

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.012.html>

氯沙坦通过 JAK2/STAT3 信号通路在晚期糖基化终产物诱导心肌微血管内皮细胞损伤中的保护机制研究

刘少志 袁中文 梅峥嵘 陈 磊 许 俊

摘要 目的 观察氯沙坦对大鼠心肌微血管内皮细胞的作用,以及对 Janus 蛋白酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导子和转录激活子 3(JAK2/STAT3) 信号通路的影响,探究氯沙坦对糖尿病的保护机制。方法 将大鼠分成空白对照组、晚期糖基化终末产物(AGEs)组、AGEs 加氯沙坦治疗组以及氯沙坦治疗组,进行晚期糖基化终产物和氯沙坦的干预。采用 MTT 法和 TUNEL 法检测大鼠心肌微血管内皮细胞的活力和凋亡率;采用 Western blot 和 RT-PCR 法对 JAK2/STAT3 信号通路中的相关蛋白表达水平进行检测;ELISA 检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)的水平。结果 与空白对照组相比,AGEs 组的大鼠心肌微血管内皮细胞的活力明显减弱、凋亡率上升,在 JAK2/STAT3 信号通路中相关蛋白表达和相关炎症因子 IL-6、TNF- β 的表达也明显升高($P < 0.05$)。AGEs 加氯沙坦治疗组与 AGEs 组相比,细胞活力有所提升,凋亡率下降,在 JAK2/STAT3 信号通路中相关蛋白表达和相关炎症因子 IL-6、TNF- β 的表达也有所下降($P < 0.05$)。氯沙坦治疗组的相关蛋白表达情况和炎症介质与空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 氯沙坦可以通过 JAK2/STAT3 信号通路来对晚期糖基化终产物进行有效抑制,从而缓解其对心肌微血管内皮细胞的损伤,起到保护作用。

关键词 氯沙坦; JAK2/STAT3 信号通路; 晚期糖基化终产物; 心肌微血管内皮细胞; 保护机制

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0545-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.012

我国糖尿病的发病率呈逐年递增趋势^[1],患者中大部分为老年人。该病极易引起多种并发症,严重影响了大众的生活质量。研究^[2]发现,晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是诱发糖尿病的主要物质之一,能损伤机体内功能性的心肌细胞和血管内皮细胞,从而导致大量白介

素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- β (tumor necrosis factor- β , TNF- β)等炎症因子^[3]的释放。这些炎症介质通过 Janus 蛋白酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导子和转录激活子 3(janus protein tyrosine protein kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 信号通路使心肌微血管内皮细胞发生增殖、分化、凋亡等生物学反应^[4-5]。氯沙坦是一种血管紧张素的拮抗剂^[6],能控制上述炎症介质在 JAK2/STAT3 信号通路的表达水平,在一定程度上能缓解糖尿病。该实验研究氯沙坦是否能对大鼠已损伤的心肌微血管内皮细胞进行有效保护,以及 JAK2/STAT3 信号通路与炎症介质 IL-6、TNF- β 相关性的探讨,为今后因糖尿病引起的心肌组织损伤寻找有效的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 实验大鼠 40 只,4 月龄,体质量 250~280 g,进行适应性饲养 1 周,随机分成 4 组,分别是空白对照组、AGEs 组、AGEs 加氯沙坦治疗组以及氯沙坦治疗组,每组 10 只。

1.2 实验仪器与试剂 MTT 检测试剂盒(上海来锐赛生物科技有限公司);IL-6、TNF- β 、ELISA 试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);PCR 分析仪(美国 ABI 公司);多功能酶标仪(上海沛欧分析仪器有限公司);恒温箱(广东宏展科技有限公司);DNA 提取试剂盒(加拿大 Fermentas 公司)。

1.3 AGEs 的制备 精密称量 5.00 g BSA 和 9.00 g 的 D-葡萄糖,溶解于 100 ml 磷酸盐缓冲溶液中,搅拌溶解,经 0.22 μ m 滤膜过滤,放置恒温箱,避光孵育 12 周,制备 AGEs。以只加 BSA 作为磷酸盐缓冲溶液为对照溶液。孵育结束后,将 AGEs 放入无菌层析袋中,以 10 倍体积磷酸盐缓冲溶液透析 4 次,每次 6 h,即得。

1.4 大鼠血清的采集 大鼠经戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,随后每只大鼠腹腔注射 1 000 U 肝素。腹主动脉取血,经 3 000 r/min,离心 15 min 后分离

2020-01-07 接收

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(B2018191);广东省医学科学技术研究基金项目(A2017453)

作者单位: 广州医科大学附属第三医院药学部,广州 510150

作者简介: 刘少志,女,硕士研究生,主管药师

许俊,女,硕士研究生,主管药师,责任作者, E-mail: 645103081@qq.com

上层血清。保存于 -80°C 的冰箱中,用于炎性介质的检测。

1.5 分离、培养心肌微血管组织细胞 立即分离大鼠心脏,去除大血管、心房和右心室,用磷酸缓冲液洗除残血。用剪刀剪去剩余游离在左心室壁心内膜及心外膜 $1/3$ 后,剩余心室组织放在 75% 乙醇溶液浸泡 20 s ,用磷酸缓冲液冲洗。碎心肌组织,用 0.2% 胶原酶在 37°C 水浴箱中震荡孵育大约 8 min ,继之以 0.25% 胰蛋白酶消化大约 10 min 。采用 15% 胎牛血清 DMEM 培养液终止消化。采集滤液离心弃上清液。最后将细胞悬于 15% 胎牛血清培养液,接种在鼠尾胶覆盖的培养瓶中。

1.6 按照分组进行相应干预培养 在培养 24 h 后,按照之前的分组进行不同溶液的干预。其中,空白对照组($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 BSA 溶液),AGEs 组($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ AGE-BSA 的溶液),AGEs 加氯沙坦治疗组($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ AGE-BSA 的溶液 + 1.33 mg/ml 的氯沙坦),氯沙坦治疗组(1.33 mg/ml 的氯沙坦)。

1.7 检测方法

1.7.1 MTT 法检测心肌微血管组织细胞的活力 将分离的细胞混悬于 DMEM 培养液和 MTT 溶液中进行 4 h 孵育,孵育完成后,在 490 nm 处测量吸光度,并于显微镜下观察细胞形态。

1.7.2 TUNEL 法计算心肌微血管组织细胞的凋亡率 将内皮细胞用磷酸盐缓冲溶液清洗,按照 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。于荧光显微镜下观察,用 DAPI 对细胞核进行染色,经 DAPI 染色后的细胞核呈蓝色,而凋亡的细胞经 TUNEL 后则呈绿色。计算绿色细胞与蓝色细胞数量的比值来代表凋亡细胞数量占总细胞数的比例。

1.7.3 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-6、TNF- β 的含量 根据 ELISA 试剂盒的说明书进行,完成后在酶标仪上测取吸光值,测量波长为 450 nm 。RT-PCR 操作中,细胞总 RNA 的提取和 cDNA 的合成可根据说明书进行。PCR 的扩增体系:总扩增体系($20\text{ }\mu\text{l}$),主要包括 cDNA ($1\text{ }\mu\text{l}$),上游引物(10 mmol/L),下游引物(10 mmol/L),PCR 的预混物($12.5\text{ }\mu\text{l}$),ddH₂O 补足至 $25\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 下首先预变性 5 min ,然后进入循环:变性(95°C 30 s)、退火(63°C 30 s)、延伸(72°C 45 s),经历 32 次循环,最后在 72°C 的条件下延伸 5 min 。

1.7.4 Western Blot 与 RT-PCR 法对 JAK2/STAT3 信号通路中蛋白进行检测 Western Blot 操作中需要经过提取蛋白、检测蛋白、配制胶体、跑电泳、转

膜、孵育抗体、显影等操作,具体操作步骤可查阅相关文献进行^[7]。RT-PCR 采用 trizol 法提取总 RNA,反转录成 cDNA,用 SYBG 法 RTPCR,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算倍数关系。

1.8 统计学处理 实验数据经 SPSS 24.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌微血管组织细胞活力结果 与空白对照组相比,AGEs 组的细胞活力明显降低;AGEs 加氯沙坦治疗组的细胞活力稍有下降;氯沙坦治疗组的细胞活力没有特别明显的变化。各组与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

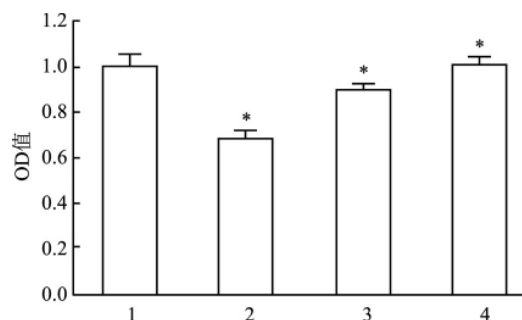


图 1 各组心肌细胞活力比较

1: 空白对照组; 2: AGEs 组; 3: AGEs 加氯沙坦治疗组; 4: 氯沙坦治疗组; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 各组心肌微血管组织细胞的凋亡率 与空白对照组比较,AGEs 组的细胞出现大量凋亡的情况,AGEs 加氯沙坦治疗组次之,氯沙坦治疗组的细胞少有凋亡,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

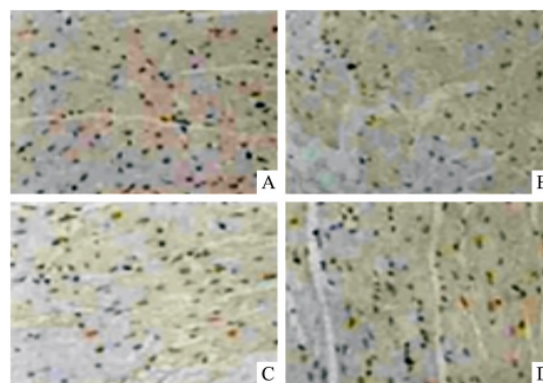


图 2 TUNEL 法观察各组大鼠心肌微血管组织细胞的凋亡情况 $\times 100$

A: 空白对照组; B: AGEs 组; C: AGEs 加氯沙坦治疗组; D: 氯沙坦治疗组

表2 各组大鼠的心肌微血管组织细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	细胞凋亡率(%)
空白对照	5.69 ± 1.26
AGEs	45.26 ± 13.86*
AGEs 加氯沙坦治疗	27.78 ± 11.83 [#]
氯沙坦治疗	4.59 ± 1.05 ^{#&}
F 值	37.68
P 值	0.00

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 AGEs 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 AGEs 加氯沙坦治疗组比较: [&] $P > 0.05$

2.3 各组大鼠心肌细胞在 JAK2/STAT3 信号通路中的影响 通过免疫印迹实验对大鼠心肌细胞的 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达水平检测我们可知: AGEs 组的磷酸化水平明显高于空白对照组; AGEs 加氯沙坦治疗组的磷酸化水平较空白对照组高而低于 AGEs 组; 氯沙坦治疗组的磷酸化水平与空白对照组表达相差不大。各组与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

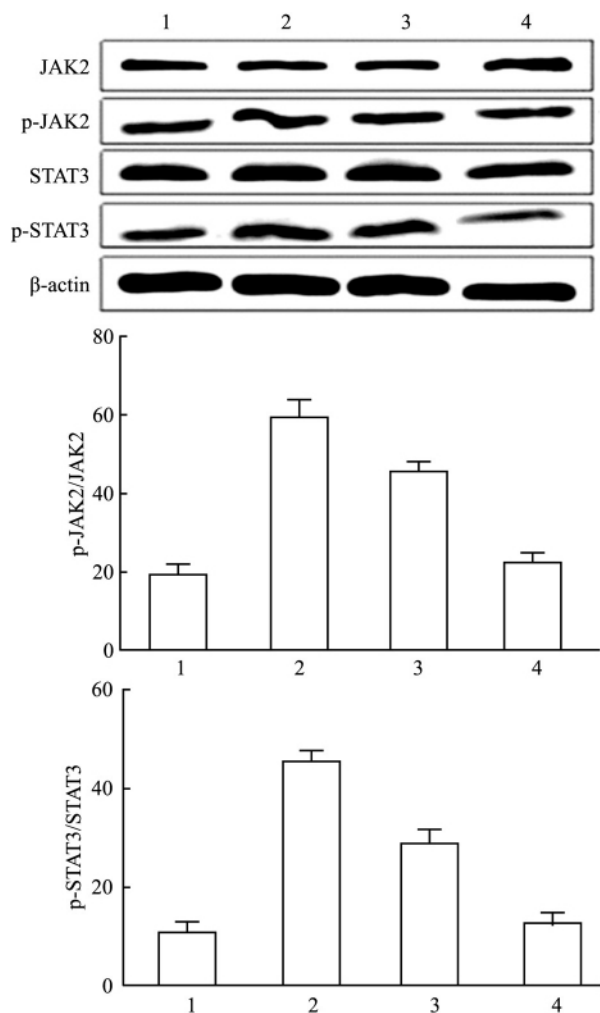
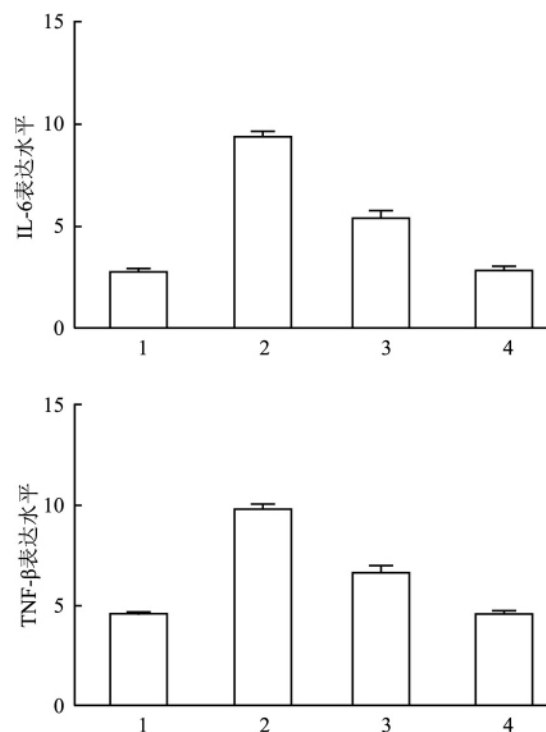


图3 各组大鼠心肌细胞在 JAK2/STAT3 信号通路中的表达结果
1: 空白对照组; 2: AGEs 组; 3: AGEs 加氯沙坦治疗组; 4: 氯沙坦治疗组

2.4 各组血清炎症介质 IL-6、TNF- β 的表达 与空白对照组比较, AGEs 组大鼠血清中炎症介质 IL-6、TNF- β 的表达均明显升高; AGEs 加氯沙坦治疗组 IL-6、TNF- β 表达水平比空白对照组要高但低于 AGEs 组; 氯沙坦治疗组大鼠的炎症介质 IL-6、TNF- β 表达水平与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4、表 3。

图4 各组大鼠血清炎症因子 IL-6、TNF- β 的表达

1: 空白对照组; 2: AGEs 组; 3: AGEs 加氯沙坦治疗组; 4: 氯沙坦治疗组

表3 各组大鼠血清中血清炎症因子 IL-6、TNF- β 的表达结果($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	IL-6(ng/ml)	TNF- β (ng/ml)
空白对照	2.651 ± 0.132	4.521 ± 0.069
AGEs	9.286 ± 0.311*	9.689 ± 0.238*
AGEs 加氯沙坦治疗	5.322 ± 0.256 [#]	6.576 ± 0.291 [#]
氯沙坦治疗	2.386 ± 0.159*	4.252 ± 0.061 [#]
F 值	95.702	81.035
P 值	0.00	0.00

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 AGEs 组比较: [#] $P < 0.05$

3 讨论

本研究旨在探讨氯沙坦对心肌微血管内皮细胞的保护机制。从 MTT 和 TUNEL 法结果可知, 在氯沙坦的干预下, 心肌微血管内皮细胞的活力与 AGEs

组比较得到提升,细胞凋亡数量明显减少。通过研究 JAK2/STAT3 通路发现,在氯沙坦的干预下,磷酸化水平与 AGEs 组比明显下降,同时炎症介质 IL-6、TNF- β 的表达水平也明显下降。

糖尿病在我国一直处于高发状态,并且患病人群逐步年轻化。发病原因通常是对葡萄糖的过量摄入和不规律的生活方式^[8]。患有糖尿病的患者对葡萄糖的摄入需要严格的控制,同时进行相关药物治疗才能有效缓解病情。糖尿病通常会引起心血管并发症^[9-11],常规的降血糖治疗方案无法对心血管疾病进行有效干预,反而可能导致患者出现低血糖乃至心血管原因的死亡。因此,糖尿病以及糖尿病引起的心血管疾病已经严重威胁到了公众的健康和生命安全。因此,探索糖尿病对心肌和血管的损伤机制,将为今后因糖尿病引起的心血管疾病的预防和治疗寻找相关作用点。

AGEs 是人体处于长期高糖状态下,蛋白质和还原糖发生糖基化反应所得到的产物^[12]。该物质会对人体的心肌细胞和微血管内皮细胞进行侵犯,使它丧失自己的功能,最后使细胞死亡。氯沙坦^[13-14]为血管紧张素受体拮抗剂,目前临床上用于保护心肌细胞抗心室的重塑。先前有文献报道^[15-16]氯沙坦可对糖尿病心肌微血管进行有效保护作用,因此本实验首先从细胞水平研究氯沙坦的治疗作用。通过 MTT 法和 TUNEL 法对各组细胞活力和凋亡检测发现,与空白对照组比较,AGEs 组的细胞活力明显下降和凋亡率上升($P < 0.05$),而在氯沙坦的干预下,AGEs 加氯沙坦治疗组的细胞活力得到了提升,凋亡率也有所下降($P < 0.05$)。该实验结果与之前文献报道的结果基本相符。根据细胞水平的实验结果,我们确定了氯沙坦对治疗心肌微血管内皮细胞有着很好的疗效,接着从基因方向研究其保护的作用机制。

有研究表明^[17]糖尿病心肌微血管的损伤与内皮细胞和吞噬细胞的活动息息相关,其活动会使得大量炎症因子和自由基的释放,造成内皮细胞的损伤,最终导致病变。促炎因子^[18]可对内皮细胞造成损伤,如 IL-6、IL-8、TNF- α 等,而抗炎介质^[19]可使炎症扩散,有 IL-4、IL-10、TGF- β 等。有文献报道^[20-21]TNF- β 和 IL-6 通过 JAK/STAT 信号通路来促成心血管损伤和心肌肥厚。通过 Western blot 和 RT-PCR 法检测结果可知,与空白对照组相比,AGEs 组 JAK2/STAT3 信号通路的磷酸化水平明显提高

($P < 0.05$),该结果与文献报道结果相一致。经过氯沙坦的干预后,AGEs 加氯沙坦治疗组的磷酸化水平较 AGEs 组有所下降($P < 0.05$),即氯沙坦通过 JAK2/STAT3 信号通路发挥疗效。通过对炎症因子 TNF- β 和 IL-6 的表达水平进行检测发现,与空白对照组比较,AGEs 组 TNF- β 和 IL-6 的表达水平有上升趋势($P < 0.05$),而 AGEs 加氯沙坦治疗组中 TNF- β 和 IL-6 的表达水平得到了有效的控制($P < 0.05$)。由此可知,氯沙坦通过对 JAK2/STAT3 信号通路磷酸化水平进行控制,同时抑制 TNF- β 和 IL-6 的表达水平。

综上所述,氯沙坦可以通过 JAK2/STAT3 信号通路来对 AGEs 患者的心肌微血管细胞进行修复,从而保护微血管心肌细胞,为以后更深入的研究奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 杨敏,柳洁.中国糖尿病防治现状[J].中国医学创新,2014,11(7):149-51.
- [2] 李玲,谢峥,万有才.阿魏酸对晚期糖基化终末产物诱导 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2019,35(14):1446-8.
- [3] 林雪松,汪乐,乔亮.高糖及晚期糖基化终末产物环境对血管内皮细胞血管样结构形成的影响[J].上海交通大学学报(医学版),2014,34(5):596-602.
- [4] 张美齐,陈环,沈晔,等.丹参酮 II A 激活 JAK2/STAT3 信号通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J].中华中医药学刊,2015,33(3):659-62,777.
- [5] 邓士兵,夏豪,周忠泉.姜黄素通过调控 JAK2/STAT3 信号通路对高糖环境下心肌细胞生物学特性的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(22):5490-2.
- [6] Wu J, Ma H, Bu X, et al. SERS determination of the antihypertensive drugs prazosin and losartan by using silver nanoparticles coated with β -cyclodextrin[J]. Mikrochimica Acta, 2019, 186(12):801.
- [7] 齐佳,崔春晖,陈日红,等.SIRT6 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J].安徽医科大学学报,2017,52(2):281-5.
- [8] 金玲玲.妊娠期糖尿病发病的相关影响因素分析[J].中国妇幼保健,2014,29(30):4973-5.
- [9] 周庆峰.细胞因子类抗糖尿病药物研究进展[J].中国药理学通报,2016,32(6):760-3.
- [10] Juan F I, Dik H, Marco R, et al. Five-Year Outcomes in Patients With Diabetes Mellitus Treated With Biodegradable Polymer Sirolimus-Eluting Stents Versus Durable Polymer Everolimus-Eluting Stents[J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(22):e013607.
- [11] 杨丽红,周欢欢,袁晓丹,等.抗阻运动对降低 2 型糖尿病患者心血管事件发生风险的效果研究[J].中国糖尿病杂志,2019,27(7):497-501.
- [12] Abu S C, Swapnil P B, Bakshi R, et al. Targeting receptors of ad-

- vanced glycation end products (RAGE) : Preventing diabetes induced cancer and diabetic complications [J]. *Pathol Res Pract* , 2019 , 215(11) : 152643.
- [13] Ayman E , Mohamed A O , Islam Y E , et al. Losartan for preventing aortic root dilatation in patients with marfan syndrome: A meta-analysis of randomized trials [J]. *Cardiol Ther* 2019 , 8(2) : 365 – 72.
- [14] 于 敏 , 于娟娟. 氯沙坦逆转心室重构的作用及机制 [J]. *中国老年学杂志* 2016 , 36(20) : 4982 – 5.
- [15] Wang L , Li J , Li D. Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 , 8(1) : 466 – 73.
- [16] 黄 琳 , 白瑞丽. 氯沙坦联合氨氯地平治疗高血压合并糖尿病的临床应用效果 [J]. *实用糖尿病杂志* 2018 , 14(3) : 34.
- [17] 郑亚萍 , 康红钰. 赤芍水提物对糖尿病心肌病大鼠心肌内质网应激与巨噬细胞浸润的影响 [J]. *医药导报* , 2015 , 34(11) : 1458 – 61.
- [18] 吴 鸿 , 王新洲 , 高水波 , 等. 益气活血方对内毒素诱导内皮细胞炎症反应的干预作用 [J]. *中国中西医结合杂志* , 2019 , 39(2) : 200 – 5.
- [19] Jin X , Yao Y , Lu X , et al. Function and mechanism of pyrin and IL-10 in the regulation of the inflammasome in pulmonary vascular endothelial cells following hemorrhagic shock [J]. *Exp Ther Med* , 2019 , 18(3) : 1768 – 74.
- [20] 尹建国 , 张社兵 , 彭道泉. 载脂蛋白 A I 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制肿瘤坏死因子 α 的转录表达 [J]. *中国动脉硬化杂志* 2017 , 25(6) : 566 – 70.
- [21] 晁 鹏 , 任 澎. JAK/STAT 信号转导通路与心力衰竭的研究进展 [J]. *心血管病学进展* 2017 , 38(6) : 729 – 35.
- [17] 郑亚萍 , 康红钰. 赤芍水提物对糖尿病心肌病大鼠心肌内质网

Protective mechanism of losartan in the injury of myocardial microvascular endothelial cells induced by advanced glycation end products via JAK2/STAT3 signaling pathway

Liu Shaozhi , Yuan Zhongwen , Mei Zhengrong , et al

(Dept of Pharmacy , The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University , Guangzhou 510150)

Abstract Objective To observe the effects of losartan on rat myocardial microvascular endothelial cells and Janus protein tyrosine protein kinase 2/signal transducer and transcriptional activator 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway , and explore protective mechanism of losartan on diabetes. **Methods** Rats were divided into a blank control group , (advanced glycation end products) AGEs group , AGEs plus losartan treatment group , and losartan treatment group for advanced glycation end products and losartan intervention. The activity and apoptosis rate of myocardial microvascular endothelial cells in rats were detected by MTT assay and TUNEL assay. The expression levels of related proteins in JAK2/STAT3 signaling pathway were detected by Western blot and RT-PCR. The levels of IL-6 and tumor necrosis factor- β (TNF- β) were detected by ELISA. **Results** Compared with the blank control group , the viability of myocardial microvascular endothelial cells in the AGEs group was significantly weakened and the apoptotic rate was increased. The expression of related proteins and the expression of related inflammatory factors IL-6 and TNF- β in the JAK2/STAT3 signaling pathway were also significantly elevated ($P < 0.05$) . Compared with the AGEs group , the AGEs plus losartan treatment group showed an increase in cell viability and a decrease in apoptotic rate. The expression of related proteins in the JAK2/STAT3 signaling pathway and the expression of related inflammatory factors IL-6 and TNF- β also decreased ($P < 0.05$) . There was no significant difference in the expression of related proteins and inflammatory mediators in the losartan group compared with the blank control group ($P > 0.05$) . **Conclusion** Losartan can effectively inhibit the advanced glycation end products through the JAK2/STAT3 signaling pathway , thereby alleviating the damage to myocardial microvascular endothelial cells and protecting them.

Key words losartan; JAK2/STAT3 signaling pathway; advanced glycation end products; myocardial microvascular endothelial cells; protective mechanism