

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.001

• 基础研究 •

自噬对高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞凋亡的保护作用 *

刘 宇¹ 曹清心² 石屹城¹ 崔 玲¹ 陈 启¹ 于曼丽¹ 赵仙先^{1△}

(1 第二军医大学附属长海医院心内科 上海 200433; 2 第二军医大学附属长海医院中医科 上海 200433)

摘要 目的:研究自噬对高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞凋亡的影响。**方法:**将人冠状动脉内皮细胞,分别用常规培养基(正常对照组)、含 30 mmol/L D-葡萄糖的高糖培养基(高糖组)、高糖培养基合并雷帕霉素(Rapamycin, RAPA; 100 nmol/L)干预(RAPA组)和高糖培养基合并 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA, 5 mmol/L)干预(3-MA组)培养。利用 CCK-8 法检测细胞生长活力,使用流式细胞术检测细胞凋亡水平,western blot 检测细胞自噬标记蛋白(Beclin1)的表达水平。**结果:**(1)高糖溶液刺激内皮细胞 24 h 后,细胞生长活力为正常组的 55.0%($P<0.01$),自噬标记蛋白 Beclin1 的表达水平明显增加,凋亡水平为正常组的 2.0 倍;(2)与高糖组相比,RAPA 组细胞生长活力明显增加,Beclin1 的表达明显升高($P<0.01$),凋亡水平为高糖组的 70.1%;(3)与高糖组相比,3-MA 组细胞生长活力明显减少,Beclin1 的表达明显降低($P<0.01$),凋亡水平为高糖组的 1.42 倍。**结论:**细胞自噬可能对高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞具有凋亡保护作用。

关键词:自噬;内皮细胞;高糖;凋亡;保护

中图分类号:Q75;R331.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)12-2201-04

Protective Effect of Autophagy on Human Coronary Artery Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Glucose *

LIU Yu¹, CAO Qing-xin², SHI Yi-cheng¹, CUI Ling¹, CHEN Qi¹, YU Man-li¹, ZHAO Xian-xian^{1△}

(1 Department of Cardioangiopathy, Chang Hai Hospital affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 Department of Traditional Chinese Medicine, Chang Hai Hospital affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To study the protective effect of autophagy on endothelial cells apoptosis induced by high glucose. **Methods:** Human coronary artery endothelial cells cultured by conventional media (Control group), conventional media containing 30 mmol/L D-glucose (High-glucose group), high-glucose media plus 100 nmol/L Rapamycin (RAPA group), or high-glucose media plus 5mmol/L 3-Methyladenine (3-MA group). Cells vitality and apoptosis were measured by CCK-8 assay and flow cytometry. The autophagy marking protein (Beclin1) expression was determined by western blot. **Results:** (1) Endothelial cell viability decreased significantly after high-glucose (30 mmol/L) stimulation, with 55.0% to the control group ($P<0.01$). Beclin1 expressed increased, and the level of cell apoptosis was significantly increased, with 2 times to the control group. (2) Compared with high-glucose group, the cell viability and the beclin1 expression of RAPA group were both increased ($P<0.01$). The level of cell apoptosis was significantly decreased, with 70.1% to the high-glucose group. (3) Compared with high-glucose group, the cell viability and the beclin1 expression of RAPA group were both decreased ($P<0.01$). The level of cell apoptosis was significantly increased, with 1.42 times to the high-glucose group. **Conclusion:** Cell autophagy might have an apoptosis-protective effect on the human coronary artery endothelial cells induced by high-glucose.

Key words: Autophagy; Endothelial cell; High-glucose; Apoptosis; Protective

Chinese Library Classification (CLC): Q75; R331.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2201-04

前言

细胞自噬(Autophagy)是真核生物对细胞内物质进行周转的重要过程,在进化中高度保守^[1,2]。自噬过程中细胞中一些损

坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹后,送入溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中进行降解并得以循环利用,以实现细胞稳态和细胞器的更新^[3]。自噬是真核细胞的一种防御和应激的调控机制,在机体的免疫、感染和炎症等过程中具有

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370266;81170223);上海市自然科学基金项目(134119a0301;13ZR1450300)

作者简介:刘宇(1983-),男,博士,主治医师,研究方向:冠心病的诊治,电话:021-31161266, E-mail:lycqx@aliyun.com

△通讯作者:赵仙先, E-mail: xianxianz@163.com

(收稿日期:2014-11-14 接受日期:2014-12-10)

重要作用,因此其在肿瘤、心血管疾病以及神经退行性疾病的发生发展中尤为重要^[4-6]。糖尿病患者循环血的高糖环境导致血管内皮细胞凋亡及功能紊乱,是糖尿病血管病变发生发展的始动环节^[7]。自噬对细胞的凋亡保护作用使其在各种细胞损伤性疾病发生发展中扮演重要角色,是改善疾病预后的重要手段。本研究利用冠状动脉内皮细胞,研究高糖诱导的内皮细胞损伤过程中自噬的活性及其影响因素,为进一步研究糖尿病导致动脉内皮功能的损伤机制和靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

人冠状动脉内皮细胞为本实验室冻存细胞株;内皮细胞培养液及生长因子、Annexin V-FITC 试剂盒购自 Life technologies 公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 蛋白提取液以及蛋白免疫印迹试剂盒均购自碧云天公司;雷帕霉素(Rapamycin,RAPA)购自 Gene Operation 公司;3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine,3-MA)购自 Sigma 公司。Beclin1 和 GAPDH 抗体购自 SantaCruz 公司。

1.2 试剂配制

将 10 mg 的 RAPA 溶解于 1 mL 无水乙醇中,作为 10 mmol/L 的 RAPA 贮存液,-20℃ 冰箱贮存,使用时用细胞培养液稀释成 100 nmol/L,0.22 μm 滤器过滤后作为工作液;将 15 mg 的 3-MA 溶解于 2.5 mL 无水乙醇中,作为 200 mmol/L 的 3-MA 贮存液,-20℃ 冰箱贮存,使用时用细胞培养液稀释成 5 mmol/L,0.22 μm 滤器过滤后作为工作液^[8]。

1.3 实验分组

将人冠状动脉内皮细胞种植于 12 孔细胞培养板中,正常组细胞用常规培养液培养;高糖组细胞用含 30 mmol/L D-葡萄糖的高糖培养液培养;RAPA 组细胞用含 100 nmol/L RAPA 的常规培养液预处理 1 h 后,用含 100 nmol/L RAPA 的高糖培养液继续处理 24 h;3-MA 组细胞用含 5 mmol/L 3-MA 的常规

培养液预处理 1 h 后,用含 5 mmol/L 3-MA 的高糖培养液继续处理 24 h。

1.4 细胞生长活力检测(CCK-8 法)

在 48 孔培养板中接种 300 μL 的细胞悬液(约 5×10^3 个细胞),在培养箱(37℃,5%CO₂)中进行预培养,待细胞生长至 70~80%融合度后,加入 30 mmol/L 的 D-葡萄糖继续培养 24 h,每孔加入 30 μL 的 CCK-8 溶液,继续在培养箱内孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 处的测定吸光度。

1.5 细胞凋亡检测(Annexin V-FITC 法)

在 6 孔细胞培养板中接种 2 mL 的细胞悬液(约 5×10^5 个细胞),在培养箱(37℃,5%CO₂)中进行预培养,待细胞生长至 70~80%融合度后,加入 30 mmol/L 的 D-葡萄糖(辅以 3-MA 或 RAPA 刺激)继续培养 24 h,收集细胞后进行计数,取 1×10^5 个细胞,按 Annexin V-FITC 试剂盒说明进行标记,利用流式细胞仪进行凋亡水平的检测。

1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

利用 RIPA 溶液提取细胞总蛋白,经 BCA 蛋白定量,取 20 μg 的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,经转膜、封闭等步骤后,一抗(Beclin1/GAPDH)在 4℃ 过夜孵育,二抗(HRP 标记)常温孵育 1 h 后,显色后观察并照相。

1.7 统计学分析

每组实验均重复三次,数据以平均值±标准差表示。采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析。组间样本采用 One-Way ANOVA 检验,P<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自噬标记蛋白 Beclin1 在高糖刺激内皮细胞后表达升高

高糖培养液刺激内皮细胞后,CCK-8 检测结果显示,细胞生长活力明显抑制,为对照组的 55.0%(P<0.01),western blot 结果显示自噬标记蛋白 Beclin1 的表达在高糖刺激后表达明显升高,是对照组的 3.41 倍(P<0.01)。见图 1。

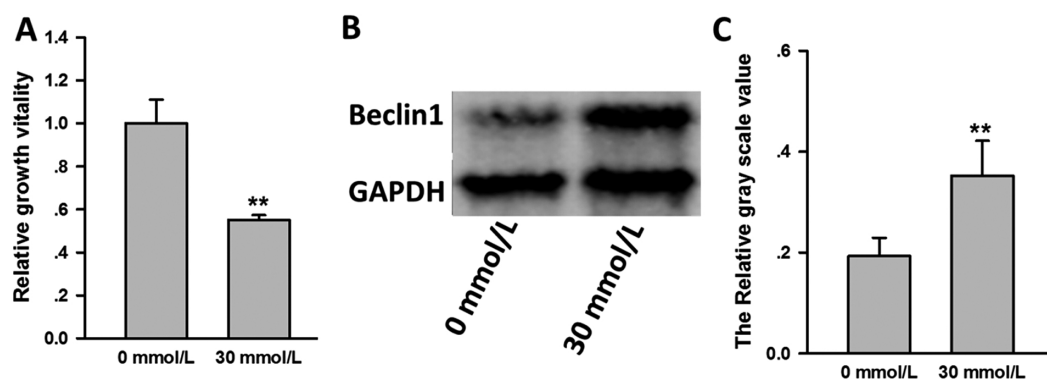


图 1 高糖诱导的内皮细胞生长抑制(A)和自噬标记蛋白 Beclin1 的表达(B,C)(**P<0.01 vs 0 mmol/L)

Fig. 1 Detection of cell growth inhibition (A) and expression of Beclin 1 (B, C) induced by high-glucose

(** P<0.01 vs 0 mmol/L)

2.2 诱导和抑制自噬的效率检测

高糖培养液联合自噬诱导剂 RAPA 干预培养内皮细胞后,western blot 检测发现 RAPA 组细胞中 beclin1 表达较高糖组明显升高,是其 1.36 倍;高糖培养液联合自噬抑制剂 3-MA 干

预培养内皮细胞后,3-MA 组细胞中 beclin1 的表达较高糖组明显减少,为其 73.4%。见图 2。

2.3 诱导和抑制自噬对内皮细胞生长活力的影响

高糖培养液联合自噬诱导剂 RAPA 干预培养内皮细胞后,

CCK-8 检测显示 RAPA 组细胞生长活力较高糖组明显增加, 是其 1.46 倍; 高糖培养液联合自噬抑制剂 3-MA 干预培养内

皮细胞后, 3-MA 组细胞生长活力较高糖组明显减少, 是其 64.6%。见图 3。

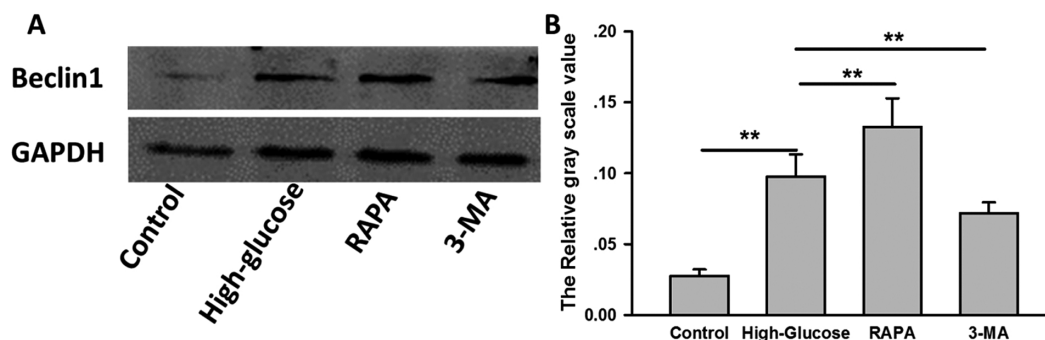


图 2 自噬诱导剂 / 抑制剂对 beclin1 表达的影响 (** P<0.01)

Fig. 2 The effect of autophagy inducer and inhibitor on Beclin1 expression (** P<0.01)

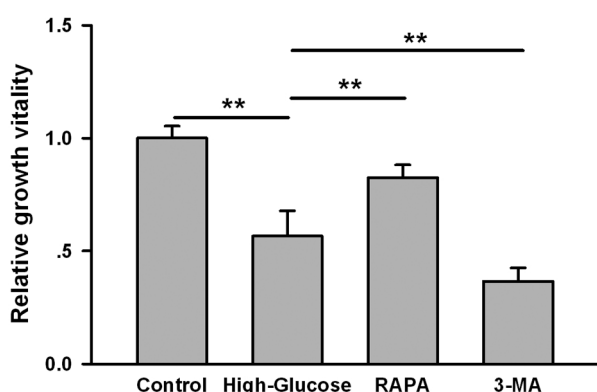


图 3 自噬诱导剂 / 抑制剂对内皮细胞生长活力的影响 (** P<0.01)

Fig. 3 The effect of autophagy inducer and inhibitor on cell growth vitality (** P<0.01)

2.4 诱导和抑制自噬对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响

高糖培养液联合自噬诱导剂 RAPA 干预培养内皮细胞后, 流式细胞术检测显示 RAPA 组细胞凋亡水平较高糖组明显减少, 是其 70.1%; 高糖培养液联合自噬抑制剂 3-MA 干预培养内皮细胞后, 3-MA 组细胞凋亡水平较高糖组明显增加, 是其 1.42 倍。见图 4。

3 讨论

细胞自噬是 Ashford 和 Porter 在 1962 年发现的一种细胞自我更新现象。同时, 它也是细胞内分解代谢通路之一, 通过自噬能够诱导蛋白质和细胞器在溶酶体内降解。正常的自噬水平

的维持, 在维持细胞自我平衡过程中发挥保护作用^[9]。细胞自噬时, 从无核糖体附着的粗面内质网区脱落的双层膜包裹部分胞质、细胞器和蛋白质等形成自噬体, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解内容物, 以实现细胞本身的代谢需要和细胞器的更新^[10]。自噬参与调节细胞物质的合成、降解和重新利用之间的代谢平衡, 影响参与生物生命活动的各个过程^[11,12]。自噬在机体的生理和病理过程中所起的具体机制目前尚未完全阐明, 但随着研究的不断深入, 自噬在各种疾病中的作用越发突显。

糖尿病是严重危害人类健康最重要的慢性疾病之一, 长期的高血糖可导致血管内皮细胞凋亡或功能损伤, 影响平滑肌细胞表型, 造成血管结构和功能的改变^[13]。大多数糖尿病患者死于其引起的心脑血管疾病, 因此探索糖尿病对血管损伤的具体机制对于拯救患者生命具有重要意义。近年来, 在 1 型、2 型以及代谢综合征糖尿病动物模型的研究证实, 自噬可能参与了糖尿病及其并发症的发病过程, 尤其是对心肌损伤的作用^[14,15]。内皮细胞的自噬是其在多种因素刺激下的有效应激手段, 内皮细胞通过自噬与凋亡之间的转换, 调控再内皮化和新生内膜的形成^[16]。研究发现自噬可以调节内皮细胞血管性血友病因子的生成、成熟和分泌, 可能成为心血管危险事件的有效预防和治疗措施^[17]。

自噬相关基因 (Autophagy related gene, ATG) 编码的蛋白在自噬的诱导、产生、成熟以及再循环过程中起着重要作用。Beclin 1 是 ATG6 在哺乳动物中的同源基因, 是细胞自噬发生的必需蛋白, 介导其它因子定位于自噬泡, 调控自噬体的形成和成熟^[18,19]。mTOR 信号通路是调控自噬的重要通路, mTOR 激

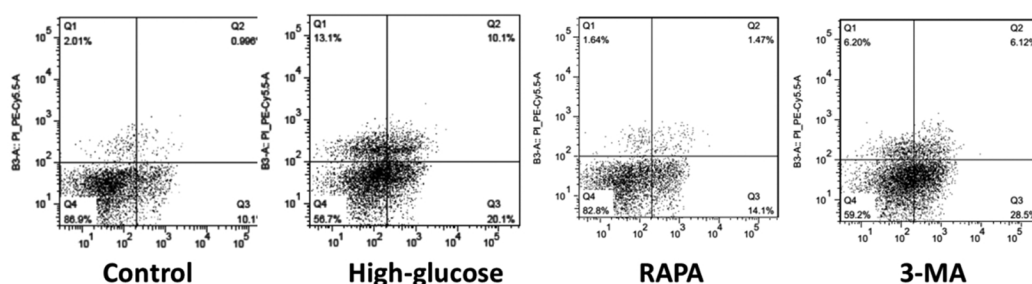


图 4 自噬诱导剂 / 抑制剂对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of autophagy inducer and inhibitor on endothelial cell apoptosis induced by high-glucose

酶是多种分子的感受器,是自噬发生具有抑制作用。P53 可以通过 DRAM 途径和 PI3K/AKT 等信号通路调控自噬发生和成熟。此外,p38、GTP/GDP 结合的 G 蛋白亚基、TNF- α 等都是调控自噬的重要因子^[20-22]。本研究证实,高糖诱导的内皮细胞自噬过程中,可通过 RAPA/3-MA 等调控细胞自噬进程,从而抑制细胞凋亡,可能对糖尿病引起血管损伤的治疗具有理论指导意义。

总之,本研究显示 RAPA 能够通过激活自噬,而对高糖诱导的细胞凋亡发挥保护作用,而 3-MA 则能够通过抑制细胞自噬,加重高糖诱导的细胞凋亡作用。这些初步研究结果,将对治疗糖尿病及其并发症提供佐证。深入探讨自噬在高糖诱导的内皮细胞损伤中的作用,对糖尿病引起血管损伤的早期预防以及靶向治疗具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, et al. Autophagy: regulation and role in development[J]. *Autophagy*, 2013, 9(7): 951-972
- [2] Hurley JH, Schulman BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion[J]. *Cell*, 2014, 157(2): 300-311
- [3] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-720
- [4] Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion[J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1216-1219
- [5] Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 174-189
- [6] Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease[J]. *Nat Med*, 2013, 19(8): 983-997
- [7] Siddiqi FS, Advani A. Endothelial-podocyte crosstalk: the missing link between endothelial dysfunction and albuminuria in diabetes [J]. *Diabetes*, 2013, 62(11): 3647-3655
- [8] Belleudi F, Purpura V, Caputo S, et al. FGF7/KGF regulates autophagy in keratinocytes: A novel dual role in the induction of both assembly and turnover of autophagosomes[J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 803-821
- [9] Zhou XJ, Zhang H. Autophagy in immunity: implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. *Autophagy*, 2012, 8(9): 1286-1299
- [10] Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes[J]. *J Cell Biol*, 1962, 12: 198-202
- [11] Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 549-555
- [12] Sandri M, Coletto L, Grumati P, et al. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 23): 5325-5333
- [13] Morss AS, Edelman ER. Glucose modulates basement membrane fibroblast growth factor-2 via alterations in endothelial cell permeability[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14635-14644
- [14] Xu X, Kobayashi S, Chen K, et al. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(25): 18077-18092
- [15] Mellor KM, Bell JR, Young MJ, et al. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(6): 1035-1043
- [16] Ye LX, Yu J, Liang YX, et al. Beclin 1 knockdown retards re-endothelialization and exacerbates neointimal formation via a crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 146-154
- [17] Torisu T, Torisu K, Lee IH, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor[J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1281-1287
- [18] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676
- [19] Decuypere JP, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction[J]. *Cells*, 2012, 1(3): 284-312
- [20] Heras-Sandoval D, Perez-Rojas JM, Hernandez-Damian J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2694-2701
- [21] Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 174-179
- [22] Zheng R, Yao Q, Du S, et al. The status of p53 in cancer cells affects the role of autophagy in tumor radiosensitisation [J]. *J BUON*, 2014, 19(2): 336-341