

血糖波动对人脐静脉血管内皮细胞腺苷酸活化蛋白激酶和过氧化物酶增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α 的影响

田翰林¹, 常柏², 田文静³

作者单位:¹ 铜仁市碧江区中医医院, 贵州 铜仁 554300; ² 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室、天津医科大学代谢病医院内分泌研究所, 天津 300070; ³ 贵州健康职业学院, 贵州 铜仁 554300

通信作者: 常柏, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为糖尿病基础及临床研究, E-mail: 493162946@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金(81473622、81273914); 铜仁市科技课题(2018)52号

摘要:目的 观察血糖波动对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和过氧化物酶增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α (PGC- 1α)的影响以探讨血糖波动对血管内皮损伤的机制。方法 体外培养HUVEC至第3代,将细胞分为:正常组:用5 mmol/L含葡萄糖和氨基酸的培养液(Glu DMEM)(模拟正常血糖环境);高糖组:25 mmol/L Glu DMEM培养液(模拟高糖环境);血糖波动组:交替用25 mmol/L和5 mmol/L Glu DMEM培养液,每8 h更换一次(模拟血糖波动环境),三组均培养48 h。使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。蛋白质印迹法(Western blot)、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组AMPK和PGC- 1α 蛋白与mRNA表达。结果 高糖组与血糖波动组两组早/晚期细胞凋亡率高于正常组($P < 0.001$),且血糖波动组早/晚期细胞凋亡率高于高糖组(均 $P < 0.05$);高糖组的AMPK和PGC- 1α 蛋白与mRNA表达分别为(0.232 ± 0.018)、(0.401 ± 0.013),血糖波动组AMPK和PGC- 1α 蛋白与mRNA表达分别为(0.158 ± 0.027)、(0.199 ± 0.010),均比正常组的(0.905 ± 0.032)、(0.946 ± 0.045)降低(均 $P < 0.05$),且血糖波动组AMPK和PGC- 1α 蛋白与mRNA表达低于高糖组(均 $P < 0.05$)。结论 血糖波动对血管内皮细胞损伤较高糖状态更为严重,其机制可能与AMPK/PGC- 1α 相关通路及细胞能量代谢改变有关。

关键词: 血糖波动; 能量代谢; 腺苷酸活化蛋白激酶; 过氧化物酶增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α ; 人脐静脉血管内皮细胞

Effects of blood glucose fluctuation on AMPK and PGC- 1α in human umbilical vein endothelial cells

TIAN Hanlin¹, CHANG Bai², TIAN Wenjing³

Author Affiliations: ¹ Bijiang District of TCM, Tongren, Guizhou 554300, China; ² NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Medical University Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300070, China; ³ Guizhou College of Health Professions, Tongren, Guizhou 554300, China

Abstract: Objective To observe the effect of blood glucose fluctuation on adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferators activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC- 1α) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and to explore the mechanism of blood glucose fluctuation on vascular endothelial injury. **Methods** The HUVECs were cultured in vitro for 3rd generation, and the cells were assigned into 3 groups: normal control group; 5 mmol/L glucose (Glu) DMEM culture medium (Glu DMEM) (simulating normal blood glucose); high glucose group; 25 mmol/L glu DMEM culture medium (simulating high blood glucose environment); glucose fluctuation group; alternate broth with 25 mmol/L and 5 mmol/L Glu DMEM, replaced once every 8 hours (simulating glucose fluctuations environment), and the three groups were all cultured for 48 hours. Flow cytometry was used to test its apoptosis rate. AMPK and PGC- 1α protein and mRNA expression in each group were detected by Western blot and RT-PCR. **Results** Early/late cell apoptosis rates in both high glucose group and glucose fluctuation group were higher than that in the normal control group (all $P < 0.001$), and the early/late apoptosis rate in the blood glucose fluctuation group was higher than that in the high glucose group (all $P < 0.05$). The expressions of AMPK and PGC- 1α protein and mRNA in high glucose group were (0.232 ± 0.018), (0.401 ± 0.013), respectively. The expressions of AMPK and PGC- 1α protein and mRNA in glucose fluctuation group were (0.158 ± 0.027), (0.199 ± 0.010), respectively, which were lower than those in the normal control group [(0.905 ± 0.032) , (0.946 ± 0.045), respectively] (all $P < 0.05$). The expressions of AMPK and PGC- 1α protein and mRNA in glucose fluctuation group was low-

er than those in high glucose group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Blood glucose fluctuation has more serious effect on the injury of vascular endothelial cells than high glucose, whose mechanism may be related to AMPK/PGC-1 α -related pathway and cellular energy metabolism changed by blood glucose fluctuation.

Key words: Blood glucose fluctuation; Energy metabolism; AMPK; PGC-1 α ; HUVEC

据世界卫生组织统计,2014 年全球成年人群糖尿病(DM)发病率高达 9%^[1],2015 年国际糖尿病联合会数据显示,全球 DM 患病人数已达到 4.15 亿,我国 2015 年 DM 患病人数居世界首位,高达 1.1 亿^[2]。同时 DM 大血管病变是公认的高致残疾病因素。近年中外研究发现,血糖波动相较于单纯性高血糖对血管内皮损伤更为严重,具体机制尚不明确。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一个由 α 、 β 、 γ 亚基形成的三聚体,被称为细胞能量的“燃料开关”“感受器”“低能警示系统”。受磷酸腺苷/三磷酸腺苷(AMP/ATP)比值调控,对细胞内能量代谢极为敏感,同时影响生理性一氧化氮(NO)产生、caspase-3 凋亡因子表达,从而影响血管内皮的功能^[3,4];过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)作为 AMPK 的下游效应分子,参与线粒体系统合成和个体合成的过程,从而影响内皮细胞能量代谢^[5]。本研究于 2016 年 12 月通过蛋白质印迹法(Western blot)和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测高糖/血糖波动下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中 AMPK、PGC-1 α 的蛋白表达与信使 RNA(mRNA)表达,以探讨血糖波动对血管内皮的影响。

1 材料与仪器

HUVECs(天津医科大学内分泌研究所),DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco 公司),肝素钠、明胶、内皮细胞生长因子(Sigma 公司),AMPK、PGC-1 α 抗体,anti- β (CST 公司)。显微镜、全自动图像分析仪(日本奥林巴斯公司),荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司),台式低/高速离心机(德国 Eppendorf 公司),PCR 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养实验分组和干预 HUVECs 复苏后用含 10% 胎牛血清的 5 mmol/L 含葡萄糖和氨基酸(Glu DMEM)的低糖培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 无菌培养箱内培养。每 24 h 换液一次,每 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期的第 3 代 HUVECs,倒掉培养液,经胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,以 $10^5/\text{mL}$ 浓度接种于六孔板中,参照文献^[6]设计血糖浓度、换药时间以及分组模式,将细胞分为三组:正常组用 5 mmol/L Glu DMEM 培养液,每 24 h 换液一次(模拟

正常糖环境);高糖组用 25 mmol/L Glu DMEM 培养液(模拟高糖环境),每 24 h 换液一次;血糖波动组用 25 mmol/L Glu DMEM 培养液和 5 mmol/L Glu DMEM 培养液,每 8 h 交替更换一次培养液(模拟血糖波动环境),将三组模型置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱培养 48 h,对相应指标进行观察。

2.2 流式细胞仪技术检测 HUVECs 凋亡 用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,2 000 r/min 离心 5 min,收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞;将细胞重悬于结合缓冲液 500 μL ,加入 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白(Annexin V-FITC)5 μL 和核酸染料(PI)5 μL ,轻混匀,室温避光反应 15 min,1 h 内进行分析。流式细胞仪激发波长 $E_x = 488 \text{ nm}$ 。用未经凋亡诱导处理的正常细胞作为对照,进行荧光补偿调节去除光谱重叠和设定十字门的位置,每组做 3 个平行反应。

2.3 Western blot 检测高糖及血糖波动对 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白表达的影响 取干预后的细胞用预冷的 PBS 冲洗两遍,加入细胞裂解液 5 min,12 000 r/min 低温离心 15 min,聚氨基丙烯酸正丁酯试剂检测法(BCA 法)检测总蛋白量,每样品取 20 滴上样,蛋白质双向电泳(DS-PAGE 电泳)分离,转膜,10 V 恒压通电 80 min。加一抗:抗 AMPK(1:1 000 稀释)、抗 PGC-1 α (1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。辣根过氧化物酶(HRP)标记的特异性二抗(1:2 000)及 HRP 标记的抗生物素抗体(1:1 000)室温下孵育 1 h。显影、定影、洗片。结果用凝胶成像软件定量扫描条带灰度,以目的蛋白条带/ β -actin 蛋白条带的比值反映各自的蛋白表达水平,每组取 6 个样本测试。

2.4 RT-PCR 检测高糖、血糖波动对 AMPK 与 PGC-1 α mRNA 表达影响 将干预后的细胞,超纯 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,引物序列:AMPK 上游引物 5'-TGGCAAACATGAATTGACTGG-3';下游引物 5'-GCTTGAGGTTCTGAATTTCTCTG-3';产物长度 113 bp;PGC-1 α 上游引物:5'-AGAAGCGGGAGTC TGAAA GG-3',下游引物:5'-CAGTTCTGTCCGCGTTGTG-3',产物长度 483 bp;用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,共 45 个循环。扩增后,60 ~

95 ℃进行融解曲线分析,目的基因和对照基因的 C_t 值经荧光定量分析仪自动采集给出,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对量,每组取 6 个样本测试。

2.5 统计学方法 统计学分析采用 SPSS 17.0 软件进行。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用成组 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析 + LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组内皮细胞凋亡率比较 数据及统计结果见表 1。整体分析(单因素方差分析)及两两比较(LSD- t 检验)显示:内皮细胞凋亡率的 4 个指标,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合数据看:早晚期细胞凋亡指标由高至低依次为血糖波动组、高糖组、正常组;机械损伤细胞指标由高至低依次为高糖组、血糖波动组、正常组;存活细胞指标由高至低依次为正常组、高糖组、血糖波动组。

表 1 高糖、血糖波动对 HUVECs 凋亡率影响/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	次数	早期细胞 凋亡	晚期细胞 凋亡	机械损伤 细胞	存活 细胞
正常组	3	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.04 ± 0.01	98.10 ± 0.99
高糖组	3	2.46 ± 0.25 ^a	20.56 ± 1.74 ^a	2.50 ± 0.19 ^a	72.53 ± 1.49 ^a
血糖 波动组	3	3.40 ± 0.16 ^{ab}	25.77 ± 1.81 ^{ab}	0.50 ± 0.14 ^{ab}	67.32 ± 1.08 ^{ab}
F 值		266.620	260.232	287.796	555.507
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:两两比较显著性标记 a、b 分别为和正常组、高糖组比较, $P < 0.05$

3.2 各组内皮细胞 AMPK 和 PGC-1 α 相对蛋白表达的变化 各组细胞 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白条带图见图 1,数据及统计结果见表 2。整体分析(单因素方差分析)及两两比较(LSD- t 检验)显示:各组内皮细胞 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白表达,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合数据看:均以血糖波动组为最低,正常组最高。

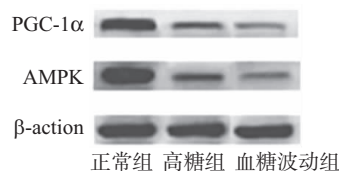


图 1 不同血糖水平下脐静脉内皮细胞 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白的表达

3.3 各组内皮细胞 AMPK 和 PGC-1 α 相对基因表达的变化 数据及统计结果见表 3。整体分析(单因素方差分析)及两两比较(LSD- t 检验)显示:细胞 AMPK 和 PGC-1 α 相对基因表达,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合数据看:两基因表达水平都是血糖波动组为最低,正常组最高。

表 2 各组细胞 AMPK 和 PGC-1 α 相对蛋白表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	样本量	AMPK	PGC-1 α
正常组	6	0.905 ± 0.032	0.946 ± 0.045
高糖组	6	0.232 ± 0.018 ^a	0.401 ± 0.013 ^a
血糖波动组	6	0.158 ± 0.027 ^{ab}	0.199 ± 0.010 ^{ab}
F 值		1 465.623	1 153.373
P 值		<0.001	<0.001

注:两两比较显著性标记 a、b 分别为和正常组、高糖组比较 $P < 0.05$

表 3 各组细胞 AMPK 和 PGC-1 α 相对基因表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	样本量	AMPK	PGC-1 α
正常组	6	1	1
高糖组	6	0.418 ± 0.023 ^a	0.401 ± 0.036 ^a
血糖波动组	6	0.329 ± 0.038 ^{ab}	0.308 ± 0.031 ^{ab}
F 值		1 158.265	1 100.540
P 值		<0.001	<0.001

注:两两比较显著性标记 a、b 分别为和正常组、高糖组比较, $P < 0.05$

4 讨论

高血糖可直接损伤内皮细胞,诱发其分泌与释放趋化因子、黏附分子等炎性介质的平衡失调,以至于刺激血管内皮细胞炎症反应;同时高糖可间接引起内质网应激、胰岛素抵抗、氧化应激和脂代谢紊乱等病理反应,导致内皮细胞功能紊乱,降低存活率,促进凋亡。高糖环境亦可活化多元醇通路,增强己糖胺途径,蛋白激酶 C 激活等,导致改变细胞氧化还原状态,介导细胞功能损害^[7-8]。血糖波动对血管功能造成损害是多途径的,且其对血管内皮细胞的损伤相较于单纯性高糖更为严重^[9-10]。本研究结果显示,体外血糖波动及持续高糖培养可诱导 HUVECs 发生凋亡,且血糖波动组凋亡率高于高糖组。

AMPK 受 AMP/ATP 比值调控,氧化应激、缺血缺氧、代谢产物等导致 AMP/ATP 比值升高的因素都可通过 AMPK α 1 亚基 172 位苏氨酸磷酸化或直接变构激活 AMPK。AMPK 激活后,通过下游 SIRT1/PGC-1 α 信号途径,引起线粒体氧化磷酸化能力增强,开启生成 ATP 产能的途径^[11]。AMPK 也通过对游离脂肪酸(FFA)氧化的促进从而拮抗 FFA 造成的内皮细胞脂毒性,以此对血管内皮产生保护^[12]。AMPK 通路中,其通过调节内皮-氧化氮合酶活性,刺激 NO 的产生,改善内皮功能^[13-14]。活化的 AMPK 通过其下游的靶分子如组蛋白脱乙酰酶(SIRT1)、FOXO 和 PGC-1 α 抑制核因子- κ B(NF- κ B)信号,随后降低炎症因子的表达^[15]。高糖

引起的血管内皮细胞中 caspase-3 的活性在 AMPK 激活时可被抑制,从而减少细胞凋亡^[16]。

PGC-1 α 作为 AMPK 的下游效应分子,AMPK 不仅能增加 PGC-1 α 的表达,且直接能够导致其磷酸化,此过程是 PGC-1 α 依赖性介导的 PGC-1 α 的启动子激活所必需的。研究表明:细胞能量代谢中线粒体起着决定性作用,作为能量代谢最重要的场所,对细胞生长、增值、凋亡以及信号转导等过程直接参与。而线粒体的生成中 PGC-1 α 可能是其关键调控因子,可对生物刺激调控线粒体表达与合成直接做出相应反应^[17-18]。被 PGC-1 α 调控的线粒体生成信号途径可能是修复与维持血管内皮细胞线粒体功能的一项主要机制^[19]。

本研究中,在高糖及血糖波动状态下血管内皮细胞 AMPK 和 PGC-1 α 蛋白表达和 mRNA 表达都呈下降表现,而且血糖波动状态下的表达下降更为明显,细胞凋亡率也更高,但具体损伤机制尚不明确,考虑与血糖波动状态下改变了内皮细胞能量代谢平衡,导致能量消耗异常以至于 AMP/ATP 比值改变,从而使 AMPK 激活减少,PGC-1 α 作为 AMPK 下游效应分子表达下降,使得整个 AMPK 通过调节 PGC-1 α -核呼吸因子-1 通路中激活编码线粒体蛋白的核基因和线粒体 DNA 的转录复制异常,线粒体表达受到影响,内皮细胞修复功能受损^[20-21]。另一方面 AMPK、PGC-1 α 表达减少也导致其相应信号通路、合成代谢与分解代谢异常,生理性 NO 的产生减少、炎性因子、caspase-3 表达上升等自身防御机制异常,继而导致血管内皮损伤。

综上所述,本研究初步结果显示,血糖波动对血管内皮细胞的损害程度高于持续高血糖,部分机制与其影响 AMPK/PGC-1 α 相关通路及细胞能量代谢改变有关,确切机制值得进一步探讨。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014[R]. Geneva: World Health organization, 2014.
- [2] 刘子琪,刘爱萍,王培玉. 中国糖尿病患病率的流行病学调查研究状况[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2015, 14(7): 547-550.
- [3] SONG P, WANG S, HE C, et al. AMPK α 2 deletion exacerbates neointima formation by upregulating Skp2 in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2011, 109(11): 1230-1239.
- [4] HAN D, YANG B, OLSON LK, et al. Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from high glucose[J]. Biochem J, 2010, 425(3): 541-551.
- [5] ARANY Z, HE H, LIN J, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle[J]. Cell Metab, 2005, 1(4): 259-271.
- [6] XIAO X, DONG Y, ZHONG J, et al. Adiponectin protects endothelial cells from the damages induced by the intermittent high level of glucose[J]. Endocrine, 2011, 40(3): 386-393.
- [7] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [8] CERIELLO A. Oxidative stress and diabetes-associated complications[J]. Endocr Pract, 2006, 12(Suppl 1): 60-62.
- [9] CALKIN AC, DREW BG, ONO A, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux[J]. Circulation, 2009, 120(21): 2095-2104.
- [10] EL-OSTA A, BRASACCHIO D, YAO D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia[J]. J Exp Med, 2008, 205(10): 2409-2417.
- [11] HARDIE DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase[J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(4): 891-896.
- [12] LOCHNER M, BEROD L, SPARWASSER T. Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function[J]. Trends Immunol, 2015, 36(2): 81-91.
- [13] IDO Y, CARLING D, RUDERMAN N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation[J]. Diabetes, 2002, 51(1): 159-167.
- [14] CALVERT JW, GUNDEWAR S, JHA S, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling[J]. Diabetes, 2008, 57(3): 696-705.
- [15] VERSARI D, DAGHINI E, VIRDIS A, et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(4): 527-536.
- [16] MORARI J, TORSINI A S, ANHÊ G F, et al. The role of proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents[J]. Metabolism, 2010, 59(2): 215-223.
- [17] SEBASTIANI M, GIORDANO C, NEDIANI C, et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(14): 1362-1369.
- [18] BROWN DA, O'ROURKE B. Cardiac mitochondria and arrhythmias[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(2): 241-249.
- [19] PARK DR, KIM JS, KIM CK. The effect of SIRT1 protein knock down on PGC-1 α acetylation during skeletal muscle contraction[J]. J Exerc Nutrition Biochem, 2014, 18(1): 1-7.
- [20] 任单单, 李晶, 常柏, 等. 抵挡汤早期干预对糖尿病大鼠腺苷酸活化蛋白激酶信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(10): 72-77.
- [21] 李博, 田瑞霞, 杨卫景, 等. PGC-1 α 的功能与代谢病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(11): 1013-1018.

(收稿日期: 2017-07-20, 修回日期: 2017-08-07)