

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0089-04

• 实验研究 •

高葡萄糖在正常氧及缺氧条件下对乳鼠心肌细胞存活与凋亡的不同影响

周艳芳, 郑晓伟, 齐国先

(中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 100011)

[关键词] 内科学; 高葡萄糖; 乳鼠心肌细胞; 缺氧; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨高葡萄糖在正常氧及缺氧条件下对乳鼠心肌细胞存活与凋亡的影响。方法 原代培养乳鼠心肌细胞, 予 33 mmol/L 葡萄糖培养基分别在正常氧及缺氧培养条件培养, 同时以 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基培养作为对照, 氯化钴模拟缺氧环境, 台盼兰染色检测细胞存活力, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记技术和 Annexin V-PI 双染法流式细胞仪检测心肌细胞凋亡。结果 正常氧条件下, 33 mmol/L 葡萄糖时较 5.5 mmol/L 葡萄糖时乳鼠心肌细胞存活率低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率高 ($P < 0.01$); 缺氧条件下, 与 5.5 mmol/L 葡萄糖浓度时比较, 33 mmol/L 葡萄糖浓度时, 心肌细胞存活率增高 ($P < 0.01$), 凋亡率降低 ($P < 0.05$)。结论 在正常氧条件下, 高葡萄糖诱导乳鼠心肌细胞凋亡。氯化钴模拟缺氧条件下, 高葡萄糖在乳鼠心肌细胞凋亡损伤中发挥保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Different Effects of Hyperglycemia on Normoxia and Hypoxia Cardiomyocyte Apoptosis

ZHOU Yan-Fang, ZHENG Xiao-Wei, and QI Guo-Xian

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 100011, China)

[KEY WORDS] Medicine; Hyperglycemia; Neonatal Rat Cardiac Myocytes; Hypoxia; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of hyperglycemia on normoxia and hypoxia apoptosis in primary neonatal rat cardiac myocytes. **Methods** To culture the primary neonatal rat cardiac myocytes and exposure to normoxia and hypoxia environment in medium containing 33 mmol/L glucose and 5.5 mmol/L glucose (control). The hypoxia environment was achieved by treating cells with cobalt chloride. Cell viability was measured by Trypan blue staining. Cardiomyocyte apoptosis was detected with terminal deoxynucleotidyl transferase biotin dUTP nick end labeling and Annexin V/PI binding assay. **Results** In 33 mmol/L glucose group cell survival rate was lower ($P < 0.01$) and apoptosis rate was higher ($P < 0.01$) than those in 5.5 mmol/L glucose group in normoxia condition. However, in hypoxia condition, cell survival rate was higher ($P < 0.01$) and apoptosis rate was lower ($P < 0.05$) in 33 mmol/L glucose group than those in 5.5 mmol/L glucose group. **Conclusion** In cultured primary neonatal rat cardiac myocytes, hyperglycemia induced apoptosis in normoxia condition. However, hyperglycemia plays an anti-apoptotic protective role in cobalt chloride mimic chemical hypoxia condition.

心肌细胞凋亡是冠心病发生发展及不良预后的重要病理基础之一。冠心病合并糖尿病或者心肌梗死后发生应激性高血糖症患者病情严重程度增加, 且预后不佳。诸多研究证明高葡萄糖诱发心肌细胞凋亡^[1-3]。然而, 有动物模型显示在缺血诱导的损伤包括凋亡过程中, 高葡萄糖发挥保护作用^[4]。因此, 可能高葡萄糖在正常氧和缺氧情况下对心肌细胞凋亡的影响不同, 因此本研究对原代培养的乳鼠心肌细胞中高葡萄糖在正常氧情况下及缺氧情况下对细胞存活与凋亡的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

出生 1~2 天的 Wister 大鼠(中国医科大学实验动物中心), 雌雄不限; 胰蛋白酶、氯化钴和台盼兰 (Sigma 公司), DMEM/F12、DMEM 低糖培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (中国科学院天津海洋生物公司), 抗 α -actin (武汉博士德公司), TUNEL-POD 原位凋亡检测试剂盒 (Roche 公司), Annexin V/PI 试剂盒 (北京宝赛公司)。

1.2 乳鼠心肌细胞培养及鉴定

取出生 1~2 天的 Wister 大鼠 30 只, 消毒, 无菌剪取心脏, 预冷的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2-7.4) 洗涤, 剪碎, 0.1% 胰蛋白酶于 37℃、80 r/min 磁力搅拌消化 5 min, 重复 10-12 次, 除首次外各次消化后上清移入 10% 胎牛血清-DMEM/F12 中终止消化, 1 000

[收稿日期] 2007-09-21 [修回日期] 2008-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30500212)

[作者简介] 周艳芳, 博士研究生, 研究方向缺血性心脏病, E-mail 为 xyjz4@sina.com。通讯作者齐国先, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向缺血性心脏病, E-mail 为 qgx2002@medmail.com.cn。郑晓伟, 博士, 主治医师, 研究方向缺氧诱导因子与缺血性心脏病, E-mail 为 xiaoweizheng2005@yahoo.com.cn。

r/min、20℃离心5 min,重悬细胞。将收集到的所有细胞悬液用200目不锈钢滤网过滤,再离心,以含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬细胞,采用差速贴壁法以 1×10^9 /L接种于培养皿中,37℃、5%CO₂培养2 h,去除先贴壁的非心肌细胞,把含有心肌细胞的细胞悬液重新调整细胞浓度至 5×10^8 /L,移入新的培养瓶及盛有多聚赖氨酸包被盖玻片的培养皿中,培养3 d,待鉴定及进一步实验使用。采用抗 α -actin抗体免疫组化染色鉴定心肌细胞。

1.3 高葡萄糖及缺氧培养

培养3天的心肌细胞换含10%胎牛血清的低糖型DMEM(含5.5 mmol/L葡萄糖)培养12 h达到起始条件等同。换葡萄糖浓度5.5 mmol/L、33 mmol/L的DMEM,分别在正常氧(21% O₂, 5% CO₂, 37℃)及氯化钴模拟缺氧(氯化钴浓度200 μ mol/L)条件下培养24 h。

1.4 台盼兰染色检测细胞存活力

参照文献[4],细胞在含0.4%台盼兰的培养基中孵育3 min,用95%乙醇固定8 min,光镜下观察,据死细胞胞质兰染,活细胞不着色,随机选择5~6个视野,计数200个细胞,计算细胞存活率。

1.5 细胞凋亡检测

末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP切口末端标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase biotin dUTP nick end labeling, TUNEL)检测细胞凋亡:细胞爬片以4%多聚甲醛室温固定1 h, PBS洗3次,3% H₂O₂-甲醇室温10 min,灭活内源性过氧化物酶, PBS洗3次,0.1% Triton X-100冰上2 min细胞打孔, PBS洗3次,加50 μ L反应混合物,盖盖玻片,湿盒37℃避光孵育60 min,阳性对照加反应混合物孵育前用1000 ku/L的DNase iv处理。阴性对照片只加反应混合物中的Label Solution进行孵育。孵育后PBS洗3次,加50 μ L Covert-POD,该盖玻片,湿盒37℃避光孵育30 min, PBS洗3次, DAB显色,苏木素复染、脱水、透明、封片。光镜下($\times 400$)观察并摄片。TUNEL阳性染色信号定位于心肌细胞核内,呈棕黄色~棕红色。分别随机选择5~6个视野,计数凋亡和正常细胞核数(共计数200个),计算心肌细胞凋亡率。

Annexin V/PI的流式细胞仪检测:用预冷PBS洗涤收集每管 5×10^8 /L细胞,用200 μ L结合缓冲液重悬,加入Annexin V 10 μ L,避光4℃反应30 min,加PI 5 μ L,再补加300 μ L结合缓冲液,流式细胞仪检测。

1.6 统计学处理

用SPSS10.0统计软件进行统计分析。计数资

料以率表示,两组间比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞特征

心肌细胞在分离培养3~4 h开始贴壁生长,倒置显微镜下观察细胞由圆形变为梭形或多角形,约12~18 h后可见单个细胞搏动,搏动次数50~70次/分,72 h细胞贴壁牢固,胞质突起呈伪足状,向细胞周围呈放射状生长,细胞形态呈梭形,不规则三角形或多边形,中间可见细胞核,搏动频率50~100次/分,规则,局部同步。免疫组织化学显示95%以上细胞为 α -actin阳性,胞质见棕黄色细丝状、颗粒状着色(图1)。

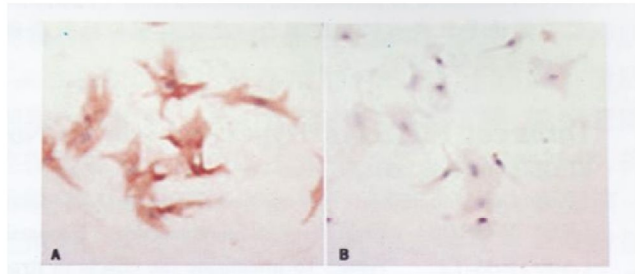


图1. 免疫组织化学鉴定心肌细胞($\times 400$) A为 α -actin染色阳性, B为空白对照组。

2.2 细胞存活率比较

在正常氧条件下,葡萄糖浓度5.5 mmol/L时,心肌细胞存活率为95%;葡萄糖浓度33 mmol/L时,心肌细胞存活率为87%,较葡萄糖浓度5.5 mmol/L时降低8%($P < 0.01$);氯化钴模拟缺氧条件下,葡萄糖浓度5.5 mmol/L时,心肌细胞存活率为70%,葡萄糖浓度33 mmol/L时,心肌细胞存活率为83%,较葡萄糖浓度5.5 mmol/L时升高13%($P < 0.01$)。

2.3 细胞凋亡率比较

正常氧条件下,葡萄糖浓度5.5 mmol/L时,少量心肌细胞凋亡,凋亡率为13%;葡萄糖浓度33 mmol/L时,凋亡心肌细胞明显增加,凋亡率升至29%,较葡萄糖浓度5.5 mmol/L时增加16%($P < 0.01$)。200 μ mol/L氯化钴模拟缺氧条件下,葡萄糖浓度5.5 mmol/L时,较多心肌细胞发生缺氧凋亡,凋亡率高达45%;葡萄糖浓度33 mmol/L时,心肌细胞凋亡率为34%,较葡萄糖浓度5.5 mmol/L时降低11%($P < 0.05$;图2)。

在正常氧条件下,33 mmol/L葡萄糖时心肌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及死细胞率均高于5.5 mmol/L葡萄糖时($P < 均 0.01$),活细胞率较5.5

mmol/L 葡萄糖时低 ($P < 0.01$); 而缺氧条件下, 33 mmol/L 葡萄糖时细胞的早期凋亡率较 5.5 mmol/L 葡萄糖时显著降低 ($P < 0.01$), 晚期凋亡率较 5.5 mmol/L 葡萄糖时高 ($P < 0.01$), 但总的细胞凋亡率仍显著低于 5.5 mmol/L 葡萄糖时 ($P < 0.01$), 33

mmol/L 葡萄糖时活细胞率显著高于 5.5 mmol/L 葡萄糖时 ($P < 0.01$)。在所采用实验条件下各组细胞凋亡均以早期凋亡为主, 晚期凋亡及死亡细胞数量甚微小或无 (图 3, 表 1)。

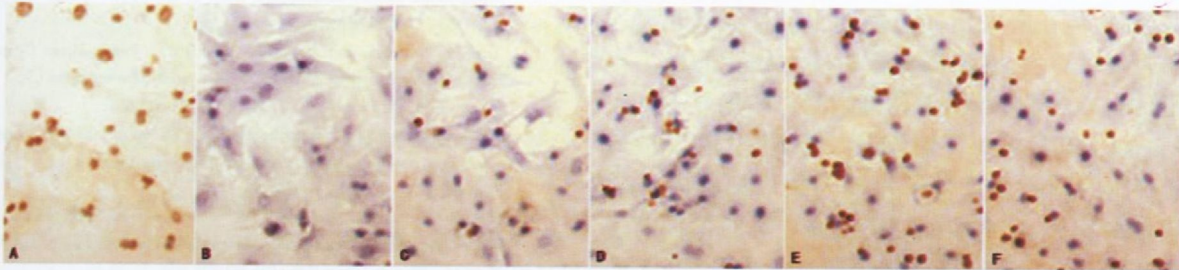


图 2. 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记染色结果 ($\times 400$) A 为阳性对照 (DNase I 处理), B 为阴性对照, C 为正常氧 5.5 mmol/L 葡萄糖, D 为正常氧 33 mmol/L 葡萄糖, E 为缺氧 5.5 mmol/L 葡萄糖, F 为缺氧 33 mmol/L 葡萄糖。

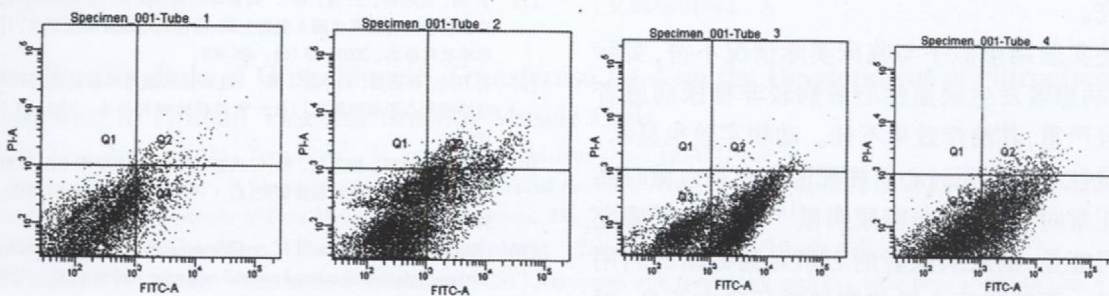


图 3. Annexin V/PI 的流式细胞仪检测结果 1 为正常氧 5.5 mmol/L 葡萄糖, 2 为正常氧 33 mmol/L 葡萄糖, 3 为缺氧 5.5 mmol/L 葡萄糖, 4 为缺氧 33 mmol/L 葡萄糖。

表 1. Annexin V/PI 流式细胞仪检测结果

葡萄糖浓度	正常氧				缺氧			
	活细胞率	早期凋亡率	晚期凋亡率	死细胞率	活细胞率	早期凋亡率	晚期凋亡率	死细胞率
5.5 mmol/L	89.9%	8.2%	1.8%	0.1%	54.9%	44%	1.1%	0%
33 mmol/L	74.5% ^a	18.0% ^a	7.2% ^a	0.4% ^a	67.6% ^a	29.9% ^a	2.4% ^a	0%

a 为 $P < 0.01$, 与 5.5 mmol/L 葡萄糖组比较。

3 讨论

不同细胞对高葡萄糖的反应多种多样, 但最终都导致功能改变, 常引起细胞死亡^[5]。在心脏组织, 长期慢性高血糖可引起细胞凋亡等, 导致糖尿病心肌病, 心功能受损^[6]。氧化应激是高葡萄糖引起细胞损伤的主要机制之一, 在人脐静脉内皮细胞, 高葡萄糖引起细胞内活性氧生成和凋亡增加^[7]。有研究显示过氧化氢可诱导心肌细胞凋亡^[8], 目前认为高

葡萄糖也通过氧化应激引起心肌细胞凋亡。然而, 在缺氧条件下, 心肌细胞能量代谢途径与在正常氧条件下不同, 在缺氧时, 其代谢强烈依靠无氧糖酵解, 需要更多的葡萄糖供给, 因此, 与正常氧条件比较, 高葡萄糖在缺氧时可能产生不同的影响。有实验提示无氧糖代谢的增强在保持缺血心肌细胞存活中可能起着关键的作用^[9]。本实验台盼兰及 TUNEL 染色结果显示, 在正常氧条件下, 33 mmol/L 葡萄糖培养基培养 24 h 时较 5.5 mmol/L 葡萄糖时心肌细胞

存活率下降 8%, 细胞凋亡率增加 16%, 而在氯化钴模拟缺氧 24 h 条件下, 33 mmol/L 葡萄糖则使心肌细胞存活力增加 13%, 细胞凋亡率由 5.5 mmol/L 葡萄糖时的 45% 降至 34%, 降低 11%。该结果与国外学者的研究结果一致。本实验 Annexin V/PI 的流式细胞仪检测结果也基本与前述结果一致, 虽见缺氧 33 mmol/L 葡萄糖时细胞晚期凋亡率高于 5.5 mmol/L 葡萄糖时, 但在所采用实验条件下各组细胞凋亡均以早期凋亡为主, 晚期凋亡仅占凋亡细胞的极小比例, 33 mmol/L 葡萄糖时总的细胞凋亡率仍显著低于 5.5 mmol/L 葡萄糖时。葡萄糖降低缺氧及化学模拟缺氧细胞的凋亡及死亡率可能与缺氧细胞内 Ca^{2+} 降低 40% 相关, 葡萄糖处理还可介导心肌保护因子 Bcl-1 升高^[4, 10]。还有研究显示高血糖妨碍 HIF-1 的功能, 用蛋白酶体和脯氨酸羟化酶抑制剂的实验显示高血糖抑制缺氧诱导的缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 蛋白稳定^[11], 而 HIF-1 α 可能通过转录激活促凋亡蛋白基因参与心肌细胞缺氧凋亡, 本课题会继续就此进行研究。

上述实验结果似乎与临床实际情况不符, 实际上, 糖尿病患者发生缺血性心脏病较非糖尿病患者常见而且严重, 其治疗效果不佳。动物实验也显示, 糖尿病鼠在心肌梗死时心肌梗死面积在高血糖时高于血糖正常时, 也高于非糖尿病鼠^[12]。这种矛盾究其原因可能是, 糖尿病患者的对葡萄糖的利用存在异常。而糖尿病心肌的侧枝循环建立不良, 对代谢糖酵解产生的酸性代谢产物的清除率低下, 也会造成心肌细胞进一步损害加重^[13]。本实验结果也再次证明代谢疗法治疗缺血性心脏病有重要意义, 在缺血性心脏病心肌梗死治疗中给予 GIK 等代谢治疗, 通过增加心肌葡萄糖摄取, 对于缺血心肌的代谢起到积极的调节和保护作用, 这有助于改善心

功能并降低急性心肌梗死早期的死亡率。

总之, 本研究结果证实, 在正常氧条件下, 高葡萄糖诱导大鼠心肌细胞凋亡, 氯化钴模拟缺氧条件下, 高葡萄糖在心肌细胞凋亡损伤中发挥保护作用。

[参考文献]

- [1] Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia induced cardiomyocyte death in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, **37** (5): 959-968.
- [2] Yukitaka Shizakuda, Reyland ME, Buttrick PM. Protein kinase C modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **282** (5): H1 625-634.
- [3] Malhotra A, Kang BP, Hashmi S, et al. PKCepsilon inhibits the hyperglycemia induced apoptosis signal in adult rat ventricular myocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, **268** (1-2): 169-173.
- [4] Schaffer SW, Croft CB, Solodushko V. Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **278** (6): H1 948-954.
- [5] Allen DA, Yaqob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications [J]. *J Nutr Biochem*, 2005, **16** (12): 705-713.
- [6] Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, et al. Hyperglycemia inhibits capacitance calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (12): 3 461-467.
- [7] 丁莉, 屈顺林, 王蕾, 等. 高葡萄糖刺激血管内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调、活性氧增加及细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (6): 405-409.
- [8] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路诱导心肌细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 185-188.
- [9] 龚菁, 李立环, 裴卫东, 等. 犬急性心肌缺血早期心肌葡萄糖、脂肪酸代谢相关酶变化的初步研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, **34** (6): 546-550.
- [10] Ricky Malhotra, Brosius III FC. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (18): 12 567-575.
- [11] Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, et al. Hyperglycemia regulates hypoxia inducible factor 1 α protein stability and function [J]. *Diabetes*, 2004, **53** (12): 3 226-232.
- [12] Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, et al. Acute Hyperglycemia Induces Nitrotyrosine Formation and Apoptosis in Perfused Heart From Rat [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (4): 1 076-082.
- [13] 殷仁富, 陈金明. 心脏能量学—代谢与治疗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002; 204.

(此文编辑 陈临溪)