DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0026　　**文章编号** 1671-8852(2025)12-1529-08

4-苯基丁酸钠通过抑制内质网应激-MAMs-线粒体钙超载轴减轻高糖引起的H9c2细胞凋亡

纪延炜　文昕郁　唐赫鹏　苏娃婷　夏中元　雷少青
武汉大学人民医院麻醉科　湖北　武汉　430060

摘要　目的：探讨内质网应激抑制剂4-苯基丁酸钠(4-PBA)对高糖条件下内质网应激-线粒体相关内质网膜(MAMs)-线粒体钙超载轴及心肌细胞凋亡的影响。方法：体外培养H9c2细胞，按随机数字表法分为3组(每组6个复孔)：低糖组(LG组)、高糖组(HG组)、高糖＋4-PBA组(4-PBA组)。LG组细胞以含5.5 mmol•L^{-1}葡萄糖的培养基正常培养，HG组细胞以含35 mmol•L^{-1}葡萄糖的培养基处理48 h，4-PBA组细胞在行高糖处理前给予4-PBA预处理2 h。细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活性；酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)水平；Rhod-2细胞可渗透钙离子荧光探针法检测线粒体钙离子水平；2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平；5,5′,6,6′-四氯-1,1′, 3,3′-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(JC-1)法检测线粒体膜电位水平；线粒体红色荧光探针(Mito-Tracker)法检测线粒体形态；透射电镜检测内质网应激、MAMs的激活水平及线粒体损伤水平；流式细胞仪检测细胞凋亡水平；免疫印迹法(Western Blot)检测内质网应激标志蛋白BIP/GRP78、CHOP及MAMs标志蛋白IP3R、GRP75、VDAC的表达水平。结果：与LG组相比：HG组细胞存活率明显降低($P<0.05$)，LDH水平升高($P<0.05$)，BIP/GRP78、CHOP、IP3R、GRP75、VDAC的表达水平升高(均$P<0.05$)，MAMs激活水平、线粒体内钙离子水平、线粒体破损比例、ROS水平及细胞凋亡率均升高(均$P<0.05$)；与HG组相比：4-PBA组细胞存活率升高($P<0.05$)，LDH水平降低($P<0.05$)，BIP/GRP78、CHOP、IP3R、GRP75、VDAC的表达水平降低(均$P<0.05$)，MAMs激活水平、线粒体内钙离子水平、线粒体破损比例、ROS水平及细胞凋亡率均降低(均$P<0.05$)。结论：4-PBA可以通过抑制内质网应激-MAMs-线粒体钙超载轴抑制高糖引起的H9c2细胞凋亡。

关键词　4-PBA；H9c2细胞；内质网应激；MAMs；线粒体钙超载；凋亡
中图分类号　R587.1
文献标识码　A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

Sodium 4-phenylbutyrate alleviates H9c2 cell apoptosis induced by high glucose by inhibiting the endoplasmic reticulum stress-MAMs-mitochondrial calcium overload axis

JI Yanwei, WEN Xinyu, TANG Hepeng, SU Wating, XIA Zhongyuan, LEI Shaoqing
Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate how the endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) effectively reduces mitochondrial calcium overload by inhibiting endoplasmic reticulum

课题来源：武汉大学临床医学＋X青年拔尖项目(编号：413000833)
作者简介：纪延炜，男，1999—，医学硕士生，主要从事糖尿病心肌病及心肌缺血再灌注损伤研究，E-mail：jiyanwei1123@163.com
通信作者：雷少青，男，1982—，医学博士，博士生导师，主任医师，主要从事糖尿病及其并发症和围术期重要脏器保护的相关研究，E-mail：leishaoqing@163.com

stress, thereby preventing subsequent cellular damage and apoptosis. **Methods:** H9c2 cells were cultured *in vitro* and divided into three groups (six replicate wells in each group) according to a random number table: the low glucose control group (LG group), the high glucose injury group (HG group), and the high glucose injury + 4-PBA group (4-PBA group). Cells in the LG group were cultured in a medium containing 5.5 mmol•L^{-1} glucose, while cells in the HG group were treated with a medium containing 35 mmol•L^{-1} glucose for 48 hours. Cells in the 4-PBA group were pretreated with 4-PBA for 2 hours prior to high glucose treatment. Cell viability was assessed using the Cell Counting Kit (CCK-8), and lactate dehydrogenase (LDH) levels in the cell culture fluid were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The Rhod-2 cell-permeable calcium ion fluorescent probe method was employed to detect mitochondrial calcium ion levels, and the 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe method was used to assess intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. The mitochondrial membrane potential was evaluated using the 5, 5′, 6, 6′-tetrachloro-1, 1′, 3, 3′-tetraethylbenzimidazolecarbocyanine iodide (JC-1) method, and mitochondrial morphology was examined using a mitochondrial red fluorescent probe. The activation level of MAMs and the extent of mitochondrial damage were assessed using transmission electron microscopy. Flow cytometry was utilized to evaluate the level of cell apoptosis, while Western Blot analysis was conducted to determine the expression levels of endoplasmic reticulum stress marker proteins (BIP/GRP78 and CHOP) and mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) marker proteins (IP3R, GRP75, and VDAC). **Results:** Compared to the LG group, the HG group showed a significantly decreased cell survival rate, increased LDH levels, and elevated expression of BIP/GRP78, CHOP, IP3R, GRP75, and VDAC (all $P<0.05$). Additionally, HG increased MAM activation, mitochondrial calcium ion levels, mitochondrial damage ratio, ROS levels, and cell apoptosis rate (all $P<0.05$). In contrast, the 4-PBA group exhibited increased cell survival rate, decreased LDH levels, and reduced expression of BIP/GRP78, CHOP, IP3R, GRP75, and VDAC compared to the HG group (all $P<0.05$). Furthermore, 4-PBA attenuated MAM activation, mitochondrial calcium ion levels, mitochondrial damage ratio, ROS levels, and cell apoptosis rate (all $P<0.05$). **Conclusion:** 4-PBA can inhibit high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by targeting the endoplasmic reticulum stress-MAMs-mitochondrial calcium overload axis.

Key Words 4-PBA; H9c2 Cells; Endoplasmic Reticulum Stress; MAMs; Mitochondrial Calcium Overload; Apoptosis

糖尿病是一种严重威胁全球健康的慢性代谢性疾病。据流行病学数据[1-2]显示,全球糖尿病患者总数已超5亿且患病率仍在不断上升。以糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)为代表的心血管系统并发症是造成糖尿病患者不良预后甚至死亡的主要因素[3]。DCM的发病机制复杂,与氧化应激、内质网应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡等因素均有关系[3]。值得注意的是,内质网相关基因表达水平的波动被认为是心血管疾病早期的标志物[4-5],并且内质网应激可以造成线粒体相关内质网膜(mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes,MAMs)内钙离子转运的异常进而引起线粒体损伤[6]。因此,减轻内质网应激的发生或许是抑制DCM进展极为有效的手段。4-苯基丁酸钠(4-phenylbutyric acid,4-PBA)已被证实能够通过抑制内质网应激来抵抗葡萄糖波动引起的心肌细胞凋亡[7]。然而,目前尚未有研究证实在DCM中,4-PBA能够通过抑制内质网应激减少钙离子向线粒体的转移进而抑制线粒体损伤。本研究在此理论基础上,利用高糖诱导H9c2细胞损伤作为模拟糖尿病心肌病的体外模型,探讨4-PBA能否通过抑制内质网应激-MAMs-线粒体钙超载轴显著减轻高血糖带来的心肌细胞损伤,旨在为DCM的早期治疗提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　细胞培养和传代　将H9c2细胞培养接种在含有10%胎牛血清（生产批号：S601P-500，SeraPro公司，德国）、1%青霉素-链霉素（生产批号：GP2408024，武汉赛维尔生物科技有限公司）的DMEM培养基（生产批号：GP24050180533，武汉赛维尔生物科技有限公司）中，于95%空气、5%CO_2、37 ℃的恒温细胞培养箱中培养。每隔1～2 d换液，待细胞密度达到80%左右时利用胰蛋白酶（生产批号：GA2304017，武汉赛维尔生物科技有限公司）消化后传代。

1.2　细胞模型的构建　胰蛋白酶消化后，取适量密度的细胞悬液接种于6孔板中，待细胞密度生长至70%～80%时，按照随机数字表法将细胞分为3组（每组6个复孔）：低糖对照组（LG组）、高糖损伤组（HG组）、高糖损伤＋4-PBA组（4-PBA组）。LG组细胞以含5.5 mmol•L^{-1}葡萄糖的DMEM培养基正常培养，HG组细胞以含35 mmol•L^{-1}葡萄糖的DMEM培养基（生产批号：24Z1201，武汉普诺赛生命科技有限公司）处理48 h，4-PBA组细胞在行高糖处理前根据文献[6]指示给予100 μmol•L^{-1}的4-苯基丁酸钠（4-phenylbutyric acid，4-PBA）（生产批号：273733，美国MCE生物科技公司）预处理2 h。

1.3　细胞计数试剂盒（cell counting kit-8，CCK-8）检测细胞活性　胰蛋白酶消化后，将H9c2细胞以每孔10^4个的密度接种于96孔板。当细胞密度生长至70%～80%时，采用上述方法进行造模。造模结束后，将CCK-8（生产批号：CR2308050，武汉赛维尔生物科技有限公司）按比例1∶10（CCK-8∶培养基）加入每个孔中，并在正常细胞培养条件下孵育2～4 h。使用酶标仪（型号：EnSight，PerkinElmer公司，美国）在450 nm波长下测定各孔的光密度值，从而计算细胞活性。

1.4　酶联免疫吸附试验（enzyme - linked immunosor-bent assay，ELISA）法检测细胞上清中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）水平　按照试剂盒（生产批号：20240710，南京建成生物工程研究所）的操作说明准备待检样品，随后利用酶标仪（型号：EnSight，PerkinElmer公司，美国）测定450 nm波长下各孔的光密度值，从而计算上清中LDH的水平。

1.5　免疫印迹法（Western Blot）检测内质网应激标志蛋白BIP/GRP78、CHOP及MAMs标志蛋白IP3R、GRP75、VDAC1的表达水平　在造模成功的细胞中加入放射免疫沉淀法裂解液（生产批号：CR2308092，武汉赛维尔生物科技有限公司）用于提取细胞蛋白。随后在细胞裂解液中加入5×蛋白上样缓冲液（生产批号：038317000，雅酶生物医药科技有限公司）并于水浴锅中95 ℃煮10～15 min使蛋白完全变性。完成上述步骤后，取适量的蛋白样品完成十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（浓缩胶80 V、30 min、分离胶120 V、50 min），随后利用聚偏二氟乙烯膜（PVDF膜，生产批号：10600023，优宁维生物科技股份有限公司）在200 mA条件下，恒流电转90 min，随后使用快速封闭液（生产批号：03812800，雅酶生物医药科技有限公司）对带有蛋白的PVDF膜封闭30 min，随后将封闭好的PVDF膜分别放入配置好的含有葡萄糖调节蛋白78（glucose-regulated protein 78，GRP78；生产批号：10199730，上海艾比玛特医药科技有限公司）、C/EBP同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP；生产批号：3500011319，爱博泰克生物科技有限公司）、电压依赖性阴离子选择性通道1（voltage-dependent anion channel 1，VDAC1；生产批号：10202676，上海艾比玛特医药科技有限公司）、葡萄糖调节蛋白75（glucose-regulated protein 75，GRP75；生产批号：10202726，上海艾比玛特医药科技有限公司）、肌醇1,4,5-三磷酸受体（inositol 1，4，5-trisphosphate receptor，IP3R；生产批号：10202693，上海艾比玛特医药科技有限公司）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH；生产批号：3522081520，爱博泰克生物科技有限公司）的一抗中，在4 ℃的条件下孵育14～16 h。孵育结束后，利用Tris缓冲液（生产批号：GA2401053，武汉赛维尔生物科技有限公司）和吐温20（生产批号：CR2312060，武汉赛维尔生物科技有限公司）的混合物（Tris-buffered saline Tween-20，TBST）洗膜3次共30 min，随后将PVDF膜放入二抗（生产批号：9300014001/9300003001，爱博泰克生物科技有限公司）中室温孵育1～2 h，随后再次洗膜3次共30 min。最后将条带置入电化学发光显影液中（生产批号：9620111922，爱博泰克生物科技有限公司）并利用凝胶成像系统（型号：Chemi-Doc，BIO-RAD公司，美国）扫描并通过Image J软件分析蛋白条带灰度值。以目的蛋白与GAPDH的比值的差异表示目的蛋白的表达水平差异。

1.6　透射电镜检测内质网应激、MAMs的激活水

平　胰蛋白酶消化后,将细胞悬浮液汇集于离心管,以1 000 r•min^{-1}持续5 min的条件收集细胞团块(需保证细胞数量大于10^7个)。取1 mL电镜固定液(生产批号:R2206151,武汉赛维尔生物科技有限公司)吹散细胞团块,并于室温下固定30 min,随后4 ℃固定2～4 h。以1 000 r•min^{-1}持续5 min的条件收集细胞团块后依次放入浓度为30%、50%、70%、80%、95%、100%的乙醇中脱水,每个浓度下处理20 min。将脱水后的细胞团块依次在丙酮:包埋剂=1:1的条件下包埋3 h,丙酮:包埋剂=1:2的条件下包埋过夜、纯包埋剂的条件下包埋6 h。在将包埋板放于烤箱48 h后,用铜网捞片。将铜网置于2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色8 min和2.6%枸橼酸铅溶液避CO_2染色8 min,后在透射显微镜下观察内质网、MAMs及线粒体的超微结构。

1.7　Rhod-2/AM细胞可渗透钙离子荧光探针法检测线粒体钙离子水平　模型成功后,去除培养基并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS,生产批号:GA23100150357,武汉赛维尔生物科技有限公司)洗涤细胞3次。以覆盖细胞为标准,将Rhod-2/AM(生产批号:R3401110,翌圣生物科技股份有限公司)工作液加入细胞中,37 ℃下孵育30 min后去除Rhod-2/AM工作液。随后PBS洗涤细胞3次,充分去除Rhod-2/AM工作液后,加入缓冲液覆盖细胞。将细胞置于37 ℃下孵育30 min后,荧光显微镜(型号:IX71,Olympus公司,日本)下检测细胞荧光强度。

1.8　2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平　造模成功后,除去培养基并用PBS清洗细胞3次,加入DCFH-DA(生产批号:011124240611,碧云天生物技术股份有限公司):无血清培养基=1:1 000的荧光工作液,并在37 ℃下孵育20 min。去除工作液并用无血清培养基洗涤细胞3次后加入无血清培养基1 mL后使用荧光显微镜(型号:IX71,Olympus公司,日本)观测荧光强度。

1.9　5,5′,6,6′-四氯-1,1′,3,3′-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(JC-1)法检测线粒体膜电位水平　造模成功后,除去培养基并用PBS清洗细胞3次,加入JC-1(生产批号:041123230814,碧云天生物技术股份有限公司):无血清培养基=1:1的工作液并在37 ℃下孵育20 min。随后清除工作液并用JC-1染色缓冲液清洗细胞3次,随后加入无血清培养基1 mL后使用荧光显微镜(型号:IX71,Olympus公司,日本)观测荧光强度。

1.10　线粒体红色荧光探针(Mito-Tracker)法检测线粒体形态　造模成功后,除去培养基并用PBS清洗细胞3次,随后,加入Mito-Tracker(生产批号:082426240311,碧云天生物技术股份有限公司)工作液每孔1～2 mL,并在37 ℃的条件下孵育30 min。去除Mito-Tracker工作液,加入37 ℃温浴的无血清细胞培养基后使用荧光显微镜(型号:IX71,Olympus公司,日本)观测线粒体形态。

1.11　流式细胞仪检测细胞凋亡水平　造模成功后,将500 μL 1×膜联蛋白Ⅴ(Annexin Ⅴ)结合缓冲液加入到以300 *g*持续10 min的条件下收集的细胞团块中并轻轻吹打重悬细胞后加入5 μL Annexin Ⅴ-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)和碘化丙啶(prop-idium iodide,PI)(生产批号:AK17638,伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。室温避光孵育20 min后通过流式细胞仪(型号:CytoFlex,Beckman Coulter公司,美国)检测细胞凋亡水平。

1.12　统计学分析　采用GraphPad Prism 9.0统计学软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　细胞存活率、LDH水平比较　与LG组相比,HG组细胞存活率显著下降,LDH水平显著升高(均$P<0.01$);与HG组相比,4-PBA组细胞存活率升高,LDH水平下降(均$P<0.01$)。

表1　3组细胞存活率、LDH水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	复孔数	细胞存活率/%	LDH/U•L^{-1}
LG组	6	98.8±14.0	107±6
HG组	6	61.9±5.0[a]	310±7[a]
4-PBA组	6	87.4±11.0[b]	158±6[b]

与LG组比较,[a]$P<0.01$;与HG组比较,[b]$P<0.01$。

2.2　内质网应激及MAMs的激活水平比较　与LG组相比,HG组内质网应激标志蛋白BIP/GRP78、CHOP及MAMs标志蛋白IP3R、GRP75、VDAC1的表达水平显著升高(均$P<0.01$);4-PBA组相比于HG组,内质网应激标志蛋白BIP/GRP78、CHOP及MAMs标志蛋白IP3R、GRP75、VDAC1的表达水平显著降低(均$P<0.01$)。电镜下,与LG组相比,HG组内质网显著破碎变形的数

量及线粒体内质网接触增多；与HG组相比，4-PBA组内质网破碎变形的数量、线粒体内质网接触减少。见图1。

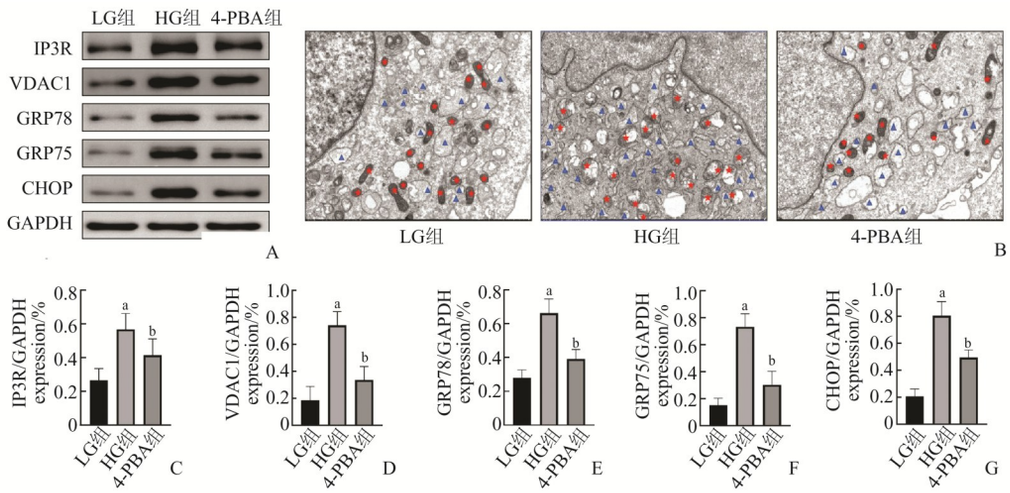


图1　3组细胞内质网应激及MAMs的激活水平比较

A. Western Blot结果图；B. 电镜透射电子显微镜下内质网及MAMs结构观察（×7 000），红色五角星代表线粒体，蓝色三角形代表内质网；C. 3组细胞IP3R蛋白水平比较；D. 3组细胞VDAC1蛋白水平比较；E. 3组细胞GRP78蛋白水平比较；F. 3组细胞GRP75蛋白水平比较；G. 3组细胞CHOP蛋白水平比较。与LG组比较，$^{a}P<0.01$；与HG组比较，$^{b}P<0.01$。

2.3　线粒体内钙离子浓度水平比较　与LG组相比，HG组细胞线粒体内钙离子水平显著上升（$P<0.01$）；与HG组相比，4-PBA组细胞线粒体钙离子浓度下降（$P<0.01$）。见图2。

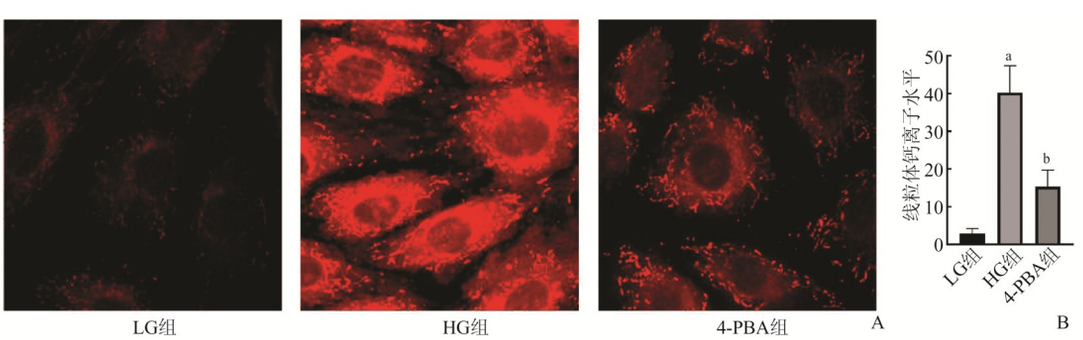


图2　3组细胞线粒体内钙离子浓度水平比较

A. Rhod-2/AM细胞可渗透钙离子荧光探针染色图（×8 000）；B. 3组细胞线粒体钙离子水平比较；与LG组比较，$^{a}P<0.01$；与HG组比较，$^{b}P<0.01$。

2.4　ROS、线粒体膜电位水平比较　与LG组相比，HG组细胞内ROS水平显著升高，但是线粒体膜电位水平显著下降（均$P<0.01$）。与HG组相比，4-PBA组细胞内ROS水平下降，线粒体膜电位水平升高（均$P<0.01$）。见图3。

2.5　线粒体形态比较　LG组线粒体形态主要表现为具有高度互连网络的细长小管；HG组线粒体呈球形变短、体积减小及线粒体数量增加，表明线粒体断裂；给予4-PBA治疗后减弱了高糖诱导的线粒体断裂。见图4及图1B。

2.6　凋亡水平比较　与LG组细胞相比，HG组细胞凋亡率显著上升（$P<0.01$）；与HG组细胞相比，4-PBA组细胞凋亡率下降（$P<0.01$）。见图5。

3　讨论

本研究探讨了4-PBA减轻高糖诱导的H9c2细胞凋亡的具体机制，证实了内质网应激可能作为一种高糖损伤的起始因素，激活MAMs，造成钙离子从内质网向线粒体的过度转移，破坏线粒体，最终引起H9c2细胞凋亡。4-PBA的处理减轻了内质网应激，同时减少了线粒体钙超载的发生并且显著抑制了高糖处理下H9c2细胞的凋亡。这些结果提示抑制内质网应激-MAMs-线粒体钙超载轴可能是

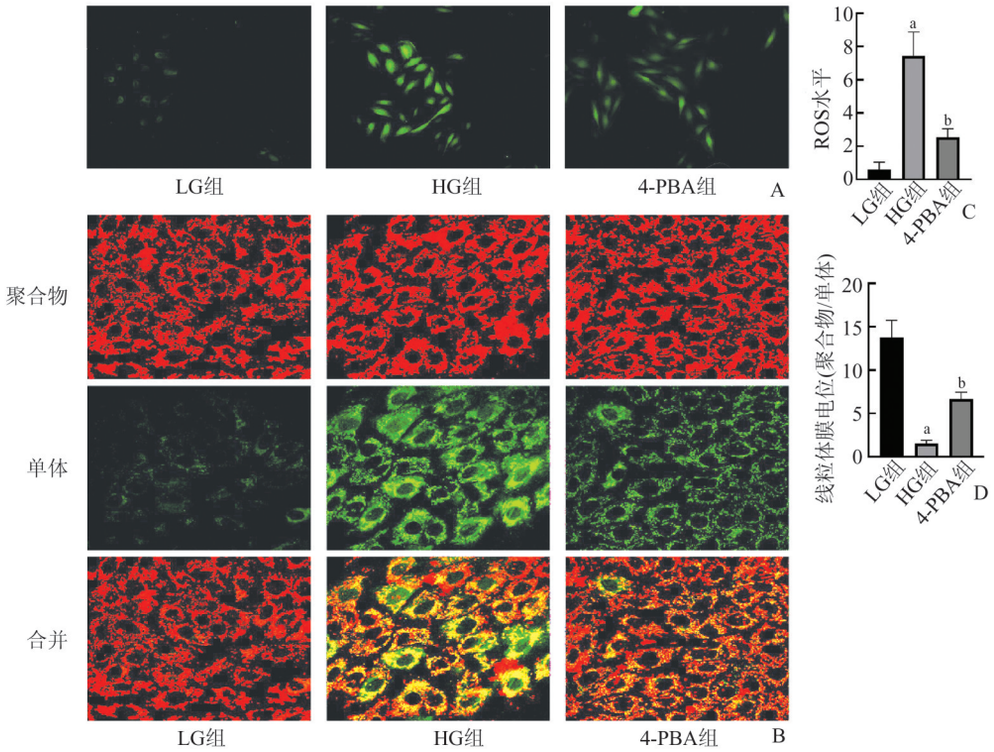


图3 3组细胞内ROS、线粒体膜电位水平比较

A. DCFH-DA染色图(×200);B. JC-1染色图(×200);C. 3组细胞ROS水平比较;D. 3组细胞线粒体膜电位水平比较。与LG组比较,$^{a}P<0.01$;与HG组比较,$^{b}P<0.01$。

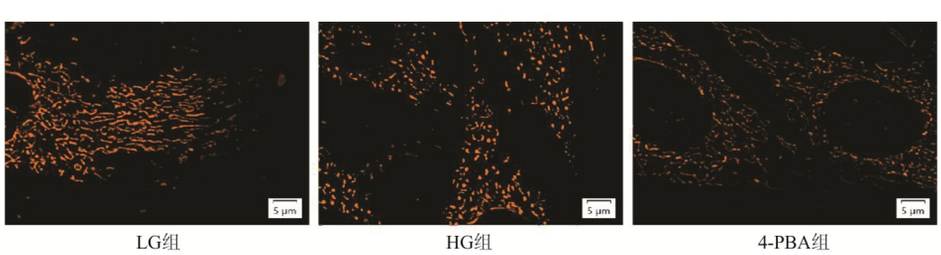


图4 3组细胞内线粒体形态对比(×8 000)

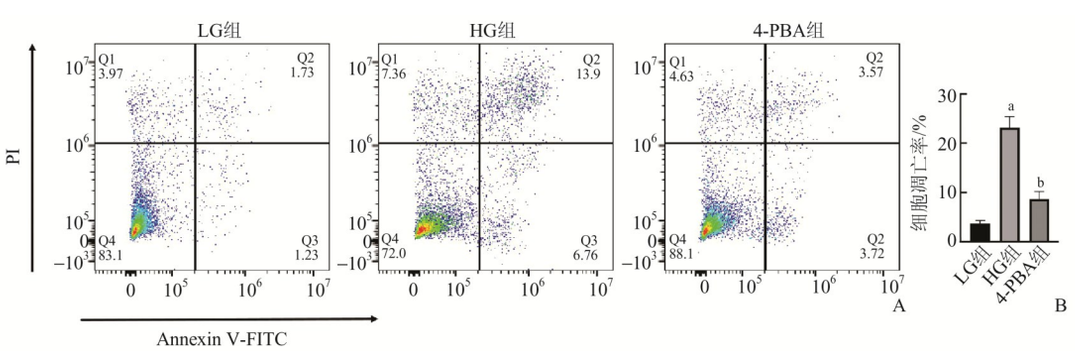


图5 3组细胞凋亡情况比较(Annex Ⅴ/PI双染)

A. 3组细胞凋亡流式细胞术结果图;B. 3组细胞凋亡率比较。与LG组比较,$^{a}P<0.01$;与HG组比较,$^{b}P<0.01$。

4-PBA减轻高糖诱导的H9c2细胞凋亡的具体机制。

截至目前,全球范围内的糖尿病的患病率约为10%且仍在不断上升[1]。其中,糖尿病病死患者中,曾患有心血管并发症的患者占比超过80%[8]。尽管有研究[9]指出,含钠-葡萄糖协同转运蛋白2的抗心力衰竭疗法能够显著降低糖尿病患者心血管死亡或住院期间心力衰竭的风险,但是糖尿病患者发生

心力衰竭的概率仍是正常人的2～4倍，且糖尿病相关心力衰竭引起的病死率仍居高不下[10-11]。在发展为糖尿病相关心力衰竭之前，糖尿病患者主要表现为心肌硬度增加、心脏肥大、心脏扩张功能障碍等无法完全由其他心血管或非心血管原因解释的心脏异常，这个阶段被称作DCM时期[3]。这个时期往往伴随着氧化应激、内质网应激、线粒体功能障碍、炎症、细胞死亡等多种机制的激活[3]。为了探索在DCM时期甚至DCM早期能够有效减少心肌损伤的干预措施，我们参照文献[12]给出的信息，利用高糖培养基培养H9c2细胞48 h模拟DCM模型并以心肌损伤指标LDH的显著上升提示模型构建的成功。

哺乳动物的内质网是蛋白质折叠和组装的主要部位，同时其在调节细胞代谢、Ca^{2+}的吸收、储存和释放等方面的能力进一步奠定了其在维持心肌正常功能方面不可替代的作用[6]。在心血管疾病中，内质网稳态被破坏，造成内质网腔内未折叠或错误折叠蛋白的过度积累进而引起内质网应激[13]。大量研究[11,14-15]指出，高糖会促进内质网应激的激活进而导致心肌细胞凋亡，促进DCM的发生发展。4-PBA是一种小分子量化合物能够稳定蛋白质构象，提高内质网对蛋白折叠的处理能力[16]。在此基础上，它被指出能够显著抑制葡萄糖波动诱导的内质网应激和后续凋亡，促进心肌细胞活力进而延缓DCM的进展[7,17-18]。本研究获得了相似的研究结果，即高糖处理下，心肌细胞活力显著下降且伴随着心肌损伤标志物LDH的显著上调，同时内质网应激激活且心肌细胞凋亡比例显著上调；而4-PBA的处理则逆转了这些现象并提供了明显的心肌保护作用。

MAMs是内质网与线粒体之间物理接触的部位，为这两种细胞器实现互相调控提供了平台[19-20]。同时，MAMs的存在也为Ca^{2+}从内质网转移到线粒体提供了由IP3R、GRP75、VDAC1组成的路径[6]。其中，IP3R是定位于内质网外膜上的负责Ca^{2+}释放通道蛋白，能够通过GRP75与定位于线粒体外膜上负责接收Ca^{2+}的通道蛋白VDAC1实现物理接触，从而实现Ca^{2+}从内质网向线粒体的转移[6]。由MAMs在应激状态下的过度激活所引起的Ca^{2+}的转移异常及后续的线粒体钙超载及线粒体损伤已经在多系统疾病中被证实会造成进一步疾病的恶化[21]。此外，YUAN等[22]发现，高糖会导致心肌细胞内质网应激的激活和线粒体损伤的发生，而抑制MAMs的形成则能显著恢复线粒体功能。ZHANG等[23]指出，糖尿病状态下，MAMs的形成会诱导Ca^{2+}从内质网释放到线粒体造成线粒体功能障碍，加速糖尿病心肌病的进展。在我们的研究中，我们发现，高糖培养下，H9c2细胞发生内质网应激及MAMs激活水平的显著上升。在此基础上线粒体内钙离子水平显著上调，即发生了线粒体钙超载。随后我们还发现，H9c2细胞的氧化应激水平显著上调并伴随着线粒体膜电位的下调及线粒体的碎片化的发生，这提示我们线粒体钙超载造成了线粒体的氧化损伤。最终这一系列损伤性因素集中反映在了H9c2细胞凋亡率的显著升高。给予4-PBA后，内质网应激被抑制的基础上，MAMs、线粒体钙超载及线粒体损伤比例显著下调，同时细胞凋亡的发生率也明显被下调。这提示我们，4-PBA能够通过抑制内质网应激，抑制MAMs的激活，进而减少线粒体损伤的发生，并最终反映在抑制心肌细胞凋亡上。

综上所述，高糖能够通过激活内质网应激-MAMs-线粒体损伤轴引起心肌细胞凋亡，而4-PBA能够通过减少内质网应激的发生，抑制该损伤轴的激活，保护心肌细胞。本研究为糖尿病心肌病的未来研究及4-PBA的临床应用提供了理论基础，但未在实验动物上进一步验证，这是我们未来研究的主要方向。

参考文献

[1] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.

[2] GREEN A, HEDE S M, PATTERSON C C, et al. Type 1 diabetes in 2017: Global estimates of incident and prevalent cases in children and adults[J]. Diabetologia, 2021, 64(12): 2741-2750.

[3] RITCHIE R H, ABEL E D. Basic mechanisms of diabetic heart disease[J]. Circ Res, 2020, 126(11): 1501-1525.

[4] XUE A M, LIN J Y, QUE C X, et al. Aberrant endoplasmic reticulum stress mediates coronary artery spasm through regulating MLCK/MLC2 pathway[J]. Exp Cell Res, 2018, 363(2): 321-331.

[5] YU B K, XU C C, TANG X R, et al. Endoplasmic reticulum stress-related secretory proteins as biomarkers

of early myocardial ischemia-induced sudden cardiac deaths[J]. Int J Leg Med, 2022, 136(1): 159-168.

[6] LI B, HUO S M, DU J Y, et al. Dibutyl phthalate causes heart damage by disrupting Ca^{2+} transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria and triggering subsequent pyroptosis[J]. Sci Total Environ, 2023, 892: 164620.

[7] WU L D, LIU Y, LI F, et al. Glucose fluctuation promotes cardiomyocyte apoptosis by triggering endoplasmic reticulum (ER) stress signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 13739-13751.

[8] PARIM B, SATHIBABU UDDANDRAO V V, SARAVANAN G. Diabetic cardiomyopathy: Molecular mechanisms, detrimental effects of conventional treatment, and beneficial effects of natural therapy[J]. Heart Fail Rev, 2019, 24(2): 279-299.

[9] LYTVYN Y, BJORNSTAD P, UDELL J A, et al. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition in heart failure: Potential mechanisms, clinical applications, and summary of clinical trials[J]. Circulation, 2017, 136(17): 1643-1658.

[10] PARK J J. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment of heart failure in diabetes[J]. Diabetes Metab J, 2021, 45(2): 146-157.

[11] DILLMANN W H. Diabetic cardiomyopathy[J]. Circ Res, 2019, 124(8): 1160-1162.

[12] ZHAN J, JIN K, XIE R, et al. *AGO2* protects against diabetic cardiomyopathy by activating mitochondrial gene translation[J]. Circulation, 2024, 149(14): 1102-1120.

[13] REN J, BI Y, SOWERS J R, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 499-521.

[14] LI J, ZHU H, SHEN E, et al. Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2010, 59(8): 2033-2042.

[15] WU T T, DONG Z, GENG J, et al. Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis *via* CHOP/*Puma* signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Eur J Pharm Sci, 2011, 42(5): 496-502.

[16] ZENG M C, SANG W H, CHEN S, et al. 4-PBA inhibits LPS-induced inflammation through regulating ER stress and autophagy in acute lung injury models[J]. Toxicol Lett, 2017, 271: 26-37.

[17] GUO R M, WU Z J, JIANG J M, et al. New mechanism of lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy: Deficiency of Endogenous H_2S Production and ER stress [J]. Mech Ageing Dev, 2017, 162: 46-52.

[18] DENG Y W, LIU F, LI Z T, et al. Hyperglycemia promotes myocardial dysfunction *via* the ERS-MAPK10 signaling pathway in db/db mice[J]. Lab Investig, 2022, 102(11): 1192-1202.

[19] YANG X, ZHUANG J, SONG W, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane: Overview and inextricable link with cancer[J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(7): 906-919.

[20] BRAVO R, GUTIERREZ T, PAREDES F, et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(1): 16-20.

[21] MAO H, CHEN W, CHEN L, et al. Potential role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane proteins in diseases[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 199: 115011.

[22] YUAN M, GONG M, ZHANG Z, et al. Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress in atrial cardiomyocytes, and mitofusin-2 downregulation prevents mitochondrial dysfunction and subsequent cell death[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6569728.

[23] ZHANG J, ZHANG F, WANG Y. Mitofusin-2 enhances mitochondrial contact with the endoplasmic reticulum and promotes diabetic cardiomyopathy[J]. Front Physiol, 2021, 12: 707634.

(2025-01-07收稿)
编辑 沈建国