

二甲双胍通过激活 AMPK 降低同型半胱氨酸对内皮细胞的损伤

付勇南¹, 胡金兴¹, 杨媛², 王梦洪¹, 郑泽琪¹, 彭景添¹
(南昌大学第一附属医院 1. 心内科, 2. 药学部, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 二甲双胍; 同型半胱氨酸; 腺苷酸活化蛋白激酶; 内皮细胞损伤; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨二甲双胍能否降低同型半胱氨酸(Hcy)对血管内皮细胞的损伤及其可能的机制。**方法** 培养人血管内皮细胞株(EC304 人血管内皮细胞),分为对照组、Hcy 组、二甲双胍组和 Hcy+二甲双胍组,采用 CCK-8 检测细胞活力,采用乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒测定内皮细胞 LDH、SOD 活性及细胞内 MDA 含量,采用 RT-PCR 检测 SOD1、过氧化氢酶(CAT)和 NADPH 氧化酶 2(NOX2) mRNA 的表达,采用 Western blot 检测 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,Hcy 组内皮细胞活力明显下降,LDH 活性增加,细胞内 MDA 含量升高,SOD 活性下降,SOD1 和 CAT mRNA 表达水平显著下降,而 NOX2 mRNA 表达水平则明显升高,二甲双胍能够抑制 Hcy 引起的细胞活力下降及 LDH、MDA 增加;二甲双胍增加 SOD 活性,增加 SOD1 和 CAT mRNA 表达水平,减少 NOX2 mRNA 表达水平。AMPK 抑制剂 Compound C 则可以逆转二甲双胍对 Hcy 引起的内皮细胞损伤的保护作用。**结论** 二甲双胍激活 AMPK 可能通过调控细胞内氧化应激抑制 Hcy 对内皮细胞的损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Metformin Attenuates Endothelial Cell Injury Caused by Homocysteine Through AMPK Pathway

FU Yong-Nan¹, HU Jin-Xing¹, YANG Yuan², WANG Meng-Hong¹, ZHENG Ze-Qi¹, and PENG Jing-Tian¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] Metformin; Homocysteine; AMP-activated Protein Kinase; Endothelial Cell Injury; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of metformin on vascular endothelial cells injured by homocysteine (Hcy) and its mechanism. **Methods** Human vascular endothelial cell line (ECV304 cells) cultivated in vitro were divided into four groups: control group, Hcy group, metformin group, Hcy and metformin co-incubation group, the cell proliferation ability was determined by CCK-8 assay. The lactate dehydrogenase (LDH), the content of malondialdehyde (MDA) and superoxidase dismutase (SOD) activity in ECV304 cells cellular supernatant were detected. RT-PCR was performed to detect mRNA expression of SOD1. p-AMPK α and t-AMPK α protein expression was detected by Western blot. **Results** Homocysteine significantly inhibited endothelial cell viability and increased the activities of LDH. Compared with the control group, the content of MDA increased and the activity of SOD decreased in Hcy group. Metformin significantly improved endothelial cell viability and SOD activity, suppressed homocysteine induced increases in LDH and MDA. Homocysteine decreased the expression of SOD1 and catalase (CAT) mRNA, increased NADPH oxidase 2 (NOX2) mRNA. Metformin increased the expression of SOD1 and CAT mRNA, decreased NOX2 mRNA compared with Hcy group. Compound C (an AMPK inhibitor) could reverse the protection of metformin. **Conclusion** Metformin could protect the ECV304 cells from injury by homocysteine via AMPK-ROS signalling pathway.

[收稿日期] 2015-06-29

[修回日期] 2016-07-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260049)

[作者简介] 付勇南, 博士, 主治医师, 主要研究方向为心血管疾病病理生理机制, E-mail 为 fyn1028@126.com。胡金兴, 硕士, 住院医师, 主要研究方向为心血管疾病病理生理机制。杨媛, 硕士, 临床药师, 主要研究方向为二甲双胍心血管保护作用机制。

二甲双胍 (metformin, Met) 是目前应用最为广泛的抗糖尿病药物, 多个研究表明二甲双胍能减少 2 型糖尿病患者的心血管死亡率^[1-2]。而且这种作用是不依赖其降糖作用, 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 的激活在二甲双胍发挥其心血管保护作用中起着关键的作用^[3], 我们前期实验也发现二甲双胍可以通过激活 AMPK 抑制压力负荷引起的心肌肥厚^[4-5]。研究证实高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是引起心血管疾病的独立危险因素, 而高 Hcy 主要通过损伤血管内皮而引起心血管疾病^[6]。目前二甲双胍对高 Hcy 引起的内皮损害的影响尚未见报道。本实验拟采用人血管内皮细胞株 (EC304 人血管内皮细胞) 复制高 Hcy 的内皮细胞损伤模型, 观察二甲双胍对高 Hcy 引起的内皮细胞损伤的影响, 探讨其可能的保护机制及其相应的信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料

人血管内皮细胞株 (EC304 人血管内皮细胞) 购自南京凯基生物公司。Prism 7500 real-time PCR 仪 (ABI 公司), 垂直板蛋白电泳装置 (美国 Bio-Rad 公司), ImageQuant LAS 4000 化学发光仪 (GE 公司)。Hcy、二甲双胍 (Sigma 公司), 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent (Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司), PCR 荧光定量检测试剂盒 (GeneCopoeia 公司), p-AMPK α 单克隆抗体、t-AMPK α 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司), 鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), HRP 标记的二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD) 测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)。所用引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 细胞培养

使用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基培养血管内皮细胞, 当细胞生长汇合达 80% 以上时进行传代。

1.3 实验分组

实验分为对照组、Hcy 组 (加入 1000 μ mol/L Hcy)、二甲双胍组 (加入 2000 μ mol/L 二甲双胍)、Hcy+二甲双胍组 (加入 1000 μ mol/L Hcy 和 2000 μ mol/L 二甲双胍)。细胞在培养 24 h 后, 换无血清

培养液培养 12 h, 按分组加入药物处理 24 h 并收集样本。

1.4 CCK-8 检测细胞活力

血管内皮细胞按 8000 个细胞/孔接种于 96 孔板中, 每组 5 个复孔, 每孔含培养基 200 μ L。细胞培养 24 h 后, 弃培养基, 更换为等体积的不含血清的 RPMI1640 培养基, 按照上述分组将培养基换成不同浓度药物的 200 μ L 培养基, 再培养 24 h; 24 h 后每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂, 将 96 孔板置于黑暗密闭的培养箱中孵育 2 h; 将酶标仪的波长调至 490 nm, 测量并记录各组的 OD 值, 各孔真实 OD 值为实际测得值减去调零孔 OD 值, 细胞活力为各处理组真实 OD 值平均值与对照组真实 OD 值平均值之比。

1.5 LDH 活性、SOD 活性及 MDA 含量的检测

细胞同步化后, 分为对照组、Hcy 组、二甲双胍组、Hcy+二甲双胍组, 药物孵育 24 h 后, 提取各组细胞培养液利用 LDH、SOD 和 MDA 测定试剂盒进行检测。

1.6 real-time PCR 检测 SOD1、过氧化氢酶及 NADPH 氧化酶 2 mRNA 表达

取培养的内皮细胞, 按 Trizol Reagent 说明书, 使用 Trizol 裂解, 提取内皮细胞总 RNA, 分光光度法测定并计算提取的总 RNA 含量及浓度。按照逆转录试剂盒说明书, 内皮细胞总 RNA 逆转录反应合成 cDNA, SOD1、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 及 NADPH 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2) mRNA 及内参照 β -actin 引物序列见表 1, 退火温度均为 60 $^{\circ}$ C, PCR 反应循环次数为 40 次。按定量 PCR 试剂盒进行操作, 以 20 μ L 反应体系进行 PCR, 取 2 μ L 逆转录反应产物与 CAT、SOD1、NOX2 mRNA 及内参照 β -actin 引物进行。PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 32 s, 40 个循环。在 ABI Prism7500 real-time PCR System 上操作反应, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示。

1.7 Western blot 检测血管内皮细胞 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白的表达

取血管内皮细胞, 使用碧云天细胞总蛋白提试剂盒提取内皮细胞总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度, 上样 80 μ g 蛋白提取液, 10%SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移至 NC 膜, 4 $^{\circ}$ C 摇床上封闭 1 h, 加入 1:1000 稀释的一抗 (小鼠抗人 GLUT-4 单克隆抗体), 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜, 封闭漂洗后加入 1:2000 稀释的二抗 (辣根酶标记的兔抗小鼠 IgG 抗体), 室温下杂交 1 h, 使用 Thermo 超敏发光试剂增强反应,

应用 GE ImageQuant LAS 4000 化学发光仪显像,并根据灰度值分析 AMPK α 和 p-AMPK α 蛋白相对表达量。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequence

基因	碱基序列	产物长度
NOX2	上游 5'-AGCCGAATGCTGCTCACTT-3'	200 bp
	下游 5'-AGTTGTCGTGGATGTACTGG-3'	
SOD1	上游 5'-GGGCATCATCAATTTCTGA-3'	200 bp
	下游 5'-AGCCTGCTGTATTATCTCCA-3'	
CAT	上游 5'-TGTGAACTGTCCCTACCG-3'	320 bp
	下游 5'-GTGTTGAATCTCCGCACT-3'	
β -actin	上游 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	200 bp
	下游 5'-TCCATGCCCAGGAAGGAAGG-3'	

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 Hcy 刺激后的内皮细胞活力的影响

细胞在不同浓度 Hcy (250、500、1000 及 2000 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后,细胞活力降低,且随着 Hcy 浓度的增加,细胞活力逐渐下降($P<0.05$;图 1A)。细胞在不同浓度二甲双胍 (250、500、1000 及 2000 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后,细胞活力无明显差异(图 1B)。细胞按对照组、Hcy 组 (1000 $\mu\text{mol/L}$ Hcy)、二甲双胍组 (2000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍)、Hcy+二甲双胍组 (1000 $\mu\text{mol/L}$ Hcy+2000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍)处理 24 h 后,Hcy 组细胞活力与对照组相比降低($P<0.05$),而 Hcy+二甲双胍组细胞活力与 Hcy 组相比活力增加($P<0.05$;图 1C)。说明二甲双胍能够减轻 Hcy 引起的内皮细胞活力的下降。二甲双胍组 LDH 水平较对照组明显增加,而 Hcy+二甲双胍组 LDH 活性较 Hcy 组显著降低(图 1D)。

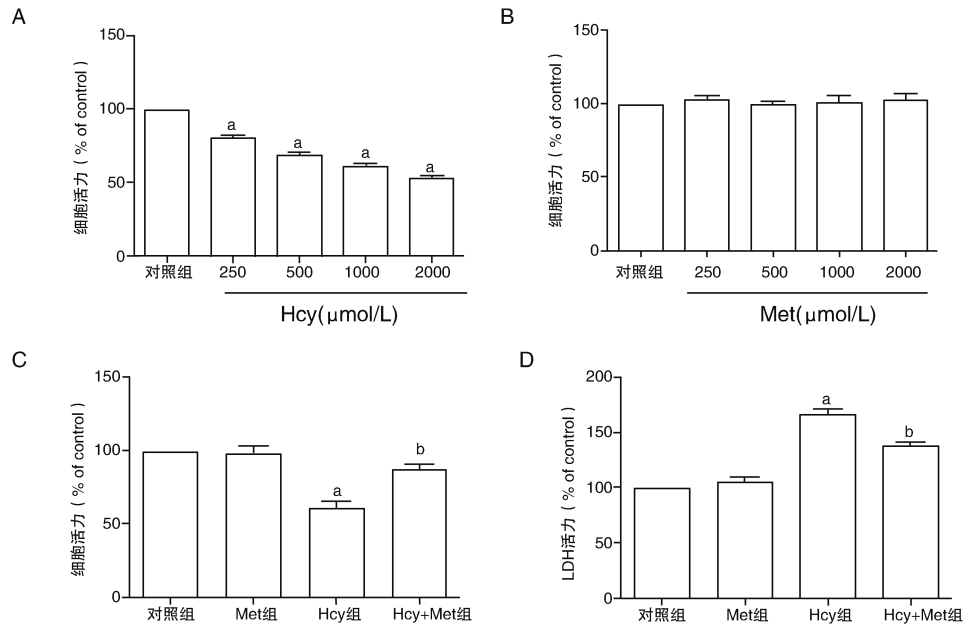


图 1. 二甲双胍对 Hcy 刺激后的内皮细胞活力的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 Hcy 组相比。
Figure 1. Effects of metformin on vascular endothelial cells injured by homocysteine ($n=6$)

2.2 二甲双胍对细胞 MDA 含量、SOD 活性的影响

二甲双胍组 MDA 含量与对照组相比无明显差异, Hcy 组 MDA 含量与对照组相比明显增加 ($P<0.01$), 而 Hcy+二甲双胍组 MDA 含量与 Hcy 组相比显著降低(图 2A)。二甲双胍组总 SOD 活性与对照组相比无明显差异, 而 Hcy 组总 SOD 活性与对照组

相比明显下降 ($P<0.05$), 而 Hcy+二甲双胍组总 SOD 活性与 Hcy 组相比明显增加 ($P<0.05$;图 2B)。

2.3 二甲双胍对细胞 SOD1、CAT 和 NOX2 mRNA 表达的影响

与对照组相比, 二甲双胍组 SOD1、CAT 和 NOX2 mRNA 的表达水平无明显差异, 而 Hcy 组

SOD1 和 CAT mRNA 的表达水平显著降低, NOX2 mRNA 的表达水平则显著增加; Hcy+二甲双胍组 SOD1 和 CAT mRNA 的表达水平较 Hcy 组明显增

加, 而 NOX2 mRNA 的表达水平则显著下降 ($P < 0.05$; 图 3)。

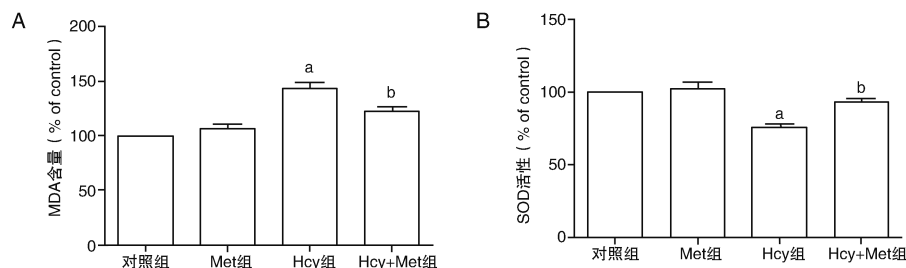


图 2. 二甲双胍对细胞 MDA 含量和 SOD 活性的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组相比。

Figure 2. Effects of metformin on MDA content and SOD activity in cells ($n=6$)

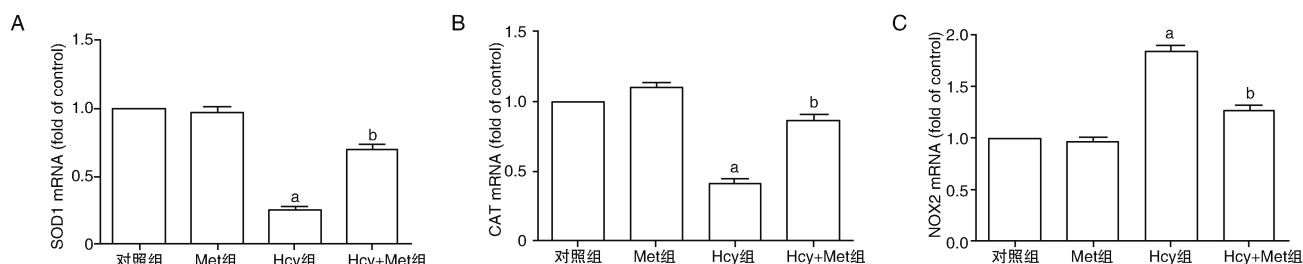


图 3. 二甲双胍对细胞 SOD1、CAT 和 NOX2 mRNA 表达的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组相比。

Figure 3. Effects of metformin on the mRNA expression of SOD1, CAT and NOX2 mRNA ($n=6$)

2.4 二甲双胍对细胞 p-AMPK α 蛋白表达的影响

二甲双胍组 p-AMPK α 表达水平与对照组相比明显增加 ($P < 0.05$); 而 Hcy 组 p-AMPK α 表达水平与对照组相比有增加趋势, 但未有统计学差异; Hcy+二甲双胍组 p-AMPK α 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而与二甲双胍组无明显差异 (图 4)。

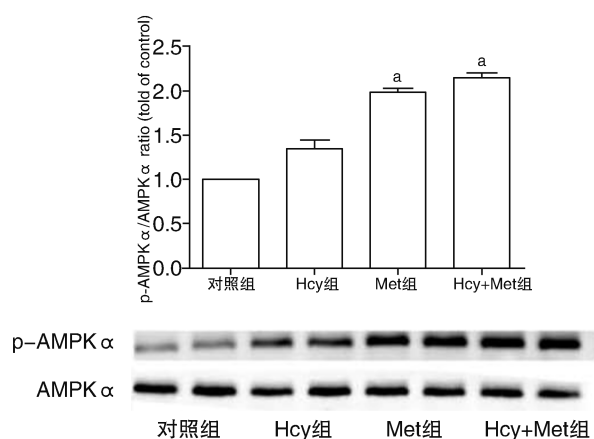


图 4. 二甲双胍对细胞 p-AMPK α 和 t-AMPK α 蛋白表达的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

Figure 4. Effects of metformin on the protein expression of p-AMPK α and t-AMPK α ($n=6$)

2.5 Compound C 逆转二甲双胍的细胞保护作用

按对照组、Hcy 组、二甲双胍组、Hcy+二甲双胍组、Compound C 组 ($1 \mu\text{mol/L}$ Compound C, AMPK 抑制剂)、Hcy+Met+Compound C 组进行分组, 结果发现, 单纯 Compound C 刺激对细胞活力无明显影响, 而 Hcy+Met+Compound C 组细胞活力较 Hcy+二甲双胍组明显下降 ($P < 0.05$), 说明 AMPK 的激活参与二甲双胍对 Hcy 引起的内皮细胞损伤的保护作用 (图 5)。

3 讨论

高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化的独立危险因素之一, 而 Hcy 对血管内皮细胞损伤是其引起动脉粥样硬化的重要原因。Hcy 使内皮细胞发生损伤的机制包括氧化应激、死亡受体通路、线粒体通路及内质网通路^[7]。正常细胞内的活性氧主要包括超氧阴离子、羟自由基、氧自由基等, 当然, 双氧水、脂质过氧化物等活性氧的衍生物也属于活性氧。正常生理状态下, 活性氧是细胞内重要的信号因子, 细胞的生长、黏附、转录因子的活化等都与活性氧有关。一般情况下, 活性氧对细胞不构成伤

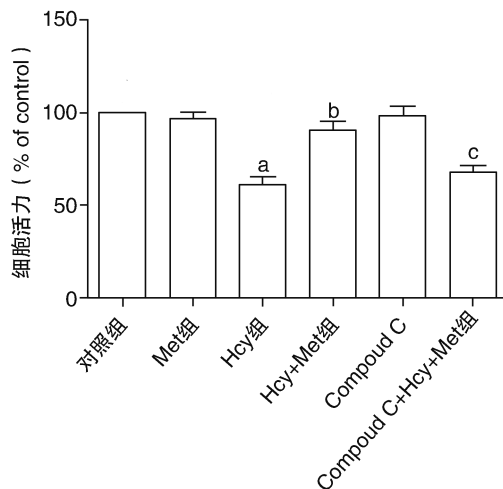


图 5. AMPK 抑制剂 Compound C 逆转二甲双胍的细胞保护作用 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 Hcy 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 Hcy+二甲双胍组相比。

Figure 5. Compound C (an AMPK inhibitor) could reverse the protection of metformin ($n=6$)

害,这主要归功于细胞内众多酶参与下的抗氧化系;当活性氧产生过多或者是抗氧化酶出现异常时,过量的氧自由基生成则会让细胞面临严重的损伤,甚至是凋亡或坏死。本研究中,Hcy 呈剂量依赖性抑制内皮细胞活力,Hcy 组 LDH 活性和 MDA 含量上升,而 SOD 活性下降,因此,氧化应激参与了 Hcy 对内皮细胞的损伤。

二甲双胍是目前应用最为广泛的抗糖尿病药物,目前的研究表明,二甲双胍不仅能够通过降低血糖产生心血管保护作用,还能够通过激活 AMPK 产生心脑血管保护作用,降低心血管事件及全因死亡率^[1-2],然而,目前二甲双胍对高 Hcy 引起的内皮损害的影响尚未见报道。本研究发现,二甲双胍并不会引起血管内皮细胞活力的损伤,二甲双胍可以减缓 Hcy 引起的血管内皮细胞活力下降,鉴于二甲双胍的保护作用可能是通过激活 AMPK 通路实现,本研究还通过 Western blot 检测各组 t-AMPK α 和 p-AMPK α 的表达,发现二甲双胍组、Hcy+二甲双胍组 p-AMPK α 的表达明显高于对照组和 Hcy 组,说明在血管内皮细胞中,二甲双胍能够明显激活 AMPK。加入 AMPK 抑制剂 Compound C 则可以逆转二甲双胍对 Hcy 对内皮细胞损伤的保护作用,说明 AMPK 在二甲双胍抑制 Hcy 引起的内皮细胞损伤中起到重要作用。

目前研究表明 AMPK 激活后具有抑制细胞内氧化应激的作用^[8-10],本研究也发现 Hcy+二甲双胍组 LDH 活性和 MDA 含量下降,而 SOD 活性上升;

Hcy 组 SOD1 和 CAT mRNA 的表达水平明显下降,而 NOX2 mRNA 的表达水平上升;Hcy+二甲双胍组 SOD1 和 CAT mRNA 的表达水平明显上升,而 NOX2 mRNA 的表达水平下降。二甲双胍可能是通过抑制血管内皮细胞的氧化应激,使细胞内的超氧阴离子、羟自由基、氧自由基等活性水平下降,产生血管内皮细胞保护作用。因此推测 AMPK-ROS 通路在二甲双胍抑制 Hcy 引起的细胞损伤中起到重要作用。

本研究是在细胞水平上观察 Hcy 对内皮细胞的细胞活力及氧化应激的作用,结果发现二甲双胍对 Hcy 损伤的内皮细胞有保护作用,其机制可能与二甲双胍激活 AMPK 有关。但是,二甲双胍激活 AMPK 后具体通过什么机制抑制细胞内氧化应激有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) [J]. Lancet, 1998, 352 (9131): 854-865.
- [2] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2008, 359 (15): 1 577-589.
- [3] Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, et al. SIRT3-AMP-activated protein kinase activation by nitrite and metformin improves hyperglycemia and normalizes pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction [J]. Circulation, 2016, 133 (8): 717-731.
- [4] Fu YN, Xiao H, Ma XW, et al. Metformin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via AMPK activation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32 (7): 879-887.
- [5] Xiao H, Ma X, Feng W, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1-Smad3 signalling pathway [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87 (3): 504-513.
- [6] Zhang D, Xie X, Chen Y, et al. Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo [J]. Circ Res, 2012, 110 (6): 808-817.
- [7] 朱琳,王彦军,俞天虹.红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (1): 5-10.
- [8] Colombo SL, Moncada S. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells [J]. Biochem J, 2009, 421 (2): 163-169.
- [9] Balteau M, Van Steenberghe A, Timmermans AD, et al. AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307 (8): H1 120-133.
- [10] Xu G, Wu H, Zhang J, et al. Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 87 (1): 15-25.

(此文编辑 文玉珊)