·基础研究·

# 4,4’-二异硫氰基芪-2,2’-二磺酸对高糖诱导心肌细胞损伤的保护作用

郭筱王，王 琳，沈明志，程 珂，杨 磊，何晓乐，王晓明*

（第四军医大学西京医院老年病科，西安 710032）

【摘 要】**目的** 探讨高糖诱导心肌细胞损伤过程中氯离子浓度的变化以及氯离子通道阻断剂4,4’-二异硫氰基芪-2,2’-二磺酸（DIDS）对受损心肌细胞的作用。**方法** 原代培养乳鼠心肌细胞，应用葡萄糖浓度为33mmol/L DMEM培养基，作用72h，构建心肌细胞损伤模型。实验分为对照组、高糖组、高糖+DIDS组和DIDS组。用MTT法检测细胞存活率，流式细胞仪检测细胞凋亡率，氯离子荧光探针（MQAE）检测细胞内氯离子浓度。**结果** 高糖作用下的心肌细胞存活率呈浓度及时间依赖性降低（$P < 0.05$），流式细胞仪检测显示受损心肌细胞以凋亡性损伤为主。MQAE检测结果显示，与对照组比较，高糖组细胞内氯离子浓度显著下降（$P < 0.05$）。心肌细胞存活率及细胞内氯离子浓度，DIDS组与对照组比较差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。与高糖组比较，高糖+DIDS组心肌细胞存活率显著升高，细胞内氯离子浓度下降明显减少，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 氯离子通道参与了高糖诱导的心肌细胞损伤过程，DIDS可在一定程度上减轻以凋亡为主的心肌细胞损伤。

【关键词】高糖；肌细胞，心脏；细胞凋亡；氯离子

【中图分类号】 R541；R587.1 【文献标识码】 A 【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00014

# Protective effect of 4,4’-diisothiocyanostilbene-2,2’-disulfonic acid on high glucose-induced cardiomyocyte injury

GUO Xiao-Wang, WANG Lin, SHEN Ming-Zhi, CHENG Ke, YANG Lei, HE Xiao-Le, WANG Xiao-Ming*

(Department of Geriatrics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi’an 710032, China)

【**Abstract**】**Objective** To investigate the change in chloride ion ($Cl^-$) concentration in high glucose-induced cardiomyocyte injury and the role of 4,4’-diisothiocyanostilbene-2,2’-disulfonic acid (DIDS), a chloride channel blocker, in the injury. **Methods** Primarily cultured neonatal rat cardiomyocytes were exposed to glucose (33mmol/L) for 72h to establish the cell model of high glucose-induced injury. The cardiomyocytes were randomly divided into 4 groups: control group, high glucose group, high glucose+DIDS group and DIDS group. MTT assay was applied to detect cell viability, and flow cytometry was used to measure cell viability and apoptosis. N-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE) was used to examine the intracellular chloride concentration. **Results** High glucose decreased the cardiomyocyte viability in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Cardiomyocyte injury was mainly in the form of apoptosis. Compared to control group, high glucose resulted in a significant decrease in intracellular $Cl^-$ in the cardiomyocytes ($P < 0.05$). There was no significant difference in cardiomyocyte viability and intracellular $Cl^-$ between the DIDS treated cells and control cells ($P > 0.05$). While, DIDS treatment improved the cardiomyocyte viability and attenuated the decrease in intracellular $Cl^-$ in cardiomyocytes after high glucose induction ($P < 0.05$). **Conclusion** $Cl^-$ is involved in the high glucose-induced cardiomyocyte injury. DIDS attenuates the injury which mainly presents as apoptosis.

【**Key words**】 high glucose; cardiomyocytes; apoptosis; chloride ion

*This work was supported by the National Natural Science Foundation of China* (81270169).

*Corresponding author: WANG Xiao-Ming, E-mail: xmwang@fmmu.edu.cn*

糖尿病的心血管并发症已成为糖尿病患者死亡的主要原因[1]。目前研究认为其主要致病机制是高糖激活了以活性氧（reactive oxygen species，ROS）为核心的线粒体途径及内质网应激途径等介导的心肌及血管内皮细胞损伤[2]。高糖在糖尿病心血管损伤中起到了重要作用[3]。氯离子是机体内最丰富的阴离子。心肌细胞膜和细胞器的氯离子通道在调节pH、细胞容积及渗透压等方面发挥重要作用，并与

收稿日期：2013−11−13；修回日期：2013−12−27

基金项目：国家自然科学基金(81270169)

通信作者：王晓明, E-mail: xmwang@fmmu.edu.cn

细胞迁移、增殖、分化及凋亡等密切相关[4]。研究发现，氯离子通道阻断剂4,4'-二异硫氰基芪-2,2'-二磺酸（4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'disulfonic acid，DIDS）能有效抑制死亡受体、线粒体和内质网应激途径诱导的细胞凋亡，挽救受损细胞[5-7]。然而，氯离子通道是否也参与了高糖诱导的心肌细胞损伤，阻断该通道对高糖诱导的心肌损伤有何影响，目前尚不清楚。本实验拟在高糖诱导的心肌细胞损伤模型基础上，通过观察细胞内氯离子浓度及细胞存活率，探讨DIDS在高糖诱导心肌细胞损伤中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

0～3d新生SD仔大鼠，由第四军医大学实验动物中心提供。DMEM培养基、胎牛血清由美国Hyclone公司提供；D-葡萄糖由VETEC公司提供，D-甘露醇由Solarbio公司提供；DIDS、Ⅰ型胶原酶、胰蛋白酶、5-溴-2-脱氧核苷尿嘧啶（BrdU）、噻唑蓝（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）及Annexin Ⅴ-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒由美国Sigma公司提供；氯离子荧光探针[N-（ethoxycarbonylmethyl）-6-methoxyquinolinium bromide，MQAE]由美国Invitrogen公司提供。

### 1.2 原代乳鼠心肌细胞培养

70%乙醇消毒乳鼠，于剑突下剪开胸腔，取出心脏，冰PBS清洗3遍，去除大血管和血污。将心脏置于小烧杯中，剪碎组织。用Ⅰ型胶原酶分6～8次将组织消化完全。收集上清液，加入等体积含血清的DMEM培养基以终止消化，1000r/min离心5min，弃上清。重悬细胞，200目细胞筛过滤细胞悬液，接种于细胞培养瓶中，差速贴壁1h。加入终浓度为100μmol/L的BrdU以抑制成纤维细胞生长。5% $CO_2$细胞培养箱37℃孵育24h后，更换含BrdU的DMEM培养基继续孵育48h，备用。

### 1.3 实验分组与药物处理

原代培养的心肌细胞随机分为对照组、高糖组、高糖+DIDS组及DIDS组。各组处理：对照组采用含血清DMEM培养基（5.5mmol/L葡萄糖+27.5mmol/L甘露醇）；高糖组采用含血清DMEM培养基（33mmol/L葡萄糖）；高糖+DIDS组采用含血清DMEM培养基（33mmol/L葡萄糖）+DIDS（100μmol/L）；DIDS组采用含血清DMEM培养基（5.5mmol/L葡萄糖+27.5mmol/L甘露醇）+DIDS（100μmol/L）分别培养。

### 1.4 MTT法检测心肌细胞存活率

将心肌细胞以$5\times10^5$/ml的浓度接种于96孔板中，每孔100μl。按所需实验条件处理后，吸弃培养基，加100μl无血清培养基及10μl浓度为5g/L的MTT溶液，继续孵育4h后取出，每孔加150μl DMSO，振荡10min。选择490nm波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收度（*A*）值（*A*值与活细胞数呈正比），以无细胞只加DMSO的调零孔测得的值为本底*A*值，计算细胞存活率。细胞存活率=（实验组*A*值－本底*A*值）/（对照组*A*值－本底*A*值）×100%。实验至少重复3次。

### 1.5 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡

参照Annexin Ⅴ-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒说明进行试验。各组心肌细胞按实验条件处理后，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，每组约收集$1\times10^6$个细胞，将消化的细胞用PBS，1000r/min离心洗涤5min，洗涤离心后，弃掉PBS，用2.5ml带血清培养基重悬细胞，Annexin Ⅴ-FITC/PI染色，流式细胞仪检测，分析细胞凋亡情况。结果判定：左下象限为正常细胞，右下象限为早期凋亡细胞，右上象限为晚期凋亡细胞，左上象限为死细胞。

### 1.6 MQAE检测细胞内氯离子浓度

将心肌细胞接种于48孔板中，并按所需实验条件处理细胞。用Krebs-HEPES缓冲液将MQAE配制成浓度为10mmol/L的工作液，每孔加入100μl MQAE工作液，5%$CO_2$细胞培养箱37℃孵育1h，随后用Krebs-HEPES缓冲液洗涤5次，每次5min。倒置荧光显微镜进行荧光检测，并拍摄荧光照片。每组随机选取5个细胞，用Image J软件分析每个细胞的荧光强度。

### 1.7 统计学处理

采用GraphPad Prism5.0统计软件进行处理。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用one-way ANOVA分析，两组间比较采用LSD-*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 高糖对心肌细胞存活率的影响

正常葡萄糖浓度（5.5mmol/L）心肌细胞存活率定义为100%。MTT结果显示，经葡萄糖浓度分别为5.5，11，22，33，44mmol/L的DMEM培养基分别处理0，24，48，72，96h后，高糖作用下的心肌细胞存活率呈浓度及时间依赖性降低，差异有统计学意义

（$P < 0.05$；图1）。33mmol/L葡萄糖作用72h，心肌细胞存活率为（73.2% ± 4.1%），以此浓度和时间作为高糖诱导细胞损伤的实验条件。

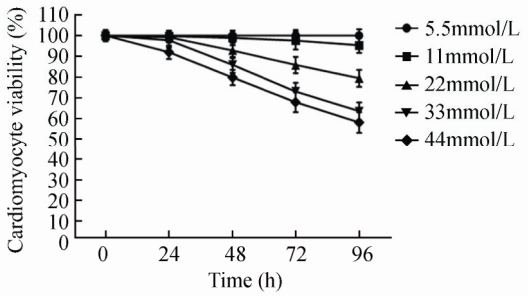



**图1**　高糖对心肌细胞存活率的影响
Figure 1　Effect of high glucose on cardiomyocyte viability

### 2.2　高糖对心肌细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示，对照组细胞状态良好，凋亡率为（6.6% ± 1.2%）。与对照组比较，高糖组细胞凋亡率为（26.8% ± 3.1%），凋亡率明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$；图2）。

### 2.3　高糖对心肌细胞氯离子浓度的影响

细胞内氯离子使MQAE荧光探针发生淬灭，MQAE荧光强度与细胞内氯离子浓度呈负相关。DIDS组与对照组的细胞内氯离子浓度比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）；与对照组比较，高糖组细胞内氯离子浓度显著下降（$P < 0.05$）；与高糖组比较，DIDS + 高糖组细胞内氯离子浓度下降明显减少，差异有统计学意义（$P < 0.05$；图3）。高糖组细胞内氯离子浓度较对照组明显减少，提示高糖诱导了心肌细胞内氯离子外流。

### 2.4　DIDS对高糖诱导心肌细胞损伤的影响

对照组心肌细胞存活率定义为100%。DIDS组与对照组心肌细胞存活率差异无统计学意义（$P > 0.05$）；高糖组心肌细胞存活率为（72.2% ± 2.85%），与对照组比较，细胞存活率显著下降（$P < 0.05$）；高糖 + DIDS组心肌细胞存活率为（83.3% ± 3.69%），与高糖组比较，细胞存活率显著升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$；图4）。

## 3　讨　论

最新研究显示，2010年中国糖尿病患者已达9 240万，而糖尿病前期的患者更是高达1.48亿，防控形势十分严峻[8]。高血糖是糖尿病性心肌损伤的独立危险因素，糖尿病性心肌病及心衰的发生发展与高血糖的持续时间、严重程度密切相关[9]。在积极控制血糖的同时，寻找预防和减轻心肌及血管损伤的药物对降低心血管疾病事件显得尤为重要。然而目前，高糖诱导心肌损伤的机制还不十分清楚。

细胞凋亡过程中伴随着细胞皱缩，也称为凋亡性容积减小（apoptotic volume decrease，AVD），氯离子的外流在其中扮演了重要角色[10]。研究表明，AVD是细胞凋亡过程中的早期事件，而阻断氯离子通道，不仅减轻了AVD，也抑制了随后的凋亡事件[11,12]。经典的细胞凋亡途径主要有死亡受体途径、线粒体途径及内质网应激途径[13]。我们前期在十字孢碱、缺血/再灌注损伤及衣霉素诱导的心肌细胞凋亡模型上，已经证实了DIDS可以通过抑制细胞凋亡，从而达到保护受损心肌细胞的目的[5−7,12]。

本研究发现，高糖对心肌细胞的损伤呈现明显的浓度和时间依赖性，并且这种损伤以凋亡的形式为主。同时证实，在高糖作用下细胞内的氯离子浓度明显降低，说明高糖激活了氯离子通道，导致了氯离子外流。而在高糖作用过程中加用氯离子通道阻断剂DIDS后，氯离子浓度下降程度明显减轻，抑制了受损心肌细胞内氯离子的外流，并维持了细胞内

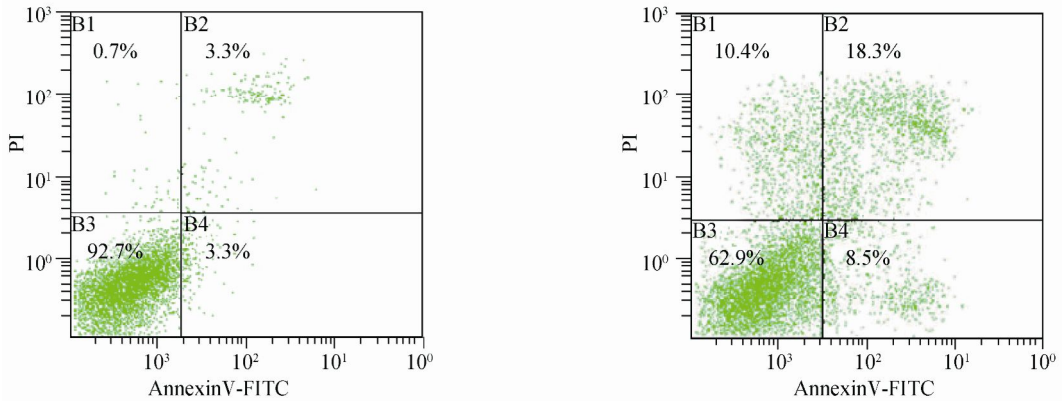



**图2**　高糖对心肌细胞凋亡的影响
Figure 2　Effect of high glucose on cardiomyocyte apoptosis rate
Compared with control group, $^{*}P < 0.05$

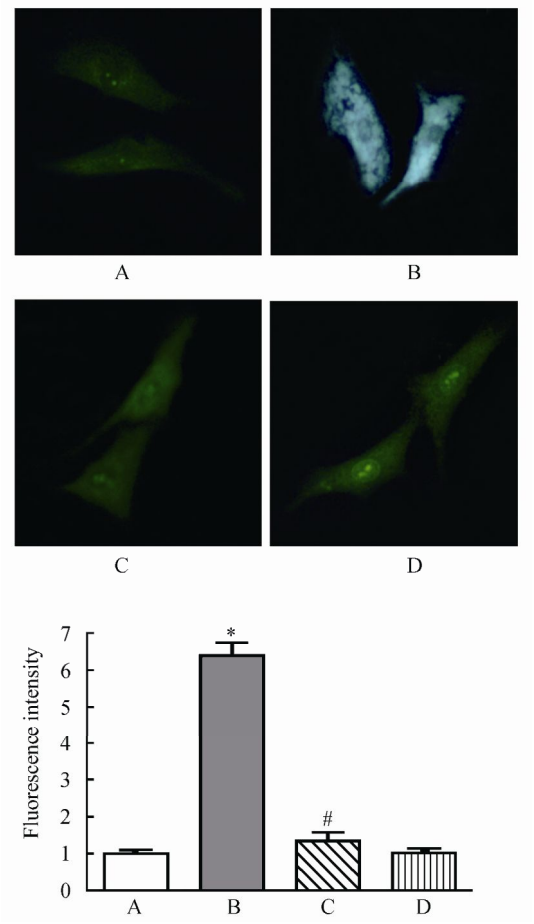



**图3 高糖对心肌细胞氯离子浓度的影响**

Figure 3 Effect of high glucose on intracellular $Cl^-$ in cardiomyocytes

A: control group; B: high glucose group; C: high glucose+DIDS group; D: DIDS group. Compared with control group, $^*P < 0.05$; compared with high glucose group, $^\#P < 0.05$

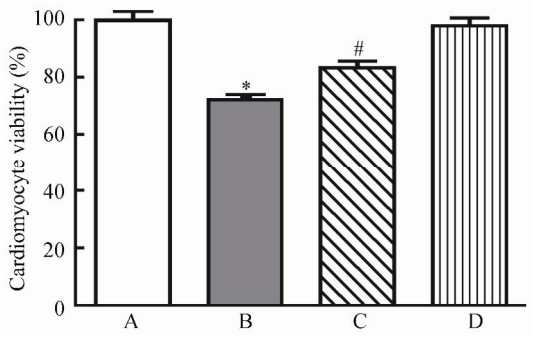



**图4 DIDS对高糖诱导心肌细胞损伤的影响**

Figure 4 Effect of DIDS on high glucose-induced cardiomyocyte injury

A: control group; B: high glucose group; C: high glucose+DIDS group; D: DIDS group. Compared with control group, $^*P < 0.05$; compared with high glucose group, $^\#P < 0.05$

环境的稳态，从而增加了心肌细胞的存活率，达到防护和阻止高糖诱导的心肌细胞损伤的目的，保护了心肌细胞。然而，高糖究竟是通过何种机制使氯离子通道开放以及如何进行调控？目前尚不清楚。研究显示，高糖所导致的糖毒性通过直接或间接的方式作用于心肌细胞致其损伤。高糖通过线粒体呼吸电子传递链产生了过量的ROS，其不但可以直接导致细胞凋亡，而且同时激活了聚腺苷二磷酸核糖聚合酶。这种酶可以通过抑制甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性使葡萄糖的代谢方式发生改变，由糖酵解途径改变为多种可能引起细胞损伤的生物级联反应。主要包括糖基化终末生物的增多和己糖胺途径，多元醇途径及蛋白激酶C的激活。除此以外，高糖损伤还可能与肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活、内质网应激等密切相关[14]。综上所述，氯离子通道参与了高糖诱导的心肌细胞损伤过程，阻断氯离子通道可在一定程度上减轻心肌细胞损伤，有效挽救濒死心肌细胞。通过对氯离子通道的干预，能够有效阻止高糖诱导心肌细胞损伤，保护心肌细胞，为糖尿病性心肌病的预防与治疗提供新的治疗策略和新靶点。

**【参考文献】**

[1] Rajesh M, Partha M, Sándor Bátkai, *et al*. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidativestress, fibrosis, inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(25): 2115−2125.

[2] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited[J]. Circulation, 2007, 115(25): 3213−3223.

[3] Yu TZ, Sheu SS, Robotham GL, *et al*. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(2): 341–351.

[4] Hume JR, Duan D, Collier ML, *et al*. Anion transport in heart[J]. Physiol Rev, 2000, 80(1): 31−81.

[5] Wang, XM, Zhang WW, Gong WQ, *et al*. Protective effect of chloride channel blockers against apoptosis of cardiomyocytes induced by ischemia/reperfusion[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2008, 10(10): 765−767.[王晓明, 张卫卫, 龚卫琴, 等. 氯离子通道阻断剂DIDS和NPPB对缺血再灌注诱导心肌细胞凋亡保护作用的研究[J]. 中华老年心血管病杂志, 2008, 10(10): 765−767.]

[6] Liu AH, Cao YN, Liu HT, *et al*. DIDS attenuates staurosporine-induced cardiomyocyte apoptosis by PI3K/Akt signaling pathway: activation of eNOS/NO and inhibition of Bax translocation[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22(1-4): 177−186.

[7] Shen MZ, Wang B, Zhai YL, *et al*. Effect of 4,4’-diisothiocyanostilbene 2,2’-disulfonic acid on endoplasmic reticulum stress-induced cardiomyocyte injury[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2012, 14(6): 622−625. [沈明志, 王 博, 王晓明, 等. 4,4’-二异硫氰基芪-2,2’-二磺酸对内质网应激诱导心肌细胞凋亡的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(6): 622−625.]

[8] Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, *et al*. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090−1101

[9] Kobayashi S, Xu XM, Chen K, *et al*. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 577–592.

[10] Lang F, Hoffmann EK. Role of ion transport in control of apoptotic cell death[J]. Compr Physiol, 2012, 2(3): 2037−2061.

[11] Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, *et al*. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (17): 9487−9492.

[12] Liu Y, Wang B, Zhang WW, *et al*. Modulation of staurosporine-activated volume-sensitive outwardly rectifying $Cl^-$ channel by PI3K/Akt in cardiomyocytes[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(27): 4859−4864.

[13] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease[J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 536–548.

[14] Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, *et al*. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic targets[J]. Drug Discov Today Dis Mech, 2010, 7(2): e135–e143.

（编辑：张青山）

## ·消 息·

# 《老年心脏病学杂志（英文版）》征稿启事

《老年心脏病学杂志（英文版）》（*Journal of Geriatric Cardiology*，JGC，ISSN 1671-5141/CN 11-5329/R）是由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所和中国科技出版传媒股份有限公司主办的国际性医学学术期刊。本刊由王士雯院士创办于2004年，目前编委会由分布在35个国家的350多位心血管专家组成。本刊是我国第一本也是唯一的反映老年心脏病学这一新兴学科的英文期刊，致力于国际老年心脏病学交流，特别是将国内老年心脏病学及相关领域的学术进展介绍给国外同行。开设的栏目有述评、综述、临床和基础研究论著、病例报告等。

为了更好地促进老年医学学科的发展，加强心血管病学的学术交流，现诚向我国和世界各地专家、学者征集优秀稿件，我们的优势：

快速评审：所有来稿均可在一个月内得到审稿意见，已评审通过的稿件可立即在线优先出版。

评审专家阵容强大：我们有来自世界各地的360名心血管领域专家为我们审稿，能保证每篇稿件的审稿质量，即使您的文章经评审后不能在本杂志上发表，详尽的评审意见也会对您的研究起到非常好的促进作用。

文章可见度高：本刊目前被许多国际著名医学数据库收录，比如PubMed、Scopus、EMBase、DOAJ等，**并已于2011年11月被SCIE收录，是我国心脏病学第一个被SCIE收录的医学学术期刊。又于2013年被中国科学引文数据库（CSCD）收录**。

地址：100853 北京市复兴路28号，《老年心脏病学杂志（英文版）》编辑部
电话：010-66936756; 010-59790736-8056
传真：010-59790736-8092
电子邮箱：jgc@mail.sciencep.com; lilaifu@mail.sciencep.com; journalgc@126.com
在线投稿：http://www.jgc301.com/ch/index.aspx