

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.04.001

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.04.001>

· 论著 ·

载脂蛋白M在心肌细胞缺氧/复氧损伤中的表达差异及其作用

程港丽, 姚霜, 施媛萍, 张俊, 罗光华, 郑璐

(苏州大学附属第三医院临床医学研究中心, 江苏 常州 213003)

[摘要] 目的: 探讨载脂蛋白M(apolipoprotein M, ApoM)在大鼠H9C2心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤中的表达差异及作用。方法: 利用安宁包缺氧体系构建大鼠H9C2心肌细胞H/R损伤模型, 采用CCK-8、细胞凋亡检测试剂盒、caspase-3活性检测试剂盒检测H9C2细胞H/R后细胞增殖、凋亡的差异, 同时检测ApoM和1-磷酸鞘氨醇受体1(sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1)在H/R条件下的表达情况。建立体外过表达ApoM(apoM overexpression, ApoM-OE)的H9C2细胞, 采用CCK-8检测心肌细胞存活率, 比色法检测细胞培养上清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 蛋白质印迹法检测心肌细胞cleaved caspase-3、caspase-3表达情况, 分析ApoM在H/R诱导的心肌细胞损伤中的可能作用。结果: 在H/R处理后, H9C2心肌细胞活力逐渐降低, 细胞凋亡率、caspase-3活性升高, 证实大鼠H9C2心肌细胞H/R损伤模型构建成功; 在H/R处理后, 心肌细胞中ApoM和S1PR1 mRNA表达水平显著上调(均 $P < 0.01$)。与对照组相比, ApoM-OE组心肌细胞存活率、LDH活性、SOD活性、及cleaved caspase-3表达水平均无明显变化($P > 0.05$)。结论: ApoM和S1PR1在H9C2细胞H/R损伤中表达水平升高, 但ApoM对H/R诱导的H9C2细胞损伤无明显的保护作用。

[关键词] 载脂蛋白M; 缺氧/复氧损伤; 1-磷酸鞘氨醇

Expression difference and role of apolipoprotein M in hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury

CHENG Gangli, YAO Shuang, SHI Yuanping, ZHANG Jun, LUO Guanghua, ZHENG Lu

(Clinical Medical Research Center, Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou Jiangsu 213003, China)

Abstract **Objective:** To investigate the differential expression and the effect of apolipoprotein M (ApoM) on H9C2 rat cardiomyocyte injury induced by hypoxia/reoxygenation (H/R). **Methods:** Using the AnaeroPack System, we established the H/R injury model of H9C2 rat cardiomyocytes. CCK-8 cell viability assay, cell apoptosis and

收稿日期(Date of reception): 2021-11-10

通信作者(Corresponding author): 郑璐, Email: qz.zhenglu@163.com

基金项目(Foundation item): 江苏省自然科学基金(BK20191158); 江苏省333人才项目(BRA2020158); 常州市国际合作项目(CZ20190022)。

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191158), "333" Talent Project of Jiangsu Province (BRA2020158), and the International Cooperation Foundation of Changzhou City (CZ20190022), China.

caspase-3 activity assay were used to detect the difference of cell proliferation and apoptosis after H/R injury. Furthermore, the expression levels of ApoM and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) were detected. H9C2 cardiomyocytes overexpressing ApoM (ApoM-OE) were established. CCK-8 assay was used to detect the survival rate of cardiomyocytes, the colorimetric method was applied to detect the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) in the cell culture supernatant, immunoblotting was used to determine the expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3, and the role of ApoM in H/R-induced cardiomyocyte injury was analyzed. **Results:** The H9C2 cardiomyocyte viability decreased gradually after H/R, while apoptosis rate and caspase-3 activity increased after H/R. It confirmed that the H/R injury model of H9C2 rat cardiomyocytes was successfully established through AnaeroPack System. The mRNA expression levels of ApoM and S1PR1 were upregulated in cardiomyocytes after H/R (both $P < 0.01$). Compared with the NC group, the cell survival rate, HDL activity, SOD activity and relative expression level of cleaved caspase-3 in the ApoM-OE group were no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** The expression levels of ApoM and S1PR1 were upregulated in H9C2 after H/R, but ApoM had no significant protective effect on H9C2 rat cardiomyocytes injured by H/R.

Keywords apolipoprotein M; hypoxia/reoxygenation injury; sphingosine-1-phosphate

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是由冠状动脉急性闭塞造成心肌坏死的一种冠心病急症,给全球造成了巨大的健康和经济负担^[1]。及时进行再灌注治疗是减少心肌梗死面积、保护心功能、降低病死率的有效方式。然而,当缺血心肌恢复血流供应,氧气被重新运输到梗死部位,会造成比缺血更严重的损伤,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[2-3]。MIRI可进一步引起微血管阻塞、心律失常、心源性休克等一系列严重的并发症^[2],危害患者生命,因此,找到有效的干预措施减轻再灌注治疗中的MIRI是亟待解决的问题。载脂蛋白M(apolipoprotein M, ApoM)主要存在于高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)中,参与HDL多种生物学功能的发挥,包括胆固醇的逆向转运、抗动脉粥样硬化、抗氧化和抗炎等过程^[4-6]。作为1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)的生理载体,ApoM可通过S1P通路抑制炎症因子的表达,减轻炎症反应^[7-8]。体内外心肌缺血再灌注模型^[9-11]证实:在缺血前或再灌注时给予HDL或S1P对心肌有明显的保护作用。ApoM作为HDL的重要组成部分以及S1P的关键载体,是否参与心肌缺血再灌注的保护作用尚不清楚。本研究以大鼠H9C2心肌细胞株为研究对象,拟探讨ApoM在心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤中的表达变化及可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠H9C2心肌细胞购自美国ATCC公司;DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清均购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(货号:CK04)购自日本同仁化学研究所;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(货号:C1062)、caspase-3活性检测试剂盒(货号:C1116)、RNA抽提试剂盒(货号:R0027)购自碧云天生物技术有限公司;过表达ApoM的慢病毒和空载体慢病毒由上海和元生物公司包装;BCA蛋白定量(货号:BB-3401)和总蛋白质提取试剂盒(货号:BB-3101)购自上海贝博生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH;货号:A020-2)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD;货号:A001-3)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;大鼠cleaved caspase-3和caspase-3一抗购自美国cell signaling technology公司(货号:9664、14220)。厌氧产气袋、厌氧罐和氧气指示剂购自日本三菱公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素的DMEM培养基在37℃、5%CO₂培养箱中培养大鼠H9C2心肌细胞,隔天换液,待细胞生长至

80%~90%融合度时, 加入适量0.25%胰酶消化细胞进行传代, 每2~3 d传代1次。

1.2.2 心肌细胞 H/R 损伤模型的建立

安宁包缺氧体系由密闭的厌氧培养罐和5% CO₂厌氧产气袋构成, 通过厌氧指示剂颜色变化显示当前体系中氧气浓度状态。取状态良好的处于对数生长期的H9C2细胞, 将细胞培养液更换为无血清的DMEM培养基, 放入安宁包缺氧体系(5% CO₂、0% O₂、95% N₂), 于37 °C培养。在缺氧状态下培养指定时间后, 转移到37 °C常氧培养箱(5% CO₂、20% O₂、75% N₂)复氧12 h。H/R组: 细胞更换无血清DMEM培养基后分别缺氧3、6、12、24 h, 再复氧12 h; 相应对照(Control)组: 心肌细胞常氧条件下培养, 其余条件与对应实验组相同。

1.2.3 CCK-8 检测 H9C2 心肌细胞活力

将H9C2细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于96孔板, 每组设置6个复孔, 每孔加入100 μ L细胞悬液, 置于37 °C培养箱培养。各组H9C2细胞分别按上文所述方法进行缺氧处理相应时间后再复氧12 h。H/R处理后, 各孔加入10 μ L CCK-8试剂, 于37 °C孵育2 h, 随后测定450 nm波长处的吸光度。

1.2.4 流式细胞术检测 H9C2 细胞凋亡率

以 1×10^5 /mL的密度将H9C2细胞接种于6孔板, 每孔加入2 mL细胞悬液。待H/R处理后, 将细胞培养液吸出至离心管备用。用不含EDTA的胰酶消化细胞, 将消化下来的细胞转移到前述相应的收集细胞培养液的离心管中, 离心弃上清, 加入195 μ L结合液轻轻重悬细胞, 依次加入5 μ L Annexin V-FITC、10 μ L碘化丙啶(propidium iodide, PI), 轻轻混匀, 室温避光孵育10~20 min, 立即用流式细胞仪进行检测。实验重复3次。

1.2.5 Caspase-3 活性检测

H9C2细胞以 1.5×10^5 /mL的密度接种于60 mm细胞培养皿, 待H/R处理后, 收集细胞培养上清及贴壁细胞, 离心弃上清, 用PBS洗涤1次。加入60 μ L裂解液, 重悬沉淀后冰浴裂解15 min。随后按试剂盒说明取各组裂解液加入反应试剂, 37 °C孵育2 h, 发现颜色变化较明显时用酶标仪检测405 nm处吸光度, 根据标准曲线及蛋白浓度计算caspase-3活性。

1.2.6 慢病毒感染 H9C2 细胞

将H9C2细胞接种于100 mm细胞培养皿中, 每个培养皿细胞数量为 5×10^5 个, 设置空载慢病毒(negative control, NC)组和ApoM过表达(apoM overexpression, ApoM-OE)组, 放入培养箱中培养。待细胞贴壁稳定后, 按感染复数(multiplicity of infection, MOI)为30分别加入相应的NC和ApoM过表达慢病毒, 并在每个培养皿中以1:200稀释度加入助染剂Polybrene。72 h后在荧光显微镜下观察慢病毒感染情况, 随后将细胞接种于不同孔板, 检测其过表达效率, 并在H/R处理后进行后续实验。

1.2.7 细胞 RNA 提取及 RT-qPCR

取对数生长期细胞以 1×10^5 /mL的密度接种于6孔板, H/R处理后, 按RNA抽提试剂盒说明提取细胞RNA, 并检测RNA浓度和纯度。RNA反转录合成cDNA后进行实时荧光定量PCR。扩增体系共25 μ L, 包含2 μ L cDNA、17.13 μ L去离子水、2.5 μ L MgCl₂、2.5 μ L缓冲液、0.5 μ L dNTPs、各0.04 μ L的引物和探针、0.25 μ L Taq酶。引物与探针序列如表1所示。PCR条件为: 95 °C变性3 min, 95 °C 5 s, 61 °C 10 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算mRNA的相对表达量^[12]。

表1 引物及探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

基因	引物/探针	序列(5'→3')
Rat APOM	前引物	ACAAAGAGACCCCAGAGCCC
	后引物	TCCATGGTGGGAGCCG
	探针	FAM-ACCTGGGCTGTGGTACTTTATGCTGG-TAMRA
Rat S1PR1	前引物	GCAGCTTCGTCCCGCTTG
	后引物	CTTTTATGTAGTTTCCITGGCT
	探针	FAM-CGAGGCTGCTGTTTCTCGGAGGC-BHQ1
Rat β -actin	前引物	GCCACTGCCGCATCCTCT
	后引物	CTGGAAGAGAGCCTCGGGG
	探针	FAM-AGCTGCCTGACGGTCAGGTCATCACTATC-TAMRA

1.2.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平

提取细胞总蛋白用于检测蛋白相对表达量。利用BCA蛋白定量确定蛋白浓度, 计算后取15 μg 蛋白在12%的SDS-PAGE凝胶中电泳分离, 随后转移到PVDF膜上, 转膜条件: 恒流220 mA, 140 min。转膜完成后的PVDF膜在5%的脱脂牛奶中室温封闭2 h。洗膜后在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境过夜孵育一抗, 隔天用TBST洗膜3次, 室温孵育羊抗鼠或羊抗兔二抗1.5 h, 随即洗膜进行化学发光显影。

1.2.9 细胞培养上清 LDH、SOD 活性检测

收集大鼠心肌H9C2细胞培养上清, 按试剂盒说明加入反应试剂, 产生颜色变化后, 通过酶标仪检测特定波长处的吸光度值, 比对标准曲线计算LDH、SOD的活力。

1.3 统计学处理

应用GraphPad Prism 8.0和SPSS 17.0统计

软件对实验数据进行统计分析, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用Student's *t*检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H9C2 心肌细胞 H/R 损伤模型的建立

与相应对照组相比, 分别缺氧3、6、12、24 h再复氧12 h处理后的H9C2心肌细胞活力明显降低($P<0.0001$); 且随着缺氧时间的增加, 细胞活力呈下降趋势。不同缺氧处理时间(3、6、12、24 h)均诱导了心肌细胞的凋亡, 随着缺氧时间的增加, 凋亡率逐渐升高。不同缺氧时间组的caspase-3活性较各自对照组均显著升高, 差异具有统计学意义($P=0.0092$ 、 0.0028 、 0.0316 、 0.0412), caspase-3活性在缺氧12 h达到峰值($P<0.05$, 图1)。

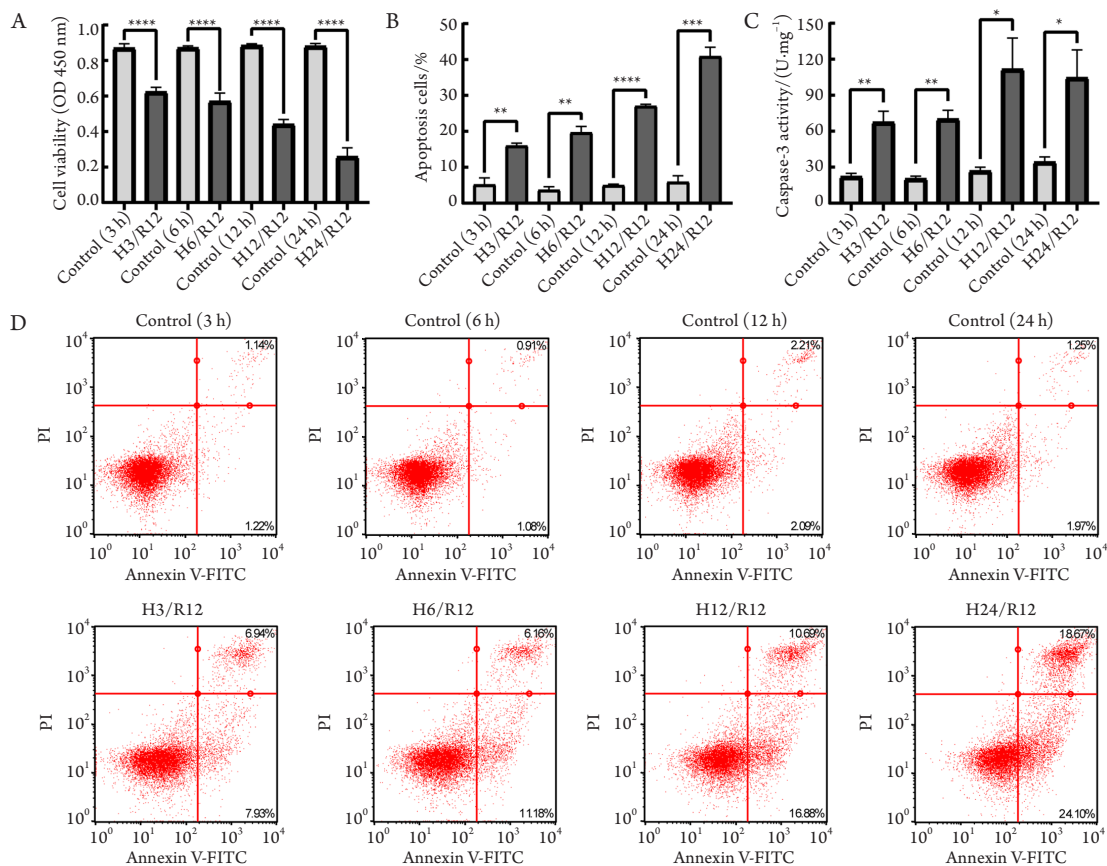


图1 H9C2心肌细胞H/R损伤模型的建立

Figure 1 Establishment of the H/R injury model of H9C2 cardiomyocytes

缺氧3、6、12、24 h再复氧12 h处理后的H9C2(A)细胞活力、(B、D)细胞凋亡率及(C)caspase-3活性。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

(A) The cell viability, (B, D) apoptosis rate and (C) caspase-3 activity of H9C2 cells after hypoxia for 3, 6, 12 h, 24 h/reoxygenation for 12 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

2.2 缺氧 6 h / 复氧 12 h(H6/R12) 诱导损伤的心肌细胞中 ApoM 和 S1PR1 表达水平的变化

与常氧对照组相比, H6/R12组心肌细胞中的 ApoM 和 S1PR1 的 mRNA 表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$, 图2)。

2.3 过表达 ApoM 的 H9C2 心肌细胞株的建立及 S1PR1 表达差异检测

空载慢病毒和携带 ApoM 基因的慢病毒均表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)。感染 72 h 后在荧光显微镜下观察到携带 EGFP 的慢病毒成功感

染到 H9C2 细胞株中。经 mRNA 和蛋白水平验证, ApoM-OE 组的 ApoM 表达水平与对照组相比显著升高($P < 0.0001$)。同时, ApoM-OE 组 S1PR1 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.001$, 图3)。

2.4 过表达 ApoM 对 H/R 诱导损伤的心肌细胞存活率、LDH 及 SOD 活性的影响

与对照组比较, H6/R12 处理后的 H9C2 心肌细胞存活率明显降低($P < 0.0001$), 心肌细胞培养上清中的 LDH 活性升高($P < 0.001$), SOD 活性显著降低($P < 0.0001$); 过表达 ApoM 对心肌细胞存活率、LDH 及 SOD 活性均无显著影响($P > 0.05$, 图4)。

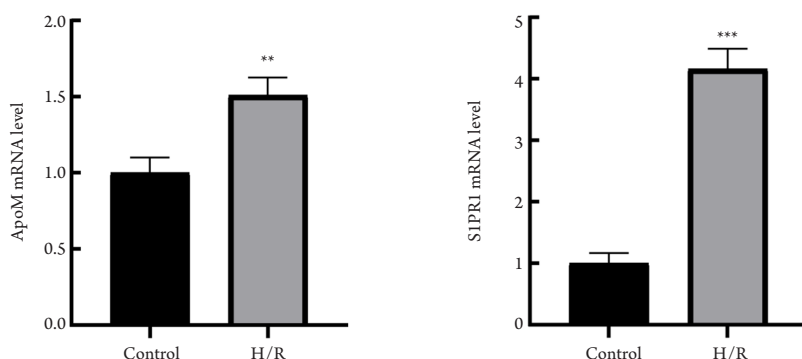


图2 ApoM和S1PR1在H6/R12的心肌细胞中表达情况(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 2 Expression levels of ApoM and S1PR1 in cardiomyocytes after hypoxia for H6/R12 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

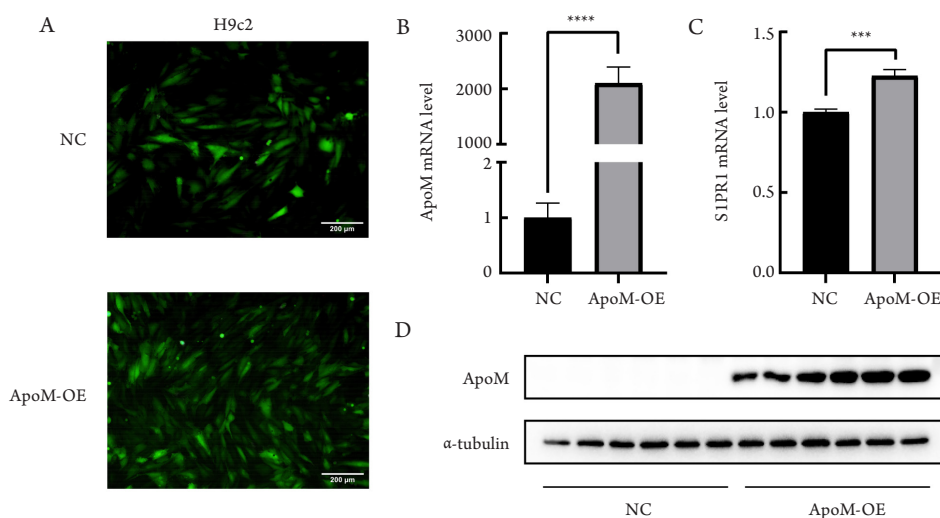


图3 ApoM过表达的H9C2心肌细胞株建立及ApoM和S1PR1在其中的表达情况

Figure 3 Establishment of ApoM-overexpressed H9C2 cardiomyocytes and detection of the expression levels of ApoM and S1PR1 (A)感染72 h后, 荧光显微镜下H9C2细胞株的感染效率($\times 100$); (B)ApoM mRNA表达水平; (C)S1PR1 mRNA表达水平; (D) ApoM蛋白表达水平。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

(A) Infection efficiency of H9C2 cell line under fluorescence microscope after 72 h ($\times 100$); (B) Expression level of ApoM mRNA; (C) Expression level of S1PR1 mRNA; (D) Expression level of ApoM protein. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

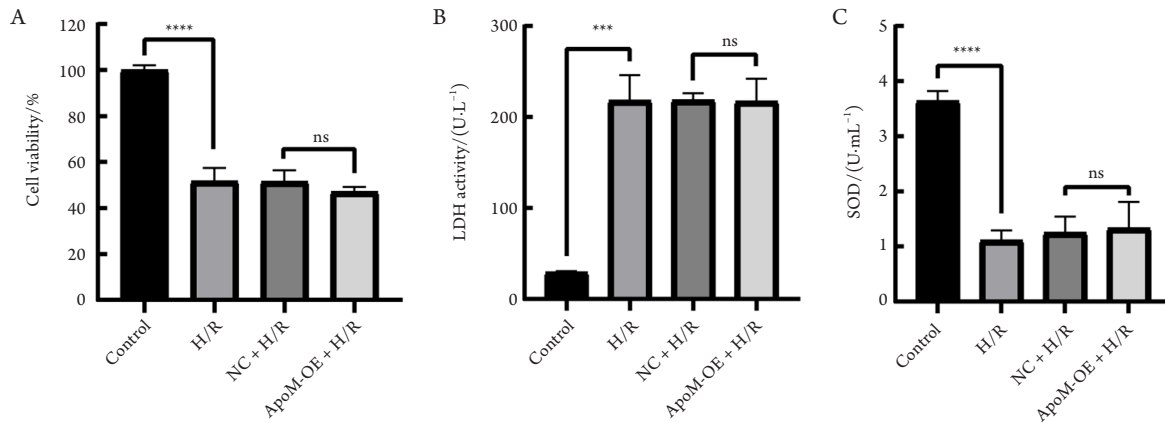


图4 ApoM对H/R诱导的心肌细胞损伤的影响

Figure 4 Effect of ApoM on H/R-induced cardiomyocytes injury

ApoM对H/R诱导损伤的(A)心肌细胞存活率、(B)LDH及(C)SOD活性的影响。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

Effect of ApoM on (A) the cell viability, (B) LDH and (C) SOD activity of injured cardiomyocytes after H/R. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.5 过表达 ApoM 对 H/R 诱导损伤的大鼠心肌细胞 cleaved caspase-3 和 caspase-3 水平的影响

与对照组相比, H6/R12组心肌细胞cleaved

caspase-3蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$), 过表达ApoM后, cleaved caspase-3和caspase-3表达水平无显著变化($P > 0.05$, 图5)。

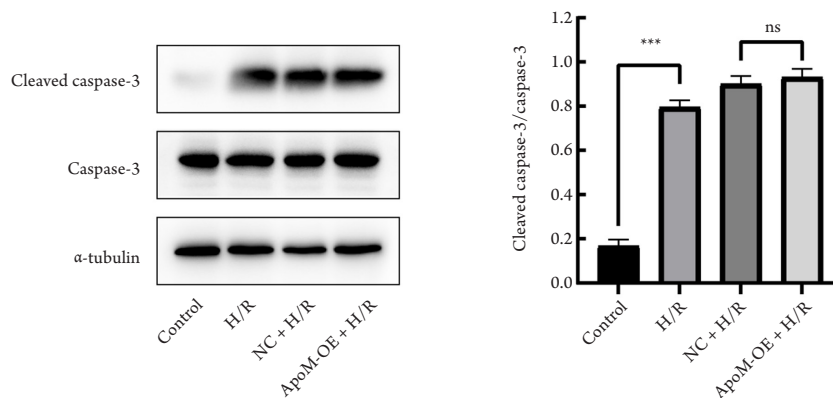


图5 过表达ApoM后H/R诱导损伤的心肌细胞cleaved caspase-3和caspase-3蛋白表达情况(*** $P < 0.001$)

Figure 5 Effect of ApoM on the expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 protein in injured cardiomyocytes after H/R (* $P < 0.001$)**

3 讨论

目前临床对于心肌缺血再灌注损伤尚无有效治疗方法, 尽管各种基础实验研究得到了可观的结果, 但在相应的临床研究中大多未出现理想的效果^[2]。氧自由基释放增加、细胞内Ca²⁺超载、过量ROS产生、线粒体通透性转换孔开放以及炎症反应等均参与了心肌缺血再灌注损伤的病理过程^[13]。缺血心肌恢复氧气和血流供应时, 产生大量的氧自由基, 超过机体清除氧化物的能力, 抗氧化物

SOD水平降低^[14]。同时, 细胞内Ca²⁺超载和炎症因子的激活也导致了细胞膜通透性增加, 心肌细胞发生结构和功能障碍, 心肌酶LDH从受损细胞中漏出, 最终造成心肌细胞的凋亡和坏死^[15]。

建立可靠的心肌细胞H/R损伤模型是开展心肌缺血再灌注损伤相关研究的有效方法。安宁包缺氧体系可以在1 h内将氧气降至0.1%, 同时将CO₂浓度稳定维持在约5%^[16]。本研究结果显示: 经安宁包体系缺氧3、6、12、24 h再复氧12 h后, 心肌细胞活力逐渐降低, 缺氧12 h/复氧12 h(H12/R12)

时已受到较严重的损伤, 细胞抑制率超过50%。细胞凋亡率和caspase-3活性在H/R处理后显著升高, 其中caspase-3活性在H12/R12达到峰值, 表明缺氧24 h/复氧12 h(H24/R12)时心肌细胞已进入凋亡晚期。而H6/R12时, 心肌细胞已发生明显凋亡且尚未发生严重的不可逆损伤, 因此选择H6/R12作为后续实验处理条件。

HDL中所含的ApoM是S1P的生理载体, S1P通过5种G蛋白偶联受体(S1PR1-5)作用于下游分子, 发挥生物学功能, 其中S1PR1被认为是心血管系统中起作用的最主要的受体^[17]。研究^[10,18]发现: ApoM基因敲除(ApoM^{-/-})小鼠HDL中不含S1P, 而与野生型小鼠相比, ApoM转基因(ApoM-Tg)小鼠的血浆S1P含量明显升高, 此外, ApoM可通过将S1P递送给内皮细胞的S1PR1, 发挥保护血管内皮和减轻炎症的作用^[19], 提示ApoM可能经S1P通路参与心血管系统的调节。本研究结果显示: 在H/R处理后, H9C2心肌细胞中ApoM和S1PR1的表达水平明显上调, 提示ApoM和S1PR1可能参与了H/R损伤的病理过程。H/R造成心肌细胞存活率明显下降, 细胞膜受损释放出细胞内LDH, 同时, 由于大量氧自由基产生, SOD水平下降, 心肌细胞抗氧化能力显著降低。ApoM过表达的H9C2细胞与对照组相比, S1PR1表达水平上调, 然而H/R处理后的心肌细胞存活率、LDH活性、SOD活性的差异均无统计学意义, 表明ApoM过表达没有减轻H/R诱导的心肌细胞损伤, 抗氧化能力也未得到缓解。Caspase-3的激活是细胞凋亡通路中的关键环节, 而在本研究中, ApoM过表达后, H/R诱导损伤的心肌细胞中cleaved caspase-3表达水平无明显变化, 说明ApoM对caspase-3的激活没有起到有效的抑制作用, 对H/R损伤的凋亡过程不产生影响。

尽管S1P对缺血再灌注的保护作用已被广泛报道, 但对于其详细机制尚有争议。Theilmeier等^[20]通过体内和体外实验证实HDL和S1P通过S1PR3和NO通路对心肌缺血再灌注损伤起保护作用。Yang等^[21]在体外试验中证实S1P/S1PR1经TGF- β /Smad3通路保护H/R诱导的心肌细胞损伤。Morel等^[10]报道S1P经S1PR2和S1PR3而不是S1PR1介导促进了Cx43-S368磷酸化, 从而减轻了心肌缺血再灌注损伤。而在最近的一项研究^[22]中, 研究者强调S1P通过S1PR3在心肌中的介导了2种相反的调节作用: 缺血心肌S1P释放增加发挥了心肌保护作用, 而经冠脉循环的S1P则加重了心肌的损伤。因此, ApoM高表达后可能经由S1P受体参与了心肌细胞H/R损伤过程, 随后在多种S1P受体的交互作用中

没有表现出明显的生物学影响。Swendeman等^[23]制备了一种可以持续激活S1P受体的重组ApoM融合蛋白ApoM-Fc, 发现注射ApoM-Fc的小鼠能抑制MIRI后中性粒细胞在梗死部位的积聚, 维持血管内皮稳态, 减轻心肌损伤。值得注意的是, 在另一项对转基因小鼠的研究^[10]中, 与野生型小鼠相比, 缺血再灌注处理后的ApoM-Tg小鼠心肌梗死面积减小, 但相反ApoM^{-/-}小鼠并未表现出更严重的损伤, 因此研究者认为, S1P在ApoM缺失的情况下, 仍可发挥其心肌保护作用。而我们基于细胞水平实验发现ApoM对心肌细胞的H/R损伤没有产生生物学影响, ApoM是否仅通过保护血管内皮间接地, 而不是直接地作用于心肌细胞发挥心脏保护功能及其中的详细机制尚有待进一步研究。

流行病学研究^[24]表明HDL-C水平与心血管疾病的发生风险呈负相关, 然而后续研究^[25]显示HDL-C的升高并不能降低心血管疾病发生率, 因此研究者们^[26]逐渐将视线转移到对HDL的组成成分的研究中。本研究基于安宁包体系构建心肌细胞H/R损伤模型, 结果表明HDL的重要组成部分——ApoM在心肌细胞H/R损伤中不发挥明显保护作用, 为ApoM、S1P和HDL的心肌保护作用相关研究提供了新的思考。

参考文献

1. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2021, 143(8): e254-e743.
2. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92-100.
3. Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, et al. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1143-1155.
4. Ruiz M, Frej C, Holmér A, et al. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein M limits endothelial inflammation by delivering sphingosine-1-phosphate to the sphingosine-1-phosphate receptor 1[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(1): 118-129.
5. Dahlbäck B, Nielsen LB. Apolipoprotein M—a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2006, 17(3): 291-295.
6. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2005, 11(4): 418-422.
7. Bisgaard LS, Christoffersen C. Apolipoprotein M/sphingosine-1-

- phosphate: novel effects on lipids, inflammation and kidney biology[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2019, 30(3): 212-217.
8. Zhu B, Luo GH, Feng YH, et al. Apolipoprotein M protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via sphingosine-1-phosphate signaling[J]. *Inflammation*, 2018, 41(2): 643-653.
 9. Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G. Protective effects of HDL against ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 2.
 10. Morel S, Christoffersen C, Axelsen LN, et al. Sphingosine-1-phosphate reduces ischaemia-reperfusion injury by phosphorylating the gap junction protein Connexin43[J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109(3): 385-396.
 11. Pedretti S, Brulhart-Meynet MC, Montecucco F, et al. HDL protects against myocardial ischemia reperfusion injury via miR-34b and miR-337 expression which requires STAT3[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218432.
 12. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
 13. Mihanfar A, Nejabati HR, Fattahi A, et al. The role of sphingosine 1 phosphate in coronary artery disease and ischemia reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2083-2094.
 14. Li C, Su Z, Ge L, et al. Cardioprotection of hydralazine against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 869: 172850.
 15. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/reperfusion[J]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1): 113-170.
 16. Wen J, Wang D, Cheng L, et al. The optimization conditions of establishing an H9c2 cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury model based on an AnaeroPack System[J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(4): 757-765.
 17. Sanna MG, Liao J, Jo E, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13839-13848.
 18. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(23): 9613-9618.
 19. Burg N, Swendeman S, Worgall S, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling maintains endothelial cell barrier function and protects against immune complex-induced vascular injury[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(11): 1879-1889.
 20. Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, et al. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor[J]. *Circulation*, 2006, 114(13): 1403-1409.
 21. Yang T, Zhang X, Ma C, et al. TGF- β /Smad3 pathway enhances the cardio-protection of S1R/S1P1 in in vitro ischemia-reperfusion myocardial cell model[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(1): 178-184.
 22. Wafa D, Koch N, Kovács J, et al. Opposing roles of S1P3 receptors in myocardial function[J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1770.
 23. Swendeman SL, Xiong Y, Cantalupo A, et al. An engineered S1P chaperone attenuates hypertension and ischemic injury[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(492): aal2722.
 24. Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD, et al. Risk factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; the Framingham study[J]. *Ann Intern Med*, 1964, 61: 888-899.
 25. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease[J]. *Lancet*, 2014, 384(9943): 618-625.
 26. Franczyk B, Rysz J, Ławiński J, et al. Is a high HDL-cholesterol level always beneficial?[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1083.

本文引用：程港丽，姚霜，施媛萍，张俊，罗光华，郑璐. 载脂蛋白M在心肌细胞缺氧/复氧损伤中的表达差异及其作用[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(4): 771-778. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.04.001

Cite this article as: CHENG Gangli, YAO Shuang, SHI Yuanping, ZHANG Jun, LUO Guanghua, ZHENG Lu. Expression difference and role of apolipoprotein M in hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(4): 771-778. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.04.001