

Spartin 和白脂素在糖尿病心脏微血管内皮损伤中的作用及其机制探讨*

陈莎¹, 汪雄², 邱琛茗², 侯娟妮², 魏晓禹², 向朝雪², 唐名扬², 张睿^{1,3}, 裴海峰^{1△}

1. 西南交通大学 临床医学院(成都 610000); 2. 西部战区总医院 心血管内科(成都 610083);

3. 西部战区总医院 检验科(成都 610083)

【摘要】 目的 探讨 spartin 和白脂素(Asp)在高糖性心脏微血管内皮(CMECs)细胞损伤中的作用及其作用机制。**方法** 培养小鼠 CMECs,将其分为正常组(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)和高糖组(HG 组,葡萄糖浓度为 30 mmol/L),实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)及 Western blot 分别检测 CMECs 痉挛性截瘫基因 20 型(spastic paraplegia 20, SPG20) mRNA 和 spartin 蛋白的表达。利用腺病毒(Ad)转染上调 spartin 表达、小干扰 RNA(siRNA)转染下调,采用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)、Asp 对下调了 spartin 表达、并在 48 h 后用 30 mmol/L 葡萄糖干预 24 h 的 CMECs 进行干预,采用流式细胞学技术检测各组细胞凋亡率,一氧化氮(nitric oxide, NO)荧光探针染色检测 NO 的生成、超氧化物阴离子荧光探针染色及 ELISA 试剂盒检测细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成。建立 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)小鼠模型,分为 T2DM 组和 T2DM+Asp 组,模型建立成功后(随机血糖大于 16.7 mmol/L)予以 Asp(1 μg/g)每天腹腔注射 1 次,2 周后小鼠心脏超声检查心脏舒张功能,心脏微血管腐蚀铸型后扫描电镜观察心脏微血管内皮完整性。**结果** 与正常组相比,HG 组小鼠 CMECs 中 SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达均降低($P<0.05$)。在 HG 培养条件下,Ad 感染后 CMECs 内 ROS 含量减少($P<0.05$),细胞凋亡水平降低($P<0.05$),NO 生成增加;相反,siRNA 干预后得到相反的结果。NAC 能够部分逆转 siRNA 的上述作用。Asp 能够上调 CMECs SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达,减少 ROS 的生成,减少细胞凋亡,增加 NO 的生成,但下调 spartin 后给予 Asp 干预,Asp 减少 ROS 生成、减少 CMECs 凋亡、NO 生成增加效应被部分逆转。体内实验发现,Asp 可改善 2 型糖尿病模型小鼠心脏功能和增加心脏微血管内皮的完整性和光滑性。**结论** Asp 可通过上调 spartin 表达途径抑制 CMECs 内的氧化应激反应,从而减轻糖尿病心脏微血管内皮损伤。

【关键词】 糖尿病 心脏微血管内皮细胞 白脂素 Spartin 氧化应激

Study of the Role and Mechanism of Asprosin/Spartin Pathway in Cardiac Microvascular Endothelial Injury Induced by Diabetic Mellitus CHEN Sha¹, WANG Xiong², QIU Chen-ming², HOU Juan-ni², WEI Xiao-yu², XIANG Chao-xue², TANG Ming-yang², ZHANG Rui^{1,3}, PEI Hai-feng^{1△}. 1. School of Clinical Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of West Theater Command, Chengdu 610083, China; 3. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of West Theater Command, Chengdu 610083, China

△ Corresponding author, E-mail: web2010@foxmail.com

【Abstract】 Objective To detect the effects and mechanism of asprosin (Asp) and spartin on the injury of mice cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) induced by high glucose. **Methods** The cultured CMECs were divided into 2 groups, one group is normal group (5.5 mmol/L glucose in the medium) and another is HG group (30 mmol/L glucose in the medium). Real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were respectively used to detect the mRNA level of spastic paraplegia 20 (SPG20) and protein expression of spartin in CMECs. Upregulation or downregulation of the expression of spartin was achieved via transfection with adenovirus (Ad) or small interfering RNA (siRNA) respectively. CMECs with downregulation of spartin expression were firstly treated with anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC) or Asp respectively for 48 h, and then were interfered with 30 mmol/L glucose for 24 h afterward. The apoptosis of cell was detected by flow cytometry. Nitric oxide (NO) production was detected

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81970241)、四川省杰出青年基金(No. 2017JQ0012)和中国博士后基金(No. 2017M613429)资助

△ 通信作者, E-mail: web2010@foxmail.com

by NO probe and ELISA kit. The intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were tested by DHE staining and ELISA kit. Type 2 diabetic model mice were established and then divided into T2DM group and T2DM+ Asp group. After the model mice were established successfully (random blood glucose was more than 16.7 mmol/L), Asp (1 $\mu\text{g/g}$) was intraperitoneally injected once a day. After 2 weeks, mice echocardiography was performed to test cardiac diastolic function. The integrity of the microvascular endothelium was observed by scanning electron microscopy. **Results** Compared with the normal group, the mRNA level of SPG20 and protein expression of spartin in mice CMECs of HG group were significantly reduced ($P < 0.05$). Under the condition of high glucose, Ad transfection induced significant decrease of the intracellular ROS level and the apoptosis level of the CMECs ($P < 0.05$), while NO increased after Ad transfection. In contrast, siRNA intervention resulted in opposite effect. In addition, the antioxidant NAC partly reversed the above changes caused by downregulating spartin. Asp upregulated the level of SPG20 mRNA and spartin protein expression in CMECs, reduced ROS production, reduced apoptosis and increased NO production. However, intervention effects of Asp, such as decreasing of ROS production, inhibiting apoptosis of CMECs and increasing of NO production, were partly reversed in spartin downregulated cells. *In vivo*, we found that Asp can improve cardiac function and increase the integrity and smoothness of cardiac microvascular endothelium in type 2 diabetic mice. **Conclusion** Asp can inhibit oxidative stress in mice CMECs through upregulating spartin signaling pathway, thereby alleviating the damage of microvascular endothelium in diabetic heart.

【Key words】 Diabetes CMECs Asprosin Spartin Oxidative stress

心脏微血管主要位于心脏血液循环终端,是心肌血流灌注的重要组成部分。由于与血液的直接接触,高血糖环境下心脏微血管内皮细胞(CMECs)比心肌细胞更易受损,因此,减轻高血糖对心脏微血管的损害对缓解糖尿病心血管并发症具有十分重要的意义^[1]。spartin 是由痉挛性截瘫基因 20 型(spastic paraplegia 20, SPG20)编码、含有 666 个氨基酸残基的蛋白质,在神经系统和非神经元组织中普遍表达^[2],spartin 定位于线粒体内,能作用于线粒体内与呼吸代谢有关的蛋白,减少细胞活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生,在维持线粒体功能中发挥着重要的作用^[3]。RENVOISE 等^[3]研究发现,spartin 可减少细胞凋亡和坏死,但其在糖尿病心脏微血管损伤中的作用及机制有待研究。白脂素(asprosin, Asp)是一种羧基端切割的 profibrillin(由 FBN1 编码前蛋白)的产物,主要来源于白色脂肪组织。研究发现,2 型糖尿病患者中 Asp 浓度升高^[4],而 Asp 缺失可造成代谢紊乱^[5]。最近研究^[6]显示,Asp 是一种新的预测急性冠脉综合征和不稳定心绞痛的严重程度的生化标记物,能改善心肌梗死后功能^[7]。但 Asp 能否对糖尿病条件下 CMECs 损伤发挥保护作用尚不清楚,因此,本研究通过构建糖尿病微血管损伤细胞模型,拟探讨 spartin 在糖尿病心脏微血管内皮损伤中的作用及其机制,并研究 Asp 对下调 spartin 表达的高糖诱导的 CMECs 损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高糖型 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司)。胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司)。逆转录试剂盒、SYBR 和 Trizol(日本 TaKaRa 公司)。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。Lipofectamine 2000、SPG20 小干扰 RNA (SPG20 siRNA, siRNA 序列: GCATACGAGAAGGCCTTTA) 及非特异阴性 siRNA(scRNA)(广州锐博生物科技有限公司)。小鼠活性氧 ELISA 试剂盒(深圳贝赛维斯生物科技有限公司)。凋亡试剂盒(美国 BD 公司)。N-乙酰半胱氨酸(NAC)、超氧化物阴离子荧光探针二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)、一氧化氮(nitric oxide, NO)荧光探针(DAF-FM-DA)(上海碧云天生物技术有限公司)。Asp(Biolegend 公司)。spartin 一抗、 β -actin 一抗及山羊抗兔二抗(上海优宁维生物科技有限公司)。绿色荧光蛋白(GFP)空载体 GV314、腺病毒(Ad)(上海吉凯基因化学技术有限公司)。链脲佐菌素(STZ,四川生工科技有限公司)。柠檬酸、柠檬酸钠(天津瑞金特化学品有限公司)。戊巴比妥钠干粉(上海生物化学制药厂)。

1.2 细胞培养

从 C57 小鼠(购自成都达硕实验动物有限公司,40 只)心脏分离出原代 CMECs,培养于含 1% 双抗(100 U/mL 青霉素和 100 pg/mL 链霉素)和

10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,并将细胞分为正常组(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)和高糖组(HG 组,葡萄糖浓度为 30 mmol/L)。

1.3 qRT-PCR 检测 CMECs 中 SPG20 mRNA 的表达

Trizol 法提取两组 CMECs 总 RNA,逆转录成为 cDNA,然后采用 ABI 7900 qRT-PCR 仪进行基因片段扩增。引物序列 β -actin: F5'-GTGCTATGT TGCTCTAGACTTCG-3', R5'-ATGCCACAGGA TTCCATACC-3'。SPG20 mRNA: F5'-ATCCCTG GGAGATCAAGTCAC-3', R5'-CTGCCTTGGTC TATTGAGGAAC-3'。以 β -actin 为内参照,最终以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算目的基因的相对表达量。

1.4 Western blot 检测 spartin 蛋白的表达

提取各组 CMECs 总蛋白,用 SDS-PAGE 电泳分离,转到 PVDF 膜上,于 5%脱脂牛奶中室温下封闭 1 h。再用人 spartin(1:2 000)一抗、 β -actin(1:3 000)一抗,于 4℃下过夜。洗膜后二抗(1:2 000)孵育(37℃,1 h)。最后采用化学发光法检测目的条带,用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值。以各组 spartin/ β -actin 灰度的比值为 spartin 蛋白的相对表达量。

1.5 Ad 感染上调 spartin 表达对高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

为验证 spartin 在高糖诱导的小鼠 CMECs 损伤中的保护作用,本实验采用腺病毒感染上调 spartin 表达后再给予高糖干预,同 1.5 分别检测 CMECs 凋亡、ROS、NO 生成水平。将 CMECs 分为溶剂组、AdGFP 组和 AdSPG20 组。溶剂组 CMECs 不进行 Ad 感染,AdGFP 组细胞感染空载体 Ad,AdSPG20 组细胞感染带有 SPG20 基因的腺病毒。培养的 CMECs 每 3 d 更换一次培养基,待 CMECs 增殖融合到 80%~90%时,用 0.25%胰蛋白酶进行消化并且按照 1:2 比例进行传代。将对数期的细胞接种在 6 孔板内,根据分组及相应干预条件行实验操作。Ad 感染 48 h 后用 30 mmol/L 的葡萄糖干预 24 h,然后进行各指标检测。

1.6 siRNA 转染下调 spartin 表达对高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

为探讨 spartin 是否参与了高糖诱导的小鼠 CMECs 损伤及其作用机制,本实验采用 siRNA 转染敲低其表达,再给予高糖干预,即将培养的 CMECs 分为溶剂组、siRNA 组、scRNA 组。待细胞增殖融合至 35%~40%时以 Lipofectamine 2000

为转染试剂,溶剂组细胞仅用转染试剂处理,siRNA 组细胞给予转染试剂+ siRNA(50 nmol/L SPG20 siRNA)处理,scRNA 组细胞给予转染试剂+ scRNA(50 nmol/L scRNA)处理,每个组设置 3 个复孔。转染 48 h 后用 30 mmol/L 的葡萄糖干预 24 h,通过 qRT-PCR 及 Western blot 分别检测 CMECs 中 spartin 表达变化,DHE 染色及 ELISA 试剂盒检测细胞内 ROS 生成变化,通过 NO 荧光探针和流式细胞学技术检测细胞内 NO 的生成和细胞的凋亡率。

为进一步探讨 spartin 下调加重 CMECs 损伤的机制,以及 Asp 在 CMECs 损伤中的作用,本研究在下调 spartin 的基础上分别给予抗氧化剂 NAC 干预和 Asp 干预,干预 48 h 后用 30 mmol/L 的葡萄糖干预 24 h,同上分别检测 CMECs spartin 表达、ROS、NO 的生成和细胞凋亡率。将 CMECs 分为 siRNA 组、siRNA+NAC 组和溶剂组、Asp 组和 Asp+siRNA 组。其中 NAC 为 10 nmol/L,Asp 为 50 nmol/L,转染 48 h 后用 30 mmol/L 的葡萄糖干预 24 h,然后进行各指标检测。

1.7 细胞凋亡、ROS、NO 水平检测

1.7.1 流式细胞术检测细胞的凋亡 各组 CMECs 消化后,1 000 r/min 离心 5 min,然后用预先冷却的 PBS 洗涤 3 次。再用 1×Binding Buffer 重悬细胞。在避光且室温的条件下加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 2.5 μ L,混匀后孵育 20 min,上机检测细胞的凋亡,Flowjo 软件进行数据分析。

1.7.2 NO 荧光探针检测细胞内 NO 的生成 各组 CMECs 以 0.25%胰酶-0.02%EDTA 进行消化离心,完全培养液重悬,将细胞按每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板。按分组处理细胞,每组设置 2 复孔。按照 1:1 000 比例稀释 DAF-FM-DA,终浓度为 5 μ mol/L。除去细胞的培养液,在每孔中加入 1 mL 适当体积稀释好的 DAF-FM-DA。于 37℃孵箱内孵育 20 min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,充分除去没有进入细胞内的 DAF-FM DA。将细胞置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.7.3 免疫荧光 DHE 染色检测细胞内 ROS 含量 对数期生长的各组小鼠 CMECs 接种于 6 孔板内,除去 6 孔板内培养基,将 DHE 稀释至 5 μ mol/L 后在每个孔板内加入 1 mL DHE 稀释液,于 37℃下避光孵育 30 min。用 PBS 清洗 3 次后将其置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.7.4 ELISA 试剂盒检测细胞内 ROS 含量 各

组小鼠 CMECs 接种于 6 孔板内,吸取培养液的上清备用。将标准品与样品均加入 96 孔板中,37 °C 下 30 min。然后洗板 5 次后加入酶标试剂,37 °C 下 30 min。再洗板 5 次后加入显色液,于 37 °C 下显色 30 min 后加入终止液,按 ELISA 试剂盒说明检测 ROS,并以对照组测值为 100%,计算实验组与对照组的比值。

1.8 动物实验

为了探索 Asp 在 2 型糖尿病心脏微血管损伤中的作用,本实验建立 2 型糖尿病小鼠模型后使用 Asp 干预,心脏超声检查心脏舒张功能和进行心脏微血管完整性检查。C57 小鼠 40 只,采用常规腹腔注射 STZ 方法^[8]建立 2 型糖尿病小鼠模型,造模前小鼠高脂高糖喂养 8 周,2 型糖尿病小鼠模型建立成功(随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L)后,分为 T2DM 组和 T2DM+Asp 组,T2DM+Asp 组小鼠予以 Asp (1 μ g/g)每天腹腔注射 1 次,2 周后进行以下检测。

1.8.1 心脏舒张功能检测 造模成功后进行小鼠心脏超声检查,了解心脏舒张功能,观察左室舒张功能的峰值流速,并计算早期快速舒张充盈波(E)与晚期舒张充盈波(A)的比值。

1.8.2 心脏微血管内皮完整性检查 造模成功后取各组小鼠,0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,给予肝素 700 U/kg 皮下注射,30 min 以后,在小鼠主动脉灌注压力 ≤ 100 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)时,以 10 mL 低黏度树脂与过氧化苯甲酰混合作为催化剂,室温(RT)下 5%氢氧化钠溶液进行腐蚀。取小鼠心脏,在去除血管周围所有结缔组织后,用冻干法干燥,铸件喷金镀膜。心脏微血管(血管直径 < 500 μ m)腐蚀铸型在 10kV 下扫描电子显微镜观察心脏微血管内皮变化,评估心脏血管壁内微血管内皮的完整性和光滑性。

1.9 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较用独立样本 *t* 检验,多组之间的比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对 CMECs 中 spartin 表达的影响

高糖(30 mmol/L)孵育 CMECs 24 h, qRT-PCR 及 Western blot 检测结果(图 1)显示,与正常组相比,高糖抑制了 SPG20 mRNA 和 spartin 蛋白的表达($P < 0.05$)。提示 spartin 可能参与了糖尿病内皮细胞的病理损伤。

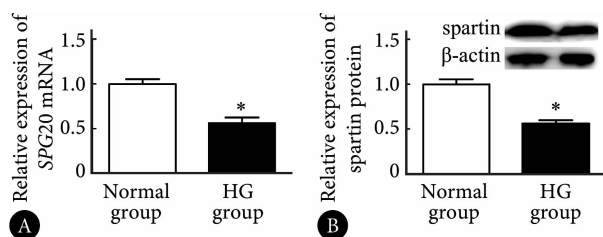


图 1 高糖对小鼠 CMECs spartin 表达的影响

Fig 1 Influence of high glucose on the expression of spartin in mice CMECs

A: Expression of SPG20 mRNA; B: Expression of spartin protein; * $P < 0.05$, vs. normal group

2.2 上调 spartin 表达对高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

结果发现, Ad SPG20 转染后, CMECs 的 SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达均增高($P < 0.05$,图 2A、2B);同时,与溶剂组及 Ad GFP 组相比, Ad SPG20 组 CMECs 内 ROS 含量减少($P < 0.05$,图 2C、2D),且细胞凋亡水平降低($P < 0.05$,图 2E, NO 生成增加(图 2F)。

2.3 下调 spartin 表达对高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

结果发现, siRNA 转染后小鼠 CMECs 的 SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达均降低($P < 0.05$,图 3A、3B);与溶剂组及 scRNA 组相比, siRNA 组 CMECs 内 ROS 含量增加($P < 0.05$,图 3C、3D),且细胞凋亡率增高($P < 0.05$,图 3E), NO 生成减少(图 3F)。表明 spartin 表达下调加重了高糖性 CMECs 损伤。

2.4 NAC 对下调 spartin 表达高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

结果发现,与 siRNA 组相比, siRNA+NAC 组小鼠 CMECs 内 ROS 的含量降低($P < 0.05$,图 4A、4B);同时, siRNA+NAC 组小鼠 CMECs 凋亡下降($P < 0.05$,图 4C), NO 生成增加(图 4D)。

2.5 Asp 对下调 spartin 表达后高糖诱导的 CMECs 损伤的影响

结果发现, Asp 能够上调小鼠 CMECs SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达($P < 0.05$,图 5A、5B),减少 ROS 的生成($P < 0.05$,图 5C、5D),减少 CMECs 的凋亡($P < 0.05$,图 5E),并增加 CMECs NO 的生成(图 5F)。但在下调 spartin 的基础上给予 Asp 干预后, Asp 减少 ROS 生成、减少凋亡、NO 生成增加效应被部分逆转($P < 0.05$,图 5C、5D、5E、5F)。

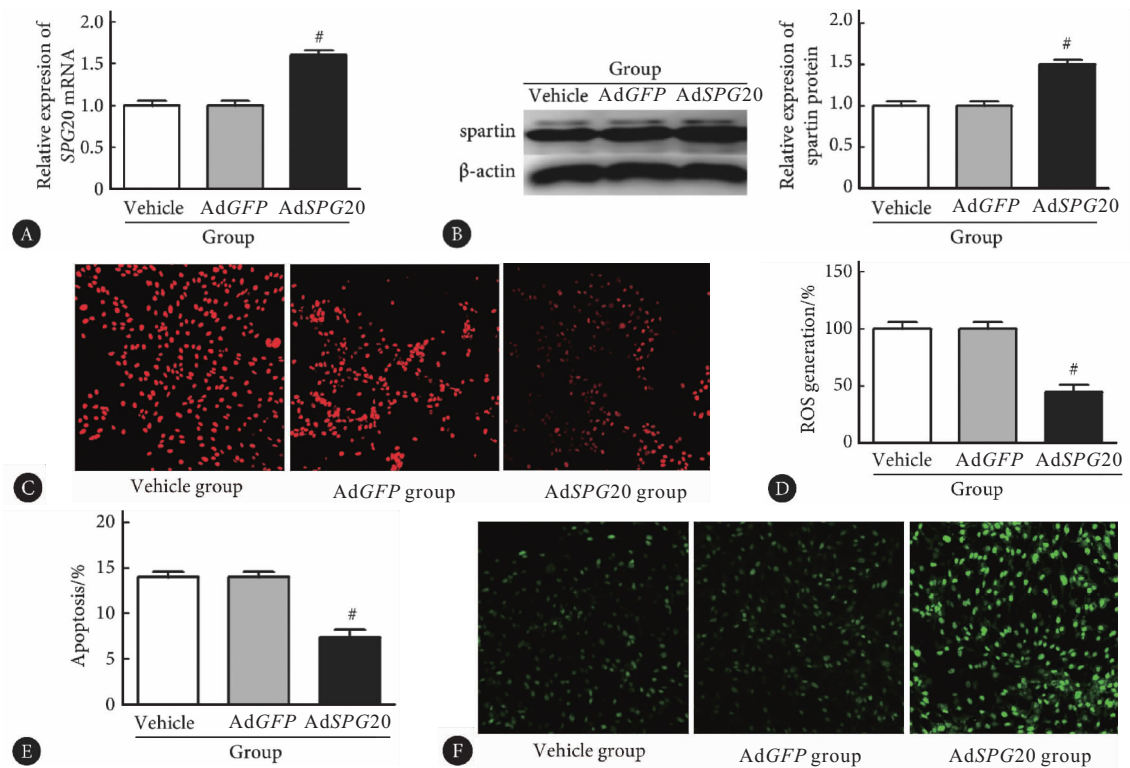


图 2 上调 spartin 对高糖性小鼠 CMECs 氧化应激、凋亡和 NO 生成的影响

Fig 2 The effect on the oxidative stress, apoptosis and NO production of mice CMECs with upregulated spartin in high glucose
A: Expression of *SPG20* mRNA; B: Expression of spartin protein; C: ROS content by DHE ($\times 200$); D: ROS content by ELISA; E: Statistical results of low cytometry; F: NO content by NO fluorescent probe ($\times 200$). $\# P < 0.05$, vs. AdGFP and vehicle groups

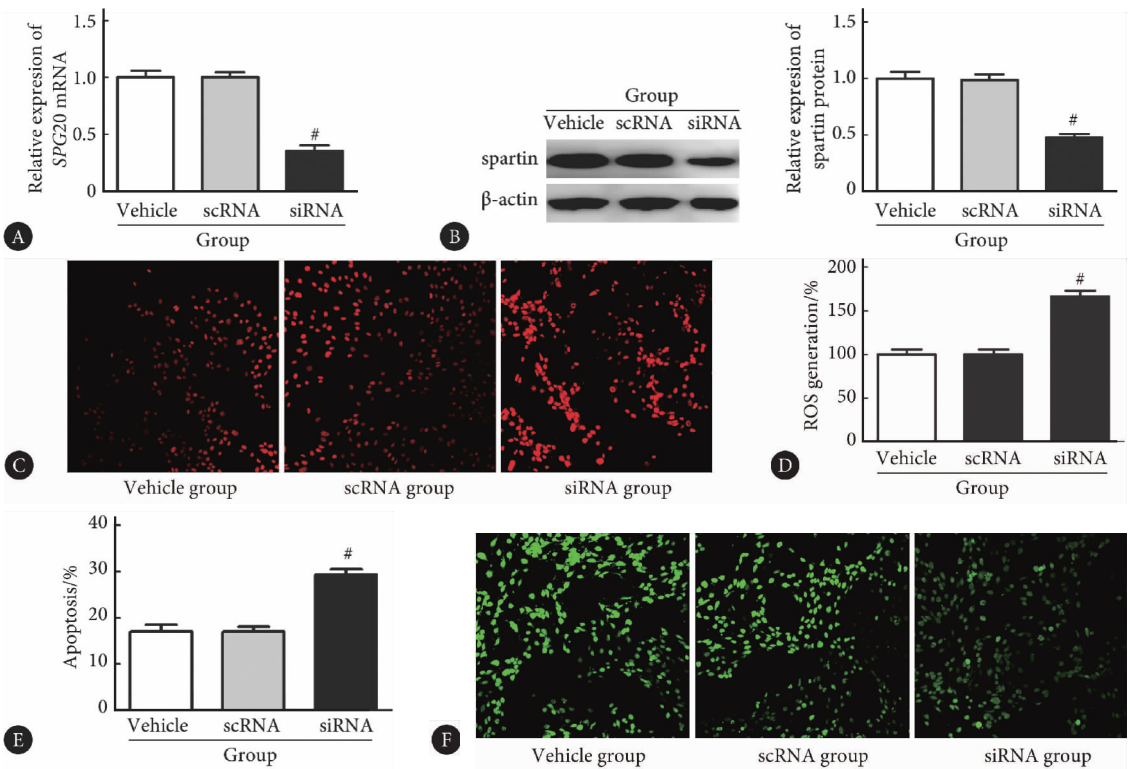


图 3 下调 spartin 对高糖性小鼠 CMECs 氧化应激、凋亡和 NO 生成的影响

Fig 3 The effect on the oxidative stress, apoptosis and NO production of mice CMECs with downregulated spartin in high glucose
A, B, C, D, E, F: Denotes the same as that in fig 2. $\# P < 0.05$, vs. scRNA and vehicle groups

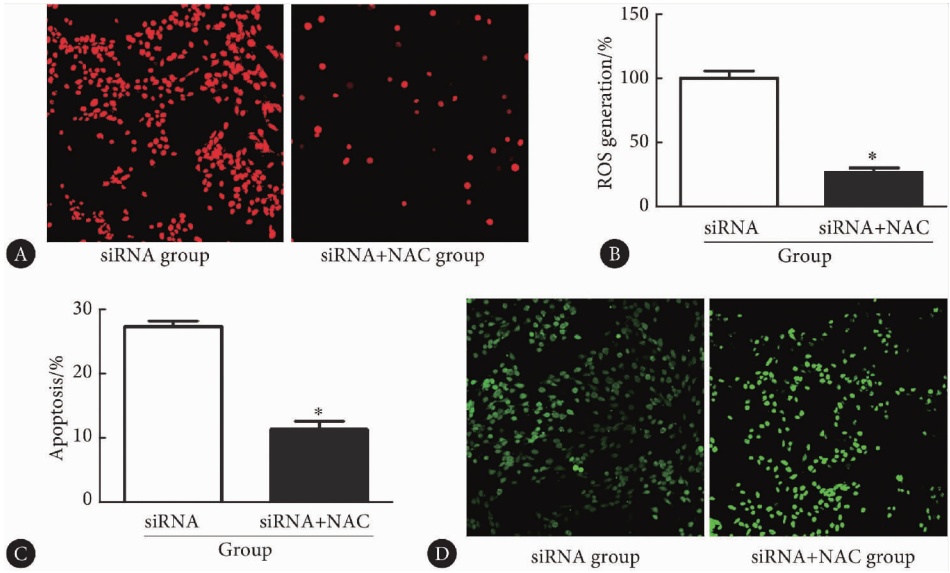


图 4 NAC 对高糖性 CMECs 细胞 spartin 表达下调后氧化应激损伤的影响

Fig 4 The effect of NAC on the mice CMECs injury caused by downregulating spartin via oxidative stress in high glucose

A; ROS content by DHE ($\times 200$); B; ROS content by ELISA; C; Statistical results of flow cytometry ($\times 200$); D; NO content by NO fluorescent probe. * $P < 0.05$, vs. siRNA group

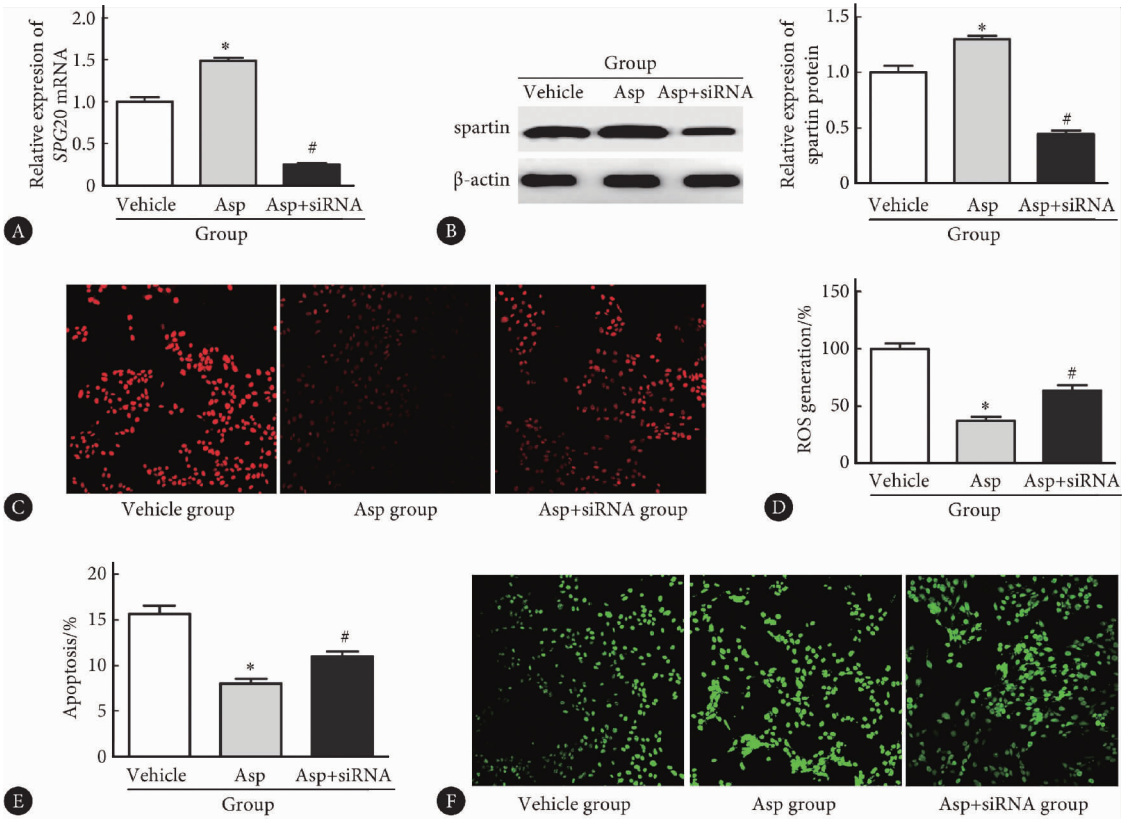


图 5 Asp 对高糖性 CMECs spartin 表达下调氧化应激损伤的影响

Fig 5 Effect of Asp on injury caused by oxidative stress of CMECs with downregulated spartin expression in high glucose

A; Expression of SPG20 mRNA; B; Expression of spartin protein; C; ROS content by DHE ($\times 200$); D; ROS content by ELISA; E; Statistical results of flow cytometry; F; NO content by NO fluorescent probe ($\times 200$). * $P < 0.05$, vs. vehicle group; # $P < 0.05$, vs. Asp group

2.6 Asp 对 2 型糖尿病模型小鼠微血管损伤的影响

心脏超声检查发现, T2DM + Asp 组小鼠较

T2DM 组小鼠 E/A 值上升($P<0.05$,图 6A)。扫描电子显微镜观察心脏微血管内皮变化发现, Asp 增加了小鼠心脏微血管内皮的光滑性和完整性

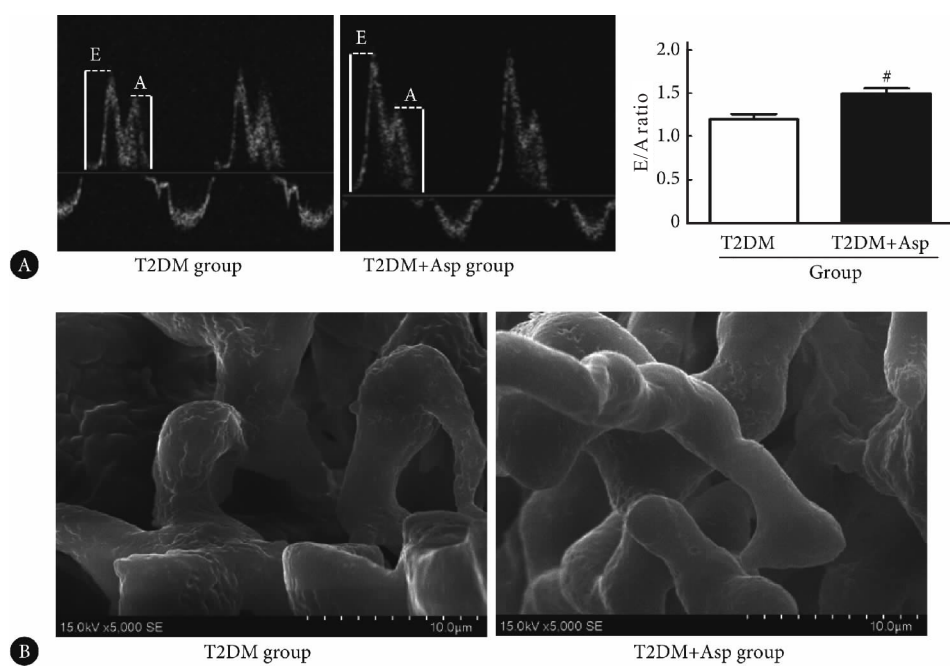


图 6 Asp 对 2 型糖尿病模型小鼠心脏功能、微血管内皮的影响
Fig 6 Effect of Asp on cardiac function and microvascular endothelium in type 2 diabetic mice
A: Echocardiography; B: Scanning electron microscopy. # $P<0.05$, vs. T2DM group

($P<0.05$,图 6B)。

3 讨论

糖尿病性心肌病是糖尿病患者心血管系统的重要并发症,会严重损害患者的心脏功能^[9],影响患者生命质量。心脏微血管主要由单层内皮细胞构成,是心肌血液供应和心肌细胞营养交换的部位,在糖尿病心肌病中发挥着重要的作用^[10],因此,全面揭示糖尿病患者心脏微血管损伤的发病机制对于糖尿病心肌病的防治具有十分重要的意义。spartin 是由 SPG20 基因编码的蛋白质^[11],LU 等^[2]已经确定 spartin 依赖于其 C-末端区域定位于线粒体内部。研究发现 spartin 的下调将导致细胞线粒体肿胀和对氧化损伤的敏感性增加^[12]。故有必要探究 spartin 在高糖诱导的小鼠 CMECs 损伤中的内在病理机制。本研究结果发现,30 mmol/L 葡萄糖可诱导 CMECs 的 SPG20 mRNA 及 spartin 蛋白表达降低,提示 spartin 在糖尿病中扮演着重要的角色。本研究结果发现,下调 spartin 表达可引起 CMECs 凋亡增加,NO 生成减少,表明 spartin 可能参与了高糖诱导的小鼠 CMECs 损伤,并且 spartin 在高糖性

CMECs 损伤中具有保护作用。这与 RING 等^[13]的研究基本一致。相反,上调 spartin 表达对高糖诱导的 CMECs 损伤有相反的作用,表明 spartin 可能是糖尿病心血管并发症防治的新靶点。

许多证据表明,氧化应激是糖尿病心血管损伤的重要作用机制^[9]。高血糖可诱导 ROS 的产生和抗氧化剂防御之间的失衡,导致氧化应激产生,从而导致生物分子,如脂质、蛋白质和 DNA 被氧化,丧失其生物学功能,造成内环境紊乱,从而影响细胞和组织的正常生物学功能^[14]。本研究发现,下调 spartin 可导致 ROS 的生成增加,这与 TRUONG 等^[15]的研究基本一致,为进一步验证 spartin 在高糖诱导的小鼠 CMECs 损伤中的作用机制,通过 NAC 清除 ROS, CMECs 的凋亡率降低,NO 生成增加,表明 spartin 是通过抑制 ROS 的生成减轻高糖诱导的 CMECs 损伤,氧化应激反应加剧是 spartin 缺失所致高糖性内皮损伤的内在机制。这与 MILEWSKA 等^[12]的研究一致。研究表明 spartin 在维持线粒体膜电位方面发挥作用。具体而言,spartin 的下调将导致线粒体膜去极化、ROS 增加,破坏的线粒体膜电位将减少 ATP 产生,并最

终导致细胞死亡。因此,为了减轻高糖对小鼠 CMECs 的氧化应激损伤,我们进一步探讨了 Asp 在其中发挥的保护作用及其作用机制。

Asp 是一种含 140 个氨基酸的蛋白质,主要由 FBN1 编码,是 profibrillin 的 C 末端切割产物。研究发现 Asp 是一种主要富含于白色脂肪组织的新型激素^[4],可在禁食期间达到峰值,通过 G 蛋白-cAMP-PKA 通路调节肝脏葡萄糖的释放。其对慢性炎症也有改善作用。最近研究报道在 FBN1 敲低的老鼠中,循环 Asp 浓度降低导致葡萄糖稳态受损,促炎症细胞因子升高导致炎症形成,进而导致疾病的发生^[16]。因此,增加 Asp 的活性或含量可以为 2 型糖尿病的治疗提供新潜力^[4]。本研究结果发现,在高糖基础上用 Asp 处理后,CMECs 的 SPG20 mRNA 和 spartin 蛋白表达均增加,提示 spartin 是 Asp 的作用靶点。此外,我们发现 Asp 作用下 CMECs ROS 生成减少,细胞损伤减轻(凋亡率降低,NO 生成增加),提示 Asp 可对高糖状态下小鼠 CMECs 发挥保护作用,而这种保护作用机制可能是通过增加 spartin 的表达,抑制小鼠 CMECs 的氧化应激反应发挥作用。为了进一步验证 Asp 和 spartin 的因果关系,我们在下调 spartin 的基础上给予 Asp 干预后发现,Asp 减少 ROS 生成、减少 CMECs 的凋亡、并增加 CMECs 中 NO 的生成的效应被部分逆转,证实了 Asp 是通过激活 CMECs 的 spartin 途径发挥保护作用。在体内实验中,我们通过用 Asp 干预 2 型糖尿病的小鼠后发现,Asp 可以改善 2 型糖尿病小鼠的心脏舒张功能和增加心脏微血管内皮的完整性和光滑性,这证实了 Asp 在 2 型糖尿病动物心脏微血管内皮上的保护作用。

综上所述,本研究首次证实了 spartin 在糖尿病中的作用,并揭示了 Asp/spartin 信号通路能够抑制 CMECs 内的氧化应激反应,从而改善糖尿病心脏微血管损伤,为糖尿病的治疗提供了理论依据。但本研究主要开展的是细胞实验,在后期的实验中,我们将引进 SPG20 基因敲除小鼠,进一步探讨 Asp 在 2 型糖尿病小鼠心脏微血管内皮损伤中的保护作用。

参 考 文 献

- [1] ZHOU H, WANG S, ZHU P, *et al.* Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. *Redox Biol*, 2018, 15: 335-346.
- [2] LU J, RASHID F, BYRNE P C. The hereditary spastic paraplegia protein spartin localises to mitochondria. *J Neurochem*, 2006, 98(6): 1908-1919.
- [3] RENVOISE B, STADLER J, SINGH R, *et al.* Spg20^{-/-} mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(16): 3604-3618.
- [4] ZHANG L, CHEN C, ZHOU N, *et al.* Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clin Chim Acta*, 2019, 489: 183-188.
- [5] ROMERE C, DUERRSCHMID C, BOURNAT J, *et al.* Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell*, 2016, 165(3): 566-579.
- [6] ACARA A C, BOLATKALE M, KIZILOGLU İ, *et al.* A novel biochemical marker for predicting the severity of acute coronary syndrome with unstable angina pectoris: asprosin. *Am J Emerg Med*, 2018, 36(8): 1504-1505.
- [7] 朱丽雯, 谭延振, 罗文平, 等. Asprosin 的表达纯化及其对小鼠在体心脏功能的作用. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4): 368-372.
- [8] 曹星华. 消退素 D1 对 2 型糖尿病小鼠骨骼肌 TLR4 及 GluT-4 影响的研究. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [9] DING M, FENG N, TANG D, *et al.* Melatonin prevents Drp1-mediated mitochondrial fission in diabetic hearts through SIRT1-PGC1 α pathway. *J Pineal Res*, 2018, 65(2): e12491 [2019-01-06]. <https://doi.org/10.1111/jpi.12491>.
- [10] ZHOU H, ZHANG Y, HU S, *et al.* Melatonin protects cardiac microvasculature against ischemia/reperfusion injury via suppression of mitochondrial fission-VDAC1-HK2-mPTP-mitophagy axis. *J Pineal Res*, 2017, 63(1): e12413 [2019-01-06]. <https://doi.org/10.1111/jpi.12413>.
- [11] BIZZARI S, HAMZEH A R, NAIR P, *et al.* Novel SPG20 mutation in an extended family with Troyer syndrome. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(6): 2155-2159.
- [12] MILEWSKA M, BYRNE P C. Different expression levels of spartin cause broad spectrum of cellular consequences in human neuroblastoma cells. *Cell Biol Int*, 2015, 39(9): 1007-1015.
- [13] RING J, ROCKENFELLER P, ABRAHAM C, *et al.* Mitochondrial energy metabolism is required for lifespan extension by the spastic paraplegia-associated protein spartin. *Microbial Cell*, 2017, 4(12): 411.
- [14] DE MELLO A H, COSTA A B, ENGEL J D G, *et al.* Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci*, 2018, 1(1): 26-32.
- [15] TRUONG T, KARLINSKI Z A, O' HARA C, *et al.* Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of spartin. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130455 [2019-01-06]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130455>.
- [16] DONMA M M, DONMA O. Asprosin: Possible target in connection with ghrelin and cytokine network expression in the post-burn treatment. *Med Hypotheses*, 2018, 118: 163-168.

(2019-04-03 收稿, 2019-06-11 修回)

编辑 沈 进