

牛磺酸通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡

梁栋 刘云峰 章毅 尹建红 许林鑫 杨静

【摘要】 目的 探讨牛磺酸对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响及其信号途径。**方法** 取健康产妇分娩后 12 h 内的脐带分离人脐静脉内皮细胞(HUVEC),进行细胞培养并分为 5 组:正常葡萄糖组(5 mmol/L D-葡萄糖,NG 组);高糖组(30 mmol/L D-葡萄糖,HG 组);NG+TAU 组(5 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸);HG+TAU 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸);HG+TAU+Wo 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸+50 nmol/L wortmannin)。干预 48 h 后应用流式细胞术检测细胞凋亡情况,Western 印迹检测磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)蛋白的表达水平,2,7-二氯二氢荧光素二乙酯(H2DCF-DA)探针技术及荧光倒置显微镜检测活性氧簇的相对含量。**结果** 与 NG 组相比,HG 组细胞的凋亡率显著增加($P<0.05$)。与 HG 组相比,HG+TAU 组的凋亡率下降($P<0.05$)。与 HG+TAU 组相比,HG+TAU+Wo 组的凋亡率较高($P<0.05$)。与 NG 组相比,HG 组磷酸化-Akt 蛋白表达下降($P<0.05$)。与 HG 组比较,HG+TAU 组磷酸化-Akt 蛋白表达增加($P<0.05$)。与 HG+TAU 组相比,HG+TAU+Wo 组磷酸化-Akt 蛋白表达下降($P<0.05$)。牛磺酸可降低高糖诱导的活性氧簇生成($P<0.05$),这一作用亦可被 wortmannine 所阻断($P<0.05$)。**结论** 牛磺酸通过 PI3K/Akt 信号途径调节细胞内活性氧簇生成,进而在高糖环境下发挥其抗凋亡作用。

【关键词】 牛磺酸;内皮细胞;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B;细胞凋亡

Taurine inhibits endothelial cell apoptosis induced by high glucose through activating PI3K/Akt pathway Liang Dong*, Liu Yunfeng, Zhang Yi, Yin Jianhong, Xu Linxin, Yang Jing,*Department of Endocrinology, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Yang Jing, Email: yangjlm@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects and signalling pathway of taurine on high glucose induced endothelial apoptosis. **Methods** The umbilical cord from the healthy puerperal woman delivered in 12 hours was taken and the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated. HUVECs were cultured and divided into 5 groups: normal glucose group (5 mmol/L D-glucose, NG group), high glucose group (30 mmol/L D-glucose, HG group), NG+TAU group (5 mmol/L D-glucose+5 mmol/L taurine), HG+TAU group (30 mmol/L D-glucose+5 mmol/L taurine), HG+TAU+Wo group (30 mmol/L D-glucose+5 mmol/L taurine+50 nmol/L wortmannin). After 48 hours, the apoptosis was tested by Flow Cytometry and expression of phosphorylated-protein kinase B (p-Akt) was examined by Western blot. At the same time, the relative content of reactive oxygen species (ROS) was tested by 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) probe technique and fluorescent inverted microscope. **Results** Compared with NG group, apoptosis rates in HG group were markedly enhanced ($P<0.05$). Compared with HG group, the apoptosis rates in HG+TAU group were decreased ($P<0.05$). Compared with HG+TAU group, apoptosis rates in HG+TAU+Wo group were increased ($P<0.05$). Compared with HG group, expression of p-Akt protein in NG+TAU group was increased ($P<0.05$). Compared with HG+TAU group, expression of p-Akt protein was reduced in HG+TAU+Wo group ($P<0.05$). Taurine could decrease the production of ROS induced by hyperglycemia ($P<0.05$), and the effects were blocked by wortmannin ($P<0.05$). **Conclusions** Taurine can regulate the generation of intracellular ROS by PI3K/Akt pathway, then prevent apoptosis of endothelial cell induced by high glucose.

【Key words】 Taurine; Endothelial cells; Phosphatidylinositol 3-kinase; Protein kinase B; Apoptosis

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 73-76)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2015.02.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373464, 812708822);山西省自然科学基金资助项目(2013011047-3, 2012011039-8);山西省卫生厅科研课题(201201062);山西省回国留学人员科研资助项目(2013-111);山西省留学人员择优启动项目(2011-762, 2013-68);中华医学会临床医学科研专项资金资助项目(13040440429)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一医院内分泌科(梁栋,刘云峰,尹建红,许林鑫,杨静);030001 太原,山西医科大学基础医学院药理教研室(章毅)

通信作者:杨静, Email: yangjlm@126.com

2 型糖尿病发病率显著增加并逐渐成为一个公共健康问题,给社会经济发展带来沉重负担^[1]。高血糖是糖尿病血管病变的高危因素,而后者是糖尿病患者的主要死因^[2]。内皮细胞功能受损及活性下降在很大程度上导致动脉粥样硬化斑块的形成。研究证实,高糖诱导的内皮细胞凋亡与升高的活性氧簇含量及随后的多重信号系统的激活密切相关^[3,4]。牛磺酸是一种含硫半必需氨基酸,参与多种生理功能的调节,有助于预防糖尿病、肥胖、脂代谢紊乱和高血压的发生。研究报道,牛磺酸作为一种内源性的抗氧化剂,通过一系列机制保护细胞(包括抗氧化、调节离子转运、渗透压等)。另有报道表明牛磺酸能够预防高糖诱导的内皮细胞凋亡,并且与削弱内皮细胞内活性氧簇形成相关,但其详细的信号机制尚不明确^[5,6]。有学者提出,牛磺酸可通过调节细胞内蛋白激酶 B (Akt/PKB) 的磷酸化水平减少细胞内活性氧簇的生成^[7,8]。本研究拟进一步证实在内皮细胞内,牛磺酸是否经由调节细胞内 Akt/PKB 磷酸化水平而发挥其抗凋亡作用。

1 材料和方法

1.1 材料 牛磺酸购自 Sigma 公司。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 BD 公司。活性氧簇检测试剂 4,5-二氨基荧光素二乙酸酯(DAF-2DA)购自 Cayman 公司。磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)特异性阻断剂 wortmannin 购自 Calbiochem 公司。磷酸化-Akt (Ser473) 抗体为 Cell Signaling Technology 公司产品。Actin 抗体购自 NeoMarker 公司。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的分离培养 取山西医科大学第一医院产科健康产妇分娩后 12 h 内的脐带,依据文献的方法分离 HUVEC^[9]。采用 M199 培养基,其中含 10%FBS,青霉素 100 IU/ml,链霉素 0.1 μg/L,肝素 0.1 g/L,ECGS 75 mg/L。细胞在 37℃、5%CO₂ 条件下培养,当细胞密度达 70%~80%时,用 0.25%胰蛋白酶 0.02%EDTA 消化传代。

1.2.2 实验分组及干预 实验分组如下:正常葡萄糖组(5 mmol/L D-葡萄糖,NG 组);高糖组(30 mmol/L D-葡萄糖,HG 组);NG+TAU 组(5 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸);HG+TAU 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸);HG+TAU+W₀ 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 mmol/L 牛磺酸+50 nmol/L wortmannin);培养板中细胞融合至 80%时用含 1%FBS 的 M199 培养基过夜同步。之后,各组不同因素干预 48 h。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 HUVEC 接种于

6 孔板,细胞同步后加上述不同因素处理,每组设 3 个复孔,培养 48 h 后弃培养液,胰酶消化后收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,annexin-V/PI 双染试剂盒染色,流式细胞仪定量分析。早期细胞凋亡率 = 早期凋亡细胞数/所测细胞总数 × 100%,实验重复 3 次。

1.2.4 活性氧簇生成检测 35 mm 培养皿中细胞分组及干预同前。之后在正常葡萄糖浓度无酚红培养液中,37℃细胞负载 2,7-二氯二氢荧光素二乙酯(H2DCF-DA, 5 μmol/L)30 min。PBS 冲洗 3 次,避光。加入预热的无酚红培养基。荧光倒置显微镜观察并摄片。ISO200,曝光时间 1/4.5 s,亮度、对比度固定。每样品随机选取 4 个视野,绿色荧光强度平均积分光密度使用 Image Pro 图像分析软件定量分析,实验重复 3 次。

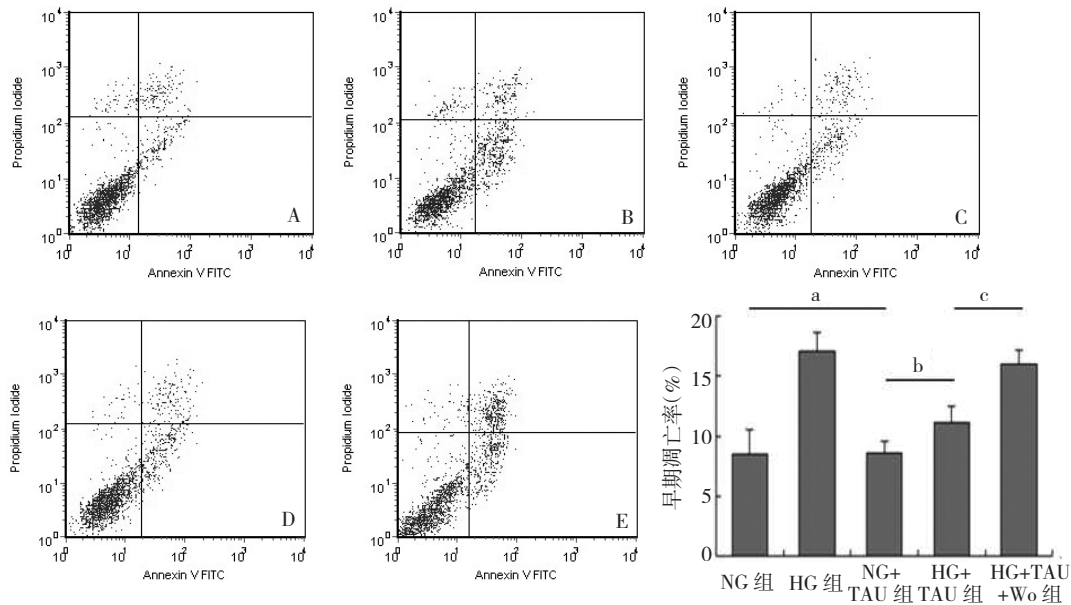
1.2.5 Western 印迹分析 35 mm 细胞培养板中细胞分组及干预同前。加入 100 μl 细胞裂解液裂解 5 min。收集细胞裂解液至 1.5 ml EP 管中(4℃)。超声 3 × 5 s,沸水中煮沸 5 min。10 000 r/min 离心 (r=165 mm)5 min。BCA 法检测总蛋白含量。每样品取 30 μg,加等体积 2 × SDS 上样缓冲液,混匀,上样。进行 SDS-PAGE 分离蛋白(分离胶浓度 10%)。之后转至 PVDF 膜。室温下,5%脱脂奶封闭液封闭 1 h。1 : 1 000 的兔抗人磷酸化-Akt (Ser473) 抗体 4℃过夜孵育。之后,1 : 2 000 的 HRP-标记的羊抗兔抗体室温下孵育 1 h。ECL 试剂盒孵育 2 min,X 光片感光,显影。应用 Image J 图像处理系统对胶片进行扫描测量感光区带的感光密度,并进行积分处理,β-actin 作为内参,实验重复 3 次,计算相对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学分析软件,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准:α=0.05。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛磺酸对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响 与 NG 组相比,HG 组细胞的凋亡率显著增加($P < 0.05$);与 HG 组相比,HG+TAU 组的凋亡率下降($P < 0.05$);与 HG+TAU 组相比,HG+TAU+W₀ 组的凋亡率较高($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

2.2 牛磺酸对高糖诱导的 HUVEC 磷酸化-Akt 蛋白表达的影响 与 NG 组相比,HG 组磷酸化-Akt 蛋白表达下降($P < 0.05$);与 HG 组比较,HG+TAU 组的磷酸化-Akt 蛋白表达增加($P < 0.05$);与 HG+TAU 组相比,HG+TAU+W₀ 组的磷酸化-Akt 蛋白表达下降



注:A:NG 组;B:HG 组;C:NG+TAU 组;D:HG+TAU 组;E:HG+TAU+Wo 组;HUVEC:人脐静脉内皮细胞;NG 组:正常葡萄糖组;HG 组:高糖组;NG+TAU 组:正常葡萄糖 + 牛磺酸组;HG+TAU 组:高糖 + 牛磺酸组;HG+TAU+Wo 组:高糖 + 牛磺酸 + wortmannin 组

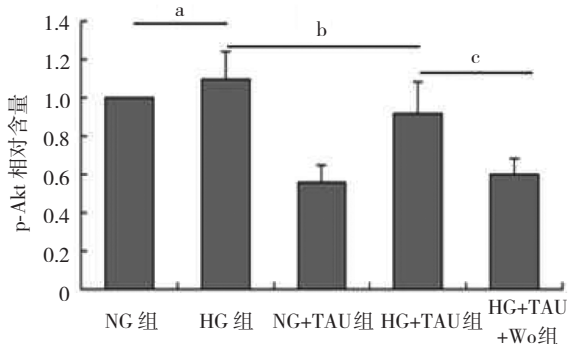
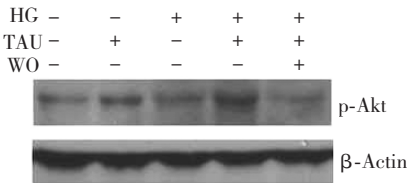
图 1 不同组别 HUVEC 的凋亡率比较

($P<0.05$),见图 2。

表 1 不同组别 HUVEC 的凋亡率($\bar{x}\pm s$,%)

组别	凋亡率	F 值	P 值
NG 组	8.53 ± 2.00	23.204	<0.05
HG 组	17.10 ± 1.55 ^a		
NG+TAU 组	8.55 ± 0.98		
HG+TAU 组	11.10 ± 1.42 ^b		
HG+TAU+Wo 组	16.00 ± 1.16 ^c		

注:与 NG 组相比,^a $P<0.05$;与 HG 组相比,^b $P<0.05$;与 HG+TAU 组相比,^c $P<0.05$;HUVEC:人脐静脉内皮细胞;NG 组:正常葡萄糖组;HG 组:高糖组;NG+TAU 组:正常葡萄糖 + 牛磺酸组;HG+TAU 组:高糖 + 牛磺酸组;HG+TAU+Wo 组:高糖 + 牛磺酸 + wortmannin 组



注: HUVEC:人脐静脉内皮细胞;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;NG 组:正常葡萄糖组;HG 组:高糖组;NG+TAU 组:正常葡萄糖 + 牛磺酸组;HG+TAU 组:高糖 + 牛磺酸组;HG+TAU+Wo 组:高糖 + 牛磺酸 + wortmannin 组;与 NG 组相比,^a $P<0.05$;与 HG 组相比,^b $P<0.05$;与 HG+TAU 组相比,^c $P<0.05$

图 2 牛磺酸对高糖诱导的 HUVEC 磷酸化-Akt 蛋白表达的影响

2.3 牛磺酸对高糖诱导的 HUVEC 活性氧簇生成的影响 与 NG 组相比,HG 组活性氧簇生成增加($P<0.05$);与 HG 组相比,HG+TAU 组的活性氧簇生成下降($P<0.05$);与 HG+TAU 组相比,HG+TAU+Wo 组的活性氧簇生成增加($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组活性氧簇荧光强度平均积分光密度($\bar{x}\pm s$)

组别	活性氧簇含量	F 值	P 值
NG 组	1.000 ± 0.000	26.086	<0.001
HG 组	2.000 ± 0.221 ^a		
NG+TAU 组	1.103 ± 0.189		
HG+TAU 组	1.377 ± 0.096 ^b		
HG+TAU+Wo 组	1.953 ± 0.180 ^c		

注:与 NG 组相比,^a $P<0.05$;与 HG 组比,^b $P<0.05$;与 HG+TAU 组相比,^c $P<0.05$;NG 组:正常葡萄糖组;HG 组:高糖组;NG+TAU 组:正常葡萄糖 + 牛磺酸组;HG+TAU 组:高糖 + 牛磺酸组;HG+TAU+Wo 组:高糖 + 牛磺酸 + wortmannin 组

3 讨论

血管内皮细胞作为一个重要的自分泌和旁分泌器官,通过调节血管张力,局部细胞生长和细胞外基质沉积而维持血管内环境稳定。内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化过程的起始步骤,也是启动糖尿病大血管病变的重要环节^[6]。糖尿病患者内皮细胞功能障碍的主要特征为细胞增殖、屏障功能、循环细胞黏附能力的改变及凋亡的发生^[10-11]。牛磺酸不仅参与维持机体内环境的稳态,而且对多种组织细胞有明显的保护作用。研究显示,口服牛磺酸能改善链脲佐菌素诱导的糖尿病模型鼠主动脉内皮依赖的舒张功能。牛磺酸能显著改善 1 型糖尿病模

型鼠左室收缩及舒张功能,并伴随 Akt/PKB 信号通路活性及超氧化物歧化酶、血红素加氧酶-1 蛋白水平的持续升高^[7]。进一步研究显示,牛磺酸能预防高糖诱导的内皮细胞凋亡,其抗凋亡效应与降低细胞内活性氧簇和稳定细胞内钙水平相关^[5]。在内皮细胞, Akt 活化可激活内皮型一氧化氮合酶,减少细胞内活性氧簇的生成,发挥抗凋亡作用。还有学者证实,细胞内钙离子过多或细胞外钙离子流入胞内过多均可损伤细胞,而牛磺酸可调节细胞内、外钙离子流动,发挥细胞保护作用^[12]。但牛磺酸是否可通过减少活性氧簇及 Akt 生成而发挥抗凋亡作用,目前尚无定论。

本研究以 HUVEC 为研究对象,结果显示,高糖诱导的内皮细胞凋亡率显著高于 NG 组。与 HG 组相比,经过牛磺酸处理的内皮细胞凋亡率显著下降,说明牛磺酸对血管内皮具有一定的保护作用。细胞中的 Akt 在无外来因素刺激时处于去磷酸化状态,只有磷酸化-Akt 才具有生物学特性,而高糖诱导内皮细胞凋亡可能与丝裂原活化蛋白激酶信号途径的激活及 Akt 磷酸化活性的减弱有关^[13-14]。本研究显示,高糖可下调 HUVEC 中磷酸化-Akt 蛋白的表达水平,而牛磺酸可显著增加高糖环境下磷酸化-Akt 蛋白的表达,提示牛磺酸可能通过此途径发挥抗凋亡作用。

活性氧簇是一种重要的细胞内信使和氧化还原反应调节剂,研究发现在心血管疾病及神经退行性疾病患者的细胞内有过量的活性氧簇,当活性氧簇产生过量或机体自身抗氧化能力被削弱时,将导致氧化应激反应的发生。活性氧簇可能是糖尿病并发症的元凶^[5]。本研究观察到与 HG 组相比, HG+TAU 组活性氧簇的表达量显著降低,提示牛磺酸可通过下调活性氧簇含量,减少氧化应激反应而保护血管内皮细胞。Wortmannin 通过与 PI3K 的催化亚单位 p110 结合,抑制 PI3K 活性,从而阻断 PI3K/Akt 信号通路。本研究中, HG+TAU+Wo 组细胞内磷酸化-Akt 的表达显著下降,而活性氧簇含量显著增加,说明牛磺酸可能经由 PI3K/Akt 信号途径调节细胞内活性氧簇生成,进而在高糖环境下发挥其抗凋亡作用。综上所述,防止血管内皮功能障碍对预防糖尿病血管病变的发生、改善糖尿病患者生活质量至关重要,而牛磺酸在保护血管内皮并预防糖尿病方面的作用应受到越来越多关注。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会内分泌学分会. 中国成人 2 型糖尿病预防的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(4): 277-283.
- [2] Mehta JL, Li DY. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(9): 1429-1435.
- [3] Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation [J]. Diabetes, 2002, 51(1): 159-167.
- [4] Piconi L, Quagliari L, Assaloni R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(3): 198-203.
- [5] Charreau B. Molecular regulation of endothelial cell activation: novel mechanisms and emerging targets [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2011, 16(2): 207-213.
- [6] Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2009, 87(2): 91-99.
- [7] Wang GG, Li W, Lu XH, et al. Taurine attenuates oxidative stress and alleviates cardiac failure in type I diabetic rats [J]. Croat Med J, 2013, 54(2): 171-179.
- [8] Ito T, Schaffer SW, Azuma J. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications [J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1529-1539.
- [9] Huttala O, Vuorenmaa H, Toimela T, et al. Human vascular model with defined stimulation medium—a characterization study [J]. ALTEX, 2015, [Epub ahead of print].
- [10] Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77(1): S65-S70.
- [11] Maugeri N, Rovere-Querini P, Baldini M, et al. Translational mini-review series on immunology of vascular disease: mechanism of vascular inflammation and remodeling in systemic vasculitis [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(3): 395-404.
- [12] Wu H, Jin Y, Wei JN, et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector [J]. Brain Res, 2005, 1038(2): 123-131.
- [13] Yang Z, Mo X, Gong Q, et al. Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose [J]. Apoptosis, 2008, 13(11): 1331-1343.
- [14] Favaro E, Miceli I, Bussolati BA, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells: effects of pravastatin on the Akt survival pathway [J]. Am J Pathol, 2008, 173(2): 442-450.
- [15] Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(12): 2067-2079.

(收稿日期: 2014-11-11)