

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0831-03

• 实验研究 •

## 酰基化 ghrelin 抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡

赵宏, 丁丽颖, 刘国良

(中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 酰基化 ghrelin; 内皮细胞; 细胞凋亡; 高血糖; 动脉粥样硬化; 流式细胞仪

[摘要] 目的 近年来研究证明高糖引起的血管内皮细胞凋亡可能加重糖尿病动脉粥样硬化, 本研究旨在探讨酰基化 ghrelin 能否抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡。方法 应用吖啶橙形态学染色及 TUNEL、流式细胞分析仪、分光光度计研究高糖及 ghrelin 预处理后内皮细胞凋亡及 caspase-3 活性情况。结果 内皮细胞暴露于高浓度葡萄糖(33.3 mmol/L) 72 h 与正常水平葡萄糖(5.5 mmol/L) 相比凋亡细胞数量显著增加, 酰基化 ghrelin( $10^{-7}$  mol/L) 预处理 24 h 后显著降低高糖诱导的凋亡。同时高糖环境下凋亡蛋白 caspase-3 活性增高, 酰基化 ghrelin 预处理后明显降低 caspase-3 活性。结论 酰基化 ghrelin 可以抑制高糖诱导的血管内皮细胞凋亡及凋亡蛋白 caspase-3 的表达, 可能在防治糖尿病动脉粥样硬化的过程中起到一定作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Acylated Ghrelin Attenuated Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Cultured Endothelial Cells

ZHAO Hong, DING Li Ying, and LIU Guo Liang

(The First Affiliated Hospital of China Medical University, ShenYang, 110001 China)

[KEY WORDS] Endocrine; Acylated Ghrelin; Endothelial Cells; Cell Apoptosis; Hyperglycemia; Atherosclerosis; Flow Cytometry

[ABSTRACT] **Aim** Hyperglycemia induced apoptosis in atherosclerotic endothelial cells may contribute to the acceleration of atherosclerosis associated with diabetes. This study confirmed that acylated ghrelin attenuates hyperglycemia induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells (ECV-304). **Methods** Morphology of cell apoptosis was observed by Acridine Orange fluorescence staining. Cell apoptosis was detected by TUNEL and flow cytometry with PI staining. Caspase-3 activity was detected by colorimetric assay. **Results** Exposure of ECV-304 to hyperglycemia level for 72 h significantly increased the number of apoptotic cells compared with normal glucose level, but pretreatment of ghrelin significantly attenuated hyperglycemia induced apoptosis. Exposure to hyperglycemia induced caspase-3 activation and ghrelin also prevented it. **Conclusion** Results of our study indicate that acylated ghrelin effectively inhibits apoptosis in cultured vascular endothelial cells and provide a basis for future therapeutic interventions in diabetic vascular complications.

血糖增高可以诱导肾、视网膜、神经和血管内皮细胞等凋亡, 上述病变与糖尿病并发症和动脉粥样硬化加重相关。Ghrelin 是近年来新发现的生长激素的内源性配体, 主要来源于胃, 在体内存在酰基化和非酰基化两种形式, 一般认为酰基化 ghrelin 具有生物活性, 研究表明 ghrelin 及其受体存在于全身多处, 决定其功能的多样性, ghrelin 的心血管效应是目前研究的热点。国外有报道表明 ghrelin 可以抑制胰腺  $\beta$  细胞<sup>[1]</sup>、脂肪细胞<sup>[2]</sup>、神经细胞<sup>[3]</sup> 凋亡, 本实验推测酰基化 ghrelin 可能具有抗高糖环境下血

管內皮细胞凋亡的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

酰基化 ghrelin 为美国 phoenix 公司产品, D-葡萄糖为 sigma 产品, DMEM 购自 GIBCO 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, 原位细胞凋亡(TUNEL)检测试剂盒购自武汉博士德公司, caspase-3 活性检测试剂盒购自凯基生物, 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 购于中国典型培养物保藏中心。流式细胞分析仪(BD), 分光光度仪(BIO-RAD 公司)。

### 1.2 细胞培养

培养基采用低糖 DMEM, 培养基含 10% 胎牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素, 0.1 g/L 链霉素, 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 实验均采用第 3~4 代细

[收稿日期] 2007-04-13 [修回日期] 2007-12-15

[作者简介] 赵宏, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为糖尿病及其并发症, 联系电话为 13002493717, E-mail 为 hong.zhao@163.com。丁丽颖, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为糖尿病及其并发症。通讯作者刘国良, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖尿病的临床和基础研究, 联系电话为 13904056203。

胞, 1% 胎牛血清进行。

### 1.3 实验分组

对照组(D-葡萄糖 5.5 mmol/L)、高糖组(D-葡萄糖 33.3 mmol/L)、ghrelin 处理组( $10^{-7}$  mol/L ghrelin+高糖)。

### 1.4 吖啶橙荧光染色观察内皮细胞凋亡

各组细胞用 PBS 洗 3 次, 95% 乙醇固定 20 min, 滤纸吸干, 1% 醋酸作用 30 s, PBS 洗 1 min, 加入 0.01% 吖啶橙染色 5 min, PBS 洗 1 min, 分色 30 s, PBS 洗 3 次, 封片, 于激发波长为 405 nm 的荧光相差显微镜下立刻观察。

### 1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

实验用六孔培养板,  $1 \times 10^6$ /孔, 收集各组细胞, 制成细胞涂片, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次, 按 TUNEL 试剂盒操作: 标本片加标记缓冲液 18  $\mu$ L/片, 加 TdT 和 DIG-d-DTP 和 1  $\mu$ L, 湿盒 37  $^{\circ}$ C 孵箱中标记 2 h, 0.01 mol/L TBS 洗 2 min  $\times$  3 次, 加封闭液 50  $\mu$ L/片, 室温 30 min, 抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 50  $\mu$ L/片加至标本片上, 置湿盒 37  $^{\circ}$ C 反应 30 min, 0.01 mol/L TBS 洗 2 min  $\times$  3 次, 抗体稀释液 1:100 稀释 SABC, 混匀后 50  $\mu$ L/片, 37  $^{\circ}$ C 反应 30 min, 0.01 mol/L TBS 洗 5 min  $\times$  4 次, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 冲洗, 封片, 显微镜观察细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞, 结果用 MetaMorph/DP10/BX41 显微图像分析系统分析, 以每片取 5 个最强的染色区域, 400 倍镜下计数各区域阳性细胞数和总细胞数, 计算出每区域阳性细胞百分比, 即凋亡指数, 以 5 个区域凋亡指数的平均值作为每组的凋亡指数。每组选取 3 张代表涂片计数, 计数结果平均值作为各组凋亡百分率。

### 1.6 流式细胞仪定量检测凋亡细胞率

实验用六孔培养板,  $1 \times 10^6$ /孔, 收集各组细胞, 75% 酒精固定过夜, 1 kr/min 离心 10 min, 弃上清, 加 PBS, 1 kr/min 离心 10 min, 弃上清, 吹打管底, 加入 1 mg/L 碘化丙锭 (PI) 500  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 避光放置 30 min, 流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 上样检测, CellQuest 3.0 采集细胞, MedFit LT 3.0 软件分析细胞周期。

### 1.7 Caspase-3 活性检测

收集实验各组细胞 ( $3 \times 10^6$ /组), PBS 洗二次, 2 kr/min 离心 5 min, 去除 PBS, 沉淀细胞中加入 50  $\mu$ L 冰冷裂解液和 0.5  $\mu$ L DTT, 吹打, 冰上裂解 60 min, 期间涡旋 4 次, 每次 10 s, 4  $^{\circ}$ C 10 kr/min 离心 1 min, 吸取上清至新管中置冰上, 测蛋白浓度, 各组采用同样蛋白量进行实验, 加入 50  $\mu$ L 的 2  $\times$  Reaction Buffer 和 0.5  $\mu$ L DTT, 加入 5  $\mu$ L Caspase-3 Substrate 并于

37  $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h, 分光光度计在 400 nm 波长测定其吸光值, 计算 OD 诱导剂/OD 阴性对照确定各组 caspase-3 活化程度。

### 1.8 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 分析方法采用单因素方差分析, SNK 法两两比较,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 荧光显微镜形态学观察

正常细胞核染色质结构正常, 呈均匀绿色荧光, 凋亡细胞由于失去膜整合性、染色质凝聚和核裂解, 胞核致密浓染, 呈结节状、新月形等多种形态, 凋亡细胞呈致密黄绿色斑点 (图 1)。

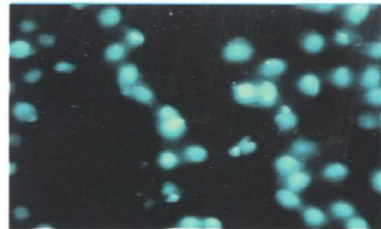


图 1. 吖啶橙染色 ( $\times 400$ )

### 2.2 TUNEL 分析 ghrelin 对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响

细胞阳性反应为细胞核呈棕黄色深染, 细胞浆中也可见弱阳性表达 (图 2)。通过 TUNEL 阳性细胞百分比定量表达凋亡细胞数量, 与对照组相比, 细胞在高糖中培养 72 h 明显增加 TUNEL 阳性细胞数, 然而, 当用 ghrelin 预处理 ( $10^{-7}$  mol/L) 24 h 后加入高糖作用 72 h, 凋亡率明显下降 (表 1)。

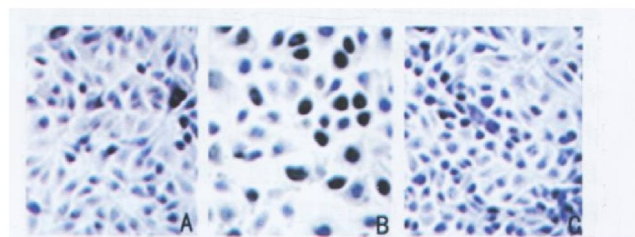


图 2. TUNEL 染色分析 ghrelin 对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响 A 为对照组, B 为高糖组, C 为高糖加 ghrelin 预处理组。

### 2.3 流式细胞仪分析凋亡百分比

与对照组相比, 高糖培养 72 h 后明显增加内皮细胞凋亡率, 而 ghrelin ( $10^{-7}$  mol/L) 预处理 24 h 后加入高糖作用 72 h, 凋亡率明显下降 (表 2)。

表 1. TUNEL 分析 ghrelin 对高糖诱导的 ECV-304 凋亡的影响

分 组	n	凋亡率
对照组	3	2.16% ± 0.09%
高糖组	3	6.91% ± 1.27% <sup>a</sup>
ghrelin 处理组	3	2.86% ± 0.16% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.001$ , 与高糖组比较。

表 2. 流式细胞仪分析 ghrelin 对高糖诱导的 ECV-304 凋亡率的影响

分 组	n	凋亡率
对照组	3	0.69% ± 0.16%
高糖组	3	4.03% ± 0.12% <sup>a</sup>
ghrelin 处理组	3	0.94% ± 0.29% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.001$ , 与高糖组比较。

#### 2.4 ghrelin 对高糖诱导的 caspase-3 活性的影响

高糖呈时间依赖方式诱导内皮细胞 caspase-3 活性增加, 不同浓度 ghrelin 预处理 24 h 后, 加入高糖与未预处理组比较活性减低(表 3)。

表 3. ghrelin 对高糖诱导的 ECV-304 caspase-3 活性的影响

分 组	24 h	48 h	72 h
对照组	1.217 ± 0.018	1.290 ± 0.055	1.325 ± 0.036
高糖组	1.593 ± 0.066 <sup>a</sup>	1.735 ± 0.055 <sup>ac</sup>	1.858 ± 0.038 <sup>ad</sup>
ghrelin 处理组	1.326 ± 0.049 <sup>b</sup>	1.339 ± 0.047 <sup>b</sup>	1.393 ± 0.018 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.001$ , 与高糖组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与高糖组 24 h 比较; d 为  $P < 0.05$ , 与高糖组 48 h 比较。

### 3 讨论

血糖升高是糖尿病大血管并发症的危险因素<sup>[4]</sup>, 高糖可以导致多种形式的血管内皮细胞功能失调, 其中内皮细胞凋亡被认为与糖尿病相关的动脉粥样硬化加重有关<sup>[5]</sup>。本实验证明在高糖环境下酰基化 ghrelin 具有抗内皮细胞凋亡的作用并减弱高糖诱导的凋亡相关蛋白 caspase-3 活性。

Ghrelin 是新近发现的一个含有 28 个氨基酸的多肽, 与能量平衡、生长激素及胰岛素分泌等相关, 其 N 末端 3 位丝氨酸有脂肪酸链( $C_7H_{15}CO$ )修饰, 此酰基化被认为是 ghrelin 发挥其功能的活性结构<sup>[6]</sup>。ghrelin 的酰基化为翻译后修饰, 是目前发现的唯一的翻译后修饰的天然多肽。近来的研究表明 ghrelin

在心衰和炎症方面发挥了重要的作用, 因此目前研究的热点是关于其在心血管方面, 尤其是在动脉粥样硬化相关疾病中的作用。

本实验证明高糖可以诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡以及可以增加凋亡相关蛋白 caspase-3 活性, 与以往研究相符<sup>[7]</sup>, 而且进一步证明用酰基化 ghrelin 预处理后可以抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡, 并且能够降低 caspase-3 活性, 说明酰基化 ghrelin 能够抑制高糖环境下的内皮细胞凋亡。

因为 ghrelin 的受体(GHS-R1a)在全身多处广泛存在, 包括在内皮细胞, 所以对于 ghrelin 功能的研究包括很多方面, 以往认为可以结合 GHS-R1a 的酰基化 ghrelin 是发挥功能所必需, 而非酰基化 ghrelin 不具有内分泌活性, 但是近来研究发现非酰基化 ghrelin 同样具有生物功能<sup>[1]</sup>。本实验未检测非酰基化 ghrelin 的作用, 但是对于体内水平远远高于其酰基化的非酰基化的 ghrelin, 其作用特别是独立于心血管方面的研究就显得尤其重要了, 可能在心血管组织中存在某种针对非酰基化 ghrelin 的未被发现的受体。

本实验结果表明酰基化 ghrelin 可能具有潜在的阻止动脉粥样硬化加重的作用, 而对于其具体通过何种途径抑制内皮细胞凋亡有待于深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, et al. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta cells and human islets: involvement of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling [J]. *Endocrinology*, 2007, **148** (2): 512-529.
- [2] Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, **18** (9): 2291-301.
- [3] Chung H, Kim E, Lee DH, Seo S, Ju S, Lee D, et al. Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation [J]. *Endocrinology*, 2007, **148** (1): 148-159.
- [4] 卢雪玲, 谢自敬, 王宁, 王薇彬, 阿依努尔. 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化若干危险因素分析[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (5): 426-429.
- [5] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zucchi G, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, **22** (3): 198-203.
- [6] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, **402** (6762): 656-660.
- [7] 华君益, 曾智, 胥昀, 黄兆铨. 高浓度葡萄糖促脂质氧化效应及其与低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞凋亡的协同作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 135-138.

(此文编辑 李小玲)