

端粒酶逆转录酶缓解阿霉素诱导心脏毒性的作用研究

顾青青¹ 陈倩雯¹ 王宇¹ 蔡达贝¹ 肖婷婷¹ 王庆捷¹ 孙铃²

¹南京医科大学附属常州市第二人民医院心内科, 江苏常州 213000; ²南京医科大学附属无锡市人民医院心内科, 江苏无锡 214000

通信作者: 孙铃, Email: sunling85125@hotmail.com

【摘要】目的 探讨端粒酶逆转录酶(TERT)缓解阿霉素(DOX)所致心脏毒性的作用。**方法** ①细胞实验:将大鼠 H9c2 心肌细胞分为对照组(CON 组)、空载腺病毒转染组(NC 组)、TERT 过表达腺病毒转染组(TERT 组)、DOX 组(1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理 12 h)、DOX+NC 组和 DOX+TERT 组(转染空载腺病毒或 TERT 过表达腺病毒 24 h 后用 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理 12 h)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测心肌细胞 TERT mRNA 表达;采用免疫荧光法检测细胞线粒体膜电位水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞内 Bax、Bcl-2、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)和 p62 表达水平。②动物实验:将雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、DOX 组(腹腔注射 DOX 15 mg/kg 构建急性心脏毒性损伤模型)、DOX+NC 组和 DOX+TERT 组(心肌点注射空载腺病毒或 TERT 过表达腺病毒 7 d 后制模)。制模 7 d 后采用天狼猩红染色检测心肌纤维化面积;采用超声心动图检测心功能。**结果** ①细胞实验:TERT 组心肌细胞 TERT mRNA 表达水平较 CON 组和 NC 组明显升高。与 CON 组相比,DOX 组和 DOX+NC 组心肌细胞 TERT mRNA 表达水平显著降低,线粒体膜电位水平显著降低,Bax 和 LC3 的蛋白表达量显著升高,Bcl-2 和 p62 的蛋白表达量显著降低。DOX 组与 DOX+NC 组各指标差异无统计学意义。与 DOX 组和 DOX+NC 组相比,DOX+TERT 组 TERT mRNA 表达水平显著升高(相对表达量:1.02 $\pm$ 0.10 比 0.61 $\pm$ 0.05、0.54 $\pm$ 0.03,均 $P<0.05$),线粒体膜电位水平显著升高(1.14 $\pm$ 0.05 比 0.96 $\pm$ 0.01、0.96 $\pm$ 0.01,均 $P<0.05$),Bax 和 LC3 的蛋白表达量显著降低,Bcl-2 和 p62 的蛋白表达量显著升高(Bax/ β -actin:0.88 $\pm$ 0.01 比 1.31 $\pm$ 0.02、1.26 $\pm$ 0.01,LC3-II/I:2.16 $\pm$ 0.05 比 2.64 $\pm$ 0.06、2.58 $\pm$ 0.02,Bcl-2/ β -actin:0.65 $\pm$ 0.01 比 0.40 $\pm$ 0.01、0.41 $\pm$ 0.01,p62/ β -actin:0.45 $\pm$ 0.01 比 0.23 $\pm$ 0.02、0.29 $\pm$ 0.01,均 $P<0.05$)。②动物实验:与 Sham 组相比,DOX 组和 DOX+NC 组小鼠心肌纤维化面积百分比显著增加,左室射血分数(LVEF)和短轴缩短率(FS)显著降低。与 DOX 组和 DOX+NC 组相比,DOX+TERT 组小鼠心肌纤维化面积百分比显著减少(%:2.33 $\pm$ 0.06 比 3.76 $\pm$ 0.07、3.87 $\pm$ 0.06,均 $P<0.05$),LVEF 和 FS 显著升高[LVEF(%):67.00 $\pm$ 1.14 比 54.60 $\pm$ 1.57、53.40 $\pm$ 2.18,FS(%):38.60 $\pm$ 0.51 比 30.60 $\pm$ 1.10、30.00 $\pm$ 0.71,均 $P<0.05$]。**结论** 上调 TERT 表达可抑制 DOX 引起的心肌细胞自噬及凋亡,减轻 DOX 诱导小鼠的心肌纤维化,改善心功能,进而缓解 DOX 所致心脏毒性。

【关键词】 端粒酶逆转录酶; 阿霉素; 心脏毒性; 细胞自噬; 细胞凋亡

基金项目: 国家自然科学基金(82270328); 江苏省自然科学基金(BK20221229)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240711-00582

Study on the effects of telomerase reverse transcriptase in alleviating doxorubicin induced cardiotoxicity

Gu Qingqing¹, Chen Qianwen¹, Wang Yu¹, Cai Dabe¹, Xiao Tingting¹, Wang Qingjie¹, Sun Ling²

¹Department of Cardiology, the Affiliated Changzhou Second People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, Jiangsu, China; ²Department of Cardiology, the Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu, China

Corresponding author: Sun Ling, Email: sunling85125@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the role of telomerase reverse transcriptase (TERT) in alleviating doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity. **Methods** ① Cell experiments: rat H9c2 cardiomyocytes were divided into control group (CON group), null adenovirus transfection group (NC group), TERT overexpression adenovirus transfection group (TERT group), DOX group (treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX for 12 hours), DOX+NC group, and DOX+TERT group (null adenovirus or TERT overexpression adenovirus were transfected for 24 hours and then treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX for 12 hours). The mRNA expression of TERT in cardiomyocytes was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The level of mitochondrial membrane potential was detected by immunofluorescence. The expression levels of intracellular Bax, Bcl-2, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and p62 were detected by Western blotting. ② Animal experiments: male C57BL/6 mice were randomly divided into a sham operation group (Sham group), DOX group (acute cardiotoxicity model was constructed by intraperitoneal injection of DOX 15 mg/kg), DOX+NC group and DOX+TERT group (modeled after transfection with airborne adenovirus or TERT overexpression adenovirus for 7 days). After 7 days of modeling, the area of myocardial fibrosis was detected by Sirius

scarlet staining, and cardiac function was detected by echocardiography. **Results** ① Cellular experiments: the mRNA expression level of TERT was significantly higher in the TERT group compared with the CON and NC groups. Compared with the CON group, the TERT mRNA expression level of cardiomyocytes in the DOX group and the DOX+NC group were significantly lower, the level of mitochondrial membrane potential was significantly lower, the protein expressions of Bax and LC3 were significantly increased, and the protein expressions of Bcl-2 and p62 were significantly decreased. No significant differences were found between the DOX group and DOX+NC group. Compared with the DOX group and DOX+NC group, the TERT mRNA expression level was increased in the DOX+TERT group (relative expression: 1.02 ± 0.10 vs. 0.61 ± 0.05 , 0.54 ± 0.03 , both $P < 0.05$), the level of mitochondrial membrane potential was significantly increased (1.14 ± 0.05 vs. 0.96 ± 0.01 , 0.96 ± 0.01 , both $P < 0.05$), the protein expressions of Bax and LC3 were significantly decreased, and the protein expressions of Bcl-2 and p62 were significantly increased (Bax/ β -actin: 0.88 ± 0.01 vs. 1.31 ± 0.02 , 1.26 ± 0.01 ; LC3-II/I: 2.16 ± 0.05 vs. 2.64 ± 0.06 , 2.58 ± 0.02 ; Bcl-2/ β -actin: 0.65 ± 0.01 vs. 0.40 ± 0.01 , 0.41 ± 0.01 ; p62/ β -actin: 0.45 ± 0.01 vs. 0.23 ± 0.02 , 0.29 ± 0.01 ; all $P < 0.05$). ② Animal experiments: compared with the Sham group, the percentage of myocardial fibrosis area was significantly increased and left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS) were significantly decreased in the DOX group and DOX+NC group. Compared with the DOX group and DOX+NC group, the percentage of myocardial fibrotic area was significantly decreased in the DOX+TERT group (%: 2.33 ± 0.06 vs. 3.76 ± 0.07 , 3.87 ± 0.06 , both $P < 0.05$), and the LVEF and FS were significantly increased [LVEF (%): 67.00 ± 1.14 vs. 54.60 ± 1.57 , 53.40 ± 2.18 ; FS (%): 38.60 ± 0.51 vs. 30.60 ± 1.10 , 30.00 ± 0.71 ; all $P < 0.05$]. **Conclusions** Up-regulation of TERT expression can inhibit DOX-induced cardiomyocyte autophagy and apoptosis, attenuate DOX-induced myocardial fibrosis in mice, improve cardiac function, and thus alleviate DOX-induced cardiotoxicity.

[Key words] Telomerase reverse transcriptase; Doxorubicin; Cardiotoxicity; Autophagy; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82270328); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221229)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240711-00582

阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种抗多肿瘤化疗药物,但其可引起患者体内多系统毒性^[1],心脏是DOX毒性的优先靶标,主要引起心脏收缩功能障碍及心脏重塑^[2-3]。心肌损伤后可发生多种心血管疾病改变,表现为扩张型心肌病和充血性心力衰竭^[4-5],患者预后及生活质量大大下降。已知DOX心脏毒性与铁死亡^[6]、线粒体功能异常^[7]、氧化应激和炎症反应等机制相关^[8],其分子机制仍不明确,探索DOX所致心脏毒性潜在治疗靶点,有利于改善DOX心肌病患者预后,提高患者生存率及生活质量。

端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和非编码端粒酶RNA组分(telomerase RNA component, TERC)组成端粒酶, TERT可与TERC稳定结合以及重复反转录RNA模板片段^[9]。已知TERT在心血管系统中有重大作用^[10], TERT位于线粒体的基质,与线粒体DNA结合并保护其功能^[11],可维持细胞氧化还原稳态和抗氧化酶的水平^[12]。此外, TERT还可减少细胞凋亡和抑制衰老^[13],调节心肌细胞的增殖能力^[14],从而对心脏起到保护作用。但是, TERT是否可以减轻DOX心脏毒性有待证实。本研究旨在探讨TERT在DOX诱导心脏毒性中对H9c2细胞及小鼠心肌损伤的修复作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞及主要试剂:标准清洁级雄性成年C57BL/6小鼠40只,6~8周龄,体质量约30 g,

购自常州卡文斯动物有限公司,实验动物合格号:SCXK(苏)2021-0013。大鼠H9c2心肌细胞购于武汉尚恩生物有限公司,待细胞生长汇合度达到90%左右,对细胞进行传代。DMEM培养基购自美国Invitrogen公司;胎牛血清和胰消化酶购自美国Gibco公司;反转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应试剂盒和超敏化学发光(enhanced chemiluminescent, ECL)试剂盒购自南京诺维赞公司;DOX、RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒和膜电位检测试剂盒(JC-1)购自上海碧云天生物技术有限公司;全蛋白提取试剂盒和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白含量检测试剂盒购自江苏凯基生物技术公司;抗体Bax、Bcl-2、p62、微管相关蛋白1轻链3(light chain 3, LC3)和 β -肌动蛋白(β -actin)购自武汉三鹰生物技术有限公司;TERT过表达腺病毒及阴性对照腺病毒载体由上海和元生物技术公司合成。

本研究通过了南京医科大学动物实验伦理委员会审批(审批号:IACUC-2401047)。

1.2 细胞实验

1.2.1 TERT腺病毒转染H9c2细胞:将携带TERT的腺病毒载体及其阴性对照载体分别转染至H9c2细胞分为TERT组和NC组。病毒转染24 h后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白。确认荧光后继续置于培养箱内。

1.2.2 分组及DOX诱导H9c2细胞心脏毒性:将

H9c2 细胞分为对照组 (CON 组)、空载腺病毒转染组 (NC 组)、TERT 过表达腺病毒转染组 (TERT 组)、DOX 组、DOX+NC 组和 DOX+TERT 组。以 DMEM 完全培养基培养 H9c2 细胞,当 H9c2 生长汇合度至 80%, 1 $\mu\text{mol/L}$ DOX 预处理 H9c2 细胞 12 h 后换液,进行下一步实验。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 TERT 的相对表达量: 培养 H9c2 细胞并转染腺病毒载体及其阴性对照,采用 RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒提取细胞内的总 RNA,检测 RNA 浓度和纯度,将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增。引物序列见表 1,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为检测内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TERT 的相对表达量。

表 1 引物序列

引物名称	序列
TERT 前引物	5'-GCAGAAGACAGTGGTGAACCTT-3'
TERT 后引物	5'-CTTAATTGAGGTCCGTCCGTAAC-3'
GAPDH 前引物	5'-AGGTCGCTGTGAACGGATTTC-3'
GAPDH 后引物	5'-AGGTCGCTGTGAACGGATTTC-3'

注: TERT 为端粒酶逆转录酶, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.4 JC-1 检测线粒体膜电位水平: 当 H9c2 细胞生长汇合度至 70%, 弃去细胞培养上清, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次, 加入 1 $\times$ JC-1 染色工作液于细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 孵育结束后吸除上清, 用 1 $\times$ JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 加入细胞培养液, 荧光显微镜下观察红光荧光与绿光荧光的比值 (红色荧光代表线粒体膜电位较高、健康的细胞; 绿色荧光代表线粒体膜电位较低、不健康的细胞)。

1.2.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测自噬、凋亡相关蛋白表达: 当 H9c2 细胞生长汇合度至 90%, 使用全蛋白提取试剂盒提取蛋白, BCA 蛋白含量检测试剂盒检测蛋白浓度, 然后用 5 $\times$ 上样缓冲液进行混匀煮沸。取 20 μg 细胞总蛋白, 用 10% ~ 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行分离, 然后将其转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。利用快速封闭液封闭 15 min 后用含吐温 20 的 Tris 缓冲液 (Tris buffered saline with tween 20, TBST)

清洗 4 次, 每次 5 min。然后将 PVDF 膜放入一抗溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 溶液室温清洗 4 次, 每次 5 min。然后将 PVDF 膜与相应辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 耦联的二抗稀释液在室温条件下孵育 2 h, 再用 TBST 清洗 4 次, 每次 5 min。抗体 Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、p62 (1 : 1 000)、LC3 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 1 000), 使用 ECL 增强化学发光, 并用高灵敏蛋白印迹成像仪分析, 使用 Image J 软件进行条带的灰度值分析。

1.3 动物实验

1.3.1 TERT 腺病毒心肌注射: 腹腔注射戊巴比妥钠 0.03 mg/g 麻醉 C57BL/6 小鼠, 备皮, 消毒皮肤后在第 3 肋间隙做一横行切口 (0.5 ~ 1.0 cm), 逐层钝性分离肌肉直至胸膜, 打开胸腔, 挤出小鼠心脏, 使用微量注射器多点心肌注射 TERT 过表达腺病毒及阴性空载病毒, 迅速关闭胸腔及皮肤切口, 7 d 后进行下一步处理。

1.3.2 RT-qPCR 检测小鼠心肌 TERT 的相对表达量: 心肌注射 TERT 腺病毒 72 h 后, 腹腔注射巴比妥钠 0.1 mg/g 麻醉小鼠, 取心脏组织, 于液氮中快速冷冻。采用 RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒提取细胞内的总 RNA, 检测 RNA 的浓度和纯度, 将 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增。细胞内 TERT 的相对表达量以 GAPDH 作为检测内参, 引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TERT 的相对表达量。

1.3.3 分组及 DOX 诱导小鼠急性心脏毒性损伤模型构建: 按随机数字表法将小鼠分为假手术组 (Sham 组)、DOX 组、DOX+NC 组和 DOX+TERT 组。DOX 组、DOX+NC 组和 DOX+TERT 组分别于第 1 天和第 5 天腹腔注射 DOX 7.5 mg/kg; Sham 组经腹腔注射 0.9% 生理盐水 10 $\mu\text{L/g}$, 干预 7 d 后进行下一步实验。

1.3.4 天狼猩红染色观察心肌纤维化面积: 制模 7 d 后腹腔注射巴比妥钠 0.1 mg/g 麻醉小鼠, 取心脏组织, 常规石蜡包埋后制成组织切片。铁苏木素染色液染切片 5 ~ 10 min, 流水冲洗 3 次; 天狼猩红染色液滴染 15 ~ 30 min, 并用流水冲洗数秒, 无水乙醇脱水 3 次, 二甲苯透明 3 次, 光镜下观察切片。

1.3.5 心脏功能检测: 异氟烷麻醉小鼠, 备皮后涂上耦合剂, 使用探头测量小鼠心功能, 测量心率、左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS)、左心室收缩

期末内径、左心室舒张期末内径、左心室收缩期末后壁厚度和左心室舒张期末后壁厚度。

1.4 统计学分析:采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件分析数据。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 细胞实验

2.1.1 TERT 的表达(图 1; 表 2):NC 组和 TERT 组均在倒置荧光显微镜下观察到细胞内绿色荧光表达。与 CON 组和 NC 组比较, TERT 组 H9c2 细胞 TERT mRNA 表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$); 同样的, 与 DOX 组和 DOX+NC 组比较, DOX+TERT 组 TERT mRNA 表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$)。

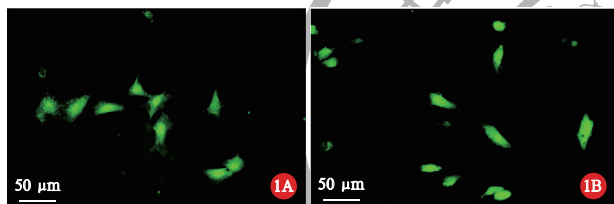


图 1 倒置荧光显微镜下观察腺病毒转染的大鼠 H9c2 心肌细胞 空载腺病毒转染组 (NC 组, A) 成功转染带有绿色荧光的空载腺病毒 (瞬时转染); 端粒酶逆转录酶 (TERT) 过表达腺病毒转染组 (TERT 组, B) 成功转染带有绿色荧光的 TERT 过表达腺病毒 (瞬时转染) 中倍放大

2.1.2 TERT 对 DOX 处理后 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响(图 2):与 CON 组比较, DOX 组和 DOX+NC 组线粒体膜电位显著下降 (均 $P < 0.05$); 而 DOX+

组别	样本量 (个)	TERT mRNA 相对表达量
CON 组	6	0.87 $\pm$ 0.07
NC 组	6	0.81 $\pm$ 0.11
TERT 组	6	1.55 $\pm$ 0.13 ^{ab}
DOX 组	6	0.61 $\pm$ 0.05
DOX+NC 组	6	0.54 $\pm$ 0.03
DOX+TERT 组	6	1.02 $\pm$ 0.10 ^{cd}

注: CON 组为对照组, NC 组为空载腺病毒转染组, TERT 组为端粒酶逆转录酶 (TERT) 过表达腺病毒转染组, DOX 组为阿霉素 (DOX) 处理组, DOX+NC 组为转染空载腺病毒后 DOX 处理组, DOX+TERT 组为转染 TERT 过表达腺病毒后 DOX 处理组; 与 CON 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 DOX 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 DOX+NC 组比较, ^d $P < 0.05$

TERT 组线粒体膜电位较 DOX 组和 DOX+NC 组显著升高 (均 $P < 0.05$); DOX 组与 DOX+NC 组线粒体膜电位差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.3 TERT 对 DOX 处理后 H9c2 细胞凋亡和自噬的影响(图 3; 表 3):与 CON 组比较, DOX 组及 DOX+NC 组 Bax 和 LC3 蛋白表达量显著升高, Bcl-2 和 p62 蛋白表达量显著降低; 与 DOX 组及 DOX+NC 组比较, DOX+TERT 组 Bax 和 LC3 蛋白表达量显著降低, Bcl-2 和 p62 蛋白表达量显著升高; DOX 组与 DOX+NC 组的各指标蛋白表达差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

2.2 动物实验

2.2.1 小鼠心肌中 TERT 的表达(图 4):心肌注射空载腺病毒与 TERT 过表达腺病毒 72 h 后, TERT 组 TERT mRNA 表达水平明显高于 NC 组 ($P < 0.05$)。

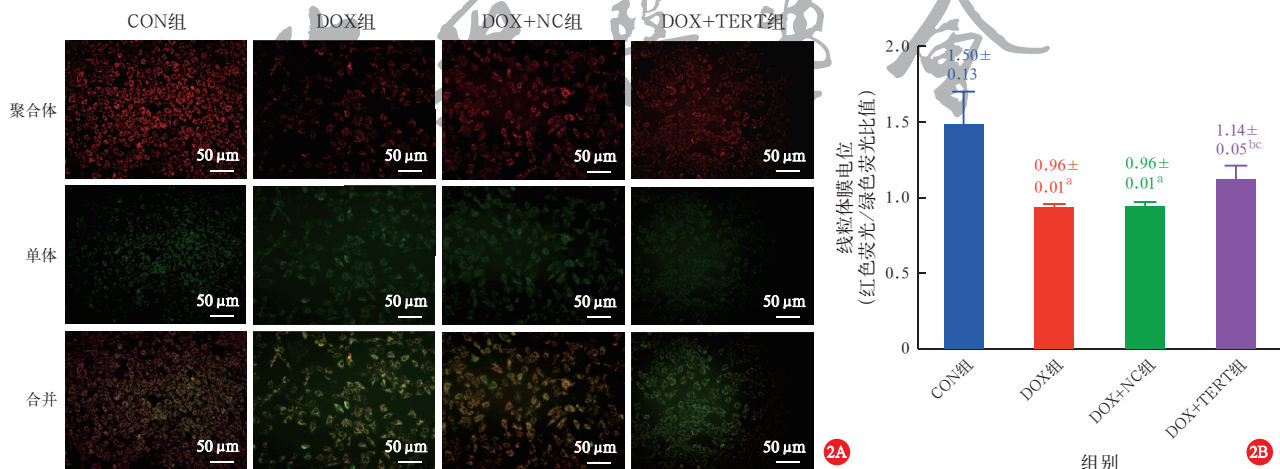
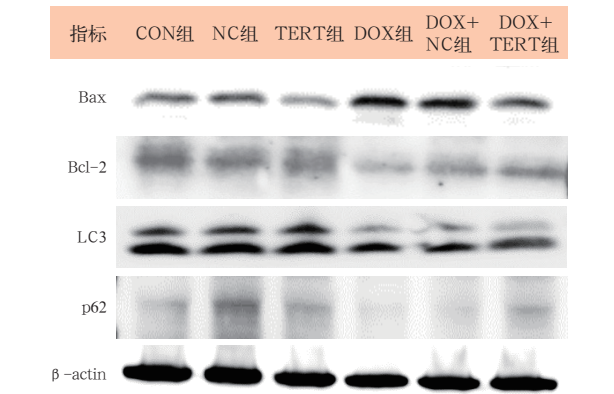


图 2 各组大鼠 H9c2 心肌细胞线粒体膜电位水平 A 为荧光显微镜下观察, 红色荧光代表线粒体膜电位较高、健康的细胞, 绿色荧光代表线粒体膜电位较低、不健康的细胞。对照组 (CON 组) 红光荧光与绿光荧光比值高, 细胞膜电位正常, 细胞状态良好; 阿霉素 (DOX) 组红光荧光与绿光荧光比值低, 细胞膜电位低, 细胞状态差; 转染空载腺病毒后 DOX 处理组 (DOX+NC 组) 红光荧光与绿光荧光比值低, 细胞膜电位低, 细胞状态差; 转染端粒酶逆转录酶 (TERT) 过表达腺病毒后 DOX 处理组 (DOX+TERT 组) 红光荧光与绿光荧光比值升高, 细胞膜电位恢复正常, 细胞状态良好 JC-1 染色 中倍放大。B 为膜电位定量比较, 膜电位水平 = 红色荧光值 / 绿色荧光值; 与 CON 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 DOX 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 DOX+NC 组比较, ^c $P < 0.05$

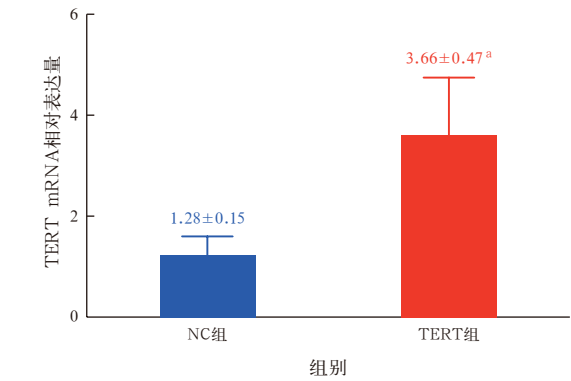


CON 组为对照组, NC 组为空载腺病毒转染组, TERT 组为端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒转染组, DOX 组为阿霉素(DOX)处理组, DOX+NC 组为转染空载腺病毒后 DOX 处理组, DOX+TERT 组为转染 TERT 过表达腺病毒后 DOX 处理组; LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠 H9c2 心肌细胞中凋亡和自噬蛋白表达

表 3 各组大鼠 H9c2 心肌细胞中凋亡和自噬蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	样本数(个)	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	LC3-II/I	p62/ β -actin
CON 组	3	0.68 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.02	1.68 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.02
NC 组	3	0.70 $\pm$ 0.40	0.92 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.01
TERT 组	3	0.63 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.03
DOX 组	3	1.31 $\pm$ 0.02 ^a	0.40 $\pm$ 0.01 ^a	2.64 $\pm$ 0.06 ^a	0.23 $\pm$ 0.02 ^a
DOX+NC 组	3	1.26 $\pm$ 0.01 ^a	0.41 $\pm$ 0.01 ^a	2.58 $\pm$ 0.02 ^a	0.29 $\pm$ 0.01 ^a
DOX+TERT 组	3	0.88 $\pm$ 0.01 ^{bc}	0.65 $\pm$ 0.01 ^{bc}	2.16 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.45 $\pm$ 0.01 ^{bc}

注: CON 组为对照组, NC 组为空载腺病毒转染组, TERT 组为端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒转染组, DOX 组为阿霉素(DOX)处理组, DOX+NC 组为转染空载腺病毒后 DOX 处理组, DOX+TERT 组为转染 TERT 过表达腺病毒后 DOX 处理组; LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, β -actin 为 β -肌动蛋白;与 CON 组比较, ^a $P<0.05$;与 DOX 组比较, ^b $P<0.05$;与 DOX+NC 组比较, ^c $P<0.05$



注: NC 组为心肌定点注射空载腺病毒组, TERT 组为心肌定点注射端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒组;与 NC 组比较, ^a $P<0.05$

图 4 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)验证腺病毒转染小鼠心肌 TERT 相对表达量

2.2.2 TERT 对 DIC 小鼠心肌纤维化及心功能的影响(图 5~6;表 4):与 Sham 组比较, DOX 组和 DOX+NC 组小鼠心肌纤维化面积显著增加(均 $P<0.05$);与 DOX 组和 DOX+NC 组比较, DOX+TERT 组小鼠心肌纤维化面积显著减少(均 $P<0.05$);而 DOX 组与 DOX+NC 组小鼠心肌纤维化面积差异无统计学意义($P>0.05$)。DOX 处理 7 d 后, DOX+TERT 组小鼠 LVEF、FS 较 DOX 组和 DOX+NC 组显著升高(均 $P<0.05$)。

3 讨论 本研究采用 DOX 诱导 H9c2 细胞急性损伤模型,腺病毒过表达 TERT 转染经 DOX 处理的 H9c2 细胞,分析 TERT 在其中的保护作用,结果显示,上调 TERT 表达可抑制 DOX 诱导的损伤心肌细胞线粒体过度自噬、细胞凋亡,从而减轻心肌细胞损伤;

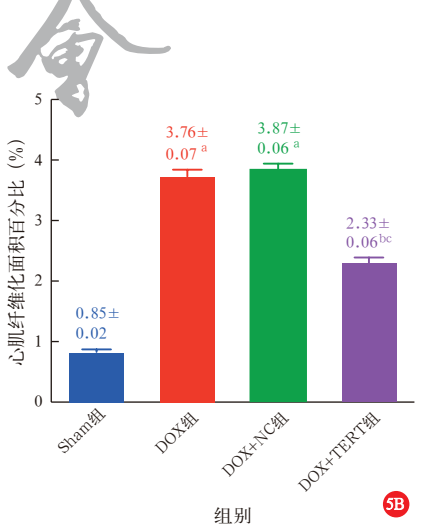
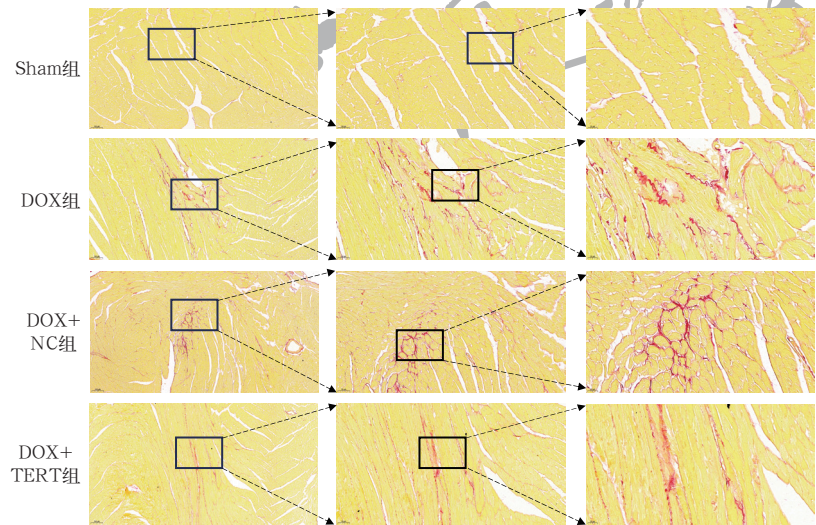
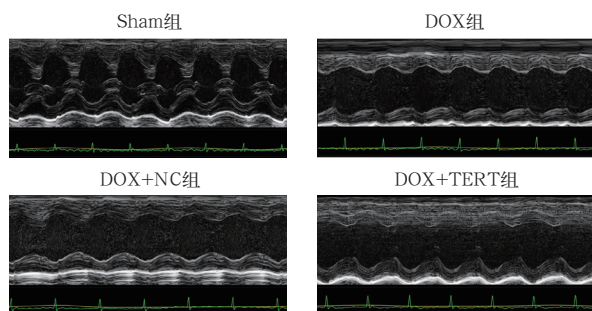


图 5 各组小鼠心肌纤维化改变 A 为光镜下观察,可见假手术组(Sham 组)红色胶原纤维部分浅,面积小;阿霉素(DOX)组红色胶原纤维部分深,面积大;心肌定点注射空载腺病毒后 DOX 处理组(DOX+NC 组)红色胶原纤维部分深,面积大;心肌定点注射端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒后 DOX 处理组(DOX+TERT 组)红色胶原纤维部分变浅,面积变小。天狼猩红染色 低倍放大。B 为心肌纤维化面积定量比较;与 Sham 组比较, ^a $P<0.05$;与 DOX 组比较, ^b $P<0.05$;与 DOX+NC 组比较, ^c $P<0.05$



注: Sham 组为假手术组, DOX 组为阿霉素(DOX)处理组, DOX+NC 组为心肌定点注射空载腺病毒后 DOX 处理组, DOX+TERT 组为心肌定点注射端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒后 DOX 处理组

图 6 各组小鼠超声心动图表现

表 4 各组小鼠心功能指标 LVEF 及 FS 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVEF(%)	FS(%)
Sham 组	10	76.60 ± 1.12	44.20 ± 0.73
DOX 组	10	54.60 ± 1.57 ^a	30.60 ± 1.10 ^a
DOX+NC 组	10	53.40 ± 2.18 ^a	30.00 ± 0.71 ^a
DOX+TERT 组	10	67.00 ± 1.14 ^{bc}	38.60 ± 0.51 ^{bc}

注: Sham 组为假手术组, DOX 组为阿霉素(DOX)处理组, DOX+NC 组为心肌定点注射空载腺病毒后 DOX 处理组, DOX+TERT 组为心肌定点注射端粒酶逆转录酶(TERT)过表达腺病毒后 DOX 处理组; LVEF 为左室射血分数, FS 为短轴缩短率; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 DOX 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 DOX+NC 组比较, ^c $P < 0.05$

此外, 构建 DOX 诱导的急性心肌毒性损伤小鼠模型, 经心肌定点注射 TERT 过表达腺病毒, 结果显示, 上调 TERT 表达可抑制模型小鼠心肌纤维化, 进而减轻 DOX 导致的心脏毒性, 为心肌损伤提供了新的治疗方法与思路。

TERT 过表达可延缓细胞衰老, 延长细胞寿命。TERT 作为端粒酶的重要组成部分, 协助端粒酶在染色体末端添加新的端粒序列, 因此 TERT 基因表达在维持细胞端粒长度和高增殖特性方面起着重要作用^[15]。既往研究表明, 表达较低水平 TERT 的成纤维细胞表现出端粒缩短, 从而使成纤维细胞的寿命缩短^[16]; 同样, TERT 突变体的构建可延长端粒和原代成纤维细胞的寿命^[17]。TERT 除了可以延缓细胞衰老之外, 还具有保护细胞免受应激诱导的细胞凋亡和坏死的功能^[18]。有研究表明, 在心脏特异性 TERT 表达小鼠中, 心肌梗死后, 与正常小鼠相比, TERT 过表达小鼠显示出更好的存活率、心脏收缩能力及更小的梗死疤痕^[19]; 另有研究表明, 上调 TERT 可减少急性缺氧导致的心脏损伤, 增加大鼠的缺氧适应性^[20]。由此可知, TERT 不仅可以延长细胞寿命, 还可以在心肌梗死或缺氧损伤中改善心室功能^[21], 减少心肌损伤, 从而起到保护心脏的作用。

DOX 作为一种抗多肿瘤化疗药物, 其主要危害为心血管毒性, 如何减轻 DOX 导致的心肌损伤成为一项难题。本课题组前期一项基础研究表明, 沉默 TERT 可削弱生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, GDF15) 外泌体对过氧化氢损伤 H9c2 细胞的保护作用^[22], 在此基础上, 我们推测 TERT 对经 DOX 损伤的心肌同样具有减少损伤、改善心脏功能的作用。TERT 因具有一定的促细胞增殖能力^[23], 其研究与肿瘤的发生发展密切相关^[24]。有研究显示, TERT 启动子的过度激活可引起肝癌的发生^[25], 这意味着控制 TERT 水平是减轻 DOX 导致心肌损伤的关键步骤。

TERT 在上述心血管疾病中具有保护作用, 其分子机制与线粒体的稳态密切相关^[26], 有研究显示, 线粒体是 DOX 的主要靶标^[23], DOX 诱导的心肌毒性损伤部分是由线粒体碎片化增加和溶酶体加速线粒体降解介导的^[27]。近期一项研究表明, DOX 下调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4), 使线粒体中的 DOX-Fe²⁺ 复合物脂质过氧化物堆积, 导致线粒体死亡, 进而影响心肌功能^[6]; 另一项研究表明, 通过抑制线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成并调节脂质代谢, 可缓解 DOX 诱导的心脏毒性^[28]。由此可见, 改善线粒体功能障碍、减少氧化应激成为治疗 DOX 诱导的心肌毒性损伤的主要手段。目前已被证明, 在线粒体内, TERT 可有效减少 ROS 产生, 与线粒体 DNA 结合, 从而增加线粒体膜电位并与线粒体传递核糖核酸 (transfer RNA, tRNA) 相互作用^[29]。本研究结果表明, DOX 可引起 H9c2 心肌细胞自噬和凋亡增强; 此外, DOX 还可导致小鼠心肌纤维化增加, 与之前的研究结果相似。关于 TERT 在 DOX 诱导的心肌毒性损伤中对线粒体影响的相关研究并不明确, 而本研究证实, 过表达 TERT 可通过减少 DOX 引起的心肌细胞自噬及凋亡, 从而减缓 DOX 导致的脏毒性。但关于 TERT 如何调控线粒体功能还需进一步探究, 根据现有研究显示, 腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路在调节线粒体稳态过程中起关键作用, TERT 有可能参与 AMPK 通路从而对线粒体稳态产生积极的影响^[30]。

综上所述, 本研究表明, 上调 TERT 表达可抑制 DOX 引起的心肌细胞自噬及凋亡, 减轻 DOX 诱导小鼠的心肌纤维化, 改善 DOX 小鼠心功能, 进而缓

解 DOX 所致心脏毒性。因此上调 TERT 的表达可能是缓解 DOX 应用所致心脏毒性的潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, et al. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. Life Sci, 2018, 200: 26–30. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
- [2] Gorini S, De Angelis A, Berrino L, et al. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7582730. DOI: 10.1155/2018/7582730. Erratum in: Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9601435. DOI: 10.1155/2019/9601435.
- [3] Lee PJH, Rudenko D, Kuliszewski MA, et al. Survivin gene therapy attenuates left ventricular systolic dysfunction in doxorubicin cardiomyopathy by reducing apoptosis and fibrosis [J]. Cardiovasc Res, 2014, 101 (3): 423–433. DOI: 10.1093/cvr/cvu001.
- [4] Liu YH, Zhang WF, Hu TT, et al. A doxorubicin-induced murine model of dilated cardiomyopathy *in vivo* [J]. J Vis Exp, 2020 (159): e61158. DOI: 10.3791/61158.
- [5] Renu K, V G A, P B TP, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy: an update [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 818: 241–253. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043.
- [6] Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity [J]. JCI Insight, 2020, 5 (9): e132747. DOI: 10.1172/jci.insight.132747. Erratum in: JCI Insight, 2023, 8 (6): e169756. DOI: 10.1172/jci.insight.169756.
- [7] Dhingra R, Rabinovich-Nikitin I, Rothman S, et al. Proteasomal degradation of TRAF2 mediates mitochondrial dysfunction in doxorubicin-cardiomyopathy [J]. Circulation, 2022, 146 (12): 934–954. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058411. Erratum in: Circulation, 2022, 146 (15): e224. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001108.
- [8] Shi SX, Chen Y, Luo ZJ, et al. Role of oxidative stress and inflammation-related signaling pathways in doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. Cell Commun Signal, 2023, 21 (1): 61. DOI: 10.1186/s12964-023-01077-5.
- [9] Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase [J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 493–517. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412.
- [10] Zurek M, Altschmied J, Kohlgrüber S, et al. Role of telomerase in the cardiovascular system [J]. Genes (Basel), 2016, 7 (6): 29. DOI: 10.3390/genes7060029.
- [11] Haendeler J, Dröse S, Büchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29 (6): 929–935. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.185546.
- [12] Rosen J, Jakobs P, Ale-Agha N, et al. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase: impact on redox homeostasis [J]. Redox Biol, 2020, 34: 101543. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101543.
- [13] Ale-Agha N, Dyballa-Rukes N, Jakob S, et al. Cellular functions of the dual-targeted catalytic subunit of telomerase, telomerase reverse transcriptase: potential role in senescence and aging [J]. Exp Gerontol, 2014, 56: 189–193. DOI: 10.1016/j.exger.2014.02.011.
- [14] Nalobin D, Alipkina S, Gaidamaka A, et al. Telomeres and telomerase in heart ontogenesis, aging and regeneration [J]. Cells, 2020, 9 (2): 503. DOI: 10.3390/cells9020503.
- [15] Brazvan B, Ebrahimi-Kalan A, Velaie K, et al. Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 9–17. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.073.
- [16] Cui W, Aslam S, Fletcher J, et al. Stabilization of telomere length and karyotypic stability are directly correlated with the level of hTERT gene expression in primary fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (41): 38531–38539. DOI: 10.1074/jbc.M205981200.
- [17] Kim M, Xu LF, Blackburn EH. Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties [J]. Exp Cell Res, 2003, 288 (2): 277–287. DOI: 10.1016/s0014-4827(03)00217-9.
- [18] Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (41): 38540–38549. DOI: 10.1074/jbc.M202671200.
- [19] Bär C, Bernardes de Jesus B, Serrano R, et al. Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5863. DOI: 10.1038/ncomms6863.
- [20] Wang YP, Zhao Z, Zhu ZY, et al. Telomere elongation protects heart and lung tissue cells from fatal damage in rats exposed to severe hypoxia [J]. J Physiol Anthropol, 2018, 37 (1): 5. DOI: 10.1186/s40101-018-0165-y.
- [21] Ale-Agha N, Jakobs P, Goy C, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase protects from myocardial ischemia/reperfusion injury by improving complex I composition and function [J]. Circulation, 2021, 144 (23): 1876–1890. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051923.
- [22] Zou AL, Xiao TT, Chi BY, et al. Engineered exosomes with growth differentiation factor-15 overexpression enhance cardiac repair after myocardial injury [J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 3295–3314. DOI: 10.2147/IJN.S454277.
- [23] 赵梦坡, 八晓敏, 罗胜军, 等. 端粒酶逆转录酶在建立永生化细胞中的应用 [J]. 动物医学进展, 2023, 44 (5): 102–107. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2023.05.019.
- [24] 林勇, 陈伟忠, 谢渭芬, 等. 端粒酶逆转录酶研究现状 [J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28 (3): 246–248. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2001.03.034.
- [25] 栾芳, 张炳昌, 王勇, 等. preS2 荧光融合蛋白的表达及其对端粒酶逆转录酶启动子的激活作用 [J]. 实用检验医师杂志, 2014, 3 (3): 137–141. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2011.03.003.
- [26] Wu BB, Leung KT, Poon ENY. Mitochondrial-targeted therapy for doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (3): 1912. DOI: 10.3390/ijms23031912.
- [27] Catanzaro MP, Weiner A, Kaminaris A, et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy [J]. FASEB J, 2019, 33 (10): 11096–11108. DOI: 10.1096/fj.201802663R.
- [28] Tai TP, Chen XY, Jia GH, et al. WGX50 mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of mitochondrial ROS and ferroptosis [J]. J Transl Med, 2023, 21 (1): 823. DOI: 10.1186/s12967-023-04715-1.
- [29] Saretzki G. Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20 (41): 6386–6403. DOI: 10.2174/1381612820666140630095606.
- [30] 阮培森, 郑耀, 董卓亚, 等. AMPK 信号通道调节自噬和线粒体稳态的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (4): 425–429. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230302-00132.

(收稿日期: 2024-07-11)

(责任编辑: 保健媛 张耘菲)

关于经过广告审批后的广告中存在不规范医学名词术语未予更改的声明

依照广告审批的相关规定,按照广告厂家的要求,本刊刊登的伊力佳、血必净及新活素广告图片和内容均按照广告审查批准文件的原件刊出,故广告内容中“适应症”“禁忌症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”“禁忌证”,“心输出量”未修改为“心排量”,“室速”未修改为“室性心动过速”,“其它”未修改为“其他”,时间单位仍用汉字表示,剂量单位“ml”未修改为“mL”,“kcal”未修改为“kJ”,“mmHg”未修改为“kPa”。特此声明!