

# 高糖对心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白1的影响\*★

施国祥<sup>1</sup>, 郑泽琪<sup>1</sup>, 李宾公<sup>1</sup>, 席海龙<sup>2</sup>, 康婷<sup>1</sup>, 孙传福<sup>1</sup>

## Effect of high glucose on the neuregulin-1 expression of cardiac microvascular endothelial cells

Shi Guo-xiang<sup>1</sup>, Zheng Ze-qi<sup>1</sup>, Li Bin-gong<sup>1</sup>, Xi Hai-long<sup>2</sup>, Kang Ting<sup>1</sup>, Sun Chuan-fu<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The pathogenesis of diabetic cardiomyopathy is unclear. Neuregulin-1 (NRG-1) can promote revascularization. Whether the incidence of diabetes cardiomyopathy is relevant to the down expression of NRG-1 of cardiac microvascular endothelial cells needs further research.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of high-glucose on the expression of the NRG-1 of cardiac microvascular endothelial cells.

**METHODS:** The second generation of cardiac microvascular endothelial cells were selected and divided into three groups.

Control group: cells were cultured in normal medium; high-glucose group: glucose (10 mmol/L) was added into medium; glucose + insulin group: glucose (10 mmol/L) and insulin (10<sup>-5</sup> U/L) were added into medium. Cardiac microvascular endothelial cells were collected after 24 hours, RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NRG-1 mRNA and protein.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, the expression of the NRG-1 mRNA and NRG-1 protein in the high-glucose group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with high-glucose group, the expression of the NRG-1 mRNA and NRG-1 protein in the glucose + insulin group were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). High glucose can inhibit the expression of NRG-1 mRNA and NRG-1 protein of cardiac microvascular endothelial cells, which can be antagonized by insulin.

Shi GX, Zheng ZQ, Li BG, Xi HL, Kang T, Sun CF. Effect of high glucose on the neuregulin-1 expression of cardiac microvascular endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(28):5159-5162. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 糖尿病心肌病的发病机制尚不清楚, 神经调节蛋白1具有促进血管再生等作用, 糖尿病心肌病的发病是否和心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白1下降有关值得进一步研究。

**目的:** 观察高糖对心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白1的影响。

**方法:** 取生长良好的第2代心肌微血管内皮细胞, 高糖组加入10 mmol/L的葡萄糖, 高糖+胰岛素组加入10 mmol/L的葡萄糖及10<sup>-5</sup> U/L的胰岛素, 对照组正常培养。培养24 h后收集细胞, RT-PCR及Western blot方法检测神经调节蛋白1 mRNA和蛋白的表达。

**结果与结论:** 与对照组比较, 高糖组心肌微血管内皮细胞神经调节蛋白1 mRNA和蛋白的表达明显下降( $P < 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖+胰岛素组心肌微血管内皮细胞神经调节蛋白1 mRNA和蛋白的表达明显升高( $P < 0.05$ ), 与对照组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。说明高糖可抑制心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白1 mRNA和蛋白, 而胰岛素可拮抗此作用。

**关键词:** 神经调节蛋白1; 高糖; 胰岛素; 心肌微血管内皮细胞; 糖尿病心肌病

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.28.007

施国祥, 郑泽琪, 李宾公, 席海龙, 康婷, 孙传福. 高糖对心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白1的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(28):5159-5162. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Xinyu People's Hospital, Xinyu 338025, Jiangxi Province, China

Shi Guo-xiang★, Studying for master's degree, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Zheng Ze-qi, Professor, Chief physician, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China zqz620712@sina.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30860101\*

Received: 2010-04-27 Accepted: 2010-06-12

## 0 引言

近年来研究表明, 神经调节蛋白1 (neuregulin-1, NRG-1)在成年心脏心内膜和心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMEC)中有较高表达<sup>[1]</sup>。NRG-1可促进心肌微血管内皮细胞增殖、减少其凋亡<sup>[2]</sup>; 同时NRG-1可抑制ERK1/2的磷酸化, 进而阻断其下游区能上调平滑肌分化的血小板来源的生长因子受体, 抑制平滑肌增生, 防止血管狭窄等病理反应的发生<sup>[3]</sup>。糖尿病心肌病的发生是否和CMEC表达NRG-1下调有关, 目前尚未见报道。因此, 实验以大鼠CMEC为

研究对象, 探讨高糖对CMEC表达NRG-1的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外对比观察实验。

**时间和地点:** 实验于2009-04/12在南昌大学第一附属医院江西省高血压研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 新生4 d健康SD乳鼠20只, 雌雄不限, 购自江西中医学院实验动物部[许可证号: SYXK(赣)2009-0008]。实验中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求<sup>[4]</sup>。

<sup>1</sup> 南昌大学第一附属医院心血管内科, 江西省南昌市330006; <sup>2</sup> 江西省新余市人民医院心血管内科, 江西省新余市338025

施国祥★, 男, 1983年生, 江西省余干县人, 汉族, 南昌大学在读硕士, 主要从事心血管内科方面的研究。

通讯作者: 郑泽琪, 教授, 主任医师, 南昌大学第一附属医院心血管内科, 江西省南昌市330006  
zzq620712@sina.com

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)28-05159-04

收稿日期: 2010-04-27  
修回日期: 2010-06-12 (20100427013/WLM · Z)

### 试剂与仪器:

试剂和仪器	来源
胎牛血清	Hyclone 公司
低糖 DMEM	Solarbio 公司
多克隆羊抗 NRG-1 抗体	Abcam 公司
反转录试剂盒	Promega 公司
2xTaq PCR MasterMix	北京天根公司
抗 β-actin 抗体	Serotec 公司

### 方法:

**CMEC的培养与鉴定:** 断颈处死SD乳鼠, 无菌条件下摘取心脏, 剪碎心肌组织, I型胶原酶水浴振荡消化60 min, 用含体积分数20%胎牛血清的DMEM培养液终止消化。收集消化液, 室温下离心, 弃上清, 重悬沉淀, 用100目滤网过滤, 收集滤液, 室温离心。弃上清, 用DMEM培养液(含体积分数20%的胎牛血清, 血管内皮生长因子20 μg/L, 成纤维细胞生长因子2 μg/L, 胰岛素样生长因子2 μg/L, 青霉素100 U/mL, 链霉素100 mg/L)悬浮血管段, 接种于纤维胶原覆盖的玻璃培养皿中。待原代内皮细胞长成融合单层后, 去除培养液, 进行传代培养, 并行抗CD31、VIII因子免疫荧光细胞化学染色, 荧光显微镜下观察。

**实验分组与干预:** 取第2代生长良好的CMEC, 高糖组加入10 mmol/L的葡萄糖, 高糖+胰岛素组加入10 mmol/L的葡萄糖及10<sup>-5</sup> U/L的胰岛素, 对照组正常培养。培养24 h后分别收集CMEC用于实验。

**RT-PCR检测CMEC NRG-1 mRNA的表达:** 根据Genebank提供的基因序列使用primer design软件进行引物设计。

### 引物序列:

Primer	Sequence	Length (bp)
NRG-1	Upstream 5'AAT GGA CAG CAA CAC AAG 3'	219
	Downstream 5'TTA GCG ATT ACA CTA GAC AG3'	
GAPDH	Upstream 5'TGT CAT CAA CGG GAA GCC CA3'	300
	Downstream 5'TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC-3'	

RT-PCR反应条件为: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性 45 s, 55 °C退火 45 s, 72 °C延伸60 s, 扩增30个循环, 最后72 °C延伸5 min。PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶(溴化乙锭染色)电泳, 凝胶成像系统上进行扫描, 以GAPDH为内参照, 比较各组NRG-1 mRNA表

达的变化。

**Western blot检测CMEC NRG-1蛋白的表达:** 提取CMEC的总蛋白, 用BCA法测定样品的蛋白浓度。蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜后, 剪出目的条带; 体积分数5%的牛血清白蛋白TBST液浸泡封闭2 h, 加一抗(多克隆羊抗NRG-1抗体, 1:200)4 °C过夜, 用TBST液洗膜; 加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温下孵育1 h, 用TBST液洗膜; 将膜放在0.5 mL ECL检测试剂混合液中孵育1 min, 在暗室中用BioRed X射线显影系统曝光1 min, 保存图像。用BioRed X射线显影分析系统进行条带的灰度分析, 以NRG-1蛋白和内参照β-actin蛋白的电泳条带灰度积分比值代表目标蛋白的相对表达量, 分析结果。

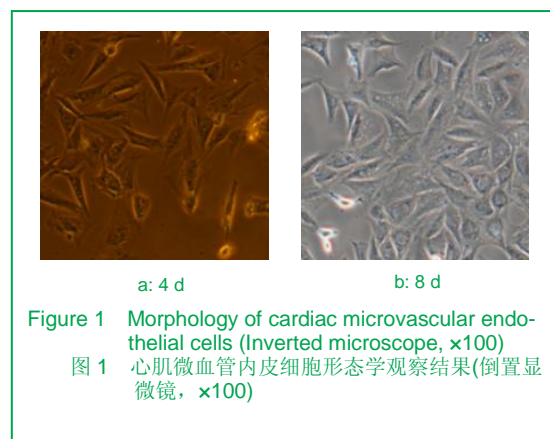
**主要观察指标:** CMEC NRG-1 mRNA和蛋白的表达。

**设计、实施、评估者:** 实验由第一、二作者设计、实施, 第三、四、五作者评估, 均受过正规培训。

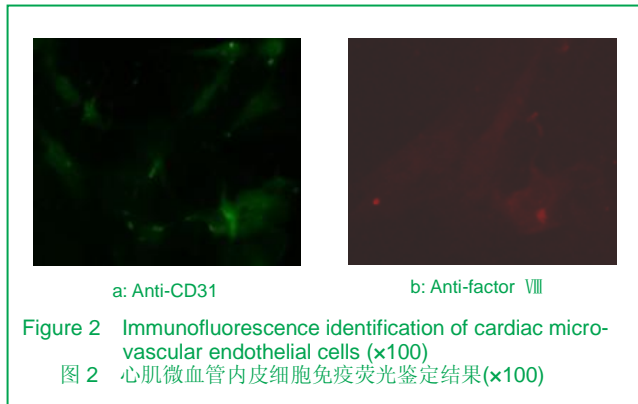
**统计学分析:** 应用SPSS 14.0软件进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间行方差齐性检验及q检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

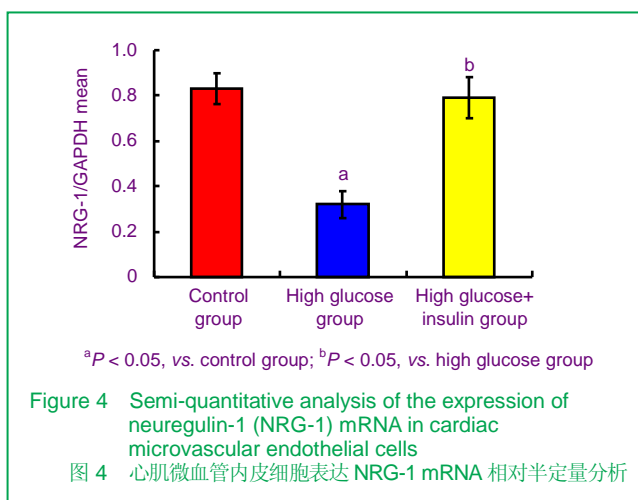
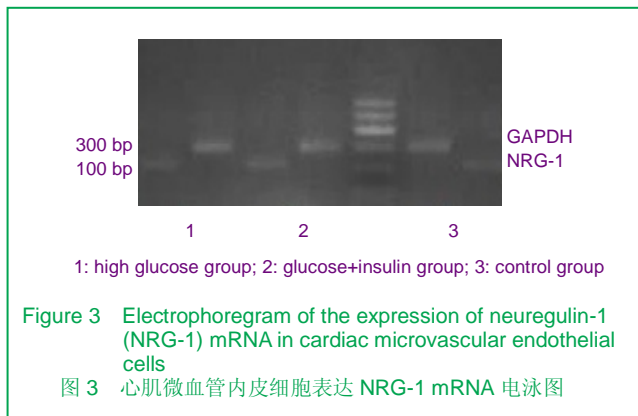
**2.1 培养细胞形态学观察结果** 倒置显微镜观察分离的微血管段形态各异, 长短不等, 呈长条状、单枝或多枝。培养1 d, 微血管段完全贴壁, 并由原来长条状回缩成团; 培养二三天, 微血管段管壁突起, 有小泡形成, 并可见树突样丝状物爬出; 培养4 d, 血管段边缘长出单个细胞, 呈三角形或长梭形; 培养五六天, 可见细胞分裂增殖形成散在细胞群落; 培养7~9 d细胞紧密排列, 连接成片, 互不重叠, 呈典型的铺路卵石样结构, 见图1。



2.2 培养细胞免疫荧光鉴定结果 CD31、VIII因子是内皮细胞的特征性标志物, 免疫荧光染色显示CD31、VIII因子主要分布在胞浆中, 分别发绿色荧光和红色荧光, 说明培养的细胞为内皮细胞, 见图2。

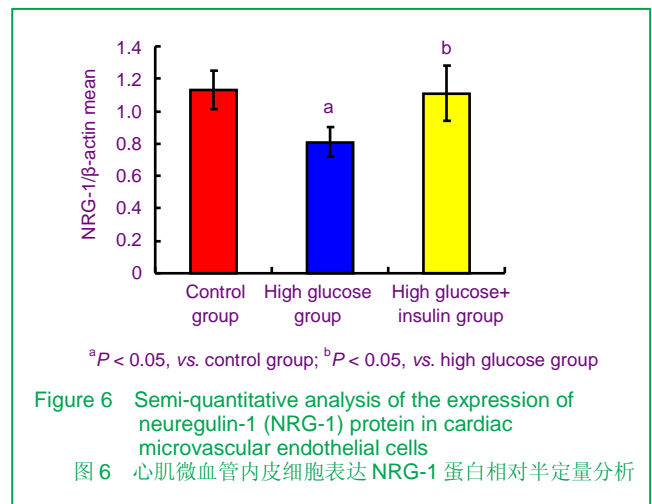
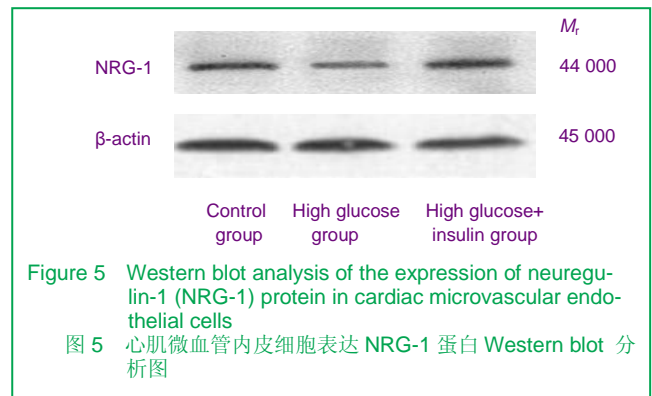


2.3 高糖对 CMEC NRG-1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示, 与对照组比较, 高糖组 CMEC NRG-1 mRNA 表达明显下降( $P < 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖+胰岛素组 CMEC NRG-1 mRNA 表达明显增高, 与对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图3, 4。



2.4 高糖对 CMEC NRG-1 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 与对照组比较, 高糖组 CMEC

NRG-1 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖+胰岛素组 CMEC NRG-1 蛋白表达明显增高, 与对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图5, 6。



### 3 讨论

单层“卵石样”排列和接触生长抑制是内皮细胞重要的生长特性, CD31、VIII因子是内皮细胞的重要标志物<sup>[5-6]</sup>。实验从心肌组织微血管段获得的细胞表现出典型的单层“卵石样”排列, 抗CD31、VIII因子免疫荧光呈阳性, 表明分离培养的细胞是CMEC。

实验发现经葡萄糖干预的 CMEC 表达 NRG-1 mRNA 和蛋白明显下降( $P < 0.05$ ), 而加入胰岛素后, CMEC 表达 NRG-1 mRNA 和蛋白与对照组比较略有下降, 但无显著性意义。说明高糖能抑制 CMEC 表达 NRG-1 mRNA 和蛋白, 而其抑制作用可被胰岛素拮抗。

内皮祖细胞是一类能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 不仅参与胚胎血管的生成, 而且在出生后成体血管新生过程中亦起重要作用, 新生血管中约25%的内皮细胞是由内皮祖细胞直接分化而来的<sup>[7-8]</sup>。实验以体外细胞培养的方式模拟临床中糖尿病患者持续高糖状态对心肌微血管内皮功能的影响。研究表明, 高糖能减低内皮祖细胞的增殖, 增加其凋亡, 使由内皮祖细胞分化而

来的内皮细胞减少<sup>[9]</sup>。同时,持久高糖刺激引起的CMEC通透性增加,这将使现存及新生血管出现病理性渗漏,代谢效率降低<sup>[10]</sup>。

近年来研究表明, NRG-1在成年心脏心内膜和CMEC中有较高表达,而在主动脉、冠状动脉、冠状静脉内皮细胞中则不表达<sup>[11-12]</sup>。NRG-1与心肌细胞膜上的ErbB2/ErbB4受体结合,引发胞内信号分子,导致存在于细胞内具有转录激活功能的蛋白质被磷酸化而活化,活化后的转录因子进入细胞核,与特定的靶基因结合,诱导晚期基因表达<sup>[13]</sup>。同时,具有转录激活功能的蛋白质被磷酸化而活化后,通过旁分泌刺激上皮细胞分泌诸如血管内皮生长因子A等血管生长因子,血管生长因子和其受体结合产生生物效应,促进血管再生<sup>[14-15]</sup>。

血小板来源的生长因子在平滑肌增生、血管狭窄等病理反应中起重要作用。血小板来源的生长因子通过促进ERK1/2磷酸化使其活化, ERK1/2通路激活后,能促进上调平滑肌细胞增殖的通路开放,进而促进其增殖,最终导致平滑肌增生、血管狭窄等病理反应<sup>[6, 16]</sup>。而NRG-1可抑制ERK1/2的磷酸化,进而阻断其下游区能上调平滑肌分化的血小板来源的生长因子受体,抑制平滑肌增生,防止血管狭窄等的发生<sup>[7, 17]</sup>。

NRG-1与心肌细胞膜上的ErbB2/ErbB4受体结合,最终诱导晚期基因表达,晚期基因表达产物通过抑制促凋亡蛋白Bax的表达,阻断线粒体蛋白的释放,避免细胞发生凋亡<sup>[18]</sup>。

高糖能减低内皮祖细胞的增殖,增加其凋亡,使由内皮祖细胞分化而来的内皮细胞减少。同时,高糖刺激引起的CMEC通透性增加,这将使现存及新生血管内皮细胞出现病理性渗漏,代谢效率降低。糖尿病患者由于处于持续高血糖状态, CMEC数量减少,代谢效率降低, CMEC表达的NRG-1将下降。由于CMEC数量减少,其通过旁分泌产生的血管生长因子亦减少,血管再生功能降低。NRG-1具有抑制心肌凋亡和血管平滑肌增生功能。糖尿病患者,由于CMEC表达的NRG-1下降,心肌细胞增生/凋亡比例失调,使得心肌细胞数量减少,心功能下降。同时, CMEC表达的NRG-1下降,使血管平滑肌增生,血管变窄,心肌血供减少。

总之, CMEC表达NRG-1的下降,可致心肌细胞凋亡增加、心肌细胞数量减少,血管平滑肌增生,血管变窄,心肌血供减少。

#### 4 参考文献

[1] Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu M, et al. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1771-1781.  
 [2] Arikawa E, Ma RC, Isshiki K, et al. Effects of insulin replacements, inhibitors of angiotensin, and PKCbeta's actions to normalize cardiac gene expression and fuel metabolism in diabetic rats. *Diabetes*. 2007;56(5):1410-1420.

[3] Wang XY, Gao XM, Liu H, et al. Gene expression profiling of the proliferative effect of periplocin on mouse cardiac microvascular endothelial cells. *Chin J Integr Med*. 2010;16(1):33-40.  
 [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.  
 [5] Wang Z, Xu G, Wu Y, et al. Neuregulin-1 enhances differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cells. *Med Biol Eng Comput*. 2009;47(1):41-48.  
 [6] Lemmens K, Doggen K, Keulenaer GW. Neuregulin-1 and its potential role in the control of cardiac function. *Heart Fail Monit*. 2008;5(4):119-124.  
 [7] Lemmens K, Doggen K, De Keulenaer GW. Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure. *Circulation*. 2007;116(8):954-960.  
 [8] Iivanainen E, Paatero I, Heikkinen SM, et al. Intra- and extracellular signaling by endothelial neuregulin-1. *Exp Cell Res*. 2007;313(13):2896-2909.  
 [9] Hintsanen M, Elovainio M, Puttonen S, et al. Neuregulin-1 genotype moderates the association between job strain and early atherosclerosis in young men. *Ann Behav Med*. 2007;33(2):148-155.  
 [10] Clement CM, Thomas LK, Mou Y, et al. Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vasc Res*. 2007;44(4):303-312.  
 [11] Lemmens K, Segers VF, Demolder M, et al. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19469-19477.  
 [12] Liu FF, Stone JR, Schuldt AJ, et al. Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(2):H660-666.  
 [13] Jaworski A, Burden SJ. Neuromuscular synapse formation in mice lacking motor neuron- and skeletal muscle-derived Neuregulin-1. *J Neurosci*. 2006;26(2):655-661.  
 [14] Singh H, Brindle NP, Zammit VA. High glucose and elevated fatty acids suppress signaling by the endothelium protective ligand angiopoietin-1. *Microvasc Res*. 2010;79(2):121-127.  
 [15] Jiang Z, Zhou M. Neuregulin signaling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2010;7(1):42-47.  
 [16] Eto K, Hommyo A, Yonemitsu R, et al. ErbB4 signals Neuregulin1-stimulated cell proliferation and c-fos gene expression through phosphorylation of serum response factor by mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biochem*. 2010;339(1-2):119-125.  
 [17] Neddens J, Vullhorst D, Paredes D, et al. Neuregulin links dopaminergic and glutamatergic neurotransmission to control hippocampal synaptic plasticity. *Commun Integr Biol*. 2009;2(3):261-264.  
 [18] Doggen K, Ray L, Mathieu M, et al. Cell Cardiol. Ventricular ErbB2/ErbB4 activation and downstream signaling in pacing-induced heart failure. 2009;46(1):33-38.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 国家自然科学基金(30860101), 课题名称: 神经调节蛋白 1 转染脂肪来源的内皮祖细胞移植治疗糖尿病心肌病。

**致谢:** 感谢南昌大学第一附属医院江西省高血压病研究所提供实验场所,同时对曾俊义、罗时文在实验中给予的帮助表示衷心感谢。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 首次通过体外细胞培养的方式模拟临床中糖尿病患者持续高血糖对心肌微血管内皮表达神经调节蛋白 1 的影响,有望为糖尿病心肌病的治疗提供新的靶点。

**设计或课题的偏倚与不足:** 实验观察高糖对体外培养的心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白 1 的影响,初步研究限于体外实验,还应进一步进行体内实验。

**提供临床借鉴的价值:** 通过调节心肌微血管内皮细胞表达神经调节蛋白 1,抑制心肌凋亡,防止血管平滑肌增生,改善心肌功能,有望为糖尿病心肌病的治疗提供新的靶点。