

## 论 著

## 丙氨酰谷氨酰胺二肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304缺氧缺糖损伤的保护作用

赵敬湘<sup>1</sup>, 赵玉芬<sup>2</sup>, 怀文辉<sup>1</sup>, 吴 振<sup>2</sup>, 唐 果<sup>2</sup>, 王字玲<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850; 2 厦门大学化学化工学院  
化学与生物化学重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要** 目的 观察丙氨酰谷氨酰胺二肽(丙谷二肽)对人脐静脉内皮细胞 ECV304缺氧缺糖损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机制。方法 在以低氧低糖培养人脐静脉内皮细胞 ECV304为细胞损伤模型的基础上,以噻唑蓝(MTT)比色法优化丙谷二肽的最佳作用浓度,显微镜观察细胞形态变化,流式细胞术检测线粒体膜电位。自动生化分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH)活性,比色法检测谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的浓度,RT-PCR方法检测细胞内肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、热休克蛋白70(HSP70)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)和缺氧诱导因子-1(HIF-1) mRNA的表达。结果 丙谷二肽能够使细胞在缺氧缺糖应激下存活率增加,线粒体损伤减轻,LDH分泌降低,GSH产生增加,HSP70和 HIF-1 mRNA的表达增加。结论 丙谷二肽对细胞缺氧缺糖损伤有明显的保护作用,这种保护作用可能与保护线粒体、维持细胞膜结构完整、上调细胞中应激基因 HSP70和 HIF-1 的表达有关。

**关键词:** 丙谷二肽;缺氧;缺糖;人脐静脉内皮细胞

**中图分类号:** R962.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-0440(2009)01-0006-07

## Protective effect of alanyl-glutamine dipeptide against hypoxic/ hypoglycemic injury in human umbilical vein vascular endothelial ECV304 cells

ZHAO Jing-xiang, ZHAO Yu-fen, HUA Wen-hui, WU Zhen, TANG Guo, WANG Zi-ling

(1. Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2 Department of Chemistry and the Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of alanyl-glutamine dipeptide (Ala-Gln) on hypoxia/hypoglycemia injury in cultured human umbilical vein vascular endothelial cell line (ECV304). **Methods** ECV304 cells were cultured in normal and hypoxia with hypoglycemia condition. Firstly, the optimal concentration of Ala-Gln exerting protective effect against hypoxic/hypoglycemic injury was determined by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Then, the changes in mitochondrial membrane potential (MMP) were measured by flow cytometry. The morphological changes of the cells were observed with light microscope. Furthermore, the lactate dehydrogenase (LDH) release from ECV304 was measured with automatic biochemistry analyses, and the reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) production was determined by colorimetric analyses. In addition, the ex-

收稿日期: 2008-09-01

作者简介: 赵敬湘,女,助理研究员,研究方向:病理生理学, Tel: 010-66931970; E-mail: zhjingxiang@163.com

\*通讯作者: 王字玲,女,研究员,硕士生导师,研究方向:免疫学, E-mail: wangzl@nic.bmi.ac.cn

pression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), heat shock protein 70 (HSP70), glucose-regulated protein 78 (GRP78) and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mRNA was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Administration of Ala-Gln in the concentration of  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  could protect ECV304 cells against hypoxic and hypoglycemic injury. The production of GSH and the expression of HSP70 and HIF-1 mRNA were increased, while the release of LDH was decreased. **Conclusion** Significant benefit of Ala-Gln dipeptide on hypoxia/hypoglycemia injury in ECV304 cells is observed, and the potential mechanisms involved might be correlated with protecting mitochondrion function, maintaining the integrity of cellular membrane, and enhancing the expression of stress protein HSP70 and HIF-1.

**Key words:** alanyl-glutamine; hypoxia; hypoglycemia; human umbilical vein vascular endothelial cells

谷氨酰胺是体内含量最为丰富的氨基酸之一。作为机体必需氨基酸,对多种器官及组织细胞具有重要而独特的代谢功能<sup>[1]</sup>。作为谷氨酰胺的供体,丙氨酰-谷氨酰胺二肽(alanyl-glutamine dipeptide,丙谷二肽)可解决其溶解度低及性质不稳定的缺点,目前主要应用于手术创伤的肠外和肠内营养补充<sup>[2]</sup>、组织器官缺血再灌损伤的保护<sup>[3]</sup>、改善危重病患者免疫功能<sup>[4]</sup>等。为了深度开发丙谷二肽的应用领域,本实验在细胞水平研究了丙谷二肽在缺氧缺糖情况下对细胞的保护作用,初步探讨其作用机制,为丙谷二肽在失血性休克的液体复苏、器官组织保存等方面应用的可能性提供依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 ECV304购自中国科学院上海分院细胞研究所。正常培养条件: ECV304细胞采用含 10%新生牛血清的高糖 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、20%  $\text{O}_2$ 和饱和湿度的培养箱中培养。缺氧缺糖培养条件: ECV304细胞采用含 1%新生牛血清的无糖 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 和 1%  $\text{O}_2$ 的低氧培养箱中培养。

### 1.2 药物、试剂与仪器

培养基和新生牛血清为美国 Gibco 公司产品;丙谷二肽由厦门大学化学系提供;碘化丙啶(propidium iodide, PI)、噻唑蓝(MTT)和 JC-1 购自 Sigma 公司;一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自北京中生北控生物科技股份有限公司;TRzol 试剂购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒(AMV)为 TaKaRa 公司产品。酶联免疫检测仪(日本 Bio-Rad 公司,型号 550),生化分析仪

(法国 Secoman 公司,型号 BASIC 70VB0358), PCR 仪(美国 MJ 公司,型号 PCT-100), FACS Calibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

## 2 方法

### 2.1 MTT法确定丙谷二肽的有效作用浓度

用 0.25%胰酶消化处于对数生长期的 ECV304 细胞,用培养液重悬细胞,调整细胞浓度,接种于 96 孔板( $5 \times 10^4$ 个/孔)培养 24 h 后,分别用含不同浓度丙谷二肽的培养液,在低氧低糖和正常氧糖的条件下培养。细胞培养 24 h 后每孔加入 MTT 液 10  $\mu\text{L}$ ,轻微震荡 5 min,放入培养箱中继续培养 2 h。2 h 后吸尽上清,每孔加二甲亚砷溶液 100  $\mu\text{L}$ ,再稍震荡溶解,采用酶联仪比色法测量波长 490 nm 处的吸光度值( $A_{490\text{nm}}$ )。每组做 5 个平行孔。

### 2.2 细胞分组与形态观察

ECV304 细胞常规复苏及传代,细胞计数并稀释至  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ,接种于 25  $\text{cm}^2$ 培养瓶中。随机分组为正常对照组: 1%新生牛血清高糖 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、20%  $\text{O}_2$ 的恒温培养箱中培养;损伤组: 1%新生牛血清无糖 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$ 的低氧培养箱中培养;药物组: 分别含 0.025, 0.05 和 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙谷二肽的 1%新生牛血清无糖 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、1%  $\text{O}_2$ 的低氧培养箱中培养;以上分组培养条件下培养 20 h 后,在显微镜下观察细胞形态变化并进行相关实验研究。

### 2.3 丙谷二肽对线粒体膜电位的影响

实验分组如上,收集细胞, PBS 漂洗 1 次,然后与  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  JC-1 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min, PBS 洗 2 次,在 FACS Calibur 流式细胞仪上进行检测。图像采用 Cell Quest 软件进行分析。

### 2.4 丙谷二肽对细胞 LDH, GSH和 MDA的影响

ECV304细胞在以上分组培养条件下培养 20 h 后,分别取上清和细胞超声裂解液(收集细胞,加入 200 μL 双蒸水超声裂解,收集上清)进行测定,依照试剂盒说明书测定细胞培养上清液和细胞裂解液中的 LDH, GSH 和 MDA 浓度变化。LDH 释放率 = 实验组 / 对照组 × 100%。

### 2.5 丙谷二肽对相关细胞因子 mRNA 表达的影响

收集的细胞加入 1 mL TRIzol 细胞裂解液,提取细胞总 RNA,测定 A<sub>260nm</sub> 和 A<sub>280nm</sub> 值以计算纯度。取 2 μg RNA 在 AMV 逆转录酶作用下进行逆转录获得 cDNA。以 10 ng cDNA 为模板,进行半定量 PCR 反应。设置 PCR 循环参数:预变性 94 °C 5 min, 94

30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 25 个循环后延伸 72 °C 7 min,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶扫描仪进行 DNA 电泳条带强度分析,计算条带相对灰度(与 GAPDH 相比),分析软件采用 Quantity one 3.0。肿瘤坏死因子(TNF-α),白细胞介素 6(IL-6),热休克蛋白 70(HSP70),葡萄糖调节蛋白(GRP78),缺氧诱导因子(HIF)-1 及阳性对照 GAPDH 的 PCR 引物,采用 Primer 5.0 软件设计,由北京博迈德生物技术公司合成(表 1)。

### 2.6 统计方法

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用 t 检验, P < 0.05 为有统计学显著意义。

## 3 结果

### 3.1 MTT法测定丙谷二肽的有效浓度

正常培养条件下 ECV304 的 A<sub>490nm</sub> 值均明显高于缺氧缺糖条件,表明缺氧缺糖使细胞的生长活性下降(图 1)。从图 1 的结果可见,当丙谷二肽浓度小于 0.016 mol · L<sup>-1</sup> 时,对细胞活性没有明显影响,但随着丙谷二肽浓度的增多,细胞生长活性逐渐下降,在丙谷二肽浓度为 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 时,细胞活性下降最明显,但与缺氧缺糖条件下细胞的 A<sub>490nm</sub> 值相比仍较高。在缺氧缺糖条件下,随着丙谷二肽浓度的增加, A<sub>490nm</sub> 值逐渐增加,仅在丙谷二肽浓度过大,大于 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 时, A<sub>490nm</sub> 值才降低,提示丙谷二肽在 0.01 ~ 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 浓度范围内可能有拮抗缺糖缺氧对细胞的损伤作用。因此以下实验选用的丙谷二肽浓度为 0.025, 0.05 和 0.1 mol · L<sup>-1</sup>。

Tab 1 Sequences of human-specific primers for amplified genes

Nomenclature	Primer	Size/bp
TNF-α	S: 5'-CCGAGTCTGGGCAAGGCTA-3'	309
	AS: 5'-CGGATGTCGAAACTAGGGAC-3'	
IL-6	S: 5'-GAGGAGACTTGCCTGGTGAA-3'	334
	AS: 5'-CATCGTACCCGTGGAGTCTA-3'	
HIF-1	S: 5'-GACAA GCCACCTGAGGAGAG-3'	381
	AS: 5'-CAAGCGTAGAACTATTCGGG-3'	
HSP70	S: 5'-CGCGACCTGAACAAAGAGCAT-3'	368
	AS: 5'-GTCTAGCTCCACTGGAAAGCT-3'	
GRP78	S: 5'-TGGGTCGACTCGAATCCAAAG-3'	513
	AS: 5'-GGTTCATGGTCTTAGCGGACTG-3'	
GAPDH	S: 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'	430
	AS: 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-3'	

S: sense; AS: anti-sense

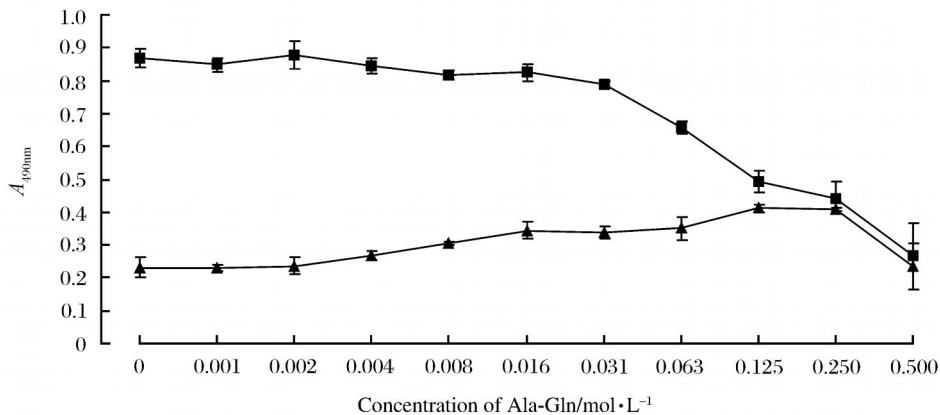
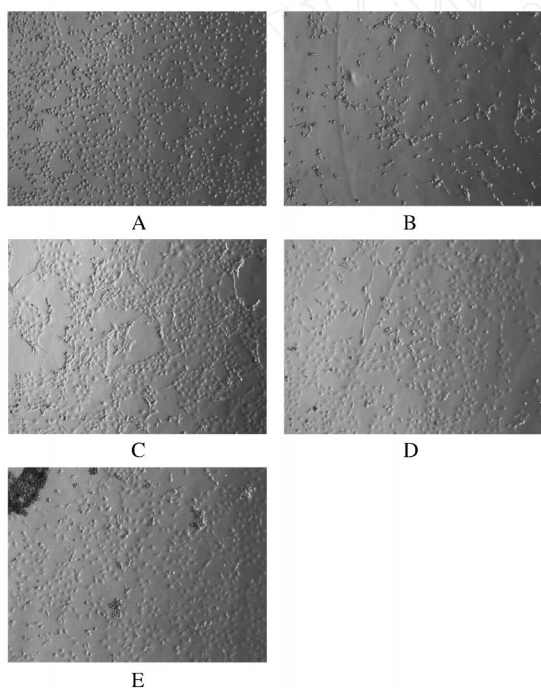


Fig 1 Cell viability of ECV304 cultured in the normal and hypoxia / hypoglycemia conditions treated with different concentrations of Ala-Gln. Normal condition; Hypoxia/hypoglycemia

### 3.2 细胞形态观察

在正常培养条件下 ECV304细胞呈单层铺路石状生长(图 2A),细胞饱满,间隙均匀。但在低氧低糖条件下培养 20 h后,大部分细胞回缩,体积变小,折光度增加,细胞间隙明显增宽,细胞大量脱落,悬浮于培养液中,贴壁细胞胞体狭长并有突起伸向周围细胞,细胞伪足相互连接成网状(图 2B),细胞死亡严重。而加入  $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙谷二肽后,细胞状况明显好转,死亡数目明显减少,但仍有少许狭长细胞(图 2C)。当丙谷二肽浓度达到  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞状态良好,细胞饱满,间隙均匀(图 2D)。当丙谷二肽浓度达到  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,虽然细胞状态良好,但细胞贴壁不牢,培养皿边缘细胞成片卷起,且有细胞成片状漂浮(图 2E)。如图 2所示(40倍放大)。说明  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙谷二肽对 ECV304细胞有明显的保护作用。



**Fig 2 Cellular morphology of ECV304 cell (×40).** A: ECV304 cells were cultured for 20h in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 1% new born bovine serum in a 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C; B, C, D, E: ECV304 cells were cultured for 20h in DMEM (without glucose) supplemented with 1% new born bovine serum in a 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C, and the different concentration of Ala-Gln ( $0.025, 0.05$  and  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were added in C, D, E groups, respectively.

### 3.3 丙谷二肽对缺氧缺糖细胞线粒体膜电位的保护作用

线粒体跨膜电位 (MMP)是指线粒体内、外膜之间的电位差,能够反映线粒体膜的通透性变化,从而体现线粒体的损伤程度。JC-1是检测 MMP的最佳方法。在线粒体膜电位较高时,JC-1聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1为单体,可以产生绿色荧光。这样就可以非常方便地通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。流式细胞术的检测结果见表 2。缺氧缺糖处理后,细胞红、绿荧光值的比率和正常对照组比较有明显的下降,而加入不同浓度的丙谷二肽后,能够在一定程度上减少比率的下降,和损伤组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。提示丙谷二肽通过保护线粒体或维持线粒体膜电位来抵抗缺氧缺糖损伤。

**Tab 2 Effect of Ala-Gln on mitochondrial membrane potential changes ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

Group	Concentration of Ala-Gln/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Ratio (red/green fluorescence)
Control	0	2.062 ± 0.102
Hypoxia/ hypoglycemia	0	1.805 ± 0.087
Ala-Gln	0.025	1.871 ± 0.074
	0.05	2.146 ± 0.113*
	0.1	1.915 ± 0.090

MMP was assessed by JC-1 staining. Briefly, ECV304 cells were stained with  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  JC-1 for 20 min at 37 °C. Fluorescence intensity was determined in Polstar at 535 and 595 emission wavelength (with excitation at 490 nm). The results were showed in mean JC-1 red /green fluorescence ratio. \*  $P < 0.05$ , compared with the hypoxia/hypoglycemia group.

### 3.4 乳酸脱氢酶、谷胱甘肽和丙二醛测定

由于细胞培养上清中 GSH和 MDA的分泌量较少,因此对细胞超声裂解后,收集上清进行测定,考察浓度变化。表 3的结果显示,缺氧缺糖可使细胞释放 LDH增加,表明细胞膜损伤严重。而丙谷二肽可减少缺氧缺糖引起的 LDH释放,且呈剂量依赖性。当丙谷二肽浓度为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,LDH水平下降最为显著。缺氧缺糖可使细胞 GSH释放量减少,丙谷二肽可增加 GSH的产生,与缺氧缺糖组相比增加明显。缺氧缺糖培养可使细胞 MDA分泌量增加,但与正常组相比差异不显著,加入丙谷二肽

MDA分泌量也轻微下降,但没有明显差异(数据略)。

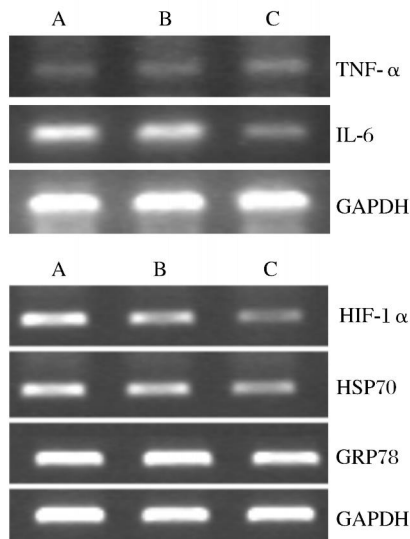
**Tab 3 Influence of Ala-Gln to the release of LDH and GSH from ECV304 cells( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )**

Group	Concentration of Ala-Gln/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ %	GSH/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Control	0	100 $\pm$ 19 <sup>*</sup>	181.1 $\pm$ 2.6 <sup>#</sup>
Hypoxia/ hypoglycemia	0	686 $\pm$ 54.	150.2 $\pm$ 3.3
Ala-Gln	0.025	382 $\pm$ 37 <sup>*</sup>	161.9 $\pm$ 4.2 <sup>#</sup>
	0.05	112 $\pm$ 22 <sup>*</sup>	167.8 $\pm$ 6.3 <sup>#</sup>
	0.1	512 $\pm$ 62 <sup>*</sup>	150.2 $\pm$ 16.8

<sup>\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with the hypoxia/hypoglycemia group. <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared with the hypoxia/hypoglycemia group.

### 3.5 丙谷二肽对炎症因子 mRNA 表达的影响

由图 3 显示,从炎症因子 TNF- $\alpha$  和 L-6 的 mRNA 表达变化可见,缺氧缺糖使 TNF- $\alpha$  mRNA 表达减少, L-6 mRNA 表达增加,丙谷二肽的加入对 TNF- $\alpha$  和 L-6 的 mRNA 表达没有明显改变。对于应激因子 HSP70、GRP78 和 HIF-1 mRNA 表达可见,GRP78 没有明显变化,HSP70 和 HIF-1 mRNA 在缺氧缺糖情况下表达增加,丙谷二肽的加入使其进一步增加(表 4)。



**Fig 3 Effect of Ala-Gln on the expression of TNF- $\alpha$ , L-6, HSP70, GRP78 and HIF-1 mRNA detected by RT-PCR** Lane A: ECV304 cells were cultured in hypoxic/ hypoglycemic condition with 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ala-Gln; land B: ECV304 cells were cultured in hypoxia/ hypoglycemia condition without Ala-Gln; lane C: ECV304 cells were cultured in normal condition.

**Tab 4 The relative value of integral optical density of TNF- $\alpha$ , L-6, HIF-1, HSP70 and GRP78 electrophoresis bands in different groups, compared with GAPDH( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

Nomenclature	Ala-Gln	Hypoxia /hypoglycemia	Control
TNF- $\alpha$	0.078 $\pm$ 0.005	0.079 $\pm$ 0.009	0.091 $\pm$ 0.010
L-6	0.307 $\pm$ 0.010	0.327 $\pm$ 0.036	0.127 $\pm$ 0.011
HIF-1	0.452 $\pm$ 0.039 <sup>*</sup>	0.383 $\pm$ 0.042 <sup>*</sup>	0.179 $\pm$ 0.021
HSP70	0.402 $\pm$ 0.032 <sup>*</sup>	0.388 $\pm$ 0.019 <sup>*</sup>	0.204 $\pm$ 0.017
GRP78	0.896 $\pm$ 0.075	0.958 $\pm$ 0.088	0.827 $\pm$ 0.105
GAPDH	1.000 $\pm$ 0.021	1.000 $\pm$ 0.025	1.000 $\pm$ 0.018

<sup>\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with control

## 4 讨论

ECV304细胞为人脐静脉血管内皮细胞株,常被用于研究各种因素对血管损伤的病理机制及药物对血管内皮的保护作用<sup>[5]</sup>。在本研究中选用 ECV304细胞制作缺氧缺糖的细胞模型。首先,采用 MTT法考察了丙谷二肽在正常培养条件下对细胞的毒性,及其在缺氧缺糖条件下对细胞的保护作用。结果表明,当丙谷二肽浓度为 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对缺氧缺糖损伤的细胞有明显的保护作用。从细胞形态上来看,缺氧缺糖培养的细胞死亡严重,而丙谷二肽的加入几乎使细胞恢复到正常状态。然后,从三方面探讨了丙谷二肽对细胞缺氧缺糖损伤的可能的保护机制:(1)对细胞膜稳定性的影响;(2)抗自由基损伤的作用;(3)对应激蛋白及炎症因子表达的影响。

线粒体是能量转换的主要场所,MMP是进行氧化磷酸化维持其功能的先决条件。线粒体膜电位的变化能够反映线粒体膜的通透性变化,从而体现线粒体的损伤程度。本实验通过 JC-1,一种特异性的阳离子荧光染料,来检测线粒体膜电位的变化。结果表明丙谷二肽能够在一定程度上减少 MMP的下降,与损伤组比较有显著性差异。LDH是机体能量代谢中重要的一种酶。正常细胞几乎不从胞浆中释放 LDH,当生物膜受损后,LDH容易从胞浆释放出来,其释放量的多少可反映细胞膜的损伤程度。本研究表明丙谷二肽的加入能够明显降低缺氧缺糖条件下细胞 LDH的分泌。以上结果提示丙谷二肽能够稳定细胞内的膜成分,降低细胞通透性,从而保护血管内皮细胞的缺氧缺糖损伤。

谷胱甘肽是强还原剂,本实验室研究表明丙谷二肽的加入能够明显提高 ECV304 细胞内 GSH 含量,而谷胱甘肽能够清除体内过氧化物,减轻氧自由基介导的细胞损伤,稳定细胞膜和蛋白质结构,也有利于受损细胞的修复和功能恢复,提高机体抗氧化能力。MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物。MDA 水平常常可反映脂质氧化的程度,间接反映出细胞受损的情况。本实验测定了丙谷二肽对缺氧缺糖培养条件下细胞分泌 MDA 的影响,结果表明,缺氧缺糖可使 MDA 释放量增加,加入丙谷二肽可以减少 MDA 的释放,但三组之间没有明显差别。原因可能是细胞分泌 MDA 量太少,容易产生测定误差。提示丙谷二肽可通过提高 GSH 的表达来减轻自由基对细胞的损伤。

有研究表明,丙谷二肽中的主要作用成分谷氨酰胺对炎症因子的产生有一定的抑制作用。Coeffier 等<sup>[6]</sup>认为,谷氨酰胺在各种组织中可调节细胞因子的生成,减少离体组织中 L-6 的生成,对肠道组织前炎症因子的生成具有特殊的抑制作用。Aossa 等<sup>[7]</sup>指出,炎症细胞因子在感染、严重并发症的发病机制中有重要作用。TNF- 和 L-10 在完全胃肠外营养组上升,在谷氨酰胺组受到抑制;给予(经口)谷氨酰胺可有效防止肠系膜血管单核细胞活性,从而避免过量细胞因子的产生。同样,Yassad 等<sup>[8]</sup>通过动物实验得到相似结论,谷氨酰胺的补充阻止了 L-6 mRNA 的表达,抑制 L-6 的生成。本研究结果显示,缺氧缺糖使 TNF- mRNA 表达减少, L-6 mRNA 表达增加。丙谷二肽的加入对 TNF- 和 L-6 的 mRNA 表达没有明显改变。提示丙谷二肽对 ECV304 细胞缺氧缺糖损伤的保护作用与 TNF- 和 L-6 没有直接关系。

HSP 是一组高度保守的多肽,普遍存在于生物体内。目前研究较多的为 HSP70 家族,是 HSP 中最保守、最主要、含量最丰富的一类。HSP 被诱导产生的因素有很多,包括缺血、缺氧、高温等刺激。它的诱导表达作为一种对外界应激的保护性反应,可帮助细胞维持代谢、结构完整。如缺氧时 HSP70 在脑、肺、肾、肝等重要脏器组织中表达,能够减轻缺氧对组织的损伤程度<sup>[9,10]</sup>。有研究表明谷氨酰胺代谢与 HSP70 调节相关。缺少谷氨酰胺后,HSP70 在蛋白合成中降低最严重<sup>[11]</sup>。HIF-1 是近几年发现的

缺氧时细胞产生的一种核蛋白,是介导细胞对缺氧微环境进行适应性反应的关键性转录调控因子,能激活许多缺氧反应性基因的表达,使细胞、组织和机体产生一系列适应性反应,而在缺氧时得以生存。现已证实,在缺氧情况下,能够诱导 HIF-1 的大量表达,并对机体有明显的保护作用<sup>[12-14]</sup>。GRP78 也称为免疫球蛋白重链结合蛋白,是进化上高度保守的蛋白质,与 HSP70 有 60% 的同源性,广泛存在于内质网内,在低糖、缺氧等应激条件下合成量明显提高,并能协助蛋白质的折叠、装配和运输,还与许多疾病有关,因此被称为内质网分子伴侣。有研究表明,在缺氧条件下,诱导 GRP78 表达对细胞有明显的保护作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,缺氧缺糖对细胞 GRP78 mRNA 的表达没有明显改变,HSP70 和 HIF-1 mRNA 表达有所增加,丙谷二肽的加入使 HSP70 和 HIF-1 mRNA 的表达进一步增加。提示丙谷二肽对细胞的保护作用与上调细胞中应激基因 HSP70 和 HIF-1 的表达有关。

总之,本研究结果表明,丙谷二肽对细胞缺氧缺糖损伤有明显的保护作用,能够增强细胞活力,减少细胞凋亡。这种对细胞的保护作用可能与保护线粒体,维持细胞膜完整膜结构,上调细胞中应激蛋白 HSP70 和 HIF-1 的表达有关。

#### 参 考 文 献

- [1] Gismondo MR, Dragon L, Fassina MC, *et al* Immune stimulating effect of oral glutamine [J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43 (8): 1752 - 1754.
- [2] Wischmeyer PE Glutamine: role in gut protection in critical illness [J]. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9 (5): 607 - 612.
- [3] Jia CJ, Dai CL, Zhang X, *et al* L-alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12 (9): 1373 - 1378.
- [4] Kircher B, Eibl G, Enrich B, *et al* The role of L-alanyl-L-glutamine in the immune response *in vitro* [J]. *Wien Klin Wo Chenschr*, 2002, 114 (15 - 16): 702 - 708.
- [5] 李胜富, 蒋红梅, 李幼平, 等. 益生注射液对人内皮细胞缺氧再给氧损伤的拮抗机理研究 [J]. *华西医学报*, 2002, 33 (2): 215 - 219.
- [6] Coeffier M, Marion R, Leplingard A, *et al* Glutamine decreases interleukin-8 and interleukin-6 but not nitric oxide and prostaglandins production by human gut *in vitro* [J]. *Cytokine*, 2002, 18 (2): 92 - 97.

(下转第 43 页)

- man dipeptidyl peptidase in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation[J]. *Protein Sci*, 2004, 13(2): 412 - 421.
- [14] Qiao L, Baumann CA, Crysler CS, *et al* Discovery, SAR, and X-ray structure of novel biaryl-based dipeptidyl peptidase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(1): 123 - 128
- [15] Peters JU. 11 Years of cyanopyrrolidines as DPP- inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(6): 579 - 595.
- [16] Engel M, Hoffmann T, Wagner L, *et al* The crystal structure of dipeptidyl peptidase (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5063 - 5068.
- [17] Sankaranarayanan A. Thiazolidine-4-carbonitriles and analogs and their use as dipeptidyl-peptidase inhibitors [P]. World (PTC) Patent: WO2003084940, 2003-10-16
- [18] Fukuda Y, Asahina Y, Yokota K, *et al* Bicyclo derivatives [P]. World (PTC) Patent: WO 2005082847, 2005-09-09.
- [19] Fukushima H, Hirata A, Takahashi M, *et al* Synthesis and structure-activity relationships of potent 4-fluoro-2-cyanopyrrolidine dipeptidyl peptidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(7): 4093 - 4106
- [20] Haffner CD, McDougald DL, Reister SM, *et al* 2-Cyano-4-fluoro-1-thiovalpyrrolidine analogues as potent inhibitors of DPP- [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(23): 5257 - 5261.
- [21] Engel M, Hoffmann T, Manhart S, *et al* Rigidity and flexibility of dipeptidyl peptidase : crystal structures of and docking experiments with DPP [J]. *J Mol Biol*, 2006, 355(4): 768 - 783.
- [22] Szczepankiewicz BG, Kurukulasuriya R. Aromatic heterocycle-based DPP- inhibitors: xanthines and related structural types [J]. *Curr Top Med Chem*, 2007, 7(6): 569 - 578.
- [23] Himmelsbach F, Mark M, Eckhardt M, *et al* Xanthine derivative, production and use thereof as a medicament [P]. World (PTC) Patent: WO2002068420, 2002-09-06
- [24] Eckhardt M, Haeu1N, Himmelsbach F, *et al* 3,5-Dihydro-imidazo[4,5-d]pyridazin-4-ones: a class of potent DPP-4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(11): 3158 - 3162.
- [25] Kurukulasuriya R, Rohde JJ, Szczepankiewicz BG, *et al* Xanthine mimetics as potent dipeptidyl peptidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(24): 6226 - 6230.
- [26] Peters JU, Weber S, Ritter S, *et al* Aminomethylpyrimidines as novel DPP- inhibitors: a 10<sup>5</sup>-fold activity increase by optimization of aromatic substituents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(6): 1491 - 1493.
- [27] Oi S, Maezaki H, Suzuki N. Pyridine compounds as inhibitors of dipeptidyl peptidase [P]. World (PTC) Patent: WO 2005042488, 2005-05-12
- [28] Eckhardt M, Himmelsbach F, Langkopf E, *et al* New imidazoles and triazoles, their preparation, and their use as pharmaceutical compositions [P]. US Patent: US20060004074, 2006-01-05.
- [29] Yasuda N, Nagakura T, Yamazaki K, *et al* Pharmaceutical use of N-carbamoylazoles [P]. European Patent: EP1258480 A1, 2002-11-20.
- [30] Wallace MB, Feng J, Zhang Z, *et al* Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(7): 2362 - 2367.

## (上接第 11 页)

- [7] Aosasa S, Mochizuki H, Yamamoto T, *et al* A clinical study of the effectiveness of oral glutamine supplementation during total parenteral nutrition: influence on mesenteric mononuclear cell [J]. *JPEN*, 1999, 23(5): S41 - S44.
- [8] Yassad A, Lavoine A, Bin A, *et al* Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture [J]. *FEBS Lett*, 1997, 412(1): 81 - 84.
- [9] Chen H, Liu Z, Zhou Z, *et al* The regulatory effect of melatonin on expression and synthesis of heat shock protein 70 gene in neonatal rat models with cerebral hypoxic ischemia [J]. *Chin Med J*, 2003, 116(4): 558 - 564.
- [10] Tokyo1 C, Karao1man G, Bastug M. Effects of acute and adaptive hypoxia on heat shock protein expression in hepatic tissue [J]. *High Alt Med Biol*, 2005, 6(3): 247 - 255.
- [11] Eliassen MM, Brabec M, Gemer C, *et al* Reduced stress tolerance of glutamine-deprived human monocytic cells is associated with selective down-regulation of Hsp70 by decreased mRNA stability [J]. *J Mol Med*, 2006, 84(2): 147 - 158.
- [12] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, *et al* Hypoxia-inducible factor (HIF-1) : its protein stability and biological functions [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(1): 1 - 12.
- [13] Yanjun Z, Guangyu L, Bin F, *et al* Study of hypoxia-induced expression of HIF-1 $\alpha$  in retina pigment epithelium [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2007, 143(3): 323 - 327.
- [14] Shrivastava K, Shukla D, Bansal A, *et al* Neuroprotective effect of cobalt chloride on hypobaric hypoxia-induced oxidative stress [J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(3): 368 - 375.
- [15] Pan YX, Ren AJ, Zheng J, *et al* Delayed cytoprotection induced by hypoxic preconditioning in cultured neonatal rat cardiomyocytes: role of GRP78 [J]. *Life Sci*, 2007, 81(13): 1042 - 1049.