

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.20.006

纳 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂调控 TLRs/MyD88 通路 对高糖诱导 HAECs 自噬及凋亡的影响 *

曹新营 邢彩耐 刘丽丽 杨光 刘馨蕊

(华北理工大学附属医院心血管内科 河北 唐山 063000)

摘要 目的:探讨纳 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂(SGLT-2i)调控 TLRs/MyD88 通路对高糖诱导的人主动脉内皮细胞(HAECs)自噬及凋亡的影响。**方法:**选用 HAECs,将细胞分为 NG 组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖)和 SGLT-2i+HG 组(30 mmol/L 葡萄糖 +50 μ mol/L 的 SGLT-2 抑制剂)。检测出各细胞生长活力、细胞凋亡水平、细胞 TLRs、MyD88 mRNA 表达水平,细胞 TLRs、MyD88、Bax、Bcl-2、Beclin 1、LC3II 蛋白表达以及自噬水平。**结果:**与 NG 组相比,HG 组细胞增殖率显著降低($P<0.05$);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞增殖率显著上升($P<0.05$)。12 h 时 24 h 时时间点,与 NG 组相比,HG 组细胞凋亡率均显著升高($P<0.05$);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞凋亡率均显著下降($P<0.05$)。与 NG 组相比,HG 组凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞 Bax、Bcl-2 表达水平下降($P<0.05$)。与 NG 组相比,HG 组自噬相关蛋白 Beclin 1、LC3II 水平升高($P<0.05$);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞 Beclin 1、LC3II 水平下降($P<0.05$)。与 NG 组相比,HG 组 TLRs、MyD88 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞 TLRs、MyD88 表达水平下降($P<0.05$)。**结论:** SGLT-2 通过调控 TLRs/MyD88 通路抑制高糖诱导的人主动脉内皮细胞自噬及凋亡。

关键词: SGLT-2i;高糖;主动脉内皮细胞;自噬;凋亡;TLRs/MyD88 通路

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2024)20-3836-03

The Effect of SGLT-2i Regulation of TLRs/MyD88 Pathway on High Glucose Induced Autophagy and Apoptosis in Human Aortic Endothelial Cells*

CAO Xin-ying, XING Cai-nai, LIU Li-li, YANG Guang, LIU Xin-rui

(Department of Cardiovascular Medicine,

Affiliated Hospital of North China University of Technology, Tangshan, Hebei, 063000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor (SGLT-2i) regulating the TLRs/MyD88 pathway on high glucose induced autophagy and apoptosis in human aortic endothelial cells (HAECs). **Methods:** Using HAECs, the cells were divided into NG group (5.5 mmol/L glucose), HG group (30 mmol/L glucose), and SGLT-2i+HG group (30 mmol/L glucose+50 μ Mol/L of SGLT-2 inhibitor). Detect the growth vitality; the level of cell apoptosis; the expression levels of TLRs and MyD88 mRNA; the levels of TLRs, MyD88, Bax, Bcl-2, Beclin 1, and LC3II in each group of cells. **Results:** Compared with the NG group, the cell proliferation rate of the HG group was significantly reduced ($P<0.05$); Compared with the HG group, the SGLT-2i+HG group showed a significant increase in cell proliferation rate ($P<0.05$). At 12 hours and 24 hours, compared with the NG group, the apoptosis rate of cells in the HG group was significantly increased ($P<0.05$); Compared with the HG group, the apoptosis rate of SGLT-2i+HG group was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the NG group, the expression levels of apoptosis related proteins Bax and Bcl-2 in the HG group increased ($P<0.05$); Compared with the HG group, the expression levels of Bax and Bcl-2 in cells of the SGLT-2i+HG group decreased ($P<0.05$). Compared with the NG group, the levels of autophagy related proteins Beclin 1 and LC3II in the HG group increased ($P<0.05$); Compared with the HG group, the levels of Beclin 1 and LC3II in cells of the SGLT-2i+HG group decreased ($P<0.05$). Compared with the NG group, the expression levels of TLRs and MyD88 proteins in the HG group increased ($P<0.05$); Compared with the HG group, the expression levels of TLRs and MyD88 in the SGLT-2i+HG group decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** SGLT-2 inhibits high glucose induced autophagy and apoptosis in human aortic endothelial cells by regulating the TLRs/MyD88 pathway.

Key words: SGLT-2i; High sugar; Aortic endothelial cells; Autophagy; Apoptosis; TLRs/MyD88 pathway

Chinese Library Classification(CLC): R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)20-3836-03

* 基金项目:河北省卫健委 2023 年度医学科学研究课题计划项目(20231251)

作者简介:曹新营(1980-),男,硕士,主治医师,研究方向:心血管疾病诊疗,E-mail: cxydpl@163.com

(收稿日期:2024-04-20 接受日期:2024-05-16)

前言

高血糖被证实与心血管疾病的发生和发展密切相关。据报道, SGLT-2 抑制剂具有调节糖代谢和改善胰岛功能^[1]。有研究表明^[2], SGLT-2 抑制剂可能通过调节 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLRs) MyD88 通路来减轻高糖环境对主动脉内皮细胞的损害。TLRs 可以感知细菌和病毒等外源性抗原, 并激活相关的信号通路。MyD88 是 TLRs 信号通路的关键分子, 但缺乏在高糖环境中对主动脉内皮细胞的自噬和凋亡中的作用。因此, 本研究旨在探究 SGLT-2 抑制剂如何通过调节 TLRs MyD88 通路来影响高糖诱导的主动脉内皮细胞自噬和凋亡。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人主动脉内皮细胞 (HAECs)、DMEM 培养基 (Thermo Fisher Scientific)、30 mmol/L 葡萄糖培养基、50 μmol/L SGLT-2i (MedChemExpress)、CCK-8 试剂盒 (Dojindo)、流式细胞术仪器 (BD Biosciences)、RNA 提取试剂盒 (Thermo Fisher Scientific)、qRT-PCR 仪器 (Applied Biosystems)、Western Blot 仪器 (PerkinElmer)。

1.2 实验分组

NG 组: 细胞在培养基中添加 5.5 mmol/L 葡萄糖。HG 组: 细胞在培养基中添加 30 mmol/L 葡萄糖。SGLT-2i+HG 组: 细胞在培养基中同时添加 50 μmol/L 的 SGLT-2 抑制剂和 30 mmol/L 葡萄糖。在 48 孔培养板中接种 300 μL 的细胞悬液, 每个孔约含 5×10^3 个细胞进行预培养, 将培养板放入培养箱中, 保持 37°C 和 5% CO₂ 培养条件中, 等待细胞生长至 70~80%。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK-8 法检测 移除培养液, 加入新的培养液, 确保包含相应处理租的成分, 加入 10 μL CCK-8 试剂, 在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中进行预培养 2 h。待细胞生长至 70~80% 融合度

后, 加入 30 mmol/L 的 D-葡萄糖继续培养 24 h。每孔加入 30 μL 的 CCK-8 溶液, 继续在培养箱内孵育 2 h。使用酶标仪 450 nm 出测定吸光度。CCK-8 的还原产物可以反应细胞代谢活性和生长状态。

1.3.2 Annexin V-FITC 检测 取得处理后的人主动脉内皮细胞悬液。将细胞悬液置于离心管中, 并进行离心, 使细胞沉淀在管底。弃去上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞沉淀。加入凋亡检测染料 Annexin V 和 PI (荧光素扩散)。在暗处孵育细胞悬液, 孵育时间为 15-30 分钟。使用流式细胞术仪器进行测量。通过流式细胞仪检测荧光素扩散和 Annexin V 标记的细胞。

1.3.3 Western Blot 提取细胞中的蛋白质, 并进行蛋白质浓度测定。将提取的蛋白质样品进行电泳分离, 通常使用 SDS-PAGE 凝胶。分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose membrane) 膜上。阻断非特异性结合位点, 使用牛血清白蛋白 (BSA) 或非脂奶粉。加入特定抗体, 与目标蛋白结合。可以使用一级抗体和二级抗体的结合来增强检测信号。弃去未结合的抗体, 用洗涤液洗涤膜上的非特异性结合物。加入酶标记的二级抗体, 使其与一级抗体结合。清洗膜上的非特异性结合物, 加入酶标底物, 使其与酶标记结合并发生反应。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SGLT-2i 对各组 HAECs 增殖、凋亡情况

与 NG 组相比, HG 组细胞增值率显著降低 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, SGLT-2i+HG 组细胞增值率显著上升 ($P < 0.05$)。12 h 时 24 h 时时间点, 与 NG 组相比, HG 组细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, SGLT-2i+HG 组细胞凋亡率均显著下降 ($P < 0.05$) 详见表 1。

表 1 SGLT-2i 对各组 HAECs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of SGLT-2i on the proliferation of HAECs in each group ($\bar{x} \pm s$)

| Groups | Cell proliferation rate (%) | 12 h cell apoptosis rate (%) | 24 h cell apoptosis rate (%) |
|------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| NG group | 102.37±22.59 | 6.39±1.49 | 4.38±1.96 |
| HG group | 63.25±12.39 ^a | 21.38±3.66 ^a | 27.86±3.92 ^a |
| SGLT-2i+HG group | 71.28±13.69 ^{ab} | 15.35±3.15 ^{ab} | 11.62±2.76 ^{ab} |
| <i>F</i> | 7.52 | 33.41 | 80.84 |
| <i>P</i> | 0.007 | <0.001 | <0.001 |

Note: Compared with the NG group, ^a $P < 0.05$; Compared with the HG group, ^b $P < 0.05$.

2.2 SGLT-2i 对各组细胞凋亡相关蛋白、自噬相关蛋白表达水平

与 NG 组相比, HG 组凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, SGLT-2i+HG 组细胞 Bax、Bcl-2 表达水平下降 ($P < 0.05$)。与 NG 组相比, HG 组自噬相关蛋白 Beclin 1、LC3II 水平升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, SGLT-2i+HG 组细胞 Beclin 1、LC3II 水平下降 ($P < 0.05$), 详见表 2。

2.3 SGLT-2i 对各组细胞 TLRs/MyD88 通路蛋白表达水平

与 NG 组相比, HG 组 TLRs、MyD88 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, SGLT-2i+HG 组细胞 TLRs、MyD88 表达水平下降 ($P < 0.05$) 详见表 3。

3 讨论

高糖是一种糖尿病常见的代谢异常会影响主动脉内皮细

表 2 SGLT-2i 对各组细胞凋亡相关蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effects of SGLT-2i on the expression of apoptosis related proteins Bax and Bcl-2 in each group of cells($\bar{x}\pm s$)

| Groups | Bax | Bcl-2 | Beclin 1 | LC3II |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| NG group | 1.56±0.15 | 1.58±0.17 | 0.86±0.17 | 0.32±0.11 |
| HG group | 4.86±0.39 ^a | 4.73±0.35 ^a | 2.03±0.36 ^a | 1.44±0.07 ^a |
| SGLT-2i+HG group | 3.43±0.24 ^{ab} | 3.79±0.46 ^{ab} | 1.25±0.15 ^{ab} | 0.63±0.19 ^{ab} |
| <i>F</i> | 176.91 | 108.06 | 29.41 | 94.47 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

Note: Compared with the NG group, ^a*P*<0.05; Compared with the HG group, ^b*P*<0.05.

表 3 SGLT-2i 对各组细胞 TLRs/MyD88 通路蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 3 SGLT-2i affects the expression levels of TLRs/MyD88 pathway proteins in each group of cells($\bar{x}\pm s$)

| Groups | TLRs | MyD88 |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| NG group | 1.52±0.16 | 1.86±0.45 |
| HG group | 5.38±0.69 ^a | 4.95±0.42 ^a |
| SGLT-2i+HG group | 3.65±0.46 ^{ab} | 3.52±0.35 ^{ab} |
| <i>F</i> | 78.61 | 71.54 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 |

Note: Compared with the NG group, ^a*P*<0.05; Compared with the HG group, ^b*P*<0.05.

胞,对人体的血管健康不利。高糖环境会导致内皮细胞的损伤和功能障碍,从而增加心血管疾病风险。高糖诱导下,内皮细胞的表达发生变化。SGLT-2i 是一种广泛应用于糖尿病治疗的口服药物。其主要用于治疗糖尿病,特别是 2 型糖尿病。SGLT-2i 通过抑制肾脏近曲小管的 SGLT-2 活性,减少葡萄糖的重吸收,从而促进尿糖排泄。SGLT-2i 通过抑制肾脏中的 SGLT-2,增加尿糖排泄,可以有效地降低血糖。同时,这种作用机制不会明显增加低血糖的风险,是相对安全的治疗方式。除了降低血糖外,SGLT-2i 还有一系列潜在的益处。一方面,通过减轻体重和降低血压,它们有助于心血管系统的改善。通过抑制食欲和促进饱腹感,SGLT-2i 可以限制能量的摄入,有助于减肥。另一方面,它们还可以减少尿蛋白排泄,保护肾脏健康。SGLT-2i 的这些潜在益处有助于心血管疾病风险的降低。多项研究表明,SGLT-2i 还有抗衰老作用^[9]。其可能机制是它们能够改善代谢稳态,减轻氧化应激和炎症,促进内皮功能。这些潜在的益处对于糖尿病患者来说具有重要意义。在糖尿病和高糖环境中,内皮细胞的自噬和凋亡过程可能会被激活^[9]。SGLT-2i 可能通过抑制自噬和凋亡的激活,保护内皮细胞免受损伤。此外,SGLT-2i 还可以通过增加细胞能量水平、抑制氧化应激和 DNA 损伤,进一步保护内皮细胞^[5]。本研究发现与 NG 组相比,HG 组细胞增殖率显著降低(*P*<0.05);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞增殖率显著上升(*P*<0.05)。12 h 时 24 h 时时间点,与 NG 组相比,HG 组细胞凋亡率均显著升高 (*P*<0.05);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞凋亡率均显著下降(*P*<0.05)。提示高糖诱导 HAECs 细胞凋亡,而 SGLT-2i 可以有效抑制高糖诱导的细胞凋亡。

TLRs 通路是指 Toll 样受体信号通路,能识别和响应微生物等外来入侵者^[9]。TLRs 通路在炎症反应、细胞激活和适应性

免疫应答中发挥关键作用。TLRs 通路能识别并响应各种病原体,进而启动免疫反应,促进适应性免疫应答的产生^[7]。TLRs 通路会引发一系列炎症反应,这些反应有助于防御入侵者并清除病原体。在感染过程中,TLRs 通路能促进免疫细胞的增殖和分化,以应对入侵者的入侵^[8]。提示,SGLT-2 抑制剂组中 TLRs 的表达水平下降。使用 SGLT-2 抑制剂的同时也能降低高糖组中细胞的 TLRs 表达水平。MyD88 是调节免疫系统中信号转导的关键分子。当免疫细胞(如巨噬细胞和树突状细胞)受到细菌、病毒、真菌等外来病原体的刺激时,它们会通过与其病原体的分子模式识别受体(Pattern Recognition Receptors, PRRs)结合来激活 MyD88 通路。激活 MyD88 通路会触发一系列信号传递事件,包括磷酸化、激活转录因子和蛋白激酶等,进而激活免疫细胞,引发炎症反应和免疫应答^[9]。激活 MyD88 通路会促使免疫细胞释放多种炎症介质,MyD88 通路的激活会引发多种抗菌机制,有助于清除病原体^[10]。与 NG 组相比,HG 组 TLRs、MyD88 蛋白表达水平升高 (*P*<0.05);与 HG 组相比,SGLT-2i+HG 组细胞 TLRs、MyD88 表达水平下降 (*P*<0.05)提示,TLRs/MyD88 通路在参与高糖诱导的人主动脉内皮细胞的自噬和凋亡,而 SGLT-2i 能够有效抑制该通路。

综上所述,SGLT-2i 可以通过调控 TLRs/MyD88 通路、抑制自噬和凋亡的激活,从而保护人主动脉内皮细胞免受高糖诱导损伤。

参考文献(References)

- [1] 余娜,刘素红,田起运,等. Cox-1MCHB 运动干预辅助 SGLT-2 抑制剂治疗糖尿病肾病的效果[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2023, 29(7): 1182-1185.
- [2] 徐丽丽,高明,王利存,等. 银杏二萜内酯调控 Toll 样受体 4/核因子- κ B 通路对糖尿病大鼠肾脏病变的影响及机制研究[J]. 临床肾脏病杂志, 2023, 23(9): 750-759.

PNA、PMA 水平^[15]。葛根可清除氧自由基和脂质过氧化,从而降低炎症反应,改善脑循环^[16]。

综上所述,血塞泰联合针刺、头部刮痧治疗风痰阻络型脑梗死患者,可改善脑 CT 血流灌注成像指标、血小板-白细胞聚集体和血液流变学。

参考文献(References)

- [1] 刘博,黎明全,汲广成,等. 中医治疗脑梗死恢复期的研究进展[J]. 河北中医, 2022, 44(11): 1921-1926.
- [2] 陈晓帆,郭育君,侯超,等. 通络活络汤联合虎符铜砭刮痧及耳穴压豆治疗脑梗死疗效研究[J]. 陕西中医, 2022, 43(9): 1196-1199.
- [3] 王丽芬,陈坤,黄丽萍,等. 醒脑开窍针刺法治疗脑梗死恢复期的临床效果及机制研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(21): 2305-2308, 2337.
- [4] 郭志华,宾晓芳,毛湘屏,等. 血塞泰治疗脑梗死恢复期风痰瘀阻证临床研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(26): 40-41.
- [5] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.
- [6] 李平,吴钟璇,张云如,等. 中风病诊断与疗效评定标准(试行)[J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(1): 55-56.
- [7] 郑云凤,李铁,王冠,等. 天麻钩藤饮加减治疗对脑梗死恢复期患者脑血流动力学、氧化应激和神经细胞因子的影响[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(4): 651-655.
- [8] 陈秀香,刘建浩,樊伟,等. 针刺对于脑梗死恢复期头痛及吞咽障碍的干预及治疗作用[J]. 世界中医药, 2023, 18(13): 1928-1931, 1937.
- [9] 王小亮,邱航健,李振东,等. 铜砭刮痧联合耳穴压豆对 MCAO 大鼠脑缺血损伤改善效果及炎症因子的影响 [J]. 解剖学研究, 2023, 45(3): 223-229.
- [10] 申思,郭志华,李雅,等. 血塞泰对急性脑梗死风痰瘀阻证患者 hs-CRP 的影响[J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(3): 28-30.
- [11] 申思. 血塞泰治疗脑梗死风痰瘀阻证患者的临床观察及对血浆 t-PA、PAI-1 的影响[D]. 湖南中医药大学, 2013.
- [12] 胡小红,陈衍贵,陈银娟,等. 急性脑梗死患者血小板白细胞聚集体与动脉粥样硬化的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(3): 291-294.
- [13] 权浩浩,张晓凤,高凯,等. 基于网络药理学的僵蚕主要药效作用研究[J]. 西部中医药, 2021, 34(3): 92-96.
- [14] 陈雨萌,李倩,刘维海,等. 丹参活性成分治疗心血管疾病的药理作用、临床应用及不良反应研究进展 [J]. 药学研究, 2023, 42(12): 1028-1034.
- [15] 梅婷婷,闫珺,陈晶. 石菖蒲化学成分及其药理作用概述 [J]. 中医药信息, 2022, 39(4): 77-80, 89.
- [16] 李蓉,宋宗良,张效科,等. 葛根现代药理作用及复方临床应用研究进展[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(2): 153-160.

(上接第 3838 页)

- [3] Arnold S V, Tang F, Cooper A, et al. Global use of SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes. Results from DISCOVER[J]. BMC Endocrine Disorders, 2022, 22(1): 1-7.
- [4] Shepard B, Ecelbarger C. Sodium Glucose Transporter, Type 2 (SGLT2) Inhibitors (SGLT2i) and Glucagon-Like Peptide 1-Receptor Agonists: Newer Therapies in Whole-Body Glucose Stabilization[J]. Seminars in nephrology, 2021, 41(4): 331-348.
- [5] Li L, Hua C, Liu, X, et al. SGLT2i alleviates epicardial adipose tissue inflammation by modulating ketone body-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase malonylation pathway [J]. Journal of cardiovascular medicine, 2023, 24(4): 232-243.
- [6] 李雅亭,岳红梅,许金回,等. Toll 样受体信号通路在 OSAS 及其并发症发生发展中的作用和作用机制研究进展 [J]. 山东医药, 2023, 63(27): 97-100.
- [7] 金玥,张煜,马焕艳,等. 家蚕 Toll 和 IMD 信号通路重要基因对不同病原体感染的免疫响应[J]. 蚕业科学, 2023, 49(2): 127-134.
- [8] Xu W, Cao F, Zhao M, et al. Macrophage activation by exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* fermented milk through TLRs-mediated NF- κ B and MAPK pathways[J]. International immunopharmacology, 2022, 108: 108875.
- [9] Lu P, Fang K, Cheng W, et al. High-frequency electrical stimulation reduced hyperalgesia and the activation of the Myd88 and NF κ B pathways in chronic constriction injury of sciatic nerve-induced neuropathic pain mice[J]. Neuroscience letters, 2023, 796: 137064.
- [10] Liu S, Wu Y, Chen H, et al. MyD88 in macrophages protects against colitis via inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in epithelial cells[J]. Genes & Diseases, 2023, 10(2): 344-347.