

· 基础研究 ·

氢气饱和生理盐水对高糖所致内皮细胞内活性氧生成和凋亡的影响

任汉强, 沈小波

(湖北省江汉大学附属武汉市第六医院内分泌科, 武汉 430015)

摘要:目的 探讨氢气(H₂)饱和生理盐水对高糖所致内皮细胞内活性氧(ROS)生成和凋亡的影响。方法 细胞分为对照组、高糖组、高糖+H₂饱和生理盐水组(H₂组)3组,流式细胞仪检测细胞内 ROS,Realtime PCR 检测氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)mRNA,细胞凋亡 ELISA 试剂盒检测细胞凋亡。结果 H₂组内皮细胞内 ROS 较高糖组明显减少(2.75±0.37 vs 6.35±1.29, P<0.01),而 SOD 和 GSH-Px mRNA 水平明显增高(SOD:0.74±0.06 vs 0.26±0.03, P<0.01; GSH-Px:0.68±0.05 vs 0.31±0.04, P<0.01),细胞凋亡水平明显降低(0.38±0.02 vs 0.89±0.05, P<0.01)。结论 H₂饱和生理盐水可减少高糖诱导的内皮细胞内 ROS 增多和抗氧化酶的消耗,并减少高糖诱导的细胞凋亡。

关键词:活性氧;氢气;葡萄糖;人脐静脉内皮细胞;凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0575-03

Hydrogen-rich saline on endothelial cells reactive oxygen species induction and apoptosis induced by high glucose

Ren Hanqiang, Shen Xiaobo

(Department of Endocrinology, No. 6 Hospital Affiliated to Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430015, China)

Abstract: Objective To study the effects of hydrogen-rich saline on endothelial reactive oxygen species(ROS) induction and apoptosis induced by high glucose. **Methods** Cells were divided into three groups, including control group, high glucose group, and H₂ group (high glucose + hydrogen-rich saline). The level of intracellular ROS was detected by FACS. The levels of super oxide dismutase(SOD), and glutathione peroxidase(GSH-Px) mRNA were detected by realtime PCR. The apoptosis of cells was analyzed by cell death ELISA. **Results** The level of intracellular ROS was reduced in the H₂ group, compared with the high glucose group (2.75±0.37 vs. 6.35±1.29, P<0.01). The levels of SOD and GSH-Px mRNA were higher in the H₂ group than those in the high glucose group (SOD:0.74±0.06 vs. 0.26±0.03, P<0.01; GSH-Px:0.68±0.05 vs. 0.31±0.04, P<0.01). The apoptosis of cells in the H₂ group was decreased, compared with the high glucose groups (0.38±0.02 vs. 0.89±0.05, P<0.01). **Conclusion** hydrogen-rich saline can decrease the high glucose-induced intracellular ROS induction, increase the antioxidant, and protect the high glucose-induced apoptosis of endothelial cell.

Key words: reactive oxygen species; hydrogen; glucose; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis

糖尿病时持续高血糖是动脉粥样硬化形成的重要危险因素。既往研究表明,高血糖可以刺激血管内皮产生氧化损伤,促进动脉粥样硬化的发生、发展^[1-2]。体内虽存在多种抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等,但在糖尿病时均明显减少,导致机体自身抗氧化能力降低^[3-4]。外源性补充抗氧化剂成为糖尿病抗氧化治疗的热点,但以往使用维生素 C 作为抗氧化剂进行治疗的临床试验均不理想,寻找新的有效抗氧化剂很有必要。新近研究发现氢气(H₂)在生物体内并非惰性气体,可以发挥抗氧化作用^[5-6],但 H₂ 对高血糖诱导的内皮细胞氧化损伤是否有影响目前尚不清楚。作者认为 H₂ 饱和生理盐水可能对高血糖所致内皮细胞氧化损伤具有保护作用,期望为糖尿病的抗氧化治疗提供新的思路。

1 材料与与方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自美国 ADL 公司。葡萄糖购自北京鼎国生物公司,用 0.01 M PBS 配制 2 mol/L 后 -20℃ 保存。胎牛血清和 DMEM-H 培养基购自美国 Gibco 公司,DCF-DA 购自美国 sigma 公司,细胞凋亡 ELISA 检测试剂盒购自美国 BD 公司。SYBR Green II 购自 TAKARA 公司。H₂ 饱和生理盐水按 Ohsawa 等^[5]所述方法配制:将 H₂ 加入 250 mL 软袋生理盐水中,0.4 mMPa 加压 4 h。抽出袋内气体重新注入

H₂ 加压 1 次,制成饱和生理盐水溶液,其中 H₂ 浓度可达 0.6 mmol/L 以上。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HUVEC 用含 10% 胎牛血清和双抗(青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL)的 DMEM-H 培养基,在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。按添加物不同分为:对照组(以等量 PBS 替代添加物),高糖组(加入终浓度为 20 mmol/L 的葡萄糖),H₂ 组(20 mmol/L 的葡萄糖 + H₂ 饱和生理盐水)。添加物作用 72 h 后进行各项指标检测。

1.2.2 流式细胞仪(FACS)检测细胞内活性氧水平 以 DCF-DA 作为荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)进行检测, FACS 检测各组细胞荧光强度。将未加 DCF-DA 的阴性对照管的自发荧光强度值定义为 1,其他各组的荧光强度值均为阴性对照的相对值(检测荧光强度/阴性对照荧光强度)。取各组处理后细胞,加 5 mL 无血清培养基和 5 μL DCF-DA 到 50 mL 培养瓶中,37℃、5% CO₂ 孵育 45 min; PBS 清洗 3 次后 0.25% 胰酶消化,终止消化后 PBS 清洗 2 次,用 2 mL 无血清培养基重悬细胞。其中阳性对照组加阳性药物 Rosup 5 μL,常温下孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次后 FACS 检测待测管荧光强度即为细胞内 ROS 含量。

1.2.3 抗氧化酶检测 使用 Realtime PCR 法测定细胞 SOD、GSH-Px mRNA 含量。收集各组细胞 4℃ 离心,按照试剂盒使

用说明书提取细胞 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA。PCR 反应液包括 12.5 μL 消毒的去离子水, 10 μL SYBR Green II, 上下游引物各 0.75 μL 和 1 μL cDNA。SOD 引物: 上游 5'-CCA CTG CAG GAC CTC ATT TT-3', 下游 5'-TCT ACT GAA CCC GTT TCC AC-3', 产物片段大小 216 bp; GSH-Px 引物: 上游 5'-GTC CAC CGT GTA TGC CT-3', 下游 5'-ACT CTT CAC GCT CCA CTT AC-3', 产物片段大小 317 bp。GAPDH 引物: 上游 5'-ATT GTC AGC AAT GCA TCC TGC A-3', 下游 5'-AGA CAA CCT GGT CCT CAG TGT A-3', 产物片段大小 320 bp。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 处理。ABI 7500 system 软件(Biosystems 公司) 分析。以 GAPDH 作为内参, 目的基因 mRNA 的量以 GAPDH 相对量表示(目的基因拷贝数/GAPDH 基因拷贝数)。

1.2.4 细胞凋亡检测 细胞凋亡 ELISA 试剂盒检测细胞凋亡。取等量各组对数生长期细胞, 0.01 M PBS 洗涤 2 次后用 200 μL 溶细胞缓冲液重新悬浮, 室温下作用 30 min。取细胞裂解液 1 000 r/min 离心 10 min 后, 吸取 20 μL 上清液加入链霉素合素包被的培养板孔中。另加入 80 μL 免疫反应试剂(含抗-DNA-POD、抗组蛋白-生物素), 置 250 r/min 摇床上, 室温孵育 2 h。取上清液, 300 μL 缓冲液洗涤 3 次, 小心移去洗涤液。加入 100 μL 底物缓冲液, 置摇床上室温孵育使颜色变化至适合。立即行比色分析, 以用底物缓冲液作空白对照, 检测波长 405 nm 处 OD 值。以检测孔平均 OD 值减去底物 OD 值大小代表细胞释放的单/低聚核小体片段的多少。核小体片段越多则凋亡细胞越多。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件完成统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间均数比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H₂ 饱和和生理盐水对高糖诱导的内皮细胞内 ROS 生成的影响 与对照组比较, 高糖组细胞内 ROS 含量明显增多(6.35 \pm 1.29 vs. 2.68 \pm 0.22, P < 0.01), 提示高糖能诱导内皮细胞 ROS 生成; 但 H₂ 组 ROS 含量较高糖组明显减少(2.75 \pm 0.37 vs 6.35 \pm 1.29, P < 0.01), 与对照组比较差异无统计学意义(2.75 \pm 0.37 vs 2.68 \pm 0.22, P > 0.05), 提示 H₂ 饱和和生理盐水可以有效降低高糖诱导的 ROS 增多。

2.2 H₂ 饱和和生理盐水对高糖诱导的内皮细胞抗氧化酶 mRNA 表达的影响 高糖组细胞内 SOD 和 GSH-Px 的 mRNA 含量与对照组相比明显降低。但 H₂ 饱和和生理盐水处理后, H₂ 组细胞内 SOD 和 GSH-Px 的 mRNA 含量较高糖组明显增高, 见表 1。

表 1 H₂ 饱和和生理盐水对高糖诱导的内皮细胞抗氧化酶 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD	GSH-Px
H ₂ 组	0.74 \pm 0.06 [#]	0.68 \pm 0.05 [#]
高糖组	0.26 \pm 0.03 [*]	0.31 \pm 0.04 [*]
对照组	0.89 \pm 0.08	0.79 \pm 0.06

*: P < 0.01, 与对照组比较; #: P < 0.01, 与高糖组比较。

2.3 H₂ 饱和和生理盐水对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响 通过细胞凋亡 ELISA 试剂盒检测发现, 高糖组细胞 OD 值明显高于对照组(0.89 \pm 0.05 vs 0.37 \pm 0.04, P < 0.01), 提示高

糖可以诱导内皮细胞凋亡, 而 H₂ 组 OD 值与对照组相似, 明显低于高糖组(0.38 \pm 0.02 vs 0.89 \pm 0.05, P < 0.01), 提示 H₂ 具有保护高糖诱导的内皮细胞凋亡的作用。

3 讨 论

糖尿病时持续高血糖可激活烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸)氧化酶[(nicotinamide adenine dinucleotide(phosphate hydrogen), NAD(P)H], 刺激细胞内 ROS 生成, 造成细胞氧化损伤^[7-8]。血管内皮是血液与血管壁之间的屏障, 高血糖的氧化应激作用在血管内皮中尤为突出, 表现为氧自由基生成增多、一氧化氮合酶表达降低、细胞凋亡增加等。血管内皮的氧化损伤是动脉粥样硬化最重要的始动和促进因素之一^[9-10]。增强内皮细胞抗氧化能力是防治糖尿病并发动脉粥样硬化的重要途径之一。

本研究发现, 高糖可以诱导内皮细胞凋亡增加, 而 H₂ 饱和和生理盐水可以保护高糖诱导的细胞凋亡。内皮细胞凋亡破坏内膜完整性, 使得血液中具有丝裂原作用的细胞因子进入中膜, 刺激平滑肌细胞增生和炎性细胞浸润, 促发动脉粥样硬化进程。细胞内 ROS 生成过多, 可激活线粒体途径和死亡受体途径诱导细胞凋亡。本研究还发现, H₂ 饱和和生理盐水可有效减少高糖诱导的细胞内 ROS 生成过多, 逆转高糖引起的抗氧化酶表达下降, 这可能是 H₂ 饱和和生理盐水发挥凋亡保护作用的机制。

氧化应激中产生的 ROS, 包括强氧化性的羟自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化亚硝酸阴离子(ONOO⁻), 还有中度或弱氧化性的一氧化氮(NO)、超氧阴离子(O₂⁻)等。其中 $\cdot\text{OH}$ 和 ONOO⁻能破坏具有重要功能的生物大分子(如 DNA、蛋白质、脂类等)的结构和功能, 加重内皮氧化损伤, 通常被认为是有害自由基。而 NO、O₂⁻等则被认为对内皮细胞具有保护作用, 是有益的氧自由基。传统的抗氧化剂(如维生素 C)等只能非特异性地清除自由基, 在发挥保护作用的同时又清除了有益的自由基^[11], 因此, 维生素 C 等非特异抗氧化剂对内皮氧化损伤的保护作用是不确定的, 只有特异性的有害自由基清除剂才能更有效地保护内皮细胞氧化损伤。

H₂ 是自然界最简单的气体分子, 以往被人们认为是一种生物学范畴的惰性气体, 在生物体中没有任何作用。近期有研究证明, H₂ 作为一种小气体分子, 易通过细胞膜等膜性结构, 可特异性中和细胞内的有害自由基(如 $\cdot\text{OH}$ 和 ONOO⁻), 保护 DNA、蛋白质等不被破坏, 维持正常的线粒体功能, 阻止细胞凋亡。动物实验也证明, 吸入 H₂ 或口服含氢生理盐水在心、脑和肝缺血再灌注损伤后有明确的保护作用, 还可以减少低密度脂蛋白的氧化修饰, 延缓 apoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化发展^[12-15]。另外, H₂ 作为新发现的抗氧化气体, 与以往许多有抗氧化作用的气体(NO、CO 等)相比, 有如下明显的优势: 惰性气体, 没有毒性; 与自由基反应的产物是水; 多余的 H₂ 可以通过呼吸等方式释放到体外, 不会在人体残留。

综上所述, 体外实验中, H₂ 可有效降低高糖引起的内皮细胞内 ROS 生成和抗氧化酶减少, 发挥抗细胞凋亡作用, H₂ 可能成为新的抗氧化剂保护细胞氧化损伤。

参考文献:

- [1] Jousilahti P, Y egutkin GG, T apanainen P, et al. Insulin regulated increase of soluble vascular adhesion protein-1 in diabetes[J]. Am J Pathol, 2002, 161(6): 2255-2262.

- [2] 李永玲, 邓华聪, 糜公仆, 等. 2 型糖尿病患者血糖、血脂、氧化应激与 β 细胞功能的相关性研究[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(6): 636-641.
- [3] Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(6): 691-728.
- [4] 王尧, 黄欢, 王艳萍, 等. 糖尿病患者血糖波动与氧化应激状态的相关性研究[J]. 中国全科医师杂志, 2011, 14(8B): 2606-2608.
- [5] Ohsawa M, Ishikawa K, Takahashi M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688-694.
- [6] 胡啸玲, 汤恢煊, 周志刚, 等. 氢气对体外循环肺损伤的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(2): 110-114.
- [7] 丁莉, 屈顺林, 王蕾, 等. 高葡萄糖刺激血管内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调、活性氧增加及细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(6): 405-409.
- [8] 张浩, 林玮栋, 汤玮, 等. 氧化应激在糖尿病足发病机制中的研究进展[J]. 上海医学, 2011, 34(5): 408-411.
- [9] Inoue N. Vascular C-reactive protein in the pathogenesis of coronary artery disease: role of vascular inflammation and oxidative stress[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2006, 6(4): 227-231.
- [10] 耿晓仲. 糖尿病肾病患者血清 VEGF 和 TNF-2 水平表达的临床意义[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2942-2945.
- [11] Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Quintero P, et al. Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different [J]. *Redox Rep*, 2010, 15(5): 207-216.
- [12] Fukuda KI, Asoh S, Ishikawa M, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 670-674.
- [13] Cai JM, Kang ZM, Liu W, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(2): 167-172.
- [14] IKuroh O, Kiyomi N, Kumi Y, et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(6): 1195-1198.
- [15] 杨秀艳, 邵蒙蒙, 金露, 等. 氢气对慢性低氧高二氧化碳大鼠学习记忆障碍的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 566-570.

(收稿日期: 2011-03-22 修回日期: 2011-09-06)

(上接第 574 页)

- Gynecologists. Management of abnormal cervical cytology and histology. ACOG practice bulletin no. 99 [J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 112(6): 1419-1444.
- [4] American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician gynecologists [J]. *Obstet Gynecol*, 2005, 105(4): 905-918.
- [5] Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197(4): 346-355.
- [6] Safaeian M, Solomon D, Wacholder S, et al. Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human papillomavirus-negative atypical squamous cells of undetermined significance [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 109(6): 1325-1331.
- [7] Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer [J]. *CA Cancer J Clin*, 2002, 52(6): 342-362.
- [8] 宋淑芳, 尹利荣, 宋静慧. 阴道镜检查在宫颈细胞学 ASCUS 分流管理中的应用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(2): 129-131.
- [9] Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women [J]. *Lancet*, 2007, 369(9580): 2161-2170.
- [10] Gage JC, Schiffman M, Solomon D, et al. Comparison of measurements of human papillomavirus persistence for postcolposcopic surveillance for cervical precancerous lesions [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(7): 1668-1674.
- [11] Castle PE, Cox JT, Jose J, et al. An Analysis of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Negative Cervical Precancers in the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) [J]. *Obstet Gynecol*, 2008, 111(4): 847-856.
- [12] Atkins KA, Jeronimo J, Stoler MH, et al. Description of patients with squamous cell carcinoma in the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study [J]. *Cancer*, 2006, 108(4): 212-221.
- [13] Mahboobeh S, Diane S, Sholom W, et al. Risk of precancer and follow-up management strategies for women with human papillomavirus-negative atypical squamous cells of undetermined significance [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 109(6): 1325-1331.
- [14] Kiatpongson S, Niruthisard S, Mutirangura A, et al. Role of human papillomavirus DNA testing in management of women with atypical squamous cells of undetermined significance [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1): 262-265.
- [15] 陈宝莲. HPV-DNA 检测筛查宫颈癌价值探讨 [J]. 重庆医学, 2009, 38(7): 854-855.

(收稿日期: 2011-01-25 修回日期: 2011-07-22)