

## 吡格列酮对高糖诱导下血管内皮细胞凋亡的影响

潘艳丽<sup>1)</sup>, 郭长策<sup>1)</sup>, 章秋<sup>2)</sup>

(1) 海军安庆医院内分泌科, 安徽 安庆 246003; 2) 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 安徽 合肥 230032)

[摘要] 目的 了解不同浓度吡格列酮 (pioglitazone, PIO) 对高糖诱导下血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 凋亡的保护作用, 并探讨其机制. 方法 将处于对数生长期的 VEC 随机分为 6 组, 分别为 A 组: 正常对照组 (Glu 5.5 mmol/L); B 组: 高糖组 (Glu 33 mmol/L); C 组: 高糖 + 低浓度 PIO 组 (PIO  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L); D 组: 高糖 + 中浓度 PIO 组 (PIO  $1 \times 10^{-6}$  mmol/L); E 组: 高糖 + 高浓度 PIO 组 (PIO  $1 \times 10^{-4}$  mmol/L); F 组: 高糖 + SP600125 组 (SP600125, 10.0  $\mu$ mol/L): (1) 采用 Annexin V/PI 双染法检测各组细胞凋亡率; (2) Western-blot 检测各组血管内皮细胞 JNK、p-JNK 蛋白的表达, 观察不同浓度 PIO 作用下 JNK 磷酸化水平的变化. 结果 (1) 与高糖组相比, 中浓度 PIO ( $1 \times 10^{-6}$  mmol/L) 及高浓度 PIO ( $1 \times 10^{-4}$  mmol/L) 均能使 VEC 凋亡均明显减少 ( $P < 0.05$ ), 呈浓度 - 效应依赖关系; (2) PIO 可明显抑制 VEC 内的 p-JNK 表达 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度 - 效应依赖关系. 与高糖组比较, JNK 抑制剂 SP600125 干预后 p-JNK 表达减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 结论 PIO 能够明显抑制高糖诱导引起的 VEC 凋亡. PIO 抑制血管内皮细胞凋亡的作用有可能是通过影响 JNK 通路来实现的.

[关键词] JNK; 血管内皮细胞; 高糖; 细胞凋亡; 吡格列酮

[中图分类号] R977.1+5 [文献标识码] A [文酮皮号] 2095-610X (2014) 09-0048-04

## Effect of Pioglitazone on High Glucose-induced Vascular Endothelial Cell Apoptosis

PAN Yan-li<sup>1)</sup>, GUO Chang-ce<sup>1)</sup>, ZHANG Qiu<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Endocrinology, The PLA Navy Anqing Hospital, Anqing Anhui 246003; 2) Dept. of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230032, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of pioglitazone (PIO) on vascular endothelial cell (VEC) apoptosis induced by the high glucose and its mechanism. Methods The VECs in the logarithmic growth were randomly divided into 6 groups: group A, normal control group (Glu 5.5 mmol/L); group B, cultured in high glucose group (Glu 33 mmol/L); group C, high glucose + low concentrations PIO group (PIO  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L); group D, high glucose + middle concentrations PIO group (PIO  $1 \times 10^{-6}$  mmol/L); group E, high glucose + high concentrations PIO group ( $1 \times 10^{-4}$  mmol/L); group F, 10.0  $\mu$ M SP600125 + PIO group (PIO  $1 \times 10^{-4}$  mmol/L). The apoptosis rate in each group was measured by Annexin V/PI double staining. The protein expressions of JNK and p-JNK in each group were detected by Western-Blot, and the change of JNK phosphorylation in high glucose-induced vascular endothelial cell under the action of PIO was observed. Results (1) Compared to the high glucose group, middle concentrations PIO ( $1 \times 10^{-6}$  mmol/L) and high concentrations PIO ( $1 \times 10^{-4}$  mmol/L) reduced the apoptosis of VEC obviously ( $P < 0.05$ ), in a dose-dependent manner. (2) PIO obviously decreased the phosphorylation level of JNK in high glucose group ( $P < 0.05$ ), and in a dose-dependent manner. Compared to high glucose group, JNK inhibitor SP600125 declined the level of phosphorylation, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). Conclusion PIO can obviously inhibit VEC apoptosis induced by high glucose, the inhibition effect of PIO may be achieved by affecting the JNK pathway.

[Key words] JNK; Vascular endothelial cells; High glucose; Cell apoptosis; Pioglitazone

[基金项目] 安徽省卫生厅科研基金资助项目 (2010B006); 安徽省科技厅自然科学基金资助项目 (1107040043)

[作者简介] 潘艳丽 (1985~), 女, 安徽安庆市人, 医学学士, 住院医师, 主要从事内分泌科临床工作.

糖尿病血管病变是糖尿病最常见也是最主要的并发症之一, 其中内皮细胞损伤及凋亡是糖尿病血管病变最早期的重要表现, 也是动脉粥样硬化发展的始动因子<sup>[1,2]</sup>。糖尿病引起内皮细胞凋亡, 可能与高糖能够激活 JNK 通路有关<sup>[3,4]</sup>。本研究通过建立体外高糖诱导的血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 凋亡模型, 加入 3 种不同浓度的吡格列酮 (pioglitazone, PIO) 对 VEC 进行干预, 观测 VEC 的细胞凋亡率以及磷酸化 JNK 表达的变化, 旨在探讨 PIO 对高糖诱导的血管内皮细胞凋亡的影响并进一步探讨其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

DMEM 低糖培养基为美国 Hyclone 公司产品。0.25% 胰蛋白酶为美国 Sigma 公司产品。SP600125, 细胞裂解液为碧云天生物技术研究产品。鼠 p-JNK 单克隆抗体 Sc-6254, 兔源性 JNKs 多克隆磷酸化抗体和总抗体,  $\beta$ -actin 单克隆鼠抗体 (一抗), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体和山羊抗鼠抗体 (二抗) 为美国 Santa Cruze 公司产品。ECL 发光试剂盒为美国 pierce 公司产品。凋亡试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司。吡格列酮为江苏恒瑞制药有限公司产品, 批号: 23020201。

### 1.2 血管内皮细胞的培养与分组

大鼠主动脉内皮细胞 VEC, 安徽中医学院药学院细胞中心提供。用含 20% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养液, 放入 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 1.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

取对数生长期的细胞, 制成单细胞悬液, 调整待测细胞浓度为  $5 \times 10^5 \sim 10^6$  个 /mL。取 1 mL 细胞 1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清。加入 1 mL 预冷 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮。1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清。重复 2 次, 将细胞重悬于 2 00  $\mu$ L Binding Buffer, 加入 10  $\mu$ L FITC - Annexin V 和 5  $\mu$ L PI 双标记后, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 采用磷脂酰丝氨酸外翻分析 (Annexin V 法) 与碘化丙啶 (PI) 核染法分析细胞凋亡及其程度。

### 1.4 Western-Blot 检测 JNK 和 p-JNK 表达

将 VEC 随机分成 6 组: A 组: 正常对照组 (Glu 5.5 mmol/L); B 组: 高糖组 (Glu 33 mmol/L); C 组: 低浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L); D 组: 中浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-6}$  mmol/L);

E 组: 高浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-4}$  mmol/L); F 组: SP600125 + 高糖组 (SP600125 10.0 Mm)。其中 F 组先用 10.0  $\mu$ M SP600125 预处理 1 h 再加高糖继续培养 18 h。提取细胞总蛋白, Western-Blot 检测各组 JNK、p-JNK 表达, 每组实验重复 3 次。

### 1.5 统计学处理

全部数据应用 SPSS 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 进行多组比较, LSD 或 SNK 检验进行两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PIO 对高糖诱导的 VEC 凋亡的影响 Annexin V/PI 双染介

与正常对照组相比, 高糖作用后 VEC 早期凋亡率、中晚期凋亡率及总凋亡率均明显增加。PIO 干预后可改善高糖对 VEC 凋亡的诱导作用, 使细胞凋亡数明显减少。PIO 不同浓度组与高糖组相比, 低浓度 PIO ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) 减少内皮细胞凋亡作用不明显 ( $P > 0.05$ ), 中浓度 PIO ( $1 \times 10^{-6}$  mmol/L) 及高浓度 PIO ( $1 \times 10^{-4}$  mmol/L) 均能使内皮细胞凋亡均明显减少 ( $P < 0.05$ ), 以高浓度组最为明显, 呈浓度 - 效应依赖关系, 见图 1、表 1。

### 2.2 PIO 对 JNK、p-JNK 水平的影响

与正常对照组相比, 高糖作用后虽然引起 VEC 的总 JNK 水平上升, 但无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 p-JNK 水平则明显上升, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PIO 干预后 p-JNK 表达减少, 与高糖组比较, 不同浓度 PIO 作用时 VEC 中 p-JNK 表达均减少 ( $P < 0.05$ ), 呈浓度 - 效应依赖关系。与高糖组比较, JNK 抑制剂 SP600125 干预后 p-JNK 表达减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2 ~ 4。

## 3 讨论

PIO 是噻唑烷二酮类 (TZDs) 的代表性药物, TZDs 是 PPAR  $\gamma$  的高选择性、高亲和性激动剂。研究表明<sup>[5,6]</sup>, TZDs 能抑制高胰岛素抵抗 (IR) 大鼠模型中血管再生, 同时血管内皮生长因子 (VEGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) 表达下降, 说明 TZDs 能通过抑制 VEGF、FGF 与 IR 介导的 VEC 增殖来抑制 VEC 再生和血管生成。有研究表明高糖及波动性高糖诱导的内皮细胞凋亡与线粒体的过氧化物过度产生有关<sup>[7]</sup>, 而 TZDs 类药物能下调线

粒体过氧化物的表达,抑制细胞的凋亡<sup>[8]</sup>. PIO预处理还可减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的人内皮祖细胞凋亡<sup>[9]</sup>.

本研究显示:与正常对照组相比,高糖作用后 VEC 早期凋亡率、中晚期凋亡率及总凋亡率明显增加. PIO 干预后可改善高糖对 VEC 凋亡的诱导作用,使 VEC 凋亡减少,其中低浓度 PIO ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) 减少 VEC 凋亡的作用不明显,而中浓度 PIO ( $1 \times 10^{-6}$  mmol/L) 及高浓度 PIO ( $1 \times 10^{-4}$  mmol/L) 均能使 VEC 凋亡均明显减少 ( $P < 0.05$ ),以高浓度组最为明显,呈一定的浓度-效应关系.

JNK 通路在细胞凋亡中的作用已逐渐被认识,遗传学研究证实 JNK 相互作用蛋白 1 (JNK-inter-acting protein, JIP1) 突变导致的 JNK 活性异常增高,是人类 2 型糖尿病的一个发病原因. Ho 等<sup>[10]</sup>研究发现,正常葡萄糖培养下的 VEC 不表达或很少表达 JNK,高糖则可使 JNK 活性和细胞凋亡数量显著增加. GW9662 是一种 PAPP- $\gamma$  拮抗剂,该拮抗剂能减弱罗格列酮对 JNK 的磷酸化作用,证明 TDZs 能上调 FGF 刺激的 VEGF 释放,而该作用是通过增强 JNK 的磷酸化来实现的<sup>[11]</sup>.

表 1 PIO 对高糖刺激下 VEC 细胞凋亡的保护作用 简8 h介 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Protective effect of PIO on VEC apoptosis under high glucose stimulation ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	早期凋亡率 (%)	中、晚期凋亡率 (%)	总凋亡率 (%)
正常对照组	3	1.61 $\pm$ 0.27	1.71 $\pm$ 0.24	3.32 $\pm$ 0.35
高糖组	3	12.25 $\pm$ 2.84*	24.18 $\pm$ 1.32*	37.43 $\pm$ 2.63*
低浓度 PIO+ 高糖组	3	11.61 $\pm$ 2.23	22.32 $\pm$ 2.06	33.93 $\pm$ 1.36
中浓度 PIO+ 高糖组	3	10.02 $\pm$ 0.76 $^{\Delta}$	14.33 $\pm$ 2.12 $^{\Delta}$	24.35 $\pm$ 1.48 $^{\Delta}$
高浓度 PIO+ 高糖组	3	5.12 $\pm$ 0.92 $^{\Delta}$	7.01 $\pm$ 1.06 $^{\Delta}$	12.13 $\pm$ 2.23 $^{\Delta}$

与正常组比较, \* $P < 0.05$ ; 与高糖组比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ .

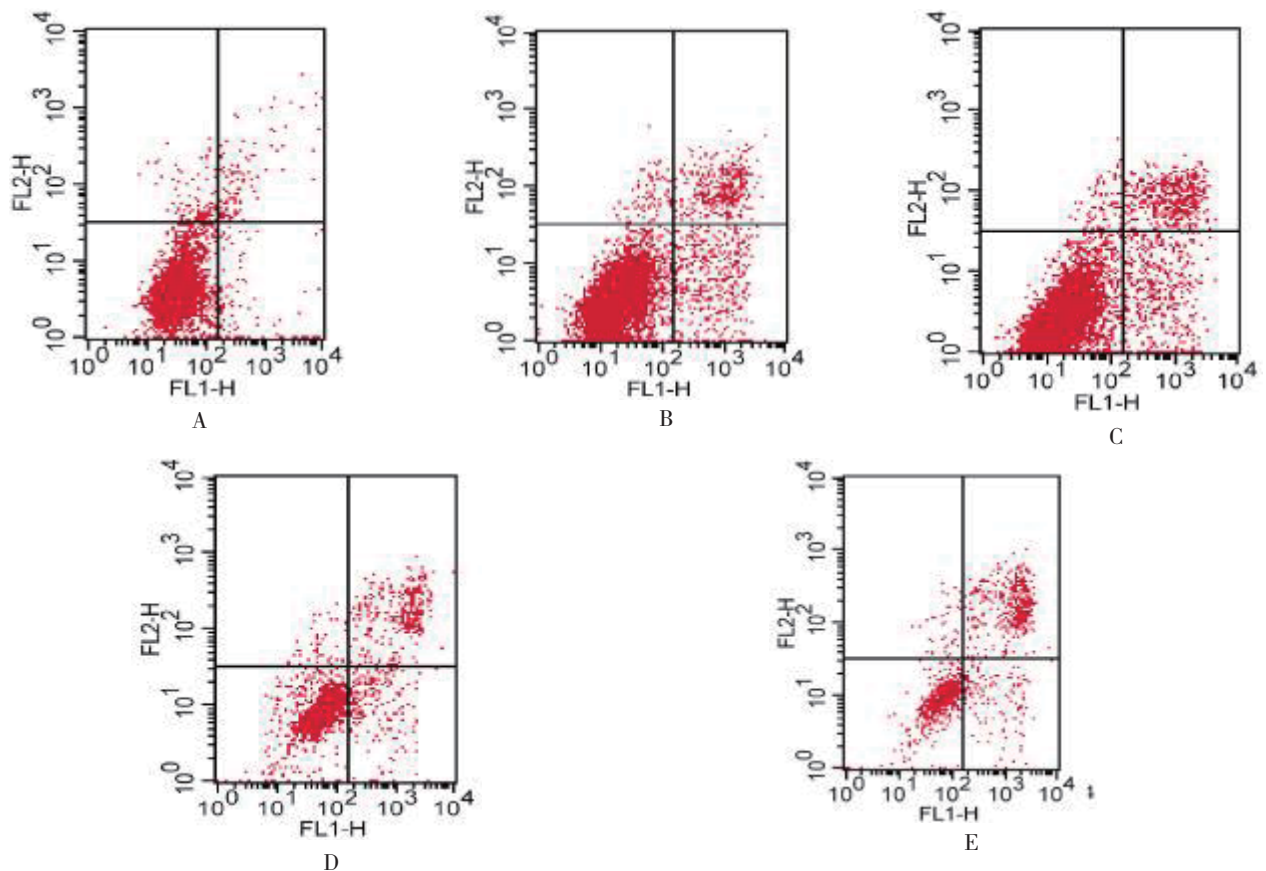


图 1 PIO 对高糖刺激下 VEC 细胞凋亡的保护作用 (18 h) [ $n = 3$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Fig. 1 Protective effect of PIO on VEC apoptosis under high glucose stimulation (18 h) [ $n = 3$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

A:正常对照组; B:高糖组; C:低浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L); D:中浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-6}$  mmol/L); E:高浓度 PIO+ 高糖组 (PIO  $1 \times 10^{-4}$  mmol/L) .

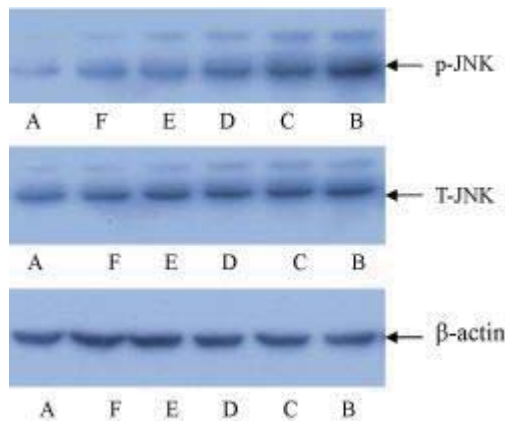


图 2 PIO 对 JNK, p-JNK 水平的影响

Fig. 2 Levels of JNK and p-JNK in different concentrations of PIO

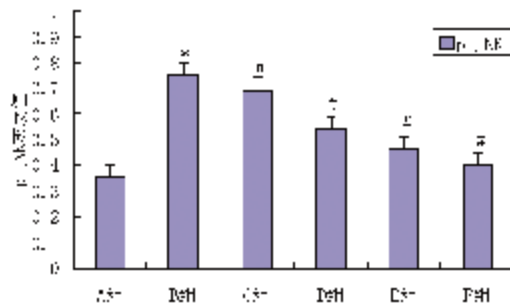


图 3 不同浓度 PIO 作用下 p-JNK 水平的相对比较

Fig. 3 The comparison of p-JNK levels in different concentrations of PIO

与正常组比较, \* $P < 0.05$ ; 与高糖组比较, # $P < 0.05$ .

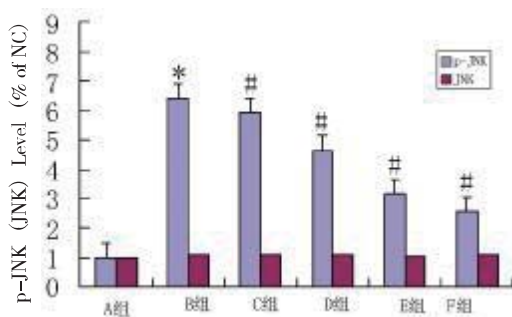


图 4 不同浓度 PIO 作用下 p-JNK、JNK 水平的相对比较

Fig. 4 The comparison of p-JNK and JNK levels in different concentrations of PIO

与正常组比较, \* $P < 0.05$ ; 与高糖组比较, # $P < 0.05$ .

本研究通过 Western blot 方法证实, 与正常对照组相比, 高糖作用后引起 VEC 内 JNK 水平上升, 但差异无显著性; 与正常对照组相比, 高糖作用后引起 VEC 内 p-JNK 水平显著上升. PIO 干预后 p-JNK 表达减少, 不同浓度的 PIO 干预的结果表明其有一定的浓度 - 效应依赖关系. 与高糖组

比较, JNK 抑制剂 SP600125 干预后 p-JNK 表达也显著减少, 提示 PIO 可能通过阻断 JNK 通路的激活来抑制 VEC 凋亡.

综上所述, PIO 除具有降糖作用外, 还能抑制高糖诱导所致的 VEC 凋亡来发挥对 VEC 的保护作用, 该作用可能是通过阻断 JNK 通路的激活来实现的.

[ 激考文献 ]

- [1] VITA J A, KEANEY JF J R. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk [J]. Circulation, 2002, 106(6):640 - 642.
- [2] CHAN W H, WU H J. J Cell Biochem. Methylglyoxal and high glucose co-treatment induces apoptosis or necrosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Cell Biochem, 2008, 103(4):1 144 - 1 157.
- [3] 刘云峰, 杨川, 程桦, 等. 高糖诱导人内皮细胞凋亡及其 JNK, AKT 信号途径的作用机制 [J]. 基础医学与临床, 2005, 25(2):163 - 167.
- [4] 牟伦盼, 陈刚. NF- $\kappa$ B 及 JNK 通路和高糖下内皮细胞凋亡 [J]. 国际心血管病杂志, 2007, 34(5):330 - 333.
- [5] HWANG J, KLEINHENZ D J, LASSEGUE B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-7 ligands regulate endothelial membrane superoxide production [J]. Am J Physiol cell Physiol, 2005, 288(3):C899 - C905.
- [6] FUJISAWA K, NISHIKAWA T, KUKIDOME D, et al. TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(9):43 - 48.
- [7] PICONI L, QUAGLIARO L, ASSALONI R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(3):198 - 203.
- [8] WANG Y L, FRAUWIRTH K A, RANGWALA S M, et al. Thiazolidinedione activation of peroxisome Proliferators-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival [J]. Biol Chem, 2002, 277(35):31 781 - 31 788.
- [9] GENSCH C, CLEVER Y, WEMER C, et al. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells [J]. Atherosclerosis, 2007, 192(1):67 - 74.
- [10] HO F M, LIN W W, CHEN B C, et al. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- $\kappa$ B and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. Cell Signal, 2006, 18(3):391 - 399.
- [11] YASUDA E, TOKUDA H, ISHISAKI A, et al. PPAR-gamma ligands up-regulate basic fibroblast growth factor-induced VEGF release through amplifying SAPK/JNK activation in osteoblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(1):137 - 143.

(2014 - 05 - 10 收稿)