

高糖对体外培养的乳鼠心肌细胞脂代谢的影响

曾琳琳, 张晓刚, 胡 波, 张巧英, 郑文武

(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 内科学; 高糖对乳鼠心肌细胞脂代谢的影响; 逆转录聚合酶链反应; 高糖; 脂蛋白脂肪酶; 心肌细胞; 胰岛素抵抗

[摘要] 目的 探讨高浓度葡萄糖对高胰岛素水平作用下乳鼠心肌细胞脂代谢的影响。方法 用胰岛素抵抗心肌细胞模型, 以不同浓度葡萄糖培养基和胰岛素为干预因素进行实验。以脂蛋白脂肪酶的表达来观察心肌细胞脂代谢的改变; 用电镜观察心肌细胞的病理性损伤。结果 80 mmol/L 葡萄糖作用下, 胰岛素抵抗心肌细胞的脂蛋白脂肪酶 mRNA 的表达及活性明显增强 ($P < 0.05$); 加用 10^{-8} mol/L 胰岛素共同孵育后, 脂蛋白脂肪酶 mRNA 的表达及活性减弱; 不同浓度葡萄糖作用下, 相同状态心肌细胞脂蛋白脂肪酶活性及脂质含量无显著性差异 ($P > 0.05$); 相同浓度葡萄糖作用下, 胰岛素抵抗心肌细胞脂质含量明显增加 ($P < 0.05$), 加用 10^{-8} mol/L 胰岛素共同孵育后, 细胞脂质含量减少。高浓度葡萄糖作用下, 正常心肌细胞和胰岛素抵抗心肌细胞出现线粒体肿胀, 髓样结构形成, 胞内脂滴增多等细胞结构损伤性改变, 加用 10^{-8} mol/L 胰岛素共同孵育后, 细胞线粒体无增多及肿胀, 胞内脂滴减少。结论 胰岛素抵抗心肌细胞脂蛋白脂肪酶表达上调, 脂代谢加速, 细胞内脂质含量增加, 脂蛋白脂肪酶 mRNA 表达强度增加, 细胞结构发生变化, 而较高胰岛素水平可逆转这些变化的发生。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of High Glucose on the Metabolic Mechanism of Lipid in Cultured Rat Cardiomyocytes

ZENG Lin-Lin, ZHANG Xiao-Gang, HU Bo, ZHANG Qiao-Ying, and ZHENG Wen-Wu

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Lipoprotein Lipase; Cardiomyocytes; Insulin Resistance; Lipid Metabolism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of high glucose on the metabolic mechanism of lipid in cultured rat cardiomyocytes. **Methods** The model of insulin resistant cardiomyocytes were established, incubated with the intervening factors of insulin and high glucose of different concentration. The changes of lipid metabolism of cardiomyocytes were observed surrounding the center of lipoprotein lipase (LPL) as the important enzyme of lipid metabolism. The pathologic damage of cell structure were observed through transmission electron microscope. **Results** The expression of LPL mRNA of the insulin resistant cardiomyocytes which treated with 80 mmol/L glucose was obviously increased ($P < 0.05$). After incubated with 10^{-8} mol/L insulin, the expression of LPL mRNA of those cardiomyocytes was decreased; the activity of LPL of the insulin resistant cardiomyocytes was obviously enhanced ($P < 0.05$) under the same concentration of glucose. After incubated with 10^{-8} mol/L insulin, the activity of LPL was weakened; the activity of LPL of the cardiomyocytes in the same incubated condition was not significantly different ($P > 0.05$) treated with 20 and 80 mmol/L glucose; the concentration of lipid of the insulin resistant cardiomyocytes was obviously enhanced ($P < 0.05$) under the same concentration of glucose. After incubated with 10^{-8} mol/L insulin, the concentration of lipid was weakened; the concentration of lipid of the cardiomyocytes in the same incubated condition was not significantly different ($P > 0.05$) treated with 20 and 80 mmol/L glucose. Swelled mitochondria, formed myelin figure, increased lipid drops were observed through transmission electron microscope in normal cardiomyocytes and the insulin resistant cardiomyocytes. After adding 10^{-8} mol/L insulin, there were no swelled mitochondria or myelin figure, with little lipid drops in the cardiomyocytes. **Conclusions** High glucose could increase the expression of LPL mRNA and the lipid in cultured rat cardiomyocytes. Insulin could reverse these changes, which may have implication for diabetes mellitus and its complications.

糖尿病心肌病是由糖尿病引起的, 以左心室舒张和(或)收缩功能障碍为表现的疾病^[1]。糖代谢异

常是糖尿病心肌病的始动因素, 高糖本身导致心肌细胞钙调节改变, 多种相关酶活性受抑制^[2,3]; 直接启动心肌细胞凋亡^[4]及通过相关途径都可致细胞损伤^[5]。2型糖尿病患者大多存在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), IR时葡萄糖利用下降转而依靠脂肪酸氧化, 心肌细胞产生一系列脂代谢紊乱, 高糖和高于正常水平量胰岛素在糖尿病心肌病的发生发展中

[收稿日期] 2005-11-15 [修回日期] 2006-06-16

[作者简介] 曾琳琳, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病心肌病, E-mail 为 llx791217@tom.com。张晓刚, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的发病机制和治疗。胡波, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病心肌病。

有重要作用,而胰岛素对代谢综合征环境中胰岛素抵抗心肌细胞的作用,关系到糖尿病心肌病的治疗。本文拟从体外细胞实验角度说明胰岛素抵抗、高糖对心肌细胞脂代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 乳鼠, 出生 1~3 天, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(高糖, Gibco 公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), 葡萄糖(分析纯, 重庆北碚化学试剂厂), 胰酶、L-谷氨酰胺(北方同正), 胰岛素注射液(万邦医药), DEPC、Trizol、Ladder Marker(上海生工生物工程有限公司), 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测试剂盒(Takara 大连宝生物工程有限公司)。

1.3 乳鼠心肌细胞的培养

参照文献[6, 7]。取 1 天 SD 乳鼠心室部分, 0.125% 胰蛋白酶消化, 100 目不锈钢筛网过滤, 含 15% FBS 的 DMEM 培养基静置 3 次(37℃, 1~2 h)。未贴壁细胞为心肌细胞, 调细胞浓度为 5×10^8 个/L, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内, 用含 15% FBS 的 DMEM 培养基进行原代培养, 3 天后进行细胞分组。

1.4 胰岛素抵抗心肌细胞模型的建立

参照文献[8]。取上述心肌细胞置于 10^{-7} mol/L 胰岛素、15% FBS 的 DMEM 培养基孵育 24 h, 弃培养液, 4℃、pH 4.0 的 DMEM 液洗 5 次, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 即为胰岛素抵抗心肌细胞模型。

1.5 实验分组

对照组为正常培养心肌细胞, 加入 80 mmol/L 葡萄糖溶液干预 24 h; 模型组为胰岛素抵抗心肌细胞, 加入 80 mmol/L 葡萄糖溶液干预 24 h; 胰岛素组为胰岛素抵抗心肌细胞, 加入 80 mmol/L 葡萄糖溶液和 10^{-8} mol/L 胰岛素干预 24 h。

1.6 细胞脂质含量测定

参照文献[9]。培养的心肌细胞经 10% 冷甲醛钙溶液固定 20~30 min 后, 加入新配制的染色孵育液 10~20 min, 流水洗 1 min, 稍干后, 1%~2% 甲基绿水溶液复染 5 min, 蒸馏水清洗, 自然晾干, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在显微镜下每张染色组随机选取 5 个视野, 计算细胞总数和染色阳性细胞数。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测心肌细胞脂蛋白脂肪酶 mRNA 的表达

1.7.1 总 RNA 的提取 取干预好的细胞, 留取上清, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每个培养瓶中加入 2 mL 0.125% 胰蛋白酶消化 4~5 min, 反复吹打后将悬液转移到离心管。离心后将细胞沉淀转移到无 RNA 酶的 EP 管中, 每管加入 Trizol 500 μ L, 反复吹打后剧烈震荡, 然后分别以氯仿、异丙醇和无 RNA 酶的 75% 乙醇提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测定 A_{260/280} 值均 ≥ 1.7 。

1.7.2 引物序列 脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)上下游引物分别为 5'-ATG GAG AGC AAA GCC CTG CT-3' 和 5'-CAC GCC AGC AGC ATG GGC TC -3', γ -actin 引物为 5'-ATG GAA GAA GAA ATG GCC GC-3' 和 5'-ACA CGC AGC TCG TTG TAG AA-3', 扩增产物长度分别为 500 bp 和 287 bp。

1.7.3 逆转录聚合酶链反应 按试剂盒说明书进行操作。MgCl₂ 2 μ L、10 \times RT Buffer 1 μ L、RNase Free dH₂O 3.75 μ L、dNTP Mixture 1 μ L、RNase Inhibitor 0.25 μ L、AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ L、Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μ L、样品 RNA 1 μ L, 总反应体系 10 μ L, 55℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min 进行逆转录反应。PCR 反应体系为 5 \times PCR Buffer 10 μ L、灭菌蒸馏水 28.75 μ L、Taq 0.25 μ L、上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L、cDNA 10 μ L, 总反应体系为 50 μ L, 按 94℃ 预变性 2 min 后, 94℃ 变性 30 s \rightarrow 55℃ 复性 30 s \rightarrow 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min 进行 PCR 反应。

1.7.4 逆转录聚合酶链反应产物检测 取 5 μ L PCR 产物上样于 1.5% 琼脂糖凝胶, 同时以 5 μ L 100 bp DNA marker 上样, 以 0.5 \times TBE 为缓冲液电泳。电泳结束后用扫描分析仪扫描凝胶, 以 γ -actin 为内参, 用 Bandscan 分析软件对 RT-PCR 结果进行吸光度分析。

1.8 电镜下心肌细胞结构的观察

取干预好的细胞, 留取上清, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 每个培养瓶中加入约 2 mL 0.125% 胰蛋白酶消化 4~5 min, 反复吹打后将悬液转移到 1 mL EP 管中, 2 000 r/min 离心 15 min, 去上清液后用戊二醛固定, 在 4℃ 冰箱中放置 2 h 后, 去戊二醛, 加入 PBS 后送电镜室观察并摄相。

1.9 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验和 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖作用下各组心肌细胞脂质含量

细胞脂质呈红色,细胞核呈紫兰色,各组之间比较具有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1. 高糖对不同状态心肌细胞脂质表达的影响

分 组	细胞总数	染色阳性细胞数	百分率
对照组	170	60	47% ^a
模型组	245	165	67% ^a
胰岛素组	215	95	39% ^a

a 为 $P < 0.05$, 组间比较。

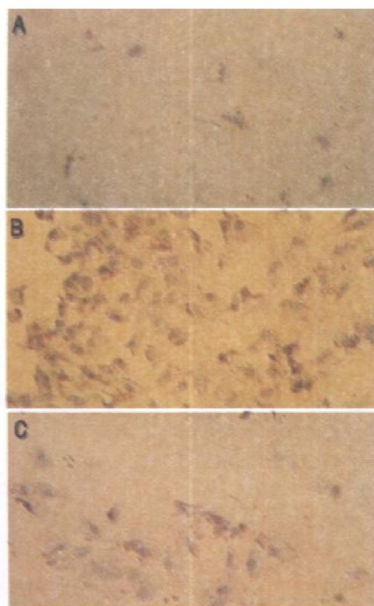


图 1. 高糖对不同状态心肌细胞脂质表达的影响 ($\times 200$)

A 为对照组, B 为模型组, C 为胰岛素组。

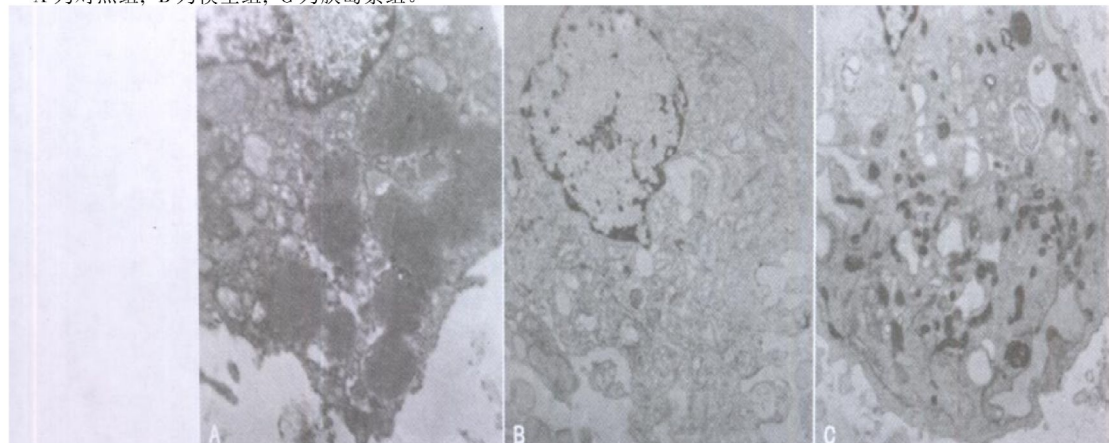


图 3. 高糖作用下心肌细胞电镜下结构的变化 ($\times 6000$)

A 为对照组, B 为模型组, C 为胰岛素组。

3 讨论

2 型糖尿病患者多存在 IR。近年,用代谢综合征来描述 IR、高血糖、脂代谢异常、高血压等状况越来越普遍。于是,将糖尿病心肌病的发生发展与代谢综合征相结合进行研究有重要意义,其中 IR 心肌

2.2 高糖下各组心肌细胞脂蛋白脂肪酶的表达

高糖对不同状态下心肌细胞 LPL mRNA 的表达具有显著性差异($P < 0.05$),胰岛素可减少心肌细胞 LPL mRNA 的表达($P < 0.01$)。见表 2 和图 2。

表 2. 高糖对不同状态下心肌细胞脂蛋白脂肪酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	相对吸光度
对照组	0.835 \pm 0.04 ^a
模型组	0.908 \pm 0.02 ^a
胰岛素组	0.795 \pm 0.01 ^a

a 为 $P < 0.05$, 组间比较。

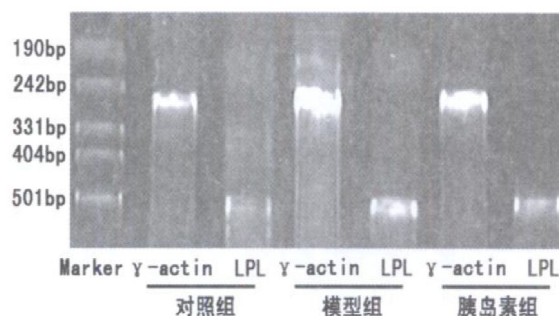


图 2. 逆转录聚合酶链反应产物凝胶电泳图

2.3 高糖作用下各组心肌细胞电镜下结构的变化

对照组可见胞内脂滴增多;模型组可见线粒体肿胀,髓样结构形成,胞内脂滴增多;胰岛素组线粒体无增多及肿胀,胞内脂滴较少(图 3)。

细胞的脂代谢、舒缩功能及结构改变还未研究清楚。胰岛素对代谢综合征环境中 IR 心肌细胞的作用,关系到糖尿病心肌病的治疗问题。

高浓度葡萄糖可引起细胞 LPL 表达上调,但均建立在动物模型基础上。本研究结果发现,体外培

养的正常心肌细胞和 IR 心肌细胞在高糖干预下 LPL 表达上调, 脂代谢加速, 细胞内脂质堆积增加, 进一步损伤细胞糖代谢形成恶性循环, 导致细胞功能与结构改变, 胞内脂滴增多, 线粒体肿胀, 髓样结构形成。胰岛素作用后 LPL 表达下调, 脂质堆积减少, 细胞线粒体无增多及肿胀, 胞内脂滴较少。

脂蛋白脂肪酶(LPL)是脂蛋白降解过程中的关键酶, 是脂质代谢中最重要的酶之一, 主要在脂肪组织、心肌、骨骼肌中表达和合成, 是外源性和内源性脂肪代谢的限速酶^[10], 促进血液中的乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的三磷酸甘油酯降解为游离脂肪酸供周围组织利用。糖尿病心肌病的心肌细胞脂质摄取增加, 心肌细胞 ATP 主要来自于葡萄糖, IR 时葡萄糖利用下降转而依靠脂肪酸氧化^[11]。细胞内脂肪酸氧化活跃, 可造成细胞内乙酰 CoA 堆积, 乙酰 CoA 对丙酮酸脱氢酶产生强烈的抑制作用, 进而抑制了细胞内葡萄糖氧化利用, 从而形成恶性循环。心肌细胞脂代谢有多个环节, 细胞外脂质进入细胞是关键环节之一。细胞膜及细胞内 LPL 的活性与细胞内外游离脂肪酸的量有正相关关系。细胞膜上 LPL 能水解细胞外的甘油三酯释放出游离脂肪酸, 细胞内的 LPL 有同样的水解作用; 细胞膜上 LPL 还能作为分子桥“捕捉”细胞外含载脂蛋白 B 的脂蛋白, 所以 LPL 可促进细胞内游离脂肪酸增加^[12]。

在糖尿病状态下, 由于 IR 和(或)胰岛素分泌不足, 葡萄糖跨膜转运及利用障碍, 游离脂肪酸氧化产能增加, 为代偿性地使游离脂肪酸更多的进入心肌细胞, 需要消耗更多的 LPL 使血液中甘油三酯降解为游离脂肪酸。因此, 机体启动调控机制, 使 LPL 基因表达增强, LPL mRNA 水平增高, 参与上述代偿过程满足心肌高速能量代谢的需要。IR 心肌细胞胞内 LPL 表达增多, 而 LPL 活性增加可提供更多的游离脂肪酸给心肌细胞作为能源, 甘油三酯和游离脂肪酸等脂滴颗粒在心肌细胞内积聚增多, 对心肌细胞内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性有抑制作用, 致钙离子在心肌纤维膜和肌浆网中分布异常, 促进糖尿病心肌病的发生发展; 另外脂滴颗粒积聚增多还直接引起 ATP 代谢失调, 氧化型低密度脂蛋白增多而不能被低密度脂蛋白受体识别而进行正常的降解, 氧化型低密度脂蛋白在体内淤积, 对心肌细胞收缩力降低以及舒张期延长有影响, 也促进糖尿病心肌病的发生发展; 除脂代谢外, 糖尿病心肌病心肌细胞损伤的最后通路可能与细胞炎症启动有关^[13]。

外源胰岛素可以使糖尿病状态下的由于 IR 和

(或)胰岛素分泌不足造成的能量代偿过程逆转。外源胰岛素可能通过多种途径抑制炎症反应, 逆转代谢综合征环境下的心肌损伤。已有多种研究表明胰岛素作为一种抗炎物质具有心脏保护作用, 多途径之间可能存在协同作用^[14, 15]。国外有研究发现胰岛素在调节 LPL 活性方面起重要作用, 与 LPL 的转录翻译以及翻译后 LPL 的活性水平调节有关^[16]。提高外源胰岛素水平可减少 IR 对心肌细胞的损害, 除在于改善代谢综合征的糖脂代谢紊乱, 还在于直接改善心肌细胞的代谢紊乱, 以及间接改善心肌细胞内外的毒性环境, 其机制还待进一步研究。

深入研究高糖和胰岛素对心肌细胞脂代谢的影响, 有助于更好的了解糖尿病心肌病的发病机制及指导临床治疗。

[参考文献]

- [1] Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE. Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiology*, 2002, **98** (1-2): 33-39
- [2] Dutta K, Carmody MW, Cala SE, Davidoff AJ. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (8): 985-996
- [3] Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (4): 1167-1171
- [4] Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (6): 1938-948
- [5] Petrova R, Yamamoto Y, Muraki K, Yonekura H, Sakurai S, Watanabe T, et al. Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (10): 1425-431
- [6] 沈静, 谢苗荣, 徐雍. 乳鼠心肌细胞培养及纯化方法的改良 [J]. *中国医药导刊*, 2001, **3** (3): 225-229
- [7] 郝亚荣, 李建军, 李庚山. 乳鼠心肌细胞的原代培养 [J]. *心脏杂志*, 2001, **13** (6): 473-476
- [8] 李晨钟, 张素华, 舒昌达. 胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞模型的建立和鉴定 [J]. *重庆医科大学学报*, 1998, **23** (4): 335-337
- [9] 刘世新. 实用生物组织学技术 [M]. 科学出版社, 1995: 86-100
- [10] 李蓉, 李启富, 郭立新. 单纯性肥胖患者脂蛋白脂肪酶基因多态性 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, **19** (3): 225-227
- [11] O'Donnell JM. Myocardial triglyceride pool kinetics from ^{13}C NMR of intact diabetic rat heart demonstrate faster turnover rates and altered compartmentation versus healthy controls. *Circulation*, 2003, **108** (17): 661
- [12] 张晓刚, 陈运贞. 冠心病患者外周血白细胞脂蛋白脂肪酶 mRNA 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 413-416
- [13] So-Yong P. Heart-specific activation of PPAR α causes insulin resistance in heart and liver [J]. *Circulation*, 2003, **108** (17): 661
- [14] Jeschke JS, Panahloo A, Stehouwer C. Insulin attenuates the systemic inflammatory response to thermal trauma [J]. *Mol Med*, 2002, **8**: 443-450
- [15] Aljada A, Ghanim H, Mohanty. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**: 419-422
- [16] Panarotto D, Remillard P, Boufard L. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in adipose tissue-specific manner [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, **32** (2): 84-92

(此文编辑 文玉珊)