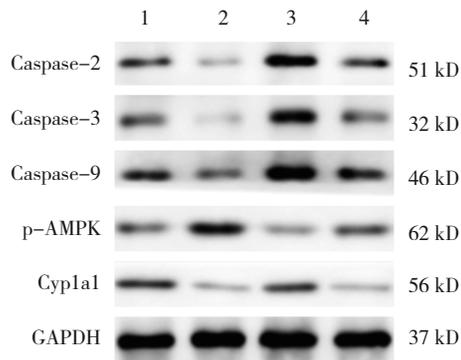
图 4 各组 H9C2 细胞流式细胞术结果

2.4 Chrb4 对心肌细胞凋亡及 Caspase-2 凋亡途径的影响

shRNA-NC 组、shRNA-Chrb4 组、AMPK 抑制剂组和 shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组心肌细胞凋亡率分别为 (15.01 ± 2.46) %、(1.89 ± 0.58) %、(37.12 ± 2.85) %、(28.24 ± 3.13) %，经方差分析，差异有统计学意义 ($F = 117.200, P = 0.000$)，shRNA-Chrb4 组较 shRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$)，AMPK 抑制剂组和 shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组较对照组增加 ($P < 0.05$)，shRNA-

抑制剂组降低 ($P < 0.05$)。各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK 和 Cyp1a1 蛋白相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，shRNA-Cyp1a1 组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1 蛋白水平较 shRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$)，p-AMPK 蛋白水平较 shRNA-NC 组升高 ($P < 0.05$)，AMPK 抑制剂组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Cyp1a1 蛋白水平较 shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组升高 ($P < 0.05$)，p-AMPK 蛋白水平较 shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组降低 ($P < 0.05$)，shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组 Cyp1a1 蛋白水平与 shRNA-Cyp1a1 组比较无差异 ($P > 0.05$)。见表 4 和图 4、5。

Chrb4+AMPK 抑制剂组较 AMPK 抑制剂组降低 ($P < 0.05$)。各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK 和 Chrb4 蛋白相对表达量比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，shRNA-Chrb4 组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Chrb4 蛋白相对表达量较 shRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$)，p-AMPK 蛋白相对表达量较 shRNA-NC 组升高 ($P < 0.05$)，AMPK 抑制剂组和 shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9 相对表达量较 shRNA-NC 组升高，p-AMPK 蛋白相对



1: shRNA-NC 组; 2: shRNA-Cyp1a1 组; 3: AMPK 抑制剂组; 4: shRNA-Cyp1a1+AMPK 抑制剂组。

图 5 各组蛋白相对表达量

表 5 各组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、p-AMPK、Chrb4 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-2 蛋白	Caspase-3 蛋白	Caspase-9 蛋白	p-AMPK 蛋白	Chrb4 蛋白
shRNA-NC 组	1.04 ± 0.06	1.01 ± 0.18	0.96 ± 0.10	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.13
shRNA-Chrb4 组	0.23 ± 0.08	0.34 ± 0.07	0.33 ± 0.11	1.56 ± 0.09	0.24 ± 0.09
AMPK 抑制剂组	1.64 ± 0.08	1.53 ± 0.11	1.54 ± 0.08	0.24 ± 0.09	1.17 ± 0.15
shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组	1.23 ± 0.07	1.15 ± 0.08	1.13 ± 0.11	0.53 ± 0.11	0.25 ± 0.10
F 值	196.100	52.460	80.730	67.440	49.930
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表达量较 shRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$), shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组 Chrb4 蛋白较 shRNA-NC 组降低, shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9、Chrb4 蛋白相对表达量较 AMPK 抑制剂组降低 ($P < 0.05$), p-AMPK 蛋白相对表达量较 AMPK 抑制剂组升高 ($P < 0.05$)。shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组 Chrb4 蛋白相对表达量与 shRNA-Chrb4 组比较无差异 ($P > 0.05$)。见表 5 和图 6、7。

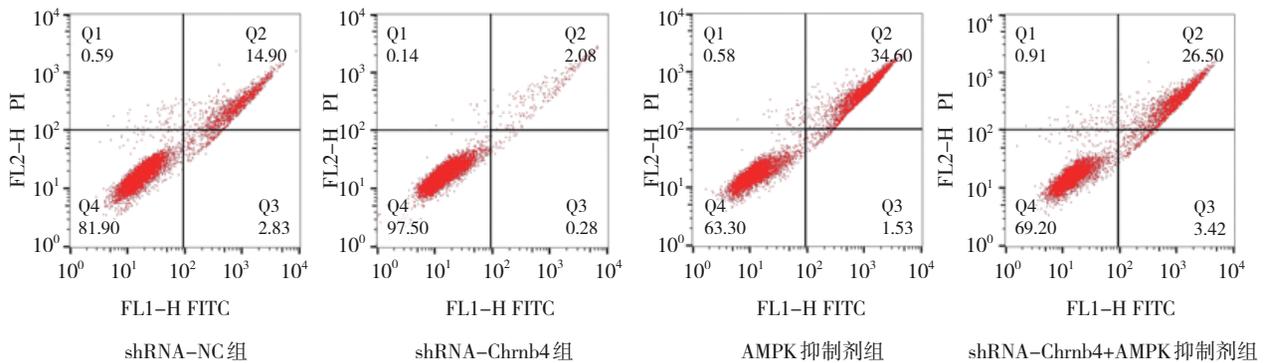
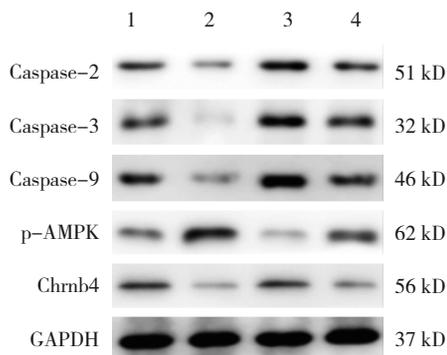


图 6 各组 H9C2 细胞流式细胞术结果



1: shRNA-NC 组; 2: shRNA-Chrb4 组; 3: AMPK 抑制剂组; 4: shRNA-Chrb4+AMPK 抑制剂组。

图 7 各组蛋白相对表达量

3 讨论

心肌细胞凋亡是 DCM 发展机制之一。有研究表明, 低凋亡水平心肌细胞可导致致命的扩张型心肌病, 抑制心肌细胞凋亡可阻碍该疾病的进展^[9]。因此抑制心肌细胞凋亡可能是预防 DCM 的新疗法。本研究结果发现, 尼古丁诱导且加重高糖高脂心肌细胞凋亡, 其机制可能是通过上调 Cyp1a1、Chrb4 表达, 抑制 AMPK 活性, 导致线粒体功能障碍, 氧化应激增加, 进一步激活 Caspase-2 凋亡途径。

ROS是在心脏生理和病理中具有重要作用的信号分子^[10]。在生理条件下,心脏ROS信号调节心脏发育和心肌细胞成熟、心脏钙处理、兴奋收缩耦合和血管张力;然而,导致ROS水平升高时产生不受调节的病理状况可通过对DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤以及线粒体通透性转换孔的激活、线粒体功能障碍等导致氧化应激^[11]。氧化应激与各种细胞类型的凋亡信号有关,包括心肌细胞^[12-13]。本研究中发现尼古丁及高糖/高脂均会导致心肌细胞线粒体功能障碍,氧化应激增加,而尼古丁会放大高糖/高脂培养条件下的心肌细胞的线粒体功能障碍和氧化应激效应,与ZHANG等^[14]和RAMALINGAM等^[15]的研究结果一致。

AMPK是一种主要的细胞能量传感器和代谢稳态的主调节器,在调节心肌细胞凋亡中发挥着重要作用^[16]。AMPK与尼古丁的一些作用直接相关^[17]。有研究证明敲除Cyp1a1可抑制细胞增殖,阻断与Cyclin D1减少相关的Go-G细胞周期,并增加与AMPK和Akt磷酸化减少相关的凋亡^[18],与本研究结果一致。这些结果表明Cyp1a1参与细胞增殖和存活途径,其机制可能与AMPK通路有关。编码nAChR β 4亚基的*Chrb4*基因广泛存在于气道上皮细胞,并形成异质nAChR来调节尼古丁受体的亲和力。有研究证明激动剂1,1-二甲基-4-苯基哌嗪碘化选择性靶向 α 3 β 4 nAChR,通过增加棕色脂肪、心脏和骨骼肌中的葡萄糖摄取,显著改善了糖耐量^[19]。本研究结果发现,Chrb4表达与AMPK活性呈负相关,即干扰Chrb4后AMPK活性上调。故笔者推测,尼古丁上调Cyp1a1、Chrb4表达,抑制AMPK活性,进而导致线粒体功能障碍,氧化应激增加,最终导致心肌细胞凋亡。

本研究结果进一步发现,H9C2细胞内Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9蛋白水平显著增加,干扰Cyp1a1或Chrb4后,H9C2细胞内Caspase-2、Caspase-3、Caspase-9蛋白相对表达量显著下调。越来越多的证据表明,具有半胱氨酸酶招募结构域的凋亡抑制因子是一种内源性蛋白,在心脏组织中高度表达,能够通过靶向多点激活来抑制缺血-再灌注诱导的心肌细胞凋亡^[20]。SINHA-HIKIM等^[21]的研究结果显示,Caspase-2介导的内在通路信号是尼古丁加高脂肪饮食诱导心肌细胞凋亡的机制之一。

综上所述,尼古丁诱导高糖、高脂心肌细胞凋亡率增加,其机制可能是上调Cyp1a1、Chrb4表达,抑制AMPK活性,导致线粒体功能障碍,氧化应激增加,并进一步激活Caspase-2凋亡途径,上调Caspase-3、Caspase-9表达诱导细胞凋亡。

参 考 文 献 :

- [1] MARFELLA R, SARDU C, MANSUETO G, et al. Evidence for human diabetic cardiomyopathy[J]. Acta Diabetol, 2021, 58(8): 983-988.
- [2] LUO H, JIANG Z L, REN Y. Therapy management of metabolic disorder comorbidity with depression[J]. Front Psychol, 2021, 12: 683320.
- [3] MÜNDEL T, HAHAD O, KUNTIC M, et al. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes[J]. Eur Heart J, 2020, 41(41): 4057-4070.
- [4] KOZAK M, DABROWSKA-ZAMOJCIN E, MAZUREK-MOCHOL M, et al. Cytokines and their genetic polymorphisms related to periodontal disease[J]. J Clin Med, 2020, 9(12): 4045.
- [5] CENTNER A M, BHITE P G, SALAZAR G. Nicotine in senescence and atherosclerosis[J]. Cells, 2020, 9(4): 1035.
- [6] MAROM-HAHAM L, SHULMAN A. Cigarette smoking and hormones[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2016, 28(4): 230-235.
- [7] CULVERHOUSE R C, CHEN L S, SACCONI N L, et al. Variants in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* region of chromosome 15 predict gastrointestinal adverse events in the transdisciplinary tobacco use research center smoking cessation trial[J]. Nicotine Tob Res, 2020, 22(2): 248-255.
- [8] 刘雯霞,刘彩红,郭蕊,等.尼古丁促进高糖/高脂培养的大鼠心肌细胞系H9C2凋亡[J].基础医学与临床,2020,40(1):24-29.
- [9] QI B C, HE L J, ZHAO Y, et al. *Akap1* deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy in mice by NDUFS1-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. Diabetologia, 2020, 63(5): 1072-1087.
- [10] PEOPLES J N, SARAF A, GHAZAL N, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 1-13.
- [11] RITCHIE R H, ABEL E D. Basic mechanisms of diabetic heart disease[J]. Circ Res, 2020, 126(11): 1501-1525.
- [12] ANGWA L M, JIANG Y T, PEI J R, et al. Antioxidant phytochemicals for the prevention of fluoride-induced oxidative stress and apoptosis: a review[J]. Biol Trace Elem Res, 2022, 200(3): 1418-1441.
- [13] XIANG M, LU Y D, XIN L Y, et al. Role of oxidative stress in reperfusion following myocardial ischemia and its treatments[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6614009.
- [14] ZHANG X, LI J P, YANG B, et al. Alleviation of liver dysfunction, oxidative stress, and inflammation underlines the

- protective effects of polysaccharides from cordyceps cicadae on high sugar/high fat diet-induced metabolic syndrome in rats[J]. *Chem Biodivers*, 2021, 18(5): e2100065.
- [15] RAMALINGAM A, BUDIN S B, MOHD FAUZI N, et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species-mediated oxidative stress attenuates nicotine-induced cardiac remodeling and dysfunction[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13845.
- [16] QI D K, YOUNG L H. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(8): 422-429.
- [17] GELERNTER J, KRANZLER H R, SHERVA R, et al. Genome-wide association study of nicotine dependence in American populations: identification of novel risk loci in both African-Americans and European-Americans[J]. *Biol Psychiatry*, 2015, 77(5): 493-503.
- [18] RODRIGUEZ M, POTTER D A. CYP1A1 regulates breast cancer proliferation and survival[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(7): 780-792.
- [19] JALL S, de ANGELIS M, LUNDSGAARD A M, et al. Pharmacological targeting of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors improves peripheral insulin sensitivity in mice with diet-induced obesity[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(6): 1236-1247.
- [20] PARK C S, BANG B R, KWON H S, et al. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(12): 1660-1670.
- [21] SINHA-HIKIM I, FRIEDMAN T C, FALZ M, et al. Nicotine plus a high-fat diet triggers cardiomyocyte apoptosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 368(1): 159-170.

(李科 编辑)

本文引用格式: 赵静, 郭蕊, 孟芝君, 等. 尼古丁促进高糖高脂诱导的心肌细胞凋亡的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(02): 25-34.

Cite this article as: ZHAO J, GUO R, MENG Z J, et al. The mechanism underlying the facilitation of nicotine on high-glucose and high-fat-induced cardiomyocyte apoptosis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(02): 25-34.