

doi: 10.16118/j.1008-0392.2018.06.010

· 基础研究 ·

1-磷酸鞘氨醇受体 1 型信号通路在压力超负荷诱导的心室重构中的作用及机制

肖倩¹, 宝璐尔¹, 陈辰¹, 张林^{1,2,3}, 范慧敏^{1,2,3}

(1. 同济大学附属东方医院心脏外科, 上海 200120; 2. 同济大学附属东方医院心衰专科, 上海 200120;

3. 同济大学附属东方医院心衰研究所, 上海 200120)

【摘要】目的 研究 1-磷酸鞘氨醇受体 1 型 (sphingosine 1-phosphate receptor 1, S1PR1) 信号通路在压力超负荷诱导的心室重构中的作用及其机制。**方法** 构建小鼠主动脉弓缩窄 (transverse aortic constriction, TAC) 模型, 模型建立的第 2 天开始经腹腔注射 S1PR1 激动剂 SEW2871 或相应的对照溶剂 DMSO, 持续给药 30 d 后观察 S1PR1 激动剂对 TAC 术后小鼠心功能的影响。体外实验: 首先通过慢病毒感染建立 S1PR1 基因过表达 (S1PR1 组) 或 S1PR1 基因沉默 (shRNA 组) 的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 稳定表达株及相应对照组 (NC 组), 并检测细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 的活性水平。同时, 分别收集 NC 组、S1PR1 组和 S1PR1 组加 ERK1/2 阻滞剂 U0126 (S1PR1+U0126 组) 的 HUVEC 细胞培养上清液, 在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的血管紧张素 II (Ang II) 的刺激下将各组 HUVEC 细胞培养上清液分别与 H9C2 心肌细胞共培养, 48 h 后测量 H9C2 心肌细胞大小, 分析 HUVEC 细胞表达的 S1PR1 通过旁分泌对心肌细胞肥大的影响及可能机制。**结果** 给药 30 d 后, 心超提示 TAC 术后 SEW2871 组左室射血分数 ($59.65\% \pm 6.12\%$) 较 DMSO 组 ($41.16\% \pm 11.91\%$) 显著提高 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色表明 TAC 术后 SEW2871 组较 DMSO 组心肌组织纤维化及心肌肥大程度明显降低 ($P < 0.05$)。蛋白印迹结果提示 S1PR1 激活 ERK1/2 信号通路。H9C2 心肌细胞的面积测量结果表明 S1PR1 组 [$22.52 \pm 4.13 \mu\text{m}^2$] 较 NC 组 [$34.98 \pm 12.92 \mu\text{m}^2$] 及 S1PR1+U0126 组 [$80.60 \pm 36.60 \mu\text{m}^2$] 的心肌细胞的面积明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** S1PR1 可以显著改善压力超负荷诱导的心室重构, 提高心功能, 减轻心肌组织纤维化及心肌细胞肥大。内皮细胞表达的 S1PR1 能改善心肌细胞肥大, 可能是通过激活 ERK1/2 信号通路完成。

【关键词】 压力超负荷; 1-磷酸鞘氨醇受体 1 型; 心肌肥大; 心室重构; 血管内皮细胞

【中图分类号】 R541 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2018)06-0046-08

Effect of S1PR1 on pressure overload-induced cardiac remodeling in mice

XIAO Qian¹, BAO Lu-er¹, CHEN Chen¹, ZHANG Lin^{1,2,3}, FAN Hui-min^{1,2,3}

(1. Dept. of Cardiac Surgery, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

2. Dept. of Heart Failure, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;

3. Heart Failure Institute, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

【Abstract】Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1) on ventricular remodeling induced by stress overload in mice.

Methods The transverse aortic constriction (TAC) model was established in female C57BL/6 mice.

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(81670234, 81470472); 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养计划资助(PWRd2017-01); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划“中医药临床重大项目”(ZY3-LCPT-2-1003)

作者简介: 肖倩(1992—), 女, 硕士. E-mail: xh6709030814xq@163.com

通信作者: 范慧敏. E-mail: frankfan@tongji.edu.cn

The TAC mice were given intraperitoneal injection of S1PR1 agonist SEW2871 5 mg/(kg · d) (TAC+SEW group, $n=5$) or Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (TAC+DMSO group, $n=5$); and the mice in sham operation group were given intraperitoneal injection of DMEM (sham group, $n=5$). After 30 d of administration, the heart function of mice in each group was examined by cardiac ultrasonography. The cardiac H9C2 cells were stimulated with angiotensin II (Ang II, 0.5 $\mu\text{mol/L}$) to induce hypertrophy. The S1PR1 gene overexpressing human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (S1PR1 group) and S1PR1 gene silencing HUVECs (shRNA group) were established by corresponding plasmid transfection, and the untransfected HUVECs served as NC group. The protein expression level of extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) in HUVEC cells was detected by Western blot. The culture supernatant of HUVEC cells was collected and co-cultured with H9C2 cells under the stimulation of Ang II for 48 h. The cells were divided into four groups: the culture supernatant of NC group without Ang II stimulation (CTL), the culture supernatant of NC group with Ang II stimulation (Ang II+NC), the culture supernatant of S1PR1 group with Ang II stimulation (Ang II+S1PR1) and the culture supernatant of S1PR1 group with Ang II stimulation group pretreated with ERK1/2 antagonist U0126 (Ang II+S1PR1+U0126). After 48 h of drug treatment, the size of cardiomyocytes was measured by ImageJ software. **Results** After 30 d of drug treatment, the echocardiography results showed that the left ventricular ejection fraction in SEW2871 group ($59.65\% \pm 6.12\%$) was significantly higher than that in DMSO group ($41.16\% \pm 11.91\%$) ($P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed that the degree of myocardial fibrosis in SEW2871 group was lower than that in DMSO group ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the levels of p-ERK1/2 in the S1PR1 group was significantly higher than that in NC group and shRNA group ($t = 3.598, 3.200, P < 0.05$). The area of H9C2 cells in S1PR1 group [$(22.52 \pm 4.13) \mu\text{m}^2$] was significantly reduced compared with NC group [$(34.98 \pm 12.92) \mu\text{m}^2$] and S1PR1+U0126 group [$(80.60 \pm 36.60) \mu\text{m}^2$] ($P < 0.05$). **Conclusion** The S1PR1 activation can remarkably improve cardiac function, ameliorate ventricular remodeling and reduce myocardial fibrosis and hypertrophy induced by pressure overload. The expression of S1PR1 in vascular endothelial cells can modify the hypertrophy of cardiac myocytes, which may be accomplished by activating the ERK 1/2 signaling pathway.

【Key words】 pressure overload; sphingosine 1-phosphate receptor 1; myocardial hypertrophy; cardiac remodeling; vascular endothelial cells

随着我国经济的发展, 人民生活方式改变明显, 在社会老龄化和城市化进程加快、居民不健康生活方式盛行的背景下, 居民心血管疾病危险因素暴露增多, 高血压、血脂异常、糖尿病的患病率持续增加, 心血管疾病的死亡率居各病因之首^[1], 虽然目前临床上中西医治疗对于心衰有一定疗效^[2-4], 但仍无法治愈甚至逆转从心室重构到心力衰竭的过程。

1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine 1-phosphate, S1P) 是一种存在于细胞内外的具有生物活性的脂质代谢产物, 其既可作为一种细胞内第二信使发挥作用, 又

可通过作用于细胞表面其特定的受体 S1PR1 ~ S1PR5 来发挥重要的生物学功能。在心血管系统中, S1PR1 在血管新生、淋巴细胞运输、心脏的生长发育以及维持血管的正常通透性等方面具有重要作用^[5-11]。目前有文献报道 S1PR1 在冠心病中的作用和机制^[5, 12-13], 提示 S1PR1 在缺血性心肌病所致的心室重构中的重要作用, 但关于 S1PR1 在高血压性心脏病、主动脉瓣狭窄等压力超负荷引起的心室重构中的作用和机制目前尚不明确。本研究通过动物体内实验及细胞实验来阐明 S1PR1 在压力超负荷

诱导下心室重构中的作用及可能的机制,以及血管内皮细胞表达的 S1PR1 对心肌肥大的影响及可能的机制,为高血压性心脏病、主动脉瓣狭窄等疾病的治疗提供可能的新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~10 周龄 C57BL/6 雌性小鼠,体质量 20~25 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司。饲养于同济大学附属东方医院心力衰竭研究所无特定病原体级动物房。该实验得到同济大学附属东方医院伦理委员会批准,并且所有动物的饲养、处理均严格遵守美国国家研究委员会 1996 版《实验动物护理和使用指南》的规定。

1.2 实验细胞与试剂

H9C2 心肌细胞系、293T 细胞、人脐静脉内皮细胞(HUVEC)均购买于美国模式菌种收集中心。SEW2871、血管紧张素 II (Ang II)、戊巴比妥那粉剂购买于美国 Sigma 公司;罗丹明标记鬼笔环肽购买于上海翊圣公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)、4%多聚甲醛溶液购自美国 Gibco 公司;ERK1/2 一抗及 p-ERK1/2 一抗购买于 CST 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠主动脉弓缩窄模型建立 选用 8~10 周龄 C57BL/6 雌性小鼠,体质量 20~25 g,使用腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉后气管插管,消毒后开胸,上至胸骨上窝,下至第 2 肋骨水平。用 4-0 缝线固定撑开肋骨,用无齿显微镊分离胸腺暴露主动脉弓。用 5-0 缝线在右颈总动脉分出后 0.3 cm 处,用 26-27G 垫扎针头(直径 0.4~0.6 mm)垫扎(可造成 70%左右狭窄),对主动脉及垫扎针进行结扎,结扎确实后抽出垫扎针,拆除 4-0 缝线,5-0 缝线缝合肌肉,1 mL 注射器轻轻抽吸胸腔内气体,4-0 缝线缝合皮肤。手术切口处用金霉素眼膏涂敷。

1.3.2 给药方式及分组 实验小鼠主动脉缩窄术(TAC)后 24 h 开始腹腔注射给药,此后每天固定时间段腹腔注射给药,药物现配现用,持续 30 d。根据实验目的将在建模后 24 h 存活的小鼠分组为假手术组(Sham 组, $n=5$)、SEW2871 组($n=5$)和 DMSO 组($n=5$)。假手术组(Sham)小鼠开胸后逐层缝合,未行

TAC 术,给予 50 μL DMSO 加 200 μL PBS 溶液^[14],腹腔注射给药;SEW2871 组为 TAC 术后给予 50 μL SEW2871(2 mg/mL)储存液加 200 μL PBS 溶液,腹腔注射给药,即 5 mg/(kg·d)^[15];DMSO 组为 TAC 术后给予 50 μL DMSO 加 200 μL PBS 溶液,腹腔注射给药。

1.3.3 心脏超声检测评估心脏功能 持续给药 30 d 后,将 Sham 组、SEW2871 组和 DMSO 组小鼠放入装有异氟烷的麻醉诱导盒中麻醉,使用小动物超声仪测量小鼠左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)、左室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)和左室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume, LVESV),评估小鼠心功能变化。

1.3.4 组织切片染色 TAC 模型建立并给药 30 d 后,称量小鼠,使用过量戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉处死小鼠,取出心脏,用 PBS 溶液灌洗心脏,脱水处理后沿心脏长轴横断切片,并行 Masson 染色和天狼猩红(sirius red)染色,显微镜下分别观察各组小鼠心肌组织纤维化程度并拍照。

1.3.5 心肌组织麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)免疫荧光染色 TAC 模型建立并给药 30 d 后分别取各组小鼠心肌组织行冰冻切片保存。取出冰冻切片后 PBS 浸泡 5 min;4%多聚甲醛溶液(PFA)固定 15 min;PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;加含有 1%BSA 的 PBST 30~50 μL /样本,室温封闭 30 min;PBS 洗 3 次,每次 3 min;WGA(抗体浓度 5 mg/mL)抗体孵育 10 min,室温;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;每个样本加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI(稀释为 1:100),孵育 5 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并统计心肌桥横截面积,评估小鼠心脏心肌细胞肥大程度。

1.3.6 慢病毒感染建立 S1PR1 基因不同表达的 HUVEC 细胞的鉴定及培养上清液收集 (1) S1PR1 基因不同表达的 HUVEC 细胞的鉴定:通过 S1PR1 基因过表达质粒(S1PR1)、S1PR1 基因沉默质粒(shRNA)及相应对照组质粒(NC)分别转染 293T 细

胞并收集相应的病毒液,将分别收集到的病毒液过滤后用于培养感染 HUVEC 细胞,于细胞培养箱中培养,12 h 后更换为正常培养基,继续培养 36 h。分别收集细胞提取 RNA,通过 RT-PCR 检测 HUVEC 细胞 S1PR1 基因的表达。S1PR1 引物:正向序列 5'-CAGGATGAGGGAGATGAC-3',反向引物序列 5'-AGGGAGTATGTTTGTGGC-3'。

(2) HUVEC 细胞培养上清液收集:通过慢病毒感染建立 S1PR1 基因过表达(S1PR1 组)或 S1PR1 基因沉默(shRNA 组)的 HUVEC 细胞稳定表达株及对照组(NC 组)的 HUVEC 细胞于 5%CO₂ 的 37 °C 培养箱培养 24 h 后更换为 0.5%FBS+1%P/S 的 DMEM 培养基,同时加入 ERK1/2 抑制剂 U0126(10 μm)后继续于培养箱中培养 48 h 后分别收集培养上清液。根据培养细胞及处理药物不同,将细胞培养上清液分为 NC 组、S1PR1 组、shRNA 组和 S1PR1+U0126 组,分别收集后用直径 0.22 μm 的滤网过滤后使用。

1.3.7 H9C2 心肌细胞肥大模型建立 分别用 0.1、0.5 μmol/L 的 Ang II 刺激 H9C2 细胞于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后行罗丹明标记鬼笔环肽染色,并用 Image J 软件测量心肌细胞表面积。分别收集细胞提取 RNA,通过 RT-PCR 检测肥大基因的表达。引物序列如下。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),正向:5'-AGTCCTTCCACGATACCA-3',反向:5'-AGGGAGTATGTTTGTGGC-3';心房钠尿肽(ANF),正向:5'-TCCA-ATCCTGTCAATCCTAC-3',反向:5'-CTCCTTCTC-CATCACCAAG-3';脑钠肽(BNP),正向:5'-TTGAAGTATGTGCCATCTTG-3',反向:5'-CAGTCTCC-AGAACAATCCA-3';肌球蛋白重链(Myh7),正向:5'-GATGAGGCTGGTGTCTTG-3',反向:5'-GAAGGACGAGGAGATGGA-3'。

1.3.8 Western 印迹法检测 p-ERK1/2 和 t-ERK1/2 的蛋白在 HUVEC 细胞中的表达水平 将 HUVEC 细胞铺板后置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,第 2 天换用无血清的培养基进行血清饥饿 24 h,饥饿 48 h 后加 100 nmol/L S1PR1 受体的配体 S1P 刺激细胞 5 min,吸去培养基,以预冷的 PBS 洗涤 2 次以洗去残余培养基于冰上,加入 100 μL 裂解液,用刮匙将贴壁的细胞刮下,收集细胞到干净的 1.5 mL 离心

管中,4 °C,12 000 r/min,离心 15 min,吸取上清液保存。将各组 HUVEC 细胞在 S1P 刺激后裂解提取蛋白定量,每组均以 30 μg 上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,后经转膜、一抗、二抗显色后照相并用 Image J 分析 p-ERK1/2、t-ERK1/2 蛋白相对表达。

1.3.9 H9C2 心肌细胞骨架染色 如 1.3.6 所述,收集 NC 组、S1PR1 组、shRNA 组和 S1PR1+U0126 组的 HUVEC 细胞培养上清液,将 H9C2 细胞与上述 HUVEC 上清液共培养,并给予 Ang II(0.5 μmol/L)刺激,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。48 h 后将 6 孔板中 H9C2 细胞吸去培养基后用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;4%PFA 溶液室温固定 20 min;PBS 再漂洗 3 次,每次 3 min;用 1%BSA 封闭液封闭 30 min;PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;用 0.1%Triton 室温破膜 5 min,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;罗丹明标记鬼笔环肽(100 nmol/L)室温避光染 40 min;用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;每个样本加入 5 μg/mL DAPI 100 mL,孵育 5 min;PBS 漂洗后抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察细胞大小并拍片,Image J 软件统计 H9C2 细胞表面积。

1.4 统计学处理

所有数据均采用 SPSS19.0 统计软件包处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据的统计分析比较采用独立样本 *t* 检验。超过两组的数据则组间比较采用单因素方差分析的方法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠主动脉弓缩窄模型的构建

通过前期实验我们成功建立了小鼠主动脉弓缩窄模型,小鼠存活率为 85%。在小鼠主动脉弓缩窄模型造模手术过程中,主动脉弓部分结扎后血流减少,心跳加速。各组小鼠造模后精神稍差,活动量减少,随后逐渐恢复。术后 24 h,存活的小鼠 30 d 时存活率为 100%。

2.2 心超结果提示 S1PR1 激活后提高压力超负荷诱导的心功能

采用小动物超声心动图测量各组小鼠给药 30 d 后的心脏功能,结果表明:TAC 术后 SEW2871 组及 DMSO 组较 Sham 组在左室射血分数(EF%)及短轴

缩短率 (FS%) 显著降低 ($F = 2.777, 10.510, P < 0.05$; $F = 1.572, 4.437, P < 0.05$), 提示 TAC 建模成功。同时, SEW2871 组较 DMSO 组 EF 及 FS 明显升高 ($t = 3.087, 3.144, P < 0.05$), SEW2871 组

LVEDD 和 LVESD 较 DMSO 组明显缩小 ($t = 2.454, 3.361, P < 0.05$), SEW2871 组小鼠 LVESV 和 LVEDV 较 DMSO 组明显减少 ($t = 3.178, 2.447, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 给药 30 天后心脏超声心动功能检测结果
Tab.1 Results of echocardiographic examination

组别	n	EF (%)	FS (%)	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEDV/ μ L	LVESV/ μ L
Sham 组	5	75.23 \pm 3.67	43.47 \pm 3.19	3.84 \pm 0.09	2.17 \pm 0.11	63.65 \pm 3.62	15.93 \pm 2.05
TAC+DMSO 组	5	41.16 \pm 11.91	20.23 \pm 6.72	4.30 \pm 0.16	3.44 \pm 0.20	84.00 \pm 16.85	49.78 \pm 15.56
TAC+SEW 组	5	59.65 \pm 6.12	31.23 \pm 4.00	3.76 \pm 0.33	2.59 \pm 0.33	61.11 \pm 12.34	25.03 \pm 7.81
t 值		3.087	3.144	2.454	3.361	2.447	3.178
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 各组心肌组织切片染色结果

Sham 组无明显心肌组织纤维化, TAC 术后 SEW2871 组及 DMSO 组分别出现一定程度的心肌组织纤维化, 其中 SEW2871 组较 DMSO 组心肌组织纤维化程度显著减低 ($P < 0.05$), 见图 1~3。

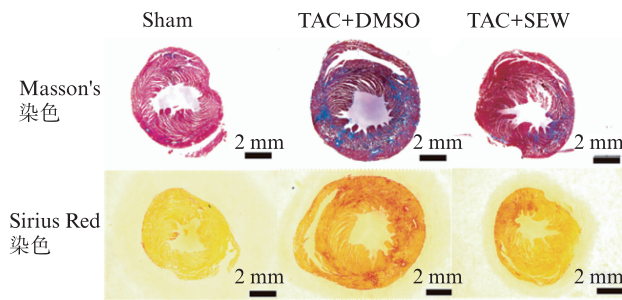


图 1 各组小鼠心脏组织切片 Masson 染色和天狼猩红染色结果

Fig.1 Masson's and Sirius red staining of hearts in each group

SEW2871 组和 DMSO 组较 Sham 组心肌组织纤维化面积明显增加, SEW2871 组心肌组织纤维化面积较 DMSO 组显著减少

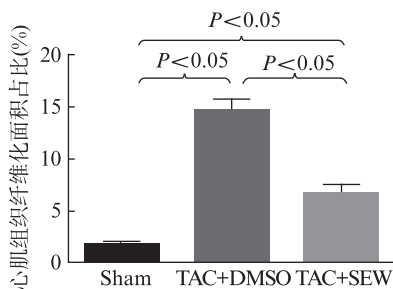


图 2 心脏组织 Masson 染色结果

Fig.2 Masson's staining of cardiac tissue

心肌组织纤维化面积占比结果提示 SEW2871 显著减少 TAC 术后的心肌纤维化

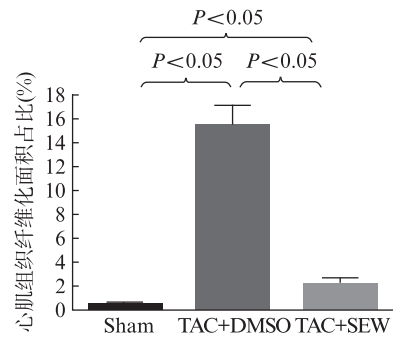


图 3 心脏组织天狼猩红染色结果

Fig.3 Sirius red staining of cardiac tissue

心肌组织纤维化面积占比结果提示 SEW2871 显著减少 TAC 术后的心肌纤维化

2.4 心肌组织 WGA 免疫荧光染色

TAC 术后 SEW2871 组及 DMSO 组较 Sham 组心肌桥横截面积增大 ($t = 8.327, 9.518, P < 0.01$), 提示建模成功, TAC 术后 DMSO 组较 SEW2871 组心肌桥横截面积显著增大 ($t = 6.728, P < 0.01$), 提示 SEW2871 可以显著抑制 TAC 术后的心肌肥大, 见图 4。

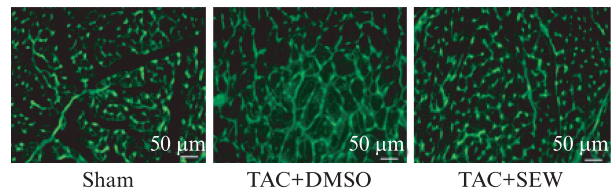


图 4 各组小鼠心肌组织切片行 WGA 免疫荧光染色结果

Fig.4 WGA staining of cardiac tissue

TAC 术后, SEW2871 组较 DMSO 组心肌桥横截面积显著减小 ($P < 0.01$)

2.5 慢病毒感染 S1PR1 基因不同表达的 HUVEC 细胞建立

S1PR1 过表达组 HUVEC 细胞 S1PR1 基因相对表达水平明显高于 NC 组及 shRNA 组 ($t=46.880$ 、 47.470 、 $P<0.001$), shRNA 组 HUVEC 细胞 S1PR1 基因相对表达水平显著低于 NC 组 ($t=20.97$ 、 $P<0.001$), 提示慢病毒感染建立 S1PR1 基因过表达 (S1PR1 组) 或 S1PR1 基因沉默 (shRNA 组) 的 HUVEC 细胞稳定表达株及相应对照组 (NC 组) 成功。

2.6 Western 印迹法检测结果显示 S1P 通过 S1PR1 激活 ERK1/2 信号通路

S1PR1 组 HUVEC 细胞 S1PR1 激活后 p-ERK1/2 蛋白的表达水平较 NC 组及 shRNA 组显著提高 ($P<0.05$), shRNA 组 HUVEC 细胞 S1PR1 激活后 p-ERK1/2 蛋白的表达水平较 NC 组明显降低 ($P<0.05$), 提示 S1P 通过 S1PR1 激活 ERK1/2 信号通路, 见图 5。

2.7 血管内皮细胞表达的 S1PR1 激活后改善 H9C2 心肌细胞肥大

CTL 组心肌细胞面积为 (27.00 ± 8.11) μm^2 , Ang II + NC 组为 (34.98 ± 12.92) μm^2 , Ang II + S1PR1 组为 (22.52 ± 4.13) μm^2 , Ang II + S1PR1 + U0126 组为 (80.60 ± 36.60) μm^2 。Ang II + NC 组心肌细胞面积较 CTL 组明显增加 ($t=5.203$ 、 $P<0.05$), 提示体外心肌肥大模型建立成功。Ang II + S1PR1

组较 Ang II + NC 组 H9C2 心肌细胞面积显著减小 ($t=11.030$ 、 $P<0.01$), 提示 S1PR1 可以改善 Ang II 诱导下的心肌肥大, 而 Ang II + S1PR1 + U0126 组心肌细胞面积较 Ang II + S1PR1 组增大明显 ($t=19.780$ 、 $P<0.01$), 说明 S1PR1 可能通过激活 ERK 通路来减轻 Ang II 诱导的心肌肥大, 见图 6。

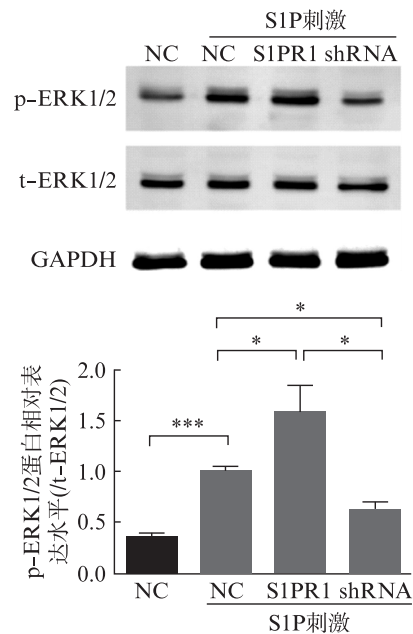


图5 各组 HUVEC 细胞 p-ERK1/2 蛋白相对表达水平 Western 印迹检测结果

Fig.5 Western blotting analysis of p-ERK1/2 protein expression in HUVECs

S1PR1 组 HUVEC 细胞 S1PR1 激活后, p-ERK1/2 蛋白的表达水平较 NC 组及 shRNA 组显著提高, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

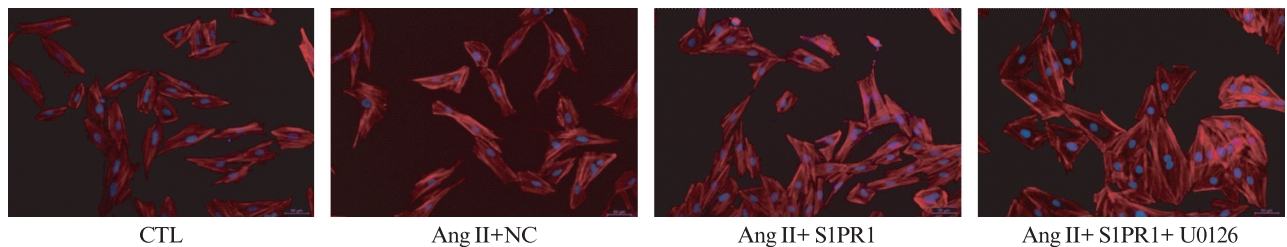


图6 H9C2 心肌细胞鬼笔环肽细胞骨架染色结果 (标尺: 50 μm)

Fig.6 The cytoskeleton staining of ghost pencil cyclic peptide in H9C2 cardiomyocytes (Scale bar, 50 μm)

Ang II + S1PR1 组较 Ang II + NC 组 H9C2 心肌细胞面积显著减小, Ang II + S1PR1 + U0126 组心肌细胞面积较 Ang II + S1PR1 组增大明显 ($P<0.05$)

3 讨论

S1P 分布于细胞内外, 维持着一定的浓度平衡。S1P 通过与其相应的受体 S1PR1 ~ S1PR5 特异性结合, 发挥相应的生物学效应。最初是在内皮细胞分化过程中发现大量表达的 S1PR1^[11], 随着研究的深入,

发现心肌组织中主要表达 S1PR1^[5]。S1PR1 受体结合于 Gi, 可激活 ERK1/2、Rac 等下游信号通路, 增强细胞抗凋亡能力细胞的迁移能力, 调节细胞的增殖、存活, 细胞骨架改变、迁移, 血管发生, 创伤愈合, 细胞内钙离子移动, 黏附分子表达, 激活单核细胞黏附内皮细胞, 在多种疾病的发生发展中都有着重要的

作用^[5,16-18]。其中,内皮细胞表达的 S1PR1 还能调节血管的渗透性,并维持内皮细胞的存活,从而保证血管内皮系统结构的完整^[8,16,19-21]。目前,研究表明 S1PR1 信号在心血管系统生理和病理过程中起重要作用,但是 S1PR1 在压力负荷过载所致心室重构中的作用和机制还有待进一步阐明。本研究发现,在 TAC 小鼠模型中给予 S1PR1 激动剂 SEW2871 药物作用后,可明显降低心肌组织纤维化程度,改善心肌细胞肥大,提高心功能,这与报道中体内 S1PR1 在心血管疾病方面中的保护作用相一致^[22]。

据报道,Raf/MEK/ MAPK、PI3K/Akt 和 JAK/STAT 信号通路在心肌肥大中发挥重要作用^[23]。在小鼠 TAC 建模中,MAPK 途径,ERK、SAPK/JNK 激酶和 p38 MAPK 在术后小鼠心脏组织中激活,ERK1/2 在内皮素和肾上腺素诱导的心肌肥大中起着至关重要的作用,心锚重复蛋白(CARP)通过抑制 ERK1/2 和 TGF- β 信号通路来改善心肌肥大^[24],ERK1/2 信号途径是心脏缺血后适应中对心肌再灌注损伤发挥保护作用的靶点^[12],抑制 ERK1/2 通路可显著改善心室重构,对于心衰的治疗也有一定的作用^[25]。在心脏发生心室重构的过程中伴随着一定的心脏血管新生。关于血管内皮细胞表达的 S1PR1 研究发现,S1PR1 表达缺失的血管内皮细胞间的黏着连接不稳定,屏障功能破坏,血管新生异常^[7,21-22,26],所以内皮细胞表达的 S1PR1 在心室重构中的发挥着一定的作用。由于体内阻断 ERK1/2 信号通路后影响因素复杂,故未行体内 ERK1/2 功能挽救实验,于体外加入 ERK1/2 信号通路阻滞剂 U0126,进一步明确 ERK1/2 在血管内皮细胞表达的 S1PR1 所致的压力超负荷诱导的心室重构中的作用。本研究体外细胞实验显示,S1PR1 基因过表达的 HUVEC 细胞在 S1P 刺激下磷酸化 ERK1/2 表达水平显著升高,H9C2 细胞与 S1PR1 基因过表达的 HUVEC 细胞培养基共培养中 H9C2 细胞面积较对照组明显减小,在加入 ERK1/2 信号通路阻滞剂 U0126 后,H9C2 细胞面积较 S1PR1 基因过表达组显著增加,提示血管内皮细胞表达的 S1PR1 能改善心肌肥大,阻断 ERK1/2 信号通路后心肌肥大改善效果不明显,说明内皮细胞表达的 S1PR1 可能通过 ERK1/2 信号通路来发挥心脏保护作用。

综上所述,S1P 特异性结合 S1PR1 后可以激活

ERK1/2 信号通路,从而发挥改善心室重构、提高心功能的治疗作用。本研究与 Ohkura 等^[11]的研究结果一致,再次验证 S1P/S1PR1 信号在改善心室重构中的积极作用及机制。本研究结果提示血管内皮细胞表达的 S1PR1 除了在心室重构中促进血管新生外,还能通过激活 ERK1/2 信号通路来改善压力超负荷诱导的心肌组织纤维化、心肌肥大,为高血压性心脏病、主动脉瓣狭窄的治疗提供新的治疗思路。对于血管内皮细胞表达的 S1PR1 激活 ERK1/2 信号后对压力超负荷诱导的心室重构的保护作用中具体的信号分子有待进一步探究。

【参考文献】

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1): 1-8.
- [2] SENNI M, PAULUS W J, GAVAZZI A, et al. New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes[J]. Eur Heart J, 2014,35(40): 2797-2815.
- [3] SUN J, ZHANG K, XIONG W J, et al. Clinical effects of a standardized Chinese herbal remedy, Qili Qiangxin, as an adjuvant treatment in heart failure: systematic review and meta-analysis[J]. BMC Complement Altern Med, 2016,16: 201.
- [4] 宝璐尔,张林,范慧敏,等.强心方组分对心肌梗死后心力衰竭小鼠心功能的影响[J].同济大学学报(医学版),2017,38(6): 6-11.
- [5] ALEWIJNSE A E, PETERS S L, MICHEL M C. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites [J]. Br J Pharmacol, 2004,143(6): 666-684.
- [6] CANNAVO A, RENGO G, LICCARDO D, et al. β 1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy [J]. Circulation, 2013,128(15): 1612-1622.
- [7] HE P, PHILBRICK M J, AN X, et al. Endothelial differentiation gene-1, a new downstream gene is involved in RTEF-1 induced angiogenesis in endothelial cells [J]. PLoS One, 2014,9(2): e88143.
- [8] JOSIPOVIC I, PFLÜGER B, FORK C, et al. Long

- noncoding RNA LISPR1 is required for S1P signaling and endothelial cell function [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018,116: 57 – 68.
- [9] JUNG B, OBINATA H, GALVANI S, et al. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development [J]. *Dev Cell*, 2012,23(3): 600 – 610.
- [10] KEUL P, VAN BORREN M M, GHANEM A, et al. Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Regulates Cardiac Function by Modulating Ca^{2+} Sensitivity and Na^+/H^+ Exchange and Mediates Protection by Ischemic Preconditioning [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5 (5). pii: ew3393.
- [11] OHKURA S I, USUI S, TAKASHIMA S I, et al. Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6 [J]. *PLoS One*, 2017,12(8): e0182329.
- [12] 包馨慧,李海霞,陶静,等.一磷酸鞘氨醇/一磷酸鞘氨醇1受体信号通路在大鼠肥大大心肌细胞缺血后适应中的作用及其机制 [J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44 (5): 431 – 435.
- [13] ZHANG F, XIA Y, YAN W, et al. Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and remodeling following myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016,310(2): H250 – 261.
- [14] PIPPIN J W, QU Q, MEIJER L, et al. Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist [J]. *J Clin Invest*, 1997,100(10): 2512 – 2520.
- [15] ISHII M, EGEN J G, KLAUSCHEN F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis [J]. *Nature*, 2009, 458 (7237): 524 – 528.
- [16] HLA T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004,15(5): 513 – 520.
- [17] HOU J, KANG Y J. Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2012,135(3): 337 – 354.
- [18] PYNE N J, MCNAUGHTON M, BOOMKAMP S, et al. Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation [J]. *Adv Biol Regul*, 2016,60: 151 – 159.
- [19] CHAVEZ A, SCHMIDT T T, YAZBECK P, et al. S1PR1 Tyr143 phosphorylation downregulates endothelial cell surface S1PR1 expression and responsiveness [J]. *J Cell Sci*, 2015,128(5): 878 – 887.
- [20] HERCIK C, COSMAS L, MOGENI O D, et al. A diagnostic and epidemiologic investigation of acute febrile illness (AFI) in Kilombero, Tanzania [J]. *PLoS One*, 2017,12(12): e0189712.
- [21] LIU Y, WADA R, YAMASHITA T, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation [J]. *J Clin Invest*, 2000,106(8): 951 – 961.
- [22] KIMURA T, WATANABE T, SATO K, et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3 [J]. *Biochem J*, 2000, 348 Pt 1: 71 – 76.
- [23] ROHINI A, AGRAWAL N, KOYANI C N, et al. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy [J]. *Pharmacol Res*, 2010,61(4): 269 – 280.
- [24] SONG Y, XU J, LI Y, et al. Cardiac ankyrin repeat protein attenuates cardiac hypertrophy by inhibition of ERK1/2 and TGF- β signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2012,7(12): e50436.
- [25] LI C, CHEN Z, YANG H, et al. Selumetinib, an Oral Anti-Neoplastic Drug, May Attenuate Cardiac Hypertrophy via Targeting the ERK Pathway [J]. *PLoS One*, 2016,11(7): e0159079.
- [26] IGARASHI J, ERWIN P A, DANTAS A P, et al. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100(19): 10664 – 10669.