

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0523-04

• 实验研究 •

球状脂联素抑制波动性高血糖诱导人脐静脉内皮细胞凋亡与脂联素受体 1 有关

赵宏宇¹, 伊桐凝², 张锦²

(中国医科大学 1 附属盛京医院急诊科, 2 附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 细胞凋亡; 人脐静脉内皮细胞; 脂联素受体 1; 波动性高血糖; 球状脂联素

[摘要] 目的 探讨球状脂联素在抑制波动性高血糖诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的机制。方法 不同条件下体外培养人脐静脉内皮细胞 5 天。实验分为对照组(葡萄糖 5.5 mmol/L)、高糖组(葡萄糖 25 mmol/L)、葡萄糖交替组(葡萄糖 5.5/25 mmol/L, 每 8 h 更换培养液一次)、高渗组(甘露醇 25 mmol/L)和高渗交替组(甘露醇 5.5/25 mmol/L, 每 8 h 更换培养液一次)。葡萄糖交替组中部分细胞用不同浓度(0.0, 5.0 和 3 mg/L)球状脂联素干预, 用脂联素受体 1 特异性小干扰 RNA 作用内皮细胞。采用流式细胞仪检测细胞凋亡及 RT-PCR 检测脂联素受体 1 和受体 2 的 mRNA 表达。结果 与对照组比较, 高糖组和葡萄糖交替组细胞凋亡明显增加, 脂联素受体 1 mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$)。与高糖组比较, 葡萄糖交替组细胞凋亡显著增加, 脂联素受体 1 mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$)。不同浓度(0.0, 5.0 和 3 mg/L)球状脂联素作用内皮细胞, 发现 3 mg/L 球状脂联素能显著抑制内皮细胞凋亡($P < 0.01$), 并能显著拮抗波动性高血糖诱导的脂联素受体 1 mRNA 表达的下降($P < 0.01$)。不同组间内皮细胞脂联素受体 2 mRNA 表达差异无显著性。sRNA 作用内皮细胞后球状脂联素这种抑制凋亡作用显著减弱($P < 0.01$)。结论 与持续性高血糖条件比较, 波动性高血糖显著降低人脐静脉内皮细胞脂联素受体 1 mRNA 的表达, 而对脂联素受体 2 mRNA 的表达无影响。球状脂联素可能通过脂联素受体 1 拮抗波动性高血糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Fluctuated Hyperglycemia Is Associated with Adiponectin Receptor-1

ZHAO Hong-Yu¹, YI Tong-Ning², and ZHANG Jin²

(1. Emergency Department of Shengjing Hospital, 2. Endocrinology Department of First Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[KEY WORDS] Cell Apoptosis; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Adiponectin Receptor-1; Fluctuated High Glucose; Globular Adiponectin

[ABSTRACT] **Aim** To study the mechanism of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) apoptosis induced by fluctuated hyperglycemia. **Methods** HUVEC were cultured in different conditions: control group, high glucose group, alternating high glucose group, high osmotic group, and alternating high osmotic group. Alternating high glucose groups were affected by different concentrations of globular adiponectin (gAD), or by small interfering RNA (sRNA).

Annexin (V)-FITC/PI double staining was used to detect apoptosis. RT-PCR was used to detect adiponectin receptor 1 (AdipoR1) mRNA and adiponectin receptor 2 (AdipoR2) mRNA.

Results Compared with control group, cells apoptosis was increased, and expression of AdipoR1 mRNA was decreased in both high glucose group and alternating high glucose group ($P < 0.01$). Cells apoptosis was increased, and expression of AdipoR1 mRNA was decreased in alternating high glucose group compared with high glucose group ($P < 0.01$). 3 mg/L gAD protected against cell apoptosis compared with groups without gAD ($P < 0.01$). gAD counteracted the decreasing expression of AdipoR1 mRNA induced by fluctuated hyperglycemia ($P < 0.01$). But expression of AdipoR2 mRNA had no difference among them.

Conclusion That gAD protected cell apoptosis induced by fluctuated hyperglycemia is associated with AdipoR1, but is not associated with AdipoR2.

高血糖对糖尿病患者血管的病理作用可能主要

有两种方式, 即慢性持续性高血糖与慢性波动性高血糖^[1]。二者对血管内皮细胞等的损伤是糖尿病患者发生动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等各种并发症的主要原因。近年来, 许多研究表明波动性高血糖相对于持续性高血糖更能促进糖尿病患者慢性血管并发症的发生与发展。内皮细胞凋亡过度是

[收稿日期] 2010-05-04 [修回日期] 2010-07-05

[作者简介] 赵宏宇, 博士, 讲师, 研究方向为糖尿病大血管病。伊桐凝, 博士, 医师, 研究方向为糖尿病大血管病。通讯作者张锦, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病大血管病, Email为: zhangjinninsy@gmail.com。

As的病理学基础,加速的As是糖尿病主要的血管并发症,而血管并发症是糖尿病致死、致残的主要原因。在脂肪细胞分泌的具有生物活性的一类蛋白质因子中,脂联素是脂肪组织基因表达最丰富的蛋白质产物之一,大量存在于血液循环中,它有抗炎、抗动脉硬化和抗糖尿病等作用,是抑制心血管疾病的重要因子。本实验以不同条件下体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象,探讨球状脂联素(globular adiponectin, gAD)在抑制波动性高血糖诱导HUVEC凋亡中的机制,为防治As提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

碘化丙啶(propidium iodide, PI)购于Sigma公司;RPMI1640细胞培养基和Trizol试剂购于Gibco公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购于BD公司;dNTP(脱氧核苷三磷酸)购于北方生物技术有限公司;Trizol Reagent and Systems总RNA抽提试剂盒购于TaKaRa公司;Taq DNA多聚酶和RNA酶购于Promega公司;参照文献设计脂联素及内参β-actin引物,由沈阳联星生物技术有限公司合成;逆转录试剂盒购于Roche公司;特异性小干扰RNA(sRNA)由上海吉玛制药有限公司合成。超净工作台购于苏州净化设备厂;细胞培养箱购于美国NuAire公司Nu4500E;PCR仪购于Perkin Elmer公司;计算机图像分析仪购于日本LUZEX-F;流式细胞仪为美国FACSCAN BD型。

1.2 细胞培养

RPMI1640细胞培养基培养HUVEC,细胞常规在37℃、5% CO₂、100%湿度的孵箱中培养。

1.3 实验分组

实验分为对照组(葡萄糖5.5 mmol/L)、高糖组(葡萄糖25 mmol/L)、葡萄糖交替组(葡萄糖5.5/25 mmol/L,每8 h更换培养液一次)、高渗组(甘露醇25 mmol/L+葡萄糖5.5 mmol/L)和高渗交替组(甘露醇5.5/25 mmol/L+葡萄糖5.5 mmol/L,每8 h更换培养液一次)。每组细胞均培养5天。本实验是渐进式进行的,根据实验设计,葡萄糖交替组又分为多个亚组,每个亚组分别用不同因素作用,即用不同浓度(0.05、1.0和3 mg/L)gAD干预或用脂联素受体1(adiponectin receptor 1, AdipoR1)特异性小干扰RNA(sRNA)作用内皮细胞或3 mg/L gAD

联合AdipoR1 sRNA作用内皮细胞。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

凋亡率用Annexin V-FITC/PI试剂盒测定。用去离子水按1:4稀释结合缓冲液,用4℃预冷的PBS洗细胞1次,用稀释好的结合缓冲液重悬细胞,调整其浓度为 1×10^9 /L。取100 μL细胞悬液于5 mL流式管底,加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI(10 μg/L),轻轻混匀。室温避光孵育15 min。在反应管中加入400 μL稀释好的结合缓冲液,1 h内上机检测早期凋亡细胞数。用CELL Quest软件对结果散点图进行分析。右下象限Annexin V(+)/PI(-)为凋亡细胞。

1.5 RT-PCR检测脂联素受体1和2 mRNA的表达

收集各组细胞,加入Trizol等提取RNA,紫外分光光度法测定RNA浓度及纯度,常规进行RT-PCR,1.5%琼脂糖电泳,自动凝胶成像分析仪下观察拍照。用Phoretix 1D V2003.02软件分析图像,以GAPDH为内参参照计算目的基因的相对表达。AdipoR1上游引物为5'-TCC TAA GCA CCG GCA GAC AAG-3',下游引物为5'-CTT GAC AAA GCC CTC AGC GAT AGT A-3'; AdipoR2上游引物为5'-GCA CTA TGT CAT CTC GGA GGG-3',下游引物为5'-GCC ATC AGC ATC AAC CAG C-3'; GAPDH上游引物为5'-GCA CCG TCA AGG CTG AAC-3',下游引物为5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'。两步法PCR扩增反应,95℃ 10 s 1个循环周期,95℃ 5 s和60℃ 34 s交替40个循环周期。在PCR检测系统的Data Analysis模块对实验数据进行分析 and 修正。

1.6 统计学处理

采用SPSS11.5软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较多组间差异,SNK- η 检验两组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测不同条件下人脐静脉内皮细胞的凋亡

与对照组比较,高糖组和葡萄糖交替组细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$),而高渗组和高渗交替组细胞凋亡率无显著改变($P > 0.05$)。与高糖组比较,葡萄糖交替组细胞凋亡率增加更显著($P < 0.01$;图1和表1)。

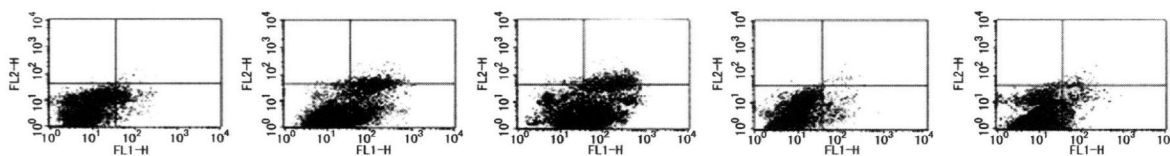


图 1 Annexin V-FITC/PI双染检测不同条件下细胞凋亡 (n = 3) 从左到右依次为对照组、高糖组、葡萄糖交替组、高渗组和高渗交替组。

表 1. 不同条件下人脐静脉内皮细胞的凋亡情况 (n = 3)

分 组	凋 亡 率
对照组	4.53% ± 1.64%
高糖组	22.66% ± 1.27% ^a
葡萄糖交替组	40.66% ± 1.27% ^{ab}
高渗组	4.49% ± 0.67%
高渗交替组	5.50% ± 0.47%

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与高糖组比较。

2.2 不同浓度球状脂联素干预对波动性高血糖导致的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

与对照组比较, 葡萄糖交替组各亚组细胞凋亡率均显著增加 ($P < 0.01$)。在不同浓度 gAD 干预下, 细胞凋亡率均有所下降, 但只有 3 mg/L gAD 干预下才明显抑制 HUVEC 凋亡 ($P < 0.01$; 图 2 和表 2)。

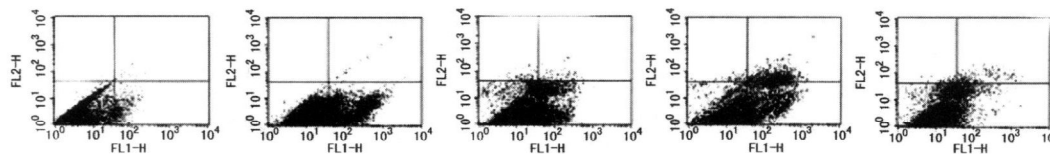


图 2 Annexin V-FITC/PI双染检测不同浓度球状脂联素作用下人脐静脉内皮细胞凋亡 (n = 3) 从左到右依次为对照组、葡萄糖交替组、0.5 mg/L gAD 干预组、1.0 mg/L gAD 干预组和 3.0 mg/L gAD 干预组。

表 2 不同浓度球状脂联素作用对波动性高血糖导致的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 (n = 3)

分 组	凋 亡 率
对照组	5.20% ± 0.47%
葡萄糖交替组	37.69% ± 1.24% ^a
0.5 mg/L gAD 干预组	36.28% ± 0.78% ^a
1.0 mg/L gAD 干预组	35.94% ± 0.59% ^a
3.0 mg/L gAD 干预组	15.02% ± 1.55% ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与葡萄糖交替组比较。

2.3 RT-PCR 检测脂联素受体 1 和 2 mRNA 的表达

与高糖组比较, 葡萄糖交替组 AdipoR1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与葡萄糖交替组比较, 3 mg/L gAD 能显著拮抗波动性高血糖诱导的 AdipoR1 mRNA 下降 ($P < 0.01$)。各组间内皮细胞 AdipoR2 mRNA 表达差异无显著性 (图 3 和表 3)。

2.4 脂联素受体 1 特异性小干扰 RNA 干预下人脐静脉内皮细胞凋亡变化

葡萄糖交替组中部分细胞分别用 gAD、AdipoR1

sRNA 作用内皮细胞或二者联合作用内皮细胞, 发现各组细胞凋亡率均比对照组显著增加 ($P < 0.01$)。与葡萄糖交替组比较, 3 mg/L gAD 干预能显著抑制 HUVEC 凋亡 ($P < 0.01$), 但 gAD 这种抑制凋亡作用在联合 AdipoR1 sRNA 作用时显著减弱 ($P < 0.01$); 单纯 AdipoR1 sRNA 干预内皮细胞凋亡与葡萄糖交替组无显著差异 (图 4 和表 4)。

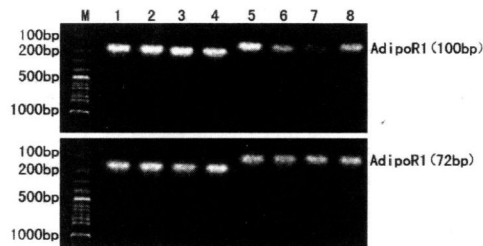


图 3 RT-PCR 检测 AdipoR1 和 AdipoR2 的 mRNA 表达 M 为 Marker 1~4 为内参 GAPDH, 5 为对照组, 6 为高糖组, 7 为葡萄糖交替组, 8 为 3 mg/L gAD 干预组。

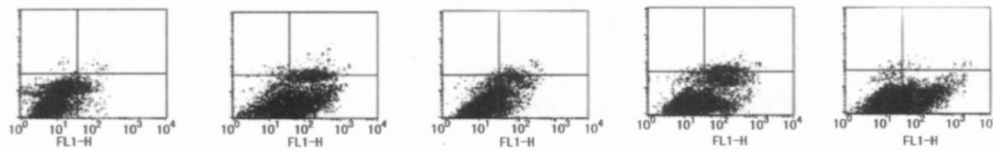


图 4 AdipoR1 sRNA 干预对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 ($n=3$) 从左到右依次为对照组、葡萄糖交替组、3.0 mg/L gAD 干预组、3.0 mg/L gAD 联合 AdipoR1 sRNA 组和 AdipoR1 sRNA 组。

表 3 AdipoR1 和 AdipoR2 的 mRNA 表达 ($n=3$)

分 组	AdipoR1	AdipoR2
对照组	0.989 ± 0.002	0.931 ± 0.000
高糖组	0.463 ± 0.006 ^a	0.933 ± 0.015
葡萄糖交替组	0.293 ± 0.012 ^a	0.933 ± 0.015
3 mg/L gAD 干预组	0.610 ± 0.017 ^{ab}	0.933 ± 0.006

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与葡萄糖交替组比较。

表 4 AdipoR1 sRNA 干预对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 ($n=3$)

分 组	凋亡率
对照组	5.95 ± 0.51
葡萄糖交替组	39.36 ± 1.17 ^a
3.0 mg/L gAD 干预组	15.64 ± 1.71 ^{ab}
gAD + AdipoR1 sRNA 组	29.31 ± 1.42 ^{ac}
AdipoR1 sRNA 组	38.78 ± 0.78 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与葡萄糖交替组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 3.0 mg/L gAD 干预组比较。

3 讨论

人脐静脉内皮细胞的凋亡与糖尿病心血管并发症的发展密切相关。近年来越来越多的研究表明,与恒定的高血糖条件相比,在波动性高血糖条件下,细胞的凋亡更加显著^[2]。相对于恒定性高糖,波动性高糖更能显著降低内皮细胞前列环素和一氧化氮的生成,同时明显增加丙二醛的含量,提示波动性高血糖较恒定性高血糖对血管内皮细胞可能具有更强的损伤效应^[3]。我们发现波动性高血糖与糖尿病患者血糖控制较差的情况非常相似,在 HUVEC 凋亡中起关键作用。波动性高血糖相对于恒定性高血糖来说,可能对内皮细胞更有害,波动性高血糖比恒定性高血糖诱导内皮细胞凋亡更加显著。

我们的实验发现,3 mg/L gAD 促进波动性高血糖条件下 HUVEC 的存活,gAD 有抗内皮细胞凋亡的作用,gAD 可能是治疗糖尿病心血管疾病的有益因子。一些研究揭示脂联素受体与糖尿病血管病变有关^[4-6]。脂联素及其受体的表达下调可能与去卵巢大鼠胰岛素抵抗的产生有关,罗格列酮能上调脂

联素及其受体的表达而改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗^[7]。我们的研究证实 AdipoR1 和 AdipoR2 在 HUVEC 中表达。与恒定性高血糖条件相比,在波动性高血糖条件下,AdipoR1 mRNA 的表达明显减少,但 AdipoR2 mRNA 的表达没有明显变化,波动性高血糖条件下,用 3 mg/L gAD 作用 HUVEC 时 AdipoR1 mRNA 的表达比不用 gAD 作用下增加了 2.09 倍,但是 AdipoR2 mRNA 的表达没有显著变化。波动性高血糖诱导的 HUVEC 凋亡能被 gAD 抑制。HUVEC 经过特异的 AdipoR1 sRNA 转染后,gAD 抑制 HUVEC 凋亡的现象被拮抗,但是这种抑制是被部分拮抗而不是被全部拮抗,这意味着 gAD 通过部分结合 AdipoR1 抑制由波动性高血糖诱导的 HUVEC 凋亡。

总之,在内皮细胞中,AdipoR1 表达的调节(而不是 AdipoR2 表达的调节)在决定 gAD 功能上起重要作用,gAD 可能通过部分结合 AdipoR1 拮抗由波动性高血糖诱导的 HUVEC 凋亡,进而在防止 As 的发生发展中起重要作用。

[参考文献]

- [1] DelPrato S. In search of normoglycemia in diabetes: controlling postprandial glucose [J]. *Int J Obes* 2002; **26** (Suppl 3): S9-S17.
- [2] Lisa Quagliaro, Ludovica Piconi, Roberta Assaloni, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: The role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation [J]. *Diabetes* 2003; **52** (11): 2795-804.
- [3] 刘江华, 宓宝斌, 廖二元, 等. 波动性高糖对内皮细胞血管舒张因子合成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (1): 55-56.
- [4] Guo Z, Xia Z, Yuen VG, et al. Cardiac expression of adiponectin and its receptors in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Metabolism*, 2007; **56** (10): 1363-371.
- [5] Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions [J]. *Nat Med*, 2007; **13** (3): 332-339.
- [6] Yamauchi T, Kadowaki T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2008; **32** (Suppl 17): S13-18.
- [7] 郑志民, 刘显庆, 周寿红, 等. 罗格列酮通过上调脂联素及其受体的表达改善去卵巢大鼠胰岛素抵抗 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17** (5): 383-386.

(此文编辑 许雪梅)