

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.12.004

达格列净对高渗诱导的血管内皮细胞衰老的干预研究*

扈若凡 周 洁 梁声茹 鱼馨文 姬秋和[△]

(空军军医大学附属西京医院内分泌科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 探讨 SGLT2i 类药物达格列净 (dapagliflozin) 对高渗诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 衰老的影响。**方法:** 将 HUVECs 分为空白组 (Blank 组)、高渗 330 组 (M-330 组)、高渗 350 组 (M-350 组)、达格列净 + 高渗组 (DAPA+M-350 组), 高渗培养环境由甘露醇诱导。衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 染色检测细胞衰老情况; 免疫荧光染色检测 SGLT2 表达变化; Western blot 检测 SGLT2、细胞衰老标志物 p21 的表达变化, JC-1 染色试剂盒检测线粒体膜电位的变化。**结果:** 免疫荧光染色和 western blot 结果显示, Blank 组, M-330 组及 M-350 组细胞上均存在 SGLT2 受体蛋白表达, 且 Blank 组, M-330 组及 M-350 组的 SGLT2 表达依次显著增加。与 Blank 组相比, M-350 组 SA- β -Gal 胞质蓝染、染色阳性率、衰老蛋白 p21 及 SGLT2 表达显著增加, 并伴有线粒体膜电位的显著下降 ($P < 0.05$); DAPA+M-350 组与 M-350 组相比, SA- β -Gal 胞质蓝染、染色阳性率和 p21 表达显著下降, 并伴有线粒体膜电位的显著上升 ($P < 0.05$)。**结论:** HUVECs 上存在 SGLT2 受体蛋白, 且在 300-350 mOsm/L 范围内随着渗透压的升高而增加, 达格列净可改善高渗所诱导的血管内皮细胞衰老, 其机制可能与达格列净改善高渗导致的线粒体功能障碍有关。

关键词: 达格列净; 高渗; 血管内皮细胞; 细胞衰老

中图分类号: R-33; R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)12-2219-05

Effects of Dapagliflozin on Hyperosmotic-induced Endothelial Vascular Cells Senescence*

HU Ruo-fan, ZHOU Jie, LIANG Sheng-ru, YU Xin-wen, JI Qiu-he[△]

(Department of Endocrinology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of dapagliflozin on the hyperosmolarity-induced vascular endothelial cells senescence. **Methods:** The human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) were divided into 4 groups: Blank group (Blank group), hypertonic-330 group (M-330 group), Hyperosmolarity -350 group (M-350 group), Dapagliflozin + Hyperosmolarity -350 group (DAPA+M-350 group). Hyperosmolarity cells culture environment induced by mannitol. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining was performed to measure the senescent cells in Blank group, M-350 group and DAPA+M-350 group. The protein levels of SGLT2 was detected by immunofluorescence staining and Western blot in Blank group, M-330 group and M-350 group. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining kit and p21 was detected by Western blot in Blank group, M-350 group and DAPA+M-350 group. **Results:** The results of immunofluorescence and Western blot showed that SGLT2 receptor protein expression was found in Blank group, M-330 group and M-350 group, and the protein levels SGLT2 in the three groups increased markedly in turn. Additionally, compared with Blank group, the rates of positive cells and the degree of blue staining in cytoplasm of SA- β -gal staining, and the protein levels of p21 and SGLT2 in M-350 group increased significantly, with the mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P < 0.05$); Moreover, compared with M-350, the positive rates of SA- β -gal staining and the protein levels of p21 decreased significantly in DAPA+M-350 group, with the mitochondrial membrane potential increased markedly ($P < 0.05$). **Conclusion:** SGLT2 receptor protein was found on HUVECs. The expression of SGLT2 receptor protein is up-regulated with the increase of osmotic pressure in the range of 300-350 mOsm/L. Dapagliflozin can reduce the senescence of vascular endothelial cells induced by hyperosmolarity, and its mechanism may be related to dapagliflozin can improve mitochondrial dysfunction.

Key words: Dapagliflozin; Hyperosmolarity; Human vascular endothelial cells; Cell senescence

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)12-2219-05

前言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种全球范围流行的慢性

代谢性疾病, 据统计, 成年人中糖尿病的发病率约为 9%^[1]。其中 2 型糖尿病 (T2DM) 人群的主要死亡原因是心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD), 其 CVD 的发病率是非 T2DM 患者的

* 基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1309803)

作者简介: 扈若凡 (1994-), 硕士研究生, 研究方向: 糖尿病的发病机制, E-mail: huruofan75@sina.com

[△] 通讯作者: 姬秋和, 教授, 主要研究方向: 糖尿病的发病机制, E-mail: jqiuhe@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2020-01-26 接受日期: 2020-02-28)

2-4 倍^[2,3]。中国大庆研究指出接近 50% 的 T2DM 患者最终死于心血管疾病,且无性别差异^[4]。达格列净(dapagliflozin)属于钠葡萄糖协同转运子 2 抑制剂(SGLT2i),是一种新型的降糖药物。该类药物不仅能有效降低血糖,还能为 T2DM 患者带来心血管获益。因此 2017 年中国 2 型糖尿病防治指南推荐使用 SGLT2i 降低糖尿病合并心血管疾病或合并心血管极高危/高危风险患者的心血管事件^[4]。目前的研究表明,SGLT2i 的作用机制主要是抑制近端肾小管钠-葡萄糖重吸收、促进尿糖排泄、降低血糖浓度,同时减少钠的重吸收、渗透性利尿、改善前后负荷,从而达到减重、降压,实现心血管保护等多重功效。血钠和血糖是影响血浆渗透压的重要因素,T2DM 人群血浆渗透压普遍具有升高现象。而血浆渗透压的变化会引起交感神经活动、血压、心率、外周阻力和儿茶酚胺分泌的改变,因此与 CVD 关系密切^[5]。细胞衰老是 CVD 发病的重要环节之一,而高渗刺激能够引发细胞衰老^[6]。那么 SGLT2i 类药物达格列净是否通过影响 T2DM 患者血浆渗透压,改善血管内皮细胞衰老,最终起到心血管保护效应呢?我们拟通过研究高渗环境中达格列净对人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs)衰老的影响,探索达格列净对心血管系统的保护机制。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料

实验用脐带均由取自空军军医大学第一附属医院妇产科的 5 名健康产妇,年龄 21-28 岁,经原代细胞培养获得。达格列净(MCE 公司),甘露醇(Solarbio 公司),内皮细胞专用培养基(ECM)购自(Sciencell 公司), β -半乳糖苷酶试剂盒(碧云天生物技术有限公司),SGLT2、p21 和 Tublin 抗体(CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞的分离与培养 无菌条件下取得健康产妇 20 cm 长脐带一条,用 PBS 冲洗脐静脉至无血色。用 0.1% 胶原酶灌注消化脐静脉 12 min,收集消化液和冲洗液至 15 mL 离心管,1000 rpm 离心 5 min 后去除上清,预冷 PBS 重悬离心后用 ECM 培养液(体积分数为 5% FNS、ECGS10 μ L/mL、1% 青链霉素混合液)重悬细胞并移至培养瓶中,放入 37℃、5% 二氧化碳培养箱内。每 3 天更换一次细胞培养液,7 天后细胞长满传代。P1 代细胞经流式细胞仪检测 CD31 阳性率达 99.5%,证实培养的细胞为血管内皮细胞。取 2-4 代细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞分组和处理 取同一批次,等量的 HUVECs 细胞分组接种:(1)空白组(Blank):ECM 完全培养液常规培养,培养液渗透压为 295 mOsm/L;(2)高渗 330 组、高渗 350 组(M-330, M-350):添加甘露醇至 ECM 完全培养液中,使最终培养液渗透压分别为 330 mOsm/L 和 350 mOsm/L;(3)达格列净处理高渗组(DAPA+M-350):在 M-350 组的完全培养液内加入达格列净孵育,达格列净终浓度为 2 μ mol/L。所有检测在分组培养 7 天后进行。

1.2.3 HUVECs 细胞线粒体膜电位检测 分组培养 7 天后,装载 JC-1 探针,弃去细胞培养基,再加入 1 mL DMEM/F-12 细胞培养基。加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,37℃ 下避光孵

育 20 min。移除上清,用 1×JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。荧光显微镜下观察,并用全自动酶标仪测定 530(绿色荧光)、590(红色荧光)吸光度(A)值。在线粒体膜电位相对较高时呈红色荧光,降低时呈现绿色荧光。红色荧光与绿色荧光的比值指示线粒体膜电位的高低。

1.2.4 细胞 SA- β -Gal 染色 HUVECs 以 1×10^5 细胞数/孔接种于 6 孔板,每组设 3 个复孔。分组处理同前。处理 7 天后终止培养。PBS 清洗细胞,细胞固定液室温固定 15 min。按试剂盒说明配制染色工作液并加入六孔板。将六孔板放入 37℃ 不含二氧化碳的培养箱内孵育 8 至 12 h, PBS 清洗 2 次后 DAPI 复染细胞核。PBS 再次清洗细胞后倒置荧光显微镜下观察拍照。每组随机选取 5 个视野计数蓝染细胞,蓝染细胞数/总细胞数代表衰老程度。

1.2.5 Western blotting 检测 HUVECs 接种于培养皿,分组处理同前。作用 7 天后 PBS 清洗、离心、收集细胞,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,提取总蛋白,BCA 法定量蛋白浓度。制备 12% 浓缩胶与分离胶,胶凝后上样、电泳、转膜、封闭,分别以 SGLT2 (1:500)、p21 (1:1000)、Tublin (1:1000) 4℃ 孵育过夜;TBST 洗膜后二抗室温 1h, TBST 再次洗膜后通过 Trident femto Western HRP Substrate 显影印迹,并且在 GE Amersham Image 600 Station 上成像分析。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫荧光化学染色 HUVECs 细胞以 2000 个/孔细胞密度接种于 24 孔板内的盖玻片上,每组 4 个复孔。分组处理同前。培养 7 天后用 PBS 清洗细胞 2 次×3 min;0.3% Triton-X100 在 4℃ 孵育 15 分钟。10% 山羊血清室温孵育 40 min。4℃ 冰箱中孵育 SGLT2 (1:500)、Tublin (1:1000);次日用 PBS 洗涤 3 次×5 min;室温下避光孵育二抗 (1:50),再次 PBS 漂洗 3 遍后,70% 甘油封片,荧光显微镜拍照。

1.3 统计学分析

统计学处理所有数据均采用 SPSS19.0 软件进行分析。所得数据均采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。多组之间的比较分析采用单因素方差分析法,组间多重比较采用最小显著差异(LSD)法;两样本均数的比较采用独立样本 t 检验;率之间的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同渗透压水平下的 HUVECs 上 SGLT2 表达

全自动倒置荧光显微镜下显示:与空白组相比,高渗组 M-330 和 M-350 的 HUVECs 细胞胞浆中均呈现绿色荧光,即 SGLT2 能够在 HUVECs 细胞上表达。Western blot 结果显示在 300-350 mOsm/L 的范围内随着渗透压的增加,SGLT2 在 HUVECs 细胞中的表达增加($P < 0.05$)(图 1)

2.2 空白组,高渗组和达格列净处理高渗组之间衰老指标的比较

与空白组相比,高渗 M-350 组 SA- β -Gal 染色胞质蓝染增加,阳性细胞数显著增加($P < 0.05$)。Western blot 结果表明,与空白组相比,高渗 M-350 组细胞衰老标志物 p21 表达增加($P < 0.05$)。而与高渗 M-350 组相比,DAPA+M-350 组的 HUVECs 细胞的 SA- β -Gal 染色阳性细胞数减少($P < 0.05$),Western blot 结果显示 p21 表达明显降低($P < 0.05$)(图 2)

2.3 空白组,高渗组和达格列净处理高渗组之间膜电位的比较

与空白组相比,M-350 组膜电位显著降低;而 DAPA+M-350 组与 M-350 组相比膜电位显著升高($P<0.05$)(图 3)。

3 讨论

近年来,作为降糖药物的 SGLT2i 类药物在心血管保护方

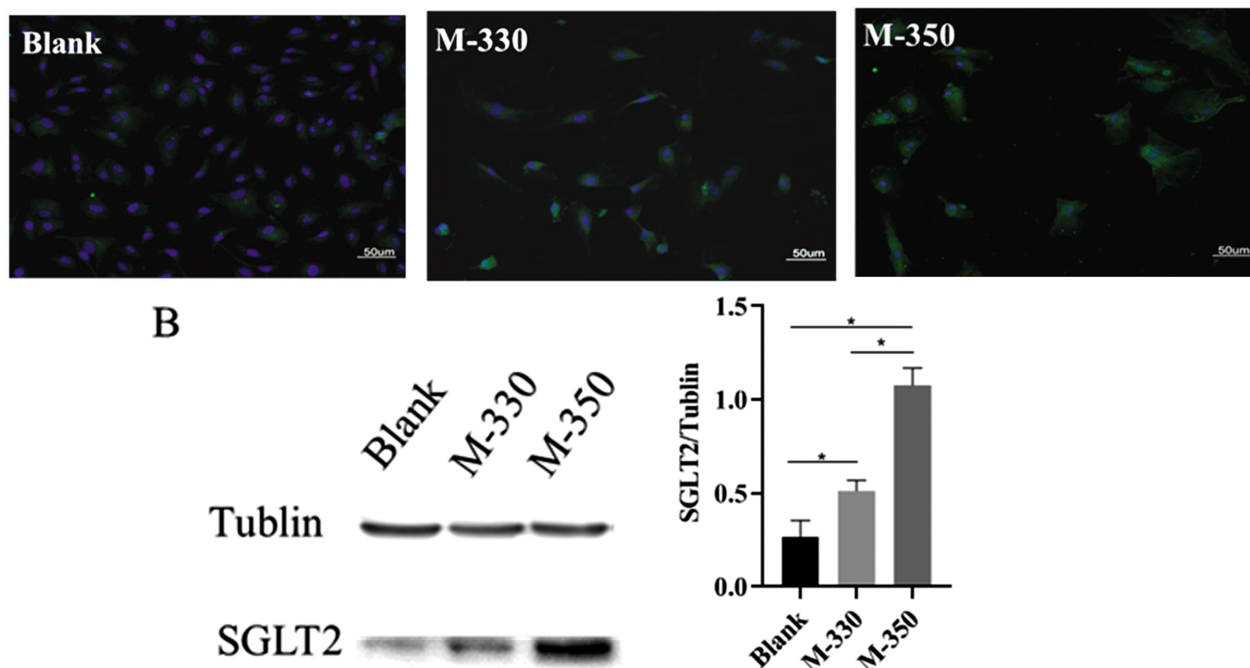


图 1 A:免疫荧光染色显示不同水平高渗环境中 HUVECs 细胞上 SGLT2 的表达;

B: Western blot 显示不同水平高渗环境中 HUVECs 细胞上 SGLT2 的表达。Mean ± SD. $n=3$, $*P<0.05$.

Fig.1 SGLT2 of each group: A: The protein expression levels of SGLT2(green) in different groups were observed by Immunofluorescence technique.

B: the protein expression levels of SGLT2 and Tublin in different groups were detected by Western blot. Mean ± SD. $n=3$, $*P<0.05$.

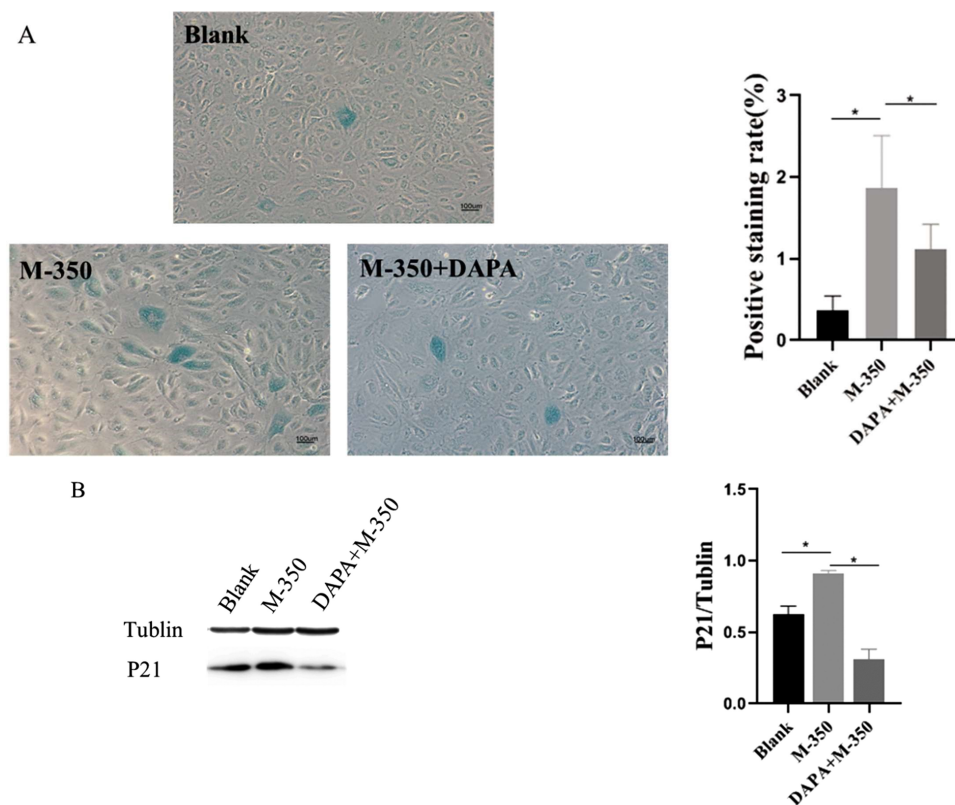


图 2 A. SA-β-Gal 染色显示空白组、M-350 组、DAPA+ M-350 组之间衰老细胞的比例,其中衰老细胞被染成蓝色;

B Western blot 显示各组中 HUVECs 细胞 p21 的表达。Mean±SD. $n=3$, $*P<0.05$ 。

Fig.2 The senescence indicators of each group. A: the results of SA-β-Gal staining, the senescent cells were stained in deep blue

B: the protein expression levels of p21 and Tublin in different groups were detected by Western blot. Mean±SD. $n=3$, $*P<0.05$.

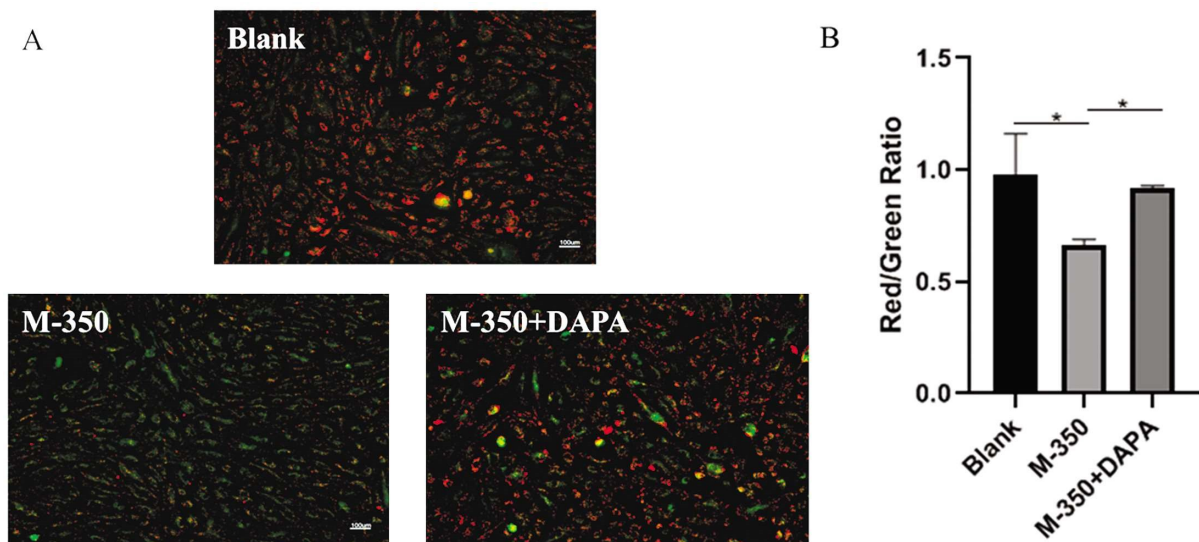


图3 各组中膜电位的变化 A: 荧光显微镜下 JC-1 染色; B: 荧光酶标仪检测后计算红/绿值。Mean ± SD。n = 3, *P < 0.05.

Fig.3 A: The Mitochondrial membrane potential(MMP) of each group by Immunofluorescence technique. B: The MMP(Red/Green) of each group by Fluorescent enzyme labeling instrument. Mean ± SD. n = 3, *P < 0.05.

面的研究层出不穷,有研究显示这种作用是通过促进利尿排出和渗透性利尿等作用,导致血容量减少,心脏前、后负荷降低,最终使血压降低以及动脉僵硬改善^[7],另外还有文献提示 SGLT2i 引起的轻微高酮血症可能会起到改善心脏的氧消耗的作用^[8,9]。但仍缺乏此类药物对血管直接影响的研究。与先前的一些研究结果相同^[3],我们也证实了 HUVECs 上存在 SGLT2 受体,提示 SGLT2i 类药物可能对 HUVECs 细胞存在的直接保护作用。

高渗是一种常见的病理状态,缺血、脓毒性休克和糖尿病性昏迷中都可伴随短时间内渗透压剧烈变化^[10]。但关于慢性血浆高渗透压对机体造成的影响还有待研究。有研究发现普通人群中近 30% 的老年人血浆渗透压升高,并且血浆渗透压的升高与糖尿病之间关系明显^[11,12]。血浆正常渗透压范围为 285-295 mOsm/L,大于 300 mOsm/L 被认为是渗透压的异常升高^[12],临床上老年糖尿病高渗状态的病人有效血浆渗透压甚至可达到 353 mOsm/L^[13]。因此我们选择了 350 mOsm/L 作为实验组的高渗浓度。慢性血浆高渗透压不仅是糖尿病患者的常见并发症,也可能是参与许多老年病理过程的重要环节。血浆渗透压的增高不仅会促进细胞水分流出,引发细胞萎缩和细胞内脱水,还能增加细胞的氧化应激,以及通过增强 DNA 损伤来促进细胞凋亡^[14,15]。我们的研究发现, SGLT2 受体的表达会随着渗透压的升高而增加,提示在高渗环境下 SGLT2i 类药物可能以 SGLT2 蛋白为靶点对 HUVECs 细胞产生直接影响。

血管内皮细胞(VECs)衰老在 CVD 的发病过程中起着重要作用,CVD 发病率随着年龄逐渐增加的一个重要原因就是由于 VECs 衰老使此类疾病的发病阈值降低^[16]。关于高渗和细胞衰老,有研究显示,过量的 NaCl 能够通过延缓 DNA 复制进而引起成纤维细胞的衰老^[6]。我们的 Western blot 和 SA-β-Gal 的染色结果提示,持续慢性的高渗刺激能够促进 HUVECs 细胞衰老,而达格列净则会抑制这种衰老,这在一定程度上提示高渗环境中 SGLT2i 类药物对心血管的保护作用也可能是通过抑制细胞衰老的途径实现。

线粒体是一种功能复杂的细胞器,在调节细胞生理衰老和细胞损伤中均起到关键的作用^[17]。有研究表明,在衰老的纤维环细胞中线粒体功能障碍显著增加^[18]。事实上线粒体 DNA 的损伤也是细胞衰老的重要机制之一^[19]。我们的研究发现高渗能够导致线粒体膜电位下降,这可能与高渗刺激产生的自由基损伤了线粒体 DNA,进而导致线粒体功能障碍有关^[20]。而达格列净对线粒体的保护作用说明其对高渗衰老的抑制作用可能与线粒体相关。

但 SGLT2i 类药物对内皮细胞可能并不总是保护作用,有研究显示坎格列净会损害内皮细胞功能和血管生成^[21],因此我们的研究仅证实了达格列净对血管内皮细胞保护的部分机制。此外,关于 HUVECs 上的 SGLT2 受体表达与细胞衰老之间分子机制也有待进一步探索。最近一项研究结果发现高血糖诱导的猪冠状动脉培养内皮细胞衰老可能由血管紧张素系统通过上调 SGLT1 和 SGLT2 的氧化还原敏感性驱动,进而增强了糖毒作用^[22]。但血管紧张素系统与高渗环境下 SGLT2 受体表达增加以及细胞衰老是否相关,还需要进一步的研究证明。

综上所述,本研究观察到 HUVECs 上的 SGLT2 表达在慢性低度的高渗环境中(300-350 mOsm/L),随着增高的渗透压刺激而增加,达格列净对慢性低度的高渗刺激 HUVECs 细胞引起的细胞衰老具有抑制作用,这可能是 SGLT2i 类药物对心血管保护作用的直接因素。但是,由于本研究是体外细胞实验的初步研究,仍缺乏更高水平的渗透压刺激实验及相关分子机制的研究和动物实验结果支持。因此,还需要更多的后续实验明确 SGLT2i 延缓高渗刺激下 HUVECs 衰老的机制,为心血管疾病的防治提供参考。

参考文献(References)

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2017; Available online: <http://www.diabetesatlas.org> (accessed on 1 June 2019)
- [2] Writing Group, M, Mozaffarian, D, Benjamin, E.J, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report

- From the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133, 447-454
- [3] Gong Qihong, Zhang Ping, Wang Jinping, et al. Morbidity and mortality after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance: 30-year results of the Da Qing Diabetes Prevention Outcome Study [J]. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2019, 7 (6): 452-461
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10: 14-67
- [5] Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2013, 304(7): R531-R542
- [6] Yamakami Y, Yonekura R, Matsumoto Y, et al. High concentrations of NaCl induce cell swelling leading to senescence in human cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 411(1-2): 117-125
- [7] Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, 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
- [8] Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: a "thrifty substrate" hypothesis [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(7): 1108-1114
- [9] Mudaliar S, Alloju S, Henry RR. Can a shift in fuel energetics explain the beneficial cardiorenal outcomes in the EMPA-REG OUTCOME study? A unifying hypothesis[J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(7): 1115-1122
- [10] Wright AR, Rees SA. Cardiac cell volume: Crystal clear or murky waters? A comparison with other cell types[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80: 89-121
- [11] Stookey J D. High prevalence of plasma hypertonicity among community-dwelling older adults: results from NHANES III [J]. *J Am Diet Assoc*, 2005, 105(8): 1231-1239
- [12] Stookey JD, Purser JL, Pieper CF, et al. Plasma Hypertonicity: Another Marker of Frailty? [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2004, 52(8): 1313-1320
- [13] Yamaoka Takuya, Tamura Yoshiaki, Kadera Remi, et al. Background characteristics and clinical features of elderly patients with hyperglycemic hyperosmolar syndrome[J]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 2017, 54: 349-355
- [14] Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87: 1441-1474
- [15] Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, et al. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis [J]. *Science*, 2016, 354 (6311): 472-477
- [16] Stout RW. Ageing and atherosclerosis [J]. *Age Ageing*, 1987, 16(2): 65-72
- [17] Xiong ZM, Choi JY, Wang K, et al. Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(2): 279-290
- [18] Gruber HE, Watts JA, Hoelscher GL, et al. Mitochondrial gene expression in the human annulus: in vivo data from annulus cells and selectively harvested senescent annulus cells[J]. *Spine Journal*, 2011, 11(8): 782-791
- [19] Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation[J]. *Aging Cell*, 2002, 1(2): 117-123
- [20] Zheng Qinxian, Ren Yueping, Reinach Peter S, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes prime environment-induced murine dry eye[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 1-8
- [21] Birkeland KI, Jørgensen ME, Carstensen B, et al. Cardiovascular mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes following initiation of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors versus other glucose-lowering drugs (CVD-REAL Nordic): a multinational observational analysis[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5: 709-717
- [22] Khemais-Benkhiat S, Belcastro E, Idris-Khodja N, et al. Angiotensin II induced redox sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 30