

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.01.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 01-0034-10

实验研究·论著

血管紧张素 II 1 型受体在氧化三甲胺促进 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化中的作用*

李天翔¹, 李素娟², 郝翔宇¹, 祝志波¹, 郑梦¹, 郭建强¹

(内蒙古医科大学附属医院 1. 心血管内科, 2. 消化内科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要: **目的** 探讨血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)在氧化三甲胺(TMAO)促动脉粥样硬化中的作用。**方法** 用分子对接预测 TMAO 与 AT1R 可能的相互作用。将 21 只 6 周龄 ApoE^{-/-}小鼠随机分为对照组、TMAO 组、TMAO+替米沙坦组, 每组 7 只。TMAO 组在饲料中加 1%胆碱复制高 TMAO 血症模型。TMAO+替米沙坦组采用替米沙坦 10 mg/(kg·d)灌胃治疗。12 周后采血, 采用高效液相色谱串联质谱法测定血浆 TMAO 含量; 油红 O 染色确定主动脉根部斑块面积; 免疫组织化学法检测斑块内炎症因子单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和白细胞介素-6(IL-6)的浸润; 构建 AT1R 表达质粒, 转染 293T 细胞, 加入 TMAO(200 μmol/L)或 TMAO(200 μmol/L)+替米沙坦(1 μmol/L)作用 0、5、10、15、30 和 60 min, 检测 AT1R 下游信号通路 ERK、PKC 磷酸化活化情况。**结果** 分子对接预测到 TMAO 与 AT1R 之间的存在直接结合位点。3 组小鼠主动脉根部斑块面积占比、斑块内 MCP-1 和 IL-6 表达比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TMAO 组较对照组主动脉根部斑块面积占比增加($P < 0.05$), 斑块内 MCP-1 和 IL-6 表达升高($P < 0.05$), 而替米沙坦组较 TMAO 组主动脉根部斑块面积占比下降($P < 0.05$), 斑块内 MCP-1 和 IL-6 表达降低($P < 0.05$)。3 组主动脉组织的 AT1R、p-ERK1/2、p-PKC 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TMAO 组较对照组升高($P < 0.05$), 而替米沙坦组较 TMAO 组下降($P < 0.05$)。在转染 AT1R 质粒的 293T 细胞中, TMAO 组(200 μmol/L)不同时间点的 p-ERK1/2、p-PKC 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 0 min 比较, 作用 15 和 30 min 时 p-ERK1/2 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), 作用 10 和 15 min 时 p-PKC 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。而替米沙坦(1 μmol/L)作用后, 各个时间点的 p-ERK1/2 和 p-PKC 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** TMAO 加重 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化机制可能包含了其对 AT1R 的作用。

关键词: 氧化三甲胺; 血管紧张素 II 1 型受体; 动脉粥样硬化

中图分类号: R543

文献标识码: A

The role of angiotensin II type 1 receptor in trimethylamine oxide-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice*

Li Tian-xiang¹, Li Su-juan², Hao Xiang-yu¹, Zhu Zhi-bo¹, Zheng Meng¹, Guo Jian-qiang¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To explore the role of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) in the promotion of atherosclerosis by trimethylamine N-oxide (TMAO). **Methods** Molecular docking was used to predict the possible interaction between TMAO and AT1R. Twenty-one 6-week-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into control group, TMAO group, and TMAO + telmisartan group, with 7 mice in each group. The TMAO group was fed with

收稿日期: 2023-07-19

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(No.2023LHMS08065)

[通信作者] 郭建强, E-mail: gjq161208@126.com; Tel: 13848157954

1% choline in the diet to replicate the high TMAO blood model. The TMAO + telmisartan group was treated with telmisartan 10 mg/(kg·d) by gavage. After 12 weeks, blood was collected, and plasma TMAO levels were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Oil Red O staining was used to determine the plaque area at the aortic root. Immunohistochemistry was used to detect the infiltration of inflammatory factors monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-6 (IL-6) in the plaque. AT1R expression plasmids were constructed, transfected into 293T cells, and treated with TMAO (200 μmol/L) or TMAO (200 μmol/L) + telmisartan (1 μmol/L) for 0, 5, 10, 15, 30, and 60 min. The activation of the downstream signaling pathways ERK and PKC was detected. **Results** Molecular docking predicted a direct binding site between TMAO and AT1R. The proportion of plaque area at the aortic root, expression of MCP-1, and IL-6 in the plaque were statistically different among the three groups ($P < 0.05$). The TMAO group showed an increase in the proportion of plaque area at the aortic root and an elevation of MCP-1 and IL-6 expression compared to the control group ($P < 0.05$), while the telmisartan group showed a decrease compared to the TMAO group ($P < 0.05$). The expression of AT1R, p-ERK1/2, and p-PKC in aortic tissues differed significantly among the three groups ($P < 0.05$). The TMAO group increased significantly compared to the control group ($P < 0.05$), while the telmisartan group decreased compared to the TMAO group ($P < 0.05$). In 293T cells transfected with AT1R plasmids, the relative expression of p-ERK1/2 and p-PKC protein at different time points in the TMAO group (200 μmol/L) was statistically different ($P < 0.05$). Compared with 0 min, the relative expression of p-ERK1/2 increased at 15 and 30 min ($P < 0.05$), and the relative expression of p-PKC increased at 10 and 15 min ($P < 0.05$). After treatment with telmisartan (1 μmol/L), there was no statistically significant difference in the relative expression of p-ERK1/2 and p-PKC at each time point ($P > 0.05$). **Conclusion** The mechanism by which TMAO exacerbates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice may involve its action on AT1R.

Keywords: trimethylamine oxide; angiotensin II type 1 receptor; atherosclerosis

新近研究发现,肠道菌群代谢产物氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)可以促进动脉粥样硬化的发生,增加心血管事件的发生率^[1],但其机制尚不清楚。近期有文献报道TMAO可延缓血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)的升压作用^[2],依那普利可降低血浆的TMAO水平^[3],提示TMAO与肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)可能存在一定的关系。本研究初步探讨TMAO与Ang II 1型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)在载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化过程中可能的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

所有动物研究和实验程序均经内蒙古医科大学动物保护与利用机构委员会批准(伦理批号:YKD202101220)。ApoE^{-/-}小鼠购于北京维通利华动物实验中心,动物合格证号:11400700368028,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006,清洁级。将21只6周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠称重、编号,均饲养在(22±1)℃的房间中,湿度50%~60%,3~4只/笼,12 h昼夜交替,室内空气新鲜。所有小鼠毛

发光亮、顺滑,无脱发,动作敏捷,进食、排便正常,体重18.5~20.7 g。采用高脂鼠粮(基础饲料+21%猪油+0.15%胆固醇)喂养复制动脉粥样硬化小鼠模型,饲料购于北京科奥协力公司,饲养于内蒙古医科大学基础实验室动物中心,共饲养12周。小鼠随机分为对照组、TMAO组、TMAO+替米沙坦组,每组7只。TMAO组在饲料中加1%胆碱复制高TMAO血症模型^[4-5]。TMAO+替米沙坦组采用替米沙坦(上海勃林格殷格翰药业有限公司,进口药品注册证号:H20090416,H20090417,国药准字:J20090089,规格:80 mg)10 mg/(kg·d)灌胃治疗^[6]。

1.2 分子对接

从RCSB PDB数据库(www.rcsb.org)下载AT1R蛋白及原始配体ZD7(PDB编号:4YAY)的晶体结构。采用ChemBiodraw软件画出小分子TMAO化合物的结构,应用Chembio 3D软件将小分子化合物的二维平面结构转换为三维立体结构。采用Pymol软件进行蛋白与配体拆分,从蛋白AT1R挖除ZD7配体,将拆分后的结构均保存为pdbqt格式。TMAO-mol2转为pdbqt格式。采用殷赋科技平台AutDock DOCK.6软件进行分子对接:寻找活性口袋,记录活性口袋坐标值(-29.193, -6.597, 28.201),软件自动

对接,提取构象保存。采用 Pymol 软件分析作图^[7], 显示出小分子配体 TMAO 与 AT1R 蛋白受体相互作用的键(氢键和阳离子- π 键), 做出原始配体 ZD7 与 AT1R 相互作用图。

1.3 小鼠收缩压和 TMAO 含量测定

采用无创小鼠鼠尾测压仪(BP-300A, 成都泰盟软件公司)测量收缩压: 测量前 3 天, 每天下午 3~4 点, 将小鼠置于 25~30 °C 环境中, 15 min/次, 使其适应, 避免因环境及应急因素导致的误差, 保证周围安静, 无噪音。测量前逐渐将箱体加温至 36 °C, 将小鼠固定在固定器中, 调整袖带高度, 保证鼠尾与测压仪平行, 避免弯曲, 按照仪器说明书逐一测量, 尽量保证在同一时间段进行, 每只小鼠测量 3~5 次, 记录收缩压平均值, 2 周测 1 次。

3 组小鼠饲养 12 周(周龄 18 周)后, 眶窦采血, 置于 1.5 mL 无菌 EP 管, 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 留取上清液, 择期送检。采用高效液相色谱串联质谱法测定小鼠血浆 TMAO 含量, 委托北京华英生物科技有限公司检测, 仪器型号 HPLC-MS/MS。从样品中取 10 μ L 上清液, 加入 90 μ L 甲醇沉淀蛋白混合, 13 200 r/min 离心 4 min, 取 50 μ L 离心后上清液, 流动相 A 为 0.1% 甲酸-水溶液, 流动相 B 为乙腈。色谱柱: MS Lab C18 (150 \times 4.6 mm, 5 μ m); 柱温: 50 °C; 流量: 1 mL/min; 质谱条件: +ESI 电喷雾离子源; IS: +4000 V; GS1: 50 psi; GS2: 50 psi。扫描方法: MRM 多反应监测; CAD: Medium; TEM: 500 e; 20 psi; CXP: 3.0; EP: 10。

1.4 小鼠动脉硬化斑块面积检测

用 3% 水合氯醛溶液麻醉小鼠后打开胸腔, 经左心室灌注冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)。在解剖显微镜下切除主动脉, 留下左心室的上 1/3, 剪断头臂干、左颈总动脉、左锁骨下动脉, 留下 1~2 mm 附着在主动脉上, 将距离心脏约 2~3 mm 处升主动脉切断, 用手术刀在平行左右心耳连线下方 1 mm 处将心脏下部切除^[8], 将连带心脏的主动脉根部组织嵌入聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物(OCT)中包埋, 置于冷冻塑料模具中, 将模具置于液氮中快速冷冻, 然后置于-80 °C 冰箱中保存。收集主动脉根部有主动脉三瓣尖清晰可见的冰冻切片, 用油红 O 进行脂质染色, 采用 Image Pro Plus 软件进行数字图像采集, 并量化油红 O 染色面积和总横截面积, 主动脉斑块面积占比表示为油红 O 阳性面积占主动脉

管腔总横截面积的比值^[8]。计算每只小鼠 6 个切片的平均值。

1.5 免疫组织化学检测斑块内炎症因子的表达

将 OCT 包埋的主动脉根部组织切片, 厚度为 5 μ m, 在 3% H₂O₂ 中室温孵育 10 min, 然后用 PBS 清洗 3 次。5% 山羊血清室温孵育 10 min, 加入抗白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 抗体(1:100, ab7737) 和抗单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 抗体(1:100, ab7202)[艾博抗(上海)贸易有限公司], 每片组织滴 50 μ L, 并在 4 °C 条件下放置过夜, 然后用 PBS 洗涤 3 次(一抗的来源是兔抗鼠)。加入生物素标记的二抗(山羊抗兔), 每块组织滴 50 μ L, 与聚合物室温孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次。用辣根标记的链霉亲和素在室温下染色 20 min 后 PBS 洗涤 3 次, 5 min/次。将 50 μ L DAB 缓冲液+50 μ L DAB 底物+50 μ L DAB 原液+850 μ L 蒸馏水混合成 1 mL DAB 显色液, 每个组织切片加入 50 μ L, 室温染色 5 min。当斑块出现褐色或棕黄色时, 苏木精染色, 用自来水冲洗, 中性胶密封。Leica 显微镜采集图像, Image Pro Plus 6.0 软件测量斑块中 IL-6、MCP-1 的吸光度值。

1.6 质粒构建及转染

基因名称: AGTR1 (NM000685.4), CDS 序列: NM000685.4:389-1468; 物种: 人, 载体名称: GV146; 元件顺序: CMV-MCS-IRES-EGFP-SV40-Neomycin; 克隆位点: XhoI/EcoRI; 步骤: 载体酶切 \rightarrow 获取目的基因片段 \rightarrow PCR 扩增产物与载体交换 \rightarrow 转化 \rightarrow 菌落 PCR 鉴定 \rightarrow 测序 \rightarrow 质粒抽提。该质粒构建委托上海吉凯基因有限公司完成。采用 Effectene 转染试剂盒[凯杰企业管理(上海)有限公司]将含有目的基因 AT1R 质粒转染至 HEK293T 细胞(广州呼吸疾病研究所提供)内, 设置空白组(HEK293T 细胞)、空载组(HEK293T 细胞+CON079)、过表达组(HEK293T 细胞+AGTR1)。制备转染复合物: 按质粒 DNA(或空载组): BufferEC: Enhancer 为 0.4 μ g: 96 μ L: 3.2 μ L 配制, 空载组在另一只 EP 管中等比例加入上述溶液。空白组和空载组各设 2 复孔, 过表达组分为 TMAO 组和 TMAO+替米沙坦组, 分别在 0、5、10、15、30 和 60 min 加入 TMAO(200 μ mol/L)或 TMAO(200 μ mol/L)+替米沙坦(1 μ mol/L), 每个时间点设置 2 个复孔, 6 个时间点共 24 孔, 最后统一收样。

1.7 Western blotting 检测 AT1R、p-ERK、p-PKC 蛋白表达

提取小鼠主动脉组织和质粒转染后 HEK293T 细胞的总蛋白,采用 Western blotting 检测各组小鼠主动脉组织和质粒转染后 HEK293T 细胞的 AT1R 蛋白相对表达量及其下游信号通路 ERK、PKC 磷酸化活化情况。制胶、转膜、用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液,孵育一抗 AT1R[ab18801,艾博抗(上海)贸易有限公司]、t-ERK1/2(9102s)和 p-ERK1/2(9101s)(美国 Cell Signaling Technology 公司),二抗 t-PKC(46809s)和 p-PKC(9371s)(美国 Cell Signaling Technology 公司),应用 UVP 凝胶成像分析仪扫描成像,采用 Image J 软件分析目的蛋白和内参蛋白[GAPDH(5174T)和 β -Tubulin(2128s),美国 Cell Signaling Technology 公司]的灰度值,两者的比值即为目的蛋白相对表达量。

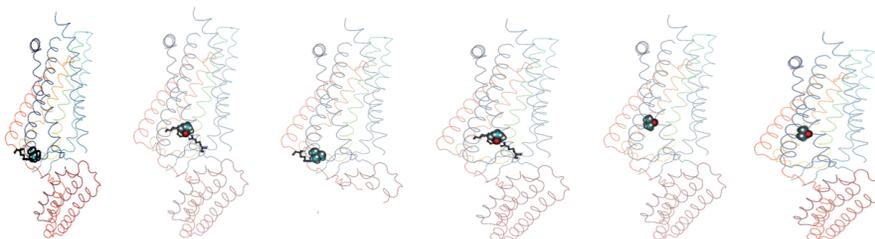
1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 和 Graphpad prism 7 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数(下四分位数,上四分位数)[M(P₂₅, P₇₅)]表示,比较用方差分析或 *H* 检验,两两比较用 LSD-*t* 检验或 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分子对接结果

TMAO 在 AT1R 上的潜在结合位点全部对接,生成了 6 个结构簇(见图 1A),其结合能量 Grid Score 范围(-17.406 29 ~ -18.521 378)(见图 1B);提取其中 1 个构象(见图 1C)进行局部对接,盒子中心(23.496, 28.829, 27.779),盒子大小(-29.193, -6.597, 28.201),采用 Pymol 软件作图,使 TMAO 位于 AT1R 已知的活性结合口袋(AT1R 的原始配体 ZD7)(见图 1D),TMAO 深埋于受体蛋白分子内部。Ang II 是 AT1R 的天然配体,既往 SINGH 等^[9]研究发现 Ang II 激活 AT1R 与 Tyr35、TRP84、Arg167 这 3 个残基结合是必须的,TMAO 为 Ang II 的竞争配体,所以进一步探讨 TMAO 与这几个位点的结合情况。TMAO 在其原位点与 AT1R 结合,TMAO 胺基上的氧原子与 Arg167 形成氢键,氮原子与 Trp-84 形成阳离子- π 键,故而使其稳定结合在 AT1R 上(见图 1E)。在结合口袋内,TMAO 配体周围主要由 Val108、Ser105、Arg167、Ile288、Trp84 氨基酸相互作用形成疏水区域;结合 TMAO 与 AT1R 分子对接结果,推测 TMAO 可能具有直接激活 AT1R 的作用。



A TMAO-AT1R形成的6个结构簇

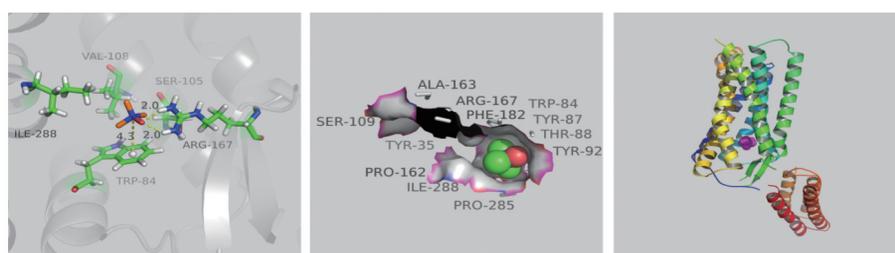
蛋白/核酸/多肽-小分子对接 (DOCK 6.9)

任务编号: 2019062509220960 创建时间: 2019-06-25 09:22:14
 更新时间: 2020-09-20 00:20:14 计算参数: 查看
 任务名称: 分子对接
 任务备注: 2

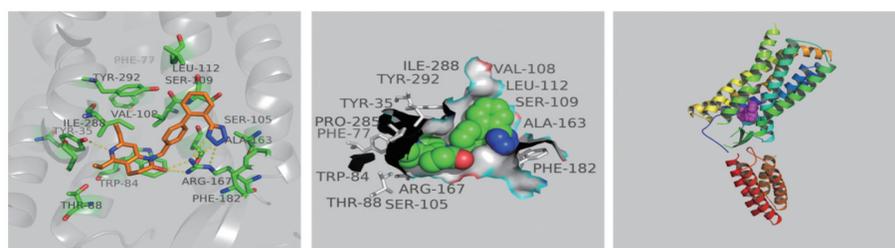
Name	Pose	Grid Score (kcal/mol)	Grid_vdw (kcal/mol)	Grid_es (kcal/mol)	Internal Energy (kcal/mol)	Cluster Size
1145	1	-18.521378	-11.557845	-6.963531	0	
1145	2	-18.370373	-12.703918	-5.666455	0	
1145	3	-17.919855	-12.042073	-5.877782	0	
1145	4	-17.896	-11.803273	-6.092726	0	
1145	5	-17.561523	-16.849726	-0.711797	0	
1145	6	-17.40629	-16.83593	-0.57036	0	

scores.csv

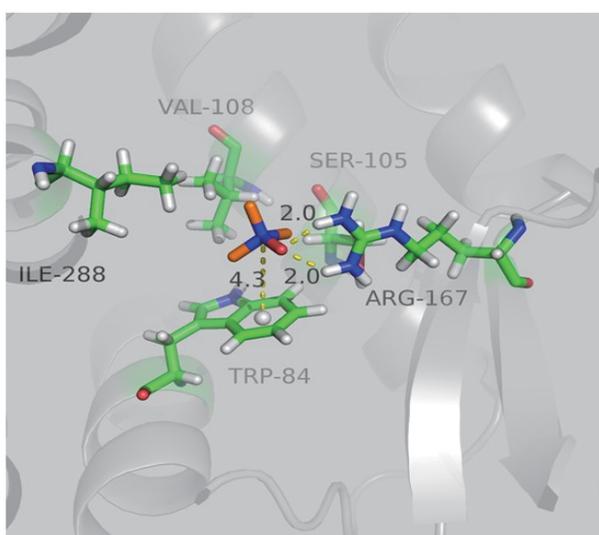
B Grid Score为结合能量



C TMAO与AT1R相互作用



D 原始配体ZD7与AT1R相互作用



E 氨基酸残基:TRP-84、ARG-167; 氢键:2.0; 阳离子- π 键:4.3

图1 TMAO和AT1R分子对接结果示意图

2.2 3组小鼠治疗前后收缩压比较

3组小鼠治疗前收缩压比较,经方差分析,差异无统计学意义($P>0.05$)。3组小鼠治疗后收缩压比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$),TMAO+替米沙坦组较对照组及TMAO组下降。3组小鼠治疗前后收缩压差值的比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.3 3组小鼠血浆TMAO水平比较

对照组小鼠血浆TMAO水平为($1\ 356.7 \pm 368.2$) ng/mL, TMAO组为($2\ 967.1 \pm 1\ 083.5$) ng/mL, TMAO+替米沙坦组为($1\ 926.7 \pm 664.0$) ng/mL。3组小鼠血浆TMAO水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=7.046, P=0.006$)。进一步两两比较,

表1 3组小鼠治疗前后的收缩压比较

($n=7, \text{mmHg}, \bar{x} \pm s$)

组别	治疗前	治疗后	差值
对照组	124.39 ± 11.69	120.08 ± 6.81	-5.14 ± 4.56
TMAO组	123.43 ± 11.34	125.00 ± 9.47	1.57 ± 18.06
TMAO+替米沙坦组	122.29 ± 12.86	88.28 ± 10.33 [†]	-34.00 ± 17.18
F值	0.042	30.690	17.520
P值	0.959	0.000	0.000

注:对照组治疗前为实验开始前的收缩压,治疗后为实验结束时的收缩压。[†]与对照组和TMAO组比较, $P<0.05$ 。

TMAO组较对照组升高($P<0.05$);TMAO+替米沙坦组较TMAO组下降($P<0.05$)。

2.4 3组小鼠主动脉根部斑块面积占比比较

对照组小鼠主动脉根部斑块面积占比为(1.72±0.25)%,TMAO组为(3.39±1.01)%,TMAO+替米沙坦组为(2.03±0.14)%。3组小鼠主动脉根部斑块面积占比比较,经方差分析,差异有统计学意义

($F=2.119, P=0.047$)。进一步两两比较,TMAO组较对照组增加($P<0.05$),表明高TMAO血症可促进动脉粥样硬化斑块形成;TMAO+替米沙坦组较TMAO组降低($P<0.05$),表明替米沙坦阻断AT1R后,TMAO的促动脉粥样硬化作用减弱。见图2。

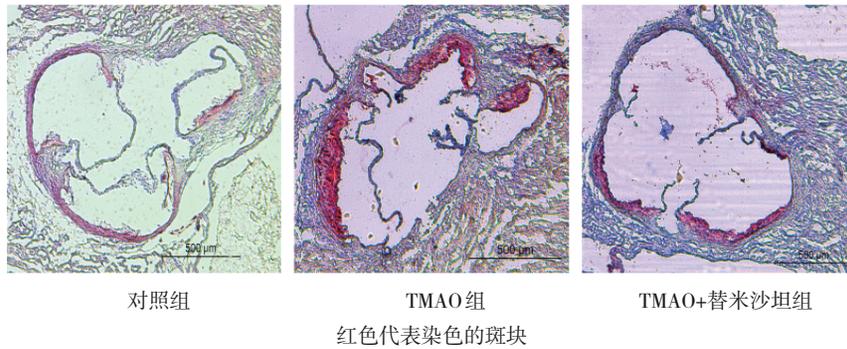


图2 3组小鼠主动脉根部斑块面积占比 (油红O染色×40)

2.5 3组小鼠主动脉根部斑块内炎症因子IL-6、MCP-1表达的比较

TMAO组主动脉根部斑块IL-6、MCP-1的棕黄色颗粒沉积较对照组明显增多,TMAO+替米沙坦组的棕黄色颗粒沉积较TMAO组明显减少,表明替米

沙坦阻断ATR1后,能够减轻TMAO促炎作用。见图3。

3组小鼠主动脉根部斑块内炎症因子IL-6和MCP-1表达比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

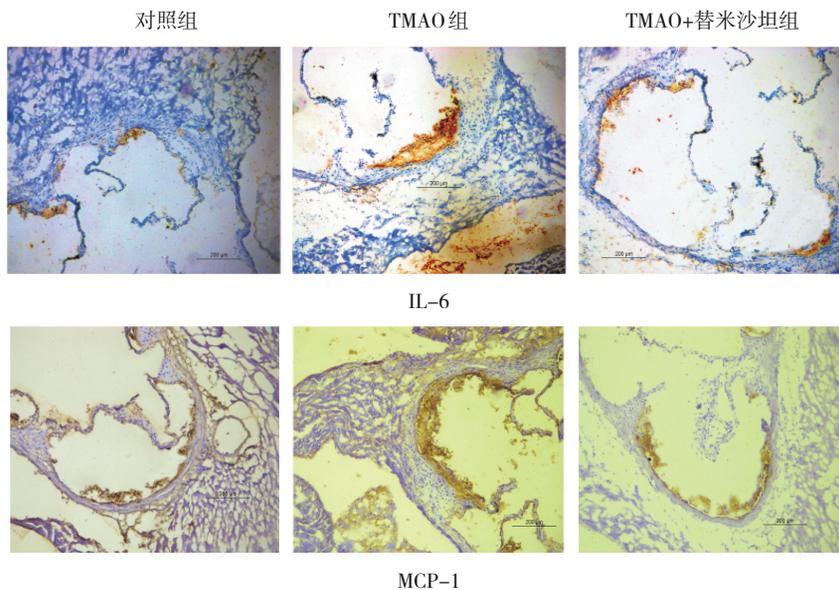


图3 3组小鼠主动脉根部斑块内炎症因子IL-6、MCP-1表达 (免疫组织化学×100)

2.6 TMAO对小鼠主动脉组织AT1R及其下游信号通路的影响

3组小鼠主动脉组织的AT1R、p-ERK、p-PKC蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$);TMAO组较对照组升高,TMAO+替米沙坦组较TMAO组下降,见表3和图4。说明TMAO在

小鼠主动脉组织中具有增加AT1R的表达并激活其下游信号通路的作用。

2.7 AT1R的真核表达质粒转染HEK293T细胞结果

将AT1R的真核表达质粒转染HEK293T细胞,结果显示,空白组、空载组及过表达组AT1R蛋白相对表达量分别为(0.08±0.003)、(0.11±0.011)、

表 2 3组小鼠主动脉根部斑块内炎症因子IL-6、MCP-1 表达比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	MCP-1
对照组	0.006 ± 0.001 1	0.003 ± 0.001 1
TMAO组	0.011 ± 0.001 2	0.009 ± 0.000 8
TMAO + 替米沙坦组	0.006 ± 0.001 7	0.006 ± 0.003 6
F 值	7.157	16.153
P 值	0.026	0.003

表 3 3组小鼠主动脉组织的AT1R、p-ERK、p-PKC蛋白 相对表达量比较 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	AT1R	p-ERK	p-PKC
对照组	0.70 ± 0.07	0.67 ± 0.19	0.37 ± 0.15
TMAO组	1.18 ± 0.14	1.20 ± 0.19	0.43 ± 0.03
TMAO + 替米沙坦组	0.90 ± 0.05	0.83 ± 0.09	0.31 ± 0.06
F 值	16.655	8.329	9.647
P 值	0.002	0.019	0.017

(0.26 ± 0.062), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 20.207, P = 0.002$), 过表达组较其他两组升高, 提示转染成功。见图 5。

2.8 TMAO对AT1R下游信号通路PKC和ERK1/2的影响

用 200 μmol/L TMAO 作用于 AT1R 真核表达质粒转染的 HEK293T 细胞, 分别于 0、5、10、15、30 和 60 min 检测 p-PKC、p-ERK1/2 的蛋白相对表达量, 经方差分析, 各时间点的 p-PKC、p-ERK1/2 的蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与 0 min 比较, 作用后 10 和 15 min p-PKC 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与 0 min 比较,

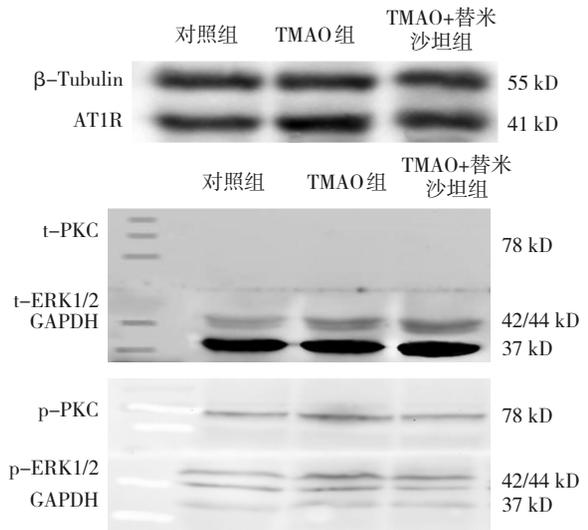


图 4 小鼠主动脉组织 AT1R、p-PKC、p-ERK1/2 蛋白表达

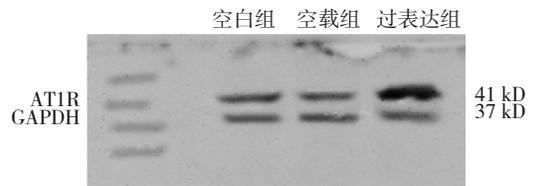


图 5 质粒转染 AT1R 蛋白表达

作用后 15 和 30 min p-ERK1/2 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。给予替米沙坦 (1 μmol/L) 干预治疗后, 分别于 0、5、10、15、30 和 60 min 检测 p-PKC、p-ERK1/2 的蛋白相对表达量, 各时间点的 p-PKC、p-ERK1/2 的蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明替米沙坦显著抑制 TMAO 的作用。见图 6 和表 4。

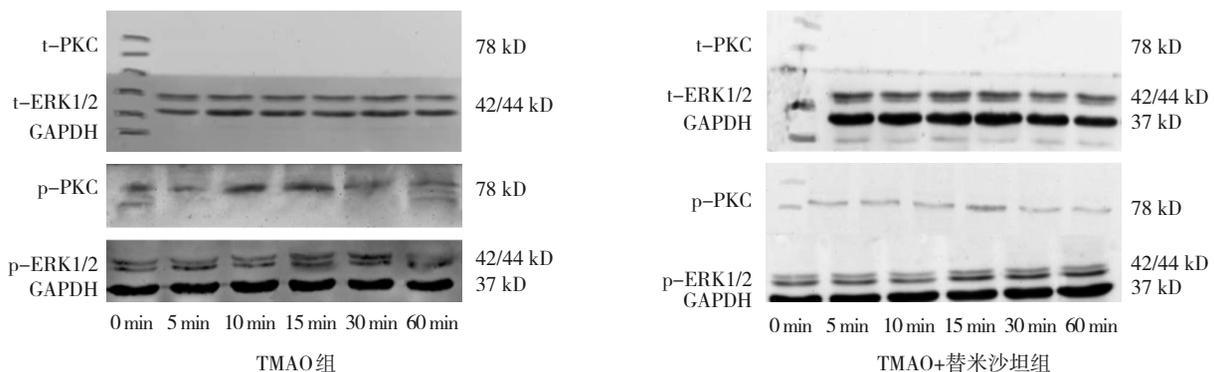


图 6 TMAO 组和 TMAO+替米沙坦组各时间点的 p-PKC 和 p-ERK1/2 的表达

表4 TMAO组和TMAO+替米沙坦组各时间点的p-PKC和p-ERK1/2蛋白相对表达量的比较

组别	p-PKC						F值	P值
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min		
TMAO组	0.23 ± 0.08	0.45 ± 0.15	0.82 ± 0.22 [†]	0.63 ± 0.15 [†]	0.49 ± 0.18	0.47 ± 0.08	5.073	0.010
TMAO + 替米沙坦组	0.20 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.11	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.08	0.23 ± 0.06	0.169	0.969

组别	p-ERK1/2						F值	P值
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min		
TMAO组	0.70 ± 0.10	1.18 ± 0.184	1.26 ± 0.28	1.70 ± 0.51 [†]	1.78 ± 0.68 [†]	1.24 ± 0.21	3.132	0.049
TMAO + 替米沙坦组	0.34 ± 0.04	0.41 ± 0.08	0.45 ± 0.15	0.47 ± 0.12	0.50 ± 0.11	0.43 ± 0.07	0.877	0.525

注: † 0 min比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

心血管疾病是威胁人类健康最主要的疾病, 动脉粥样硬化是其主要的病理基础, 已有炎症、脂质渗透、单细胞聚集等很多学说, 但其确切机制并不十分清楚。最近研究发现, 肠道微生物群对动脉粥样硬化的发生和发展有着重要的作用^[11], 但其机制尚不清楚。

TMAO是肠道菌群的代谢产物, 是三甲胺在肝脏中被黄素单加氧酶催化的氧化产物; 三甲胺是肠道细菌通过三甲胺裂解酶对含三甲胺基团的化合物进行切割的产物。一些食物, 如肉食类富含卵磷脂、胆碱及肉碱等, 为三甲胺的主要来源。近年来发现氧化三甲胺与动脉粥样硬化心血管疾病有着密切的关系。有研究表明TMAO通过抑制胆固醇逆向转运、活化巨噬细胞清道夫受体^[12]、内皮细胞、增加血小板聚集^[13]、改变组织甾醇代谢、激活NF- κ B信号通路^[14]、激活NLRP3炎症小体^[15]等机制促进动脉粥样硬化的发生、发展, 但TMAO加重动脉粥样硬化的机制尚不十分清楚。

RAS在动脉粥样硬化的发病过程中发挥了重要作用。Ang II是RAS的主要效应分子, 通过激活AT1R发挥其多种生物活性作用, 一方面是血管收缩、醛固酮分泌和钠、钾、水平衡, 另一方面是引起内皮功能障碍、氧化应激、炎症反应及促进中膜平滑肌细胞增殖、迁移等^[16]。有趣的是, 除了Ang II之外, 诸如机械拉伸、与自身抗体的相互作用或AT1R某些氨基酸的人工替换, 也能在没有Ang II的情况下激活AT1R, 这种受体在不结合天然或药理学激动剂自发激活, 产生第二信使, 实现信号传递的现象被定义为组成性激活^[6, 17]。AT1R

的组成性激活可以理解局部RAS活性在病理中的重要作用, 各种激素、细胞因子、炎症或代谢应激可使心脏和血管中的AT1R发生上调, 显著增强AT1R的组成型活性, 并加速疾病的进展。本研究前期实验证实AT1R对同型半胱氨酸的促动脉粥样硬化作用具有重要的意义, 其机制可能是同型半胱氨酸组成性激活了AT1R^[18]。

近期有文献报道TMAO可延缓Ang II的升压作用, 依那普利可降低血浆的TMAO水平, 本研究前期实验结果也显示, 血管紧张素受体阻滞剂可改变ApoE^{-/-}小鼠肠道菌群的结构, 改变TMAO相关细菌的比例, 降低血浆TMAO水平^[19], 故推测TMAO与RAS可能存在一定的相关性。本研究将TMAO作为配体与AT1R蛋白受体进行分子对接, 预测到两者存在直接结合的结构基础。由于AT1R的组成性激活特性, 所以可能存在TMAO激活AT1R的可能性。因此采用ApoE^{-/-}小鼠作为动脉粥样硬化模型, 饲料含1%胆碱提高血浆TMAO含量, 发现高TMAO血症可促进动脉粥样硬化, 加重斑块炎症, 与文献[4, 20]报道的一致; 而采用替米沙坦阻断AT1R后, TMAO促动脉粥样硬化的作用减弱, 斑块面积减少、炎症因子表达水平下降, 其原因除与TMAO含量下降有关外, 替米沙坦阻断TMAO对AT1R的作用可能更为重要。为进一步明确TMAO对AT1R下游信号通路的作用, 本研究构建了AT1R的真核表达质粒, 转染HEK293T细胞, 然后用TMAO(200 μ mol/L)刺激, 发现p-ERK在15、30 min, p-PKC在10、15 min时磷酸化水平较0 min明显升高, 而用替米沙坦预处理可减弱TMAO的这一作用, 这些结果进一步表明TMAO激活了AT1R。由此, 可以得出这样的推论: 饮食结构的变化导致

肠道菌群的变化,从而增加了血浆TMAO的含量,进一步组成性激活了血管局部组织的AT1R,引起内皮功能障碍,与其他危险因素共同启动了动脉粥样硬化的病理过程。诸如高血压、糖尿病、血脂异常等传统危险因素能够促进血管壁炎症反应,炎性介质可导致血管壁局部AT1R表达增加,而此时血浆TMAO水平升高更加激活了血管壁AT1R;同时,TMAO本身也通过激活NF- κ B信号通路激活炎症反应,从而出现了信号通路的交联放大效应,加速动脉粥样硬化的病理过程。AT1R有2条主要的下游信号通路——G蛋白信号通路和抑制素介导通路。G蛋白依赖信号通路包括PKC和ERK1/2磷酸化,细胞内Ca²⁺水平变化和活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)信号传导。抑制蛋白介导(Arrestin)的激活, β -抑制蛋白2(β -arrestin 2)转位与AT1R结合,协助了AT1R的内化,本研究结果显示,TMAO能引起AT1R G蛋白依赖信号通路包括PKC和ERK1/2磷酸化,但信号通路下游的激活情况及 β -arrestin 2通路是否也被同时激活仍需进一步探讨。关于TMAO与AT1R是否能够直接结合,仍需进一步验证,比如采用放射性配体受体结合实验验证两者的直接结合,以及TMAO能引起AT1R发生什么样的构象改变,哪些氨基酸是介导TMAO激活AT1R的关键,这都需要进一步研究。

本研究也存在诸多的不足,一是不能排除是否为TMAO激活了局部RAS系统,增加了局部Ang II的水平,进而导致AT1R活化;二是分子对接仅仅是预测TMAO与AT1R可能直接结合,尚缺乏直接的实验证据,未来可采用放射性配体与受体结合分析实验验证TMAO与AT1R的直接结合;三是采用AT1R基因敲除小鼠进一步验证,可能会更具有说服力。

本研究结果提示TMAO可能结合并激活AT1R,发挥促动脉粥样硬化作用,这一结论使动脉粥样硬化的理论知识更加丰富,也让TMAO的致病机制有了新的进展,或许可以通过改变肠道菌群,或者改变TMAO产生的关键酶,降低血浆TMAO水平,减轻AT1R组成性激活的程度,进一步降低动脉粥样硬化的发病率。TMAO有望成为治疗心血管疾病的新靶点,为肠道菌群和RAS系统在心血管

疾病领域建立一座桥梁。

参 考 文 献 :

- [1] THOMAS M S, FERNANDEZ M L. Trimethylamine N-oxide (TMAO), diet and cardiovascular disease[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2021, 23(4): 12.
- [2] JIANG S, SHUI Y J, CUI Y, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine N-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension[J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102115.
- [3] KONOP M, RADKOWSKI M, GROCHOWSKA M, et al. Enalapril decreases rat plasma concentration of TMAO, a gut bacteria-derived cardiovascular marker[J]. *Biomarkers*, 2018, 23(4): 380-385.
- [4] WANG Z N, KLIPPELL E, BENNETT B J, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57-63.
- [5] ZHU W F, GREGORY J C, ORG E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124.
- [6] LI T Y, YU B, LIU Z X, et al. Homocysteine directly interacts and activates the angiotensin II type I receptor to aggravate vascular injury[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 11.
- [7] LIU T, LIU M M, CHEN F M, et al. A small-molecule compound has anti-influenza A virus activity by acting as a "PB2 inhibitor"[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 4110-4120.
- [8] ZHU Z B, LI S J, JIA Y C, et al. Homocysteine promotes migration of adventitial fibroblasts via angiotensin II type I receptor activation to aggravate atherosclerosis[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2022, 41(6): 535-547.
- [9] SINGH K D, UNAL H, DESNOYER R, et al. Divergent spatiotemporal interaction of angiotensin receptor blocking drugs with angiotensin type I receptor[J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(1): 182-193.
- [10] PELLEGRIN M, BOUZOURÈNE K, AUBERT J F, et al. Activation of bone marrow-derived cells angiotensin (Ang) II type I receptor by ang II promotes atherosclerotic plaque vulnerability[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2621.
- [11] ZOU Y F, SONG X J, LIU N, et al. Intestinal flora: a potential new regulator of cardiovascular disease[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(3): 753-772.
- [12] ZHU B T, REN H, XIE F, et al. Trimethylamine N-oxide generated by the gut microbiota: potential atherosclerosis treatment strategies[J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(35): 2914-2919.
- [13] WITKOWSKI M, WEEKS T L, HAZEN S L. Gut microbiota and cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 553-570.
- [14] YANG G L, LIN C C, YANG Y W, et al. Nobiletin prevents trimethylamine oxide-induced vascular inflammation via inhibition of the NF- κ B/MAPK pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(22): 6169-6176.

- [15] ZHANG X L, LI Y N, YANG P Z, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes vascular calcification through activation of NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) inflammasome and NF- κ B (nuclear factor κ B) signals[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 751-765.
- [16] POZNYAK A V, BHARADWAJ D, PRASAD G, et al. Renin-angiotensin system in pathogenesis of atherosclerosis and treatment of CVD[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6702.
- [17] ZHANG H T, LUGININA A, MISHIN A, et al. Structural insights into ligand recognition and activation of angiotensin receptors[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42(7): 577-587.
- [18] 李天翔, 祝志波, 郝祥宇, 等. AT1受体在同型半胱氨酸致动脉粥样硬化斑块不稳定性中的作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(5): 1-7.
- [19] 李天翔, 李素娟, 郝祥宇, 等. 替米沙坦在动脉粥样硬化中对肠道菌群及其代谢产物TMAO的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(11): 1233-1241.
- [20] TANG W H W, WANG Z N, LEVISON B S, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(17): 1575-1584.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 李天翔, 李素娟, 郝翔宇, 等. 血管紧张素II型受体在氧化三甲胺促进ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(1): 34-43.

Cite this article as: LI T X, LI S J, HAO X Y, et al. The role of angiotensin II type 1 receptor in trimethylamine oxide-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(1): 34-43.