

高浓度葡萄糖促脂质氧化效应及其与低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞凋亡的协同作用

华军益^{1,3}, 曾智¹, 胥昀², 黄兆铨³

(华西医科大学附属第一医院 1. 心内科, 2. 血液科, 四川省成都市 610041; 3. 浙江省东方医院心内科)

[主题词] 高血糖; 脂蛋白, 低密度; 内皮, 血管; 凋亡; 脂过氧化物; 动脉粥样硬化

[摘要] 以培养的人脐静脉内皮细胞株内皮细胞 V304 为对象, 研究高浓度葡萄糖有无促进细胞介导的低密度脂蛋白脂质过氧化效应及高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白协同诱导凋亡及其可能机制。采用 TBARS 法检测培养基丙二醛含量; Giemsa 染色后采用光镜及电镜对凋亡细胞定性观察, 流式细胞仪检测凋亡率。结果显示, 高浓度葡萄糖促进细胞介导的低密度脂蛋白脂质过氧化效应, 并呈量-效关系; 高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白协同诱导血管内皮细胞凋亡, 很可能与前述效应以及通过产生氧化应激而延长细胞周期转换有关。结果提示, 高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白协同诱导血管内皮细胞凋亡作用促进了糖尿病状态下动脉粥样硬化的发生发展, 可能是糖尿病易发生动脉粥样硬化的部分机制。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

High Glucose Enhances Lipid Peroxidation and Synergetically Induces V304 Apoptosis with Low Density Lipoprotein

HUA Jun-Yi, ZENG Zhi, XU Yun, and HUANG Zhao-Quan

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of West China University of Medicine, Chengdu 610041, China)

[MeSH] Hyperglycemia; Lipoprotein, LDL; Endothelium, Vascular; Apoptosis; Lipid Peroxides; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** The pathological mechanism of high occurrence of atherosclerosis in diabetes mellitus (DM) has not been clear. The purpose of this study is to detail its possible mechanism by studying whether high glucose and LDL could synergetically injure vascular endothelial cells (ECV304). **Methods** Glucose (5.5, 20 and 40 mmol/L) and/or LDL (100 mg/L) was added into the medium of cultured endothelial cells and incubated for 24, 48, and 72 h respectively. The lipid peroxidation was assessed by the content of TBARS, apoptosis and cell cycle were studied with Giemsa staining, transmission electron microscopy and Coulterepics SP. **Results** (1) High glucose could enhance cell-mediated LDL peroxidation and showed a position of dose-effect relationship. (2) High glucose and LDL had synergetical effects on inducing apoptosis. This may be preferentially related to the cell-mediated LDL peroxidation enhanced by high glucose and prolongation cell cycle traversal of endothelial cells through oxidative stress produced by high glucose. **Conclusion** High glucose and LDL could synergetically induce apoptosis in endothelial cells, which aggravate the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. This may at least partly attribute to the mechanism that diabetes mellitus mostly accompany high risk of atherosclerosis.

糖尿病(diabetes mellitus, DM)促发动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病机制尚未明了, 目前认为是多种危险因素作用于不同环节所导致的多因素疾病, 这些因素之间可能存在复杂的交互作用促成了糖尿病状态下 As 的发生发展。高浓度葡萄糖可通过产生过多氧自由基造成氧化应激而对血管内皮细胞产生毒性作用^[1], 从而启动了 As 的发生、发展。

过去较多的研究集中在葡萄糖和蛋白质发生非酶促糖基化反应方面, 而近年来动脉壁脂蛋白在处于氧化应激的生物体系中发生氧化修饰倍受重视。本文通过研究高浓度葡萄糖是否具有促进低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)生物氧化效应以及协同诱导血管内皮细胞凋亡的作用, 初步探讨糖尿病状态下 As 的发病机制。

[收稿日期] 2001-07-02 [修回日期] 2002-03-05

[作者简介] 华军益, 男, 1973 年 4 月出生, 浙江省衢州市人, 浙江省东方医院心内科主治医师, 华西医科大学硕士研究生, 主要从事冠心病、高血压的临床工作和基础研究及心血管疾病介入治疗。曾智, 男, 1954 年 10 月出生, 四川省南充市人, 华西医科大学附属第一医院副院长, 心内科教授, 主要从事冠心病的临床工作和基础研究及心血管疾病介入治疗。胥昀, 女, 1977 年 3 月出生, 四川省成都市人, 硕士研究生, 主要从事白血病、细胞凋亡临床工作和基础研究。

1 材料与方法

1.1 内皮细胞 V304 的复苏、培养与传代

从液氮罐中取出冻存的内皮细胞 V304 投入 37℃温水中, 摇动使尽快解冻。吸出细胞悬液并滴加 DMEM 液 10 mL, 混匀, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃

上清后再重复洗涤一次,用 DMEM 液稀释混匀,接种于培养瓶中,37℃ 5% CO₂ 孵箱静置 7 h,换液,除去未贴壁细胞。以后每隔 2 天换液 1 次,至长满并融合成单层。用 0.25% 胰蛋白酶和 0.2% EDTA 混和液(1:1)消化,传代比例为 1:2,培养条件不变。

1.2 人天然低密度脂蛋白的提取

取健康人血浆,按张林华等^[2]一次性密度梯度超速离心法提取。以牛血清白蛋白(1 g/L)为标准品,用 Lowry 法测定蛋白浓度。

1.3 内皮细胞 V304 形态学观察

经 Giemsa 染色后使用倒置相差显微镜观察细胞。收集细胞,4 000 r/min 离心 10 min,加入 0.3% 戊二醛混匀,固定 5 min,10 kr/min 离心 15 min,弃上清,加入 3% 戊二醛,包埋、切片、定位后电镜观察。

1.4 脂质氧化程度的测定

采用 TBARS 法测定细胞上清液中脂质氧化程度。其原理是脂过氧化物降解中的丙二醛可与硫代巴比妥酸缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.5 细胞凋亡的测定及细胞周期分析

采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)插入 DNA 定量染色法。常规消化、收集细胞,每个样本细胞数约 1×10^6 ,用 PBS(不含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺, pH 7.4, 0.15 mol/L)洗涤二次, - 20℃ 75% 冰乙醇固定,1 200 r/min 离心 3 min 去除固定液,用 PBS 充分洗涤二次后,加入 0.5 mL PBS 液(同前)制成细胞悬液,按 1:50 悬浮于 2 mL 含 0.1% Triton-X-100、50 mg/L PI 和 5 mg/L RNAaseA 中,轻轻振荡使细胞分离,置于 - 40℃ 黑暗处染色 60 min,以 400 目筛网过滤,调整细胞浓度,上机检测。检测波长为 488 nm。每份样本检测 5 000~10 000 个细胞。用 multicvle DNA 分析软件包进行凋亡率和细胞周期分布测定。

1.6 实验分组

将细胞消化并接种于 6 孔培养板,待细胞均匀铺满孔底面后,换含 0.5% 小牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h,将其分成六组: 5.5 mmol/L 葡萄糖组; ④20 mmol/L 葡萄糖组; ④40 mmol/L 葡萄糖组;

LDL 组; LDL+ 20 mmol/L 葡萄糖组; LDL+ 40 mmol/L 葡萄糖组。每孔总容量 2 mL,不足部分以 DMEM 液补足,分别孵育 24 h、48 h 及 72 h 后检测各项指标。

1.7 统计学处理

采用 SPSS10.0 版统计分析软件包处理实验数据。采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料显著性检验用单因素方差分析(ANOVA)和两两比较(LSD 法)。交

互作用的判断采用析因设计的方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

经 Giemsa 染色后,清晰可见正常内皮细胞核及疏松淡染的染色质,其中部分细胞染色质浓集成块而深染,偏向核的一侧或呈环形浓集于核膜下,符合凋亡形态学改变(图 1, Figure 1)。电镜证实为凋亡细胞(图 2, Figure 2)。



图 1. Giemsa 染色。

Figure 1. Giemsa staining. Apoptotic cells showing chromatin condensation, partial distribution in the nuclear or surrounding nuclear membrane ($\times 100$).

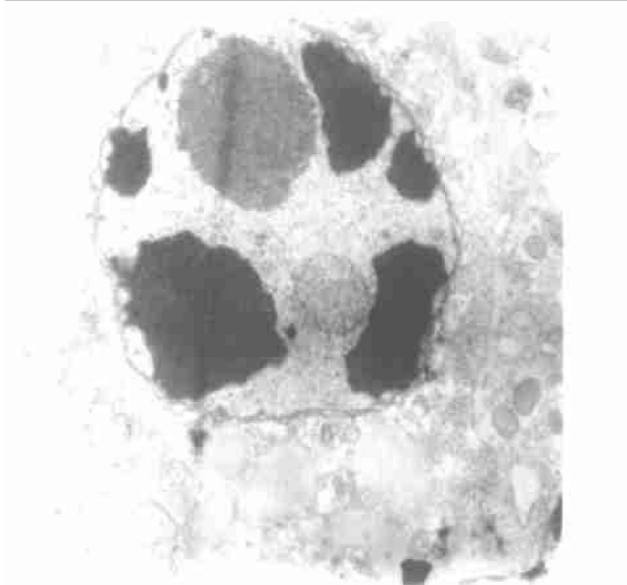


图 2. 透射电镜下的凋亡细胞。

Figure 2. Apoptotic cell is proved by transmission electron microscope ($\times 8 000$).

2.2 脂质过氧化修饰

从表 1(Table 1) 可以看出, 高浓度葡萄糖有一定的促脂质氧化作用。细胞脂质过氧化量随葡萄糖浓度增加而有上升趋势 ($P < 0.01$), 同时也随作用时间延长呈轻度上升趋势 ($P > 0.05$)。提示 24 h 脂质过氧化水平已达到相当水平, 加入外源天然 LDL 后, 丙二醛含量显著增加, 表现出明显的协同作用。

表 1. 内皮细胞培养不同时间后上清液中硫代巴比妥酸反应物质含量。

Table 1. TBARS content in the medium of cultured endothelial cell at different time ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$).

Groups	24 h	48 h	72 h
Glu 5.5	0.60 \pm 0.09	0.64 \pm 0.11	0.67 \pm 0.15
Glu 20	1.89 \pm 0.31 ^a	2.01 \pm 0.07 ^a	2.08 \pm 0.26 ^a
Glu 40	2.29 \pm 0.21 ^{ab}	2.32 \pm 0.17 ^a	2.34 \pm 0.32 ^a
LDL	3.20 \pm 0.20	3.23 \pm 0.23	3.23 \pm 0.38
LDL+ Glu 20	5.03 \pm 0.18 ^{ce}	5.18 \pm 0.40 ^{ce}	5.21 \pm 0.19 ^{ce}
LDL+ Glu 40	6.10 \pm 0.49 ^{de}	6.43 \pm 0.35 ^{ce}	6.66 \pm 0.44 ^{ce}

a: $P < 0.05$, compared with Glu 5.5 group; b: $P < 0.05$, compared with Glu 20 group; c: $P < 0.05$, compared with LDL group; d: $P < 0.05$, compared with LDL+ Glu 20 group; e: $P < 0.05$ synergism approved with ANOVA. Glu 5.5: 5.5 mmol/L glucose; Glu 20: 20 mmol/L glucose; Glu 40: 40 mmol/L glucose.

2.3 细胞凋亡和细胞周期分析

2.3.1 细胞凋亡分析 培养的内皮细胞 V304 有一定基础凋亡率。20 mmol/L 葡萄糖无明显诱导内

皮细胞 V304 凋亡作用 ($P > 0.05$), 40 mmol/L 葡萄糖作用 72 h 后细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)。LDL 作用 48 h 后有致凋亡作用 ($P < 0.05$), LDL+ 20 mmol/L 及 40 mmol/L 葡萄糖组作用 48 h 和 72 h 均有明显致凋亡效应 ($P < 0.05$), 见表 2(Table 2)。

表 2. 高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白致内皮细胞凋亡率。

Table 2. Apoptosis inducing activity of Glucose and LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$).

Groups	24 h	48 h	72 h
Glu 5.5	2.43 \pm 0.45	2.57 \pm 0.29	2.63 \pm 0.25
Glu 20	2.46 \pm 0.29	2.77 \pm 0.15	2.87 \pm 0.15
Glu 40	2.26 \pm 0.55	3.03 \pm 0.31	4.60 \pm 0.36 ^c
LDL	2.40 \pm 0.30	3.20 \pm 0.30	5.50 \pm 0.35
LDL+ Glu 20	2.63 \pm 0.15	5.90 \pm 0.26 ^b	6.77 \pm 0.31 ^b
LDL+ Glu 40	3.07 \pm 0.38	7.90 \pm 0.46 ^{ab}	10.0 \pm 1.0 ^{ab}

a: $P < 0.05$, compared with LDL+ Glu 20 group at the same period; b: $P < 0.05$, compared with the same group in the prior period; c: $P < 0.01$ compared with controls in the same period; Synergism, $P < 0.05$. Glu 5.5: 5.5 mmol/L glucose; Glu 20: 20 mmol/L glucose; Glu 40: 40 mmol/L glucose.

2.3.2 细胞周期分析 从细胞周期分布可见, 高浓度葡萄糖和 LDL 作用内皮细胞 V304 二至三天均可使 G_0/G_1 细胞百分比增加, 而 S 和 G_2/M 比例下降, 提示高浓度葡萄糖和 LDL 均可延缓 G_0/G_1 向 S 期过渡。但这尚不能排除同时影响 G_2 向 M 期过渡 (表 3, Table 3)。

表 3. 高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白对内皮细胞 V304 细胞周期分布的影响。

Table 3. Effects on the cell cycle of ECV304 ($\bar{x} \pm s$, %).

Group	24 h			48 h			72 h		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
Glu 5.5	66.5 \pm 1.5	25.4 \pm 3.4	8.2 \pm 2.0	70.1 \pm 4.1	20.6 \pm 1.5	9.2 \pm 4.8	76.3 \pm 1.3	15.0 \pm 1.0	8.8 \pm 1.4
Glu 40	69.0 \pm 4.5	24.9 \pm 2.9	6.0 \pm 2.0	78.9 \pm 1.6 ^a	16.4 \pm 1.8	4.7 \pm 0.6	84.3 \pm 0.8 ^a	10.9 \pm 1.6	4.7 \pm 2.2
LDL	65.7 \pm 2.0	27.1 \pm 1.9	7.1 \pm 0.4	80.0 \pm 1.3 ^a	13.7 \pm 2.1	6.9 \pm 1.0	82.4 \pm 1.1 ^a	11.5 \pm 2.8	6.2 \pm 1.6
Glu+ LDL	65.2 \pm 2.9	27.4 \pm 2.1	7.3 \pm 1.0	81.0 \pm 3.9 ^a	12.9 \pm 2.6	6.1 \pm 2.0	84.5 \pm 5.1 ^a	11.6 \pm 2.7	3.9 \pm 2.4

a: $P < 0.05$, compared with Glu 5.5 group in the same period. Glu 5.5: 5.5 mmol/L glucose; Glu 20: 20 mmol/L glucose; Glu 40: 40 mmol/L glucose.

3 讨论

随着葡萄糖浓度增加、作用时间延长, 膜脂质过氧化程度与细胞凋亡增加, 当在反应体系中同时加入低密度脂蛋白后, 过氧化脂质含量显著增加, 细胞凋亡出现时点提前、比例增高, 表现出明显的协同损伤效应, 这些效应很可能是糖尿病促发动脉粥样硬

化的部分机制。

脂质过氧化修饰在动脉粥样硬化的发生机制中占有重要作用^[3]。糖尿病和高脂血症等诱发脂质过氧化是动脉粥样硬化的重要发病学环节。经氧化修饰后形成的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL, ox-LDL) 致动脉粥样硬化作用明显增强^[4]。最近有研究显示, 氧化型低密度脂蛋白的毒性作用可能为其

中的氧化甾醇部分^[5],也有研究显示氧自由基介导了氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡^[5,6]。本研究显示,高浓度葡萄糖能够促进细胞介导的低密度脂蛋白过氧化,这与 Maziere 等^[7]研究一致,并且呈浓度依赖性,即随着葡萄糖浓度增加,低密度脂蛋白氧化程度增加,诱导内皮细胞凋亡作用也相应增强。另外,氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞毒性作用具有时间依赖性,即作用 24 h 后低密度脂蛋白氧化程度已达到较高水平,与作用 48 h 及 72 h 无统计学差异($P > 0.05$),但内皮细胞凋亡率随作用时间延长而逐渐增加。提示动脉粥样硬化的发生与高脂血症和糖尿病病程也有关。

血管细胞的凋亡在动脉粥样硬化进展和好转中起一定作用^[8]。目前认为,高浓度葡萄糖或氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡与氧化应激及自由基损伤有关^[6,9],同时发现糖尿病患者血清脂质过氧化物和超氧阴离子升高,因而认为氧化应激导致了糖尿病并发症。近来发现,高浓度葡萄糖或氧化型低密度脂蛋白均可促发内皮细胞内 Ca^{2+} 升高,从而激活 Ca^{2+} 依赖的核酸内切酶,裂解 DNA 成 180~200 bp 或其整数倍大小的片段而诱导凋亡^[10]。用维生素 E 可显著抑制氧化型低密度脂蛋白刺激 Ca^{2+} 内流,提示 Ca^{2+} 超载很可能与氧化应激有关^[11]。本研究显示,内皮细胞 V304 有一定基础凋亡率,40 mmol/L 葡萄糖作用 72 h 可诱导内皮细胞 V304 凋亡,与文献^[10]报道的 48 h 不同,可能与所采用的内皮细胞 V304 与原代培养的人脐静脉内皮细胞不同有关。20 mmol/L 葡萄糖在三天内均未诱发内皮细胞 V304 凋亡,加入低密度脂蛋白后凋亡出现时间提前,凋亡率亦显著增加,表现出显著协同作用,并且在一定浓度范围内随葡萄糖浓度增加,协同致凋亡作用增强,可能与高浓度葡萄糖促进膜脂质过氧化和细胞介导的低密度脂蛋白氧化作用直接相关,这可以解释糖尿病合并脂质紊乱时动脉粥样硬化发病率高、进展快、病情重的特点。

从凋亡照片图和细胞周期分布表可以看出,从

48 h 到 72 h, G_0/G_1 期细胞比例增加, S 和 G_2/M 比例下降,同时出现了凋亡亚二倍体峰,提示细胞凋亡的发生与高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白延缓细胞周期转换有关,但尚无法判断凋亡细胞具体主要来源于细胞周期的何期,尚需进一步研究。另外,从细胞周期分布比例上看,似乎联合组对细胞周期的影响与单独组比无明显差异,不易看出协同作用。

应该指出,凋亡虽是通过启动自身内部机制而发生的细胞自然死亡,但也可以是细胞对某些外界毒性物质的一种应答^[1]。本研究中内皮细胞发生凋亡可认为是对高浓度葡萄糖和低密度脂蛋白产生氧化应力的一种应答,在启动动脉粥样硬化发生中占有一定地位。

[参考文献]

- [1] Ceriello A, Russo PD, Amstad P, et al. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*, 1996, **45**: 471-475
- [2] 张林华,刘秉文,等. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21**: 257-260
- [3] Daniel Steiberg. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 1997, **95**: 1 062-071
- [4] Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1993, **98**: 1-9
- [5] Rusinio AE, Lin Y, Thewke D, et al. Isolation of somatic cell mutant resistant to the induction of apoptosis by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 2000, **275** (10): 7 296-303
- [6] Harada Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, et al. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem*, 1998, **273** (16): 9 681-687
- [7] Maziere C, Auclair M, Rose Robert F, et al. Glucose-enriched medium enhances cell-mediated low density lipoprotein peroxidation. *FEBS Lett*, 1995, **363** (3): 277-279
- [8] Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 367-380
- [9] Galle J, Schneider R, Heinloth A, et al. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int*, 1999, **55** (44): 1 450-461
- [10] Wu QD, Wang JH, Fennessy F, et al. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol*, 1999, **277** (6 pt 1): C: 1 229-238
- [11] 徐雅琴,唐朝枢,张钧华,等. 氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对血管内皮细胞钙转运的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 32-34 (此文编辑 文玉珊)