

教授于 2009 年研发的 COPD 评估测试 (CAT) 是目前比较简便实用的测试问卷^[5]。研究显示, CAT 拥有与复杂的 SGRQ 问卷非常相似的评估能力, 适用于所有确诊 COPD 患者的生活质量评估。CAT 也是 GOLD 2011 推荐的评估问卷之一^[11]。本研究中笔者采用 CAT 问卷评估患者的生活质量, 结果显示, 治疗前 EIEN 组和对照组患者的 CAT 评分分别为 33.8 ± 5.5 、 32.5 ± 6.1 , 提示 COPD 对患者生活质量的影响非常严重。治疗后, 随着病情好转, 两组患者 CAT 评分均有显著下降, 生活质量改善。在生态免疫肠内营养组患者, 这种改善更为明显, CAT 评分为 17.2 ± 5.3 , 提示 COPD 对患者生活中度影响。而在对照组患者, CAT 评分为 24.6 ± 4.8 , COPD 对患者生活质量的影响仍然严重。

综上所述, 对 COPD 急性加重患者, 采用生态免疫肠内营养这种新型的营养支持模式可显著改善患者的营养状况、免疫功能及生活质量, 疗效优于普通肠内营养制剂, 值得进一步研究并在临床推广应用。

参考文献

- Collins PF, Elia M, Stratton RJ. Nutritional support and functional capacity in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Respirology*, 2013, 18(4): 616-629
- Varraso R, Camargo CA Jr. More evidence for the importance of nutritional factors in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(6): 1301-1302

- Bengmark S. Ecoimmunonutrition: a challenge for the third millennium[J]. *Nutrition*, 1998, 14(7-8): 563-572
- 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4): 255-264
- Jones PW, Harding G, Berry P, et al. Development and first validation of the COPD Assessment Test[J]. *Eur Respir J*, 2009, 34(3): 648-654
- Huertas A, Palange P. COPD: a multifactorial systemic disease[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2011, 5(3): 217-224
- Günay E, Kaymaz D, Selcuk NT, et al. Effect of nutritional status in individuals with chronic obstructive pulmonary disease undergoing pulmonary rehabilitation[J]. *Respirology*, 2013, 18(8): 1217-1222
- Itoh M, Tsuji T, Nemoto K, et al. Undernutrition in patients with COPD and its treatment[J]. *Nutrients*, 2013, 5(4): 1316-1335
- DeBellis HF, Fetterman JW Jr. Enteral nutrition in the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patient[J]. *J Pharm Pract*, 2012, 25(6): 583-585
- Wang G, Wen J, Xu L, et al. Effect of enteral nutrition and ecoimmunonutrition on bacterial translocation and cytokine production in patients with severe acute pancreatitis[J]. *J Surg Res*, 2013, 183(2): 592-597
- GOLD Executive Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary Disease (Revised 2011) [EB/OL]. [2012-11-16]. [http://www. goldcopd. com](http://www.goldcopd.com)

(收稿日期: 2014-03-03)

(修回日期: 2014-03-24)

肌肽对高糖引起的 HUVECs 细胞损伤的保护作用

庄旭东 师 岩

摘 要 目的 探讨肌肽对高糖环境中的人脐静脉内皮细胞的氧化损伤的减弱作用。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUVECs), 分为正常对照组、高糖损伤组和肌肽预保护组。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-3,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法检测细胞存活率, 检测各组细胞上清液中丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的含量以反映内皮细胞的氧化应激水平, 并检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase-3) 蛋白活性。**结果** MTT 检测结果显示, 细胞存活率随着高糖刺激时间和高糖浓度的增加而逐渐降低, 而肌肽预保护组细胞的存活率显著高于高糖处理组 ($P < 0.05$); 高糖组与对照组相比, MDA、LDH 含量明显增高, SOD 含量显著下降, 而肌肽预保护组与高糖组相比, MDA、LDH 含量明显下降, SOD 含量显著升高 ($P < 0.05$)。caspase-3 活性检测结果显示高糖组活性比正常糖对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而肌肽预保护组与高糖组相比, caspase-3 活性显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 肌肽能够减弱高糖诱导的 HUVECs 细胞氧化应激损伤。

关键词 肌肽 高糖 氧化损伤 人脐静脉内皮细胞

[中图分类号] R392.1

[文献标识码] A

Carnosine Attenuates High Glucose-Induced Injury in HUVECs. Zhuang Xudong, Shi Yan. Department of Biochemistry, Qiqihar Med-

基金项目: 黑龙江省教育厅科研基金资助项目 (12521630); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目

作者单位: 161006 齐齐哈尔医学院医学技术学院检验专业 (庄旭东), 生物化学教研室 (师岩)

通讯作者: 师岩, 电子信箱: happy-3650814366@sohu.com

ical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To explore attenuate effects of carnosine on high glucose - induced oxidative injury in HUVECs. **Methods** HUVECs cultured in vitro were divided into three groups: normal control group, high glucose damage group and a group pretreated with carnosine. The viability of HUVECs exposed to different concentrations of glucose were measured by MTT assay. Oxidative stress was evaluated by detecting levels of MDA, LDH and SOD in the supernatant of culture media. And the activation of caspase - 3 was measured to reflect the extent of cell apoptosis. **Results** MTT assay results showed that the viability decreased with the increase of glucose concentration and time, while the group pretreated with 20mmol/L carnosine could increase the viability significantly ($P < 0.05$). The results showed significant increase of MDA and LDH levels and decrease of SOD activity in the high glucose group compared with the control group. However, in group pretreated with 20mmol/L carnosine, MDA and LDH levels decreased and SOD activity increased significantly compared with the high glucose group ($P < 0.05$). The activation of cleaved caspase - 3 protein increased in high glucose group ($P < 0.05$), compared with the control group. But the activation of caspase - 3 decreased in the group pretreated with 20mmol/L carnosine group ($P < 0.05$). **Conclusion** Carnosine can attenuates high glucose - induced oxidative injury in endothelial cells.

Key words High glucose; Carnosine; Oxidative damage; Human umbilical vein endothelial cells

糖尿病血管并发症是糖尿病常见的并发症之一,且发生早、预后差、病死率高,其引发的心脑血管疾病是糖尿病患者致死致残的主要原因,约占糖尿病患者死亡原因的60%~70%^[1]。如何有效保护血管内皮细胞,成为防治糖尿病血管并发症的关键^[2]。2004年,美国糖尿病学会提出糖尿病及其血管并发症都有统一的发病机制,即高血糖引起的氧化应激损伤、氧化应激致使大量氧自由基及活性氧直接损伤血管内皮细胞,引起细胞凋亡,最终表现为内皮细胞功能障碍^[3]。因此抗氧化治疗成为防治糖尿病血管病变的一个有效途径。研究显示,肌肽作为一种内源性的抗氧化剂,它具有水溶性好、性质稳定、分子质量低、易于被机体利用等优点^[4]。本实验以体外培养的人脐静脉内皮细胞为对象,建立高糖诱导的细胞损伤模型,观察肌肽能否减弱高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤,为肌肽在防治糖尿病血管并发症方面提供理论依据。

材料与方法

1. 实验材料:人脐静脉内皮细胞 HUVECs 本实验室保存(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心);肌肽(美国 Sigma 公司);胎牛血清(Hyclone, 美国);0.25% 胰酶 - 0.02% EDTA (吉诺生物医药技术有限公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒检测试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);caspase - 3 活性检测试剂盒(南京凯基生物公司)。

2. 实验方法:(1)人脐静脉内皮细胞 HUVECs 常规培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。(2)实验分组及预处理方式。细胞分组:①正常对照组(NC 组),葡萄糖浓度为 5.5mmol/L;②高糖损伤组(HG 组),葡萄糖浓度各为 20、25、30mmol/L;③高糖 + 肌肽预保护组(Car + HG 组),高糖刺激的细胞,提前 6h 加入 20mmol/L 肌

肽预保护。(3)MTT 法检测细胞的存活率:细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板,含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养 24h 后,弃培养液,更换不含血清的 DMEM 培养液培养 6h,使细胞同步化。分组同上,每组设 6 个平行孔,再培养 24、48、72h 后,加 50μl 新鲜配制的 1mg/ml MTT,于 37℃、5% CO₂ 培养 4h 后,弃培养液,每孔加入 150μl DMSO,轻摇 10min 溶解紫色结晶。30min 内利用酶标仪在 490nm 波长下检测光密度(OD)值。(4)检测细胞培养上清液中 MDA、LDH、SOD 的含量:分别检测对照组、高糖组和肌肽预保护组的细胞上清液中 MDA、LDH、SOD 含量,从而反映各组细胞的氧化应激水平。检测 MDA、LDH、SOD 的细胞上清液取样量分别为 200、100、150μl,采用化学比色法,按试剂盒说明书操作。(5)分光光度法检测肌肽对细胞 caspase - 3 活性的影响:按照 caspase - 3 活性试剂盒说明书操作。分光光度计在 400 nm 波长检测各组细胞的吸光度值,确定各组细胞 caspase - 3 活性的值,比较各组细胞的凋亡损伤程度。

3. 统计学方法:运用 SPSS 16.0 软件进行分析。数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间的差异采用 *t* 检验法进行处理,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 人脐静脉内皮细胞形态学观察:倒置相差显微镜下观察结果显示,正常对照组细胞培养 24、48、72h 时,始终呈现单层铺路石样排列,细胞以多形性和短梭形为主,细胞边缘清晰,具有较强的折光性,细胞核椭圆形,核膜胞膜完整,细胞胞质内无明显颗粒样物质及异常包涵体。高糖组细胞于 48h 增殖旺盛,细胞数量明显多于正常糖的细胞,但细胞形态较差。而 72h 后,高糖组细胞开始出现明显细胞变圆、体积缩小、大量细胞脱壁浮起,细胞变形、皱缩,折光性弱,细胞间边缘模糊,胞质内颗粒增多,可见细胞碎片;而高糖中加入肌肽预保护组细胞形态接近于正常糖对照组(图 1)。



图 1 倒置相差显微镜观察培养 72h 的人脐静脉内皮细胞形态 (×400)
A. 正常对照组 (5.5mmol/L); B. 高糖损伤组 (25mmol/L); C. 高糖 (25mmol/L) + 肌肽预保护 (20mmol/L) 组

2. MTT 检测不同浓度葡萄糖及肌肽对 HUVECs 细胞存活率的影响: 与正常对照组相比, 20、25、30mmol/L 葡萄糖刺激 24h 后, 细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。高浓度葡萄糖处理 48、72h 后, 与 24h 相比细胞存活率降低, 随着高糖刺激时间和高糖浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2), 提示细胞存活率具有时间、浓度依赖性。30mmol/L 葡萄糖刺激 48h, 细胞存活率 $< 40\%$, 25mmol/L 葡萄糖刺激 48h, 细胞存活率约 50%, 提示 25mmol/L 浓度能兼顾体现高糖诱发的氧化应激损伤和适当的细胞死亡率, 故实验中选择 25mmol/L 为常规高糖刺激浓度。高糖刺激 72h 细胞死亡率过高, 选择高糖刺激 48h, 既可造成内皮细胞可逆性氧化应激损伤, 又能较好反应抗氧化剂肌肽对血管的保护作用。25mmol/L 高糖刺激 48h 并加入肌肽预保护的细胞中, 细胞的存活率较高糖组显著提高, 可由高糖损伤组的 $57.07\% \pm 1.94\%$ 增加到 $79.29\% \pm 1.61\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3. MDA、LDH、SOD 含量的测定: 细胞培养上清液中 MDA、LDH、SOD 的含量, 反映内皮细胞的氧化

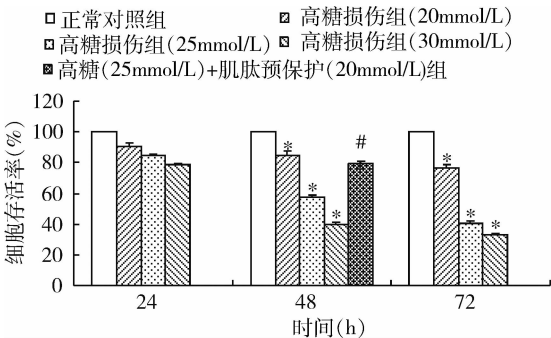


图 2 MTT 检测不同浓度高糖和肌肽对 HUVECs 存活率的影响
与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与高糖损伤组 (25mmol/L) 比较, # $P < 0.05$

应激水平。高糖刺激 48h 组与正常对照组相比, LDH、MDA 含量明显增高, SOD 含量显著下降 ($P < 0.01$)。但给予有效浓度肌肽 20mmol/L 后, 与高糖损伤组 (25mmol/L) 相比, 其 LDH、MDA 含量明显下降, SOD 含量显著上升 ($P < 0.01$, 表 1)。说明肌肽可作为有效的抗氧化剂, 明显抑制高糖引起的内皮细胞氧化应激反应, 对高糖引起的细胞损伤有一定保护作用。

表 1 各组 MDA、LDH、SOD 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	MDA (nmol/L)	LDH (U/L)	SOD (U/ml)
正常对照组	0.569 ± 0.067	1708.774 ± 12.893	23.847 ± 0.314
高糖损伤组 (25mmol/L)	1.232 ± 0.144 *	1928.029 ± 32.596 *	19.364 ± 0.545 *
高糖 (25mmol/L) + 肌肽预保护 (20mmol/L) 组	0.613 ± 0.077 #	1784.238 ± 30.144 #	23.044 ± 0.415 #

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与高糖损伤组 (25mmol/L) 比较, # $P < 0.05$

3. caspase - 3 活性测定: 分别测定了正常对照组、高糖损伤组 (25mmol/L) 及高糖 (25mmol/L) + 肌肽预保护 (20mmol/L) 组细胞内 caspase - 3 活性的变化。结果发现, 正常对照组细胞 caspase - 3 活性较低, 活性值为 3.81 ± 0.63 ; 高糖损伤组 (25mmol/L) 细胞的 caspase - 3 活性值为 10.42 ± 0.64 , 与正常对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与高糖损伤组 (25mmol/L) 相比, 高糖 (25mmol/L) + 肌肽预保

护 (20mmol/L) 组 caspase - 3 活性值为 4.45 ± 0.75 , 明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

糖尿病血管病变的主要表现之一是血管内皮细胞功能障碍, 氧化应激在其病变中的损伤作用已得到证实, 如何保护血管内皮细胞免受高糖损伤, 抗氧化成为防治的关键^[5]。肌肽作为一种内源性抗氧化剂, 具有多种抗氧化作用, 能有效清除活性氧和自由

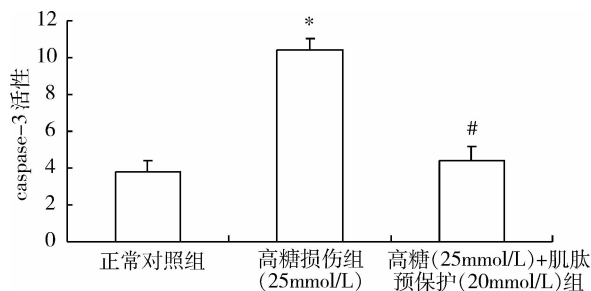


图3 检测 caspase-3 活性

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与高糖损伤组

(25mmol/L) 比较, # $P < 0.05$

基,对于改善及治疗2型糖尿病并发症有很好应用前景,例如防治糖尿病肾病、糖尿病视网膜病、糖尿病心血管病及糖尿病神经系统损伤等方面已有报道^[6,7]。为了进一步研究肌肽这种抗氧化剂在糖尿病心血管疾病中的作用,实验中以 HUVECs 为对象,建立高糖环境中的血管内皮细胞损伤模型,研究肌肽对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用及其机制。MTT 法检测了 HUVECs 在不同高糖浓度中,不同时间点的细胞存活率,建立了高糖诱导的细胞损伤模型,观察肌肽对高糖刺激下的细胞保护作用。再通过检测正常对照组、高糖损伤组和高糖 + 肌肽预保护组细胞培养上清液中 MDA、LDH、SOD 的含量,研究肌肽在高糖环境诱导的细胞氧化损伤过程中的抗氧化作用。

近年研究已经明确,氧化应激主要是细胞内产生大量自由基,导致自由基/抗氧化物平衡失调,损伤机制与细胞膜脂质过氧化、蛋白质和核酸变性密切相关,其中脂质过氧化必将损伤细胞的功能^[8,9]。MDA 是脂质过氧化的降解产物,测其含量的高低可反映脂质过氧化的程度,从而反映细胞受过氧化损伤的程度^[10]。细胞损伤时,胞内 LDH 漏出到胞外,测定细胞培养上清液中 LDH 含量可反映细胞损伤程度,含量的增加是细胞不可逆损伤或坏死的标志。SOD 是细胞内抗氧化损伤的重要防线,是一种抗氧化系统重要的抗氧化酶,其活性的高低又可反映出细胞清除氧自由基的能力。研究结果显示高糖损伤组 (25mmol/L) 与正常对照组相比,MDA、LDH 含量明显增高, SOD 含量显著下降,而高糖 (25mmol/L) + 肌肽预保护 (20mmol/L) 组与高糖损伤组 (25mmol/L) 相比,MDA、LDH 含量明显下降, SOD 含量显著升高,这说明高糖能增强血管细胞的氧化应激损伤,而肌肽可有效抑制高糖诱导的氧化应激,从而保护细胞减少损伤。

近年研究表明,氧化应激损伤会加剧细胞凋亡,其发生主要由两条信号通路:死亡受体介导的信号通

路和线粒体介导的信号通路,其发生发展过程中 caspase 蛋白酶家族引发一系列级联反应,两条通路最终在 caspase-3 处会合,在介导细胞凋亡过程中发挥核心作用, caspase-3 活化增高被称为凋亡发生的标志性事件, caspase-3 也被称为细胞凋亡中最主要的终末剪切酶^[11,12]。本研究发现高糖环境作用细胞 48h 后,高糖组中 caspase-3 活性增高,而肌肽预保护组中 caspase-3 活性降低,因此推测肌肽作用于高糖环境下的血管内皮细胞,可通过降低凋亡蛋白 caspase-3 活性,抑制凋亡信号通路介导抗氧化作用,保护线粒体,减少细胞功能障碍,从而减弱高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激和凋亡损伤。肌肽的这种抗氧化作用有望成为防治糖尿病血管并发症的新途径,其详细机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 纪立农. 对 2 型糖尿病新的大型临床试验结果的解读和分析 [J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(11): 642-647
- 杜宣, 宋歌, 曹小俊, 等. 高糖对人脐静脉内皮细胞表面/X40L 表达的影响及生物学意义 [J]. 江苏医药, 2013, 39(15): 1745-1747
- Hipkiss AR. On the enigma of carnosine's anti-ageing actions [J]. Exp Gerontol, 2009, 44(4): 237-242
- Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, et al. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? [J]. Chemistry Central Journal, 2013, 7(1): 38
- 师岩, 房绍红, 周宏博. 肌肽对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(6): 527-530
- 周莉莉, 桂书彦, 杨雁, 等. L- carnosine 对 NIT-1 胰岛细胞的影响及机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(7): 1281-1286
- Budzeń S, Rymaszewska J. The biological role of carnosine and its possible applications in medicine [J]. Adv Clin Exp Med, 2013, 22(5): 739-744
- Emanuele E, Spencer JM, Braun M. An experimental double-blind irradiation study of a novel topical product (TPF 50) compared to other topical products with DNA repair enzymes, antioxidants, and growth factors with sunscreens: Implications for preventing skin aging and cancer [J]. Journal of Drugs in Dermatology, 2014, 13(3): 309-314
- 陶燕来, 吴涛, 徐亮, 等. L- 肌肽影响血糖、血压、脂质代谢的相关研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(9): 891-896
- 王秀华, 方春钱, 吴晨光, 等. 高糖对 HUVEC 功能的影响及机制研究 [J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(19): 12-16
- Bellia F, Vecchio G, Rizzarelli E. Carnosinases, their substrates and diseases [J]. Molecules, 2014, 19(2): 2299-2329
- Brown BE, Kim CH, Torpy FR, et al. Supplementation with carnosine decreases plasma triglycerides and modulates atherosclerotic plaque composition in diabetic apo E (-/-) mice [J]. Atherosclerosis, 2014, 232(2): 403-409

(收稿日期: 2014-02-25)

(修回日期: 2014-03-14)