

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.11.003

高糖诱导血管内皮细胞凋亡机制的研究*

张佳 王小丽 于东升 胡巧云 唐传峰 刘培玉 盛亮[△]

(南京医科大学基础医学院药理学系 江苏 南京 211166)

摘要 目的: 探讨高糖诱导血管内皮细胞凋亡的分子机制。**方法:** 在高浓度葡萄糖的培养基中培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelium cells, HUVECs), 模拟高糖血症条件下内皮细胞的病理状态。通过 MTT 检测 HUVEC 细胞生存情况; JC-1 检测 HUVEC 细胞线粒体膜电位; 逆转录-聚合酶链反应和荧光素酶报告基因检测己糖激酶 II (hexokinase II, HK II) 的转录; 免疫印迹和免疫共沉淀检测 VDAC1、HK II、Bcl-2、Bax 线粒体上蛋白表达水平和它们之间的相互作用。**结果:** 25 mM 和 100 mM 葡萄糖诱导 HUVEC 细胞生存率分别下降了 19.21%±4.13% 和 25.29%±5.78%; 线粒体膜电位分别降低了 34.19%±5.13% 和 58.63%±4.78%; HK II 蛋白表达水平分别降低了 13.97%±6.32% 和 35.13%±5.18%; 使得 HK II 同 VDAC1 互作减弱, 代偿性增强了 VDAC1 同 Bax 互作。**结论:** 高糖下调 HUVEC 细胞 HK II 表达水平, 增强线粒体膜通透性, 最终诱导了细胞凋亡。

关键词: 高糖血症; 己糖激酶 II; 血管内皮细胞; 电压依赖性阴离子通道 1; 线粒体

中图分类号: R-33; Q244; R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)11-2012-07

Study on the Mechanism of High Glucose-induced Endothelial Cell Apoptosis*

ZHANG Jia, WANG Xiao-li, YU Dong-sheng, HU Qiao-yun, TANG Chuan-feng, LIU Pei-yu, SHENG Liang[△]

(Department of pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of hyperglycemia-induced apoptosis of vascular endothelial cells.

Methods: HUVEC cells were used to mimic the pathological status of endothelial cells in the condition of hyperglycemia. The cell viability was detected by MTT assay, the mitochondrial membrane potential was detected with JC-1 staining and flow cytometry assay, the transcription levels of hexokinase II (HK II) were detected using reverse transcription-polymerase PCR and luciferase assay. Western blot and immune co-precipitation were used to analyse the expression of VDAC1, HK II, Bcl-2 and Bax on the mitochondrial outer membrane and their interactions. **Results:** The viability of HUVEC cells incubated in medium containing 25 or 100 mM glucose was reduced by 19.21%±4.13% and 25.29%±5.78% respectively; mitochondrial membrane potential was reduced by 34.19%±5.13% and 58.63%±4.78% respectively; HK II protein expression levels were reduced by 13.97%±6.32% and 35.13%±5.18% respectively; the interactions between HK II and VDAC1 were both reduced in the two groups, while the Bax and VDAC1 interactions were compensatorily enhanced. **Conclusion:** High glucose reduced the HK II expression, increased mitochondrial permeability and eventually induced the apoptosis of HUVEC cells.

Key words: Hyperglycemia; Hexokinase II; Vascular endothelial cells; Voltage-Dependent Anion Channel 1; Mitochondria

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q244; R587.1 **Document code:** A

ArticleID: 1673-6273(2018)11-2012-07

前言

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是因胰岛素绝对或相对不足或者靶细胞对胰岛素敏感性降低引起的内分泌疾病^[1], 糖尿病血管病变是糖尿病人最常见的并发症, 是糖尿病致死、致残的主要原因^[2], 内皮细胞凋亡是糖尿病血管病变的始动因素和病理基础^[3]。

线粒体有“细胞动力工厂”之称, 为细胞的活动提供能量^[4], 其功能的破坏是细胞发生凋亡的重要原因^[5]。电压依赖性阴离子通道(Voltage-Dependent Anion Channel, VDAC)位于线粒体

外膜^[6]能够影响线粒体的功能^[7]。VDAC有三种亚型, VDAC1、VDAC2和VDAC3, 其中血管内皮细胞中主要表达VDAC1^[8]。在病理状态下VDAC1通道开放, 释放细胞色素c(Cytochrome c, Cyt c)入胞浆, 诱导细胞凋亡^[9]。VDAC1的关闭受HK II、Bcl-2和Bax的影响, 前两者闭合VDAC1, 降低线粒体膜通透性, 后者则开放之增加线粒体膜通透性^[10], 造成Cyt c向胞浆逸散诱导细胞凋亡。

迄今为止已有大量研究表明高糖可以从多条通路诱导内皮细胞凋亡: ①高糖可诱导蛋白激酶C-β2 (protein kinase C-β2, PKC-β2)表达上升, 激活核因子-κB(nuclear factor kappa

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81400613, 81770862); 江苏省自然科学基金项目(BK20140901)

作者简介: 张佳(1991-), 硕士研究生, 主要研究方向: 分子药理, 电话: 18360866126, E-mail: zhangjiaadom@163.com

△ 通讯作者: 盛亮(1980-), 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 分子药理, E-mail: lgsheng@njmu.edu.cn

(收稿日期: 2017-12-05 接受日期: 2018-01-03)

B, NF- κ B), 导致炎症因子产生, 同时能增强还原型辅酶 II 氧化酶活性, 导致活性氧增加, 促进内皮细胞凋亡^[11]; ② 高糖还可以直接激活 NF- κ B, 使环氧化酶-2 表达上调, 诱导前列腺素 E2 生成, caspase-3 活化, 诱导内皮细胞凋亡^[12]。但目前关于高糖诱导血管内皮细胞凋亡的机制众说纷纭, 更深层次的机制还有待阐明。

本研究发现高糖诱导 HUVEC 细胞凋亡升高, 并伴有 HKII 和 Bcl-2 表达水平下调, 降低了两者与 VDAC1 互作, 代偿性增强 Bax 的病理作用。探讨高糖条件下, 血管内皮细胞 HKII 和 Bcl-2 表达调控机制, 以期对糖尿病血管并发症的防治提供新线索和潜在的干预靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC 细胞购自上海中科院干细胞库; MTT(ST316)、线粒体膜电位检测试剂盒、细胞线粒体分离试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; HK II 及其对照病毒购自上海吉凯生物有限公司; PPAR γ 和 CREB 表达质粒由美国密歇根大学芮良优教授惠赠; Protein A+G 树脂珠购自上海七海复泰生物科技有限公司; 转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Life technologies 公司; 蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Dual-Luciferase 报告基因检测试剂盒购自中国普洛麦格生物技术有限公司; SYBR 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; Prime Script RT reagent 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; MG-132 购自上海蓝木化工有限公司; VDAC1 抗体购自 SANTA CRUZ(sc-390996); HK II (CST2867)、Bax(CST5023)、Bcl-2 (CST2872)、Cleaved Caspase-3 (CST9661)、Cytochrome c (CST4272)、 β -actin (CST3700)、PPAR γ (CST2435)、Flag (CST2368)、Phospho-CREB(CST9198)、CREB (CST9197) 抗体购自 Cell Signaling Technology; COXIV (ab202554) 抗体购自 Abcam 公司; 山羊抗鼠 IgG 二抗、山羊抗兔 IgG 二抗购自中国伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含 10 % FBS (gibco-10270)、1 % Penicillin-Streptomycin (HyClone-SV30010) 的 DMEM/LOW GLUCOSE 培养基 (HyClone-SH30021.01) 中培养 HUVEC 细胞, 放置 5 % CO₂, 37 °C 的恒湿培养箱。

1.2.2 细胞处理 于细胞培养皿中接种 HUVEC 细胞, 经文献调研发现 25 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度是合适的实验剂量^[13], 细胞培养过夜后换 25 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度的培养基中培养 72 h, 用于细胞生存情况、蛋白表达及相互作用、基因表达和线粒体功能的检测。

1.2.3 细胞感染 于 6 孔板中接种 2×10^5 个 HUVEC 细胞, 培养过夜。加入 2×10^7 个病毒颗粒, 2 h 后换 5 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度的培养基, 孵育 72 h 后收细胞, 用于细胞生存情况、蛋白表达及相互作用、基因表达和线粒体功能的检测。

1.2.4 细胞转染 于 6 孔板接种 HUVEC 细胞, 次日用 Lipofectamine 2000 转染细胞。将质粒 1 μ g/孔稀释于 50 μ L 无抗生素无血清的培养基。将脂质体加入混合液中 (按 1 μ g 质粒: 2 μ L 脂质体比例加入), 并将待转染的细胞换成无血清培养基,

加入 900 μ L/孔无血清培养基; 5 min 后, 每孔加质粒脂质体混合物, 置于 5 % CO₂, 37 °C 的恒湿培养箱中培养 4 h 后换成血清培养基继续培养 48 h, 收获细胞, 用于荧光素酶报告基因检测。

1.2.5 MTT 检测 在 96 孔板接种 HUVEC 细胞, 通过细胞计数将细胞的密度控制在 10^5 cell/mL 左右, 设置调零孔和对照孔, 培养 72 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 培养箱中孵育 1 h。弃去上层溶液, PBS 清洗培养皿, 弃上清, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶液, 室温摇床 10 min, 用酶标仪测量每孔的吸光度, 检测波长为 570 nm。

1.2.6 线粒体分离提取 将 HUVEC 细胞接种于培养皿中, 72 h 后, 2.5 % 胰酶消化, 离心收集细胞。将 4000 万个细胞重悬于 1.5 mL 线粒体分离试剂于中, 冰浴放置 15 min。将细胞悬液转移到玻璃匀浆器中, 匀浆 30 次后, $600 \times g$, 4 °C 离心 10 min。取上清至另一离心管中, $11000 \times g$, 4 °C 离心 10 min。去除上清, 沉淀即为分离得到的细胞线粒体。

1.2.7 线粒体膜电位检测 于 6 孔板中接种 HUVEC 细胞, 72 h 后, 2.5 % 胰酶消化细胞, 离心, 弃上清。加入 1 mL 培养基, 加入 1 mL JC-1 染色液, 混匀, 37 °C 孵育 20 min。弃上清, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 加入 1 mL 染色缓冲液, 进行流式细胞仪检测。

1.2.8 蛋白免疫印记 用冷 PBS 清洗培养皿, RIPA 收集细胞, 冰上裂解 30 min, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液即为细胞总蛋白。将 20 μ g 蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶, 60 V 恒压电泳, 当蛋白样品进入分离胶时, 调节电压为 100 V。将凝胶架到电转槽内并连接电源 (100 V)。取出 PVDF 膜, 用 5 % 的脱脂牛奶封闭 1 h。将蛋白条带于 4 °C 冰箱, 孵一抗过夜。次日用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min。室温孵育二抗 1 h。TBST 溶液洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min。滴加 ECL 发光液, 利用化学成像仪检测化学发光信号。

1.2.9 免疫共沉淀 于 6 孔板接种 HUVEC 细胞, 72 h 后, 以 100 μ L/孔 RIPA 溶液裂解细胞, 离心取上清, 检测蛋白浓度, 取 0.5 mg 蛋白样品用 RIPA 溶液稀释到 0.5 mL, 加入 2 μ L VDAC1 抗体, 在 4 °C 翻转混合 2 h, 加入 20 μ L Protein A + G 树脂珠, 4 °C 翻转混合 1 h, 离心弃上清, 用 RIPA 洗树脂珠 3 次, 树脂珠和蛋白样品混合煮沸, 最后一起加入凝胶上样。

1.2.10 实时定量 RT-PCR 用 Trizol 裂解 HUVEC 细胞, 提取总 RNA 并检测其纯度与浓度。将 RNA 逆转录成 cDNA, 将 SYBR Green、ddH₂O、引物和 cDNA 混合, 进行 PCR 扩增, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来计算基因水平的变化。引物序列为: HK II 上游: 5'-TGCCACCAGACTAACTAGACG-3', 下游 5'-CCCGTGCC-CACAATGAGAC-3'; PPAR γ 上游: 5'-GGGATCAGCTCCGTG-GATCT-3', 下游 5'-TGCACTTTGGTACTCTTGAAGTT-3'; Bcl-2 上游: 5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3', 下游 5'-CG-GTTCAGGTACTCAGTCATCC-3'; 内参 GAPDH 上游: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游 5'-GGCTGTTGT-CATACTTCTCATGG-3'。

1.2.11 荧光素酶报告基因 (Luciferase) 检测 制备被动裂解缓冲液 1 $\times$ PLB; 5 $\times$ PLB 与蒸馏水按 1:4 比例混匀。LAR II: 用 Luciferase Assay Buffer II 10 mL 溶解冻干粉 Luciferase Assay Substrate。STOP & Go; 取 2.1 mL 50 $\times$ STOP & Go Substrate 加到

105 mL 的 STOP& Go Buffer。在提供的棕色 STOP& Go Reagent 瓶中,振摇 10 s。于 96 孔板中加入 20 μ L/孔 PLB 裂解液,加入 100 μ L/孔 LAR II,在荧光发光仪上检测萤火虫萤光素酶,加入 100 μ L/孔 Stop&Go 试剂,检测海肾萤光素酶的活性。以萤火虫萤光素酶数值/海肾萤光素酶的比值进行统计分析。

1.3 数据统计与分析

本研究测量指标的数据以 mean $\pm$ SE 表示。组间比较采用 t 检验或单向方差分析,继而组间的多重比较采用 Bonferroni Dunn 方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖培养诱导 HUVEC 细胞凋亡

一方面,文献调研发现 25 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度可用于高糖刺激细胞的研究;另一方面,我们的实验结果也表明 HUVEC 细胞在 25 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度刺激下出现凋亡。MTT 实验结果发现细胞生存率分别下降了 19.21% $\pm$ 4.13% 和 25.29% $\pm$ 5.78%。Western blot 结果显示,Bcl-2 表达分别下降了 32.1% $\pm$ 6.03% 和 51.01% $\pm$ 5.15%,caspase3 活化分别增强了 64.12% $\pm$ 10.06% 和 89.03% $\pm$ 11.31%,Bax 水平没有显著变化,线粒体膜电位分别降低了 34.19% $\pm$ 5.13% 和 58.63% $\pm$ 4.78%。见图 1。

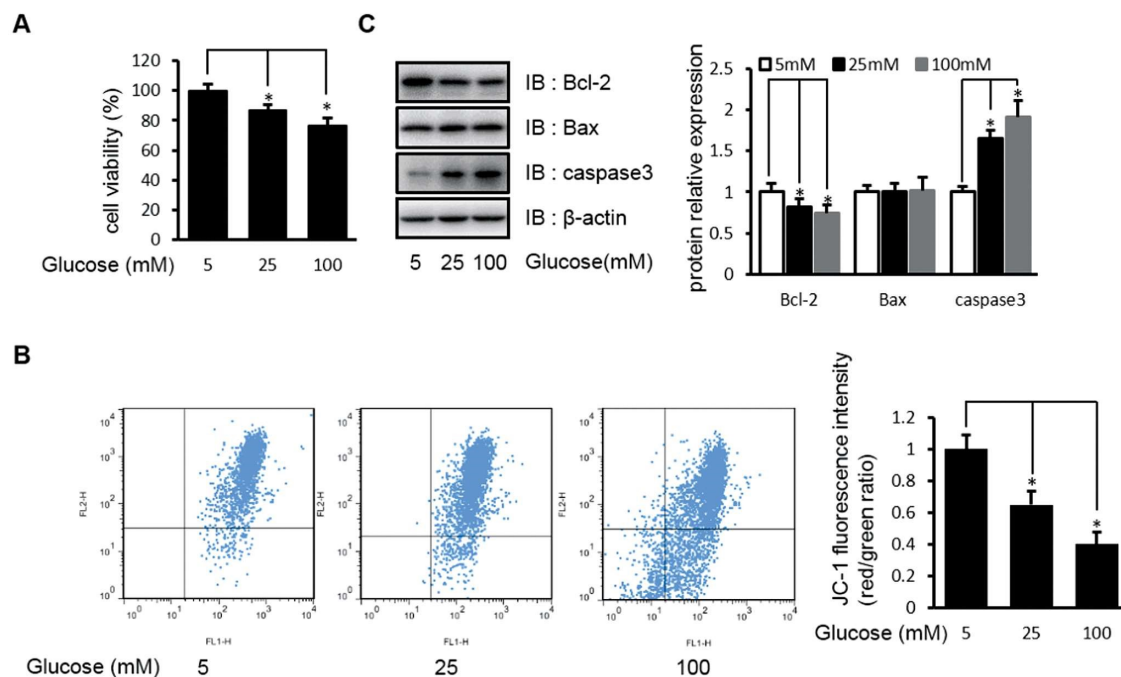


图 1 高浓度葡萄糖诱导 HUVEC 细胞凋亡

Fig.1 High glucose induced apoptosis of HUVEC cells

注:与对照组相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

Note: compared with control group,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

2.2 高糖诱导凋亡相关蛋白在线粒体丰度的改变

依据图 1 的结果,高糖可能通过影响线粒体功能诱导细胞凋亡。Cyt c 是一种小型的血红蛋白,属于细胞色素 c 蛋白家族,其与线粒体内膜松散地结合在一起,Cyt c 同其他细胞色素不同,其是高度水溶性的,携带一个电子,是电子传递链的组成部分,可进行氧化还原^[14]。我们发现 25 mM 和 100 mM 葡萄糖浓度条件下,线粒体内特异性 Cyt c 蛋白水平分别降低了 17.89% $\pm$ 7.23% 和 35.81% $\pm$ 5.81%,而其在细胞内总体水平没有变化;Bax 在线粒体表达水平分别上升了 59.99% $\pm$ 5.82% 和 98.79% $\pm$ 8.91%,而其在细胞内总体表达水平没有变化;HK II 在线粒体表达水平分别下降了 16.73% $\pm$ 7.61% 和 36.78% $\pm$ 6.23%,并且细胞内总体表达水平分别下降了 13.97% $\pm$ 6.32% 和 35.13% $\pm$ 5.18%。免疫共沉淀发现 VDAC1 与 Bax 相互作用增强,而同 Bcl-2 和 HK II 的相互作用减弱。见图 2。

2.3 过表达 HK II 逆转高糖诱导的 HUVEC 细胞凋亡

我们用 HK II 病毒感染 HUVEC 细胞,上调 HK II 表达水

平,MTT 实验结果发现 100 mM 葡萄糖条件下细胞生存率回复到正常水平的 90.95% $\pm$ 5.98% 并且线粒体膜电位回复到正常水平的 82.56% $\pm$ 6.58%。Western blot 结果显示,在高糖条件下 Bcl-2 表达水平回复到正常水平的 95.83% $\pm$ 7.62%;活化的 caspase3 表达水平回复到正常水平的 97.63% $\pm$ 7.83%。见图 3。

2.4 过表达 HK II 逆转高糖诱导的凋亡相关蛋白在线粒体的变化

我们在细胞内过表达 HK II,使 100 mM 葡萄糖条件下 HK II 在线粒体上的表达水平回复到正常水平的 89.95% $\pm$ 7.13%,Cyt c 在线粒体内蛋白水平回复到正常水平的 90.1% $\pm$ 8.12%。而 Cyt c 在细胞内总体水平没有变化。在高糖条件下 Bcl-2 的表达水平回复到正常水平的 89.97% $\pm$ 6.93%。进一步考察上述蛋白的相互作用,发现 HK II 的过表达增强了自身以及 Bcl-2 与 VDAC1 的互作,同时下调了 VDAC1 与 Bax 的互作。见图 4。

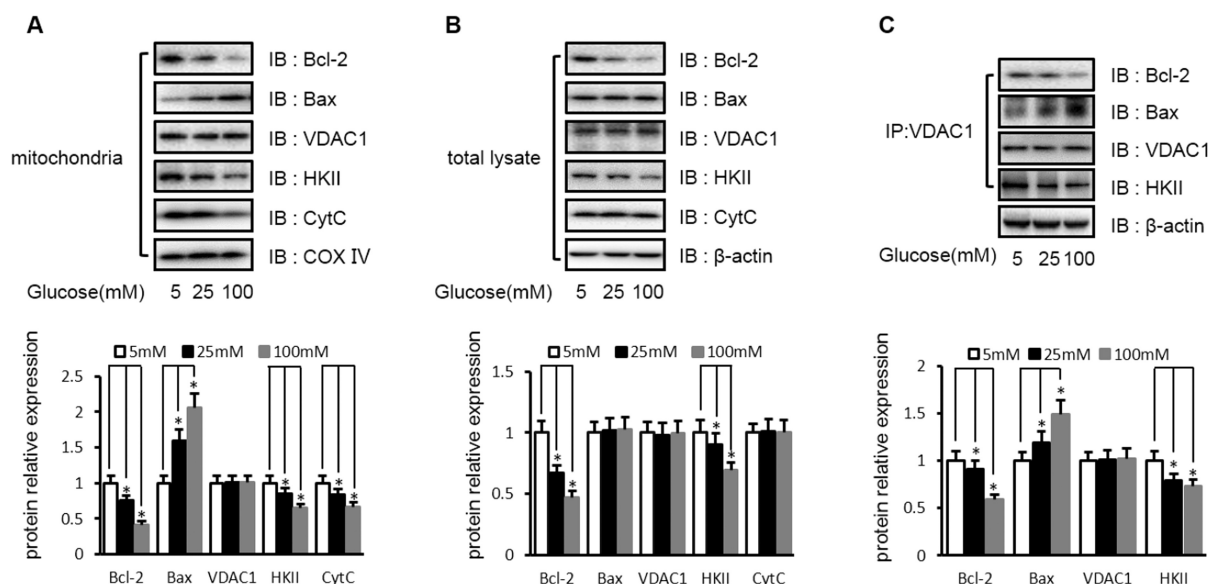


图2 高糖对 VDAC1 互作蛋白表达水平的影响

Fig.2 High glucose influenced the expression of proteins interfering with VDAC1

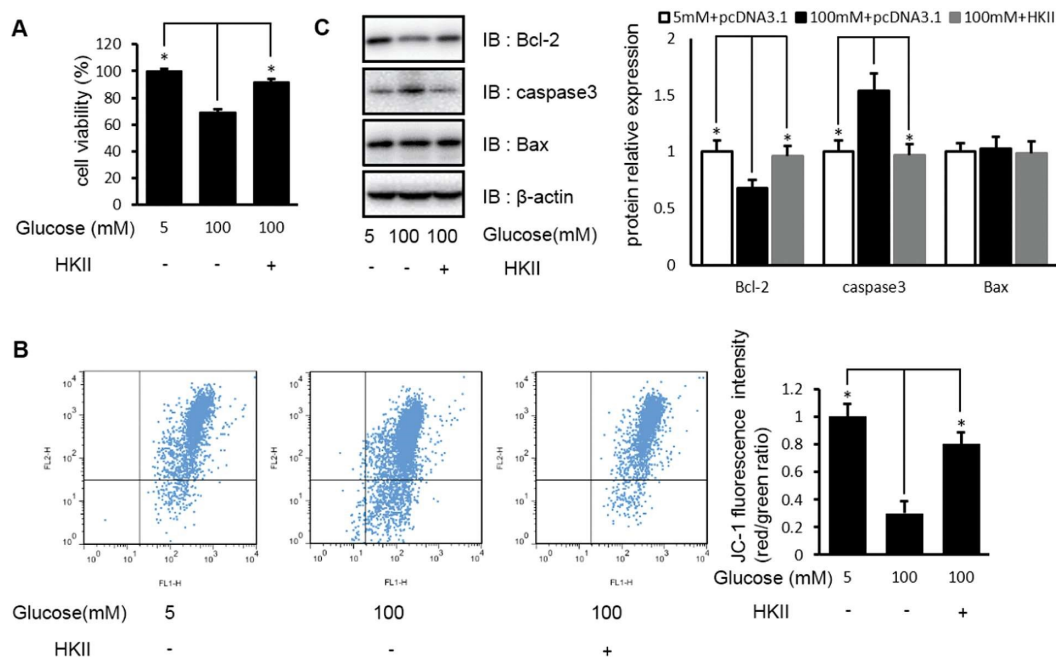
注:与对照组相比, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。Note: compared with control group, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图3 过表达 HK II 逆转高糖诱导 HUVEC 细胞凋亡

Fig.3 Overexpression of HK II reversed high glucose inducing HUVEC cells apoptosis

注:与对照组和高糖 + pcDNA3.1 组相比, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。Note: compared with control group and high glucose + pcDNA3.1 group, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

2.5 高糖下调 HUVEC 细胞中 HK II 的转录

我们发现 25 mM、100 mM 葡萄糖处理条件下, HK II 的 mRNA 水平分别下降了 $50.31\% \pm 8.81\%$ 和 $70.35\% \pm 5.61\%$ 。与此同时, 我们使用蛋白酶体抑制剂 MG132 阻断 HK II 蛋白酶体降解途径, 发现高糖对 HK II 蛋白水平的下调趋势并未受 MG132 的影响。经文献调研发现过氧化物酶体增殖生物激活受体 γ (Peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 是调控 HK II 表达的转录因子。我们克隆了含有人 HK II 启动子的

荧光素酶报告质粒 pGL3-HK II, 共表达 PPAR γ 可以升高 HK II 转录水平 18.79 ± 0.68 倍。高糖抑制了 PPAR γ 的 mRNA 水平和蛋白水平, 然而我们表达外源性带有 Flag 标签的 PPAR γ 时, 其表达水平未受高糖影响。见图 5。

2.6 高糖经由抑制 HK II 下调 Bcl-2 表达水平

我们在细胞内过表达 HK II, 使 100 mM 葡萄糖条件下 Bcl-2 的 mRNA 水平回复到正常水平的 $86.85\% \pm 5.91\%$ 。我们克隆了含有 Bcl-2 启动子的荧光素酶报告质粒 pGL3-Bcl-2,

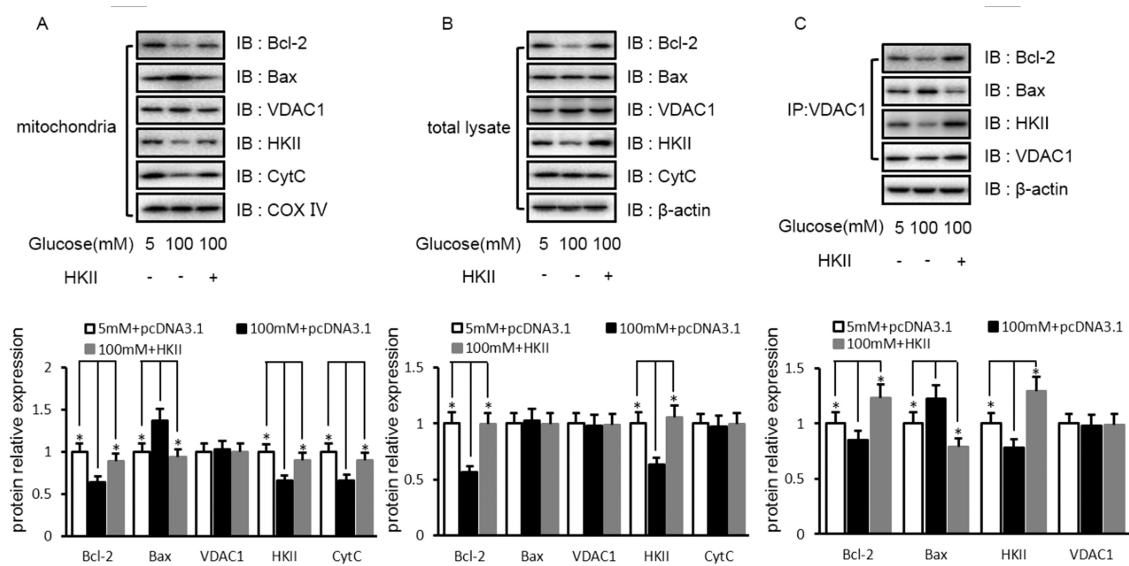


图 4 过表达 HK II 逆转 HUVEC 细胞线粒体内凋亡相关蛋白的表达变化

Fig.4 Overexpression of HK II reversed the expression of proteins related to apoptosis in the mitochondria of HUVEC cells

注:与对照组和高糖+pcDNA3.1 组相比, $*P < 0.05$, $n=3$ 。

Note: compared with control group and high glucose+pcDNA3.1 group, $*P < 0.05$, $n=3$.

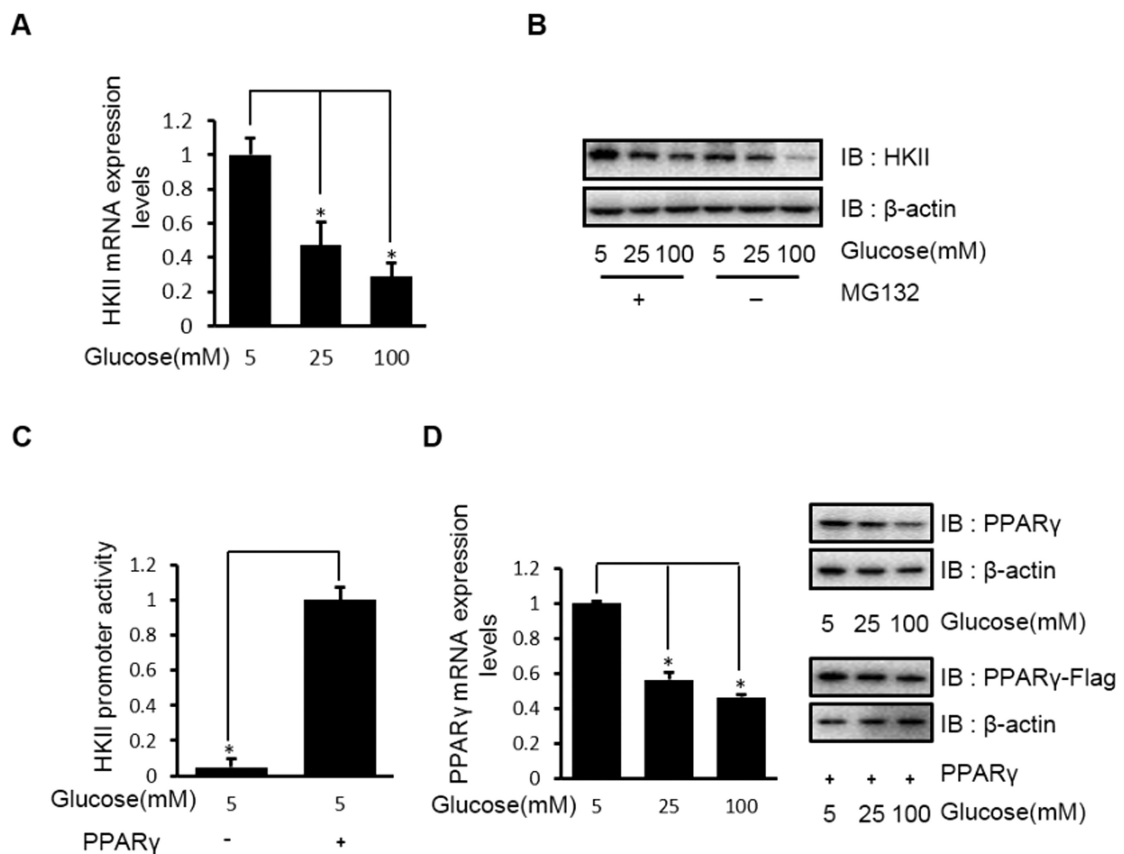


图 5 高糖下调 HUVEC 细胞中 HK II 的转录

Fig.5 High glucose downregulated the transcription of HK II in HUVEC cells

注:与对照组相比, $*P < 0.05$, $n=3$ 。

Note: compared with control group, $*P < 0.05$, $n=3$.

在共表达 CREB 的条件下, Bcl-2 转录水平升高了 18.98 ± 0.85 倍。我们考察了 CREB 的磷酸化水平作为 CREB 活化指标, 发现高糖抑制 CREB 的磷酸化水平, 但在 HK II 过表达情况下 CREB 磷酸化水平有所回升, 这同 Bcl-2 的 mRNA 水平变化相

一致。见图 6。

3 讨论

糖尿病血管病变是糖尿病主要的并发症, 是糖尿病并发多

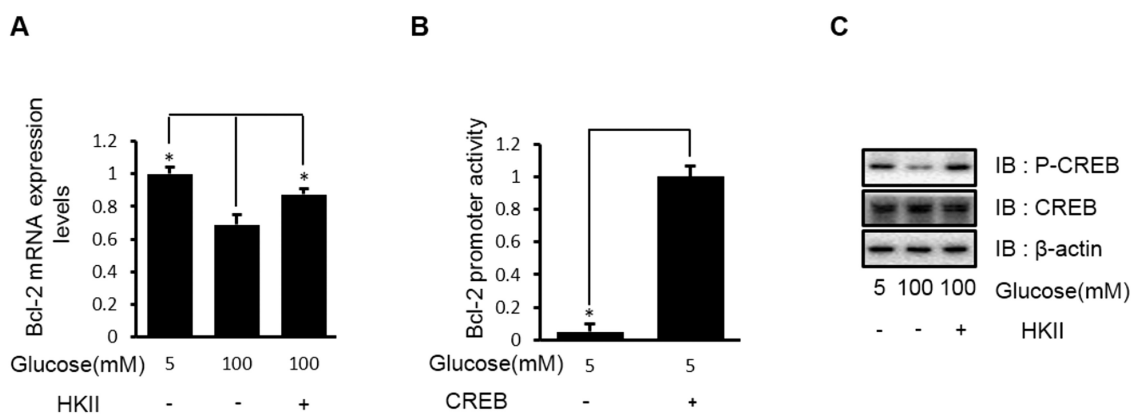


图6 高糖通过抑制 HK II 下调 Bcl-2 表达水平

Fig. 6 High glucose downregulated the expression of Bcl-2 via inhibiting the expression of HK II

注:与对照组和高糖+pcDNA3.1 组相比, * $P<0.05$, $n=3$ 。Note: compared with control group and high glucose+pcDNA3.1 group, * $P<0.05$, $n=3$.

种器官(肾脏、眼、心脏、皮肤)损伤的病理基础^[15],其初始阶段是内皮细胞凋亡^[16]。在本研究中,我们以 HUVEC 细胞作为研究对象^[17],在高糖培养条件下观察并探讨其凋亡机制,以期寻找治疗糖尿病血管病的理想靶点。

细胞凋亡是在多种调控因子的作用下产生的可控性的细胞程序性死亡^[18]。线粒体是控制细胞生命活动的中心,不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,同时也是调控细胞凋亡的重要的细胞器,在细胞凋亡过程中处于核心地位^[19]。Cyt c 是第一个被证明的在凋亡细胞线粒体中释放的蛋白,只要其从线粒体释放入胞浆,细胞就会不可逆地发生凋亡^[20]。这一过程与线粒体的跨膜电位 (mitochondrial inner transmembrane potential, $\Delta \psi_m$) 的改变密切相关^[21]。线粒体 $\Delta \psi_m$ 的降低被证明是细胞凋亡级联反应过程最初发生的事件,一旦线粒体 $\Delta \psi_m$ 骤降,则细胞凋亡将不可逆发生:细胞线粒体膜通透性增强,将增加 Cyt c 释放,释放到胞浆中的 Cyt c 与凋亡蛋白酶激活因子结合,形成 Cyt c/凋亡蛋白酶激活因子凋亡体,促进 caspase-9 前体的活化,活化加速的 caspase-9 前体可激活 caspase-3 前体,使细胞进入不可逆的凋亡过程^[22]。通过 MTT 证实了高糖对 HUVEC 细胞凋亡的诱导,并且这种凋亡可能与线粒体膜通透性增强相关^[23]。JC-1 检测发现线粒体膜电位的降低和 western blot 检测发现线粒体内特异性 Cyt c 蛋白水平的下降很好的证实了这一点。

VDAC1 位于线粒体外膜,可在膜上形成亲水性电压门控通道,Bax 可与 VDAC1 直接结合,增加 VDAC1 的开放,从而升高线粒体膜的通透性^[24]。Western blot 结果发现,虽然 Bax 和 VDAC1 总体蛋白水平未受高糖影响,但是 Bax 在线粒体上的丰度被高糖显著上调。由于 Bax 与 VDAC1 之间相互作用的增强可上调线粒体膜的通透性^[25],我们通过免疫共沉淀发现两者之间的相互作用在高糖条件下显著增强,这一点很好的解释了线粒体膜通透性的增强。有报道显示,VDAC1 蛋白的三维结构呈 β -桶状模式,由 19 个 β -氨基酸链所构成,其 N 端的氨基酸残基呈 α -水平式螺旋分布于 VDAC1 孔内^[26],VDAC1 的 N 端 α -螺旋区域是 VDAC1 与 HK II 或 Bcl-2 的共同结合位点,纯化的 HK II 或 Bcl-2 均能降低含 VDAC1 脂质体的电导性,但

对 N 端被剪切过的 VDAC1 脂质体没有影响^[27],进一步证实 HK II 或 Bcl-2 能与 VDAC1 的 N 端区域相结合,抑制 VDAC1 的开放,产生抑制凋亡的效应^[28],我们通过免疫共沉淀发现,在高糖条件下 HK II 和 Bcl-2 与 VDAC1 的相互作用显著下降,进而通过检测 HK II 和 Bcl-2 总体细胞表达水平,发现高糖显著下调了两者的蛋白水平,这可能是他们同 VDAC1 相互作用降低的主要原因。此外,因 HK II 同 Bax 之间存在着竞争结合 VDAC1 的关系^[29],我们推测 HK II 表达水平的下降为 Bax 和 VDAC1 相互作用的增强创造了条件。

为验证 HK II 的下调是高糖诱导 HUVEC 细胞凋亡过程的中心事件,我们使用 HK II 病毒感染 HUVEC 细胞,逆转高糖对 HK II 的下调作用,MTT 检测发现高糖诱导的细胞凋亡得到抑制;JC-1 染色发现线粒体膜电位降低获得了改善;western blot 结果发现线粒体内 Cyt c 蛋白水平有所回升。这些都证实了过表达 HK II 改善了线粒体膜的通透性,这可能与 Bax 在线粒体丰度的下降以及其同 VDAC1 相互作用的减弱密切相关。

HK II 表达水平的上调通过竞争结合使得 VDAC1 与 Bax 之间的相互作用明显减弱,进而降低了 Bax 与线粒体膜的结合,下调了其在线粒体膜上的丰度,降低了 VDAC1 的开放^[30]。有趣的是,HK II 的上调增强了 Bcl-2 的蛋白表达,因此增强了 Bcl-2 与 VDAC1 之间的相互作用。这也是高糖诱导 HUVEC 细胞凋亡得以抑制的重要原因。HK II 上调 Bcl-2 的表达已有报道^[31],这与我们的实验结果相一致。我们的数据证明 HK II 可能上调了 Bcl-2 的转录因子 CREB^[32]的磷酸化水平,从而增强 CREB 对 Bcl-2 的转录活性,因此 HK II 表达的下调间接造成了 Bcl-2 表达水平的下降,但其中具体调控机制有待进一步研究。

为探讨高糖对 HK II 表达调控的机制,我们检测了 HK II 的 mRNA 水平,发现高糖抑制了其转录。此外,我们用 MG132 阻断了 HK II 蛋白酶体的降解途径,发现高糖对 HK II 蛋白水平的下调趋势并未改变。反证高糖对 HK II 表达的调控存在于转录阶段。经文献调研发现 PPAR γ 是调控 HK II 转录的重要转录因子^[33],Luciferase 实验结果也证实了在 HUVEC 细胞内 PPAR γ 对 HK II 确有转录调控作用。另外,我们发现高糖能够

抑制 PPAR γ 的转录而非加速其蛋白降解,最终造成 PPAR γ 表达水平下调。因此我们认为高糖通过下调 PPAR γ 的转录水平抑制其对 HK II 的转录。HK II 表达水平的下调一方面造成 Bcl-2 的下调,减弱了其 VDAC1 的相互作用,另一方面减弱了 HK II 与 Bax 竞争结合 VDAC1 的能力,造成 Bax 和 VDAC1 相互作用代偿性增强,增加了线粒体膜通透性,启动了细胞凋亡^[34]。

综上所述,高浓度葡萄糖具有诱导 HUVEC 细胞凋亡的作用,其机制可能是高糖通过下调 HK II 的表达,进而降低 Bcl-2 的表达,减弱了二者同 VDAC1 的互作,间接加强了 Bax 同 VDAC1 的互作,增加了细胞线粒体膜的通透性,启动 caspase 级联反应,从而导致细胞不可逆性凋亡。因此, HK II 可能成为抑制内皮细胞凋亡,治疗糖尿病血管病变的重要靶点。

参考文献(References)

- [1] Wang N, Cheng J, Han B, et al. Exposure to severe famine in the prenatal or postnatal period and the development of diabetes in adulthood: an observational study[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(2): 1-8
- [2] Ervasti J, Virtanen M, Lallukka T, et al. Contribution of comorbid conditions to the association between diabetes and disability pensions: a population-based nationwide cohort study [J]. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 2016, 42(3)
- [3] Wang Q, Zhang M, Torres G, et al. Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission[J]. *Diabetes*, 2017, 66(1): 193
- [4] Sturm A, Mollard V, Cozijnsen A, et al. Mitochondrial ATP synthase is dispensable in blood-stage *Plasmodium berghei* rodent malaria but essential in the mosquito phase [J]. *Colloquium Paper*, 2015: 10216-10223
- [5] Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology & Therapeutics*, 2011, 16(3-4): 233
- [6] Shoshanbarmatz V, Krelin Y, Shteinfekuzmine A. VDAC1 functions in Ca(2+) homeostasis and cell life and death in health and disease[J]. *Cell Calcium*, 2017[Epub ahead of print]
- [7] Ben-Hail D, Begas-Shvartz R, Shalev M, et al. Novel Compounds Targeting the Mitochondrial Protein VDAC1 Inhibit Apoptosis and Protect Against Mitochondria Dysfunction [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(48): jbc.M116.744284
- [8] Shoshan-Barmatz V and Mizrahi D. VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1)[J]. *Atlas of Genetics & Cytogenetics in Oncology & Haematology*, 2012, (8)
- [9] Yang X, Tang S, Dai C, et al. Quinocetone induces mitochondrial apoptosis in HepG2 cells through ROS-dependent promotion of VDAC1 oligomerization and suppression of Wnt1/ β -catenin signaling pathway [J]. *Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2017, 105: 161
- [10] Huang L, Han J, Benhail D, et al. A New Fungal Diterpene Induces VDAC1-dependent Apoptosis in Bax/Bak-deficient Cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(39): 23563-23578
- [11] M Z, F S, F C, et al. Subcellular proteomic approach for identifying the signaling effectors of protein kinase C- β 2 under high glucose conditions in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7247-7262
- [12] Fratantonio D, Speciale A, Canali R, et al. Low nanomolar caffeic acid attenuates high glucose-induced endothelial dysfunction in primary human umbilical-vein endothelial cells by affecting NF- κ B and Nrf2 pathways[J]. *Biofactors*, 2016, 43(1)[Epub ahead of print]
- [13] Chen Z, Canet MJ, Sheng L, et al. Hepatocyte TRAF3 promotes insulin resistance and type 2 diabetes in mice with obesity [J]. *Mol Metab*, 2015, 4(12): 951
- [14] Wen Y, Li W, Poteet EC, et al. Alternative Mitochondrial Electron Transfer as a Novel Strategy for Neuroprotection [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(18): 16504-16515
- [15] Casqueiro J, Casqueiro J and Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis [J]. *Indian Journal of Endocrinology & Metabolism*, 2012, 16(Suppl1): S27-S36
- [16] Amore A, Cirina P, Conti G, et al. Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy[J]. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 2004, 19(1): 53
- [17] Zitmangal T, Green J, Pasmanikchor M, et al. Vitamin D manipulates miR-181c, miR-20b and miR-15a in human umbilical vein endothelial cells exposed to a diabetic-like environment [J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2014, 13(1): 8
- [18] Johnsen HL, Robert HH. Both the apoptotic suicide pathway and phagocytosis are required for a programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Bmc Biology*, 2016, 14(1): 39
- [19] Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 112(6): 957-962
- [20] Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, et al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2012, 1817(4): 598-609
- [21] Lemasters JJ, Qian T, He L, et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2002, 4(5): 769
- [22] Geng J, Qiang W, Rong W, et al. Tubeimoside-1 induces glioma apoptosis through regulation of Bax/Bcl-2 and the ROS/Cytochrome C/Caspase-3 pathway [J]. *Oncotargets & Therapy*, 2015, 2015 (default): 303-311
- [23] Colombini M. Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability[J]. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*, 2016, 49 (1): 57-64
- [24] Camara AKS, Zhou YF, Wen PC, et al. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 460
- [25] Shi Y, Chen J, Weng C, et al. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, 305(4): 989
- [26] Zweckstetter M. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2010, 31(3): 227-285

- factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6043-6048
- [10] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674
- [11] Hirsch H A, Iliopoulos D, Joshi A, et al. A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases[J]. Cancer Cell, 2010, 17(4): 348-361
- [12] Enomoto H, Nakamura H, Liu W, et al. Down-regulation of HDGF Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo[J]. Anticancer Res, 2015, 35(12): 6475-6479
- [13] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390
- [14] Bao C, Wang J, Ma W, et al. HDGF: a novel jack-of-all-trades in cancer[J]. Future Oncology, 2014, 10(16): 2675-2685
- [15] Enomoto H, Nakamura H, Liu W, et al. Hepatoma-Derived Growth Factor: Its Possible Involvement in the Progression of Hepatocellular Carcinoma [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(6): 14086-14097
- [16] Chen B, Huang T, Jiang J, et al. miR-141 suppresses proliferation and motility of gastric cancer cells by targeting HDGF [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 388(1-2): 211-218
- [17] Guo H, Li W, Zheng T, et al. MiR-195 targets HDGF to inhibit proliferation and invasion of NSCLC cells[J]. Tumour Biol, 2014, 35(9): 8861-8866
- [18] Song Y, Hu Z, Long H, et al. A complex mechanism for HDGF-mediated cell growth, migration, invasion, and TMZ chemosensitivity in glioma[J]. J Neurooncol, 2014, 119(2): 285-295
- [19] Fritz V, Fajas L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells [J]. Oncogene, 2010, 29(31): 4369-4377
- [20] Liu L, Zhao X, Zhao L, et al. Arginine Methylation of SREBP1a via PRMT5 Promotes De Novo Lipogenesis and Tumor Growth [J]. Cancer Res, 2016, 76(5): 1260-1272
- [21] Swinnen J V, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(4): 358-365
- [22] Deberardinis R J, Sayed N, Ditsworth D, et al. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth[J]. Curr Opin Genet Dev, 2008, 18(1): 54-61
- [23] MEDES G, THOMAS A, WEINHOUSE S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices *in vitro* [J]. Cancer Res, 1953, 13(1): 27-29
- [24] Zhao X, Feng D, Wang Q, et al. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1 [J]. J Clin Invest, 2012, 122(7): 2417-2427
- [25] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 153-161
- [26] Zhu Z, Zhao X, Zhao L, et al. p54nrb/NONO regulates lipid metabolism and breast cancer growth through SREBP-1A [J]. Oncogene, 2015
- [27] Tania M, Khan M A, Song Y. Association of lipid metabolism with ovarian cancer[J]. Current Oncology, 2010
- [28] Hager M H, Solomon K R, Freeman M R. The role of cholesterol in prostate cancer [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(4): 379-385
- [29] Jacobs R J, Voorneveld P W, Kodach L L, et al. Cholesterol metabolism and colorectal cancers[J]. Curr Opin Pharmacol, 2012, 12(6): 690-695
- [30] Guo D, Hildebrandt I J, Prins R M, et al. The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(31): 12932-12937

(上接第 2018 页)

- [27] Arzoine L, Zilberberg N, Ben-Romano R, et al. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(6): 3946
- [28] Monaco G, Decrock E, Arbel N, et al. The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(14): 9150-9161
- [29] Tomasello MF, Guarino F, Reina S, et al. The voltage-dependent anion selective channel 1 (VDAC1) topography in the mitochondrial outer membrane as detected in intact cell [J]. Plos One, 2013, 8(12): e81522
- [30] Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, et al. Bcl-2 Prevents Bax Oligomerization in the Mitochondrial Outer Membrane[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(21): 18361
- [31] Rho M, Kim J, Jee CD, et al. Expression of type 2 hexokinase and mitochondria-related genes in gastric carcinoma tissues and cell lines [J]. Anticancer Research, 2007, 27(1A): 251
- [32] R M, M M, JA C, et al. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005, 25(2): 234
- [33] Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, et al. PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver[J]. Nature Communications, 2012, 3(3): 672
- [34] Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, et al. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(21): 14764