

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00952

白藜芦醇对体外高糖刺激下小鼠脑微血管内皮细胞解偶联蛋白基因表达的影响

陈 峰¹, 刘志民², 赵 璞^{1*}

- 1. 第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003
- 2. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察高糖对小鼠脑微血管内皮细胞解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)基因表达的影响,并探讨白藜芦醇的调节作用。**方法** 通过体外培养小鼠脑微血管内皮细胞系 bEnd. 3, 采用 RT-PCR 方法观察不同浓度葡萄糖(5.5, 25 mmol/L)刺激及白藜芦醇(25 μmol/L)干预时 UCP 基因表达的变化。**结果** 25 mmol/L 葡萄糖刺激 24 h 能上调 UCP4、UCP5 mRNA 表达($P < 0.05$), 而对 UCP1、UCP2 基因表达无明显影响;白藜芦醇能上调基础状态及高糖状态下的 UCP5 基因表达($P < 0.05$), 能抑制高糖引起的氧自由基增加($P < 0.05$)。**结论** 高糖刺激可特异性上调小鼠脑微血管内皮细胞 UCP4、UCP5 基因表达;白藜芦醇能降低高糖诱导的氧自由基生成,同时上调细胞 UCP5 基因的表达。

[关键词] 糖尿病;脑微血管内皮细胞;解偶联蛋白;白藜芦醇;氧化性应激

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0952-03

Effects of resveratrol on uncoupling protein mRNA expression in brain microvessel endothelial cells under hyperglycemic condition *in vitro*

CHEN Feng¹, LIU Zhi-min², ZHAO Ying^{1*}

- 1. Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
- 2. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of hyperglycemia on uncoupling protein (UCP) mRNA expression in mouse brain microvessel endothelial cell line bEnd. 3, and to investigate the regulatory effect of resveratrol on the expression. **Methods** Mouse bEnd. 3 cells were cultured *in vitro*. The mRNA levels of UCP1-5 in bEnd. 3 cells were determined by RT-PCR after exposure to different concentrations of glucose(5.5, 25 mmol/L) and resveratrol (25 μmol/L). **Results** We found that exposure to 25 mmol/L glucose for 24 h up-regulated the expression of UCP4 and UCP5 mRNA levels ($P < 0.05$), but had no noticeable influence on the expression of UCP1 and UCP2 mRNA levels. Resveratrol increased UCP5 mRNA levels under baseline and hyperglycemia conditions ($P < 0.05$), and it decreased reactive oxygen species(ROS) induced by hyperglycemia condition ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose stimulation can specifically up-regulate UCP4 and UCP5 mRNA expression in mouse brain microvessel endothelial cells. Resveratrol can greatly decrease ROS production induced by hyperglycemia condition and up-regulate UCP5 mRNA expression.

[Key words] diabetes mellitus; brain microvessel endothelial cells; uncoupling protein; resveratrol; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):952-954]

氧化应激是糖尿病微血管并发症的重要致病因素之一^[1], 而线粒体是氧自由基产生的主要部位。因此, 研究线粒体内抗氧化状态具有重要意义。解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)位于线粒体内膜, 具有降低线粒体质子梯度, 减少氧自由基生成的功能。本研究主要观察高糖对线粒体 UCP mRNA 表达的影

响及白藜芦醇对 UCP mRNA 表达的调节作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器及细胞系 DMEM 培养液(含 5.5 mmol/L 或 25 mmol/L 葡萄糖)购自 Gibco 公司; FBS 购自 Kibbutz Beit Haemer 公司; Dnase I、

[收稿日期] 2010-05-06 **[接受日期]** 2010-06-08

[基金项目] 国家重点基础研究规划(“973”计划, 2005CB523304). Supported by the National Basic Research Program (“973”Program, 2005CB523304).

[作者简介] 陈 峰, 博士生. E-mail: smmu1379@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885454, E-mail: zmliu-yzhao@hotmail.com

RNA 酶抑制剂购自 TaKaRa 公司;M-MLV 反转录酶、多种限制性内切酶购自 Fermentas 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;白藜芦醇购自 Sigma 公司。其他试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。高速冷冻离心机购自 Beckman 公司;分光光度计、PCR 仪、电泳仪、电泳槽购自 Bio-Rad 公司;电子天平购自 Mettler Toledo 公司。小鼠脑微血管内皮细胞系 bEnd. 3 购自 ATCC(CRL-2299)。bEnd. 3 细胞在含有 10% FBS 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的低糖 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中培养,每 2 d 传代 1 次。

1.2 细胞 RNA 提取 细胞弃去培养液,加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的磷酸盐缓冲液润洗 1 次,然后加入 600 μ l TRIzol 裂解细胞,并将裂解液转入 1.5 ml 管中;加入 400 μ l 三氯甲烷,室温静置 10 min;4 $^{\circ}$ C 15 000 \times g 离心 15 min。取上清,加入等体积异丙醇,快速震荡 30 s,室温静置 20 min。4 $^{\circ}$ C 15 000 \times g 离心 15 min,弃去上清,加入 200 μ l 75%乙醇,震荡后 4 $^{\circ}$ C 5 000 \times g 离心 10 min。弃去上清,沉淀即为总 RNA。室温干燥 10 min 后,加入 20 μ l DEPC 水溶解,用分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。

1.3 反转录和半定量 PCR 取纯化后的总 RNA 2 μ g 在 M-MLV 反转录酶和 dNTP 的作用下得到 cDNA。通过半定量 PCR 的方法检测各基因表达,同时扩增 β -actin 序列作为内对照。PCR 引物序列如下。 β -actin: 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G -3' (sense), 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3' (antisense); UCP1: 5'-CCC CTA ATC TAA TGA GAA ATG-3' (sense), 5'-AAA GAA GCC ACA AAC CCT-3' (antisense); UCP2: 5'-GCT GGT GGT GGT CGG AGA T-3' (sense), 5'-CCC AAG CGG AGA AAG GAA-3' (antisense); UCP3: 5'-ATG CCT ACA GAA CCA TCG C-3' (sense), 5'-AGC TCC CAG ACG CAG AAA-3' (antisense); UCP4: 5'-ACT CTG GAG GTC GGA TGG-3' (sense), 5'-AAC TGG ATA AGC CGT GGG-3' (antisense); UCP5: 5'-CGA GTT CGG CAC TTT CCC-3' (sense), 5'-AGC ACG CTG AGC AGT TGG-3' (antisense)。PCR 产物用溴化乙锭在 1.5% 琼脂糖电泳凝胶上显现。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's *t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 高糖对小鼠脑微血管内皮细胞 UCP 基因表达

的影响 RT-PCR 检测到小鼠脑微血管内皮细胞系 bEnd. 3 在含有 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养液中培养时表达 UCP1、UCP2、UCP4、UCP5,未能检测到 UCP3。25 mmol/L 葡萄糖刺激 2~10 h 对 UCP1、UCP2、UCP4、UCP5 mRNA 水平无明显影响(图 1),但刺激 24~48 h 能明显上调 UCP4、UCP5 mRNA 水平(图 2),UCP5 mRNA 的升高一直持续到在高浓度葡萄糖刺激后 5~7 d(图 2、图 3)。

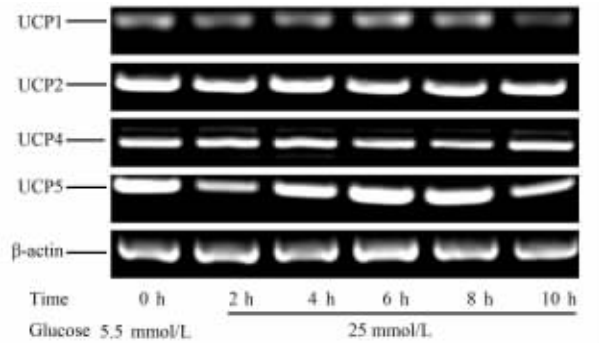


图 1 短期内高糖对脑微血管内皮细胞 UCP mRNA 表达的影响

Fig 1 Short-term effect of high glucose on UCP mRNA level in brain microvessel endothelial cells

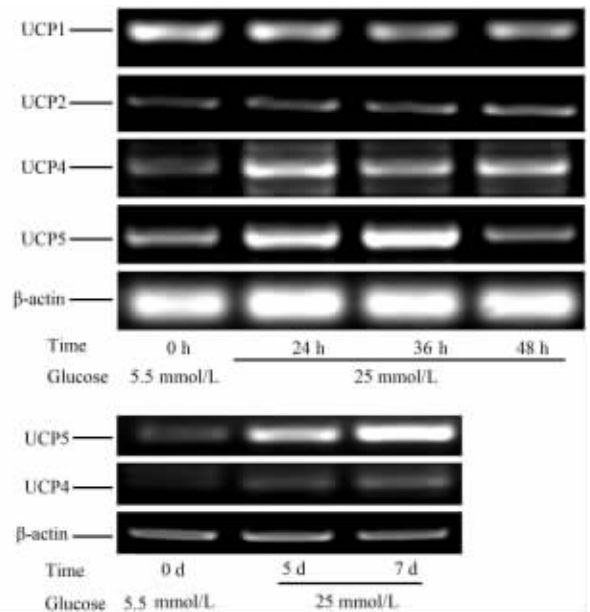


图 2 长期高糖刺激对脑微血管内皮细胞 UCP mRNA 表达的影响

Fig 2 Long-term effect of high glucose on UCP mRNA level in brain microvessel endothelial cells

2.2 白藜芦醇对高糖刺激小鼠脑微血管内皮细胞 UCP 基因表达的影响 白藜芦醇 25 μ mol/L 刺激 24 h 能明显上调低糖及高糖环境中的 UCP5 mRNA 水平($P < 0.05$, 图 4);实验结果还显示 25

$\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇干预能抑制 24 h 高糖刺激所诱导的氧自由基水平的增加(以低糖组作参照从 1.49 ± 0.16 倍降低至 1.14 ± 0.10 倍, $P < 0.05$)。

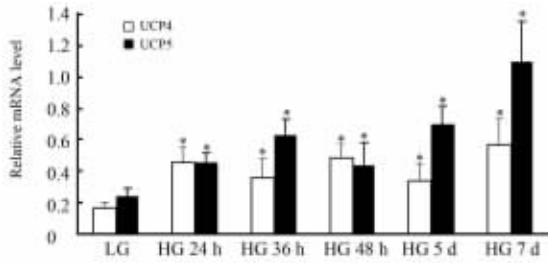


图3 高糖刺激下脑微血管内皮细胞 UCP4、UCP5 mRNA 表达的变化

Fig 3 Effect of high glucose on UCP4 and

UCP5 mRNA level in brain microvessel endothelial cells

LG; Low glucose; HG; High glucose. * $P < 0.05$ vs LG. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

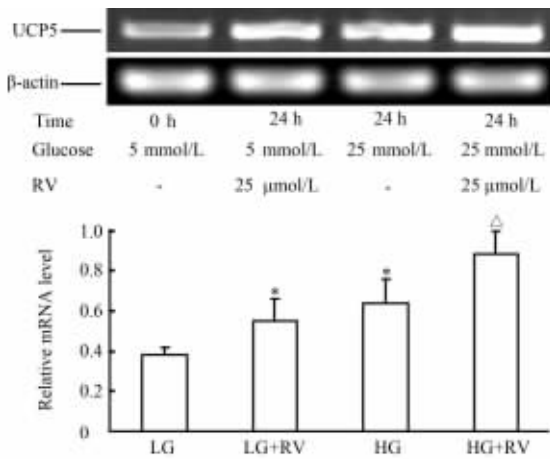


图4 白藜芦醇(RV)对脑微血管内皮细胞 UCP5 mRNA 表达的影响

Fig 4 Effect of resveratrol(RV) on UCP5 mRNA level in brain microvessel endothelial cells

LG; Low glucose; HG; High glucose. * $P < 0.05$ vs LG; $\Delta P < 0.05$ vs HG. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

线粒体是血管内皮细胞高糖刺激时氧自由基的主要来源之一,高血糖导致三羧酸循环加快,呼吸链负荷加大,引起超氧阴离子产生增多。线粒体内抗氧化能力不足时,超氧阴离子会攻击线粒体 DNA 和线粒体膜,进而自由基泄露至胞质引发细胞核损伤、蛋白激酶 C 激活、糖基化终末产物形成以及多元醇的累积,导致细胞损伤^[2]。研究发现,高血糖能上调脑微血管内皮细胞氧自由基水平和抗氧化酶(如铜锌超氧化物歧化酶、锰超氧化物歧化酶)等基因的表达,但锰超氧化物歧化酶蛋白水平却未能明显上调^[3]。锰超氧化物歧化酶作为线粒体内抗氧化自由基最关键的酶,其蛋白水平的失调必然会导致抗自由基水平的相对低

下,而机体可能会通过其他方式减少线粒体内氧自由基的产生。本研究显示脑微血管内皮细胞可能会通过上调 UCP4、UCP5 来减少线粒体氧自由基的产生。

UCP 是线粒体内膜介导 H^+ 内流的跨膜蛋白,质子通过 UCP 内流时不产生氧化磷酸化解偶联(ATP),能量则以热的形式散失。目前研究发现其主要生理功能是产生热能、控制活性氧生成及参与调节能量代谢等^[4]。UCP 家族包括 UCP1、UCP2、UCP3、UCP4 和 UCP5。有研究显示脑内主要以 UCP4、UCP5 为主,而 UCP2 常富集于各种组织的血管内皮^[5]。本研究采用 RT-PCR 方法未能检测到 UCP3 亚型;结果还显示短期内的高糖刺激对各亚型 UCP 表达没有明显影响,长期高糖刺激情况下 UCP4、UCP5 基因转录水平明显上调,而 UCP1、UCP2 未见明显变化。UCP1 与 UCP2 结构近似且分布广泛,均具有显著的减少线粒体氧自由基功能,但在脑微血管内皮细胞中未能表达上调的原因仍不清楚。UCP4、UCP5 虽然主要表达于中枢神经系统,但同样具有减少氧自由基生成的功能^[4]。本研究结果提示脑微血管内皮细胞 UCP 基因转录水平上调在高糖刺激中可能发挥重要的保护作用。

白藜芦醇是葡萄等植物的提炼物,生物研究显示其具有抗衰老、抗氧化、抗炎及抗肿瘤等多种作用^[6]。本研究结果显示白藜芦醇能提高高糖及低糖状态下脑微血管内皮细胞 UCP5 基因转录水平,同时观察到白藜芦醇能明显降低高糖下氧自由基的生产水平。由于 UCP5 具有减少自由基产生的功能,因此我们推测这可能部分与白藜芦醇升高 UCP5 基因表达相关。

[参考文献]

- [1] Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22: 257-273.
- [2] Hadi H A, Suwaidi J A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus[J]. Vasc Health Risk Manag, 2007, 3: 853-876.
- [3] Allen C L, Bayraktutan U. Antioxidants attenuate hyperglycaemia-mediated brain endothelial cell dysfunction and blood-brain barrier hyperpermeability[J]. Diabetes Obes Metab, 2009, 11: 480-490.
- [4] Wolkow C A, Iser W B. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan[J]. Ageing Res Rev, 2006, 5: 196-208.
- [5] Alán L, Smolková K, Kronusová E, Santorová J, Jezek P. Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues[J]. J Bioenerg Biomembr, 2009, 41: 71-78.
- [6] Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic[J]. Cell Cycle, 2007, 6: 2495-2510.

[本文编辑] 贾泽军