

GKT137831 降低活性氧自由基水平 来缓解阿托伐他汀所致的骨骼肌糖摄取下降

张 荣¹, 杨鑫泉², 熊 婷², 唐 珊², 艾可青³,
钟红艳¹, 毛永清², 王大新¹

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州, 225001; 2. 中南大学湘雅医学院, 湖南 长沙, 410000;

3. 大连医科大学, 辽宁 大连, 116000)

摘 要: **目的** 探讨 GKT137831 对阿托伐他汀干预骨骼肌细胞的保护作用机制。**方法** 采用阿托伐他汀干预骨骼肌 C2C12 细胞 48 h。采用 CCK-8 方法分析阿托伐他汀对骨骼肌细胞生存率的影响。采用 Western blot 检测阿托伐他汀干预后 NADPH 氧化酶 4 (Nox4) 蛋白表达。采用流式细胞术检测阿托伐他汀对骨骼肌细胞糖摄取及活性氧自由基 (ROS) 水平的影响。予 Nox4 抑制剂 GKT137831 共培养, 分析阿托伐他汀对细胞糖摄取及 ROS 水平的影响。**结果** 阿托伐他汀干预骨骼肌细胞 48 h 后, C2C12 细胞糖摄取能力下降, ROS 增加, 予 GKT137831 后可缓解糖摄取下降及 ROS 增加。CCK-8 实验结果显示, 阿托伐他汀干预细胞 48 h 对细胞活力无影响。阿托伐他汀干预 C2C12 骨骼肌细胞后 Nox4 表达增加。**结论** GKT137831 通过降低 ROS 水平来缓解阿托伐他汀所致的骨骼肌糖摄取下降。

关键词: GKT137831; 阿托伐他汀; 活性氧自由基; 糖摄取

中图分类号: R 336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2019)10-053-05 **DOI:** 10.7619/jcmp.201910015

GKT137831 alleviates atorvastatin-induced decreased glucose uptake of skeletal muscle by suppressing reactive oxygen species level

ZHANG Rong¹, YANG Xinquan², XIONG Ting², TANG Shan², AI Keqing³,
ZHONG Hongyan¹, MAO Yongqing², WANG Daxin¹

(1. Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001;

2. Xiangya Medical School of Central South University, Changsha, Hunan, 410000;

3. Dalian Medical University, Dalian, Liaoning, 116000)

ABSTRACT: **Objective** To explore the mechanism of GKT137831 on protecting skeletal muscle cells by atorvastatin intervention. **Methods** Atorvastatin was used to intervene C2C12 cells in skeletal muscle for 48 hours. CCK-8 method was used to analyze the effect of atorvastatin on survival rate of skeletal muscle cells. Western blot was used to detect the expression of NADPH Oxidase 4 (Nox4) after atorvastatin intervention. Flow cytometry was used to detect the effect of atorvastatin on glucose uptake and reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle cells. Co-culture of Nox4 inhibitor GKT137831 was used to analyze the effect of atorvastatin on cellular glucose uptake and ROS level. **Results** After intervention with atorvastatin on skeletal muscle cells for 48 hours, the glucose uptake ability of C2C12 cells decreased and ROS increased. GKT137831 could alleviate the decrease of glucose uptake and the increase of ROS. CCK-8 results showed that atorvastatin had no effect on cell viability after 48 hours of intervention. Nox4 expression increased after atorvastatin intervention on C2C12 skeletal muscle cells. **Conclusion** GKT137831 can alleviate atorvastatin-induced decreased glucose uptake of skeletal muscle by suppressing reactive oxygen species level.

KEY WORDS: GKT137831; atorvastatin; reactive oxygen species; glucose uptake

目前,他汀类药物已改变心血管疾病(CVD)的一级和二级预防,循证数据^[1]证实了他汀类药物治疗的疗效和安全性,有助于指导临床医生管理 CVD 高危人群。随着对他汀类药物的深入研究,大量临床试验、荟萃分析和观察性研究^[2-4]发现,接受他汀类药物治疗的患者新发糖尿病(NODM)的风险增高,而对于经过强化他汀治疗的患者和有 NODM 危险因素的患者,这种风险会进一步增高。阿托伐他汀作为高效能的他汀类药物,与低效能他汀类药物相比,其可中等程度地增加 NODM 风险^[5]。目前,临床上尚无有效的治疗手段可以完全阻断高效能他汀类药物导致的 NODM。目前关于他汀类药物致 NODM 的研究主要集中在他汀类药物增加胰岛素抵抗和损伤胰岛 B 细胞功能方面,其中骨骼肌是人体中糖代谢最大的靶器官,参与了机体 85% 的糖代谢。因此,在他汀类药物导致 NODM 的过程中,骨骼肌可能是此类药物发生糖代谢紊乱的主要靶点。活性氧自由基(ROS)不仅参与了生理信号转导,在一些疾病中也参与病理生理信号转导,如糖尿病及代谢性疾病。

在小鼠源性的骨骼肌细胞中,NADPH 氧化酶 4(Nox4)呈现高表达,该酶是骨骼肌中 ROS 的重要来源之一^[6-7]。研究^[8]证实,减少 Nox4 源性的 ROS 可有效改善 2 型糖尿病大鼠内皮细胞的胰岛素抵抗。GKT137831 作为 Nox4 的抑制剂,具有良好的抗氧化功能,已用于临床二期实验。本研究尝试论证阿托伐他汀致骨骼肌糖摄取下降可能与 ROS 水平增加有关,而 GKT137831 可能具有通过减少 ROS 的产生而缓解他汀类药物致 NODM 的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞培养

小鼠 C2C12 骨骼肌细胞购自中国科学院细胞库(苏州),GKT137831 购自 MCE 公司,阿托伐他汀、兔 β -actin 抗体购自美国 Sigma 公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, H_2DCFDA 、2-NBDG 购自美国 Invitrogen 公司,兔 Nox4 抗体购自美国 Abcam 公司。ECL 化学发光试剂购自美国 Thermo 公司;高糖 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)、马血清(HS)购自美国 GIBCO 公司;青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司。骨骼肌 C2C12 培养条件均

为:DMEM 培养基(高糖,含 10% FBS、1% 双抗),37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养 24 h,待细胞长至 70% ~ 80% 汇合度,更换为含 2% 马血清的完全培养基,每隔 24 h 换液,养至第 5 天,形成成熟的肌管细胞,向培养基中加入 1 $\mu mol/L$ 和 10 $\mu mol/L$ 的阿托伐他汀,处理 48 h。

1.2 CCK-8 法检测细胞活性

C2C12 细胞以 2×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板中,分为 3 组,分别加入 0、1、10 $\mu mol/L$ 阿托伐他汀处理。药物处理 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 1 h 后,于酶标仪 450 nm 波长读数,检测吸光度。细胞活力(%) = [(阿托伐他汀组 - 空白组)/(对照组 - 空白组)] $\times$ 100%。

1.3 流式细胞仪检测技术检测骨骼肌细胞糖摄取能力

C2C12 细胞以 6×10^5 的密度接种在 6 孔板上。分化后的细胞给予阿托伐他汀(1、10 $\mu mol/L$)处理 48 h。加入 2-NBDG 染料 30 min 室温避光共培养,用冰冷的 $1 \times PBS$ 终止反应后,用 0.1% Triton-X100 消化细胞。流式细胞仪检测细胞糖摄取的变化(激发波长为 485 nm,发射波长为 535 nm)。

1.4 流式细胞仪检测技术检测骨骼肌胞内 ROS 水平

阿托伐他汀干预成熟的肌管细胞后加入 10 $\mu mol/L$ DCFH-DA 室温下避光孵育 30 min。收集细胞,流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平(激发波为 485 nm,发射波为 525 nm)。

1.5 Western blot 检测阿托伐他汀干预后骨骼肌细胞 Nox4 表达情况

收集细胞,用 RIPA 溶液(含蛋白酶抑制剂抑制剂)裂解提取蛋白,以 Bradford 法进行蛋白定量,按每孔 40 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%。采用湿转方法将蛋白转至 0.2 $\mu mol/L$ 硝酸纤维素膜,使用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 h, Nox4 抗体中(稀释浓度 1:4 000)4 $^{\circ}C$ 孵育过夜。二抗(1:2 000 稀释)孵育时间为 1 h,使用伯乐 XRS 化学发光成像分析仪显影成像。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿托伐他汀对骨骼肌 C2C12 细胞生长无影响

为验证阿托伐他汀抑制骨骼肌 C2C12 细胞糖摄取并非是通过损伤细胞发生的,以 CCK-8 法检测阿托伐他汀(1、10 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h 后骨骼肌细胞的活性。结果显示,与对照组相比,阿托伐他汀处理后 C2C12 细胞生长活性不受影响,提示阿托伐他汀抑制骨骼肌细胞糖摄取并不是由于损伤细胞所致。见图 1。

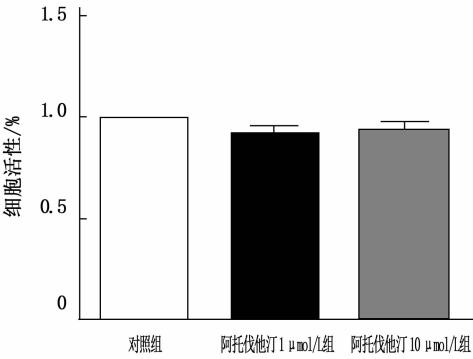


图 1 阿托伐他汀(1、10 $\mu\text{mol/L}$)处理 48 h 后 C2C12 细胞活性

2.2 阿托伐他汀通过增加 ROS 水平致骨骼肌细胞糖摄取能力下降

为了验证阿托伐他汀致 NODM 可能是由于

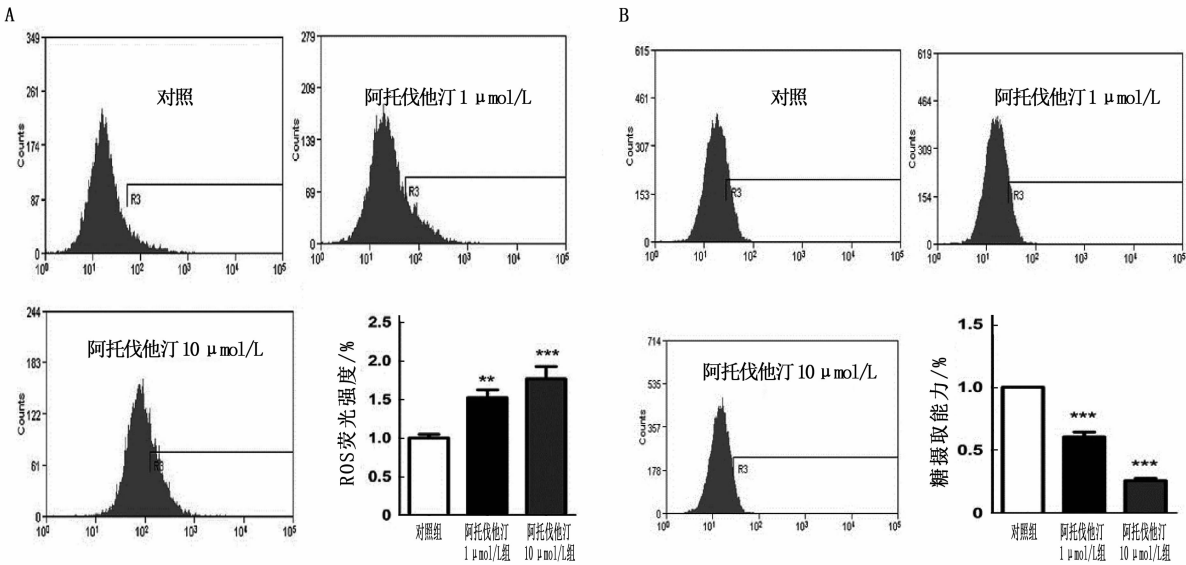
其增加了 ROS 水平进而损伤骨骼肌细胞糖摄取,本研究采用流式细胞仪检测阿托伐他汀(1、10 $\mu\text{mol/L}$)干预骨骼肌细胞 48 h 后糖摄取的情况。结果显示,阿托伐他汀处理骨骼肌细胞后,与对照组相比,ROS 水平明显升高(图 2A),同时糖摄取能力显著下降(图 2B),提示阿托伐他汀致 NODM 可能是通过增加 ROS 水平所致的。

2.3 阿托伐他汀增加骨骼肌细胞中 Nox4 的表达

研究已证实 Nox4 是骨骼肌中 ROS 的主要来源之一, Nox4 的过表达参与了糖尿病的发生、发展。本研究采用 Western blot 法检测阿托伐他汀干预骨骼肌细胞 48 h 后 Nox4 的表达情况,结果显示,与对照组相比, Nox4 蛋白的表达显著增加。见图 3。

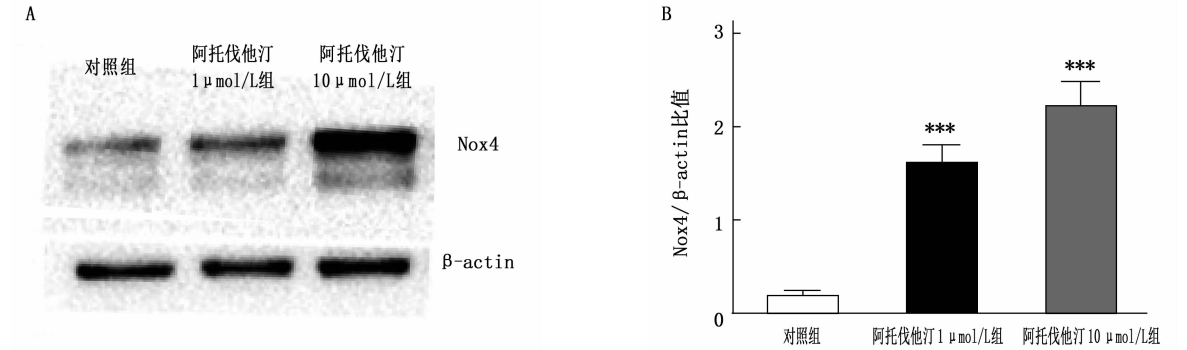
2.4 GKT137831 通过降低 ROS 水平缓解阿托伐他汀所致的骨骼肌糖摄取下降

GKT137831 作为 Nox4 的抑制剂,可以有效抑制 Nox4 的活性而不影响 Nox4 的表达,进而减少 Nox4 源性的 ROS 产生。为了验证 GKT137831 对阿托伐他汀干预骨骼肌的保护作用,将 GKT137831 (10 nmol/L) 和阿托伐他汀 (1、10 $\mu\text{mol/L}$)共孵育 48 h, 用流式细胞仪分别检测糖摄取和 ROS 水平,结果显示, GKT137831 可以部分增强骨骼肌糖摄取能力,降低 ROS 水平,见图 4。



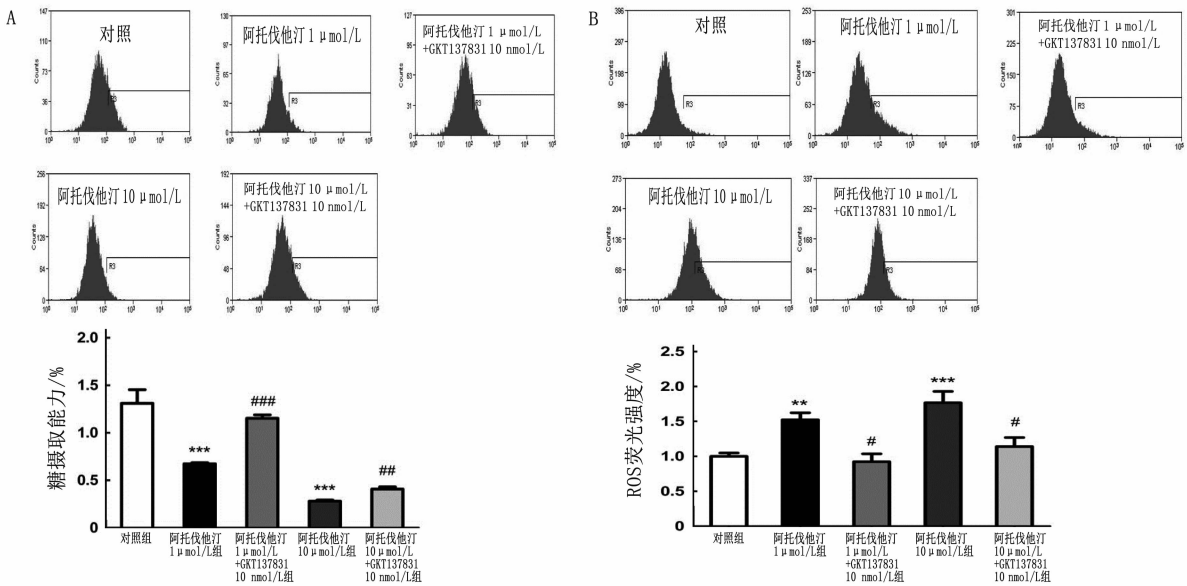
A: 阿托伐他汀干预骨骼肌细胞 48 h, 流式细胞仪检测提示 ROS 水平明显增加;
B: 阿托伐他汀干预骨骼肌细胞可致细胞糖摄取能力显著下降。
与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 阿托伐他汀通过增加 ROS 水平致骨骼肌细胞糖摄取能力下降



阿托伐他汀干预骨骼肌细胞 48 h, Western blot 法检测提示 Nox4 蛋白表达显著增加。与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 3 阿托伐他汀通过增加 ROS 水平致骨骼肌细胞糖摄取能力下降



A: GKT137831 (10 nmol/L)可部分缓解阿托伐他汀(1、10 μ mol/L)所致的糖摄取下降; B: GKT137831 (10 nmol/L)可降低阿托伐他汀(1、10 μ mol/L)干预所致的 ROS 水平升高。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与阿托伐他汀组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 4 GKT137831 通过降低 ROS 水平缓解阿托伐他汀所致的骨骼肌糖摄取下降

2.5 阿托伐他汀对骨骼肌的影响

骨骼肌是人体中葡萄糖代谢重要的靶器官,约占机体葡萄糖处理量的 75.0%^[9]。他汀类药物是最常用的处方药,用于抑制胆固醇的合成,减少心血管不良事件的发生^[10]。然而,他汀类药物使用导致的相关肌肉疾病的不良反应是患者中断治疗最常见的原因^[11]。此外,近年来发现他汀类药物可致骨骼肌中相关糖代谢受损,主要表现在干扰葡萄糖转运体 4 向细胞膜的转位过程,进而影响骨骼肌对葡萄糖的摄取过程^[12]。本模型中,阿托伐他汀通过增加 Nox4 的表达、提升 ROS 水平而降低骨骼肌细胞对糖摄取的能力,用 Nox4 活性抑制剂 GKT137831 可降低 ROS 水平,从而缓解阿托伐他汀对骨骼肌糖摄取的影响,提示 GKT137831 可

能是缓解他汀类药物不良反应潜在的有效策略。

3 讨论

他汀类药物作为目前常用的降脂药,自 20 世纪 80 年代用于临床后,已显著降低心血管不良事件的发生率^[1, 13-14]。然而,最近的临床试验^[15]表明,接受他汀类药物(尤其是以阿托伐他汀为代表的高效能他汀药)治疗的患者,其新发糖尿病(NODM)的发病风险显著增加。目前,关于他汀类药物致 NODM 的分子机制仍在探索中。已有文献^[16]报道,阿托伐他汀能降低胰岛素介导的葡萄糖摄取,这是由于葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)向细胞膜转位受损以及胰岛素诱导的胰岛素受体-1 酪氨酸磷酸化和 AKT 丝苏氨酸磷酸化程度下降所致。尽管本研究未涉及胰

胰岛素信号通路,但本研究结果显示,在无胰岛素刺激的情况下,阿托伐他汀同样可以降低骨骼肌细胞对糖摄取的能力,提示在骨骼肌糖代谢过程中,阿托伐他汀不仅影响了胰岛素介导的葡萄糖摄取过程,而且干预了无胰岛素刺激状态下骨骼肌的糖摄取,加重了胰岛素抵抗的发生、发展。Mita 等^[17]研究比较了普伐他汀与阿托伐他汀治疗对 2 型糖尿病患者 β 细胞功能的影响。与普伐他汀相比,阿托伐他汀对胰岛 β 细胞未见保护作用,甚至可以降低胰岛 β 细胞分泌胰岛素的能力。

GKT137831 作为 Nox4 的新型抑制剂,可有效减少肝炎模型中肝脏星状细胞 ROS 的产生,缓解肝脏纤维化及肝脏细胞凋亡的发生、发展^[18]。此外,该药对肾脏的保护作用已在三种不同的糖尿病肾病动物模型中得到证实, GKT137831 可显著降低糖尿病肾病模型鼠中 ROS 水平,缓解糖尿病肾脏血管病变^[19-21]。由于该药具有良好的抗氧化功能,目前已进入临床二期试验,用于糖尿病并发症的防治研究。然而, GKT137831 是否可以在骨骼肌中发挥其抗氧化功能,进而降低骨骼肌中的 ROS 水平,保护骨骼肌的糖代谢,目前尚不清楚^[22]。本研究结果显示,在骨骼肌细胞中, GKT137831 可部分缓解阿托伐他汀所致的葡萄糖摄取下降,同时观察到该药可缓解阿托伐他汀所致的 ROS 水平增加。提示 GKT137831 可在骨骼肌细胞中发挥其抗氧化的功能,缓解阿托伐他汀对骨骼肌糖摄取的影响。

综上所述,他汀类药物,尤其是以阿托伐他汀为代表的高效能他汀药物,不仅可致胰岛素抵抗的发生、发展,还可影响胰岛 β 细胞分泌胰岛素的能力。

参考文献

- [1] Betteridge D J, Carmena R. The diabetogenic action of statins-mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(2): 99-110.
- [2] Coleman C I, Reinhart K, Kluger J, et al. The effect of statins on the development of new-onset type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(5): 1359-1362.
- [3] Sattar N, Preiss D, Murray H M, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials[J]. *Lancet*, 2010, 375(9716): 735-742.
- [4] Preiss D, Seshasai S R, Welsh P, et al. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis[J]. *JAMA*, 2011, 305(24): 2556-2564.
- [5] Dormuth C R, Filion K B, Paterson J M, et al. Higher potency statins and the risk of new diabetes: multicentre, observa-

- tional study of administrative databases[J]. *BMJ*, 2014, 348: g3244-g3256.
- [6] Sun Q A, Hess D T, Nogueira L, et al. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel by NADPH oxidase 4[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(38): 16098-16103.
- [7] Handayani S, Iguchi G, Fukuoka H, et al. Reactive oxygen species play an essential role in IGF-1 signaling and IGF-1-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(3): 912-921.
- [8] Li Q, Su J, Jin S J, et al. Argirein alleviates vascular endothelial insulin resistance through suppressing the activation of Nox4-dependent O_2 -production in diabetic rats[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 121: 169-179.
- [9] Gan Z, Fu T, Kelly D P, et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases[J]. *Cell Res*, 2018, 28(10): 969-980.
- [10] Godoy J C, Niesman I R, Busija A R, et al. Atorvastatin, but not pravastatin, inhibits cardiac Akt/mTOR signaling and disturbs mitochondrial ultrastructure in cardiac myocytes[J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 1209-1225.
- [11] Echaniz-Laguna A, Mohr M, Tranchant C. Neuromuscular symptoms and elevated creatine kinase after statin withdrawal[J]. *N Engl J Med*, 2010, 62(6): 564-575.
- [12] Sun B, Zhong Z, Wang F, et al. Atorvastatin impaired glucose metabolism in C2C12 cells partly via inhibiting cholesterol-dependent glucose transporter 4 translocation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 108-119.
- [13] 王朝阳. 大剂量降脂药物在缺血性卒中患者中的应用效果[J]. *实用临床医药杂志*, 2015, 199(3): 117-118.
- [14] 王娜, 祁学章, 舒志刚, 等. 自发性脑出血患者的他汀应用和脑微出血情况分析[J]. *实用临床医药杂志*, 2018, 22(7): 19-22.
- [15] Sasaki J, Iwashita M, Kono S. Statins: beneficial or adverse for glucose metabolism[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2006, 13(3): 123-129.
- [16] Banach M, Malodobra - Mazur M, Gluba A, et al. Statin therapy and new-onset diabetes: molecular mechanisms and clinical relevance[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(27): 4904-4912.
- [17] Mita T, Watada H, Nakayama S, et al. Preferable effect of pravastatin compared to atorvastatin on beta cell function in Japanese early-state type 2 diabetes with hypercholesterolemia[J]. *Endocr J*, 2007, 54(3): 441-447.
- [18] Jiang J X, Chen X, Serizawa N, et al. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(2): 289-296.
- [19] Watson A M, Li J, Samijono D, et al. Quinapril treatment abolishes diabetes-associated atherosclerosis in RAGE/apolipoprotein E double knockout mice[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2): 444-458.
- [20] Petruzzelli L, Herrera R, Rosen O M. Insulin receptor is an insulin-dependent tyrosine protein kinase: copurification of insulin-binding activity and protein kinase activity to homogeneity from human placenta[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(11): 3327-3331.
- [21] Gorin Y, Cavaglieri R C, Khazim K, et al. Targeting NADPH oxidase with a novel dual Nox1/Nox4 inhibitor attenuates renal pathology in type 1 diabetes[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(11): F1276-F1287.
- [22] Ferreira L F, Laitano O. Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 98: 18-28.