

网络出版时间:2024-03-21 18:19:05 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.010

内皮素-1 调控 SOCC/TGF- β 参与房颤大鼠发生心房纤维化

贾卓然¹,代曼玉¹,梁士楚²,吴健¹,薛杨诚¹,张定欣¹,沈兵³,赵韧¹

摘要 **目的** 探讨内皮素-1(ET-1)对心房颤动(AF)大鼠心房纤维化的作用和机制。**方法** 14只成年雄性SD大鼠随机分配为对照(NC)组、房颤(AF)组;采用连续1周每日尾静脉注射1次氯化钙-乙酰胆碱混合液0.1 ml/100 g的方法建立AF大鼠模型,NC组同等方式注射等量生理盐水;各组均在第1天及第8天记录窦性或AF心电图,超声心动图监测心房大小和心功能;采用HE染色及Masson染色观察心房组织纤维化情况;采用Western blot法检测心房组织中内皮素-1(ET-1)、I型胶原(COL-I)、转化生长因子(TGF)- β 、钙库操纵性钙通道(SOCC)蛋白Orai1和基质相互作用分子1(STIM1)的表达;培养小鼠心房肌细胞HL-1细胞,以梯度浓度的ET-1处理24 h后,采用Western blot法观察HL-1细胞ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路中TGF- β 、Orai1及STIM1蛋白表达变化;利用siRNA转染方法敲低HL-1细胞中Orai1表达,以合适浓度的ET-1处理细胞24 h,Western blot检测HL-1细胞中TGF- β 蛋白的表达情况。**结果** 与NC组相

比,超声心动图显示AF大鼠心脏左房内径(LAD)增加($P < 0.05$);HE和Masson染色结果显示AF组大鼠心房组织纤维化($P < 0.05$),Western blot检测结果提示AF组心房组织中ET-1、Orai1、STIM1、TGF- β 、COL-I蛋白表达较NC组增加($P < 0.05$)。ET-1处理HL-1细胞后,HL-1细胞Orai1、STIM1、TGF- β 蛋白表达增多($P < 0.05$)。敲低HL-1细胞中Orai1表达后,ET-1的处理不再使TGF- β 的表达上调。**结论** AF大鼠心房组织ET-1表达增多,并通过ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路促进心房纤维化。

关键词 内皮素-1;心房颤动;心房纤维化;Orai1;基质相互作用分子1;TGF- β ;HL-1细胞

中图分类号 R 541.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0429-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.010

2024-02-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81970446)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230032

²四川大学华西医院心脏内科,成都 610041

³安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:贾卓然,女,硕士研究生;

赵韧,女,主任医师,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zhaoren@ahmu.edu.cn

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是最常见的心律失常,我国成年人AF患病率为1.6%,较之前明显升高^[1]。心房结构重构和电重构引发并维持AF,目前认为,心房纤维化是AF主要病理基础,但心房纤维化的发生发展的机制研究缺乏,对于心房纤维化的有效干预靶点仍有待探究。内皮素系统在维持心血管稳态中发挥重要作用,是治疗心血管系统疾病的重要靶标之一。大量研究^[2-4]发现,AF患者外

ability of A549 cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy individuals were isolated by density gradient centrifugation. After monocytes were removed by adhesion method, A549 cells pretreated with mitomycin C were co-cultured with PBMCs at 10:1 ratio. After 2 weeks, flow cytometry was used to detect the proportion of CD8⁺T cells and the expression levels of perforin and granzyme B. **Results** Compared with the control group, the proliferation inhibition rates of A549 cells increased after treatment with 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA for 24 h ($P < 0.01$). The IC₅₀ of DHA on A549 cells was 46.26 $\mu\text{mol/L}$. According to IC₅₀ concentration analysis, the inhibition rates of A549 cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DHA for 0, 24, 48 and 72h were 1.53%, 53.50%, 63.84% and 69.91%, and the cells inhibition rates of A548 cells increased compared with the previous observation time point, namely 0, 24 and 48 h ($P < 0.01$). The colony formation assay showed that the colony formation number of A549 cells in DHA treated group decreased compared with the control group ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that compared with the control group, the proportion of CD8⁺T cells induced by A549 cells in the co-culture system and the proportion of CD8⁺T cells expressing perforin and granzyme B were higher in DHA pretreatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** DHA inhibits the growth of NSCLC cells and promotes anti-tumor immune response of CD8⁺T cells induced by NSCLC cells.

Key words dihydroartemisinin; non-small cell lung cancer; tumor immunity; CD8⁺T cells; perforin; granzyme B

周血和心房组织内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 含量升高,参与心房纤维化过程。钙库操纵性钙内流是钙离子进入细胞内的主要模式之一,对细胞分化、增殖、凋亡具有重要调控作用,其中,钙感受器基质相互作用分子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1)、钙释放激活的钙通道蛋白 1 (calcium release-activated calcium channel protein 1, Orail) 是钙库操纵性钙通道 (store-operated calcium channels, SOCC) 的主要功能蛋白。研究^[5]表明 ET-1 通过介导胞外钙离子内流及胞内钙库释放调控胞浆钙离子浓度,最近的研究^[6]显示,SOCC 的激活参与 ET-1 在缺血再灌注过程中介导的冠脉收缩,但 SOCC 的激活是否参与 AF 心房纤维化过程及是否与 ET-1 调控相关尚不明确。该研究通过构建 AF 大鼠模型及体外 HL-1 细胞实验,研究 AF 心房结构变化及心房组织中 ET-1、Orail、STIM1、TGF- β 和 COL-1 蛋白表达情况,探究 ET-1 及 SOCC 在 AF 发生过程中的关联,并探讨 ET-1 对 AF 心房纤维化的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 经安徽医科大学伦理委员会批准(伦理学批号:No. LLSC20190530),14 只健康雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠来自安徽医科大学动物实验中心,体质量 220 g 左右,组间体质量无统计学差异,心率 450 次/分左右,窦性心律,依随机数字原则分为对照 (normal control, NC) 组、房颤 (atrial fibrillation, AF) 组,统一标准饲料喂养,自由饮水,动物实验室 12 h/12 h 明暗交替,湿度 50% 左右,温度维持在 24 °C 左右并通风良好。

1.1.2 主要试剂和仪器 ET-1 (货号:HY-P71446) 购自美国 MedChemExpress 公司;乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) (货号:A6625) 购自上海 Sigma-Aldrich 公司;氯化钙 (CaCl₂) (货号:ST365) 及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号:P0010) 购自上海碧云天生物科技有限公司;小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (货号:NS-028541) 购自北京梓熙生物科技有限公司;Orail siRNA (si Orail) 序列: sense (CCUCAACUCGGUCAAGAG), antisense (CUCUUUGACCGAGUUGAGG);一抗 Anti-TGF- β (货号:BF 8012)、ET-1 antibody (货号:DF6125)、Anti-Orail (货号:DF 7956)、Anti-GAPDH (货号:AF 7021)、山羊抗小鼠二抗 (货号:S0002) 及山羊抗

兔二抗 (货号:S0001) 购自美国 Affinity Biosciences 公司;STIM1 抗体 (货号:GTX54855) 购自美国 GeneTex 公司;一抗 Anti-COL1 (货号:R 26615) 购自 ZENBIO Biosciences 公司;一抗 Anti-Tubulin (货号:10094-1) 购自美国 Proteintech Biosciences 公司;HE 染色试剂盒 (货号:G 1120) 及 Masson 三色染色试剂盒 (货号:G 1340) 购自北京索莱宝生物科技有限公司;减血清培养基 (opti-minimal essential medium, Opti-MEM) (货号:31985070) 购自美国 Thermo Fisher Scientific Inc. US。小鼠心房肌细胞 HL-1 细胞 (货号:FH1101) 购自上海富衡生物科技有限公司。心脏超声仪器购自美国 General Electric Health-Care 公司 (型号:Vivid E95 Ultra Edition);体式辅助显微镜 (型号:BX53F2) 购自日本 Olympus Corporation;二氧化碳培养箱 (型号:HF90) 购自上海力康生物医疗科技控股有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠分组及 AF 模型构建 将 14 只 SD 大鼠随机分为 NC 组和 AF 组,每组 7 只。NC 组大鼠 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧固定于鼠板上,四肢伸展用绝缘弹力带牵拉固定,针形电极分别刺入四肢皮下,记录正常心电图。暴露大鼠尾静脉,静脉注射生理盐水 0.1 ml/100 g,每日尾静脉注射 1 次,连续注射 7 d,再次记录心电图;AF 组大鼠同样记录正常心电图后,暴露大鼠尾静脉,静脉注射 CaCl₂-Ach 混合液 0.1 ml/100 g (混合液浓度为 CaCl₂ 10 mg/ml + Ach 66 ug/ml 新鲜配制),每日尾静脉注射 1 次,连续注射 7 d,记录心电图,出现典型 AF 心电图表现说明模型构建成功 (P 波消失,代之以大小不等 f 波并持续时间 > 2 s)。

1.2.2 超声心动图 以 50 mg/kg 剂量腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠全身麻醉两组 SD 大鼠,胶带固定大鼠四肢,使其背部朝下仰卧于鼠板上,充分暴露心脏所在位置,除去表皮毛发,打开心脏超声仪器,准备完成后使用探头 (型号:12 s) 寻找大鼠心脏位置, M 型频谱扫描速度为 200 mm/s,测定左室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD) 及射血分数 (ejection fraction, EF), 计算左室分数缩短率 (fractional shortening, FS) = [(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100%。采用模式追踪法在胸骨旁长轴切面主动脉窦水平测量左房内径 (left atrium diameter, LAD), 计算模型建立前后 LAD、EF 及 FS 的差值,并分别表示为 Δ LAD、

ΔEF 及 ΔFS 。每项参数测量 3 次,计算平均值。

1.2.3 心房组织 HE 染色和 Masson 染色 以 50 mg/kg 剂量腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠全身麻醉两组 SD 大鼠,无菌手术器械打开胸腔,取出心脏,无菌 PBS 液冲洗后,置于显微镜下分离出心房组织,固定脱水后制备石蜡切片。HE 染色:将石蜡切片依次放入二甲苯醇 I 浸泡 10 min,无水二甲苯醇 II 浸泡约 10 min,无水二甲苯醇 III 浸泡 10 min 后用无水乙醇 I 浸泡 5 min,无水乙醇 II 浸泡 5 min 后,依次按照由高到低浓度梯度乙醇溶液浸泡 20 min,用苏木精液染液处理 5 min 后水洗 1 min,复用 0.5% 的盐酸乙醇分化液处理 30 s,水洗 1 min 后用碳酸锂蓝化处理 30 s,水洗 2 min,加伊红液染色处理 3 s,流水冲洗 1 min,依次按照由高到低浓度梯度的乙醇脱水后二甲苯冲洗使组织透明,滴加中性树胶,盖玻片封片,显微镜下观察。根据 Masson 染色试剂盒说明进行 Masson 染色。PBS 缓冲液清洗切片 3 次,每次 10 min,滴加铁苏木精染色液 4 min 后水洗,酸性乙醇溶液分化 10 s,Masson 蓝化液染色 3 min,再次水洗 1 min,丽春品红液染色 1 s,弱酸水冲洗 1 min,磷钼酸溶液分化 2 min,苯胺蓝染液染色 1 min,乙醇脱水后二甲苯冲洗使组织透明,滴加中性树胶封片,显微镜下观察。

1.2.4 Western blot 法检测心房组织 ET-1、Orai1、STIM1、TGF- β 和 COL-1 蛋白表达 取大鼠心房组织,加入适量裂解液,冰上研磨,4 °C,12 000 r/min,离心 20 min,取上清液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白含量,配平后行 Western blot 试验,转膜后 5% 脱脂牛奶室温孵育 PVDF 膜 2 h,之后加入稀释一抗 ET-1 (1 : 1 000), Orai1 (1 : 1 000), STIM1 (1 : 1 000), TGF- β (1 : 1 000), COL-1 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,洗膜后室温孵育相应稀释二抗(1 : 2 000) 2 h,PBST 洗膜后加入 ECL 显影液显影曝光。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值,检测各组心房组织中 ET-1、Orai1、STIM1、TGF- β 、COL-1 的相对蛋白表达水平。

1.2.5 细胞培养、分组和转染 复苏 HL-1 细胞,从液氮罐中取出细胞冻存管,37 °C 水浴解冻,1 000 r/min 离心 5 min 后,均匀接种于 60 mm 细胞培养皿,加入 10% 培养基约 2 ml,于 37 °C 恒温,5% CO₂ 细胞培养箱培养。细胞传代,第 3 代传代至 6 孔板,细胞贴壁程度至正常 70% 时进行细胞小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的转染,更换为 Opti-MEM。将 HL-1 细胞分为 4 组:NC 组(对照组)、ET-

1 组(ET-1 处理)、Si Orai1 组(Si Orai1 转染使 Orai1 表达降低)、ET-1 + Si Orai1 组(Si Orai1 转染使 Orai1 表达降低并使用 ET-1 处理)。以 lipofectamine 3000 为转染试剂,si Orai1 组加入 si Orai1 溶液,转染浓度为 100 nmol/L,置于 37 °C 恒温,5% CO₂ 培养箱继续培养,6 h 后更换新鲜 10% DMEM 培养基,转染 48 h 后进行 Orai1 蛋白表达量检测;ET-1 组使用 50 nmol/L 的 ET-1 处理 HL-1 细胞 24 h;ET-1 + Si Orai1 组即 HL-1 细胞在使用 Si Orai1 转染 48 h 后,使用 50 nmol/L 的 ET-1 处理 24 h;对照组细胞不做处理,置入 37 °C 恒温,5% CO₂ 培养箱培养 48 h。

1.2.6 Western blot 法检测细胞 Orai1、STIM1 和 TGF- β 蛋白表达 将细胞从培养箱中取出,冰上操作,吸尽原培养基后加入细胞裂解液,摇床震荡 20 min 充分裂解后转至 EP 管,4 °C 高速离心机 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行 BCA 蛋白定量后行 Western blot 实验,依次上样、电泳、转膜,转膜后 5% 脱脂牛奶室温孵育 PVDF 膜 2 h,之后加入稀释一抗 Orai1 (1 : 1 000), STIM1 (1 : 1 000), TGF- β (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,洗膜后加入相应稀释二抗(1 : 2 000) 室温孵育 2 h,均匀滴加显影液后曝光。用 ImageJ 软件分析条带灰度值检测蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 利用 GraphPad Prism 8 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AF 组与 NC 组大鼠心电图与超声心动图相关指标的比较 心电图记录结果显示 NC 组大鼠呈窦性心律(图 1A),AF 组大鼠可见典型 AF 心电图表现(图 1B);大鼠超声心动图数据显示,与 NC 组大鼠相比(0.028 ± 0.009) mm,AF 组大鼠左房 ΔLAD (0.119 ± 0.013) mm 增大($t = 5.75, P < 0.001$),而 ΔEF 、 ΔFS 两组差异无统计学意义($t = 1.70, 2.49$, 均 $P > 0.05$)。见图 1C。

2.2 AF 组大鼠心房组织病理变化情况 SD 大鼠心房组织 HE 及 Masson 染色结果显示,NC 组心肌细胞排列整齐,形状基本一致,AF 组可见大片蓝色胶原纤维沉积(图 2A),AF 组大鼠心房组织纤维化增加($t = 3.52, P < 0.05$)。见图 2B。

2.3 AF 组大鼠心房组织中 ET-1、COL-1、Orai1、STIM1 和 TGF- β 蛋白表达增多 利用 Western blot

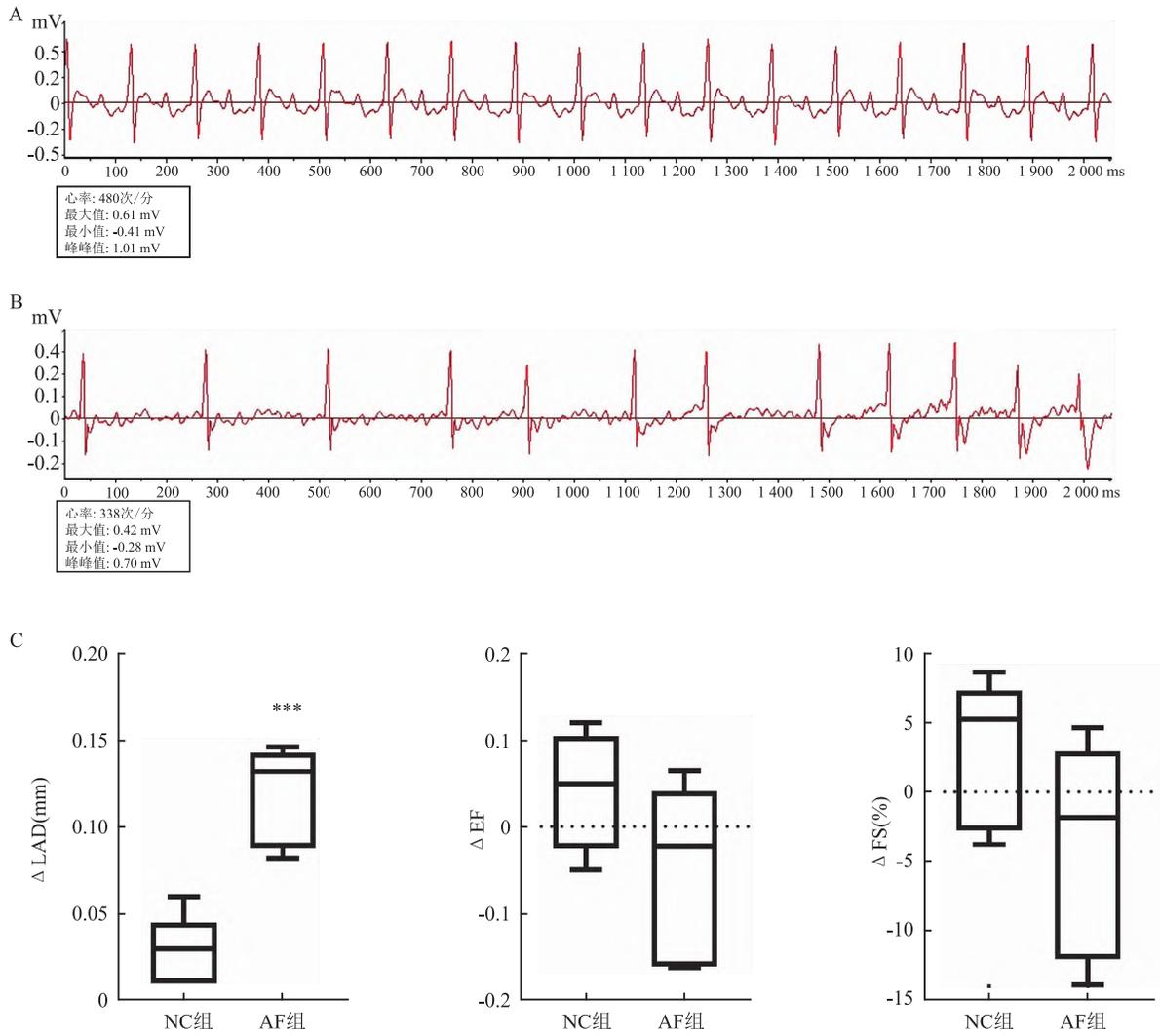


图1 两组大鼠心电图及超声心动图的比较

A: NC组窦性心律心电图;B: AF组为f波出现、P波消失典型的AF心电图;C: NC组和AF组模型建立前后LAD、EF及FS变化情况的比较;与NC组比较:*** $P < 0.001$

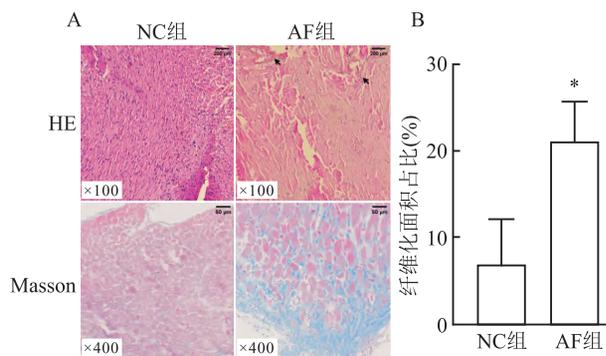


图2 两组大鼠心房组织纤维化情况的比较

A: NC组和AF组大鼠心房组织切片;B: NC组和AF组大鼠心房组织纤维化面积占比比较;与NC组比较: * $P < 0.05$

检测心房组织中 ET-1、纤维化相关蛋白 COL- I 及 TGF- β 表达情况与 SOCC 功能蛋白 Orai1、STIM1 表

达水平,结果显示,与 NC 组大鼠相比,AF 组大鼠心房组织中 ET-1、COL-1 及 TGF- β 蛋白表达增多($t = 2.92, 5.19, 2.45$, 均 $P < 0.05$),此外,AF 组心房组织中 Orai1、STIM1 蛋白表达也增多($t = 3.58, 5.21$, 均 $P < 0.01$)。见图 3。提示 AF 大鼠在 ET-1 蛋白表达增多的同时发生心房纤维化。

2.4 ET-1 对 HL-1 细胞 Orai1、STIM1、TGF- β 表达情况影响 Western blot 检测结果显示,HL-1 细胞接受浓度为 50 nm/L 的 ET-1 处理 24 h 后,Orai1、STIM1、TGF- β 的表达上调($t = 4.36, 4.85, 5.69$, 均 $P < 0.05$);当细胞中 SOCC 功能蛋白 Orai1 表达敲减后,ET-1 + Si Orai1 组细胞中 TGF- β 的表达与 NC 组差异无统计学意义,然而,相较于 ET-1 组,其表达呈下调趋势(图 4),提示 ET-1 促进 HL-1 细胞 TGF- β 的表达过程中,SOCC 功能蛋白参与其中。

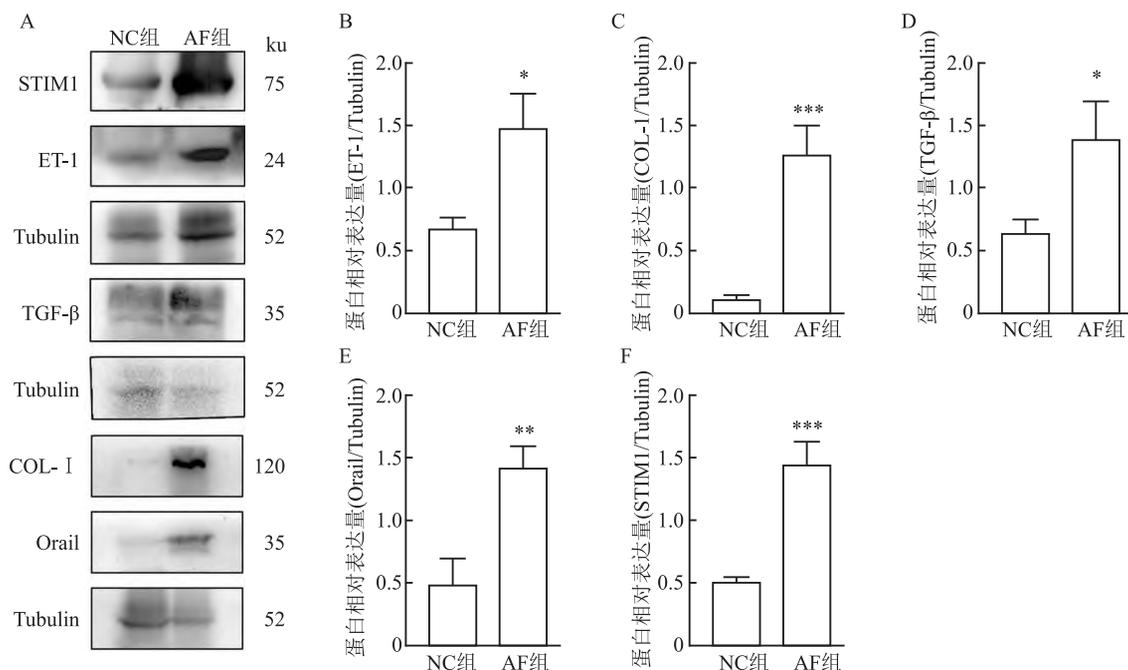


图3 两组大鼠心房组织中 ET-1、COL-I、Orail、STIM1 和 TGF-β 蛋白表达的比较

A: NC 组和 AF 组大鼠心房组织 ET-1、COL-I、Orail、STIM1 和 TGF-β 蛋白表达情况; B - F: NC 组和 AF 组大鼠 ET-1、COL-I、Orail、STIM1、TGF-β 蛋白灰度分析及相对表达水平比较; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

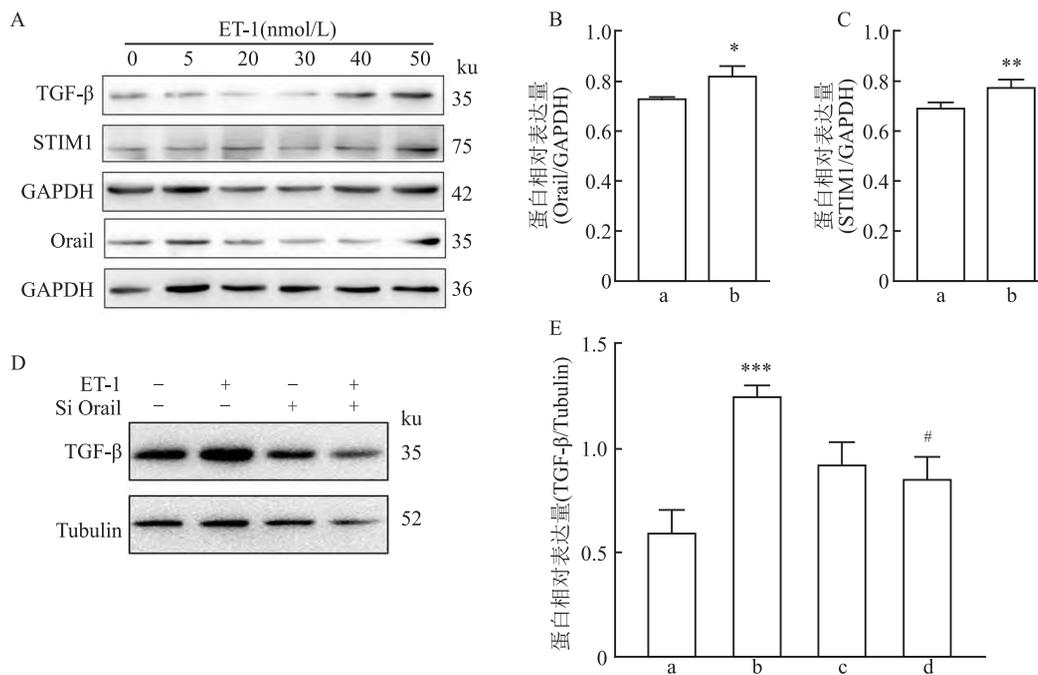


图4 ET-1 对 HL-1 细胞 Orail、STIM1 和 TGF-β 表达情况影响

A: 梯度浓度 ET-1 处理 HL-1 细胞后 Orail、STIM1、TGF-β 蛋白表达情况; B、C: NC 组和 ET-1 组 HL-1 细胞 Orail 和 STIM1 蛋白相对表达的比较; D、E: 各组 HL-1 细胞 TGF-β 蛋白相对表达的比较; a: NC 组; b: ET-1 组; c: Si Orail 组; d: ET-1 + Si Orail 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 ET-1 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

目前,心房结构重构、电重构、异常钙离子电流

和自主神经系统变化在 AF 的发生发展中发挥重要作用,其中以心房纤维化为主要表现的结构重构是 AF 发生和维持的关键^[7]。许多途径如肾素 - 血管

紧张素-醛固酮系统、氧化应激和信息传递途径能够调节心房纤维化, TGF- β 是其中一个关键调节器^[8]。当前研究^[9-10]表明, 沙库巴曲缬沙坦通过降低 TGF- β 表达和通过影响心房肌的钙离子通道抑制心房纤维化的进展。最新研究^[11]发现乳脂球-EGF 因子 8 通过负向调控 TGF- β /Smad2/3 抑制心房纤维化, 但具体作用机制尚不明确。临床上, AF 患者亟需改善心肌重构治疗新途径^[12], 但对于心房纤维化尚无明确的治疗策略, AF 患者心房纤维化的机制需要更多的探索与研究。本研究显示 AF 大鼠心房增大, 心房发生纤维化, 同时 ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路关键蛋白表达上调, 抑制 SOCC 的同时抑制了 HL-1 细胞中的 TGF- β 蛋白的表达, 初步表明了 ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路对心房纤维化的促进作用, 拮抗其中相关分子可能能够有效干预 AF 和心房纤维化进展。

ET-1 是人类重要的内皮素亚型之一, 主要由内皮细胞分泌, 可以作为细胞因子或与其受体结合在组织纤维化中发挥重要作用, 心脏中存在 ETA 和 ETB 受体, 其中内皮素受体拮抗剂波生坦已被证明可以减少高血压和修复性心肌纤维化动物模型中纤维化心肌的重构^[13]。最近研究^[2]表明, AF 患者血清 ET-1 水平显著升高, 与 AF 持续时间呈正相关, 且在射频消融术后复发的 AF 患者中 ET-1 水平较高, 表明 ET-1 在 AF 发生和维持过程中发挥重要作用。AF 患者心耳 ET-1 和 COL- I 表达及胶原纤维沉积增多, 且 COL- I 表达水平与 ET-1 表达水平呈正相关, 提示 ET-1 可能通过促进心房纤维化而参与 AF 的发生^[3], 但具体机制尚不明确。本研究显示 AF 大鼠心房组织中 ET-1 表达增加, HL-1 细胞培养后 ET-1 诱导 TGF- β 合成增加, 提示 ET-1/TGF- β 可能参与 AF 和心房纤维化的过程。

SOCC 与心肌纤维化的发生密切相关。Orail 和 STIM1 作为 SOCC 两个重要分子基础, 在心肌重构过程中发挥重要作用。药理研究^[14]表明, SOCC 和非选择性阳离子通道是 ET-1 诱导平滑肌收缩、丝裂原活化蛋白激酶磷酸化和花生四烯酸释放的重要钙内流途径。但 ET-1 诱导的心肌纤维化过程中, SOCC 是否参与其中尚不明确。最近研究^[15]表明, Orail 介导的 Ca^{2+} 内流的上调, 增强人心房成纤维细胞的增殖和迁移能力。本研究显示 HL-1 细胞中 Orail 表达降低后 ET-1 的诱导不再使 TGF- β 蛋白表达水平升高, 表明 Orail 参与 ET-1 诱导心房纤维化的过程。

综上所述, 本研究探索了通过 ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路促进 AF 大鼠发生心房纤维化, 拮抗该信号通路中相关分子如 Orail 可能会有效干预心房纤维化在 AF 发生中的进展。此结果为改善 AF 患者心房纤维化提供了新的治疗方向与药物靶点。然而 ET-1 是作为细胞因子或是与其受体结合调控 SOCC/TGF- β 尚未得到具体研究, 因此也将成为下一步实验的研究重点。

参考文献

- [1] Shi S, Tang Y, Zhao Q, et al. Prevalence and risk of atrial fibrillation in China: a national cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2022, 23:100439.
- [2] 高琦, 耿嘉逸, 丁洋洋, 等. 内皮素-1 和结缔组织生长因子在心房颤动患者中高表达并与射频消融术后的复发相关 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(11): 1689-96.
- [3] Mayyas F, Niebauer M, Zurick A, et al. Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size, and fibrosis in patients with structural heart disease [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3(4):369-79.
- [4] Wu S, Yang Y M, Zhu J, et al. The association between plasma big endothelin-1 levels at admission and long-term outcomes in patients with atrial fibrillation [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 272:1-7.
- [5] Chuang T Y, Au L C, Wang L C, et al. Potential effect of resistin on the ET-1-increased reactions of blood pressure in rats and Ca^{2+} signaling in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4):1610-8.
- [6] Calderón-Sánchez E M, Ávila-Medina J, Callejo-García P, et al. Role of Orail and L-type $\text{CaV}1.2$ channels in endothelin-1 mediated coronary contraction under ischemia and reperfusion [J]. *Cell calcium*, 2020 (86):102157.
- [7] Sohns C, Marrouche N F. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis [J]. *Eur Heart J*, 2020;41(10):1123-31.
- [8] Ma J, Chen Q, Ma S. Left atrial fibrosis in atrial fibrillation: mechanisms, clinical evaluation and management [J]. *J Cell Mol Med*, 2021;25(6):2764-75.
- [9] Jia T, Wang X, Tang Y, et al. Sacubitril ameliorates cardiac fibrosis through inhibiting TRPM7 channel [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:760035.
- [10] Li L Y, Lou Q, Liu G Z, et al. Sacubitril/valsartan attenuates atrial electrical and structural remodeling in a rabbit model of atrial fibrillation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 881:173120.
- [11] Ge Z, Chen Y, Wang B, et al. MFGES8 attenuates Ang-II-induced atrial fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation through inhibition of TGF- β 1/Smad2/3 pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 139:164-75.
- [12] Bizhanov K A, Abzaliyev K B, Baimbetov A K, et al. Atrial fibrillation: epidemiology, pathophysiology, and clinical complications (literature review) [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2023, 34(1):153-65.

- [13] Jiang F, Liu G S, Dusing G J, et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses[J]. *Redox Biol*,2014,2:267-72.
- [14] Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N. Involvement of phospholipase C in endothelin 1-induced stimulation of Ca²⁺ channels and basilar artery contraction in rabbits[J]. *J Neurosurg*,2006,105(2):288-93.
- [15] Lee T W, Chung C C, Lee T I, et al. Fibroblast growth factor 23 stimulates cardiac fibroblast activity through phospholipase C-mediated calcium signaling[J]. *Int J Mol Sci*,2021,23(1):166.

Endothelin-1 regulates SOCC/TGF- β and involved in atrial fibrosis in rats with atrial fibrillation

Jia Zhuoran¹, Dai Manyu¹, Liang Shichu², Wu Jian¹, Xue Yangcheng¹, Zhang Dingxin¹, Shen Bing³, Zhao Ren¹

(¹Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041; ³Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of endothelin-1 (ET-1) on atrial fibrosis in Atrial fibrillation (AF) rats. **Methods** Fourteen adult male SD rats were randomly divided into normal control (NC) group and Atrial fibrillation (AF) group. The rat model of Atrial fibrillation was established by injecting 0.1 ml/100g CaCl₂-ACh mixture into the tail vein once a day for one week. The control group was injected with the same dose of normal saline. An electrocardiogram of normal or atrial fibrillation was recorded on the first day and the eighth day in each group, and echocardiography was used to monitor atrial size and cardiac function. The fibrosis of atrial was observed using Masson and HE staining. The expression of endothelin-1 (ET-1), collagen-I (Col-I), transforming growth factor- β (TGF- β) and the store operated calcium channel (SOCC) protein Orai1, stromal interaction molecule 1 (STIM1) in atrial tissue were detected by Western blot. HL-1 cells were cultured and treated with gradient concentration of ET-1 for 24 hours. Western blot was used to observe changes in the expression of TGF- β , Orai1 and STIM1 proteins in ET-1/SOCC/TGF- β signaling pathway of HL-1 cells. Small interfering RNA (siRNA) transfection method was used to knock down the expression of Orai1 in HL-1 cells, then the cells were treated with appropriate concentrations of ET-1 for 24 hours, and the expression of TGF- β protein in HL-1 cells was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, echocardiography showed a significant increase in left atrial diameter (LAD) of the heart in atrial fibrillation rats ($P < 0.05$). The HE and Masson staining results showed significant fibrosis in the myocardial tissue of AF group rats ($P < 0.05$), and the Western blot results indicated the expression of ET-1, Orai1, STIM1, TGF- β and COL-I in the myocardial tissue of AF group significantly increased compared to the NC group ($P < 0.05$). After ET-1 treatment of HL-1 cells, the protein expression of Orai1, STIM1 and TGF- β increased ($P < 0.05$), while knocking down Orai1 in HL-1 cells, ET-1 treatment no longer caused the expression of TGF- β a significant upregulation. **Conclusion** AF caused by atrial fibrillation results in a significant increase in ET-1 expression in atrial tissue, and ET-1/SOCC/TGF- β signal pathway promotes atrial fibrillation and fibrosis.

Key words endothelin-1; atrial fibrillation; atrial fibrosis; Orai1; STIM1; TGF- β ; HL-1 cell