罗格列酮调控沉默信息调节因子 1 对高糖处理的心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响

韩玉泽　张春雨　梁慧　赵丹

【摘要】　目的：探讨罗格列酮对高糖处理的心肌微血管内皮细胞（CMEC）增殖、迁移的影响和分子机制。　方法：将大鼠 CMEC 分为对照组（葡萄糖 5.5 mmol/L）、高糖对照组（葡萄糖 33 mmol/L）、实验 1 组（高糖＋罗格列酮 5 μmol/L）、实验 2 组（高糖＋罗格列酮 10 μmol/L）、实验 3 组（高糖＋罗格列酮 20 μmol/L）。细胞计数试剂盒 8（CCK-8）法检测细胞增殖活力；Transwell 实验检测细胞迁移能力；Western blot 检测 P21、上皮细胞钙粘蛋白（E-cadherin）、沉默信息调节因子 1（Sirt1）的蛋白表达水平；实时荧光定量聚合酶链反应检测 *Sirt*1 的 mRNA 表达水平。将 Sirt1 小干扰 RNA（si-Sirt1）转染 CMEC，经高糖和罗格列酮 20 μmol/L 处理后，采用上述方法检测细胞增殖和迁移能力。　结果：与对照组比较，高糖对照组 CMEC 增殖和迁移能力降低，P21 和 E-cadherin 表达增加，Sirt1 表达降低（P 均＜0.05）。与高糖对照组比较，高糖联合罗格列酮处理后 CMEC 增殖和迁移能力增加，P21 和 E-cadherin 表达降低，Sirt1 表达增加（P 均＜0.05）。与高糖联合罗格列酮处理比较，转染 si-Sirt1 并经高糖联合罗格列酮处理后 CMEC 增殖和迁移能力降低，P21 和E-cadherin表达增加（P 均＜0.05）。　结论：罗格列酮通过上调 Sirt1 表达促进高糖处理的 CMEC 增殖和迁移。

【关键词】　罗格列酮；心肌微血管内皮细胞；增殖；迁移；沉默信息转录调控因子 1

doi：10.3969/j.issn.1673-6583.2021.03.012

Effects of rosiglitazoneon on the proliferation and migration of cardiac microvascular endothelial cells treated with high glucose by regulating Sirt1　*HAN Yuze*，*ZHANG Chunyu*，*LIANG Hui*，*ZHAO Dan*
Department of Cardiology，*Dalian Friendship Hospital*，*Dalian*　116001，*China*

【**Abstract**】　**Objective**：To investigate the effects and molecular mechanism of rosiglitazone on proliferation and migration cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) treated by high glucose.
Methods：Rat CMECs were divided into control group (5.5 mmol/L glucose)，high glucose control group (33 mmol/L glucose)，experimental group 1 (33 mmol/L glucose + 5 μmol/L rosiglitazone)，experimental group 2 (33 mmol/L glucose + 10 μmol/L rosiglitazone) and experiment 3 group (33 mmol/L glucose + 20 μmol/L rosiglitazone). Cell counting kit 8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation activity. Transwell test was used to detect cell migration ability. Western blot was used to detect the expression levels of P21，epithelial cadherin (E-cadherin) and silent information transcriptional regulator 1 (Sirt1). Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect Sirt1 mRNA expression. The Sirt1 small interfering RNA (si-Sirt1) was transfected into CMECs，which was exposed to high glucose and 20 μmol/L rosiglitazone，and then the cell proliferation and migration abilities were measured by the above method.　**Results**：Compared with the control group，the proliferation and migration abilities of CMECs and the expression level of Sirt1 were decreased in high glucose control group，while the expression levels of P21 and E-cadherin were increased (all P＜0.05). Compared with the high glucose control group，the proliferation and migration abilities of CMECs and the expression

基金项目：大连市卫健委科研基金（1711029）
作者单位：116001　大连市友谊医院心内二科

levels of Sirt1 were increased after treated with high glucose with rosiglitazone, while the expression levels of P21 and E-cadherin were decreased (all $P<0.05$). Compared with high glucose combined with rosiglitazone treatment group, the proliferation and migration abilities of CMECs were declined, and the expression levels of P21 and E-cadherin were increased after transfection of si-Sirt1 (all $P<0.05$). **Conclusions**: Rosiglitazone promotes the proliferation and migration abilities of CMECs treated with high glucose by up-regulating Sirt1 expression.

【Key words】 Rosiglitazone; Cardiac microvascular endothelial cells; Proliferation; Migration; Silent information transcriptional regulator 1

心血管疾病是糖尿病患者最常见的并发症。心肌微血管内皮细胞(CMEC)占心脏细胞总数的1/3,在维持冠状动脉微血管和邻近心肌细胞正常功能方面起着关键作用[1]。然而,慢性高血糖等因素可引起 CMEC 功能障碍和凋亡,导致微血管病变[2]。罗格列酮是噻唑烷二酮类抗糖尿病药,可通过提高胰岛素的敏感性有效控制血糖。研究显示,罗格列酮可减轻 CMEC 损伤并改善其功能,对改善糖尿病心肌微血管病变具有重要意义[3-4]。在正常状态下,内皮细胞增殖能力有限,但在病理情况下内皮细胞增殖和迁移对血管修复具有始动作用[5]。然而,罗格列酮能否促进内皮细胞增殖并提高其迁移能力尚未可知。沉默信息调节因子 1(Sirt1)是研究最为广泛的去乙酰化酶同源物,研究显示 CMEC 细胞 Sirt1 活性降低,可抑制细胞自噬,增强细胞凋亡,促进糖尿病冠状动脉微血管功能障碍的发生[6]。但目前尚不明确罗格列酮是否通过调控 Sirt1 表达影响 CMEC 增殖和迁移。本研究探讨罗格列酮对高糖处理的大鼠 CMEC 增殖和迁移的影响,并分析其对 Sirt1 表达的调控作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料

大鼠心肌微血管内皮细胞 CMEC 购于德国微生物菌种保藏中心;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗溶液购于美国 Gibco 公司;罗格列酮(纯度为 93.3%,批号 100673-201902)购于中国食品药品检定研究院;Sirt1 小干扰 RNA(si-Sirt1)及其对照(si-NC)、PCR 引物由上海生工公司提供;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)购于美国 Sigma 公司;Transwell 小室购于美国 BD 公司;兔源抗 Sirt1 抗体、兔源抗 P21 抗体、兔源抗上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)抗体、山羊抗兔 IgG 二抗购于美国 CST 公司。

1.2　细胞培养和分组

CMEC 细胞采用含 10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基培养,置于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱中。当细胞融合度达到 80%时,进行传代,同步化以后进行实验分组。以含 5.5 mmol/L 葡萄糖的完全培养基培养的细胞作为对照组;含 33 mmol/L 葡萄糖的完全培养基培养的细胞作为高糖对照组[7];在含 33 mmol/L 葡萄糖的完全培养基中加入终浓度为 5、10、20 μmol/L 的罗格列酮,培养的细胞分别作为实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组[8]。培养 24 h 后,检测细胞增殖、迁移能力以及 Sirt1 的表达水平。

将 si-NC、si-Sirt1 分别转染 CMEC,并采用 33 mmol/L葡萄糖和 20 μmol/L 罗格列酮处理 24 h,记为实验 3+si-NC 组、实验 3+si-Sirt1 组,随后检测细胞增殖和迁移能力变化。

1.3　CCK-8 法检测细胞增殖活力

将各组 CMEC 细胞按照 5×10^3/孔接种到 96 孔板,培养 24 h 后,每孔加入 CCK8 试剂 10 μL,培养箱孵育 4 h,全自动酶标仪检测 450 nm 波长各孔光密度(OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

1.4　Transwell 实验检测细胞迁移能力

采用无血清 RPMI-1640 培养液重悬各组 CMEC 细胞,在 Transwel 上室加入 1×10^5 个 CMEC 细胞,在 24 孔板下室加入含 10 ng/mL 血管内皮生长因子的完全培养液,培养箱孵育 8 h 后,用棉签擦去上室未迁移细胞,经多聚甲醛戈丁和结晶紫染色后,倒置显微镜下观察细胞过膜情况,选取 3 个视野,拍照并计数,以均值表示细胞迁移能力。

1.5　Western blot 检测 P21、E-cadherin 和 Sirt1 的蛋白表达水平

采用 RIPA 裂解缓冲液提取各组 CMEC 细胞总蛋白,并进行蛋白定量。利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离细胞蛋白,电泳结束后,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上。5%脱脂奶室温封闭膜 1 h,洗膜后,4 ℃条件下用稀释的一抗溶液孵育膜过夜,加入稀释的二抗溶液室温孵育膜1 h。使用增强型化学发光试剂显影,ImageJ 软件分析目的蛋白的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白的

相对表达水平。

1.6　实时荧光定量 PCR 检测 *Sirt*1 的 mRNA 表达水平

采用 Trizol 试剂从各组细胞分离总 RNA，利用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录，采用 SYBR Green Master Mix 在 ABI 7900HT 系统上检测 *Sirt*1 的 mRNA 表达水平。*Sirt*1 引物序列：上游 5′-GCCAGAGTCCAAGTTTAGAAGA-3′，下游 5′-CCATCAGTCCCAAATCCAG-3′。*GAPDH* 引物序列：上游 5′-TGGAAGGACTCATGACCACA-3′，下游 5′-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3′。以 *GAPDH* 为内参照，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 *Sirt*1 的 mRNA 表达水平。

1.7　统计学分析

所有实验设置 3 个平行实验并重复 3 次，实验数据采用均数 ± 标准差表示。采用 SPSS 17.0 进行数据分析，两组间均数比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　罗格列酮对高糖处理的 CMEC 增殖的影响

与对照组比较，高糖对照组 CMEC 存活率明显降低；与高糖对照组比较，高糖联合罗格列酮处理后 CMEC 存活率均明显升高（P 均 <0.05）。见表 1。

2.2　罗格列酮对高糖处理的 CMEC 迁移的影响

与对照组比较，高糖对照组 CMEC 迁移数量显著降低；与高糖对照组比较，高糖联合罗格列酮处理后 CMEC 迁移数量均显著增加（P 均 <0.05）。见表 2。

表 1　各组 CMEC 存活率比较

分组	存活率/%
对照组	100.03 ± 6.67
高糖对照组	46.39 ± 4.51(1)
实验 1 组	53.68 ± 4.95(2)
实验 2 组	65.82 ± 5.13(2)
实验 3 组	84.55 ± 5.72(2)

注：与对照组相比，(1) $P<0.05$；与高糖对照组相比，(2) $P<0.05$

表 2　各组 CMEC 迁移数量比较

分组	迁移细胞数/个
对照组	169.00 ± 8.82
高糖对照组	73.00 ± 4.17(1)
实验 1 组	89.00 ± 4.66(2)
实验 2 组	103.00 ± 5.01(2)
实验 3 组	143.00 ± 6.92(2)

注：与对照组相比，(1) $P<0.05$；与高糖对照组相比，(2) $P<0.05$

2.3　罗格列酮对高糖处理的 CMEC 中 *Sirt*1、P21、E-cadherin 表达的影响

与对照组比较，高糖对照组 CMEC 中 *Sirt*1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低，P21 和 E-cadherin的蛋白表达水平均显著增加；与高糖对照组比较，高糖联合罗格列酮处理后 CMEC 中 *Sirt*1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高，P21 和 E-cadherin 的蛋白表达水平均显著降低（P 均 <0.05）。见表 3 和图 1。

表 3　各组 CMEC 中 *Sirt*1、P21、E-cadherin 的表达水平比较

分组	*Sirt*1mRNA 表达水平	Sirt1 蛋白表达水平	P21 蛋白表达水平	E-cadherin 蛋白表达水平
对照组	1.00 ± 0.05	0.61 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02
高糖对照组	0.23 ± 0.03(1)	0.14 ± 0.02(1)	0.68 ± 0.04(1)	0.73 ± 0.04(1)
实验 1 组	0.36 ± 0.03(2)	0.25 ± 0.02(2)	0.55 ± 0.04(2)	0.59 ± 0.04(2)
实验 2 组	0.52 ± 0.04(2)	0.37 ± 0.03(2)	0.41 ± 0.03(2)	0.38 ± 0.03(2)
实验 3 组	0.75 ± 0.04(2)	0.54 ± 0.03(2)	0.32 ± 0.03(2)	0.24 ± 0.02(2)

注：与对照组相比，(1) $P<0.05$；与高糖对照组相比，(2) $P<0.05$

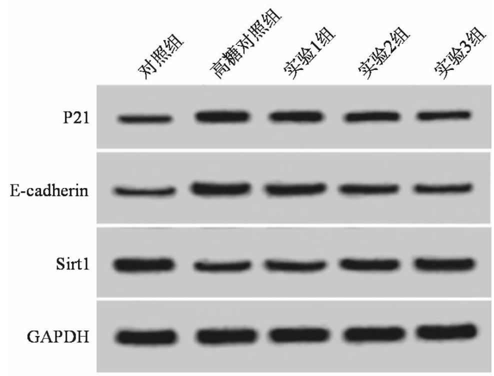

图 1　各组 CMEC 中 Sirt1、P21、E-cadherin 的蛋白表达情况

2.4　抑制 Sirt1 能减轻罗格列酮对高糖处理的 CMEC 增殖、迁移的影响

与实验 3 + si-NC 组比较，实验 3 + si-Sirt1 组 CMEC 存活率显著降低（$P<0.05$）。见表 4。

表 4　2 组转染后 CMEC 存活率比较

分组	存活率/%
实验 3 + si-NC 组	84.62 ± 5.57
实验 3 + si-Sirt1 组	52.53 ± 4.22
t	13.776
P	<0.001

与实验 3＋si-NC 组比较，实验 3＋si-Sirt1 组 CMEC 中 Sirt1 的蛋白表达水平显著降低，E-cadherin 和 P21 的蛋白表达水平均显著升高，细胞迁移数量显著降低（P 均＜0.05）。见表 5 和图 2。

表 5　2 组转染后 CMEC 迁移数量及蛋白表达水平比较

分组	Sirt1 蛋白表达水平	P21 蛋白表达水平	E-cadherin 蛋白表达水平	迁移细胞数/个
实验 3＋si-NC 组	0.53±0.04	0.33±0.03	0.23±0.02	141±6.85
实验 3＋si-Sirt1 组	0.25±0.02	0.61±0.04	0.61±0.04	84±4.94
t	25.491	18.783	16.800	20.248
P	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

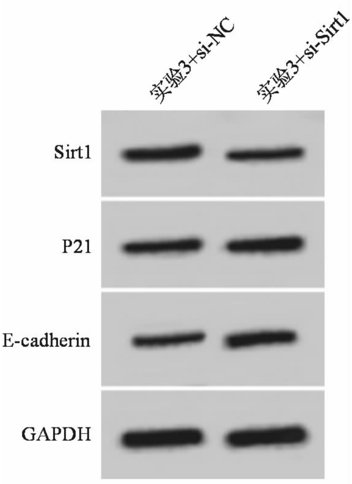

图 2　2 组转染后 Sirt1、P21 和 E-cadherin 的蛋白表达情况

3　讨论

罗格列酮为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）的特异、高效激动剂。罗格列酮除通过激活 PPARγ 受体对糖尿病有治疗作用外，对心血管系统也有不同程度的保护作用。高夏青等[9]发现罗格列酮通过提高血清超氧化物歧化酶水平，抑制炎性因子分泌，减轻心肌氧化应激和炎性损伤，减少心肌梗死面积。邹晓译等[10]发现罗格列酮通过降低还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）氧化酶活性和血管超氧阴离子水平，减轻血管紧张素Ⅱ诱导的血压升高和心肌肥厚。郝拮等[11]发现罗格列酮可通过促进脂联素分泌，减少梗死面积，进而在缺血预适应中发挥心肌保护作用。本研究探讨罗格列酮对高糖处理的 CMEC 增殖和迁移的影响，发现高糖处理的 CMEC 的存活率和迁移能力显著降低，而罗格列酮干预可使高糖处理的 CMEC 的存活率和迁移能力显著升高。P21 是一种重要的周期蛋白激酶抑制剂，可将细胞周期阻滞于 G1 期，具有抗细胞增殖作用[12]。E-cadherin是细胞黏附分子，可维持上皮极性和完整性，其表达或功能缺失与细胞迁移密切相关[13]。高糖处理的 CMEC 的 P21 和 E-cadherin 蛋白表达升高，而罗格列酮干预后 P21 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低，与上述功能实验结果一致。以上研究表明罗格列酮可拮抗高糖对 CMEC 增殖和迁移的抑制作用，对高糖处理的 CMEC 细胞有保护作用。

研究显示，通过去乙酰化作用，Sirt1 不仅在细胞代谢、分化、凋亡、氧化应激以及衰老中发挥调控作用，还参与心脏发育、心肌细胞生长、血管形成，是心血管疾病防治的潜在靶点[14]。Zhong 等[15]发现丹参酮ⅡA 可通过激活 Sirt1 维持线粒体电位，减少线粒体膜通道孔开放，抑制促凋亡因子释放，促进 CMEC 细胞存活，保护微血管结构和功能。此外，Sirt1 还可降低高糖诱导下血管内皮细胞氧化应激水平，拮抗高糖对血管内皮细胞增殖抑制和凋亡促进作用[16]。本研究发现高糖处理的 CMEC 的 *Sirt1* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低，罗格列酮可拮抗高糖对 *Sirt1* 表达的抑制作用，提示罗格列酮可能通过调控 *Sirt1* 表达参与对 CMEC 增殖、迁移的调控。进一步研究显示，抑制 *Sirt1* 可减轻罗格列酮对高糖处理的 CMEC 增殖和迁移的影响，这说明上调 Sirt1 是罗格列酮拮抗高糖对 CMEC 细胞增殖和迁移抑制作用的重要机制。

总之，本研究证实罗格列酮通过上调 Sirt1 可促进高糖处理的 CMEC 增殖、迁移能力，为临床应用罗格列酮改善糖尿病患者心肌微血管损伤提供了实验依据。

参　考　文　献

［1］ Liu Y, Ma Y, Wang R, et al. Advanced glycation end products accelerate ischemia/reperfusion injury through receptor of advanced end product/nitrative thioredoxin inactivation in cardiac microvascular endothelial cells［J］. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(7):1769-1778.

［2］ 侯聪聪，梁红玉，赵丽丽，等. 小檗碱改善高糖诱导血管内皮细胞和微血管内皮细胞损伤[J]. 微循环学杂志，2018，28(1):7-11.

[3] 程训民，江时森，马瑞，等. 罗格列酮对改善糖尿病大鼠心肌微血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国微循环，2008，12(2)：85-88.
[4] 程训民，江时森，马瑞，等. 罗格列酮对高血压合并糖尿病大鼠心肌微血管内皮细胞功能的影响[J]. 上海医学，2007，30(S1)：52.
[5] 张颖，胡舜英，尹彤，等. 利拉鲁肽通过 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 通路促进心肌微血管内皮细胞的增殖和迁移[J]. 南方医科大学学报，2015，35(9)：1221-1226.
[6] Lin J，Zhang L，Zhang M，et al. Mst1 inhibits CMECs autophagy and participates in the development of diabetic coronary microvascular dysfunction[J]. Sci Rep，2016，6(1)：34199-34209.
[7] 王雷，付爱萍，孙书红，等. 木犀草素对高糖诱导的心肌微血管内皮细胞损伤的影响及机制[J]. 现代生物医学进展，2018，18(7)：1243-1247.
[8] 陈争跃，余雄伟，聂振禹，等. 罗格列酮对人腹膜微血管内皮细胞 AQP1、VEGF-A 及 COX-2 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2015，31(1)：44-48.
[9] 高夏青，薛凌. 罗格列酮对兔心肌缺血再灌注损伤保护机制的研究[J]. 中国现代应用药学，2014，31(3)：265-270.
[10] 邹晓译，张扬，张双月，等. 罗格列酮对血管紧张素Ⅱ诱导高血压大鼠的血压影响及其机制[J]. 心脏杂志，2014，26(5)：529-532.
[11] 郝拮，王丹. 罗格列酮在缺血预适应中对心肌保护作用的研究[J]. 临床心血管病杂志，2014，30(1)：34-36.
[12] 韩金栋，袁志刚，郑华宾，等. 重组腺病毒介导 p21 对小鼠视网膜新生血管生成的抑制作用[J]. 中华眼底病杂志，2012，28(5)：493-497.
[13] 万杨，吕涛，肖智雄. p53 突变蛋白对人肺腺癌细胞中 E-cadherin的表达调控及细胞迁移的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版)，2016，53(3)：657-663.
[14] 谢军. Sir1：心血管疾病药物治疗的潜在靶点[J]. 国际儿科学杂志，2012，39(6)：598-601.
[15] Zhong J，Ouyang H，Sun M，et al. Tanshinone ⅡA attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury via regulating the SIRT1-PGC1α-mitochondrial apoptosis pathway[J]. Cell Stress Chaperones，2019，24(5)：991-1003.
[16] 王科峰，柴林燕，张允东，等. SIRT1 对高糖环境下血管内皮细胞活力及 ROS 水平的影响[J]. 武警后勤学院学报(医学版)，2018，27(1)：6-10.

(收稿：2020-07-15　修回：2021-02-05)
(本文编辑：胡晓静)