罗格列酮对高糖环境下人脐静脉内皮细胞作用的研究

杨明璨[1],熊鸿燕[2],林 辉[3] (1. 第三军医大学基础部人体解剖学教研室,重庆 400038;2. 第三军医大学军事预防医学院流行病学教研室,重庆 400038;3. 第三军医大学军事预防医学院热带研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究罗格列酮对高糖环境下人脐静脉内皮细胞促血管生成功能的影响及其机制。**方法** 通过 MTT 检测法、细胞划痕实验,探讨罗格列酮在高糖环境下对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖与迁移能力的影响,并用 ELISA 方法检测经罗格列酮作用后高糖培养上清中 VEGF、SDF-1 的含量,进行统计分析。**结果** 经罗格列酮药物处理后的 HUVEC 增殖和迁移能力明显高于高糖组,且培养基中 VEGF 和 SDF-1 的含量也有显著升高。AKT 阻断剂可以阻断罗格列酮对 HUVEC 增殖、迁移和分泌功能的促进作用。**结论** 罗格列酮在高糖环境下可显著促进 HUVEC 的增殖、迁移和分泌功能,AKT 信号通路在这一过程中发挥着重要的作用。

[关键词] 罗格列酮;人脐静脉内皮细胞;高糖环境;活化
[中图分类号] R459.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)03-0253-04

Effects of rosiglitazone on activation of human umbilical vein endothelial cells in high glucose environment

YANG Ming-can[1], XIONG Hong-yan[2], LIN Hui[3] (1. Depanment of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Depanment of Epidemiolog, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Research Institute for Tropical Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of rosiglitazone on proangiogenesis function of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in high glucose environment. **Methods** HUVECs were cultured in high glucose environment and stimulated by rosiglitazone. MTT, cell scratch test and Transwell assay were used to detect HUVEC proliferation and migration. The concentration of VEGF, SDF-1 was also detected in the supernatant. **Results** Rosiglitazone could effectively promote HUVEC proliferation and migration. The concentration of VEGF and SDF-1 in rosiglitazone stimulated supernatant was higher than that in high glucose group. The inhibition of AKT signal could block the promotion of rosiglitazone on the HUVEC proliferation, migration and secretion. **Conclusion** Rosiglitazone could significantly promote HUVEC secretion, proliferation and migration in high glucose environment. AKT signal played an important role in this process.

Keywords: rosiglitazone; HUVEC; high glucose environment; activation

糖尿病是一种严重威胁人类健康的代谢性疾病,糖尿病的心血管病变是其最常见的一种并发症,也是导致患者死亡的重要原因[1-3]。因此糖尿病患者对组织工程血管的需求十分大,然而高糖引起的血管内皮细胞受损使得组织工程血管在糖尿病患者手术移植后通畅率很低,因此维持内皮细胞在高糖状态下的正常功能对于保持组织工程血管的通畅具有十分重要的意义[4]。AKT 通路是血管生成过程中至关重要的一个信号通路,研究表明它的阻断可以抑制内皮细胞分泌 VEGF 和 SDF-1 等促血管生成因子[5]。罗格列酮(Rosiglitazone)是一种降血糖药物,研究表明其具有控制血糖和改善胰岛素抵抗的作用[6],此外也有文献报道罗格列酮可减轻心肌缺血、抑制炎症,减少氧化应激反应,并对糖尿病慢性并发症有一定的预防和治疗作用[7-8]。然而目前还没有文献报道罗格列酮对高糖环境下内皮细胞功能的影响。内皮细胞具有抑制血栓形成和内膜增生的重要作用,然而高血糖环境下血管内皮细胞受到直接损伤,致使其功能发生紊乱,因此维持内皮细胞的正常功能对于组织工程血管的替代治疗具有十分重要的意义。本实验使用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),通过观察罗格列酮对高糖环境下内皮细胞促血管生成功能的影响,探讨其对糖尿病条件下病变血管替代治疗的潜在意义。

1 材料与方法

1.1 实验主要试剂

罗格列酮(Sigma),RPMI-1640 基础培养基(Hyclone 公司,美国),胎牛血清(Hyclone 公司,美国),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、ELISA 试剂盒皆购于厦门慧嘉生物科技有限公司,Tr-

doi:10.11659/jjssx.01E015061
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31470046)
[收稿日期] 2015-01-28 [修回日期] 2015-02-25

answell 细胞培养小室(Corning 公司),4% 多聚甲醛(Boster 公司),0.5% 结晶紫(Sigma),AKT 抑制剂 triciribine(Sigma)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自 ATCC (美国)。使用 RPMI-1640 培养基,10% 胎牛血清作为基础培养基,含 5.6 mmol 和 30 mmol 葡萄糖做为 HUVEC 低糖和高糖培养基[8],37 ℃、5% CO_2 孵箱常规培养。采用加入低糖培养基常规培养方法为对照组、加入高糖培养基为高糖组、高糖组加入 10 μmol 罗格列酮[9]为罗格列酮组,AKT 信号通路抑制组为在加入罗格列酮的同时加入 5 μmol 的 triciribine。

1.2.2 细胞增殖实验 我们采用 MTT 实验检测 HUVEC 的增殖能力[10]。取对数生长期的 HUVEC,用胰酶消化后,按照 4 000个/孔的密度传代到 96 孔板中。细胞贴壁后,根据对 HUVEC 的分组给予因子刺激。24 h 后,每孔加入 20 μl 的 5 mg/mL MTT,37 ℃孵育 4 h,去上清后每孔加入 150 μl DMSO。使用 Emax 酶标仪(Molecular Devices),OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.2.3 细胞划痕实验 将 HUVEC 种植于 6 孔板中,待其长满,除对照组采用 0.1% FBS 的正常培养基外,其余 3 组均用 0.1% FBS的高糖培养基培养 24 h。取已消毒的 P1000 枪头,垂直进行细胞划痕[11],洗去除划下的细胞。按照实验分组给予因子刺激,之后放入 37 ℃,5% CO_2 孵箱继续培养 24 h。PBS 洗 3 次后,用 4% 多聚甲醛固定后 0.5% 结晶紫对其染色。OLYMPUS BX50 显微镜(Japan)拍摄划痕图像(40 ×),使用 IPP 软件(Media Cybernetics)测量 0 h 以及 24 h 的细胞创痕面积。

1.2.4 培养基中细胞因子检测 将 3 组 HUVEC 孵箱37 ℃,5% CO_2 常规培养 48 h 后,将各组培养基用 0.22 μm 针式滤器抽滤,采用 RD 公司生产的 ELISA 试剂盒,检测各组培养基中 VEGF、SDF-1 的含量,进行的各种操作严格按照说明书上进行。

1.3 统计学方法

每组实验至少重复 3 次。采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,描述性数据采用平均值和百分比分析表示,实验数据采用 t 检验或 χ^2 检验闭合率,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗格列酮对 HUVEC 增殖的影响

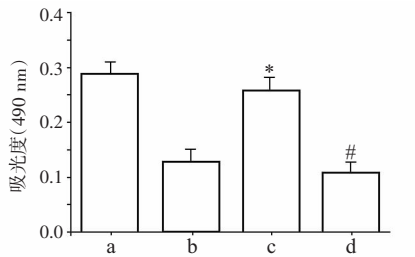
从图 1 可以看出相对于对照组,高糖可以显著抑制 HUVEC 的增殖,使细胞的增殖速率下降了 55%;罗格列酮可以降低高糖对 HUVEC 增殖的抑制作用,使细胞的增殖速率增加了 102%;而 AKT 抑制剂阻断了罗格列酮对 HUVEC 增殖的影响,使其增殖速率下降了 58%,各组之间差异明显,结果均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 罗格列酮对 HUVEC 迁移的影响

我们采用划痕实验研究罗格列酮对 HUVEC 迁移的影响。图 2 结果显示,相对于对照组,高糖组的 HUVEC 的划痕闭合面积下降了 52%。罗格列酮降低了高糖对 HUVEC 迁移功能的影响,使 HUVEC 的划痕闭合面积相对于高糖组增加了 64%。AKT 信号通路在这一过程中发挥着十分重要的作用,AKT 信号通路的阻断降低了罗格列酮对 HUVEC 迁移的促进作用,HUVEC 的划痕闭合面积是罗格列酮组的 21%。各组之间差异明显,结果均具有统计学意义($P<0.05$)。

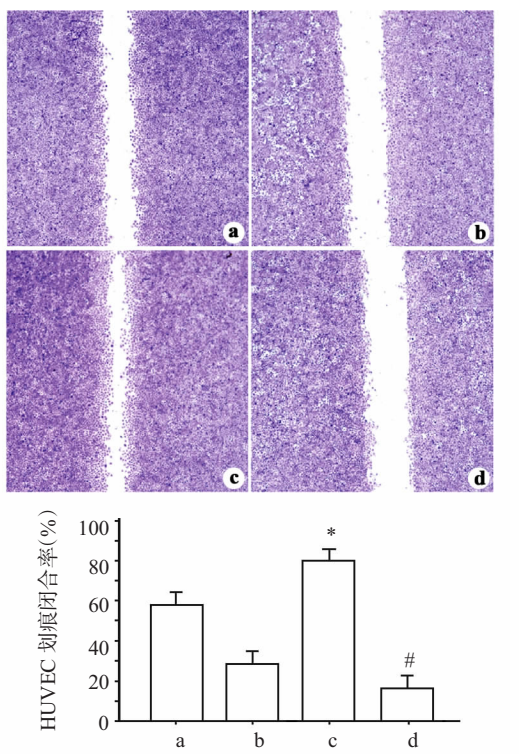
2.2 培养基中 VEGF、SDF-1 含量的测定结果

用 ELISA 试剂盒对各组培养基中 VEGF、SDF-1 进行检测,结果见图 3,从图中可以看出罗格列酮组培养基里 VEGF、SDF-1 的含量分别是高糖组的 3.2 倍和 3 倍。而 AKT 抑制组中 VEGF、SDF-1 的含量分别是罗格列酮组的 1/2 和 1/3。各组之间差异明显,结果均具有统计学意义($P<0.05$)。这提示在高糖环境中,罗格列酮药物可以促进 HUVEC 分泌细胞因子 VEGF、SDF-1 分泌。AKT 信号通路的阻断抑制了罗格列酮对 HUVEC 细胞因子的作用效果。



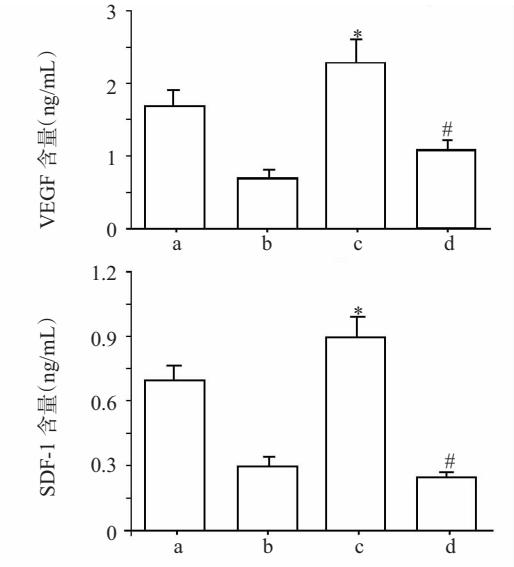
a:对照组;b:高糖组;c:罗格列酮组;d:AKT 抑制剂组;*:与高糖组相比,$P<0.05$;#:与罗格列酮组相比,$P<0.05$

图 1 罗格列酮对 HUVEC 增殖的影响



a:对照组;b:高糖组;c:罗格列酮组;d:AKT 抑制剂组;*:与高糖组相比,$P<0.05$;#:与罗格列酮组相比,$P<0.05$

图 2 罗格列酮对 HUVEC 迁移的影响划痕实验



a:对照组;b:高糖组;c:罗格列酮组;d:AKT 抑制剂组;*:与高糖组相比,$P<0.05$;#:与罗格列酮组相比,$P<0.05$

图 3 培养基中 VEGF、SDF-1 含量

3 讨论

目前全球糖尿病并发症的发病率逐年升高,而它在微血管病变和动脉硬化的基础上能产生多种慢性并发症,糖尿病的血管病变则是引起患者致残甚至致死的首要原因[12]。研究表明内皮细胞具有抑制血栓形成和内膜增生的重要作用,因此在组织工程血管移植后长期通畅的维持中发挥着关键性作用。然而高血糖环境下内皮细胞受到直接的损伤,使其功能发生紊乱,所以维持血管内皮细胞的正常功能对于组织工程血管的替代治疗具有十分重要的意义。在心血管系统的发生和重建过程中,PI3K-Akt 信号转导通路是至关重要的,研究[5]表明它的阻断可以抑制内皮细胞分泌 VEGF 和 SDF-1 等促血管生成因子,通过研究证实 AKT 信号通路发挥着重要作用。

罗格列酮作为降血糖药物,已经广泛应用于糖尿病的治疗缓解,国外文献[7-8]报道罗格列酮可以具有减轻心肌缺血、抑制炎症、减少氧化应激反应,并对糖尿病慢性并发症有一定的预防和治疗作用,然而在高糖环境下罗格列酮对血管内皮细胞的影响尚不明确。在实验中,我们使用降糖药物罗格列酮作用于高糖环境培养的 HUVEC,研究发现在罗格列酮组在药物作用的影响下,HUVEC 的增殖明显高于高糖组。在细胞划痕实验中,罗格列酮组的 HUVEC 划痕闭合率同样高于高糖组,并且效果十分明显。可见在高糖环境下,降糖药物罗格列酮能够促进 HUVEC 的增殖和迁移,而增殖、迁移以及旁分泌是血管内皮细胞发挥促血管生成功能的重要机制。国外已有研究[16]表明,VEGF(血管内皮生长因子)、SDF-1(基质细胞衍生因子-1)均能刺激血管的形成,其中 VEGF 是血管内皮细胞的特异性生长因子,是现阶段最有效的血管生成因子,能增加血管通透性,促进 HUVEC 分裂和增殖,和血管新生密切相关。SDF-1 可以促进 HUVEC 增殖,加速血管生成[17]。各组培养基采用 ELISA 检测的方法,显示出罗格列酮组 VEGF、SDF-1 含量明显高于高糖组。这再次证实了相关结论,并且提示我们高糖环境下罗格列酮不仅能够促进 HUVEC 的增殖和迁移,同时在旁分泌方面也起着促进 HUVEC 分泌相应的细胞分子的作用,对血管新生有着重要的影响。通过本研究我们发现降糖药物罗格列酮可以在高糖环境下保护血管内皮细胞免受高糖环境的损伤,维持内皮细胞的正常促血管生成功能。因此,我们认为罗格列酮可以作为组织工程血管移植后的一种治疗药物,在降低血糖的同时保护迁移到组织工程血管表面的内皮细胞正常功能。

综上所述,通过罗格列酮对高糖环境下血管内皮细胞的作用研究表明,此药物对高糖环境下的 HUVEC 有着活化作用,ATK 信号通路在这一过程中发挥着关键性作用,而这种活化作用的具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 代庆红,王忠东. 中国糖尿病的现状调查[J]. 中国医药指南,2011,9(13):206 - 208.

[2] 王鑫蕾,崔世维. 2 型糖尿病患者糖尿病防治知识认知程度与控制现状分析[J]. 交通医学,2012,26(6):587 - 589.

[3] 钱寒光,朱栋晓,祝建中,等. 骨髓间充质干细胞自体移植促进缺血肢体血管生成的实验研究[J]. 中国微循环,2007,11(5):303 - 305.

[4] Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, et al. Treatment for diabetic foot ulcers[J]. Lancet,2005,366(9498):1725 - 1735.

[5] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis[J]. Circ Res,2002,90(12):1243 - 1250.

[6] 钱红霞,李新胜,付冬霞,等. 罗格列酮对 2 型糖尿病患者血脂、血糖及炎症因子的作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(4):340 - 342.

[7] Gao XQ, Li HW, Ling X, et al. Effect of rosiglitazone on rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Asian Pac J Trop Med, 2013,6(3):228 - 231.

[8] Petrazzi L, Grassi D, Polidoro L, et al. Cardiovascular risk and cardio-metabolic protection: role of glitazones[J]. J Nephrol,2008,21(6): 826 - 835.

[9] Ji Y, Liu J, Wang Z, et al. PPARγ agonist rosiglitazone ameliorates LPS-induced inflammation in vascular smooth muscle cells via the TLR4/TRIF/IRF3/IP-10 signaling pathway[J]. Cytokine, 2011, 55(3):409 - 419.

腹腔镜左半肝切除治疗原发性肝癌 47 例临床疗效研究

钟 爱,陈 健,郑树国,范毓东,李建伟,郭 鹏 (第三军医大学西南医院肝胆研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 分析腹腔镜左半肝切除治疗原发性肝癌的安全性与可行性。**方法** 回顾性分析 2007 年至 2014 年第三军医大学西南医院肝胆外科行左半肝切除术治疗原发性肝癌患者 93 例的临床资料,其中腹腔镜左半肝切除术 47 例,开腹左半肝切除术 46 例。对比分析 2 种手术方式患者术中、围手术期及随访数据资料,评价腹腔镜左半肝切除术治疗原发性肝癌是否具有安全性与可行性。**结果** 腹腔镜与开腹的肿瘤直径分别为(56.57 ± 24.56) mm 与(64.11 ± 33.39) mm,$P = 0.218$,差异无统计学意义。腹腔镜和开腹手术时间分别为(217.53 ± 60.22) min 与(306.80 ± 119.91) min,$P < 0.05$,差异有统计学意义。腹腔镜和开腹术中失血量分别为(350.21 ± 197.98) mL 与(556.74 ± 471.41) mL,$P < 0.05$,差异有统计学意义。术中输血率腹腔镜和开腹分别为 12.8% 与 32.6%,$P < 0.05$,差异有统计学意义。术后 ICU 时间、术后胃肠道恢复功能时间、术后住院时间腹腔镜均短于开腹左半肝切除,$P < 0.05$,差异有统计学意义。术后并发症发生率腹腔镜与开腹分别为 14.9% 与 23.9%, $P = 0.271$ 差异无统计学意义。术后 1 年与 3 年生存率腹腔镜为 91.5%、83.0%,开腹为 84.8%、76.1%。术后 1 年与 3 年无瘤生存率腹腔镜为74.5%、59.6%,开腹为 65.2%、54.3%。**结论** 腹腔镜左半肝切除术治疗原发性肝癌是安全可行的,可作为左半肝切除治疗原发性肝癌的标准术式推广应用。

[关键词] 腹腔镜手术;开腹左半肝切除;原发性肝癌;临床对照试验
[中图分类号] R657.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)03-0256-04

Clinical curative effect of laparoscopic left hepatectomy for primary hepatic carcinoma in 47 cases

ZHONG Ai, CHEN Jian, ZHENG Shu-guo, FAN Yu-dong, LI Jian-wei, GUO Peng (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety and feasibility of laparoscopic left hepatectomy in patients with primary hepatic carcinoma. **Methods** Retrospective analysis was conducted in clinical data of left hepatectomy from 2007 to 2014, including 47 cases of laparoscopic hepatectomy and 46 cases of open hepatectomy. The intraoperative and postoperative data of the two surgical methods were compared to evaluate whether laparoscopic left hepatectomy is safe and feasible. **Results** The tumor size were bigger in the open hepatectomy [(56.57 ± 24.56) mm vs. (64.11 ± 33.39) mm, $P = 0.218$]. The laparoscopic left hepatectomy resulted in shorter operation time [(217.53 ± 60.22) min vs. (306.80 ± 119.91) min], and there was a significantly difference ($P < 0.05$). The intraoperative blood loss were lesser in the laparoscopic left hepatectomy [(350.21 ± 197.98) mL vs. (556.74 ± 471.41) mL], and there was a significantly difference ($P < 0.05$). The laparoscopic left hepatectomy had a smaller intraoperative blood transfusion rate (12.8% vs. 32.6%, $P < 0.05$). The length of ICU

doi:10.11659/jjssx.03E015053
[基金项目] 国家自然科学基金(81071975);第三军医大学西南医院临床创新基金(SWH2013LC04)
[通讯作者] 陈 健,E-mail: cjcrj@yahoo.com
[收稿日期] 2015-03-02 [修回日期] 2015-03-26

[10] Zeng W, Yuan W, Li L, et al. The promotion of endothelial progenitor cells recruitment by nerve growth factors in tissue-engineered blood vessels[J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1636 – 1645.
[11] Shen L, Zeng W, Wu YX, et al. Neurotrophin – 3 accelerates wound healing in diabetic mice by promoting a paracrine response in mesenchymal stem cells[J]. Cell Transplant, 2013, 22(6): 1011 – 1021.
[12] Zucchi P, Ferrari P, Spina ML. Diabetic foot: from diagnosis to therapy [J]. G Ital Nefrol, 2005, 22 (31): 20 – 22.
[13] Zimny S, Dessel F, Ehren M, et al. Early detection of microcirculatory impairment in diabetic patients with foot at risk[J]. Diabetes Care, 2001, 24(10): 1810 – 1814.
[14] Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2004, 20(1): 78 – 89.
[15] Jaquinandi V, Mahe G, Leftheriotis G, et al. Reference value of transcutaneous oxygen measurement in diabetic patients compared with nondiabetic patients [J]. J Vasc Surg, 2009, 49(1): 279 – 280.
[16] Tullavardhana T, Akranurakkul P, Ungkitphaiboon W, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression as a biomarker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis[J]. Oncol Res Treat, 2015, 38(3): 110 – 114.
[17] Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing[J]. Leukoc Biol, 2001, 69(4): 513 – 521.

(编辑:魏 源)