

脂联素对高糖环境下人心肌细胞增生及 caspase - 3、T - 钙黏蛋白表达的影响

李舒帆 李 兴

摘 要 **目的** 研究脂联素(ADPN)对高糖环境下人心肌细胞(HCM)的增生及 caspase - 3、钙黏蛋白(T - cadherin)表达的影响。**方法** ①分为3组:对照组、高糖组、高糖 + 脂联素组;②分别干预24h、48h、72h后用MTT法测定细胞增生,ELISA法测定上清液中caspase - 3的含量,荧光定量PCR法测定T - 钙黏蛋白的表达。**结果** 高糖的持续作用可以抑制细胞增生,增加caspase - 3的表达;加入脂联素后促进细胞增生,同时减少caspase - 3的表达。T - 钙黏蛋白在高糖组表达较对照组减少,脂联素组表达较高糖组增加,且呈时间依赖性。**结论** 脂联素可以纠正高糖诱导的人心肌细胞凋亡,通过上调T - 钙黏蛋白的表达发挥对心肌细胞的保护作用。

关键词 脂联素 心肌细胞 T - 钙黏蛋白 caspase - 3

Effects of Adiponectin on Cell Proliferation and Expression of caspase - 3 and T - cadherin in Human Cardiac Myocytes Cultured with High Glucose. Li Shufan, Li Xing. Department of Endocrinology, The Second Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To investigate the effects of ADPN on proliferation and the expression of caspase - 3 and T - cadherin in HCM cultured with high glucose. **Methods** ①The cells were divided into 3 groups: normal glucose group, high glucose group and high glucose plus ADPN group. ②After cells being cultured for 24h, 48h and 96h, the proliferation activity of HCM was observed by MTT. The expression of caspase - 3 was detected by ELISA. The expression of T - cadherin was detected by Real - Time PCR. **Results** The continuing role of high glucose could inhibit cell proliferation and increase expression of caspase - 3, but the proliferation of HCM was promoted and the expression of caspase - 3 was reduced after addition of ADPN. Compared with N group, the expression of T - cadherin was decreased in high glucose group, but increased in ADPN group. **Conclusion** The ADPN can rectify high glucose - induced apoptosis of HCM, and thus plays a protective effect on myocardial cells by upregulating the T - cadherin expression.

Key words Adiponectin; Cardiac myocytes; T - cadherin; Caspase - 3

糖尿病心肌病可诱发心力衰竭、心律失常、心源性休克和猝死,已经成为糖尿病患者最主要的死因之一。脂联素是近年来发现的对糖尿病具有保护作用的特殊蛋白质,脂联素与脂联素受体在糖尿病及其并发症的发生发展中的作用日益受到重视,而T - 钙黏蛋白做为一种新的脂联素受体逐渐为人们所关注。本研究通过观察在高糖及脂联素的干预下人心肌细胞的增生、凋亡及T - 钙黏蛋白的表达情况,旨在探讨脂联素对人心肌细胞可能的保护机制以及脂联素与T - 钙黏蛋白之间的相互关系。

材料与方法

1. HCM 细胞的处理与培养: HCM 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于含 5% CO₂、37℃ 恒温培养

箱中孵育,每 3 ~ 4 天用 0.25% 胰酶消化传代。

2. 实验分组: 分为 3 组: 对照组 (5.5 mmol/L 葡萄糖, N 组)、高糖组 (30 mmol/L 葡萄糖, G 组)、高糖 + 脂联素组 (30 mmol/L 葡萄糖 + 2.5 μg/ml ADPN, A 组), 分别干预 24h、48h、72h。

3. MTT: 取对数期 HCM 接种于 96 孔板, 接种密度为 1×10^5 个/毫升, 培养 24h 后弃去旧液, 按实验分组进行干预, 加入 25 μl MTT, 继续孵育 4h, 弃上清加入 DMSO 溶解, 于酶标仪 450 nm 处测吸光值 (OD)。

4. ELISA: 采用酶联免疫试剂盒, 按说明书操作, 将各时间点收集到得细胞上清液在常温下溶解, 各取 100 μl 分别加入已包被好 caspase - 3 抗体的 ELISA 96 孔板中。ELISA 间接夹心法检测反应终止后, 用酶联免疫检测仪测定 450 nm 处的 A 值, 根据 caspase - 3 标准品 A 值曲线, 换算所测上清液中 caspase - 3 的含量。

5. 荧光定量 PCR: (1) 总 RNA 的提取: 细胞生长达 80% 融合状态时, 弃去旧液, 按实验分组进行干预, 弃去上清液, 加入 Trizol 试剂提取总 RNA。(2) 反转录反应: 反转录反应体系

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目 (2007 - 95)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二临床医学院内分泌科

通讯作者: 李兴, 电子信箱: lixinglaoshi@yahoo.com.cn

为 20μl,按照反转录说明书合成 cDNA。(3)荧光定量 PCR 引物及探针:引物 T-cadherin 上游序列:5'-TGTTGGCAAGG-TACTCGATAGT,G-3';下游序列:5'-GACGCTCCCTGTGT-TCTCATT-3';Taqman 荧光探针序列:5'(FAM)-AAAGGTC-CAAG,TTCCGGCTCACTGGA-(BNQ1)3'。内参 β-actin 上游序列:5'-GGCAGCCAGCACAAATGAA-3';下游序列:5'-GGAAGGTGGACAGCGAGG-3';Taqman 荧光探针序列:5'(FAM)-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-(BNQ1)3'。反应条件:荧光定量 PCR 反应体系为 20μl,在 PCR 扩增仪上按照 94℃,2min;然后 94℃ 20s,60℃ 40s,共 40 个循环。由 PCR 反应曲线得到 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt}方法计算相对定量结果。

6. 统计学分析:采用 SPSS13.0 统计软件,各数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞增生:由表 1 可知,G 组与 N 组比较 24h 细胞增生能力增加,48h、72h 细胞增生受抑制($P < 0.05$);A 组与 G 组比较 24h 差异无统计学意义,48h、72h 细胞增生能力明显增加($P < 0.05$)。

2. caspase-3:由表 2 可知,G 组与 N 组比较 24h caspase-3 的表达差异无统计学意义,48h、72h 表达明显增加($P < 0.05$);A 组 24h、48h、72h 其表达均较 G 组明显减少($P < 0.05$)。

3. T-钙黏蛋白:由图 1 可知,24h、48h、72hG 组与 N 组相比 T-钙黏蛋白的表达减少,A 组与 G 组相比 T-钙黏蛋白的表达增加,且具有时间依赖性。

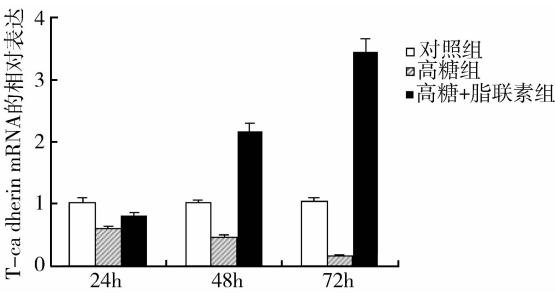


图 1 各实验组心肌细胞 T-钙黏蛋白 mRNA 的表达

增厚等,导致左室舒张功能障碍,逐步出现收缩功能的受损,最终发展为充血性心力衰竭。心肌细胞具有不可再生的特点,在糖尿病心肌病变过程中存在心肌细胞的凋亡,并随心脏功能的降低而加速,从而导致心肌收缩单位的丧失,加速心力衰竭的形成。心肌细胞的凋亡与氧化应激增加、ROS 系统激活、PKC 的活化、TNF-α、胰岛素样生长因子-1 等多种因素的作用有关。研究证明,高血糖诱发细胞凋亡至少部分是通过 ROS 系统刺激细胞色素 C 来激活 caspase-3 通路而形成的^[1]。本研究观察到随着高糖的持续刺激心肌细胞增生受到抑制,凋亡相关因子 caspase-3 的表达增加,而脂联素则可以纠正由高糖诱导的该细胞的凋亡。脂联素是近年来发现的由脂肪细胞分泌的蛋白质,通过抗炎、损伤后抗内膜增生、保护血管内皮细胞、抗动脉粥样硬化、增加胰岛素敏感性等多种途径发挥对抗糖尿病的作用。国内外大量的研究表明脂联素是糖尿病心肌病的保护因子,低脂联素水平是糖尿病心肌病的发病机制之一^[2]。脂联素受体介导了脂联素的各种生物学效应,脂联素及其受体 1 和受体 2 的保护作用已有大量研究。T-钙黏蛋白是 2004 年 Hug 用分子克隆技术发现的一种新的脂联素受体,可与六聚体和高分子质量多聚体的脂联素结合,在心血管系统中表达最高^[3]。

田腊梅等证实 T-钙黏蛋白在 1 型糖尿病大鼠的心肌细胞膜及核周都有表达,其表达量与血清脂联素水平呈正相关,且随着病变的进展表达逐渐增加^[7]。由于 T-钙黏蛋白缺乏胞内部分,可以认为其对脂联素信号转导通路及功能不起作用,可能仅是脂联素的一个结合蛋白。但也有学者认为,T-钙黏蛋白可以通过与其他膜蛋白结合而参与信号转导,从而引起后继事件的发生^[4]。研究发现,1 型糖尿病心肌细胞在高糖环境下易发生氧化应激而凋亡,脂联素可通过抑制高糖环境中活性氧簇的产生和升高一氧化氮合酶的活性从而发挥抗氧化作用,抑制心肌细

表 1 各实验组心肌细胞增生的比较(OD 值)(n=3)

组别	24h	48h	96h
对照组	0.299 ± 0.010	0.355 ± 0.010	0.409 ± 0.013
高糖组	0.378 ± 0.007 *	0.335 ± 0.008 *	0.281 ± 0.016 *
高糖+脂联素组	0.365 ± 0.022	0.426 ± 0.004 #	0.498 ± 0.019 #

* 与对照组相比, $P < 0.05$;# 与高糖组相比, $P < 0.05$

表 2 各实验组心肌细胞 caspase-3 表达的比较(ng/ml)(n=3)

组别	24h	48h	96h
对照组	0.694 ± 0.087	0.570 ± 0.020	0.424 ± 0.013
高糖组	0.796 ± 0.016	2.883 ± 0.060 *	3.312 ± 0.013 *
高糖+脂联素组	0.672 ± 0.023 #	0.508 ± 0.012 #	0.113 ± 0.016 #

* 与对照组相比, $P < 0.05$;# 与高糖组相比, $P < 0.05$

讨 论

糖尿病心肌病是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一。其典型病理改变为心肌细胞肥大、心肌间质增生及纤维化、心肌局灶性坏死、心肌血管壁

胞的凋亡^[5]。本研究发现脂联素可以时间依赖性的增加高糖环境下心肌细胞 T-钙黏蛋白的表达,可能与氧化应激时 T-钙黏蛋白上调性表达有关,通过与脂联素结合后激活磷脂酰肌醇-3-激酶信号途径从而对抗氧化应激导致的细胞凋亡,并且可以提高细胞在氧化应激状态下的生存能力^[6]。说明脂联素可以通过上调受体 T-钙黏蛋白的表达发挥对心肌细胞的保护作用,且这种保护作用呈时间依赖性,从而为临床治疗糖尿病心肌病提供新的思路。

参考文献

- 1 Lu cai, Wei Li. Hyperglycemia - Induced Apoptosis in Mouse Myocardium[J]. Diabetes, 2002, 51: 1938 - 1948
- 2 Tsujino, Takeshi, Kawasaki, *et al.* Left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: pathophysiology and therapeutic implications[J]. American Journal of Cardiovascular Drugs, 2006, 6(4): 219 - 230

- 3 Hug C, Wang J, Ahmad NS, *et al.* T - cadherin is a receptor for hexameric and high - molecular - weight forms of Acrp 30 / adiponectin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (28): 10308 - 10313
- 4 Bromhead C, Miller J H, McDonald F J. Regulation of T - cadherin by hormones, glucocorticoid and EGF [J]. Gene, 2006, 374: 58 - 67
- 5 Motoshima H, Wu X, Mahadev K, *et al.* Adiponectin suppresses proliferation a superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated oxidized LDL[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315: 264 - 271
- 6 Manjunath B. Joshi, Maria Philippova, Danila Ivanov, *et al.* T - cadherin protects endothelial cells from oxidative stress induced apoptosis [J]. FASEB, 2005, 10: 1096 - 1119
- 7 田腊梅, 李兴. 脂联素及 T-钙黏蛋白与大鼠糖尿病心肌病的关系 [J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(8): 505 - 506

(收稿: 2010 - 01 - 18)

(修回: 2010 - 04 - 07)

叶绿素铜钠联合三黄三仙汤治疗免疫介导再生障碍性贫血的动物实验研究

蒋慧芳 魏克民 王 勇

摘 要 目的 探讨叶绿素铜钠联合三黄三仙汤(YST)对再生障碍性贫血的治疗作用及机制。**方法** 动物实验研究:建立免疫介导再生障碍性贫血(AA)小鼠模型,随机分为空白对照组、模型对照组、CsA 对照组、叶绿素铜钠盐组、叶绿素铜钠联合三黄三仙汤(YST)组,每组 10 只,2 周后处死检测血象、骨髓像、骨髓病理切片、外周血 CD4⁺、CD8⁺、TNF- α 、IL-6 含量。**结果** YST能延长模型小鼠生存,降低模型小鼠的死亡率;改善模型小鼠的外周血红细胞,白细胞及血小板;提高骨髓有核细胞数;改善骨髓病理改变;降低外周血 CD8⁺细胞,增加 CD4⁺细胞比率,提高 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值;降低血 TNF- α 、IL-6 水平;与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** YST 对 AA 模型小鼠有较好的治疗作用。

关键词 叶绿素铜钠盐 贫血 再生障碍性 治疗 IL-6 TNF- α

Animal Research of Immune - mediated Aplastic Anemia Treatment by YST. Jiang Huifang, Wei Kemin, Wang Yong. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To investigate therapeutic effect of YST in aplastic anemia and its mechanism. **Methods** Sixty immune - mediated aplastic anemia (AA) mice were established and then divided into five groups: normal control group, model control group, CsA control group, sodium copper chlorophyll group, YST group. After being treated 2 weeks, they were put to death and the hem gram, bone marrow, as well as bone marrow biopsy, CD4⁺, and CD8⁺, in peripheral blood, TNF- α and IL-6 were detected. **Results** YST can extend the survival period of the mice and reduce the mortality rate. The possibly mechanism may be the following: improving the model mice peripheral blood erythrocytes, leukocytes and platelets; increasing the nucleated cells and pathological changes of bone marrow; and at the cellular level, reducing the peripheral blood CD8⁺ cells and increasing the ratio of CD4⁺ cells, thus improving T cell ratio of CD4⁺/CD8⁺; possible decreasing serum TNF- α and IL-6 levels. It is significant different and $P < 0.05$. **Conclusion** YST has an effective effect on aplastic anemia mice.

Key words Sodium copper chlorophyll; Aplastic; Anemia; Therapy; IL-6; TNF- α

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(Y2008CA024)

作者单位:310012 杭州,浙江省立同德医院(蒋慧芳、魏克民);浙江中医药大学(王勇)