

[文章编号] 1007-3949(2011)19-11-0897-04

• 实验研究 •

波动性高糖对血管平滑肌细胞增殖及凋亡蛋白表达的影响

冯朝彩¹, 赵占胜¹, 李丹², 王绵¹, 邓永贵¹, 周红¹, 赵赛¹, 张甜甜¹, 王婷¹, 张力辉¹, 苏胜偶¹

(1. 河北医科大学第二医院内分泌科, 2. 军械工程学院门诊部, 河北省石家庄市 050000)

[关键词] 波动性高葡萄糖; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨波动性高葡萄糖对血管平滑肌细胞增殖及凋亡蛋白表达的影响。方法 以持续高糖和波动性高糖分别孵育大鼠胸主动脉平滑肌细胞 24 h, 采用 MTT 法检测血管平滑肌细胞增殖活性, 流式细胞术检测细胞周期改变, Western blotting 检测胞浆中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果 波动性高浓度葡萄糖 (5.5 mmol/L 和 25 mmol/L 交替) 培养较持续高浓度葡萄糖 (25 mmol/L) 培养可明显增加血管平滑肌细胞增殖活性, 促进其由 G₀/G₁ 期向 S 期转变, 上调 Bcl-2/Bax 比值。结论 波动性高葡萄糖可能通过干预细胞周期及对凋亡蛋白的调控, 进一步促进血管平滑肌细胞增殖, 诱导其凋亡, 因而较持续性高葡萄糖更能促进糖尿病动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Intermittent High Glucose on Cell Proliferation and the Expressions of Apoptosis Protein in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

FENG Zhao-Cai¹, ZHAO Zhan-Sheng¹, LI Dan², WANG Mian¹, DENG Yong-Gui¹, ZHOU Hong¹, ZHAO Sai¹, ZHANG Tian-Tian¹, WANG Ting¹, ZHANG Li-Hui¹, and SU Sheng-Ou¹

(1. Department of Endocrinology, Second Hospital of Hebei Medical University; 2. Department of Function, Ordnance Engineering College, Shijiazhuang 050000, China)

[KEY WORDS] Intermittent High Glucose; Vascular Smooth Muscle Cells; Cell Proliferation; Apoptosis; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of intermittent high glucose on cell proliferation and the expressions of apoptosis proteins in rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Rat VSMC were incubated with constant high glucose or intermittent high glucose. VSMC proliferation was evaluated by MTT assay. The cell cycle was examined by flow cytometry. The protein expressions of Bcl-2 and Bax were studied by Western blotting. **Results** Compared with constant high glucose, intermittent high glucose significantly stimulated cell proliferation, enhanced transition of cultured VSMC from the G₀/G₁ phase to the S phase and upregulated the ratio of Bcl-2/Bax. **Conclusions** Intermittent, rather than constant, high glucose, could significantly promote VSMC proliferation and induce apoptosis by regulating the cell cycle and modulating the apoptosis-regulatory proteins, indicating its stronger proatherogenic role in diabetic macrovascular disease.

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者发生慢性血管并发症不仅与持续高糖状态有关, 也与血糖波动关系密切^[1]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是 DM 患者发生大血管病变的主要病理基础, 内皮细胞、血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 等细胞成分在 As 的发生发展过程中具有重

要作用。但是近年来针对波动性高糖对血管功能影响的研究主要侧重于内皮细胞, 而 VSMC 在波动性高糖状态下功能改变的研究甚少。本研究以大鼠胸主动脉平滑肌细胞株 A7r5 为对象, 旨在探讨波动性高糖对 VSMC 增殖和凋亡的可能作用及相关机制。

[收稿日期] 2010-12-01

[基金项目] 河北省卫生厅医学科学研究重点课题计划 (20090108)

[作者简介] 冯朝彩, 硕士, 主要从事糖尿病心血管疾病的防治研究, E-mail 为 hebeiyike2010@sohu.com。通讯作者赵占胜, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病心血管疾病的防治研究, E-mail 为 zhshzhao@sina.com。李丹, 主治医师, 主要从事心血管超声临床研究, E-mail 为 lidan_oec@hotmail.com。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株 A7r5 细胞(中科院上海细胞所);倒置显微镜(Olympus);MCO175 型 CO₂ 培养箱(Sanyo);双波光酶标比色计(上海三科仪器有限公司);Epics-XL II 型流式细胞仪(Beckman Coulter 公司);GDS 凝胶扫描系统(Image 公司);高糖 DMEM 培养基、低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(GIBCO 公司);胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司);考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物公司);鼠单抗 Bcl- α 抗体(eBio-science 公司);兔抗人 β -actin 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);鼠单抗 Bcl-2 抗体、鼠单抗 Bax 抗体(杭州四季青生物工程公司产品);辣根酶标记的山羊抗鼠 IgG(H+L)(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养和计数

将细胞冻存管从液氮中取出,立即置于 37℃ 恒温水浴箱内,复温后将细胞悬液吸入 10 mL 离心管中,加入 5 mL DMEM 基础培养基,离心后加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的完全 DMEM 培养基,用吸管吹打悬浮细胞,将细胞悬液移置细胞培养瓶中,放入 37℃、5% CO₂ 的培养箱中静置培养,48 h 后更换培养液,0.25% 的胰蛋白酶液消化传代。取对数生长期细胞调整细胞数接种于培养瓶或 96 孔板中,分组实验。

1.3 实验分组

将细胞培养 48 h 后换含无血清的培养基培养 24 h,使细胞同步于 G₀/G₁ 期,然后分 3 组:①正常对照组:5.5 mmol/L 葡萄糖组;②持续高糖组:25 mmol/L 葡萄糖组;③波动性高糖组:白天 5.5 mmol/L 葡萄糖和 25 mmol/L 葡萄糖每 3 h 高糖 2 h 低糖交替 3 次,高糖过夜。培养 24 h。

1.4 MTT 法检测细胞增殖活性

取对数生长期的平滑肌细胞,用 0.25% 胰酶消化后,按 1×10^7 个/L,以每孔 200 μ L 接种于 96 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱孵育 48 h,换无血清培养基继续培养 24 h,按预先的实验设计分组更换培养液,孵育 24 h 后每孔内加入 20 μ L MTT (5 g/L) 溶液,孵育 4 h,吸尽各孔内溶液,加入 DMSO 150 μ L,充分振荡 10 min,使结晶完全溶解,在酶联免疫仪上选用 490 nm 波长测定每孔的吸光度值(A₄₉₀值)。每组设 10 个重复孔,取平均值,实验重复 6 次。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期分布

取生长状态良好的平滑肌细胞,以 2×10^8 个/L

的密度接种于 50 mL 培养瓶中,按预先的实验设计分组更换培养液,孵育 24 h 后用 0.25% 胰酶消化收集细胞(每组细胞计数 $> 1 \times 10^6$ 个),10 kr/min 离心 5 min,PBS 洗涤并制成单细胞悬液,重复两次,4℃ 预冷乙醇(终浓度为 70%)固定细胞,4℃ 冰箱保存。1 kr/min 离心 4 min 弃固定液,冷 PBS 再洗 2 次,取细胞 1×10^9 个/L 0.1 mL 加入碘化丙啶(PI)染液 1 mL,4℃ 避光孵育 30 min,以 500 目铜网过滤,使样品成为合格的单细胞悬液,上流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.6 Western blotting 法检测细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

提取细胞总蛋白,考马斯亮兰定量。取 200 μ g 胞浆蛋白,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,100 V 稳压转膜 1.5~2.5 h。转膜完毕,丽春红染色,鉴定转膜效果。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入 1:100 鼠单抗 Bcl-2 抗体、1:100 鼠单抗 Bax 抗体,4℃ 孵育过夜。加入 1:1000 辣根过氧化酶标记的山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h。TBS 溶液漂洗 10 min \times 3,暗室中进行化学发光,胶片曝光显影后分析结果。将显色条带扫描至计算机中,用 Scion-Image 软件对结果进行半定量分析,用任意单位 AU (Darea \cdot Ddensity) 表示凝胶谱带的面积 \times 荧光强度值。同时检测 β -actin 的表达做为参照。以目的蛋白与 β -actin 的灰度比值表示蛋白表达水平。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 14.0 统计分析软件进行统计学分析。各组均数的比较行单因素方差分析,用最小显著差法(LSD)作两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 血管平滑肌细胞增殖情况

波动性高糖组 VSMC A₄₉₀ 值较正常对照组、持续高糖组均显著升高(均 $P < 0.01$);持续高糖组 A₄₉₀ 值较正常对照组亦明显增加($P < 0.01$;表 1)。

表 1. 不同浓度葡萄糖干预后细胞增殖活性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of glucose concentration cell viability of VSMC ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	A ₄₉₀ 值
正常对照组	6	0.172 \pm 0.009
持续高糖组	6	0.186 \pm 0.011 ^a
波动性高糖组	6	0.205 \pm 0.017 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$, 与持续高糖组比较。

2.2 细胞生长周期比率

各浓度葡萄糖作用于 VSMC 24 h 后,波动性高糖组、持续高糖组 S 期细胞百分比正常对照组增高显著 (P 分别 $<0.01, 0.05$), 而波动性高糖组较持续高糖组增高 ($P < 0.05$); 波动性高糖组 G_0/G_1 期

细胞百分比持续高糖组和正常对照组明显降低 (P 分别 $<0.01, 0.005$), 而持续高糖组 G_0/G_1 期细胞百分比与正常对照组比较差异无统计学意义。各组间 G_2 期细胞百分比相比无统计学意义 (表 2)。

表 2. 不同葡萄糖浓度对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2. Effects of different concentration of glucose on cell cycle of VSMC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	G_0/G_1	S	G_2
正常对照组	59.07% \pm 4.03%	34.05% \pm 1.45%	6.88% \pm 2.58%
持续高糖组	54.75% \pm 1.70%	37.57% \pm 1.54% ^a	7.71% \pm 1.62%
波动性高糖组	47.46% \pm 4.04% ^{cc}	41.92% \pm 1.76% ^{bd}	10.92% \pm 2.28%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.005$, 与正常对照组比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与持续高糖组比较。

2.3 不同葡萄糖浓度对凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达量的影响

与正常对照组相比,波动性高糖组和持续高糖组 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达均明显增强 (均 $P < 0.01$), 波动性高糖组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达也显著高于持续高糖组 (P 分别 $<0.05, 0.01$); 波动性高糖组和持续高糖组 Bcl-2/Bax 比值均明显高于正常对照组 (均 $P < 0.01$), 波动性高糖组 Bcl-2/Bax 比值较持续高糖组显著增高 (均 $P < 0.01$; 表 3 和图 1)。

表 3. 不同葡萄糖浓度对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Table 3. Effects of different concentration of glucose on expressions of Bcl-2, Bax protein of VSMC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/Bax 比值
正常对照组	1.345 \pm 0.087	2.297 \pm 0.098	0.585 \pm 0.014
持续高糖组	1.881 \pm 0.088 ^a	2.803 \pm 0.070 ^a	0.671 \pm 0.014 ^a
波动性高糖组	2.386 \pm 0.097 ^{ab}	3.294 \pm 0.091 ^{ac}	0.724 \pm 0.010 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与持续高糖组比较。

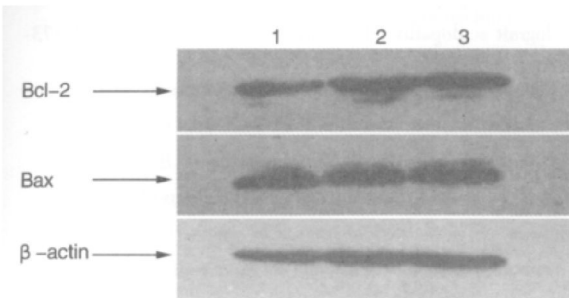


图 1. 不同葡萄糖浓度对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响
1 为正常对照组, 2 为持续高糖组, 3 为波动性高糖组。

Figure 1. Effects of different concentration of glucose on expressions of Bcl-2, Bax protein of VSMC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨 论

糖尿病是以慢性高血糖为特征的代谢紊乱综合征, 大血管病变所引起的心脑血管疾病是其主要的致死致残原因。高血糖与心脑血管疾病密切相关, 糖化血红蛋白 (HbA1C) 每升高 1%, 1 型和 2 型糖尿病患者的心脑血管疾病相对危险性分别增加 15% 和 18%^[2,3], 提示高血糖状态是糖尿病患者容易发生心脑血管疾病的重要原因。

As 是心脑血管疾病的基本病理改变, VSMC 细胞过度增殖是导致 As 的重要环节^[4]。高血糖状态是糖尿病患者更易发生 As 的重要原因^[5]。有学者发现, 2 型糖尿病患者血糖波动是发生亚临床 As 的高危因素^[6]。目前针对葡萄糖波动的相关研究主要集中于血管内皮细胞^[7]、视网膜血管周细胞^[8]等, 提示与恒定性高血糖相比, 波动性高血糖更能促进糖尿病患者慢性并发症的发生发展。最近有学者发现, 以 5 mmol/L 和 25 mmol/L 葡萄糖浓度交替培养和 25 mmol/L 葡萄糖浓度持续培养大鼠主动脉 VSMC, 48 h 后前者能进一步增加细胞数量、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 活性以及骨桥蛋白表达, 提示短期的血糖飘移在糖尿病 As 发展过程中的重要作用^[9]。

以往的研究证实, 持续高浓度葡萄糖培养的 VSMC G_0/G_1 期的细胞数目减少, 进入 S 期的细胞数目明显增多, 细胞凋亡受到抑制, 提示 VSMC 作为动脉壁的重要组成部分, 持续性高糖导致其增殖和凋亡的失衡是 DM 中 As 发生发展的重要因素^[10]。而波动性高糖是否对 VSMC 细胞周期及细胞增殖和凋亡产生影响尚未见报道。本研究表明, 持续体外高糖培养可刺激 VSMC 细胞增殖, 改变了细胞在不

同周期的百分比,与我们既往的研究结果一致。给予短时间的波动高糖处理后,细胞增殖活性、处于S期的细胞百分比进一步增加,提示波动高糖也参与了VSMC增殖的调控机制,这种效应是通过对细胞周期的干预的调控来完成的。

除过度增殖外,VSMC凋亡受阻可能是As发生发展过程中的重要因素。Bcl-2和Bax是Bcl-2基因家族中的重要成员,前者抗凋亡,后者则促凋亡,高水平的Bcl-2/Bax比值有助细胞存活,该比值过低则促进凋亡^[11]。本研究检测了Bcl-2和Bax蛋白表达,与对照组相比,虽然持续高糖组和波动性高糖组均可同时增加抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax表达,但Bcl-2/Bax比值亦有显著增高,其结果是抑制细胞凋亡,且这种效应在波动性高糖条件下更为显著。

迄今为止,间歇性波动高糖所致细胞功能损伤的具体分子机制尚不完全清楚。有学者认为在波动性高糖诱导细胞损伤中,可能存在着与持续性高糖不同的其他特异性分子机制,推测可能是细胞长时间孵育在高浓度葡萄糖环境中,可诱导细胞中的某些代谢反应发生代偿性改变,进而对细胞起到反馈性的调控作用,使其可适应或对抗高糖带来的毒性效应。然而当细胞外界环境中的糖浓度不断变化时,细胞中上述的适应性可能发生减弱,从而导致细胞出现了更为严重的功能损伤^[8]。本研究在VSMC上证实,波动性高葡萄糖可能通过促进细胞周期转化、调控凋亡相关蛋白的表达进而增加细胞增殖,抑制其凋亡,其对细胞功能损伤较之持续性高糖更为严重。因此,严格控制血糖水平,减少血糖波动对控制糖尿病大血管并发症的发生发展,提高患者的生存质量具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 夏城东,殷惠军,陈可冀. 波动性高血糖与心血管并发症关系[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(1): 99-101.
 [2] Rydén L, Standl E, Bartnik M, et al. Guidelines on diabe-

tes, pre2diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD) [J]. Eur Heart J, 2007, 28(1): 88-136.

- [3] Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association [J]. Circulation, 2007, 115(1): 114-126.
 [4] 易善清,胡苏华,谢明,等. 桃红四物汤含药血清对血管平滑肌细胞迁移β3整合素及基质金属蛋白酶9表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(6): 714-718.
 [5] 李忠,王华. 血浆脂联素、超敏C反应蛋白与2型糖尿病动脉粥样硬化病变程度的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(13): 2016-018.
 [6] 何霞,唐炜立,周智广,等. 2型糖尿病患者血糖波动与亚临床动脉粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 26(10): 759-762.
 [7] 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.
 [8] 匡洪宇,马丽丽,江红,等. 持续及间断高糖培养对牛视网膜血管周细胞凋亡的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(8): 498-500.
 [9] Sun J, Xu Y, Dai Z, et al. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by up-regulating osteopontin [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 313(1-2): 64-69.
 [10] 赵占胜,王绵,梁江燕,等. 罗格列酮对高糖诱导大鼠血管平滑肌细胞炎症和增殖的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(10): 1371-374.
 [11] Nykänen AI, Pajusola K, Krebs R, et al. Common protective and diverse smooth muscle cell effects of AAV-mediated angiotensin-1 and -2 expression in rat cardiac allograft vasculopathy [J]. Circ Res, 2006, 98(11): 1373-380.

(此文编辑 李小玲)