

· 论 著 ·

激活的一磷酸腺苷活化蛋白激酶对软脂酸诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用

程莹^{1,2}, 母义明^{1*}, 汪保安¹, 潘长玉¹, 陆菊明¹

(1. 中国人民解放军总医院内分泌科, 北京 100853; 2. 中国人民解放军成都军区总医院内分泌科, 成都 610032)

[摘要] **目的:** 观察激活的一磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)对软脂酸(PA)诱导的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)损伤的保护作用, 探讨其可能的作用机制。 **方法:** 按 HUVEC 培养液中成分不同, 实验分为 8 组, 分别为: 空白对照组(常规培养)、PA 培养组、5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(AICAR)培养组、PA+AICAR 培养组、二甲双胍(Met)培养组、PA+Met 培养组、吡格列酮(PGZ)培养组和 PA+PGZ 培养组。HUVEC 在各组培养液中分别培养 24、48 和 72 h, MTT 法测定不同时间点各组细胞的存活率, Western 印迹法测定培养 24 h 时各组细胞的磷酸化 AMPK 蛋白表达水平。 **结果:** 与对照组相比, PA 组细胞 24、48 和 72 h 的存活率明显降低, 分别为 58.95%、36.68% 和 15.09% ($P < 0.05$); 培养 72 h, AICAR+PA 组、Met+PA 组和 PGZ+PA 组细胞的存活率均显著高于 PA 组 ($P < 0.05$); 单独应用 AICAR、Met 和 PGZ 培养对细胞的存活率影响不大, 与对照组比较无显著差异。与对照组和 PA 组相比, 培养 24 h 时, AICAR、Met 和 PGZ 刺激 HUVEC 的磷酸化 AMPK 表达增加 ($P < 0.05$)。 **结论:** AICAR、Met 和 PGZ 可能通过激活 AMPK, 显著减轻 PA 诱导的 HUVEC 的损伤。

[关键词] AMP-活化蛋白激酶; 5-氨基-4-甲酰胺核苷酸; 二甲双胍; 吡格列酮

[中图分类号] R 589.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0957-04

Protective effect of activated AMP-activated protein kinase on palmitic acid-induced damage of human umbilical vein endothelial cells

CHENG Ying^{1,2}, MU Yi-ming^{1*}, WANG Bao-an¹, PAN Chang-yu¹, LU Ju-ming¹ (1. Department of Endocrinology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Department of Endocrinology, General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Chengdu 610032)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of activated AMP-activated protein kinase (AMPK) on the human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) damage induced by palmitic acid (PA) and the related mechanism. **Methods:** HUVEC were divided into 8 groups according to the culture media (cultured for 24 to 72 h): blank control (conventional culture), 300 $\mu\text{mol/L}$ PA, 1 mmol/L aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-ribofuranoside (AICAR), PA+AICAR, 2 mmol/L metformin, PA+metformin, 10 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone, and PA+pioglitazone groups. Survival rates of HUVEC were determined by MTT at 24, 48 and 72 h after culture. Western blot were performed to detect the expression of phospho-AMPK at 24 h. **Results:** Compared with blank control group, cell survival rates in PA group were decreased by 58.95%, 36.68% and 15.09% at 24, 48 and 72 h ($P < 0.05$), respectively. Seventy-two hours after culture, HUVEC survival rates of AICAR+PA group, Met+PA group and PGZ+PA group were obviously higher than that of PA group ($P < 0.05$); AICAR, metformin or pioglitazone alone had no obvious influence on HUVEC survival rate. Twenty-four hours after culture, Phospho-AMPK expression was increased in AICAR, metformin and pioglitazone groups compared with that of control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** AICAR, metformin and pioglitazone can decrease the damage of HUVEC induced by PA, possibly through activating AMPK.

[KEY WORDS] AMP-activated protein kinase; 5-amino-4-imidazolecarboxamide-riboside; metformin; pioglitazone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 957-960]

高游离脂肪酸血症作为引起胰岛素抵抗的主要原因, 在糖尿病和代谢综合征患者血管内皮细胞损伤的发生发展过程中具有重要作用^[1]。一磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在胰岛素抵抗的动物模型中研究发现, 激活 AMPK 后能够促进骨骼肌细胞的脂肪酸氧化, 改善胰岛素抵抗^[2]。但在血管内皮细胞中, 激活 AMPK 是否存在类似的

作用, 还不是很清楚。本研究分别使用 AMPK 的激动剂 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸 (5-amino-4-imidazolecarboxamide-riboside, AICAR)、二甲双胍 (metformin, Met)、吡格列酮 (pioglitazone, PGZ)

[作者简介] 程莹, 博士生, 主治医师。

E-mail: chengyingxgg@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: muyiming@301hospital.com.cn

激活 AMPK, 观察激活的 AMPK 对软脂酸 (palmitic acid, PA) 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 损伤的影响, 探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞的获取和试剂来源 HUVEC 取自健康孕妇的脐静脉, 脐带剪下后立即浸泡在 4℃ 无菌生理盐水中, 用 Hank's 液冲洗脐静脉腔 2~3 次, 洗净残血。将 37℃ 预温的含 1% 胶原酶 I 的 DMEM 培养液 (购自 Gibco BRL 公司) 5~10 ml 注入脐静脉, 并置于 37℃ 温箱中孵育 20 min。然后用 DMEM 培养液反复冲洗脐静脉腔, 洗液在 1 000 r/min 离心 10 min。弃去上清后收集 HUVEC, 并用含 10% 内皮细胞支持物、20% 胎牛血清、1% 肝素钠、1% 谷氨酰胺和 1% HEPES 的 DMEM 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养细胞。细胞贴壁后, 用第 VIII 因子间接荧光免疫标记流式细胞术和抗 CD34⁺ 抗体直接荧光标记法鉴定内皮细胞的比例 ≥ 98%。PA、AICAR、Met、PGZ 和四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 均购自 Sigma 公司。兔抗人磷酸化 AMPK 抗体购自 Cell Signaling 生物公司, HRP 标记的羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 实验分组 取对数生长期细胞, 按细胞密度为 2×10^4 /ml 接种于 24 孔培养板或培养皿中, 细胞培养 24 h 后, 置换培养液, 按培养液成分不同分为 8 组, 包括未加任何刺激物的空白对照组、PA 培养组 (300 μmol/L PA)、AICAR 培养组 (1 mmol/L AICAR)、PA + AICAR 培养组 (300 μmol/L PA + 1 mmol/L AICAR)、Met 培养组 (2 mmol/L Met)、PA + Met 培养组 (300 μmol/L PA + 2 mmol/L Met)、PGZ 培养组 (10 μmol/L PGZ) 和 PA + PGZ 培养组 (300 μmol/L PA + 10 μmol/L PGZ)。

1.3 MTT 法分析细胞存活率 按前述方法培养细胞, 并分别用各种刺激物处理细胞, 继续孵育细胞, 在 24、48 和 72 h 时, 弃去培养液, 用 PBS 充分洗涤细胞 3 次, 加入 1 mg/ml MTT, 于 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 4 h。弃去 MTT 后加入二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO), 摇床振荡 10 min 并测定 490 nm 波长的 D_{490} 。细胞存活率 = 各组细

胞的 D_{490} 平均值 / 对照组细胞的 D_{490} 平均值 × 100%, 每项试验重复 3 次。PA 在 90℃ 溶于 0.1 mol/L NaOH。为去除 NaOH 对细胞生长的影响, 各组细胞 (包括对照组) 培养液中均加入 NaOH, 并保持其最终浓度均为 0.2 mmol/L。

1.4 Western 印迹法测定磷酸化 AMPK 蛋白的表达 按前述方法培养细胞, 并分别用各种刺激物处理细胞 24 h 后, 弃去培养液, 用冰的 PBS 洗涤细胞 3 次后, 每个培养皿中加入 1 ml 预冷的细胞裂解液, 提取总蛋白并测定浓度。取 100 μg 蛋白样品在 6% 的 SDS-PAGE 胶电泳, 100 V 电压下转膜 2 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 将转膜后的 PVDF 膜置于 5% 的脱脂牛奶封闭液中 4℃ 封闭过夜。次日, 用 0.1% 的 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。兔抗人磷酸化 AMPK 一抗用含 5% BSA 的 TBST 稀释 1 000 倍, 将膜装入塑料袋中, 加入一抗, 封口, 摇床震荡, 37℃ 条件下孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。HRP 标记的羊抗兔二抗用含 5% BSA 的 TBST 稀释 1 000 倍, 将膜装入塑料袋中, 加入二抗, 封口, 摇床震荡, 37℃ 条件下孵育 45 min。0.1% TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。发光物质 A、B 各 1 ml, 混匀后作用于膜 1 min, 保鲜膜包裹 PVDF 膜, 曝光。

1.5 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用 SPSS 11.0 软件处理, 并用 *t* 检验分析; $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 各组细胞存活率的测定 与对照组相比, 随着时间的延长, PA 组的细胞存活率明显下降 ($P < 0.05$)。AICAR、Met 和 PGZ 单独作用于细胞时, 对于细胞的存活率影响不大, 与 PA 共同作用培养细胞时, 在各个时间点均可明显减少 PA 诱导的细胞存活率下降 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 各组细胞磷酸化 AMPK 蛋白的表达水平 与对照组相比, PA 组细胞的磷酸化 AMPK 表达没有明显变化, 而 AICAR、Met 和 PGZ 组细胞的磷酸化 AMPK 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 PA 联合培养时, AICAR + PA、Met + PA 和 PGZ + PA 组细胞的磷酸化 AMPK 表达水平较 PA 组明显升高 ($P < 0.05$)。这说明 AICAR、Met 和 PGZ 都能够刺激 HUVEC 磷酸化 AMPK 表达增加 (图 1)。

表1 不同刺激物对 HUVEC 存活率的影响

Tab 1 Impact of different stimuli on cell survival rates of HUVEC

Time(t/h)	Control	PA	AICAR	AICAR+PA	Met	Met+PA	PGZ	PGZ+PA
24	100	58.95*	120.53 [△]	68.11 [△] *	122.85 [△] *	80.42 [△] *	97.91 [△]	74.10 [△] *
48	100	36.68*	95.98 [△]	55.01 [△] *	97.34 [△]	52.87 [△] *	85.17 [△]	59.25 [△] *
72	100	15.09*	89.56 [△]	44.33 [△] *	88.63 [△]	44.96 [△] *	79.03 [△]	35.81 [△] *

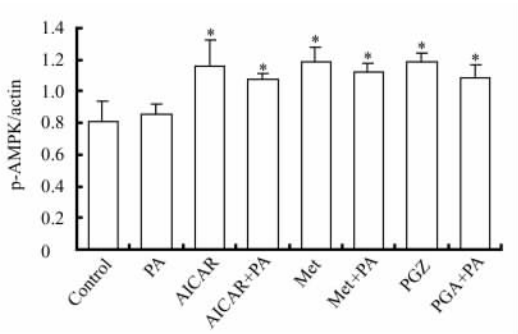
* $P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs PA group

图1 24 h 各组细胞磷酸化 AMPK 蛋白水平的表达

Fig 1 Expression of phospho-AMPK in each group at 24 h of culture

* $P < 0.05$ vs control or PA group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

血浆中游离脂肪酸水平增加是 2 型糖尿病和代谢综合征患者心脑血管事件增加的重要原因之一。本研究和我们以往的研究结果^[3]均表明,PA 浓度增加,可以引起血管内皮细胞的损伤。游离脂肪酸造成血管内皮损伤可能与肿瘤坏死因子- α 诱导的致细胞凋亡的蛋白过度表达、内皮细胞一氧化氮合酶活性的改变^[4]以及细胞因子刺激内皮细胞神经酰胺的产生等多种机制有关。

AMPK 是调节细胞能量代谢的一种重要的激酶,受 AMP 的变构和上游的 AMPK 激酶(AMP-KK)的催化作用而被激活,激活后启动一系列细胞能量代谢过程。AMPK 激活后通过磷酸化作用抑制乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC),ACC 活性降低使丙二酰辅酶 A 的合成减少,从而对肉碱脂酰转移酶(carnitine palmitoyl transferase 1, CPT-1)——脂肪酸氧化过程中的限速酶的抑制作用减弱,脂肪酸的氧化增加,因此我们推测,激活 AMPK 有可能通过增加脂肪酸的氧化过程减少脂肪酸引起的血管内皮细胞损伤。

AICAR 是目前应用较多的 AMPK 激活剂,它是腺苷的类似物,进入细胞后在腺苷激酶的作用下

转化为单磷酸核苷 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-*D*-ribofuranosyl-5'-monophosphate (ZMP), ZMP 是 AMP 的类似物,它能够变构激活 AMPK 和其上游的 AMPKK,后者继而激活 AMPK^[5]。与 AICAR 激活 AMPK 的作用途径不同,二甲双胍通过影响线粒体活性氧簇(如 ONOO⁻)、激活 AMPK 上游激酶的途径促进其磷酸化而导致 AMPK 的激活,这一过程受磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)途径的调节,并不改变细胞内 AMP : ATP 的比值^[6]。从我们的实验中可以看出,AICAR 能够显著减少 PA 引起的血管内皮细胞损伤,这种作用随着时间的延长而增加。二甲双胍也能够发挥减少脂肪酸引起的细胞损伤的作用。AICAR 和二甲双胍均促进磷酸化的 AMPK 蛋白表达增加,由于二者激活 AMPK 的机制不同,两个物质都能够产生同样的磷酸化效果,我们更有理由相信这种保护作用是由 AMPK 激活引起的。有研究发现,二甲双胍通过增加 AMPK 依赖的热休克蛋白 90 介导的内皮型一氧化氮合酶的活性来改善血管内皮细胞功能^[7]。

噻唑烷二酮类药物能够通过抑制呼吸链中复合物 I 的形成激活 AMPK^[8],有研究发现,罗格列酮^[9]和吡格列酮^[10]能够通过改变细胞内的能量代谢而显著激活骨骼肌细胞和肝脏、脂肪组织中的 AMPK。另外,噻唑烷二酮类药物能够增加体内脂联素的合成,这也可能是其激活 AMPK 的途径之一^[11]。我们的实验结果显示,吡格列酮本身并不刺激 HUVEC 的增殖,但是与 PA 共同培养时,它能够显著减少 PA 诱导的 HUVEC 细胞的死亡。

糖尿病患者常常同时存在血脂异常,代谢综合征患者中高血糖和血脂紊乱更是如影随形,英国前瞻性糖尿病研究(the United Kingdom prospective diabetes study,UKPDS)中控制血糖对于预防糖尿病微血管并发症得到了令人满意的结果,但是对于大血管并发症并未得到肯定的结果。越来越多的研究证明,预防大血管病变需要综合的防治手段,不仅

仅是严格控制血糖,减少游离脂肪酸对血管内皮细胞的损伤也是重要的方面。与 AICAR 激活 AMPK 作用途径相似,运动时消耗大量的 ATP,改变 AMP:ATP 比例激活 AMPK,因此,运动不仅能够减轻骨骼肌细胞等组织的胰岛素抵抗,还对游离脂肪酸造成的血管内皮细胞损伤具有一定的保护作用。二甲双胍和噻唑烷二酮类药物是临床上常用的降血糖药物,二者能够通过激活 AMPK 来减少游离脂肪酸引起的血管内皮细胞损伤,从而在减少糖尿病和代谢综合征患者的大血管病变方面发挥重要作用,这也可以解释为什么在 UKPDS 中只有二甲双胍组患者的大血管病变和和心脑血管疾病明显减少。

[参考文献]

[1] Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, et al. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells[J]. FASEB J, 2004, 18: 146-148.
 [2] Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome[J]. Endocrine, 2006, 29: 91-100.
 [3] 詹晓蓉,肖或君,母义明,等.游离脂肪酸和胰岛素及葡萄糖对脐静脉血管内皮细胞影响的实验研究[J].中华糖尿病杂志, 2004,12:131-135.
 [4] Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction[J]. Curr Hypertens Rep,2003,5: 473-480.

[5] Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K, et al. The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Com, 1999, 265: 112-115.
 [6] Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. Role of mitochondrial reactive nitrogen species [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 43940-43951.
 [7] Davis BJ, Xie Z, Viollet B, et al. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis *in vivo* by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase[J]. Diabetes, 2006, 55: 496-505.
 [8] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway new players upstream and downstream[J]. J Cell Sci, 2004, 117: 5479-5487.
 [9] Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 25226-25232.
 [10] Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, et al. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314: 580-585.
 [11] Combs TP, Wagner JA, Berger J, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kiloDaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization[J]. Endocrinology, 2002, 143: 998-1007.

[收稿日期] 2006-01-09 [修回日期] 2006-07-15
 [本文编辑] 贾泽军

欢迎订阅《护理管理杂志》

《护理管理杂志》是经中华人民共和国新闻出版署批准公开发行的专科护理杂志,中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊,获第四次全军医学期刊优秀编辑质量奖。本刊认真履行办刊宗旨,紧跟学科发展动态,并对护理学科的热点、难点问题进行了快捷追踪报道,得到了护理界专家及同仁的认可。开辟有院长看护理、论坛、论著、调查研究、综述、质量管理、专科护理管理、护理科研管理、护理教育、人力资源管理、信息管理、医院感染管理、社区护理管理、护理改革、护理工作与法、安全管理、护理经济管理、护理考察等栏目。

《护理管理杂志》推出刊授继续教育学分项目,订阅本刊并进行学分注册者,根据注册登记情况和返回编辑部的有效答题卡,全年可获取 I 类继续教育学分 12 分。

《护理管理杂志》为国际期刊标准大 16 开本,64 页,月刊,每月 10 日出版。

订价:每本 5 元,全年定价 60 元人民币,全国各地邮电局均可订购,邮发代码 82-926,也可破年、破季从编辑部直接订阅。从编辑部集体订阅超过 100 套以上者,可享受 9 折优惠,每册 4.5 元,全年每套 54 元(免邮费)。编辑部自行装订了 2002~2006 年各年的杂志合订本,2002、2003 年各年合订本(双月刊)每套 38 元,2004~2006 年各年合订本(月刊)每套 76 元,如需订购请直接从编辑部办理邮购(免邮费)。

编辑部地址:北京市东城区南门仓 5 号《护理管理杂志》编辑部 邮编:100700

开户银行:工商银行东城支行营业室,户名:北京军区总医院,账号:090267001-76

电话:010-64048630,64043064,66721461 传真:010-66721265

E-mail:huguan@public3.bta.net.cn 或 hlg1@chinajournal.net.cn