

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.08.005

◇ 药学研究 ◇

西格列汀对高糖诱导内皮细胞凋亡的改善作用及机制研究

丰磊¹, 张婷², 张金金¹, 赵岚¹作者单位:¹南阳油田总医院内分泌科, 河南 南阳 473132;²南阳医学高等专科学校基础医学部, 河南 南阳 473000

通信作者: 赵岚, 女, 主任医师, 研究方向为糖尿病, 骨质疏松, E-mail: xyj196609@163.com

摘要: **目的** 研究西格列汀对高糖诱导内皮细胞凋亡的改善作用及机制。 **方法** 培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)并分组, 对照组用含有 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 处理, 高糖组用含有 33.3 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 处理, 西格列汀组用含有 33.3 mmol/L 葡萄糖及 20 μ mol/L 西格列汀的 DMEM 处理, 西格列汀+LY 组用含有 33.3 mmol/L 葡萄糖、20 μ mol/L 西格列汀、10 μ mol/L LY294002 的 DMEM 处理。检测各组细胞凋亡率及细胞中凋亡基因、人磷酸化磷酸肌醇 3 激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)的表达量。 **结果** 高糖组的细胞凋亡率及 Cleaved-caspase-9 [0.91 (0.71, 1.12) 比 0.43 (0.34, 0.59)]、Cleaved-caspase-3 [0.75 (0.67, 0.93) 比 0.45 (0.36, 0.58)] 的蛋白表达量明显高于对照组, B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) [0.23 (0.17, 0.36) 比 0.60 (0.45, 0.72)]、p-PI3K [0.40 (0.22, 0.61) 比 0.94 (0.78, 1.21)]、p-AKT [0.27 (0.13, 0.34) 比 0.66 (0.40, 0.79)] 的蛋白表达量明显低于对照组; 西格列汀组的细胞凋亡率及 Cleaved-caspase-9 [0.32 (0.26, 0.43) 比 0.91 (0.71, 1.12)]、Cleaved-caspase-3 [0.34 (0.24, 0.48) 比 0.75 (0.67, 0.93)] 的蛋白表达量明显低于高糖组, Bcl-2 [0.69 (0.58, 0.83) 比 0.23 (0.17, 0.36)]、p-PI3K [0.87 (0.67, 0.99) 比 0.40 (0.22, 0.61)]、p-AKT [0.65 (0.48, 0.73) 比 0.27 (0.13, 0.34)] 的蛋白表达量明显高于高糖组; 西格列汀+LY 组的细胞凋亡率及 Cleaved-caspase-9 [0.72 (0.58, 0.86) 比 0.32 (0.26, 0.43)]、Cleaved-caspase-3 [0.68 (0.54, 0.73) 比 0.34 (0.24, 0.48)] 的蛋白表达量明显高于西格列汀组, Bcl-2 [0.37 (0.29, 0.45) 比 0.69 (0.58, 0.83)]、p-PI3K [0.49 (0.34, 0.58) 比 0.87 (0.67, 0.99)]、p-AKT [0.32 (0.24, 0.38) 比 0.65 (0.48, 0.73)] 的蛋白表达量明显低于西格列汀组。 **结论** 西格列汀能够抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡且该作用与激活 PI3K/AKT 通路有关。

关键词: 降血糖药; 高血糖症; 细胞凋亡; 内皮细胞; 西格列汀; PI3K/AKT 通路

Improvement and mechanisms of sitagliptin on high glucose induced apoptosis of endothelial cells

FENG Lei¹, ZHANG Ting², ZHANG Jinjin¹, ZHAO Lan¹Author Affiliations: ¹Department of Endocrinology, General Nanyang Oil Field Hospital, Nanyang, Henan 473132, China;²Department of Basic Medicine, Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: Objective To study the improvement effect and mechanism of sitagliptin on high glucose induced apoptosis of endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and grouped. The control group was treated with DMEM containing 5.5 mmol/L glucose, the high glucose group was treated with DMEM containing 33.3 mmol/L glucose, the sitagliptin group was treated with DMEM containing 33.3 mmol/L glucose and 20 μ mol/L sitagliptin, and the sitagliptin+LY group was treated with DMEM containing 33.3 mmol/L glucose, 20 μ mol/L sitagliptin and 10 μ mol/L LY294002. The apoptotic rate and the expression of apoptotic genes, p-PI3K and p-AKT were detected. **Results** The apoptotic rate and the expression of Cleaved-caspase-9 [0.91 (0.71, 1.12) vs. 0.43 (0.34, 0.59)] and Cleaved-caspase-3 [0.75 (0.67, 0.93) vs. 0.45 (0.36, 0.58)] in high glucose group were significantly higher than those in control group, while the expression of Bcl-2 [0.23 (0.17, 0.36) vs. 0.60 (0.45, 0.72)], p-PI3K [0.40 (0.22, 0.61) vs. 0.94 (0.78, 1.21)] and p-AKT [0.27 (0.13, 0.34) vs. 0.66 (0.40, 0.79)] were significantly lower than those in control group. The apoptotic rate and the expression of Cleaved-caspase-9 [0.32 (0.26, 0.43) vs. 0.91 (0.71, 1.12)] and Cleaved-caspase-3 [0.34 (0.24, 0.48) vs. 0.75 (0.67, 0.93)] in sitagliptin group were significantly lower than those in high glucose group, and the expression of Bcl-2 [0.69 (0.58, 0.83) vs. 0.23 (0.17, 0.36)], p-PI3K [0.87 (0.67, 0.99) vs. 0.40 (0.22, 0.61)] and p-AKT [0.65 (0.48, 0.73) vs. 0.27 (0.13, 0.34)] were significantly lower than those in control group. The apoptotic rate and the expression of Cleaved-caspase-9 [0.72 (0.58, 0.86) vs. 0.32 (0.26, 0.43)] and Cleaved-caspase-3 [0.68 (0.54, 0.73) vs. 0.34 (0.24, 0.48)] in Sitagliptin+LY group were significantly higher than those in Sitagliptin group, while the expression levels of Bcl-2 [0.37 (0.29, 0.45) vs. 0.69 (0.58, 0.83)], p-PI3K [0.49 (0.34, 0.58) vs. 0.87 (0.67, 0.99)] and p-AKT [0.32 (0.24, 0.38)]

vs. 0.65 (0.48, 0.73)] were significantly lower than those in Sitagliptin group. **Conclusion** Sitagliptin can inhibit high glucose induced apoptosis of endothelial cells, which is related to the activation of PI3K/AKT pathway.

Key words: Hypoglycemic agents; Hyperglycemia; Apoptosis; Endothelial cells; Sitagliptin; PI3K/AKT pathway

动脉粥样硬化是2型糖尿病病人常见的并发症之一,同时也是增加心肌梗死、脑梗死等疾病发生风险的独立危险因素。内皮细胞位于血管最内层、是血管与血液循环之间的第一道防线,高糖诱导内皮细胞凋亡是糖尿病病人发生动脉粥样硬化的重要病理环节,针对内皮细胞凋亡进行干预是防治糖尿病病人动脉粥样硬化的有效靶点^[1-2]。西格列汀是近年来广泛用于降糖治疗的二肽基肽酶4(DPP4)抑制剂,通过抑制DPP4活性、增加胰高血糖素样肽-1的含量来起到降糖作用^[3]。已有研究报道,西格列汀能够在高糖环境下增加内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶的表达^[4],提示西格列汀可能在高糖环境下发挥内皮保护作用,但具体的保护效应及机制尚未明确。为此,本研究自2018年4月至2019年4月以人脐静脉内皮细胞(HUVECs)为对象,分析了西格列汀对高糖诱导HUVECs凋亡的改善作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HUVECs细胞株购自中科院上海细胞资源中心,在液氮中冷冻保存。

1.1.2 试剂 西格列汀购自默沙东公司,磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抑制剂LY294002购自Sigma公司,TUNEL凋亡染色试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司,B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3、PI3K、AKT、人磷酸化磷酸肌醇3激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)的单克隆一抗购自Abcam公司。

1.1.3 仪器 荧光显微镜购自Nikon公司,化学显影仪购自Bio-rad公司。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs培养、分组及给药 HUVECs用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM进行贴壁培养,每2天更换1次培养液,细胞长至80%后用0.25%胰蛋白酶消化细胞,传代接种在培养板内并分组。对照组用含有5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM处理,高糖组用含有33.3 mmol/L葡萄糖的DMEM处理,西格列汀组在33.3 mmol/L高糖的基础上参照戴尧^[3]的研究、用含有20 μ mol/L西格列汀的DMEM处理,西格列汀+LY组用含有33.3 mmol/L葡萄糖、20 μ mol/L西格列汀、10 μ mol/L LY294002的DMEM处理,每个条件设5个复孔,连

续处理24 h。

1.2.2 HUVECs凋亡检测 HUVECs接种在24孔板内,分组给药24 h后用TUNEL试剂盒进行染色,抗荧光猝灭封固液封固后在荧光显微镜下观察,对绿色荧光的细胞和蓝色荧光的细胞进行计数,计算两者比值为细胞凋亡率。

1.2.3 HUVECs中Bcl-2、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3、p-PI3K、p-AKT表达检测 HUVECs接种在6孔板内,分组给药24 h后用RIPA裂解液裂解细胞、提取蛋白,BCA试剂盒对蛋白进行定量后取30 μ g蛋白样本进行蛋白质印迹法(Western blot)检测,将蛋白样本加入SDS-PAGE中,电泳后电转移至NC膜,用5%脱脂牛奶在室温封闭NC膜1 h,用Bcl-2、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3、PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT的单克隆一抗在4 $^{\circ}$ C孵育NC膜过夜。次日,用HRP标记的二抗在室温孵育NC膜1 h,最后加入ECL显影液、在化学显影仪中显影得到蛋白条带,根据条带的灰度值计算蛋白表达量。

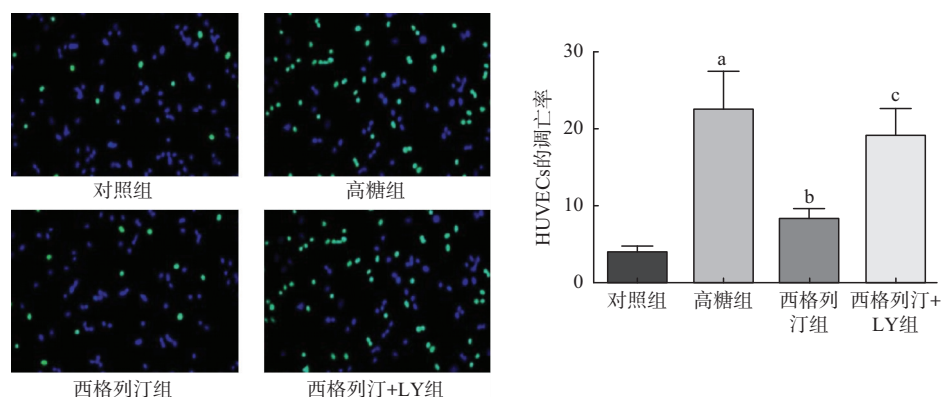
1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0软件录入数据,四组间计量资料的采用非参数检验(Kruskal-Wallis), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西格列汀对高糖条件下HUVECs凋亡的影响 与对照组比较,高糖组HUVECs的凋亡率明显增加($P < 0.05$);与高糖组比较,西格列汀组HUVECs的凋亡率明显减少($P < 0.05$);与西格列汀组比较,西格列汀+LY组的凋亡率明显增加($P < 0.05$)。见图1。

2.2 西格列汀对高糖条件下HUVECs中凋亡基因表达的影响 与对照组比较,高糖组HUVECs中Bcl-2的蛋白表达量明显减少,Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3的蛋白表达量明显增加($P < 0.05$);与高糖组比较,西格列汀组HUVECs中Bcl-2的蛋白表达量明显增加,Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3的蛋白表达量明显减少($P < 0.05$);与西格列汀组比较,西格列汀+LY组HUVECs中Bcl-2的蛋白表达量明显减少,Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3的蛋白表达量明显增加($P < 0.05$)。见图2,表1。

2.3 西格列汀对高糖条件下HUVECs中PI3K/AKT通路的影响 与对照组比较,高糖组HUVECs中p-PI3K、p-AKT的蛋白表达量明显减少($P < 0.05$);与高糖组比较,西格列汀组HUVECs中



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与西格列汀组比较,^c $P < 0.05$

图1 四组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡率的比较(荧光染色 $\times 100$)

p-PI3K、p-AKT的蛋白表达量明显增加($P < 0.05$);与西格列汀组比较,西格列汀+LY组 HUVECs 中 p-PI3K、p-AKT 的蛋白表达量明显减少($P < 0.05$)。见图3,表2。

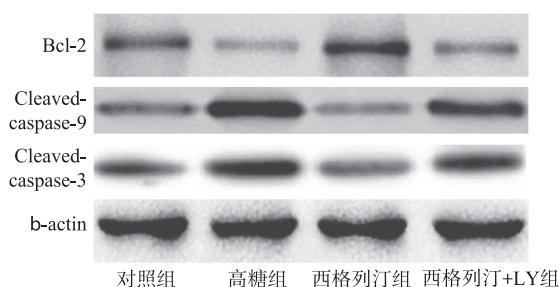


图2 四组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中Bcl-2、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3的蛋白条带

表1 四组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中Bcl-2、Cleaved-caspase-9、Cleaved-caspase-3蛋白表达的比较/ $M(P_{25}, P_{75})$

组别	孔数	Bcl-2	Cleaved-caspase-9	Cleaved-caspase-3
对照组	5	0.60(0.45,0.72)	0.43(0.34,0.59)	0.45(0.36,0.58)
高糖组	5	0.23(0.17,0.36) ^a	0.91(0.71,1.12) ^a	0.75(0.67,0.93) ^a
西格列汀组	5	0.69(0.58,0.83) ^b	0.32(0.26,0.43) ^b	0.34(0.24,0.48)
西格列汀+LY组	5	0.37(0.29,0.45) ^c	0.72(0.58,0.86) ^c	0.68(0.54,0.73) ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与西格列汀组比较,^c $P < 0.05$

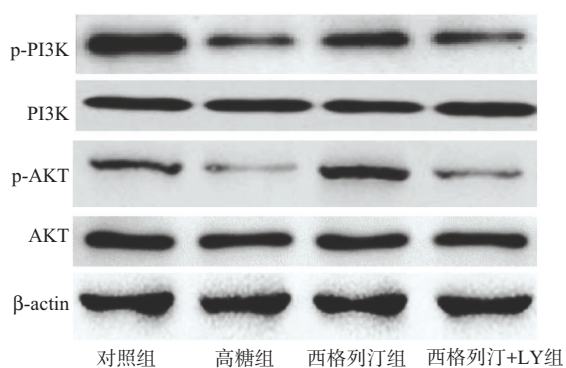


图3 四组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中p-PI3K、p-AKT的蛋白条带

表2 四组人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中p-PI3K、p-AKT蛋白表达的比较/ $M(P_{25}, P_{75})$

组别	孔数	p-PI3K	p-AKT
对照组	5	0.94(0.78,1.21)	0.66(0.40,0.79)
高糖组	5	0.40(0.22,0.61) ^a	0.27(0.13,0.34) ^a
西格列汀组	5	0.87(0.67,0.99) ^b	0.65(0.48,0.73) ^b
西格列汀+LY组	5	0.49(0.34,0.58) ^c	0.32(0.24,0.38) ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与西格列汀组比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

近年来,2型糖尿病的发病率呈不断升高的趋势,相应糖尿病并发症的发病人数也不断增多,严重危害国民的生命健康^[5]。动脉粥样硬化是糖尿病常见的血管并发症,以动脉粥样斑块形成为基本特征,可增加心肌梗死、脑梗死等心脑血管疾病的发生风险。血管内皮细胞的损伤是造成动脉粥样硬化发生的重要因素,糖尿病发生发展过程中内皮细胞的损伤与持续高糖环境的刺激有关^[6]。多项研究证实,高糖条件能够引起内皮细胞发生凋亡^[7-9],这也是高糖刺激内皮细胞损伤的可能途径。本实验以HUVECs为对象、用高糖条件刺激后得到了与既往其他报道一致的结果,即高糖组HUVECs的凋亡率明显高于对照组。因此,抑制高糖诱导的HUVECs凋亡也被越来越多的学者视为防治糖尿病血管并发症的靶点。

西格列汀是一类二肽基肽酶4抑制剂,通过抑制二肽基肽酶4对胰高血糖素样肽-1的降解来增加体内胰高血糖素样肽-1的水平,进而通过胰高血糖素样肽-1的生物学活性来起到降糖作用。新近的多项研究报道,胰高血糖素样肽-1具有内皮保护作用^[10-11];国内戴尧的研究证实,西格列汀能够在高糖环境下增加内皮细胞中诱导型一氧化氮合酶的表达^[4],提示西格列汀可能也具有内皮保护作用。本实验在高糖条件下用西格列汀对HUVECs进行干

预,观察凋亡率发现:西格列汀组 HUVECs 的凋亡率明显低于高糖组,说明西格列汀能够抑制高糖诱导的 HUVECs 凋亡、具有内皮细胞作用。

线粒体途径凋亡是目前已知在高糖环节下与内皮细胞凋亡密切相关的凋亡机制,Bcl-2 基因是调控该凋亡途径的关键基因^[12-13]。Bcl-2 基因的编码产物定位于线粒体外膜,能够抑制线粒体内细胞色素 C 向细胞质的释放;进入细胞质的细胞色素 C 能够使 pro-caspase-9 裂解为有活性的 cleaved-caspase-9,后者通过一系列级联反应使 pro-caspase-3 裂解为有活性的 cleaved-caspase-3,进而引起细胞凋亡。Bcl-2 通过抑制细胞色素 C 的释放来起到抗凋亡作用^[14-15]。在本研究中,高糖刺激后 HUVECs 中 Bcl-2 的表达减少,cleaved-caspase-9 及 cleaved-caspase-3 的表达增多;在用西格列汀处理后,HUVECs 中 Bcl-2 的表达增多,cleaved-caspase-9 及 cleaved-caspase-3 的表达减少,与细胞凋亡率的变化趋势一致,进一步证实西格列汀能够抑制高糖诱导的 HUVECs 凋亡。

在明确西格列汀对高糖诱导的 HUVECs 凋亡具有抑制作用后,本研究进一步分析了西格列汀发挥该作用的分子机制。PI3K/AKT 通路是具有促增殖、抗凋亡作用的信号通路,PI3K 及 AKT 以磷酸化的形式发生活化后能够调节下游 Bcl-2、4EBP1 等基因的表达,进而促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[16-17]。本实验的分析证实,高糖组细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达明显减少,西格列汀干预后细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达明显增加,说明西格列汀对 HUVECs 的 PI3K/AKT 通路具有激活作用。在西格列汀干预的同时联用 PI3K 的抑制剂 LY294002 后,西格列汀降低细胞凋亡率及 cleaved-caspase-9、cleaved-caspase-3 表达、增加 Bcl-2 表达的作用发生逆转,由此证实西格列汀对 HUVECs 中 PI3K/AKT 通路的激活介导了其抑制凋亡的效应。

综上所述,西格列汀能够抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡且该作用与激活 PI3K/AKT 通路有关,未来可设计临床研究来观察西格列汀对糖尿病病人动脉粥样硬化的防治作用。

参考文献

- [1] PI X, XIE L, PATTERSON C. Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis [J]. *Circ Res*, 2018, 123(4): 477-494.
- [2] KNAPP M, TU X, WU R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 1-8.
- [3] 刘丹, 吴红艳. 西格列汀治疗脆性糖尿病的有效性及其安全性观察 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(5): 954-957.
- [4] 戴尧, 林先和, 戴东生. 西格列汀对人主动脉内皮细胞内皮素 1 及一氧化氮合酶的影响及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 114-118.
- [5] 蒋晓飞. 老年糖尿病患者慢性并发症及影响因素分析 [J]. *安徽医学*, 2017, 38(7): 923-924.
- [6] KAUR R, KAUR M, SINGH J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 121.
- [7] BMMERT TD, HIJMANS JG, REIAKVAM WR, et al. High glucose derived endothelial microparticles increase active caspase-3 and reduce microRNA-Let-7a expression in endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(2): 1026-1029.
- [8] WU Y, LEE S, BOBADILLA S, et al. High glucose-induced p53 phosphorylation contributes to impairment of endothelial antioxidant system [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(9): 2355-2362.
- [9] CHEN Y, WANG Y, JIANG Y, et al. High-glucose treatment regulates biological functions of human umbilical vein endothelial cells via Sirt1/FOXO3 pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(9): 199.
- [10] ZHANG Q, XIAO X, ZHENG J, et al. A glucagon-like peptide-1 analog, liraglutide, ameliorates endothelial dysfunction through miRNAs to inhibit apoptosis in rats [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6567. DOI: 10.7717/peerj.6567.
- [11] XU J, WANG J, CHENG Y, et al. Glucagon-like peptide-1 mediates the protective effect of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor on renal fibrosis via reducing the phenotypic conversion of renal microvascular cells in monocrotaline-treated rats [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1864107. DOI: 10.1155/2018/1864107.
- [12] ZHANG J, GUO Y, GE W, et al. High glucose induces apoptosis of HUVECs in a mitochondria-dependent manner by suppressing hexokinase 2 expression [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 621-629.
- [13] ZHANG J, GUO Y, GE W, et al. High glucose induces the apoptosis of HUVECs in mitochondria dependent manner by enhancing VDAC1 expression [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(12): 725-728.
- [14] WIDLANSKY ME, HILL RB. Mitochondrial regulation of diabetic vascular disease: an emerging opportunity [J]. *Transl Res*, 2018, 202: 83-98.
- [15] GIULIANI A, CIRILLI I, PRATTICIZZO F, et al. The mitomiR/Bcl-2 axis affects mitochondrial function and autophagic vacuole formation in senescent endothelial cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(10): 2855-2873.
- [16] HUANG JJ, SHI YQ, LI RL, et al. Therapeutic ultrasound protects HUVECs from ischemia/hypoxia-induced apoptosis via the PI3K-Akt pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1990-1999.
- [17] ELSHAER SL, LEMTALI T, EL-REMESSY AB. High glucose-mediated tyrosine nitration of pi3-kinase: a molecular switch of survival and apoptosis in endothelial cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(4): 47.

(收稿日期: 2019-08-15, 修回日期: 2019-10-20)