

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.20.011

吡格列酮诱导心肌细胞凋亡和抑制心肌细胞肥大的作用及其机制研究 *

陈 红¹ 段多喜¹ 雷 英¹ 高水群² 唐 静² 吴 茜³

(1 成都医学院第二附属医院 / 核工业四一六医院中西医结合科 四川 成都 610057;

2 成都医学院第二附属医院 / 核工业四一六医院药剂科 四川 成都 610057; 3 成都市第一人民医院心血管内科 四川 成都 610095)

摘要 目的:探讨吡格列酮诱导心肌细胞凋亡和抑制心肌细胞肥大的作用及其机制研究。**方法:**选取 1-3 日龄的健康新生 SD 大鼠,采用酶学分离心肌细胞并培养。将心肌细胞分为 4 组:对照组、吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组、阿帕替尼 2 μ M 组。采用自动细胞计数器(BioRad)计数吡格列酮和阿帕替尼对心肌细胞增殖的影响,流式细胞术检测心肌细胞凋亡率, $[^3\text{H}]$ -亮氨酸掺入法评估心肌细胞的肥厚,用相差显微镜检测心肌细胞直径。蛋白免疫印迹试验检测 VEGFR-2、磷酸化 VEGFR-2、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化人体抑癌基因(P53),兔抗人单克隆抗体(Bax),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达水平。免疫组织化学检测心肌细胞 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax 阳性指数。**结果:**吡格列酮和阿帕替尼均能抑制心肌细胞活力,其中吡格列酮以剂量依赖的方式抑制心肌细胞活力,即吡格列酮剂量越大,其抑制心肌细胞活力越强。吡格列酮或阿帕替尼治疗后,心肌细胞凋亡率显著增加,表明两者均诱导心肌细胞凋亡。吡格列酮或阿帕替尼治疗后,血管紧张素 II(Ang II)诱导的 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸掺入量显著减少,心肌细胞直径减小,表明两者均抑制心肌细胞肥大。吡格列酮显著提高了新生大鼠心肌细胞中 Bax 和磷酸化-P53 的蛋白表达,降低了 mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化-VEGFR-2 蛋白表达。与对照组比较,吡格列酮和阿帕替尼治疗后,VEGFR-2 阳性指数和 Bcl-2 阳性指数显著降低,Bax 阳性指数显著升高($P<0.05$)。**结论:**吡格列酮通过调节 VEGFR-2 信号通路诱导心肌细胞凋亡,抑制心肌细胞肥大。

关键词:吡格列酮;心肌细胞凋亡;心肌细胞肥大;作用机制

中图分类号:R-33;R541.61;R322.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)20-3856-06

Effects of Pioglitazone on Inducing Apoptosis and Inhibiting Hypertrophy of Cardiomyocytes and its Mechanism*

CHEN Hong¹, DUAN Duo-xi¹, LEI Ying¹, GAO Shui-qun², TANG Jing², WU Xi³

(1 Department of Integrated TCM & Western Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College/Nuclear Industry 416 Hospital, Chengdu, Sichuan, 610057, China; 2 Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College/Nuclear Industry 416 Hospital, Chengdu, Sichuan, 610057, China; 3 Department of Internal Medicine-Cardiovascular, Chengdu First People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610095, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect Effects of pioglitazone on inducing apoptosis and inhibiting hypertrophy of cardiomyocytes and its mechanism. **Methods:** 1 to 3 days old healthy newborn SD rats were selected, and cardiomyocytes were isolated and cultured by enzyme. Myocardial cells were divided into four groups: control group, pioglitazone 10 μ M group, pioglitazone 20 μ M group, and apatinib 2 μ M group. BioRad was used to count the effects of pioglitazone and apatinib on the proliferation of cardiomyocytes, flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of cardiomyocytes, and the $[^3\text{H}]$ -leucine incorporation method was used to evaluate the hypertrophy of cardiomyocytes. The diameter of the cardiomyocytes was examined by a microscope. Western blot was used to detect the protein expression levels of VEGFR-2, phosphorylated VEGFR-2, Akt, phosphorylated p53, Bax, Bcl-2 and mTOR. The positive index of VEGFR-2, Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemistry. **Results:** Both pioglitazone and apatinib can inhibit the activity of myocardial cells, and pioglitazone can inhibit the activity of myocardial cells in a dose-dependent manner, that is, the greater the dose of pioglitazone, the stronger the inhibition of cardiac cell activity. The apoptosis rate of myocardial cells increased significantly after treatment with pioglitazone or apatinib, indicating that both of them induced apoptosis. After treatment with pioglitazone or apatinib, the amount of $[^3\text{H}]$ - leucine incorporation induced by Ang II was significantly reduced, and the diameter of cardiac cells decreased, indicating that both inhibited cardiomyocyte hypertrophy. Pioglitazone significantly increased the expression of Bax and phosphorylated-p53 in neonatal rat cardiomyocytes, and decreased the expression of mTOR, Akt, VEGFR-2, Bcl-2 and phosphorylated VEGFR-2. Compared with the control group, the positive index of VEGFR-2 and Bcl-2 were significantly decreased and Bax positive index increased significantly($P<0.05$). **Conclusion:** Pioglitazone induces cardiomyocyte apoptosis and inhibits cardiomyocyte hypertrophy by reg-

* 基金项目:四川省医学科研青年创新课题项目(Q16033)

作者简介:陈红(1981-),女,本科,主治医师,从事中医及西医治疗心血管病方向的研究, E-mail: henhong_20212021@163.com

(收稿日期:2021-04-27 接受日期:2021-05-23)

ulating the VEGFR-2 signaling pathway.

Key words: Pioglitazone; Cardiomyocyte apoptosis; Cardiomyocyte hypertrophy; Mechanism of action

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.61; R322.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)20-3856-06

前言

心力衰竭是心血管疾病最常见的后果,也是全世界心血管疾病死亡的主要原因。心力衰竭的基本病理生理是心脏重构,主要包括心肌细胞肥大、心肌细胞凋亡、坏死、成纤维细胞增殖和纤维化等多种细胞改变^[1]。研究表明,糖尿病通过糖毒性和脂肪毒性驱动心脏重构,包括心肌肥大和心肌细胞丢失,最终导致心力衰竭^[2]。吡格列酮被广泛用于过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)- γ 激动剂和胰岛素增敏剂,以改善2型糖尿病患者的血糖控制^[3]。然而,吡格列酮的应用导致的心血管风险仍有争议。基于前瞻性的大血管事件吡格列酮临床试验数据显示,吡格列酮使用不会显著增加心肌梗死或心源性死亡的风险,而且吡格列酮可以通过抑制蛋白激酶B(AKT)/糖原合成酶激酶-3(GSK3 β)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路来抑制负荷诱导的心肌肥厚^[4,5]。但有研究显示吡格列酮治疗与心衰风险增加相关^[6]。血管内皮生长因子受体(VEGFR)具有三种不同的亚型,分别为VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3。研究表明,VEGFR-1和VEGFR-2分别对心肌细胞肥大的恢复和诱导至关重要,而VEGFR-3则通过促进代偿性心肌细胞肥大和提高存活率而对梗死心肌有益,被认为是心脏肥厚和心力衰竭的关键因素^[7-9]。吡格列酮降低门静脉高血压大鼠内脏组织VEGFR-2的表达,抑制血管新生,提示可能直接影响VEGFR-2的表达^[10]。因此,本实验旨在探讨吡格列酮诱导心肌细胞凋亡和抑制心肌细胞肥大的作用及其机制研究,以探索吡格列酮影响心血管预后的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 新生大鼠心肌细胞分离培养

选取1-3日龄的健康新生SD大鼠。分离大鼠心脏,放入PBS中洗涤3次后将心肌组织转移入装有DMEM/F12的血清中,并剪成约1 mm³碎块。在分离心肌组织中加入0.25%胰酶及0.01%胶原酶各2 mL,在37℃条件下用恒温磁力搅拌机混匀,消化5 min,第一次弃上清,随后每次消化的上清液均收集并装入含10% FBS的DMEM培养基中,直至上清液澄清或心脏组织块消失。将收集上清液离心1000 rpm 10 min。弃上清后加入DMEM/F12重悬细胞(含15%胎牛血清),随后转移至培养瓶中,放置在培养箱中1.5 h后,弃去贴壁细胞,取上清细胞液调整细胞浓度为5 $\times$ 10⁴个/cm²,再接种到目的培养器皿中。加入0.1 mmol/L 5-BrdU以阻止成纤维细胞增殖。培养48 h后即可用于实验。

1.2 心肌细胞分组

将上述培养心肌细胞分为4组:对照组,不加入吡格列酮或阿帕替尼;吡格列酮10 μ M组和吡格列酮20 μ M组,加入吡格列酮10 μ M或20 μ M;阿帕替尼2 μ M组,加入阿帕替尼2 μ M;其余各组心肌细胞在相同条件下培养并用于实验。

1.3 细胞增殖实验

吡格列酮(广州方海医药科技有限公司)和VEGFR-2选择性抑制剂阿帕替尼(艾博抗(上海))对心肌细胞增殖的影响在处理24 h使用自动细胞计数器(BioRad)计数结晶紫染色细胞。在不同的刺激条件下,结晶紫染色作为一个快速和通用的检测筛选细胞活力,被用来分析细胞活力。将心肌细胞(5 $\times$ 10⁴个/孔)接种于96孔板,在标准培养基中培养24 h。血清饥饿24 h后,用0.1 μ M血管紧张素II处理心肌细胞24 h。在给药前2 h加入吡格列酮(10或20 μ M)和阿帕替尼(2 μ M)。结晶紫染色时,用1 $\times$ 磷酸盐缓冲盐水洗涤2次,20%甲醇固定30 min,0.2%结晶紫溶液在室温下轻摇染色30 min。染色细胞用水冲洗,直到背景清晰可见。用1% SDS提取结晶紫染料,使用自动细胞计数器计数细胞。

1.4 心肌细胞肥大

心肌细胞以5 $\times$ 10⁴个/孔的密度在96孔板中接种,使用[H]-亮氨酸掺入法评估心肌细胞的肥厚。用吡格列酮(10或20 μ M)和阿帕替尼(2 μ M)治疗2 h后,用0.1 μ M血管紧张素II(Ang II)刺激心肌细胞肥大,每孔同时加入1 μ Ci [H]-亮氨酸。用Ang II刺激60 h后,用10%三氯乙酸冰沉淀30 min,然后用1 mol/L NaOH在4℃下溶解过夜。样品用1 mol/L盐酸中和,[H]水平在闪烁液中使用 β 计数器来评估[H]-亮氨酸掺入。

1.5 心肌细胞大小的测定

在无血清培养液中培养心肌细胞24 h后,吡格列酮10 μ M组和吡格列酮20 μ M组分别给予吡格列酮10 μ M或20 μ M,阿帕替尼2 μ M组则加入阿帕替尼2 μ M,对照组给予等体积生理盐水。每24 h加药一次,持续7 d,用0.25%的胰酶消化使之脱落后,用相差显微镜检测细胞直径,每个视野检测10个细胞直径后取其平均值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

采用膜联蛋白A5-绿色荧光素(AV)/碘化丙啶(PI)双染色流式细胞术(南京凯基生物科技发展有限公司)检测心肌细胞凋亡率。收集处理后细胞(1-5 $\times$ 10⁵/mL),用磷酸盐缓冲盐水洗涤2次,然后用500 μ L的结合缓冲液重悬。随后用10 μ L AV和5 μ L PI室温暗培养15 min。流式细胞仪在30 min内鉴定出凋亡细胞,并置于荧光显微镜下观察细胞凋亡形态。

1.7 蛋白免疫印迹试验

胰蛋白酶化的细胞在放射免疫沉淀实验缓冲液中溶解,在冰上匀浆,然后离心。上清通过10% SDS-PAGE分解并转移到PVDF膜。用含5%脱脂牛奶的Tris缓冲盐水(TBS)堵塞膜,并与以下一抗在4℃下孵育一夜:VEGFR-2,磷酸化VEGFR-2,蛋白激酶B(Akt),磷酸化人体抑癌基因(P53),兔抗人单克隆抗体(Bax),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),GAPDH。再加入TBST溶液洗膜3次,室温冲洗5 min。加入二抗,室温下孵育1 h,用TBST溶液洗膜3次,室温冲洗5 min。用密度法分析薄膜上的能带强度,并将结果归一

化为 β -actin。以 GAPDH 作为蛋白载量对照。

1.8 免疫组织化学检测心肌细胞 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax

一抗为鼠 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax 单克隆抗体,1:5 稀释,切片行脱蜡水化,操作过程按试剂盒说明书进行,以 PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色。每组大鼠心肌细胞观察取 5 张切片,每张切片观察每个视野中的阳性细胞数和细胞总数,最后计算平均值作为 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax 阳性指数。

1.9 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示及 t 检验,计数资料以频数和百分率表示及 χ^2 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吡格列酮和阿帕替尼对心肌细胞活力影响

对照组、吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组和阿帕替尼 2 μ M 组心肌细胞活力细胞计数值逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示吡格列酮和阿帕替尼均能抑制心肌细胞活力,其中吡格列酮以剂量依赖的方式抑制心肌细胞活力,即吡格列酮剂量越大,其抑制心肌细胞活力越强。见表 1。

2.2 吡格列酮和阿帕替尼对心肌细胞肥大影响

表 1 各组心肌细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of myocardial cell counts in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Myocardial cell counts($\times 10^4$)
Control group	2.75 $\pm$ 0.31
Pioglitazone 10 μ M group	1.92 $\pm$ 0.30*
Pioglitazone 20 μ M group	1.60 $\pm$ 0.28**
Apatinib 2 μ M group	1.28 $\pm$ 0.30**@
F value	60.827
P value	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 10 μ M group, ** $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 20 μ M group, @ $P < 0.05$.

与对照组比较,吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组和阿帕替尼 2 μ M 组 [3 H]-亮氨酸掺入量逐渐减少,心肌细胞直径减小,其中吡格列酮 20 μ M 组和阿帕替尼 2 μ M 组 [3 H]-亮氨酸掺入量减少最显著,,差异均有统计学意义($P < 0.05$);吡格列酮 20 μ M 组的细胞直径减小更显著。提示吡格列酮或阿帕替尼治疗后,Ang II 诱导的 [3 H]-亮氨酸掺入量显著减少,心肌细胞直径减小,表明两者均抑制心肌细胞肥大。见表 2。

表 2 各组 [3 H]-亮氨酸掺入和细胞直径比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of [3 H]-leucine incorporation and cell diameter in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	[3 H]-leucine incorporation(cpm/hole)	Cell diameter(μ m)
Control group	842.37 $\pm$ 21.63	21.06 $\pm$ 1.67
Pioglitazone 10 μ M group	714.83 $\pm$ 21.34*	20.15 $\pm$ 1.59*
Pioglitazone 20 μ M group	534.60 $\pm$ 19.72**	18.04 $\pm$ 1.38*
Apatinib 2 μ M group	506.91 $\pm$ 19.34**@	19.86 $\pm$ 1.43*
F value	41.083	11.062
P value	0.000	0.010

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 10 μ M group, ** $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 20 μ M group, @ $P < 0.05$.

2.3 吡格列酮和阿帕替尼对心肌细胞凋亡率影响

显微镜下观察可见对照组大鼠心肌细胞结构完整,形态规则,染色均匀;而吡格列酮 10 μ M 处理组大鼠心肌细胞膜消失,细胞形态不规则,数量增多,细胞核破裂,染色质浓缩,见图 1。对照组、吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组和阿帕替尼 2 μ M 组心肌细胞凋亡率逐渐增加,均明显高于对照组,其中吡格列酮 10 μ M 组的细胞凋亡率显著低于吡格列酮 20 μ M 组和阿帕替尼 2 μ M 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示吡格列酮或阿帕替尼治疗后,心肌细胞凋亡率显著增加,表明两者均诱导心肌细胞凋亡。见表 3。

2.4 Bax、磷酸化 -P53、mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化 -VEGFR-2 蛋白表达水平表达

与对照组比较,吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组、阿帕替尼 2 μ M 组 Bax 和磷酸化 -P53 蛋白表达水平均显著提高,mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化 -VEGFR-2 蛋白表达

水平显著减低,差异有统计学意义($P < 0.05$);同样,阿帕替尼显著降低 mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化 -VEGFR-2 蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示吡格列酮显著提高了新生大鼠心肌细胞中 Bax 和磷酸化 -P53 的蛋白表达,降低了 mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化 -VEGFR-2 的表达。见图 2,表 4。

2.5 心肌细胞 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax 免疫组织化学检测结果

与对照组比较,吡格列酮 10 μ M 组、吡格列酮 20 μ M 组、阿帕替尼 2 μ M 组 VEGFR-2 阳性指数和 Bcl-2 阳性指数显著降低,Bax 阳性指数显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

吡格列酮是抗糖尿病的噻唑烷二酮类药物,其作用机制与胰岛素的存在有关,属胰岛素增敏剂,可减少外周组织和肝脏

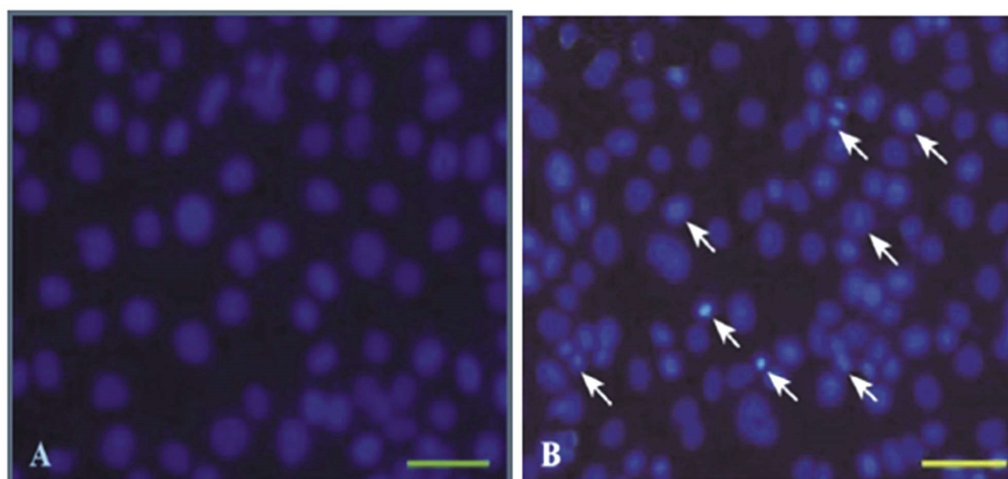


图1 吡格列酮对大鼠心肌细胞凋亡活性的影响

Fig.1 The effect of pioglitazone on the apoptotic activity of rat cardiomyocytes

Note: A: Control group; B: Pioglitazone 10 μ M group, Scale=50 μ m, Arrow shows apoptotic cardiomyocytes.表3 各组心肌细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of cardiomyocyte apoptosis rate in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Apoptosis rate(%)
Control group	5.61 $\pm$ 0.42
Pioglitazone 10 μ M group	24.62 $\pm$ 2.34*
Pioglitazone 20 μ M group	32.09 $\pm$ 3.16* ^{&}
Apatinib 2 μ M group	35.71 $\pm$ 3.20* ^{&@}
F value	51.924
P value	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 10 μ M group, [&] $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 20 μ M group, [@] $P < 0.05$.

的胰岛素抵抗,增加依赖胰岛素的葡萄糖的处理,并减少肝糖的输出,是PPAR- γ 的特异性激动剂,临床上常用来治疗2型糖尿病^[11,12]。一项旨在评估吡格列酮心血管事件的大型前瞻性PROACTIVE研究经过34.5个月的随访后发现,与安慰剂组相

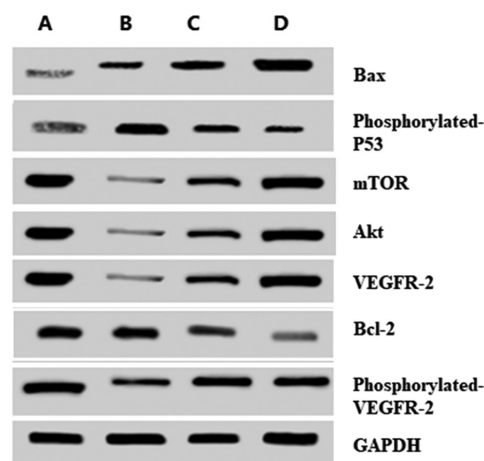


图2 Bax、磷酸化-P53、mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2和磷酸化-VEGFR-2蛋白表达水平表达

Fig.2 Protein expression of Bax, phosphorylated-P53, mTOR, Akt, VEGFR-2, Bcl-2 and phosphorylated-VEGFR-2

Note: A: Control group, B: Pioglitazone 10 μ M group, C: Pioglitazone 20 μ M group, D: Apatinib 2 μ M group表4 Bax、磷酸化-P53、mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2和磷酸化-VEGFR-2蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)Table 4 Protein expression levels of Bax, phosphorylated-P53, mTOR, Akt, VEGFR-2, Bcl-2 and phosphorylated-VEGFR-2($\bar{x} \pm s$)

Groups	Bax	Phosphorylated-P53	mTOR	Akt	VEGFR-2	Bcl-2	Phosphorylated-VEGFR-2
Control group	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
Pioglitazone 10 μ M group	1.23 $\pm$ 0.04*	3.51 $\pm$ 0.14*	0.22 $\pm$ 0.03*	0.31 $\pm$ 0.04*	0.27 $\pm$ 0.03*	0.88 $\pm$ 0.10*	0.25 $\pm$ 0.03*
Pioglitazone 20 μ M group	1.85 $\pm$ 0.08* ^{&}	2.87 $\pm$ 0.12* ^{&}	0.58 $\pm$ 0.05* ^{&}	0.63 $\pm$ 0.05* ^{&}	0.61 $\pm$ 0.05* ^{&}	0.67 $\pm$ 0.08* ^{&}	0.53 $\pm$ 0.05* ^{&}
Apatinib 2 μ M group	3.20 $\pm$ 0.11* ^{&@}	1.94 $\pm$ 0.10* ^{&@}	0.79 $\pm$ 0.08* ^{&@}	0.86 $\pm$ 0.08* ^{&@}	0.82 $\pm$ 0.07* ^{&@}	0.50 $\pm$ 0.06* ^{&@}	0.77 $\pm$ 0.06* ^{&@}
F value	93.674	77.526	10.362	8.946	60.824	56.208	63.051
P value	0.000	0.000	0.005	0.013	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 10 μ M group, [&] $P < 0.05$; Compared with the pioglitazone 20 μ M group, [@] $P < 0.05$.

表 5 各组心肌细胞 VEGFR-2、Bcl-2 及 Bax 阳性指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of VEGFR-2, Bcl-2 and Bax positive indexes of cardiomyocytes in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	VEGFR-2 positive indexes(%)	Bcl-2 positive indexes(%)	Bax positive indexes(%)
Control group	25.91± 2.04	41.05± 2.34	16.49± 1.52
Pioglitazone 10 μ M group	21.63± 1.75*	35.17± 2.15*	20.38± 1.75*
Pioglitazone 20 μ M group	17.25± 1.43*	28.95± 2.04*	24.94± 1.83*
Apatinib 2 μ M group	15.09± 1.24*	21.39± 1.73*	27.05± 1.95*
F value	18.617	36.947	21.046
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$.

比, 吡格列酮可以使 2 型糖尿病心肌梗死 / 中风 / 死亡的风险降低 16%^[13]。表明吡格列酮可改善糖尿病患者和非糖尿病胰岛素抵抗患者的血管功能, 吡格列酮治疗可能对心血管预后有利。此外, 吡格列酮治疗 2 型糖尿病血糖控制不佳患者可能有助于降低血糖水平, 减少每日胰岛素剂量, 但并不增加心肌梗死的风险、心力衰竭、心脏死亡和全因死亡^[14]。以上研究表明吡格列酮对心力衰竭患者的治疗更有利。

心肌细胞凋亡是心肌梗死早期、心肌再灌注损伤、心肌缺血缺氧时心肌细胞死亡的主要表现形式, 最终可导致多种缺血缺氧性心脏病^[15]。心肌细胞肥大通常是对血流动力学压力或心肌损伤的适应性反应, 使心脏满足增加的氧气需求, 最终会导致心脏疾病的进展, 是心脏对心肌损伤、超负荷等引起的心室重塑的重要表现, 是诱发心衰、心率失常、心肌梗死等心血管疾病的独立危险因素, 导致间质纤维化增加和心室功能下降^[16]。吡格列酮对心血管系统的影响已有报道, 研究显示吡格列酮可减轻野百合碱诱导的大鼠右心室肥厚和纤维化, 减少心肌细胞大小^[17]。2.5 mg/kg 吡格列酮可改善 Ang II 诱导的高血压大鼠模型收缩期和舒张期心功能障碍^[18]。然而, 也有研究显示, 40 mg/kg 吡格列酮可以诱导心肌肥大, 并增加血浆容量, 但不影响心脏代谢和全身胰岛素敏感性^[19]。这些相互矛盾的发现可能是由于吡格列酮给药剂量的差异造成的, 因为超治疗剂量的吡格列酮治疗被证明会引起心脏毒性^[20]。基于化学蛋白质组学的吡格列酮靶结合谱分析表明, 线粒体功能紊乱、心脏离子通道和心脏交感信号中断是吡格列酮疗效和心脏毒性的潜在来源^[21]。

在本研究证实, 吡格列酮降低了 Ang II 诱导的心肌细胞活力和心肌细胞肥大, 提高了 Bax 和磷酸化 P53 的表达, 降低了磷酸化 VEGFR-2、Akt 和 mTOR 的表达。提示吡格列酮通过影响 VEGFR-2 信号通路诱导心肌细胞凋亡, 抑制心肌细胞肥大。因此, 推测吡格列酮治疗对心衰患者是不利的。大鼠心脏凋亡细胞数量增加, 提示凋亡可能是该模型中伴随稳定代偿向心力衰竭过渡的心肌细胞数量减少的一种机制。此外, 心肌细胞凋亡是代偿性心肌肥厚向心力衰竭过渡过程中更为关键的决定因素。吡格列酮与 VEGFR-2 具有较强的结合作用, 提示吡格列酮的心血管作用可能与调控血管生成、新生内膜的形成以及 VEGFR-2 参与途径相关的动脉粥样硬化有关^[22]。VEGFR-2 是一种酪氨酸激酶受体, 在配体结合时二聚并被反式磷酸化激活^[23]。VEGFR-2 的激活可以刺激下游信号通路, 包括 c-Raf/MEK/

ERK 和 PI3K/Akt 通路的激活, 导致细胞增殖、迁移和存活的增加^[24]。VEGFR-2 是心肌细胞肥大生长的关键因子^[25]。吡格列酮直接靶向 VEGFR-2, 抑制磷酸化 VEGFR-2 的表达, 提示吡格列酮通过抑制诱导新生大鼠心肌细胞凋亡, 抑制心肌细胞肥大。下游 PI3K/Akt 信号通路也分别通过抑制 p53 依赖通路和激活 mTOR 依赖通路参与这些细胞的存活和肥大^[26-28]。本研究中, 吡格列酮和 VEGFR-2 抑制剂阿帕替尼提高心肌细胞中 Bax 和磷酸化 -P53 的表达, 降低肥厚心肌细胞中 mTOR、Akt、VEGFR-2、Bcl-2 和磷酸化 -VEGFR-2 的表达, 提示吡格列酮可能通过作用于 VEGFR-2 信号通路来发挥作用。与对照组比较, 免疫组化检测显示其他各组心肌细胞 VEGFR-2、Bcl-2 阳性指数显著降低, Bax 阳性指数显著升高。Bcl-2 是一种新型癌基因, 对细胞凋亡具有抑制作用^[29]。而 Bax 与 Bcl-2 具有较高的同源性, 其蛋白表达水平的高低与凋亡调控具有直接相关性。Bax 表达水平的增加可拮抗 Bcl-2 的作用, 从而促进凋亡^[30]。提示吡格列酮通过降低 VEGFR-2 信号通路相关蛋白和 mRNA 表达来诱导大鼠心肌细胞凋亡, 抑制心肌细胞肥大。

综上所述, 吡格列酮通过作用于 VEGFR-2 信号通路, 诱导心肌细胞凋亡, 抑制心肌细胞肥大, 有助于进一步理解吡格列酮应用的心血管风险及其机制。

参考文献(References)

- [1] 李兆, 程功, 纳 - 葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂对心室重构的影响[J]. 中国全科医学, 2021, 24(3): 267-271
- [2] Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR, et al. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations [J]. Circulation, 2016, 133(24): 2459-2502
- [3] 孙兰, 张帆, 石明隽, 等. 吡格列酮对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞 - 间充质细胞转分化的影响及机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1949-1954
- [4] Wei WY, Ma ZG, Xu SC, et al. Pioglitazone Protected against Cardiac Hypertrophy via Inhibiting AKT/GSK3 β and MAPK Signaling Pathways[J]. PPAR Res, 2016, 2016: 9174190
- [5] 卢宇, 马德琳, 余学锋. 罗格列酮和吡格列酮的心血管安全性[J]. 药物不良反应杂志, 2015, 17(2): 138-141
- [6] de Jong M, van der Worp HB, van der Graaf Y, et al. Pioglitazone and the secondary prevention of cardiovascular disease. A meta-analysis of randomized-controlled trials [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1):

134

- [7] Kivela R, Hemanthakumar KA, Vaparanta K, et al. Endothelial Cells Regulate Physiological Cardiomyocyte Growth via VEGFR2-Mediated Paracrine Signaling[J]. *Circulation*, 2019, 139(22): 2570-2584
- [8] Wang H, Zhang S, Wang N, et al. Genetic variants of VEGFR-1 gene promoter in acute myocardial infarction[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 56
- [9] 谢林润,李骊华.血管内皮生长因子在心血管疾病中的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2019, 46(4): 219-222
- [10] Schwabl P, Payer BA, Grahovac J, et al. Pioglitazone decreases portosystemic shunting by modulating inflammation and angiogenesis in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertensive rats [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1135-1142
- [11] 刘忠强,屈玲玲,邹琴,等.吡格列酮调控 β -连环蛋白表达延缓糖尿病大鼠肾脏纤维化的组织和细胞实验研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(7): 529-536
- [12] 徐晓东,徐浩,王姗姗,等.吡格列酮联合利拉鲁肽对老年 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者血浆脂联素、转化生长因子- β 1 水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(1): 43-46
- [13] Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2005, 366(9493): 1279-1289
- [14] Tan A, Cao Y, Xia N, et al. The addition of pioglitazone in type 2 diabetics poorly controlled on insulin therapy: a meta-analysis[J]. *Eur J Intern Med*, 2010, 21(5): 398-403
- [15] 贺滢.CaMK II 对 20-HETE 诱导的心肌细胞凋亡和肥大的作用及机制研究[D].贵州:遵义医学院, 2018: 1-72
- [16] Vázquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509-525
- [17] Behringer A, Trappiel M, Berghausen EM, et al. Pioglitazone alleviates cardiac and vascular remodelling and improves survival in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2016, 389(4): 369-379
- [18] Sakamoto A, Hongo M, Furuta K, et al. Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin I-I-induced hypertension[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(2): 409-415
- [19] Chang CS, Tsai PJ, Sung JM, et al. Diuretics prevent thiazolidine-dione-induced cardiac hypertrophy without compromising insulin-sensitizing effects in mice[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(2): 442-453
- [20] Elshama SS, El-Kenawy Ael-M, Osman HE. Toxicological evaluation of subchronic use of pioglitazone in mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(7): 712-719
- [21] 车瑞芹,崔秀洁,马常满.吡格列酮通过 PI3K/AKT 通路改善多柔比星诱导的心脏毒性 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2021, 42(3): 402-406
- [22] 何晓乐.吡格列酮对老年 2 型糖尿病伴高血压患者血糖、血压及血管内皮功能的影响[D].中国人民解放军空军军医大学;第四军医大学, 2016: 1-43
- [23] 万邦贝,刘波,王兆兴,等.Meis1 与 VEGFR-2 在早期肾癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2020, 45(9): 1061-1067
- [24] Sarabipour S, Ballmer-Hofer K, Hristova K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding[J]. *Elife*, 2016, 5: e13876
- [25] Zheng L, Han P, Liu J, et al. Role of copper in regression of cardiac hypertrophy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 66-84
- [26] 王秀珍,邹伟,李冀,等.基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路探讨稳心丹对 MIRI 大鼠心肌保护作用的机制研究[J]. *中医药学报*, 2020, 48(10): 6-11
- [27] 郑建滨,黄娟珍,吴加富,等.星状神经节阻滞对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 9-13
- [28] 高伟年,赵曙光,郭娜,等.HERC2 通过激活 PI3K-AKT 信号促进心肌细胞肥大[J]. *河北医科大学学报*, 2020, 41(6): 632-636
- [29] 徐彬,杨秀书,刘旋,等.尿液环境中肠上皮细胞及其凋亡因子半胱氨酸蛋白酶 3、Bax 和 Bcl-2 表达的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(20): 3173-3177
- [30] 刘中,产进中,黄俊,等.缺血预处理诱导的外泌体对心肌细胞低氧/复氧损伤及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(2): 197-202

(上接第 3817 页)

- [25] Ru Y, Chen XJ, Zhao ZW, et al. CyclinD1 and p57kip2 as biomarkers in differentiation, metastasis and prognosis of gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73860-73870
- [26] Xu X, Tian J, Li QY. Downregulation of HOTTIP regulates insulin secretion and cell cycle in islet β cells via inhibiting MEK/ERK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(15): 4962-4968
- [27] Song M, Lee J, Kim YJ, et al. Jeju Magma-Seawater Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis via CaMKK β -AMPK Signaling Pathways in B16F10 Melanoma Cells [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(9): 473
- [28] Wen W, Lowe G, Roberts CM, et al. Pterostilbene Suppresses Ovarian Cancer Growth via Induction of Apoptosis and Blockade of Cell Cycle Progression Involving Inhibition of the STAT3 Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1983