

张书萍,莫显刚,张诗悦,等. 达格列净对动脉粥样硬化的影响以及与钠氢交换体 1 相关机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 10-18.

Zhang SP, Mo XG, Zhang SY, et al. Effect of dapagliflozin on atherosclerosis and the mechanism related to sodium hydrogen exchanger 1 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 10-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.002

达格列净对动脉粥样硬化的影响以及与钠氢交换体 1 相关机制

张书萍¹,莫显刚^{1,2*},张诗悦¹,陈举海¹,王 兰²,杨 卉²,刘大男³

(1.贵州医科大学,贵阳 550004;2.贵州医科大学附属医院综合病房,贵阳 550004;
3.贵州医科大学附属医院心血管内科,贵阳 550004)

【摘要】 目的 探讨达格列净对载脂蛋白 E 敲除 ($ApoE^{-/-}$) 小鼠动脉粥样硬化 (AS) 形成的影响以及与钠氢交换体 1 (NHE1) 相关的机制。**方法** 6 周龄雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 24 只,随机分为普通饮食组、高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组 (10 mg/(kg·d)) 以及高脂饮食+格列美脲组 (0.5 mg/(kg·d))。8 周后,HE 染色检测小鼠主动脉的 AS 斑块情况,定量 PCR 及免疫印迹法检测主动脉葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT2) 表达,免疫组化法检测主动脉 NHE1 表达。进而给予达格列净 (10 μ mol/L)、阿米洛利 (20 μ mol/L) 以及脂多糖 (100 ng/mL) 干预小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞处理 24 h,免疫印迹法检测 NHE1 蛋白表达以及 SNARF-1/AM 荧光法检测 NH_4Cl 诱导 pH 值回复率 (NHE1 活性);酶联免疫吸附法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 分泌情况。**结果** 高脂饮食+达格列净组主动脉的 AS 斑块面积显著低于高脂饮食组 ($P<0.05$);各组主动脉斑块内均极低表达 SGLT2 ($P<0.05$);高脂饮食+达格列净组内斑块 NHE1 表达较高脂饮食组下降 ($P<0.05$)。LPS+达格列净组 RAW.7 细胞的 NHE1 蛋白水平明显低于 LPS 组 ($P<0.05$);SNARF-1 荧光法提示达格列净处理后细胞内 pH 值降低 ($P<0.05$),细胞 NHE1 活性显著降低 ($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+达格列净组细胞上清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著减少 ($P<0.05$),IL-10 含量显著增加 ($P<0.05$)。**结论** 达格列净通过抑制 NHE1 表达及其活性抑制 AS 斑块发展及细胞因子释放。

【关键词】 动脉粥样硬化;钠-葡萄糖协同转运蛋白 2;达格列净;钠氢交换体 1;脂多糖; $ApoE^{-/-}$ 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0010-09

Effect of dapagliflozin on atherosclerosis and the mechanism related to sodium hydrogen exchanger 1

ZHANG Shuping¹, MO Xiangang^{1,2*}, ZHANG Shiyue¹, CHEN Juhai¹, WANG Lan², YANG Hui², LIU Danan³

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China. 2. Comprehensive Ward, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004. 3. Department of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dapagliflozin on the formation of atherosclerosis (AS) in apolipoprotein E knockout ($ApoE^{-/-}$) mice and the mechanism associated with sodium-hydrogen exchanger 1 (NHE1). **Methods** 24 6-week-old male $ApoE^{-/-}$ mice were randomly divided into ordinary diet group, high-fat diet group, high-fat diet+dapagliflozin group (10 mg/(kg·d) gavage) and high-fat diet+glimepiride group (0.5 mg/(kg·d) gavage). AS plaques in mouse aorta was observed by using HE staining after 8 weeks. The expression of sodium-glucose cotransporter 2

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160097,31660288)。

【作者简介】 张书萍 (1995—),女,硕士,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:1529834331@qq.com

【通信作者】 莫显刚 (1975—),男,教授,博士,博士生导师,研究方向:老年心血管疾病临床与基础研究。E-mail:moxiangang123@126.com

(SGLT2) in the aorta was measured by quantitative PCR and Western blot. NHE1 expression was detected by immunohistochemistry. Then, mouse macrophage cell line RAW 264.7 cells were treated with dapagliflozin (10 $\mu\text{mol/L}$), amiloride (20 $\mu\text{mol/L}$) and lipopolysaccharide (100 ng/mL) for 24 h. The expression of NHE1 protein was analyzed by Western blot. The recovery rate (NHE1 activity) from the NH_4Cl -induced acid load was assayed by SNARF-1/AM fluorescence method. $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-10 secretion were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results The AS plaque area in the aorta of the high-fat diet+dapagliflozin group was significantly lower than that of the high-fat diet group ($P<0.05$). The expression of SGLT2 in the aortic plaques of each group was significantly decreased ($P<0.05$). The plaque NHE1 expression in the high-fat diet+dapagliflozin group was lower than that in the high-fat diet group ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the LPS+dapagliflozin group had a significantly lower NHE1 protein level in the RAW 264.7 cells ($P<0.05$). SNARF-1 fluorescence assay indicated dapagliflozin inhibited NHE1 activity with decreasing intracellular pH ($P<0.05$). ELISA showed that the contents of $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β and IL-6 in the cell supernatant were significantly decreased, whereas the content of IL-10 was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** Dapagliflozin inhibits AS plaque development and cytokine release by inhibiting NHE1 expression and its activity.

【Keywords】 atherosclerosis; sodium-glucose cotransporter 2; dapagliflozin; sodium hydrogen exchanger 1; lipopolysaccharide; *ApoE*^{-/-} mice

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是冠心病、脑卒中及外周动脉闭塞等血管疾病的病理基础。AS 斑块内炎症细胞代谢活跃,糖酵解增强,致斑块内 pH 值降低,后者常导致斑块不稳定及心血管事件发生。钠氢交换体 1 (sodium-hydrogen exchanger 1, NHE1) 是调节细胞及组织 pH 值最重要的分子之一^[1],且 NHE1 决定 AS 病灶的酸化状态并促进 AS 形成^[2]。钠葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) 抑制剂如达格列净、恩格列净等主要通过抑制肾小管上皮 SGLT2 而减少葡萄糖重吸收发挥降糖作用^[3],此外, SGLT2 抑制剂可改善心血管临床结局及减低死亡率^[4],而格列美脲等降糖药物却无此功能。SGLT2 抑制剂具有增加糖尿病 AS 斑块稳定性^[5],降低系统或斑块炎症,减少肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活及氧化应激,改善内皮功能等作用^[6],这一系列功能提示 SGLT2 抑制剂具有抗 AS 效应。另一方面, SGLT2 抑制剂恩格列净能降低心肌细胞 NHE1 80% 活性^[7]; SGLT2 抑制剂能减轻 NHE1 野生型小鼠心肌细胞凋亡而抗心衰,而在 NHE1 敲除小鼠中 SGLT2 抑制剂效应消失^[8]。综上, NHE1 促进 AS 斑块形成, SGLT2 抑制剂具有抗 AS 效应并能抑制 NHE1 活性,推测 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 活性而抗 AS,但类似报道鲜见。本研究采用 *ApoE*^{-/-} 小鼠为研究对象,高脂饮食喂养,制作动脉粥样硬化炎症模型^[9],拟观察 SGLT2 抑制剂达格列净对高脂饮食喂养 *ApoE*^{-/-} 小鼠 AS 斑块形成及 RAW264.7 巨噬细胞的影响,进而探讨是否与 NHE1 的相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 6 周龄 *ApoE*^{-/-} 小鼠 24 只,基因背景为 C57BL/6 小鼠,小鼠体重均为 (20 $\pm$ 2) g,购自北京维通利华公司 [SCXK (京) 2019-0010],饲养于贵州医科大学动物实验室 [SYXK (黔) 2018-0001],动物实验通过贵州医科大学动物福利伦理委员会批准 (2101044)。实验研究过程中遵循替代、减少、优化的 3R 原则。

1.1.2 细胞

小鼠单核细胞细胞系 RAW264.7 细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗小鼠 NHE1 抗体 (英国 Abcam 公司, ab230449); 兔抗小鼠 SGLT2 抗体 (英国 Abcam 公司, ab37296); GAPDH 抗体 (美国 GeneTex 公司, GTX100118); HRP 标记的山羊抗兔二抗 (英国 abcam 公司, ab6721); ECL 化学发光试剂盒 (德国默克 Millipore 公司, 1925901); 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司, B5M54371); EDTA 缓冲液 (武汉塞维尔, G1206); 胰酶 (以色列 BI 公司, 1552692); 青链霉素混合液 (以色列 BI 公司, 1823547); DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司, 8120425); 达格列净 (美国 Selleck 公司, S154806); 格列美脲 (美国 Selleck 公司, S134401); 阿米洛利 (美国 MCE 公司, 2016-88-8); 尼日利亚菌素 (nigericin) (美国 Selleck 公司, S665302); SNARF-1/AM (美国 Selleck 公司,

S897401);高脂饲料(北京 博爱港公司,1145NA);ELISA 试剂盒均由北京四正柏公司提供:TNF- α (20210930)、IL-1 β (20211024)、IL-6 (2021116)、IL-10 (20211123)。TD-4279A 血糖测试仪及血糖试纸(杭州 泰博科技);RM2016 病理切片机(上海 徕卡仪器有限公司);Nikon Eclipse CI 正置光学显微镜(日本 尼康);激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物喂养、分组及观察

SPF 级雄性 6 周龄 *ApoE*^{-/-} 小鼠 24 只,给予喂养普通饲料适应性喂养 1 周。1 周后,随机分为普通饮食组(ordinary diet group)、高脂饮食组(high-fat diet group)、达格列净组(high-fat diet + dapagliflozin group)、格列美脲组(high-fat diet + glimepiride group),每组 6 只。普通饮食组予以普通饲料饲养,其余各组均高脂饲料(配方:1%胆固醇,0.2%胆酸钠,10%猪油,10%蛋黄粉,78.8%基础饲料)喂养,同时达格列净组予以 10 mg/(kg·d)生理盐水溶解灌胃,格列美脲组予以 0.5 mg/(kg·d)生理盐水溶解灌胃,普通饮食组及高脂饮食组分别等量生理盐水灌胃。高脂饲料阴凉干燥避光保存,每天每只 5 g 投食。饲养室环境通风良好,温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 $\pm$ 10)%,12 h/12 h 交替照明和避光。自由饮水,不同喂养及药物干预后,禁食 8 h 尾静脉取血检测空腹血糖,连续喂养 8 周后,戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉麻醉后处死,取小鼠主动脉、肾皮质按照后续实验操作进行。

1.3.2 HE 染色检测主动脉斑块

各组小鼠采用多聚甲醛从左心室灌流后,取出主动脉,4 $^{\circ}$ C PBS 中清洗 3 次,4%多聚甲醛固定,制备石蜡切片,HE 染色,利用光学显微镜进行观察并拍照,进行图片数据分析,计算校正斑块面积(斑块面积/血管截面积)%。

1.3.3 免疫组化检测斑块 NHE1

各组病理切片在 1 mmol/L EDTA 缓冲液(pH=9.0)高压修复 3 min(气压阀冒大气开始计时),抗原修复石蜡切片完成后,3% BSA 室温封闭 30 min,加入 3% BSA 配制的 NHE1 一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗后,加入二抗,室温孵育 50 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水封片,观察并拍照,用图像分析软件 Image J Pro Plus 6.0 进行分析。

1.3.4 定量 PCR 检测各组 SGLT2 mRNA 表达

以高表达 SGLT2 的正常小鼠肾皮质为阳性对

照($n=6$),根据说明提取各组主动脉总 RNA,按照逆转录及 PCR 试剂盒操作,分别取每组 2 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA,按照 10 μ L 反应体系进行扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 min,60 $^{\circ}$ C 30 s,后两步 40 个循环。引物设计:小鼠 SGLT2 基因 mRNA (NM-133254.5) 及 GAPDH 基因 (NM-008084.3) 为模板自行设计引物,SGLT2 基因:正向 5'-CATTGGTGTGCTTGTGGT-3',反向 5'-CGAGACAATGGTAAGCCCCA-3';GAPDH 基因:正向 5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3',反向 5'-TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC-3',上海生工公司合成。所有样本的 Ct 值均由荧光定量 PCR 仪读取,得到样本中各基因的 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.3.5 免疫印迹法检测 SGLT2 表达

为了显示各组 SGLT2 表达情况,以高表达 SGLT2 的正常小鼠肾皮质组织作为阳性对照($n=6$),称取适量肾皮质、高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组及高脂饮食+格列美脲组主动脉组织,选择从左心室发出后向下延伸约 2 cm 的主动脉,选择的肾皮质大约与此相同重量。液氮捣碎,提取蛋白质,以蛋白浓度 5~10 μ g/ μ L 为标准,以每组总蛋白质量 30 μ g 计算出各组上样体积,经 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,一抗(SGLT2 1:1000)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温封闭 2 h,ECL 显色,图像分析软件 Image J 进行灰度值分析。

1.3.6 细胞培养、分组及处理

RAW264.7 细胞培养于含高糖 DMEM 培养基(Hyclone),将培养瓶内生长至约 80%的细胞胰酶消化离心,细胞沉淀浓重悬成每毫升 1.5×10^5 个的细胞悬液,每孔 2 mL 细胞悬液加入 6 孔板中,待细胞生长至汇合率>80%,给予达格列净(终浓度:10 μ mol/L)、阿米洛利(终浓度:20 μ mol/L)以及脂多糖(LPS,终浓度:100 ng/mL)分别或同时干预 24 h,分为空白对照组(Blank control group)、脂多糖组(LPS group)、脂多糖+达格列净组(LPS + dapagliflozin group)、脂多糖+阿米洛利组(LPS + amiloride group)、脂多糖+达格列净+阿米洛利组(LPS+dapagliflozin+amiloride group),共 5 组。

1.3.7 检测各组细胞 NHE1 的表达情况

不同药物干预六孔板内细胞 24 h 后,提取蛋白,NHE1 一抗稀释比例(1:1000),其余方法同动物部分 Western blot 操作。

1.3.8 检测 pH 值回复率(NHE1 活性)

采用荧光比率法检测细胞内 pH^[10],将生长有融合度约 80% 的 RAW264.7 细胞的盖玻片加入 SNARF-1/AM 溶液,37℃ 孵育 30 min,洗涤后,激光共聚焦显微镜下,以激发波长为 530 nm,检测发射波长为 580 nm 和 630 nm 荧光强度,计算其比率。采取 NH₄Cl 酸负荷法检测细胞内 pH 值回复率(NHE1 活性),采用 30 mmol/L NH₄Cl 溶液浸浴 3 min,无钠溶液漂洗 5 min 维持细胞内短暂酸中毒,继而加或不加达格列净或阿米洛利的含钠溶液漂洗使 Na⁺/H⁺ 交换加速,即促进 NHE1 活性增加。不同 pH 高钾溶液、SNARF-1/AM 负载及 nigericin 孵育 30 min,以 pH 值和荧光强度比制作胞内 pH 标准曲线。

1.3.9 检测各组 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 表达

酶联免疫吸附法检测各组 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 表达,收集各组细胞培养上清,依据 ELISA 试剂盒操作说明,测定各组 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 的分泌,自动酶标仪在 450 nm 处读取数值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,两组间差异比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 T_2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

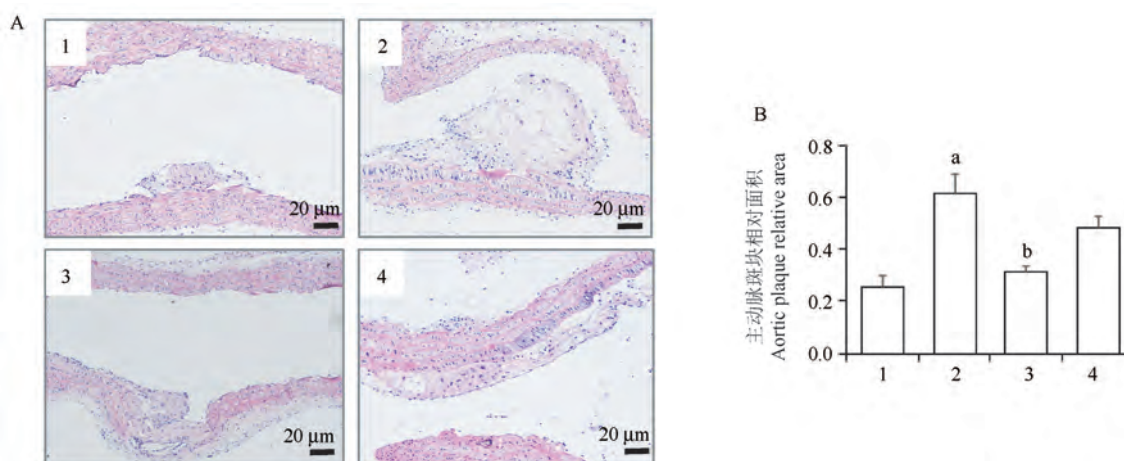
2 结果

2.1 达格列净减少非糖尿病 AS 形成

为排除血糖降低对 AS 形成的影响,以高脂饮食+格列美脲为对照,检测高脂饮食+达格列净干预对高脂饮食喂养 *ApoE*^{-/-} 小鼠 AS 形成的影响。结果提示(图 1A、1B)与普通饮食组相比,高脂饮食组斑块显著增加($P < 0.05$);高脂饮食+达格列净组 AS 斑块面积低于高脂饮食组及高脂饮食+格列美脲组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),而高脂饮食+格列美脲组较高脂饮食组差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,喂养过程中,药物处理后监测血糖(如表 1 所示),高脂饮食组血糖较普通饮食组升高,但差异无明显统计学意义($P > 0.05$),高脂饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组与高脂饮食组相比均可轻微减低血糖趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示相对于高脂饮食+格列美脲组,高脂饮食+达格列净抑制斑块形成,还是血糖观察结果均提示达格列净减少非糖尿病 AS 形成。

2.2 AS 斑块 SGLT2 蛋白及 mRNA 极低表达

为明确 SGLT2 抑制剂是否影响 AS 斑块 SGLT2 表达,采用普通饮食组肾皮质作为阳性对照,检测 SGLT2 在主动脉斑块的蛋白及 mRNA 表达。结果显示,与肾皮质阳性对照组比较,高脂饮食组、高脂



注:A:主动脉 HE 染色;B:主动脉的斑块面积分析。1:普通饮食组;2:高脂饮食组;3:高脂饮食+达格列净组;4:高脂饮食+格列美脲组。与普通饮食组相比,^a $P < 0.05$;与高脂饮食组和高脂饮食+格列美脲组相比,^b $P < 0.05$ 。

图 1 达格列净对 *ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉中动脉粥样硬化斑块的影响($n = 6$)

Note. A, HE staining of aorta. B, Plaque area analysis of the aorta. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, High-fat diet+dapagliflozin group. 4, High-fat diet+glimepiride group. Compared with ordinary diet group, ^a $P < 0.05$. Compared with high-fat diet group and high-fat diet+glimepiride group, ^b $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of dapagliflozin on atherosclerotic plaques in the aorta of *ApoE*^{-/-} mice

饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组主动脉斑块中 SGLT2 蛋白及 mRNA 表达均非常低 ($P<0.05$) (图 2A~2C), 且高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组 3 组间 SGLT2 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。提示主动脉 AS 内极低表达 SGLT2, 且 SGLT2 抑制剂达格列净亦未影响 SGLT2 表达, SGLT2 抑制剂可能并非通过 SGLT2 靶点抗 AS 作用。

2.3 达格列净抑制 AS 斑块 NHE1 蛋白表达

因 NHE1 可促进 AS 斑块形成, 检测 SGLT2 抑制剂达格列净是否改变 AS 斑块 NHE1 表达, 结果显示, 与普通饮食组相比, 高脂饮食组斑块中 NHE1 表达有上升趋势, 但无统计学意义 ($P>0.05$)。而在高脂饮食喂养基础上, SGLT2 抑制剂达格列净处理后斑块内 NHE1 相对于高脂饮食组表达下调 ($P<0.05$), 降糖药格列美脲组斑块内 NHE1 虽较高脂饮食组有所下降, 但差异无统计学意义 (图 3A、3B)。提示 NHE1 蛋白表达减低可能在 SGLT2 抑制剂达格列净抗 AS 中发挥作用。

2.4 达格列净抑制 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达及活性

2.4.1 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达

为验证动物实验结果, 以脂多糖诱导 NHE1 蛋白表达, 给予 SGLT2 抑制剂达格列净或 NHE1 抑制剂阿米洛利干预, 检测 RAW264.7 细胞 NHE1 表达。结果如图 4A、4B 显示, 与空白对照组相比, 脂多糖组的 NHE1 蛋白水平上调 ($P<0.05$), 而达格列净以及阿米洛利均可逆转脂多糖诱导的 NHE1 蛋白水平升高 ($P<0.05$), 然而, 阿米洛利+达格列净联合干预下, 与阿米洛利或达格列净单独干预相比, NHE1 蛋白水平无明显变化 ($P>0.05$)。提示达格列净或许通过 NHE1 受体作用, 进而影响 NHE1 蛋白水平。

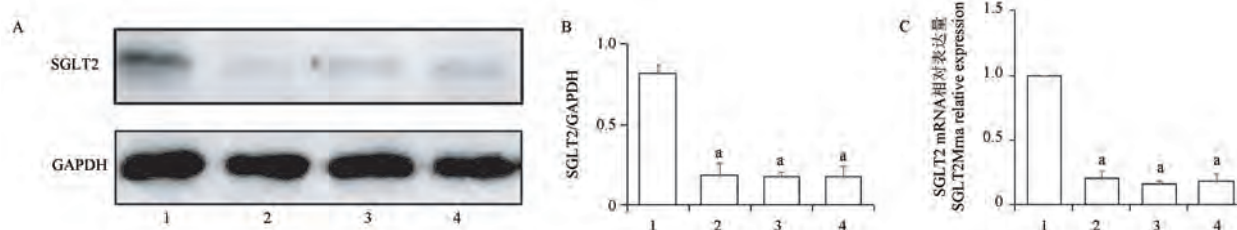
2.4.2 RAW264.7 细胞 NHE1 活性

NHE1 功能方面, 使用 SNARF-1/AM 双荧光强度比率法检测 SGLT2 抑制剂达格列净对 RAW264.7 细胞静息 pH 值, 结果显示相对于对照组, 在达格列净、阿米洛利单独或同时存在下, 细胞

表 1 6 各组小鼠血糖变化情况 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=6$)

Table 1 Changes in blood glucose of mice in each group

组别 Groups	0 周 0 weeks	2 周 2 weeks	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	8 周 8 weeks
普通饮食组 Ordinary diet group	5.28±0.97	5.08±1.01	4.97±0.80	5.15±0.99	5.17±0.91
高脂饮食组 High-fat diet group	5.33±0.60	5.10±0.88	5.28±0.71	5.35±0.63	5.30±0.86
高脂饮食+达格列净组 High-fat diet+dapagliflozin group	5.13±0.46	4.92±0.56	4.60±0.98	4.62±0.94	4.82±0.63
高脂饮食+格列美脲组 High-fat diet+glimepiride group	5.34±0.41	4.85±0.83	4.88±0.99	4.45±0.92	4.63±1.06
<i>F</i>	0.40	0.13	0.62	1.41	0.61
<i>P</i>	0.95	0.94	0.62	0.27	0.62



注: A: 免疫印迹法检测主动脉 SGLT2 蛋白表达量; B: 主动脉 SGLT2 蛋白表达量分析; C: qPCR 检测主动脉 SGLT2 mRNA 表达量。1: 普通饮食组; 2: 高脂饮食组; 3: 高脂饮食+达格列净组; 4: 高脂饮食+格列美脲组。与普通饮食组相比, ^a $P<0.05$ 。

图 2 主动脉组织中 SGLT2 表达情况 ($n=6$)

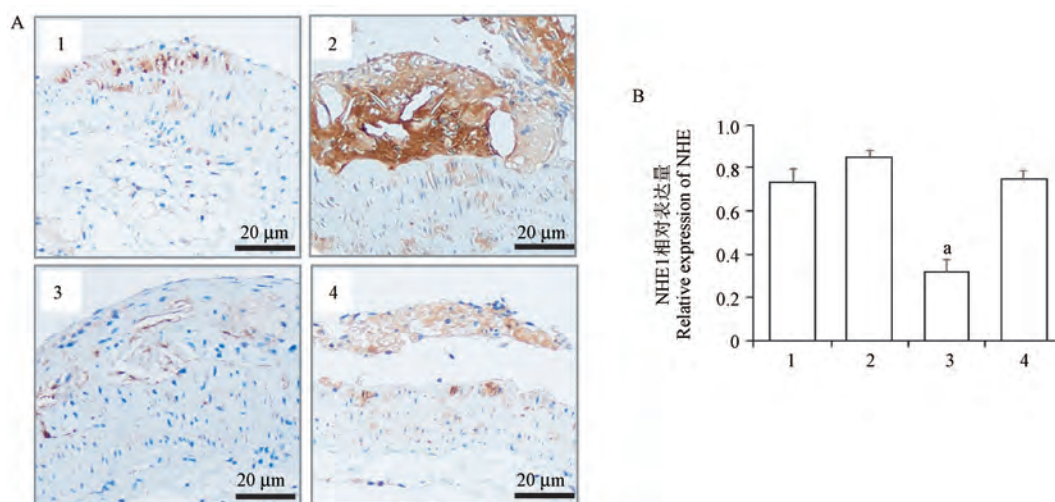
Note. A, Western blot detection of aortic SGLT2 protein expression. B, Analysis of aortic SGLT2 protein expression. C, qPCR detection of aortic SGLT2 mRNA expression. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, High-fat diet + dapagliflozin group. 4, High-fat diet + glimepiride group. Compared with ordinary diet group, ^a $P<0.05$.

Figure 2 SGLT2 expression in aortic tissue

静息状态下 pH 值降低,而 3 组静息 pH 值差异无统计学意义(图 5A)。进而检测 NH_4Cl 脉冲酸负荷后 pH 回复率即 NHE1 活性,结果显示与空白对照组相比,在达格列净、阿米洛利单独或同时存在下,细胞内 NHE1 活性均降低($P<0.05$);与达格列净组相比,细胞内 NHE1 活性无明显变化($P>0.05$)(图 5B)。达格列净干预,细胞内 pH 值及细胞内 NHE1 活性变化效应与达格列净与阿米洛利同时处理时效应相同,提示达格列净可能通过抑制 NHE1 活性改变细胞内 pH 值。

2.5 达格列净抑制 RAW264.7 细胞中炎症情况

与空白对照组比,LPS 组细胞上清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 含量显著增加($P<0.05$),IL-10 含量显著减少($P<0.05$);与 LPS 组比,LPS+达格列净组及 LPS+阿米洛利组可下调脂多糖诱导 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 含量($P<0.05$),上调 IL-10 含量($P<0.05$);与 LPS+阿米洛利组比较,LPS+阿米洛利+达格列净组 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 含量无统计学差异($P>0.05$)(表 2)。结果提示达格列净可能通过 NHE1 途径抑制 LPS 诱导炎症效应。

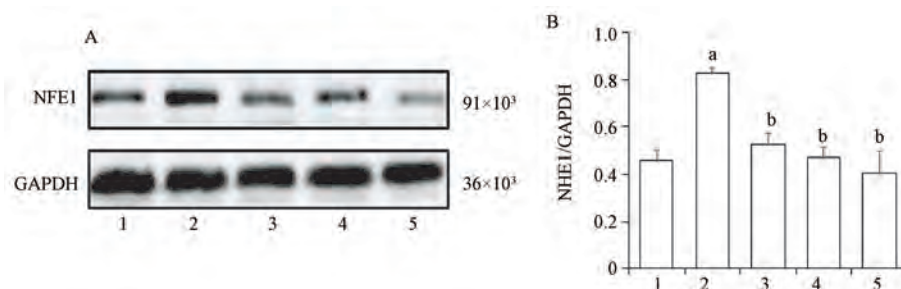


注:A:免疫组化检测主动脉斑块中 NHE1 表达量;B:主动脉斑块中 NHE1 表达量分析。1:普通饮食组;2:高脂饮食组;3:达格列净组;4:格列美脲组。与高脂饮食组相比,^a $P<0.05$ 。

图 3 达格列净对 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠主动脉斑块组织中 NHE1 表达的影响($n=6$)

Note. A, Immunohistochemical detection of NHE1 expression in aortic plaques. B, Analysis of NHE1 expression in aortic plaques. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, Dapagliflozin group. 4, Glimepiride group. Compared with high-fat diet group, ^a $P<0.05$.

Figure 3 Effect of dapagliflozin on NHE1 expression in aortic plaque tissue of $\text{ApoE}^{-/-}$ mice

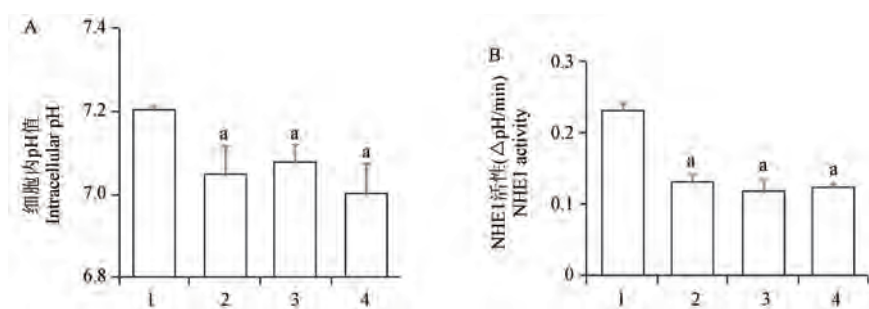


注:A:免疫印迹法检测 RAW264.7 细胞中 NHE1 表达量的变化;B:RAW264.7 细胞中 NHE1 表达量分析。1:空白对照组;2:LPS 组;3:LPS+达格列净组;4:LPS+阿米洛利组;5:LPS+达格列净+阿米洛利组。与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与 LPS 组比较,^b $P<0.05$ 。

图 4 达格列净对 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达的影响($n=3$)

Note. A, Western blot was used to detect the changes of NHE1 expression in RAW264.7 cells. B, Analysis of NHE1 expression in RAW264.7 cells. 1, Blank control group. 2, LPS group. 3, LPS+dapagliflozin group. 4, LPS+amiloride group. 5, LPS+dapagliflozin+amiloride group. Compared with Blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with LPS group, ^b $P<0.05$.

Figure 4 Effects of dapagliflozin on NHE1 protein expression in RAW264.7



注:A;SNARF-1/AM 荧光法检测 RAW264.7 细胞中 pH 变化分析;B;RAW264.7 细胞中 NHE1 活性变化分析。1:空白对照组;2:达格列净组;3:阿米洛利组;4:达格列净+阿米洛利组。与空白对照组比较, $^aP<0.05$ 。

图 5 达格列净对 RAW264.7 细胞 NHE1 活性的影响($n=3$)

Note. A, Analysis of pH changes in RAW264.7 cells detected by SNARF-1/AM fluorescence method. B, Analysis of changes in NHE1 activity in RAW264.7 cells. 1, Blank control group. 2, Dapagliflozin group. 3, Amiloride group. 4, Dapagliflozin+amiloride group. Compared with Blank control group, $^aP<0.05$.

Figure 5 Effect of dapagliflozin on NHE1 activity in RAW264.7 cells

表 2 各组细胞上清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 与 IL-10 含量比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=3$)

Table 2 Comparison of the contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the supernatant of cells in each group

组别 Groups	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
空白对照组 Blank control group	491.8 $\pm$ 33.57	71.58 $\pm$ 6.16	1458 $\pm$ 43.52	578.6 $\pm$ 56.99
LPS 组 LPS group	1010 $\pm$ 61.63 ^a	151.6 $\pm$ 7.39 ^a	2943 $\pm$ 59.27 ^a	253.1 $\pm$ 51.71 ^a
LPS+达格列净 LPS+dapagliflozin group	597.6 $\pm$ 43.06 ^b	123.9 $\pm$ 4.09 ^b	1458 $\pm$ 119.46 ^b	424.3 $\pm$ 43.22 ^b
LPS+阿米洛利组 LPS+amiloride group	575.8 $\pm$ 39.31 ^b	119.3 $\pm$ 9.16 ^b	1576 $\pm$ 39.31 ^b	425.7 $\pm$ 63.96 ^b
LPS+阿米洛利+达格列净组 LPS+amiloride+dapagliflozin group	545.7 $\pm$ 23.44 ^b	123.9 $\pm$ 6.82 ^b	1466 $\pm$ 89.28 ^b	395.6 $\pm$ 42.06 ^b
<i>F</i>	73.29	52.42	218.5	14.71
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003

注:与空白对照组比较, $^aP<0.05$;与 LPS 组比较, $^bP<0.05$

Note. Compared with Blank control group, $^aP<0.05$. Compared with LPS group, $^bP<0.05$.

3 讨论

AS 斑块形成以脂代谢异常、动脉壁炎症为重要特征的病理过程。SGLT2 抑制剂是目前唯一被临床试验证实具有降低心血管疾病风险的降糖药。本研究结果显示 SGLT2 抑制剂达格列净可减少 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 AS 斑块形成,进而表明 SGLT2 抑制剂达格列净不仅可抑制斑块 NHE1 表达,还可抑制细胞 NHE1 活性以及 LPS 诱导炎症因子释放,这些作用亦可被 NHE1 抑制剂阿米洛利所拮抗,提示抑制 NHE1 表达及活性,或许是 SGLT2 抑制剂抗 AS 的新机制。

3.1 达格列净减少非糖尿病 AS 形成

SGLT2 抑制剂是一种通过阻断肾近端小管中的 SGLT2 来达到抑制肾葡萄糖重吸收的新型降糖药。SGLT2 抑制剂具有心血管的保护作用,可以降低血

糖、改善心脏功能。此外, SGLT2 抑制剂还可抑制抗炎因子表达、改善免疫细胞表型以及机体酮体代谢等^[11]。研究表明 SGLT2 抑制剂能减少糖尿病小鼠 AS 斑块形成^[12-13],从而减弱 AS 的发生发展。本研究发现在 $ApoE^{-/-}$ 敲除小鼠中普通饮食喂养仍有少量斑块形成,而高脂饮食喂养会使斑块生长明显,且高脂饮食组的斑块增加可被 SGLT2 抑制剂达格列净抑制,非 SGLT2 抑制剂降糖药格列美脲组 AS 斑块却无明显减少,提示达格列净可减少非糖尿病 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 AS 斑块形成,降糖药格列美脲无抗 AS 效应。本研究采用经典 $ApoE^{-/-}$ 小鼠制作动脉粥样硬化模型,使用高脂饮食喂养可使其模型成功率高,而普通饮食组造成典型 AS 模型所需时间更长,在本研究时间范围内难以成功,故本研究采用了普通饮食组做空白对照,高脂饮食喂养制作模型。此

研究还发现各组小鼠血糖在达格列净及格列美脲不同降糖药物处理下,相对于高脂饮食组,小鼠血糖虽有下降趋势,但无明显统计学差异,可能有以下原因:(1)可能实验动物系非糖尿病模型;(2)检测血糖时采用的尾部静脉血较少;(3)测量血糖方法不精确;(4)实验小鼠样本量少,故本实验并不排除达格列净通过影响小鼠血糖进而对斑块的影响。有趣的是,两种降糖药均未明显降低小鼠正常血糖,本研究再次重现既往降糖药 SGLT2 抑制剂抑制非糖尿病小鼠 AS 斑块形成的结果^[14-16],这意味着有必要深入探讨 SGLT2 抑制剂减少 AS 形成的新机制,为选择 SGLT2 抑制剂治疗 AS 相关疾病提高新的研究策略^[11]。

3.2 AS 斑块 SGLT2 蛋白及 mRNA 极低表达

SGLT2 抑制剂在体内从两方面发挥作用:(1)主要通过肾小管上皮细胞 SGLT2 靶向作用;(2)脱靶效应^[17]。因本实验研究高脂饮食诱导 AS 模型情况下,主动脉内 SGLT2 的表达情况,故本研究仅列出了高脂饮食喂养情况下主动脉内 SGLT2 的表达情况,未罗列出普通饮食组斑块内的 SGLT2 表达情况,同高脂饮食组呈相同水平。本研究发现高脂饮食喂养下,与肾皮质高表达 NHE1 mRNA 及蛋白质相比,小鼠主动脉斑块 SGLT2 蛋白和 mRNA 表达非常低;无论是否达格列净干预,动脉斑块 SGLT2 表达无明显改变,提示 SGLT2 高度特异性表达于肾小管^[18],SGLT2 可能对斑块发生发展作用有限,而 SGLT2 抑制剂的脱靶效应可能发挥重要作用。研究发现 SGLT2 抑制剂恩格列净通过脱靶效应降低心肌细胞 NHE1 活性,抑制心肌细胞凋亡^[7-8]。

3.3 达格列净抑制 NHE1 蛋白表达

本研究在 AS 斑块及巨噬细胞上探讨了 SGLT2 抑制剂是否具有抑制 NHE1 的脱靶效应。我们发现高脂饮食组相较普通饮食组斑块内 NHE1 表达增加,且高脂饮食组内增加的 NHE1 可被 SGLT2 抑制剂达格列净药物所抑制,而格列美脲无此生理效应。达格列净可抑制斑块内 NHE1 表达。

本文从动物体内实验中探究了达格列净对 NHE1 的抑制作用,选择 RAW 巨噬细胞 LPS 诱导体外炎症模型,探究达格列净对体外细胞炎症模型下 NHE1 的作用,发现达格列净可降低细胞内 pH 以及抑制 NHE1 活性,且这些作用亦可被 NHE1 抑制剂阿米洛利所拮抗,提示 SGLT2 抑制剂能通过脱靶效应抑制 NHE1 活性。NHE1 广泛分布于各种细

胞的细胞膜^[19]。

3.4 达格列净抑制 RAW264.7 细胞中炎症情况

本研究通过检测各组药物作用后培养细胞中的炎症因子的变化,发现 LPS 诱导的促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的增加以及抗炎因子 IL-10 的减少炎症因子释放可被达格列净逆转。且达格列净的逆转效应与 NHE1 抑制剂单独或共同处理时效应相接近,提示达格列净的抗炎效应可能通过抑制 NHE1 产生。

NHE1 将胞外 Na⁺ 及胞内 H⁺ 进行交换,主要参与调节细胞内 pH 值。本研究以及我们之前研究均表明 AS 斑块中 NHE1 表达增高^[19],斑块炎症细胞浸润部位 pH 值降低。炎症或缺血区域常会出现 pH 值呈酸性,酸性环境又导致斑块环境内的巨噬细胞功能异常,促进 AS 斑块形成^[20]。即提示酸性环境与斑块发生发展可相互促进。新近有研究 Fluralozone 能通过抑制 NHE1 抗 AS^[21],亦提示了 NHE1 在 AS 中的关键作用。虽然本研究未检测达格列净干预后斑块内 pH,但我们研究表明 SGLT2 抑制剂可通过抑制 NHE1 活性抑制 AS 斑块形成,将达格列净的抗 AS 效应与 NHE1 联系起来,缩短 NHE1 基础研究的临床转化。

AS 斑块中巨噬细胞及平滑肌细胞是泡沫细胞的两个主要来源,而本研究在斑块组织中未能区别何种细胞 NHE1 表达。鉴于单核巨噬细胞是 AS 斑块主要组成细胞,故以巨噬细胞作为研究对象,发现达格列净抑制细胞 NHE1 蛋白表达及 NHE1 活性,抑制 LPS 诱导炎症因子的释放,且这种抑制效应并未被 NHE1 抑制剂阿米洛利增强。我们的研究结果与 SGLT2 抑制剂能通过抑制巨噬细胞向 M1 细胞分化而抑制炎症因子释放一致^[13],同时 NHE1 也参与 M1 细胞分化^[22],提示 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 表达及活性发挥抗炎作用。

3.5 研究的不足及结论

本研究尚未对斑块酸化程度进行研究,未对 SGLT2 抑制剂作用于 NHE1 基因敲除小鼠探究其抗 AS 机制,本课题组将在后续的研究中进行完善。

总之,尽管本研究未能在机制上深入研究,但结果表明 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 表达及活性而发挥抗 AS 作用。这些发现或许会深化 SGLT2 抑制剂心血管保护作用的认识,拓展 SGLT2 抑制剂临床运用,为探讨 NHE1 参与 AS 斑块形成的机制研究和临床转化提供新思路。

参考文献:

- [1] Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na^+/H^+ exchanger [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(11): 1081–1095.
- [2] Liu CL, Zhang X, Liu J, et al. Na^+/H^+ exchanger 1 determines atherosclerotic lesion acidification and promotes atherogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3978.
- [3] Braunwald E. SGLT2 inhibitors: the statins of the 21st century [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(11): 1029–1030.
- [4] Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med* 2015, 373(22): 2117–2128.
- [5] Chen YC, Jandeleit-Dahm K, Peter K. Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor dapagliflozin stabilizes diabetes-induced atherosclerotic plaque instability [J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(1): e022761.
- [6] Zelniker TA, Braunwald E. Mechanisms of cardiorenal effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(4): 422–434.
- [7] Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, et al. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na^+/H^+ exchanger, lowering of cytosolic Na and vasodilation [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(3): 722–726.
- [8] Iborra-Egea O, Santiago-Vacas E, Yurista SR, et al. Unraveling the molecular mechanism of action of empagliflozin in heart failure with reduced ejection fraction with or without diabetes [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4(7): 831–840.
- [9] 李迎新, 黄霖. 动脉粥样硬化动物模型制作方法的介绍 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 70–73.
- [10] 莫显刚, 王兰, 郭静, 等. 过表达 NHE1 通过上调钙蛋白酶活性降低 RAW264.7 细胞 ABCA1 蛋白表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(1): 12–16.
- [11] Liu Z, Ma X, Ilyas I, et al. Impact of sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors on atherosclerosis: from pharmacology to pre-clinical and clinical therapeutics [J]. *Theranostics*, 2021, 11(9): 4502–4515.
- [12] Al-Sharea A, Murphy AJ, Huggins LA, et al. SGLT2 inhibition reduces atherosclerosis by enhancing lipoprotein clearance in Ldlr type 1 diabetic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 166–176.
- [13] Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, et al. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143396.
- [14] Dimitriadis GK, Nasiri-Ansari N, Agrogiannis G, et al. Empagliflozin improves primary haemodynamic parameters and attenuates the development of atherosclerosis in high fat diet fed ApoE knockout mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 494: 110487.
- [15] Han JH, Oh TJ, Lee G, et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE mice fed a western diet [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(2): 364–376.
- [16] Lee SG, Lee SJ, Lee JJ, et al. Anti-inflammatory effect for atherosclerosis progression by sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitor in a normoglycemic rabbit model [J]. *Korean Circ J*, 2020, 50(5): 443–457.
- [17] Chen S, Coronel R, Hollmann MW, et al. Direct cardiac effects of SGLT2 inhibitors [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 45.
- [18] Sabolic I, Vrhovac I, Erer DB, et al. Expression of Na^+/D -glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(8): 1174–1188.
- [19] 杨卉, 莫显刚, 王兰, 等. ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块中 NHE1 与 Netrin-1 表达上调 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(6): 777–783.
- [20] Sarigianni M, Tsapas A, Mikhailidis DP, et al. Na^+/H^+ exchanger-1: a link with atherogenesis? [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(12): 1545–1556.
- [21] Huang N, Qiu Y, Liu Y, et al. Fluralozone protects endothelial function in atherosclerosis by ameliorating NHE1 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(10): 1310–1320.
- [22] Zhang X, Li J, Luo S, et al. IgE contributes to atherosclerosis and obesity by affecting macrophage polarization, macrophage protein network, and foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 597–610.

[收稿日期]2022-04-08