

· 临床研究 ·

## COX-2 信号通路参与高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大研究

李劲松

(重庆市双桥区人民医院 400900)

**摘要:**目的 探讨环氧化酶-2(COX-2)在高糖高胰岛素诱导的心肌肥大中的作用。方法 用高糖高胰岛素刺激体外培养的乳鼠心肌细胞,以细胞表面积、蛋白含量和心房利钠因子(ANF)mRNA 表达为心肌细胞肥大的反映指标,观察 COX-2 特异性抑制剂——塞来昔布对高糖高胰岛素致肥大作用的影响。利用 real-time PCR 检测细胞中 mRNA 的表达。结果 高糖高胰岛素诱导细胞表面积、总蛋白含量以及 ANF、COX-2 mRNA 的表达增加( $P<0.05$ );塞来昔布可以抑制高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大( $P<0.05$ ),同时抑制 COX-2 的表达( $P<0.05$ )。结论 塞来昔布可以通过抑制 COX-2 的表达,从而对抗高糖高胰岛素诱导的心肌肥大。

**关键词:**糖尿病;环氧化酶-2;心肌细胞肥大;高糖高胰岛素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.25.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)25-2537-02

## Study on influence of COX-2 in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin

Li Jinsong

(People's Hospital of Shuangqiao District, Chongqing 400900, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of clooxygenase 2(COX-2) in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin. **Methods** Use high glucose and insulin to activate the cultured neonatal rat cardiomyocytes, and take the cell surface area, protein content, and atrial natriuretic area(ANF) mRNA expression as the indexes of cardiomyocyte hypertrophy, and then observe the effect of COX-2 on cardiomyocyte hypertrophy caused by high glucose and insulin. real-time PCR was used to assay the expression of COX-2 mRNA. **Results** High glucose and insulin induced profound change of hypertrophic morphology, the significant increase in cell surface area, protein content, ANF and COX-2 mRNA expression compared to control group( $P<0.05$ ). However, celecoxib(0.3  $\mu\text{mol/L}$ ) could inhibit the cardiomyocyte hypertrophy and the expression of COX-2 mRNA. **Conclusion** Celecoxib can attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin by decreasing the expression of COX-2.

**Key words:** Diabetes mellitus; clooxygenase 2; cardiomyocyte hypertrophy; high glucose and insulin

糖尿病是当前世界的流行性疾病之一,糖尿病在世界范围内的流行趋势日趋严重<sup>[1]</sup>。有研究发现,糖尿病本身可引起心脏结构和功能的损伤,出现以心肌肥厚、心室顺应性降低和峰充盈率减少为主要特征的糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)<sup>[2-3]</sup>。心肌肥厚是糖尿病性心肌病关键的结构改变,与糖尿病患者心力衰竭、猝死等密切相关<sup>[4-5]</sup>。环氧化酶(COX)是由花生四烯酸合成前列腺素(prostaglandin, PGs)的限速酶,分为 COX-1 和 COX-2 两种,COX-1 组成性表达,存在于正常组织中,一般浓度较低,外源性刺激不能诱导其表达;COX-2 在内皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞中,可受活性氧中间产物诱导性表达,并参与氧化应激过程,其产物在炎症等病理过程中起重要作用<sup>[6-9]</sup>。有研究发现,糖尿病是一种与炎症有关的疾病,IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等多种促炎性细胞因子参与了糖尿病的发生、发展过程<sup>[10]</sup>。COX-2 特异性抑制剂——塞来昔布是否可以抑制糖尿病心肌肥厚,目前尚未见相关报道。现将本研究利用高糖高胰岛素作为刺激因子,在离体培养的乳鼠心肌细胞进行的相关研究报道如下。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物** 1~3 d 龄的 SD 乳鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。

**1.2 实验试剂** 塞来昔布、多聚甲醛、PVDF 膜购自 Sigma 公司, RIPA 裂解液、BCA 蛋白试剂盒购自江苏碧云天公司, PCR 逆转录试剂盒、TRIzol 购自 TaKaRa 生物工程公司, DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司。

**1.3 心肌细胞原代培养**<sup>[11]</sup> 将乳鼠心脏剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右小块,加 0.125% 的胰蛋白酶为单细胞悬液,调整细胞浓度至 (0.25~0.65)  $\times 10^8$  cells/L 接种于 6 孔细胞培养板,检测细胞表面积;调整细胞浓度至 (2.5~3.5)  $\times 10^8$  cells/L,接种于 25 mL 细胞培养瓶内,检测 mRNA;接种于 24 孔细胞培养板,检测蛋白含量。置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。心肌细胞在 18~30 h 后可贴壁生长,在 48 h 后出现自发搏动。开始培养时加入 0.1 mmol/L 5- $\beta$ -BrdU 抑制非心肌细胞生长。48 h 后更换培养液继续培养 24 h,至 72 h 换无血清培养液并加入相应试剂,继续孵育 48 h 后用于检测。

**1.4 实验分组** 将原代培养的心肌细胞分为 3 组,(1)对照组:葡萄糖 5.5 mmol/L;(2)模型组:葡萄糖 25.5 mmol/L 加胰岛素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ;(3)实验组:在模型组的基础上加用塞来昔布 0.3  $\mu\text{mol/L}$ 。

**1.5 心肌细胞表面积测量** 取有心肌细胞生长的盖玻片,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,95% 的乙醇固定 13~18 min, HE 染色后用 QwinV3 图像分析系统(德国 Leica 公司)检测单个细胞的表面积,每张玻片测量 10 个视野,每个视野测 20~25 个细胞,取均值。每组重复 6 次。

**1.6 心肌细胞蛋白浓度的测定** 收集心肌细胞,加入裂解液,在冰浴条件下用超声破碎仪破碎细胞,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书操作,用标准曲线计算心肌细胞的蛋白含量。

**1.7 检测心房利钠因子(ANF)、COX-2 mRNA 的表达** 用

real-time PCR,引物序列如下:ANF 正义链 5'-TCA CTG GAT TGG AGC CAA GAG-3',反义链 5'-TCC TGC AGA TAT GGT GTT TTC TAC-3';COX-2 正义链 5'-GAA TCA CTC ATC AGC GCA TCA C-3',反义链 5'-CTA GAC AGT ACG CGC TCC AGA TAC-3'; $\beta$ -actin 正义链 5'-GCC CTA CGG TCA ATA CAT GA-3',反义链 5'-CTG CGT GGT TCC CTT CGT AGA-3'。扩增片段分别为 75、162、423 bp。引物由 TaKaRa 生物工程公司合成。扩增完成以后进行凝胶电泳分离验证 real-time PCR 结果。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

3 组高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大见表 1,图 1。对照组和实验组心肌细胞 COX-2 mRNA 表达值( $53.3 \pm 5.6$  和  $39.5 \pm 2.8$ )与模型组( $135.8 \pm 11.4$ )比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

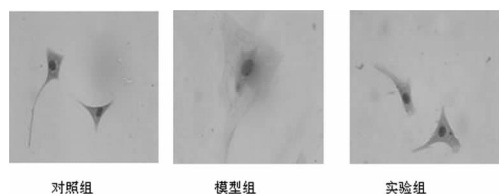
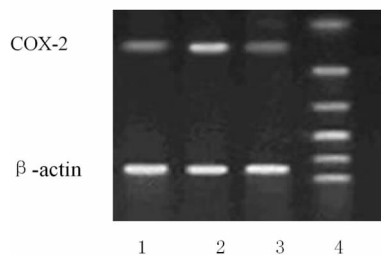


图 1 高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大 HE 染色( $\times 400$ )

表 1 3 组高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	细胞表面积 ( $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ )	蛋白含量 ( $\mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ )	ANF mRNA
对照组	$398.5 \pm 51.2$	$20.6 \pm 3.8$	$31.2 \pm 5.9$
模型组	$1006.8 \pm 63.1^*$	$50.4 \pm 6.5^*$	$166.3 \pm 18.9^*$
实验组	$425.6 \pm 53.2^{\wedge}$	$29.4 \pm 3.6^{\wedge}$	$42.8 \pm 7.3^{\wedge}$

\*: $P < 0.05$ ,与对照组比较; $\wedge$ : $P < 0.05$ ,与模型组比较。



1:对照组;2:模型组;3:实验组;4:Marker。

图 2 高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大凝胶电泳分离结果

## 3 讨 论

心肌肥厚是 2 型糖尿病等代谢性疾病患者常见的并发症,是糖尿病患者并发心力衰竭和猝死的根本原因<sup>[12-13]</sup>。患者在糖尿病情况下血糖升高,与此同时机体的调节机制促使胰岛素分泌增加。虽然短期代偿机制能有效降低血糖水平,但长时间高血糖会干扰胰岛素通路而降低其敏感性,从而影响葡萄糖转运,导致血糖水平和胰岛素浓度持续升高,形成高糖高胰岛素血症。目前有文献报道,高糖高胰岛素亦可作为独立的因素参与心肌肥大的形成<sup>[13-14]</sup>。本研究用  $0.1 \mu\text{mol/L}$  胰岛素与  $25$ .

$5 \text{ mmol/L}$  葡萄糖刺激心肌细胞,模拟糖尿病患者高糖高胰岛素血症环境,发现心肌细胞表面积、总蛋白含量和 ANF mRNA 的表达均明显升高,出现心肌细胞肥大。

Bell 和 McDermott<sup>[15]</sup> 发现炎症反应在心肌肥厚和糖尿病的发生、发展过程中均起主要作用,提示糖尿病心肌肥厚的发生可能与促炎性细胞因子有一定相关性。COX-2 是炎症反应过程中重要的促炎性细胞因子,可以催化花生四烯酸产生 PGs,引起连锁炎症反应,COX-2 的表达水平与炎症反应的严重程度密切相关<sup>[6]</sup>,COX-2 的表达时间也明显早于 TNF、IL-1 和 IL6 等促炎性细胞因子。也有研究显示,COX-2 参与了心肌肥厚的发生、发展过程,提示 COX-2 可能在糖尿病心肌肥厚中起重要作用。

本研究结果显示,高糖高胰岛素刺激心肌细胞肥大的同时,COX-2 mRNA 的表达明显增加,二者呈正相关,提示高糖高胰岛素诱导心肌细胞肥大可能与其激活 COX-2 的表达有关。为进一步确定 COX-2 在心肌细胞肥大中的作用,本研究还采用了 COX-2 特异性阻断剂——赛来昔布进行了更深入的研究。结果表明,赛来昔布在抑制 COX-2 表达的同时,可以对抗高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大,进一步证实 COX-2 参与了高糖高胰岛素诱导的心肌细胞肥大。

综上所述,本研究利用高糖高胰岛素诱导心肌细胞肥大模型证明 COX-2 与其致肥大机制密切相关,为糖尿病心肌肥厚的治疗提供了新的思路和途径,并为开发低毒高效、价格便宜的治疗糖尿病心肌肥厚的药物提供了基础理论支持。

## 参考文献:

- [1] 周士胜,李达,周一鸣.慢性烟酰胺超载与 2 型糖尿病流行的关系[J].生理学报,2010,62(1):86-92.
- [2] 李庆凤,苏珂.糖尿病心脏病发病机制的研究进展[J].中国全科医学,2011,9(2):291-311.
- [3] 董世芬,洪缨,孙建宁.糖尿病心脏病与过氧化物增殖体激活受体[J].中国药理学通报,2010,26(8):1117-1120.
- [4] Saunders J, Mathewkutty S, Drazner MH, et al. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: update on pathophysiological mechanisms[J]. Herz, 2008, 33(3):184-190.
- [5] Zimmet P. Preventing diabetic complications: A primary care perspective[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2009, 33(3):442-4452.
- [6] 姜昕,郭毅,王启章,等.小檗碱对脂多糖诱导的 COX-2 表达的影响[J].临床心血管病杂志,2011,27(2):152-157.
- [7] 黄沙,余江毅.2 型糖尿病炎症的中医病机探讨[J].辽宁中医杂志,2009,36(3):373.
- [8] Wu WK, Sung JJ, Lee CW, et al. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms[J]. Cancer Lett, 2010, 295(1):7-16.
- [9] Cakała M, Strosznajder JB. The role of cyclooxygenases in neurotoxicity of amyloid beta peptides in Alzheimer's disease[J]. Neurol Neurochir Pol, 2010, 44(1):65-79.
- [10] Rivero A, Mora C, Muros M, et al. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy[J]. Clin Sci, 2009, 116(6):479-492. (下转第 2540 页)

表 3 分娩方式、新生儿出生体质量、喂养方式对产后妇女骨密度的影响

影响因素	n	Neck	L <sub>1-4</sub>
分娩方式			
剖腹宫产	542	0.83±0.14	1.05±0.12
自然分娩	234	0.84±0.14	1.05±0.13
新生儿出生体质量(g)			
<2 500	39	0.90±0.14	1.00±0.13
2 500~<4 000	667	0.92±0.16	1.02±0.12
≥4 000	70	0.95±0.15	1.04±0.13
喂养方式			
人工喂养	133	0.90±0.13	1.09±0.12
混合喂养	384	0.84±0.16	1.06±0.12
纯母乳喂养	259	0.74±0.15*	0.97±0.13*

\*:  $P < 0.05$ , 与人工喂养和混合喂养比较。

### 3 讨 论

世界卫生组织(WHO)将骨质疏松症定义为由骨量低下、骨微细结构破坏,导致骨骼脆性增加和骨折为特征的全身性疾病。骨质疏松症是一种与增龄相关的疾病,同时也是一种与遗传和环境因素密切相关的疾病。骨峰值及骨丢失率两因素决定一个人的骨量<sup>[4]</sup>,因此,建立足够的峰值骨量是预防骨质疏松的关键。妇女 20~30 岁为骨量缓慢增长期,25~30 岁骨量达到峰值,30~40 岁为骨峰值相对稳定期。本研究入选产后妇女的平均年龄(28.76±3.49)岁,已经达到骨峰值期。产后妇女骨量减少和骨质疏松的发生率分别为 42.14%和 2.45%,需要引起足够重视,及时采取各种措施帮助产后妇女恢复骨量,以利于减少或延缓女性围绝经期骨质疏松症的发生。

本研究结果显示,产后妇女年龄与骨密度关系不大,体质量、身高、BMI 与骨密度呈正相关,与其它研究结果相符<sup>[5-6]</sup>。提示身材矮小、BMI 较小的产后妇女发生骨量减少或骨质疏松的可能性较大,应及早采取措施,如补钙、运动等预防骨量的丢失。

本研究中,分娩方式对产后骨密度无影响,剖宫产和自然分娩的产后妇女骨密度没有差别,与刘建建和杨桂莲<sup>[7]</sup>研究结果不一致,可能与剖宫产手术已经是妇产科医生掌握得较好的手术方式、术中出血量不大、加之目前国内三级甲等医院术后镇痛运用广泛、产后妇女剖宫产术后下床活动较早有关。新生儿出生体质量对产后妇女骨密度没有影响。新生儿出生体质量与产后妇女文化程度、孕次、新生儿性别等多因素相关<sup>[8]</sup>。

有多项研究表明,哺乳可导致妇女骨量降低<sup>[9-10]</sup>。本研究

发现,喂养方式影响产后妇女骨密度,纯母乳喂养会降低骨密度,人工喂养者骨密度最高。哺乳会增加产后妇女钙流失,通过乳汁供给新生儿及婴幼儿赖以生长的钙。哺乳期妇女每天需消耗 1 300~2 400 mg 钙,而我国成人膳食中每日钙的摄入量仅为 500~600 mg,钙摄入不足必然会动员骨钙入血,以满足哺乳所需及产后妇女生理需求。因此,对产后哺乳期妇女定期、定量补钙能增加骨密度<sup>[11]</sup>,有利于降低骨质疏松症的发生率。

### 参考文献:

- [1] Kalkwarf HJ, Specker BL, Bianchi DC, et al. The effect of calcium supplementation on bone density during lactation and afterweaning[J]. *N Eng J Med*, 1997, 337(8): 523-528.
- [2] Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(8): 1137-1141.
- [3] 程晓光. 国际临床骨密度学会共识文件(2005 年版)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12(2): 205-209.
- [4] 刘忠厚. 骨质疏松学[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998: 142.
- [5] 陈金标, 秦林林, 张卫, 等. 体质量、体成分与骨密度的关系[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(2): 15-18.
- [6] 谢晶, 杜靖远, 沈霖等. 体质量和身高对峰值骨量的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(1): 27-28.
- [7] 刘建建, 杨桂莲. 产后骨密度影响因素研究[J]. *实用预防医学*, 2011, 18(3): 464-466.
- [8] Murray LJ, O reilly DPJ, Betts N, et al. Season and outdoor ambient temperature: effects on birth weight[J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2000, 96(5 pt 1): 689-695.
- [9] Prentice A. Maternal calcium requirements during pregnancy and lactation[J]. *Am J Clin Nutr*, 1994, 59(2 Suppl): S477-483.
- [10] 刘华平, 杨琳, 任东平, 等. 哺乳期妇女钙代谢及骨密度的变化[J]. *空军总医院学报*, 2005, 21(4): 208-210.
- [11] 李彦敏, 王建忠, 薛颖, 等. 产后早期女性骨密度的研究进展[J]. *河北医药*, 2010, 32(2): 219-220.

(收稿日期: 2011-05-23 修回日期: 2011-06-08)

(上接第 2538 页)

- [11] Li HZ, Guo J, Gao J, et al. Role of dopamine D2 receptors in ischemia/reperfusion induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 18.
- [12] Saunders J, Mathewkutty S, Drazner MH, et al. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: update on pathophysiological mechanisms[J]. *Herz*, 2008, 33(3): 184-190.
- [13] Sakata S, Lebeche D, Sakata Y, et al. Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292

(2): 1204-1207.

- [14] Liao Y, Takashima S, Zhao H, et al. Control of plasma glucose with alpha-glucosidase inhibitor attenuates oxidative stress and slows the progression of heart failure in mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(1): 107-116.
- [15] Bell D, Mcdermott BJ. Effects of rosiglitazone and interactions with growth-regulating factor in ventricular cell hypertrophy[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 508(1/3): 69-76.

(收稿日期: 2011-05-28 修回日期: 2011-06-23)