

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.10.003
文章编号: 1005-8982 (2022) 10-0013-05

糖尿病专题·论著

达格列净对糖尿病大鼠血管内皮功能及PTEN/PI3K/Akt信号通路的影响*

史丽¹, 胡婷婷², 李红³, 张三明², 刘智慧², 左惠玲⁴, 胡利梅¹, 任卫东¹

(1.河北北方学院附属第一医院 内分泌科, 河北 张家口 075000; 2.河北北方学院附属第一医院 国际医疗部, 河北 张家口 075000; 3.张家口市卫生健康项目管理中心, 河北 张家口 075000; 4.河北北方学院附属第一医院 核医学科, 河北 张家口 075000)

摘要: **目的** 探究达格列净对糖尿病大鼠血管内皮功能及PTEN/PI3K/Akt信号通路的影响。**方法** 将30只SPF级SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、达格列净组, 各10只。模型组、达格列净组成功复制糖尿病模型后, 达格列净组给予1 mg/(kg·d)达格列净灌胃处理, 连续4周; 模型组、对照组分别同时灌胃等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。采用酶联免疫吸附试验检测血清内皮素1(ET-1)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)水平; 苏木精-伊红染色观察大鼠主动脉血管组织病理学变化; Western blotting检测大鼠血管内皮组织PTEN/PI3K/Akt信号通路蛋白的表达。**结果** 达格列净组大鼠一般情况好于模型组。达格列净组大鼠主动脉病理变化较模型组改善。与对照组比较, 模型组、达格列净组大鼠血清ET-1、HIF-1 α 、VEGF水平升高($P < 0.05$), 但达格列净组大鼠血清ET-1、HIF-1 α 、VEGF水平低于模型组($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组、达格列净组大鼠血管内皮组织PTEN蛋白相对表达量降低($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 但达格列净组较模型组大鼠血管内皮组织PTEN蛋白相对表达量升高($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。**结论** 达格列净可能通过促进PTEN/PI3K/Akt信号通路活化, 改善糖尿病大鼠血管内皮功能损伤, 从而防治糖尿病及其并发症的发生。

关键词: 糖尿病; 达格列净; 血管内皮功能; PTEN/PI3K/Akt信号通路; 大鼠

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Effects of dapagliflozin on vascular endothelial function and PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in diabetic rats*

Li Shi¹, Ting-ting Hu², Hong Li³, San-ming Zhang², Zhi-hui Liu², Hui-ling Zuo⁴, Li-mei Hu¹, Wei-dong Ren¹
(1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Shijiazhuang, Hebei 075000, China; 2. International Medical Services, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Shijiazhuang, Hebei 075000, China; 3. Zhangjiakou Municipal Health Commission, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 4. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Shijiazhuang, Hebei 075061, China)

Abstract: Objective To explore the effects of dapagliflozin on vascular endothelial function and PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in diabetic rats. **Methods** A total of 30 SPF male SD rats were randomly divided into control group, model group and dapagliflozin group, each group with 10 rats. The diabetic models were successfully established in the model group and the dapagliflozin group, and the rats in dapagliflozin group were given 1 mg/(kg·d)

收稿日期: 2021-10-18

* 基金项目: 2021年度河北省“三三三人才工程”资助项目(No: A202103006); 张家口市科技攻关计划项目(No: 2021040D)
[通信作者] 任卫东, Tel: 15530396532

of dapagliflozin by gavage for 4 weeks. The rats in the model group and the control group were given an equal volume of sodium citrate buffer solution by gavage at the same time. Serum levels of endothelin-1 (ET-1), hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hematoxylin and eosin staining was used to observe the histopathological changes of rat aortas. The expressions of proteins associated with the PTEN/PI3K/Akt pathway in rat aortas were detected by Western blotting. **Results** The overall conditions of the rats in the dapagliflozin group were greater than those in the model group, and the pathologies of rat aortas were ameliorated in the dapagliflozin group compared with the model group. The serum levels of ET-1, HIF-1 α and VEGF in the model group and the dapagliflozin group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), while they were lower in the dapagliflozin group relative to those in the model group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative protein expression of PTEN was lower, but the relative protein expressions of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were higher in the model group and the dapagliflozin group ($P < 0.05$). Besides, the relative protein expression of PTEN in the dapagliflozin group was higher than that in the model group, while the relative protein expressions of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in the dapagliflozin group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Dapagliflozin may enhance the activation of PTEN/PI3K/Akt pathway and mitigate the vascular endothelial dysfunction in diabetic rats, thus preventing the occurrence of diabetes and its complications.

Keywords: diabetes mellitus; dapagliflozin; vascular endothelial function; PTEN/PI3K/Akt signaling pathway; rat

糖尿病是一种常见的代谢紊乱性疾病,发病率呈逐年上升趋势,糖尿病大血管病变是其常见的严重并发症之一,也是患者死亡的主要原因,目前尚无有效措施预防及控制糖尿病大血管病变^[1]。有研究显示,微血管病变导致血管内皮功能障碍是糖尿病大血管病变发生、发展的病理基础^[2]。因此探寻有效防治糖尿病血管内皮损伤的药物对于防治糖尿病大血管病变有重要临床意义。达格列净是一种新型降糖药物,属于钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂,能够降低血糖、血脂,延缓糖尿病进展^[3]。陈皎等^[4]研究显示,达格列净能够改善糖尿病合并心力衰竭患者的心功能和血管内皮功能,从而降低再入院率。武卫党等^[5]研究显示,达格列净能够改善糖尿病心肌缺血大鼠心肌及血管功能。然而达格列净对糖尿病患者血管内皮功能的作用机制尚未明确。既往研究显示,上调人张力蛋白同源物基因(phosphate and tension homology deleted on chromosomes, PTEN)表达,可抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路活化,减轻 2 型糖尿病大鼠血管病变,抑制主动脉血管内皮损伤^[6]。目前有关达格列净对糖尿病血管内皮功能的影响是否与调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路有关,少见报道。因此,本研究探究达格列净对糖尿病大鼠血管内皮功能的影响,并分析其可能机制,

以期有效防治糖尿病大血管病变提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,6 周龄,体重 180 ~ 210 g,平均(195 ± 15)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2021-0029。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 达格列净片(国药准字 J20170040,瑞典 Astra Zeneca AB 公司),蛋白提取试剂盒、链脲佐菌霉素(Streptozotocin, STZ)(上海吉至生化科技有限公司),高脂饲料(江苏省协同医药生物工程有限公司),苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司),内皮素 1(Endothelin-1, ET-1)、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(江西艾博因生物科技有限公司),兔抗鼠人张力蛋白同源物基因(phosphate and tension homology deleted on chromosomes, PTEN)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、p-PI3K、

Akt、p-Akt、 β -actin 抗体、山羊抗兔 HRP 二抗(上海经科化学科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 Optima™ XPN 超速离心机(美国贝克曼库尔特生物科技有限公司), BD-SW50 光学显微镜(深圳市博视达光学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的复制及分组 30 只大鼠随机分为对照组、模型组、达格列净组,各 10 只。模型组、达格列净组给予高脂高糖饲料喂养,对照组给予普通饲料喂养。12 周后大鼠禁食不禁水 12 h,模型组和达格列净组一次性尾静脉注射 30 mg/kg STZ 溶液(以 pH 4.5 的 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液现用现配);对照组一次性尾静脉注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。72 h 后经尾静脉测大鼠空腹血糖,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为 2 型糖尿病模型复制成功^[7]。

1.3.2 给药方式 达格列净组大鼠模型复制成功后予以 1 mg/(kg·d)^[8]达格列净灌胃,连续 4 周。模型组、对照组大鼠分别于同时间灌胃等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。

1.3.3 标本采集 3 组大鼠均在末次给药结束后,用 4% 多聚甲醛麻醉。于腹主动脉取血 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,取上清液置入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

取血结束后立即处死大鼠,打开胸腔剥离胸主动脉及腹主动脉血管,取血管外膜组织,分为两部分。一部分乙醇脱水、透明、石蜡包埋过夜,连续切片(6 μ m 厚),用于 HE 染色;另一部分保存于液氮中,用于 Western blotting 检测。

1.3.4 ELISA 检测血清 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平 取各组大鼠腹主动脉取血的血清,严格按照试剂盒说明书进行操作,采用 ELISA 检测血清 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平^[9]。

1.3.5 HE 染色观察大鼠主动脉血管组织病理变化 取各组大鼠主动脉血管组织切片,脱蜡,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,按照 HE 染色试剂盒说明书进行染色,中性树胶封片。采用光学显微镜观察并采集图片,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件观察主动脉血管组织病理变化。

1.3.6 Western blotting 检测大鼠血管内皮组织 PTEN/PI3K/Akt 信号通路蛋白的表达 分别取 3 组剩余主动脉血管组织标本制备组织匀浆,提取总

蛋白并检测浓度及纯度,电泳、转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入一抗(PTEN、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt)及内参 β -actin,按 1:500 稀释,次日加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育 2 h,显色、显影定影,以各蛋白条带灰度值的比值计算蛋白相对表达量^[10]。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 SNK-*q* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

对照组小鼠每日饮水,尿量均正常,皮毛光滑、柔顺有光泽,精神状态良好,活动量大,反应敏捷;模型组小鼠精神萎靡,皮毛暗黄无光泽,活动量减少,出现典型的多饮、多食、多尿及体形消瘦现象;与模型组比较,达格列净组大鼠上述一般情况有所改善。

2.2 各组大鼠主动脉血管组织病理变化

对照组大鼠血管内皮完整,中层可见梭形平滑肌细胞,弹力纤维清晰、完整,呈环形排列;模型组大鼠主动脉内膜增厚,血管内皮中层平滑肌细胞增生,弹力纤维排列紊乱;与模型组比较,达格列净组大鼠主动脉上述病理变化有所改善。见图 1。

2.3 各组大鼠 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平比较

3 组大鼠血清 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组比较,模型组、达格列净组大鼠血清 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平升高($P<0.05$),但达格列净组大鼠血清 ET-1、HIF-1 α 、VEGF 水平低于模型组($P<0.05$)。见表 1。

2.4 各组大鼠血管内皮组织 PTEN/PI3K/Akt 信号通路蛋白相对表达量比较

3 组大鼠血管内皮组织 PTEN、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组比较,模型组、达格列净组大鼠血管内

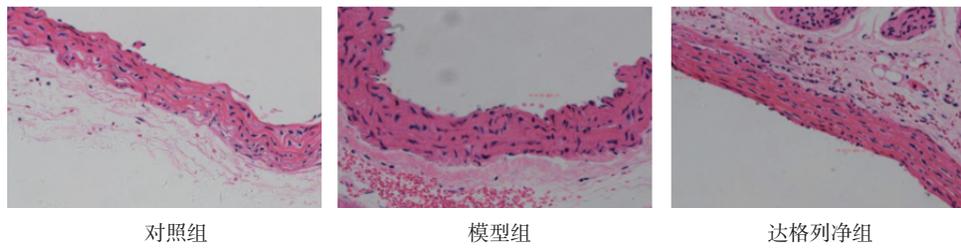


图 1 各组大鼠主动脉血管组织病理学变化 (HE × 200)

表 1 各组大鼠 ET-1、HIF-1α、VEGF 水平比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | ET-1 (ng/L) | HIF-1α (u/mL) | VEGF (u/mL) |
|-------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 对照组 | 153.28 ± 22.99 | 23.85 ± 3.58 | 651.62 ± 97.80 |
| 模型组 | 269.60 ± 40.55 ^① | 39.06 ± 5.89 ^① | 1083.15 ± 163.52 ^① |
| 达格列净组 | 198.28 ± 22.99 ^{①②} | 31.62 ± 4.75 ^{①②} | 796.78 ± 120.36 ^{①②} |
| F 值 | 751.945 | 659.973 | 659.294 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

表 2 各组大鼠 PTEN/PI3K/Akt 信号通路蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | PTEN | p-PI3K/PI3K | p-Akt/Akt |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 1.06 ± 0.19 | 0.38 ± 0.04 | 0.33 ± 0.05 |
| 模型组 | 0.23 ± 0.08 ^① | 0.96 ± 0.15 ^① | 1.09 ± 0.16 ^① |
| 达格列净组 | 0.43 ± 0.14 ^{①②} | 0.83 ± 0.12 ^{①②} | 0.78 ± 0.12 ^{①②} |
| F 值 | 281.594 | 586.481 | 583.129 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

皮组织 PTEN 蛋白相对表达量降低 (P < 0.05), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量升高 (P < 0.05); 但达格列净组较模型组大鼠血管内皮组织 PTEN 蛋白相对表达量升高 (P < 0.05), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量降低 (P < 0.05)。见表 2。

究证实, 血管内皮功能损伤是其主要病理基础之一^[11]。达格列净是新型口服降糖药, 广泛应用于 2 型糖尿病的治疗, 对糖尿病血管病变有一定治疗作用。孙娟等^[12]研究显示, 达格列净能够改善胰岛功能并缓解糖尿病患者血管病变。史晓荻等^[13]研究显示, 达格列净对糖尿病患者血管内皮功能有一定改善作用, 对防止并发症有积极作用。

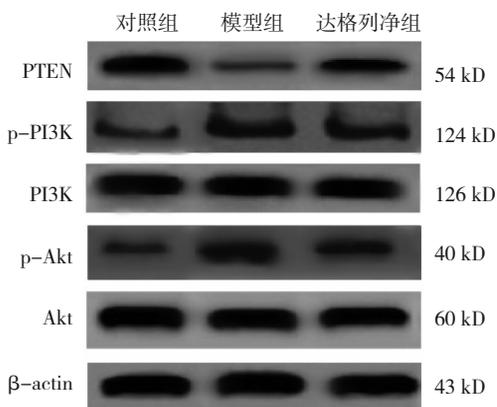


图 2 各组大鼠血管内皮组织 PTEN/PI3K/Akt 信号通路蛋白的表达

ET-1、HIF-1α、VEGF 是由血管内皮细胞分泌的活性物质。有研究显示, 在持续高血糖状态下, 微血管内皮细胞受损, 发生血管内皮功能障碍, 促使 ET-1、HIF-1α、VEGF 分泌增加, 3 者可一定程度反映血管内皮功能损伤程度^[14]。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠主动脉内膜增厚, 血管内皮中层平滑肌细胞增生, 弹力纤维排列紊乱, 而经达格列净处理后, 大鼠主动脉上述病理变化有所改善; 且与对照组比较, 模型组、达格列净组大鼠血清 ET-1、HIF-1α、VEGF 水平升高, 但经达格列净药物处理后, 大鼠血清 ET-1、HIF-1α、VEGF 水平降低, 说明达格列净可对糖尿病大鼠血管内皮功能发挥保护作用。

3 讨论

糖尿病大血管病变是糖尿病长期慢性并发症, 已成为糖尿病患者死亡的主要原因之一, 严重影响患者生活质量及生命健康, 目前仍缺乏理想的防治手段。糖尿病大血管病变发病机制复杂, 研

究证实, 血管内皮功能损伤是其主要病理基础之一^[11]。达格列净是新型口服降糖药, 广泛应用于 2 型糖尿病的治疗, 对糖尿病血管病变有一定治疗作用。孙娟等^[12]研究显示, 达格列净能够改善胰岛功能并缓解糖尿病患者血管病变。史晓荻等^[13]研究显示, 达格列净对糖尿病患者血管内皮功能有一定改善作用, 对防止并发症有积极作用。

PI3K/Akt 信号通路是调节细胞生长、代谢的重要信号通路。有研究显示, 持续高血糖能够刺激 PI3K/Akt 信号通路活化, 使 PIP2 转化为第二信使 PIP3, 从而促进 Akt 磷酸化和下游效应基因 HIF-1α 表达, 引起 VEGF 的表达, 而血管内皮细胞异常增

殖、迁移, 促进糖尿病血管病变的发生^[15]。PTEN 是一种具有双重脂质磷酸酶活性的抑癌基因, 有研究显示其能负向调控 PI3K/Akt 信号通路^[16]。韩利平等^[17]研究显示, 上调 PTEN 表达可抑制 PI3K/Akt 信号通路活化, 改善糖尿病大鼠血管病变损伤程度。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组、达格列净组大鼠血管内皮组织 PTEN 蛋白相对表达量降低, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量升高; 但达格列净组大鼠血管内皮组织 PTEN 蛋白相对表达量升高, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量降低, 与既往研究结果相似, 说明达格列净可能通过上调 PTEN 表达, 抑制 PI3K/Akt 信号通路活化, 从而改善糖尿病大鼠血管内皮功能损伤, 为防治糖尿病大血管病变提供一定理论依据。

综上所述, 达格列净对糖尿病大鼠血管内皮功能损伤发挥保护作用, 可能是通过促进 PTEN/PI3K/Akt 信号通路活化来实现的。然而本研究并未明确达格列净对 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的具体调控作用, 后期将进行深入阐述。

参 考 文 献 :

- [1] FLEEMAN L, GOSTELOW R. Updates in feline diabetes mellitus and hypersomatotropism[J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2020, 50(5): 1085-1105.
- [2] HORTON W B, BARRETT E J. Microvascular dysfunction in diabetes mellitus and cardiometabolic disease[J]. Endocr Rev, 2021, 42(1): 29-55.
- [3] 梁宇, 焦秀敏, 张星光, 等. 达格列净对超重 2 型糖尿病患者脂联素水平和体脂分布及骨矿含量的影响研究[J]. 中国全科医学, 2021, 24(21): 2655-2660.
- [4] 陈姣, 周杰, 汤冰倩, 等. 达格列净治疗糖尿病合并心衰的疗效及其血管内皮功能和炎症因子的影响[J]. 心血管康复医学杂志, 2020, 29(5): 599-603.
- [5] 武卫党, 石磊, 张丹凤, 等. 达格列净对糖尿病心肌缺血大鼠心肌功能改善作用的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(7): 778-780.
- [6] 韩利平. 黄地安消胶囊调控 PI3K/Akt 信号通路改善 2 型糖尿病血管病变作用及机制研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学.
- [7] RIEDEL U, SCHÜBLER E, HÄRTEL D, et al. Wundbehandlung bei Diabetes und diabetischem Fußulkus[J]. Hautarzt, 2020, 71(11): 835-842.
- [8] 陈玲, 吴小燕, 高苹. 达格列净和坎地沙坦联用对糖尿病大鼠肾脏调节尿浓缩功能的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 59(77): 45-50.
- [9] RUSSIGNAN A, DAL COLLO G, BAGNATO A, et al. Targeting the endothelin-1 receptors curtails tumor growth and angiogenesis in multiple myeloma[J]. Front Oncol, 2021, 8(28): 1-7.
- [10] ZHANG C Y, LIN T J, NIE G H, et al. Cadmium and molybdenum co-induce pyroptosis via ROS/PTEN/PI3K/AKT axis in duck renal tubular epithelial cells[J]. Environ Pollut, 2021, 272(95): 116403-116409.
- [11] KORNUM D S, KLINGE M W, FASSOV J, et al. Symptoms of diabetic gastroenteropathy in patients with diabetes[J]. Ugeskr Laeger, 2020, 182(49): 1-8.
- [12] 孙娟, 褚璇, 赵猛, 等. 达格列净对肥胖 2 型糖尿病对代谢指标及血管病变的影响[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(88): 18-20.
- [13] 史晓荻, 魏志杰. SGLT-2 抑制剂联合常规降糖治疗对 2 型糖尿病患者血管内皮功能的影响[J]. 安徽医学, 2019, 41(1): 33-38.
- [14] JIANG W, SUN Y J, WANG H, et al. HIF-1 α Enhances vascular endothelial cell permeability through degradation and translocation of vascular endothelial cadherin and claudin-5 in rats with burn injury[J]. J Burn Care Res, 2021, 42(2): 258-268.
- [15] XU Z X, JIA K Q, WANG H, et al. METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway via PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1): 32-38.
- [16] BRAGLIA L, ZAVATTI M, VINCETI M, et al. Deregulated PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling in prostate cancer: still a potential druggable target[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020 1867(9): 118731-118739.
- [17] 韩利平, 郭明飞, 高家荣, 等. 黄地安消胶囊调控磷脂酰基醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路减轻 GK 大鼠血管病变损伤程度的研究[J]. 安徽医药, 2018, 22(6): 16-21.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 史丽, 胡婷婷, 李红, 等. 达格列净对糖尿病大鼠血管内皮功能及 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(10): 13-17.

Cite this article as: SHI L, HU T T, LI H, et al. Effects of dapagliflozin on vascular endothelial function and PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in diabetic rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(10): 13-17.