

高糖对大鼠心肌细胞 NMDA 受体表达、胞内钙和超氧自由基水平的影响

刘 泉 程秀丽 郝 维 曹济民 高 雪

摘 要 **目的** 探讨高浓度葡萄糖对心肌细胞促离子型谷氨酸受体亚型 NMDA 受体(NMDAR)表达、胞内钙水平以及活性氧自由基产生的影响。**方法** 分离新生(1~3 天)大鼠心室肌细胞,心肌细胞与不同浓度葡萄糖(对照组葡萄糖浓度 5mmol/L,高糖组葡萄糖浓度 33mmol/L)共孵育 24~72h 后,用 Western blot 法检测心室肌细胞 NMDAR1 和 NMDAR2B 亚单位的表达水平,活细胞工作站检测胞内 Ca^{2+} 水平,流式细胞术检测细胞内活性氧自由基(ROS)含量。**结果** 与对照组细胞相比,高浓度葡萄糖使心肌细胞的 NMDAR2B 的表达水平明显上调($P<0.05$),而 NMDAR1 的表达则降低。经高糖处理的心肌细胞在收缩时胞内钙水平高于对照细胞,高糖处理使心肌细胞的 ROS 水平升高,而用 MK-801 选择性阻断 NMDAR 可明显降低由高糖所致的胞内 ROS 增高(与高糖组对比, $P<0.05$)。**结论** 高浓度葡萄糖可上调大鼠心肌细胞 NMDAR2B 及下调 NMDAR1 的表达,并增加细胞内 Ca^{2+} 水平及 ROS 的生成,而阻断 NMDAR 可抑制 ROS 的生成。提示 NMDAR 可能参与糖尿病性心肌损害。

关键词 心肌细胞 NMDA 受体 Ca^{2+} 活性氧 血糖

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Effects of High Glucose on NMDA Receptor Expression, Intracellular Ca^{2+} and ROS Levels in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. Liu Xiao, Cheng Xiuli, Hao Wei, et al. Department of Physiology & Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of high glucose on NMDA receptor (NMDAR) expression, intracellular calcium and reactive oxygen species (ROS) levels in cardiomyocytes. **Methods** Hearts were harvested from neonatal SD rats and ventricular myocytes were isolated and cultured. Western blot was used to investigate the expressions of NMDAR, confocal microscopy was to determine the intracellular Ca^{2+} level, flow cytometry to examine the production of intracellular reactive oxygen species (ROS). **Results** Compared with the control cells (treated with 5mmol/L glucose), incubation of cardiomyocytes with high glucose (33mmol/L) for 72h increased the protein expression of NMDAR2B, but decreased the protein level of NMDAR1 (both $P<0.05$). High glucose also elevated the intracellular Ca^{2+} and ROS levels in cardiomyocytes. Selective blockade of NMDAR by MK-801 (30 $\mu\text{mol/L}$) suppressed the elevation of ROS induced by high glucose. **Conclusion** High glucose upregulates NMDAR2B expression but downregulates NMDAR1 expression, enhances calcium mobilization and ROS production in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Blocking NMDAR suppressed the ROS production induced by high glucose. These results suggested that NMDAR may be a pharmacological target for treating diabetic cardiomyopathy.

Key words Cardiomyocytes; NMDA receptor; Ca^{2+} ; Oxidative stress; Blood glucose

糖尿病是一种以血中葡萄糖水平升高为特点的代谢性疾病。尽管糖尿病的发病机制复杂,但血糖升高以及细胞对葡萄糖的利用能力降低对全身多个器官有损害作用是无疑的。糖尿病性多器官损害及其慢性并发症,是糖尿病致残、致死的主要原因,其中心肌损害已成为糖尿病的重要死因之一。N-甲基-D-门冬氨酸受体(NMDAR)作为促离子型谷氨酸受

体的亚型之一,其中枢功能已被熟知。目前有报道谷氨酸受体同样表达于外周组织器官,如心脏、肾、胃和视网膜等^[1-5]。研究显示,在用 STZ 诱导大鼠发生 2 型糖尿病 4 周和 12 周后,视网膜 AMPA 受体亚基 GluR1 和 GluR2/3 蛋白表达量均有所增加,NMDA 受体亚基 NR1 在 4 周时表达增加,12 周后下降^[6,7]。小脑组织匀浆液中 Glu 含量增加,NR1、NR2B 和代谢型谷氨酸受体亚基 mGluR5 表达都增加,并通过 IP_3 - Ca^{2+} 途径诱发神经系统退行性改变,提示糖尿病诱发的器官损害与谷氨酸受体密切相关^[8]。

目前尚无糖尿病心肌谷氨酸受体的相关研究。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81000060)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学和病理生理学系

通讯作者:高雪,电子信箱:longlongnose@163.com

本研究以高浓度葡萄糖处理培养的幼龄大鼠心肌细胞以模拟心肌细胞处于体内高糖环境,观察细胞促离子型谷氨酸受体亚基 NMDAR1 和 NMDAR2B 的表达变化,以及胞内 Ca^{2+} 和 ROS 水平的变化,藉此判断高糖对心肌细胞 NMDAR 表达的影响与心肌损害的可能关系。

材料与方法

1. 试剂: I 型胶原酶及 DMEM(无糖)培养基购自 Gibco; 5-溴-脱氧尿苷、DCFH-DA 及 (+)MK-801 购自 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清购自 Invitrogen 公司,Fluo-3/AM 和 Pluronic F127 购自 Biotium 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒来自 Pierce;RIPA 裂解液(强)和苯甲基磺酰氨(PMSF)购自 Beyotime 公司;NMDAR1 和 NMDAR2B 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;D-Hank's 液、DMEM(高糖)培养基、F12 培养基、青霉素、链霉素、胰酶等购自国家实验细胞资源共享平台(<http://cellresource.cn>,北京)。

2. 心肌细胞培养:取 1~3 天新生 SD 大鼠,于无菌条件下开胸,获取心脏,胶原酶液主动脉逆行灌流消化心肌,之后取左心室肌,进一步消化和纯化细胞。细胞分离及纯化步骤参考文献并做适当修改^[9]。

3. Western blot 法:用于检测心肌细胞 NMDAR1 和 NMDAR2B 的表达量。纯化后的细胞用 DMEM(高糖)/F12 培养 2 天,换用 DMEM(无糖)/F12 培养基,对照组给予 5mmol/L 葡萄糖,高糖组给予 33mmol/L 葡萄糖。孵育 72h 后以适量预先加有 PMSF 的 RIPA 裂解液(强)裂解细胞,收集裂解产物,35 μg 胞质蛋白样品通过 SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。通过 ECL 发光液激发荧光,以 X 线片记录下蛋白印记,Quantity One 分析图像并将数据输出进行分析。

4. 激光共聚焦显微术:用于测定胞内 Ca^{2+} 水平。向培养基内加入 3 $\mu\text{mol/L}$ fluo-3/AM 并置于 37℃ 下避光孵育 1h,以 D-Hank's 液洗两次后加入新鲜 DMEM(无糖)/F12 培养基并置于激光共聚焦显微镜的载物台上。记录使用的激发波长为 488nm,发射波长为 515nm。以 Velocity 6.3 软件分析数据。

5. 流式细胞术:用于检测乳鼠心肌细胞活性氧含量,细胞处理如前所述,对照组给予 5mmol/L 葡萄糖,高糖组给予 33mmol/L 葡萄糖,NMDAR 阻断剂 30 $\mu\text{mol/L}$ (+)MK-801 提前 20min 加入后给予 33mmol/L 葡萄糖。各组均孵育 24h,并以 0.05% 胰酶消化使细胞游离,培养基终止后用 D-Hank's 重悬。测定胞内活性氧含量时,向上述细胞悬液内加入 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 并置于 37℃ 下避光孵育 30min,用 200 目筛网过滤后,用 Accuri® C6 流式细胞仪(美国 BD 公司生产)进行 ROS 检测。采用的激发光波长为 488nm,发射光波长为 525nm。用 CFlow Plus 1.0 软件分析数据。

6. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验和方差

分析进行统计学处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高浓度葡萄糖处理对新生大鼠心肌细胞 NMDAR 亚单位表达的影响:与对照组(葡萄糖浓度 5mmol/L)细胞相比,高糖处理可明显上调心肌细胞 NMDAR2B 表达水平,但下调 NMDAR1 的表达水平,均为 $P < 0.05$ (图 1)。

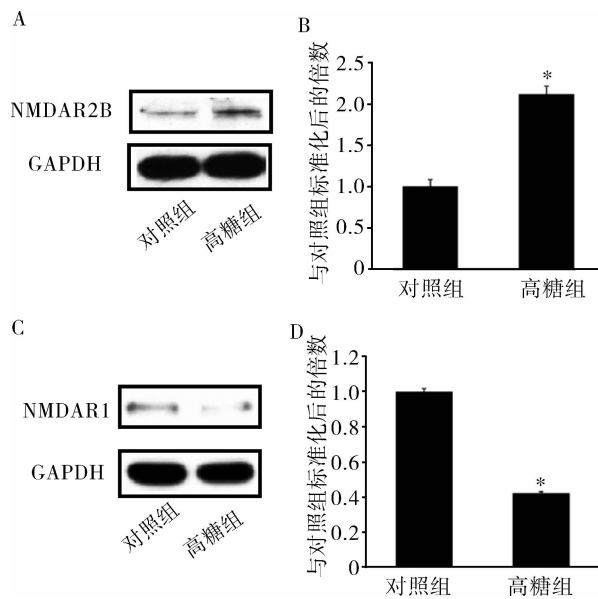


图 1 高糖对幼龄大鼠心肌细胞 NMDAR2B 和 NMDAR1 蛋白表达的影响

A、C. Western blot 法检测结果(原始条带);B、D. 蛋白表达水平统计图(均为 $n=3$);与对照组相比,* $P < 0.05$

2. 高糖处理的心肌细胞在收缩时胞内游离钙水平较高:与对照组细胞相比,高糖处理的心肌细胞在静息时其胞内游离钙水平($[\text{Ca}^{2+}]_i$)无明显差别。但当心肌细胞收缩时,高糖组的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显高于对照组,且 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的亚细胞区域也波及较大(图 2)。

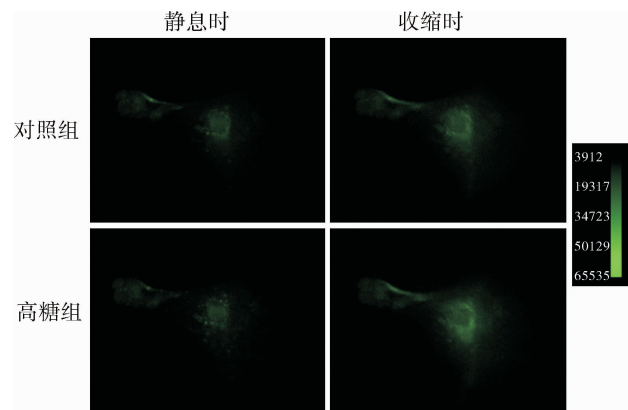


图 2 激光共聚焦实验显示高糖对心肌细胞胞内 Ca^{2+} 水平的影响

3. 高浓度葡萄糖致心肌细胞 ROS 生成增多: 流式细胞术实验结果(图 3)显示, 高糖处理可使心肌细胞内的 ROS 水平升高。与对照组相比, 高糖处理使曲线右移, 说明高组的 ROS 水平升高 ($P < 0.05$)。

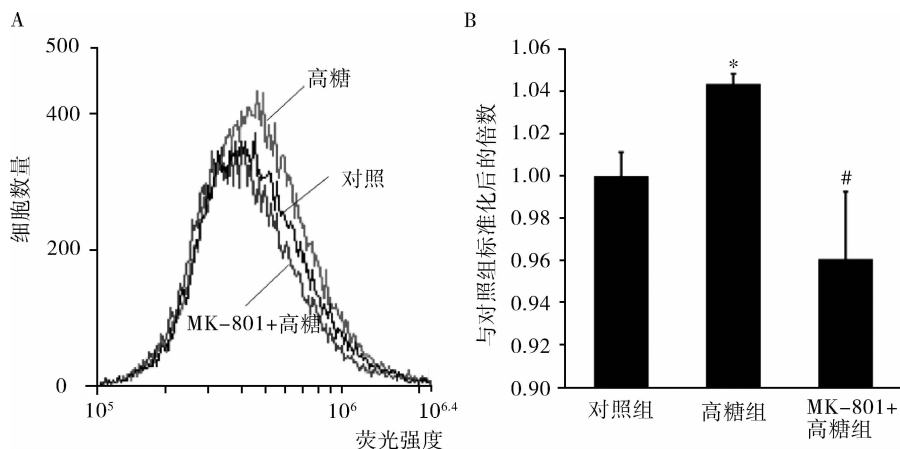


图3 MK-801 预处理对高糖诱导新生大鼠心肌细胞 ROS 生成的抑制作用

A. 流式细胞术实验原始图; B. 统计图(每组 $n = 4$); 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与高糖组相比, # $P < 0.05$

讨 论

糖尿病时高血糖对心肌细胞的慢性损害仍有进一步研究的必要。本研究首先观察了体外模拟高血糖对心肌细胞 NMDAR 表达的影响。笔者前期的研究表明, 激动 NMDAR 可致心肌细胞钙超载和氧化应激^[10]。因此笔者进一步观察了高糖作用下, 心肌细胞钙和 ROS 水平是否有改变, 以及利用 NMDAR 受体阻断剂 MK-801 检测了高糖诱导的胞内钙和 ROS 水平的变化是否与 NMDAR 有关。

有关 NMDAR 与心脏的相关研究较少。有研究显示, NMDA 可以诱导心室纤颤的发生, 心肌梗死大鼠心脏 NMDAR 表达上调并诱导细胞凋亡, HIV-1 gp120 通过 NMDAR 介导心肌细胞自噬^[11,12]。本研究进一步发现, 高浓度葡萄糖可以诱导新生大鼠心肌细胞 NMDAR2B 表达上调和 NMDAR1 表达下调, 并升高心肌细胞收缩时的胞内钙水平和 ROS 水平, 而用 MK-801 阻断 NMDAR 后这种变化被明显抑制。这说明在高糖作用下, 心肌细胞的 NMDAR 表达水平发生改变, 进一步引起细胞钙稳态和氧化应激朝着不利于心肌细胞健康的方向改变, 而阻断 NMDAR 可部分纠正这种不利变化。这提示 NMDAR 参与了高糖所致的心肌细胞钙稳态异常和氧化应激, 因而 NMDAR 可能成为糖尿病性心肌损害的一个治疗靶点。

NMDA 受体家族成员由 NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D 和 NR3A 共 6 种亚基构成, 其分布和功

事先用 MK-801 处理高糖组细胞, 反映 ROS 水平的曲线又回复至对照水平, 说明阻断 NMDAR 剂可抑制高糖引起的心肌细胞 ROS 升高(与高糖组相比, $P < 0.05$)。

能也各有不同。有关 NMDAR2B 在心脏的研究鲜见。Gill 等^[2]和 Leung 等^[3]报道, NMDAR2B 表达于心肌组织; 且在胚胎期 14 和 18 天以及出生后 0、5、12 天均有表达, 但在出生后 21 天表达消失。提示 NMDAR2B 在正常心脏的表达是个动态的过程, 随着年龄的增加, 表达量逐渐降低。NMDAR1 在心肌不同部位表达量有所不同, 但其表达量随年龄增长并无显著性变化^[1-3]。本研究中以高浓度葡萄糖处理的心肌细胞 NMDAR2B 表达明显低于正常对照组, 而 NMDAR1 表达量却显著降低, 说明高糖能够干扰心肌细胞 NMDAR2B 及 NMDAR1 的正常表达。另外, 高糖预处理心肌细胞 ROS 产生增加, NMDAR 阻断剂 MK-801 可显著降低 ROS 的生成, 说明 ROS 的生成在一定程度上是由 NMDAR 介导的, 细胞内 ROS 含量升高能激活线粒体凋亡途径最终使细胞走向死亡。此外, 本研究发现, 高糖可以升高心肌细胞收缩时的胞内钙水平, 这种变化是否与钙超载有一定关系, 值得进一步探讨。胞内 Ca^{2+} 平衡对细胞的存活具有非常关键的作用, 许多病理过程都与 Ca^{2+} 平衡的紊乱有关。

做为深入探讨研究糖尿病心肌损伤与 NMDAR 关系的第一步, 笔者初步得出以下结论, 高糖环境可以导致乳鼠心肌细胞 NMDAR 表达异常, 细胞内 Ca^{2+} 升高, ROS 含量上升, 且 ROS 含量的上升与 NMDAR 有关。这一发现为研究糖尿病并发心脏病的发生机制提供了新思路, 为糖尿病心肌并发症的预

防和治疗开辟了一条重要的途径。

参考文献

- Mueller R. The monkey (macaca fascicularis) heart neural structures and conducting system; an immunochemical study of selected neural biomarkers and glutamate receptors [J]. *Toxicologic Pathology*, 2003, 31(2): 227–234
- Gill S, Veinot J, Kavanagh M, *et al.* Human heart glutamate receptors—implications for toxicology, food safety, and drug discovery [J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35: 411–417
- Leung J, Travis B, Verlander J, *et al.* Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 283: R964–R971
- Torii K, Moriyama Y. Physiology and pharmacology of the gut nutrient perception [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(10): 1841–1843
- Santiago R, Hughes M, Kamphuis W, *et al.* Diabetes changes ionotropic glutamate receptor subunit expression level in the human retina [J]. *Brain Research*, 2008, 1198: 153–159
- Santiago R, Gaspar J, Baptista F, *et al.* Diabetes changes the levels of ionotropic glutamate receptors in the rat retina [J]. *Molecular Vision*, 2009, 15: 1620–1630
- Santiago R, Hughes M, Kamphuis W, *et al.* Diabetes changes ionotropic glutamate receptor subunit expression level in the human retina [J]. *Brain Research*, 2008, 1198: 153–159
- Anu J, Kumar T, Nandhu M, *et al.* Enhanced NMDAR1, NMDA2B and mGlu5 receptors gene expression in the cerebellum of insulin induced hypoglycaemic and streptozotocin induced diabetic rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 630: 61–68
- Iwaki K, Sukhatme VP, Shubaita HE, *et al.* Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly. Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(23): 13809–13817
- Gao X, Xu XB, Pang J, *et al.* NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiocyte [J]. *Physiol Res*, 2007, 56(5): 559–569
- Liu Y, Zhou L, Xu HF, *et al.* A preliminary experimental study on the cardiac toxicity of glutamate and the role of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor in rats [J]. *Chin Med J*, 2013, 126(7): 1323–1332
- Meng L, Zhang Z, Xu K, *et al.* HIV-1 gp120 induces autophagy in cardiomyocytes via the NMDA receptor [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(6): 2517–2523

(收稿日期: 2014-05-16)

(修回日期: 2014-05-26)

支架蛋白 JLP 调控 B 细胞上 CD40 诱导的 MAPK 信号通路活化及细胞增殖

颜 奇 王惠明 丁国华

摘 要 目的 对支架蛋白 JLP 在小鼠 B 细胞上 CD40 诱导信号通路活化及细胞增殖中的作用进行研究, 探索支架蛋白 JLP 在 CD40 诱导小鼠 B 细胞信号通路及后续生物学效应中的作用。方法 磁珠分选法分选出 jlp 野生型和 jlp 基因敲除小鼠模型脾脏 B 细胞, 使用免疫印迹法检测在接受 CD40 配体 (CD40L) 刺激后 jlp 野生型和 jlp 基因敲除型小鼠脾脏 B 细胞 p38、Erk 和 Jnk MAPK, 磷酸化 c-Jun 以及 NF- κ B 信号通路及的活化情况, 并使用 CFSE 检测两种基因型小鼠 B 细胞在接受 CD40L 刺激后细胞增殖情况。结果 jlp 基因敲除小鼠 B 细胞在受到 CD40L 刺激后其 p38、Erk、Jnk MAPK 信号通路以及 c-Jun 活化情况均较 jlp 野生型小鼠 B 细胞明显减弱, 而 NF- κ B 信号通路的激活情况在两种基因型 B 细胞中并无明显差异, jlp 基因敲除小鼠 B 细胞中 CD40 诱导的细胞增殖水平较 jlp 野生型 B 细胞明显降低。结论 支架蛋白 JLP 参与调控 B 细胞上 CD40 诱导的 MAPK 信号通路活化及细胞增殖。

关键词 支架蛋白 JLP B 细胞 MAPK 信号通路 细胞增殖

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Scaffolding Protein JLP Regulates CD40L-Induced MAPK Signal Pathway Activity and Cell Proliferation in B Lymphocyte. Yan Qi,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81370800, 81172793); 国家科技支撑计划项目 (2011BAI10B04); 重庆市自然科学基金资助项目 (2011BB5028)

作者单位: 430006 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者: 丁国华, 教授, 电子信箱: ghxding@gmail.com