

二甲双胍对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

鲁谦, 白鹏, 周荣, 边云飞, 柴婵娟, 朱国斌

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 二甲双胍; 缺氧/复氧损伤; 人脐静脉内皮细胞; 核因子 κ B/P65

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的影响及其可能机制。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 建立缺氧/复氧模型, 随机分为 5 组: 正常对照组、缺氧/复氧组、缺氧/复氧 + 不同浓度(0.1、0.5、1.0 mmol/L)二甲双胍干预组。流式细胞术检测各组细胞的凋亡率, 实时定量聚合酶链反应检测各组核因子 κ B/P65 mRNA 的表达, 酶联免疫吸附法检测各组上清液中细胞间黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 的浓度。**结果** 与对照组相比, 缺氧/复氧组细胞凋亡增加($P < 0.05$), 核因子 κ B/P65 mRNA 增加, 同时细胞间黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 的浓度均升高($P < 0.05$); 与缺氧/复氧组比较, 二甲双胍预处理能减少缺氧/复氧所致人脐静脉内皮细胞凋亡($P < 0.05$), 减少核因子 κ B/P65 的 mRNA 的表达, 同时细胞间黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 的浓度均降低($P < 0.05$), 其中 0.5 mmol/L 浓度组保护作用最佳。**结论** 二甲双胍对缺氧/复氧损伤引起的人脐静脉内皮细胞损伤有保护作用, 其机制可能与下调核因子 κ B/P65 表达及抑制了细胞间黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 的释放有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of Metformin on Injury of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Anoxia/Reoxygenation

LU Qian, BAI Peng, ZHOU Rong, BIAN Yun-Fei, CHAI Chan-Juan, and ZHU Guo-Bin

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Metformin; Anoxia/Reoxygenation; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Nuclear Factor- κ B/p65

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects and possible mechanism of metformin (Met) on anoxia/reoxygenation (A/R) injury in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were cultured and anoxia/reoxygenation model was set up, then randomly divided into 5 groups: the control group, A/R group, A/R + Met(0.1 mmol/L) group, A/R + Met(0.5 mmol/L) group, A/R + Met(1.0 mmol/L) group. The apoptosis rate of HUVECs was detected by flow cytometry. The mRNA expression of nuclear factor kappa B/P65 (NF- κ B/P65) was quantified by real-time PCR (RT-PCR) and the supernatant concentrations of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with control group, apoptosis rate of A/R group was increased ($P < 0.05$), the mRNA expression of NF- κ B/P65 was increased significantly in A/R group, the concentrations of ICAM-1 and TNF- α were improved ($P < 0.05$). However, compared with A/R group, cell apoptosis rate was decreased in groups treated by metformin ($P < 0.05$). The mRNA expression of NF- κ B/P65 was decreased significantly and the concentrations of ICAM-1 and TNF- α were reduced in metformin pretreatment groups ($P < 0.05$).

Conclusion Metformin may protect HUVEC from A/R injury and its mechanism may be related to downregulation of NF- κ B/P65 gene expression and the inhibition of the release of inflammation factor ICAM-1 and TNF- α .

目前有研究表明缺血再灌注损伤引起的内皮细胞凋亡及功能障碍是缺血再灌注并发无复流现

[收稿日期] 2014-01-15

[作者简介] 鲁谦, 硕士研究生, 研究方向为冠状动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 fantexi1116@163.com。边云飞, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗, E-mail 为 yunfeibian@ sina.com。通讯作者朱国斌, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床、心脏电生理的诊断和治疗, E-mail 为 fantexi20112014@163.com。

象的重要机制之一^[1]。近年来二甲双胍降糖以外的心脏保护作用日益受到重视。Legtenberg 等^[2]研究表明二甲双胍能减少缺血再灌注对心脏的损伤,然而其具体机制尚不能明确。Isoda 等^[3]研究显示二甲双胍能明显抑制脂多糖(LPS)诱导的血管内皮细胞、单核巨噬细胞、平滑肌细胞炎性因子的表达,减少上述细胞的凋亡。因此我们推测二甲双胍对心脏保护作用可能与其减轻血管内皮细胞缺血再灌注损伤有关。本实验通过建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)缺氧/复氧模型(anoxia/reoxygenation, A/R),模拟在体血管内皮细胞缺血再灌注损伤,研究二甲双胍对缺血再灌注损伤引起的血管内皮细胞损伤有保护作用及可能机制,为减少缺血再灌注的冠状动脉无复流现象提供一种临床思路。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC 由浙江大学第二附属医院消化内科惠赠;二甲双胍购 Sigma 公司;Trizol 试剂、逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)酶联免疫吸附试剂盒购自博士德公司;AnnexinV-FITC 流式检测试剂盒购自南京凯基生物公司。

1.2 细胞培养与实验分组

HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂、100% 湿度的孵箱中常规培养。将培养的 HUVEC 分为 5 组:对照组、A/R 组、A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组、A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组、A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组。对照组:正常培养,不施行任何干预。A/R 组:加入缺氧液培养 2 h,再换入复氧液,将细胞置入正常孵箱(5% CO₂, 37℃)下孵育 2 h。干预组:预先以终浓度为 0.1、0.5、1.0 mmol/L 二甲双胍与 HUVEC 共同孵育 12 h,之后进行缺氧复氧干预。

1.3 A/R 模型的制作

采用 Esumi 等^[4]改进的方法,配制缺氧液和复氧液。缺氧液组成:137 mmol/L NaCl, 12 mmol/L KCl, 0.49 mmol/L MgCl₂, 0.9 mmol/L CaCl₂, 4.0 mmol/L HEPES, 10 mmol/L 脱氧葡萄糖,20 mmol/L 乳酸钠,pH = 6.2;复氧液用细胞培养液,实验时用缺氧液换去细胞培养液,放入缺氧孵箱中(5% CO₂, 95% N₂, 37℃)培养 2 h。再换入复氧液,将细胞置

入正常孵箱(5% CO₂, 37℃)下孵育 2 h。

1.4 流式细胞技术检测细胞凋亡率

收集处理好的细胞,用 Binding Buffer 制备 500 μ L 细胞悬液,分别加入 FITC 标记的 Annexin-V, PI 染液各 5 μ L,轻轻混匀,室温避光下孵育 15 min 后上机检测。

1.5 ELISA 检测上清液 TNF- α 和 ICAM-1 浓度

分别采用 TNF- α 和 ICAM-1 试剂盒测定,严格按试剂盒和酶标仪说明操作,测定各组上清液的 TNF- α 和 ICAM-1 浓度。

1.6 RT-PCR 测定 NF- κ B/P65 mRNA 的表达量

Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 量,吸光度 A_{260/280} 均在 1.7 ~ 2.0。将 RNA 反转录成 cDNA,进行两步法扩增,PCR 反应体系为 20 μ L: cDNA 1 μ L, RNA 上下游引物各 0.8 μ L, 2 \times Mix 8 μ L,实验引物依据文献检索 Primer 5.0 软件进行设计并验证,由大连宝生物有限公司合成。PCR 引物: NF- κ B/P65 上游 5'-CCT GGA GCA GGC TAT CAG TC-3', 下游引物 5'-ATC TTG AGC TCG GCA GTG TT-3', GAPDH 上游 5'-AGG CTA GCT GGC CCG ATT TC-3', 下游 5'-TGG CAA CAA TAT CCA CTT TAC CAG-3' A 扩增程序: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环。

1.7 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 法。

2 结果

2.1 细胞凋亡率

对照组细胞主要集中在 B3 区,凋亡率较少; A/R 组出现大量凋亡细胞,二甲双胍干预后凋亡率明显减少($P < 0.05$),其中 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组较 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组凋亡率减少($P < 0.05$),而 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组较 A/R + Met0.5 mmol/L 二甲双胍组凋亡率反而增高($P < 0.05$)。可见 0.5 mmol/L 二甲双胍组对 A/R 引起的损伤保护作用最强(图 1 和表 1)。

2.2 二甲双胍对 A/R 损伤炎症因子表达的影响

与对照组相比,A/R 组 ICAM-1、TNF- α 浓度显著增高,二甲双胍干预后与 A/R 组比较 ICAM-1、TNF- α 浓度明显降低,A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组较 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组的 ICAM-1、TNF- α 浓度明显降低,而 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组较 A/R +

0.1 mmol/L 二甲双胍组、A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组的 ICAM-1、TNF- α 水平反而增高(表 2)。

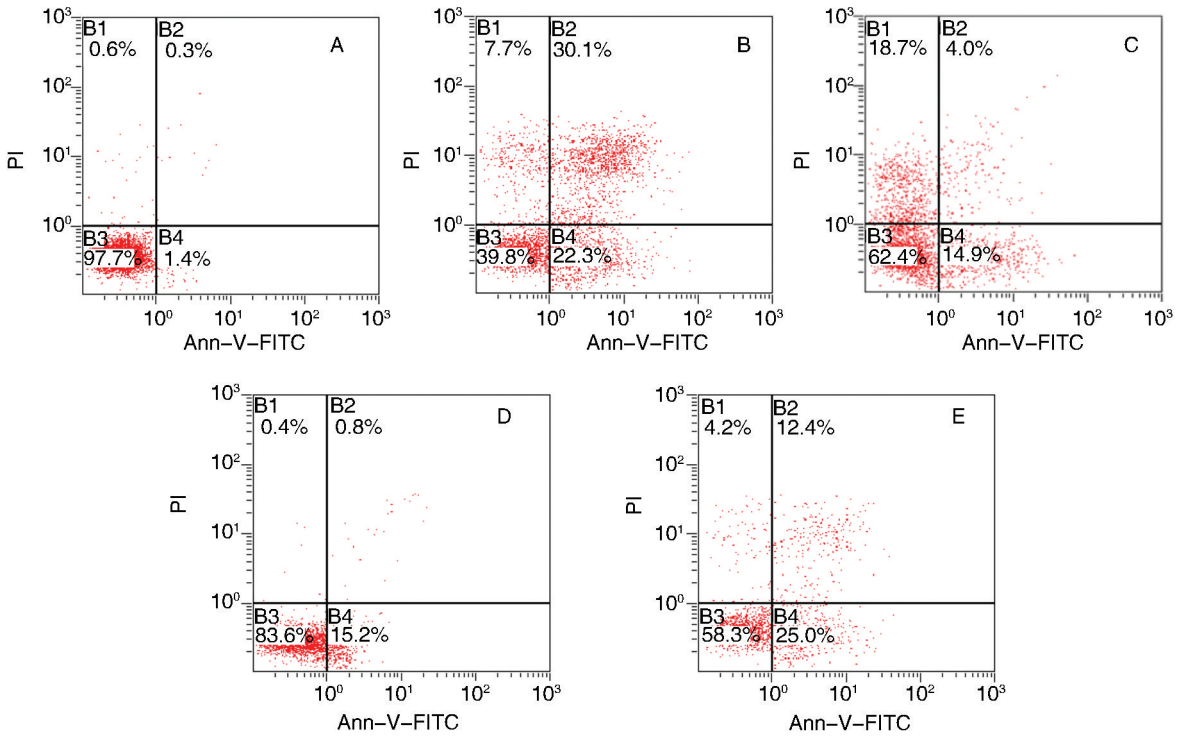


图 1. 流式细胞术检测细胞凋亡率 A 为对照组, B 为 A/R 组, C 为 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组, D 为 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组, E 为 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组。

Figure 1. The apoptotic rates examined by flow cytometry

表 1. 各组心肌细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1. Apoptotic rates of cardiomyocytes in different groups

分 组	凋 亡 率
对照组	2.04% \pm 0.42% ^b
A/R 组	49.48% \pm 1.53% ^{ed}
A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组	19.14% \pm 2.34% ^{abc}
A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组	15.56% \pm 1.28% ^{ac}
A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组	37.08% \pm 1.62% ^{ad}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 A/R 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组比较。

2.3 二甲双胍对 A/R 损伤 NF- κ B/P65 mRNA 表达的影响

各组 NF- κ B/p65 mRNA 的表达量均较对照组显著升高, 二甲双胍干预后与 A/R 组 NF- κ B/p65 mRNA 的表达比较均明显降低($P < 0.01$), A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍较 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组的水平明显降低($P < 0.05$), 而 A/R + 1.0 mmol/L

二甲双胍组较 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组、A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组的水平均增加($P < 0.05$; 图 2)。

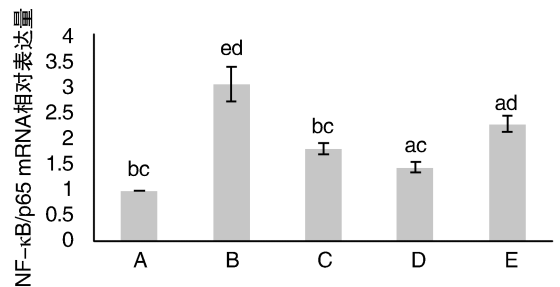


图 2. 各组 NF- κ B/P65 mRNA 相对表达量的比较 A 为对照组, B 为 A/R 组, C 为 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组, D 为 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组, E 为 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 A/R 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组比较。

Figure 2. Comparison of NF- κ B/P65 expression among different groups($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 2. 各组上清液中 TNF- α 和 ICAM-1 浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2. Concentrations of TNF- α and ICAM-1 in supernatant among different groups

分 组	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	ICAM-1 (ng/L)
对照组	1.28 \pm 0.09 ^b	2.14 \pm 0.16 ^b
A/R 组	3.25 \pm 0.15 ^{ed}	5.39 \pm 0.20 ^{ed}
A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组	2.04 \pm 0.14 ^{abc}	3.65 \pm 0.21 ^{abc}
A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组	1.83 \pm 0.11 ^{ac}	3.39 \pm 0.13 ^{ac}
A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组	2.51 \pm 0.16 ^{ad}	4.63 \pm 0.08 ^{ad}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 A/R 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.1 mmol/L 二甲双胍组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 0.5 mmol/L 二甲双胍组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 A/R + 1.0 mmol/L 二甲双胍组比较。

3 讨 论

经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 等再灌注手段虽可使心脏大血管的血运得于重建, 但再灌注后引起的微血管功能障碍可出现小血管灌注不足的现象 (即无复流现象), 进一步加重心肌损伤、坏死, 导致心室扩张和重构, 心功能低下和心力衰竭, 以及恶性心律失常等严重并发症发生率增高^[5,6]。研究表明再灌注时无复流的发生与炎症反应引起的内皮细胞凋亡及功能障碍密切相关^[7]。减轻再灌注中的血管内皮细胞的损伤是减少无复流发生的一个重要方向。

二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的传统药物, 近年来研究表明, 除在控制血糖作用以外, 二甲双胍在心脏保护、抑制肿瘤的生长, 治疗多囊卵巢综合征等诸多方面起着重要作用。Zhao 等^[8] 通过冠状动脉造影观察到二甲双胍能明显减少再灌注无复流的发生, 然而其具体机制尚未能完全阐述。本实验通过培养 HUVEC 模拟缺血再灌注过程, 用不同浓度的二甲双胍对其进行干预, 结果显示二甲双胍干预后细胞凋亡率明显减轻, 提示二甲双胍对内皮细胞 A/R 有保护作用。

研究发现 TNF- α 在内皮细胞再灌注损伤中发挥重要作用, 一方面 TNF- α 能促进炎症反应中内皮细胞表面的糖萼降解, 破坏内皮细胞的完整性^[9]; 另一方面 TNF- α 可直接或间接导致内皮细胞凋亡^[10]。研究表明 ICAM-1 大量表达时, 对缺血再灌注中内皮细胞的损伤亦发挥重要作用, 它可诱导内皮细胞骨架相关蛋白酪氨酸磷酸化, 引起细胞骨架的改变, 有利于中性粒细胞向局部组织聚集浸润导致微血栓形成和毛细血管阻塞, 引起缺血区无复流现象的发生; 同时 ICAM-1 可使内皮细胞对氧自由

基、弹性蛋白酶、蛋白水解酶等细胞毒性物质黏附增加, 加重内皮细胞损伤^[11]。

研究表明 NF- κ B/p65 转录活性增加及下游 TNF- α 、ICAM-1 表达与心脏缺血再灌注密切相关^[12]。NF- κ B 通常以 p65/P50 二聚体形式存在胞浆中, 其中 p65 含有转录活化区域, 在静息状态下 NF- κ B 与其抑制蛋白 (I κ B) 结合, 以无活性形式存在于胞浆中。再灌注时产生的氧自由基导致 NF- κ B P65/P50 发生核易位, 进入细胞核与 TNF- α 、ICAM-1 等炎症因子的 NF- κ B 结合位点结合, 促使 TNF- α 、ICAM-1 等炎症因子表达增加, 上述炎症因子的释放进一步激活 NF- κ B, 导致炎症因子进一步放大, 加重机体损伤^[13-15]。

本实验通过体外构建血管内皮细胞 A/R 模型, 观察到 A/R 组 NF- κ B/p65 mRNA 与 TNF- α 、ICAM-1 表达显著增高, 细胞凋亡率明显增加, 上述结果表明 A/R 诱导了内皮细胞中 NF- κ B 通路活化及 TNF- α 、ICAM-1 炎症因子表达, 导致了内皮细胞凋亡。与 A/R 组比较, 二甲双胍干预后 NF- κ B/p65 mRNA 的转录及 TNF- α 、ICAM-1 炎症因子表达均减少, 提示二甲双胍可能通过抑制 NF- κ B/p65 转录活性, 减少 TNF- α 、ICAM-1 炎症因子的释放, 从而对缺血再灌注损伤所导致血管内皮细胞损伤起到保护作用。此外, 通过不同浓度的二甲双胍预处理后, 0.5 mmol/L 二甲双胍的对 A/R 内皮细胞的保护作用最佳, 值得注意的是当二甲双胍浓度进一步升高时, 二甲双胍对内皮细胞 A/R 损伤的保护作用反而降低, 表明二甲双胍对内皮细胞的保护作用可能存在一定的浓度相关性。

综上所述, 一定浓度的二甲双胍下调了 NF- κ B/P65 表达及减少炎症因子 TNF- α 、ICAM-1 的释放, 减轻了血管内皮细胞的凋亡, 从而对缺血再灌注损伤所导致血管内皮细胞损伤起到保护作用。二甲双胍减少再灌注无复流发生的机制较为复杂, 需进一步对其可能涉及的机制进行深入研究, 为临床上减少缺血再灌注损伤的防治提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Brosh D, Assali AR, Mager A, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality [J]. Am Cardiol, 2007, 99(4): 442-445.
- [2] Legtenberg RJ, Houston RJ, Oeseburg B, et al. Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats [J]. Horm Metab Res, 2002, 34(4): 182-185.

- [3] Isoda K, Young JL, Zirlik A, et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(3): 611-617.
- [4] Esumi K, Nishida M, Shaw D, et al. NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischemia[J]. *Am Physiol*, 1991, 260(6 Pt 2): H1 743-752.
- [5] Ito H, Maruyama A, Iwakura K, et al. Clinical implications of the 'no reflow' phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1996, 93(2): 223-228.
- [6] van t Hof AW, Liem A, de Boer MJ, et al. Clinical value of 12-lead electrocardiogram after successful reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Zwolle Myocardial infarction Study Group[J]. *Lancet*, 1997, 350(9 078): 615-619.
- [7] Fröhlich GM, Meier P, White SK, et al. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(23): 1 714-722.
- [8] Zhao JL, Fan CM, Yang YJ, et al. Chronic pretreatment of metformin is associated with the reduction of the no-reflow phenomenon in patients with diabetes mellitus after primary angioplasty for acute myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Ther*, 2013, 31(1): 60-64.
- [9] Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 78-89.
- [10] Tisato V, Zauli G, Rimondi E, et al. Inhibitory effect of natural anti-inflammatory compounds on cytokines released by chronic venous disease patient-derived endothelial cells[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 423 407.
- [11] Vinten-Johansen J, Jiang R, Reeves JG, et al. Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, 21(1): 123-145.
- [12] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Kirshenbaum, Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB[J]. *Circ Res*, 2011, 108(9): 1 122-132.
- [13] Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF-kappaB induces regression of cardiac hypertrophy, independent of blood pressure control, in spontaneously hypertensive rats[J]. *Am Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(1): H20-29.
- [14] Min JK, Kim YM, Kim SW. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells[J]. *Immunol*, 2005, 175(1): 531-540.
- [15] Kim HJ, Tsoy I, Park JM, et al. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF-alpha-induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF-kappaB-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(5): 1 391-397.

(此文编辑 李小玲)