

褪黑素减轻高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的机制

刘婉卿¹,但章勇¹,周青¹,汪渊¹,王怡²,朱华庆¹

摘要 目的 探究褪黑素(MLT)对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的影响及其可能的分子机制。方法 培养HUVEC并分为3组:对照组、模型组和治疗组。对照组用葡萄糖浓度为5.5 mmol/L的DMEM培养基处理,模型组用高糖(葡萄糖浓度为30 mmol/L)的DMEM培养基处理,治疗组用含有100 μmol/L MLT的高糖DMEM培养基处理。MTT法检测高糖及MLT对HUVEC增殖的影响,试剂盒法测定细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的释放量,流式细胞术检测活性氧(ROS)的生成,Hoechst 33342/PI双染检测细胞凋亡和坏死情况,Western blot检测高糖及MLT对HUVEC内质网应激和细胞焦亡相关蛋白表达的影响。结果 与对照组相比,模型组的细胞增殖水平下降;细胞培养上清液中LDH释放量增加;HUVEC中ROS生成增加;双染试验显示,蓝色荧光和红色荧光增加,GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α、NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1β蛋白表达量增加。与模型组相比,治疗组的细胞增殖水平升高;细胞培养上清液中LDH释放量减少;HUVEC中ROS生成减少;双染试验中蓝色荧光和红色荧光减少,GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α、NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1β蛋白表达量减少。结论 MLT可以减轻高糖诱导的HUVEC损伤,其机制可能与调控内质网应激和细胞焦亡有关。

关键词 高糖;人脐静脉内皮细胞;褪黑素;内质网应激;细胞焦亡

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0764-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.017

褪黑素(melatonin, MLT)是一种主要由人和哺乳动物松果体分泌的一种吲哚类激素,其化学名是N-乙酰基-5-甲氧基色胺,又称为松果体素^[1]。

2022-03-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82170484);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004b11020025)

作者单位:¹安徽医科大学分子生物学实验室(省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室),合肥 230032

²安徽医科大学生命科学院生物工程系,合肥 230032

作者简介:刘婉卿,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq@126.com;

王怡,女,讲师,博士,责任作者,E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn

在体内,MLT发挥着抗炎抗氧化、清除自由基、抗细胞凋亡等生物学功能^[2-3]。血管内皮由一层薄薄的扁平细胞所组成,它形成血管的内壁,是血管腔内血液及其他血管壁(单层鳞状上皮)的接口。血管内皮细胞的损伤与多种心血管疾病的发生发展有着密切的关系,如高血压、动脉粥样硬化、心力衰竭等^[4]。糖尿病常并发大血管或微血管病变,导致糖尿病心肌病、糖尿病肾病、视网膜并发症等,这些病理过程常与血管内皮损伤紧密相关^[5]。在本实验中,用高糖环境模拟人体糖尿病条件,探究人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)在MLT干预下损伤与修复的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 MLT(南京都莱生物技术有限公司);DMEM低糖培养基和胎牛血清(以色列Biological Industries公司);噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(美国Sigma公司);Hoechst 33342/碘化丙啶(propidium iodide,PI)双染试剂盒(上海贝博生物科技有限公司);葡萄糖(上海国药集团化学试剂有限公司);胰酶、青链霉素、蛋白酶抑制剂、RIPA裂解液、活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);anti-GRP78、anti-ATF4、anti-CHOP、anti-IRE1α、anti-PERK、anti-ATF6α、anti-NLRP3、anti-cleaved caspase-1、anti-IL-1β抗体(美国CST公司);anti-GAPDH、山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗小鼠IgG-HRP抗体(美国Santa Cruz公司)。

1.1.2 实验仪器 ZHJH-C1112C型超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);HERA CELL VIOS 160 i型恒温细胞培养箱、酶标仪、高速低温离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);-80℃超低温冰箱(日本SANYO电器股份有限公司);电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂);全自动数码凝胶成像系统(上海欧翔公司);TDZ4-WS低速自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);磁力搅拌

器(北京中兴伟业仪器有限公司);电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂);pH 仪(上海雷磁仪器厂);CytoFLEX 流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTER 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVEC 细胞培养 HUVEC 细胞购自于美国 ATCC 细胞库,传代至第三代,培养于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每隔 24 h 换液,待细胞融合至 80% 左右时传代,并取对数生长期细胞进行相关实验。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期的 HUVEC 细胞,经胰酶消化后,用含有 10% 胎牛血清的完全培养基重悬,以 200 μl/孔(2 × 10³ 个细胞)接种于 96 孔板中,分为 10 组:对照组、溶剂对照组、模型组、治疗组(MLT 浓度分别为 10、20、40、60、80、100、160 μmol/L),置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁后,弃去原培养上清液,PBS 洗涤 3 次后分别给予正常完全培养基(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)、含与治疗组等量的二甲基亚砜的正常完全培养基、高糖完全培养基(葡萄糖浓度为 30 mmol/L)、含相应浓度的 MLT 的高糖完全培养基处理。作用 48 h 后每孔加入 20 μl(5 mg/ml)的 MTT,继续在培养箱中孵育 4 h,弃去培养上清液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,振荡溶解后用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔的吸光度(A₄₉₀)值。

1.2.3 LDH 释放量检测 将 HUVEC 细胞分为 3 组:对照组、模型组和治疗组。细胞均匀接种于培养皿中,待细胞贴壁后,对照组用 5.5 mmol/L 葡萄糖浓度的普通培养基进行培养,模型组用 30 mmol/L 葡萄糖浓度的高糖培养基进行培养,治疗组用含有 100 mmol/L MLT 的 30 mmol/L 葡萄糖浓度的高糖培养基进行培养。处理 48 h 后收集各组细胞培养上清液,按照试剂盒说明书检测细胞培养上清液中 LDH 的释放量。

1.2.4 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测 将细胞种于 6 孔板中,同 1.2.3 项处理 48 h 后收集各组处理后的细胞,并用无血清培养基以 1 : 1 000 稀释 DCFH-DA。以每孔 800 μl 的体积重悬细胞,置于 37 °C 培养箱中孵育 20 min,每隔 5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分接触。用无血清培养基洗涤 3 次,流式细胞仪检测。

1.2.5 Hoechst 33342/PI 双染 将细胞种于玻底培养皿中,同 1.2.3 项处理 48 h 后弃去培养上清

液,用 PBS 洗涤 2 次。取 100 μl 试剂 C 加 900 μl 无菌纯水稀释,混匀即成 1 × 染色缓冲液工作液,每皿加入 1 ml 工作液,再加入 10 μl Hoechst 33342 染色液 A,轻轻混匀后 4 °C 避光孵育 10 min。在每皿加入 10 μl PI 染色液 B,轻轻混匀后 4 °C 避光孵育 10 min。PBS 洗涤细胞后用共聚焦显微镜检测结果。

1.2.6 Western blot 实验 取对数生长期的 HUVEC 细胞消化后以相同的量接种于 100 mm 直径的细胞培养皿,置于培养箱中培养,待完全贴壁后弃去培养液,用 PBS 洗 3 次,同 1.2.3 项处理 48 h,弃去培养基,用 PBS 洗 3 次,每皿加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上充分裂解细胞,14 000 r/min 4 °C 离心 20 min。吸取上清液,根据 BCA 法测定的蛋白浓度,以 4 : 1 的比例加入相应体积的总蛋白和 5 × 蛋白上样缓冲液,振荡混匀后在 100 °C 水浴中煮沸 15 min 使蛋白完全变性,冷却后置于 -80 °C 冰箱中保存。电泳时每泳道加入 20 μg 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳完成后将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。TBST 洗涤 3 次,TBS 洗涤 1 次,每次 5 min,分别孵 anti-GRP78、anti-ATF4、anti-CHOP、anti-IRE1α、anti-PERK、anti-ATF6α、anti-NLRP3、anti-cleaved caspase-1、anti-IL-1β、anti-GAPDH 一抗(1 : 1 000),置于 4 °C 冰箱摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,TBS 洗涤 1 次,每次 5 min。孵二抗羊抗兔(1 : 5 000)、羊抗鼠(1 : 3 000),室温摇床孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,TBS 洗涤 1 次,每次 5 min,加 ECL 显影液显影。以 GAPDH 作为内参,用 Quantity One 软件分析结果,蛋白表达水平以目的蛋白/GAPDH 的平均灰度值比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,各组实验重复 3 次以上,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLT 对高糖刺激下的 HUVEC 细胞增殖的影响 MTT 结果显示,与对照组相比,模型组 HUVEC 增殖水平下降,差异有统计学意义($F = 2.484; P < 0.001$)。与模型组相比,治疗组 HUVEC 的增殖水平升高,并且在 MLT 浓度为 100 μmol/L 时细胞增殖水平最高,差异有统计学意义($F = 0.328; P < 0.001$)。故后续实验中均采用 100 μmol/L 作为治疗组 MLT 浓度。溶剂对照组与对照组之间无统计

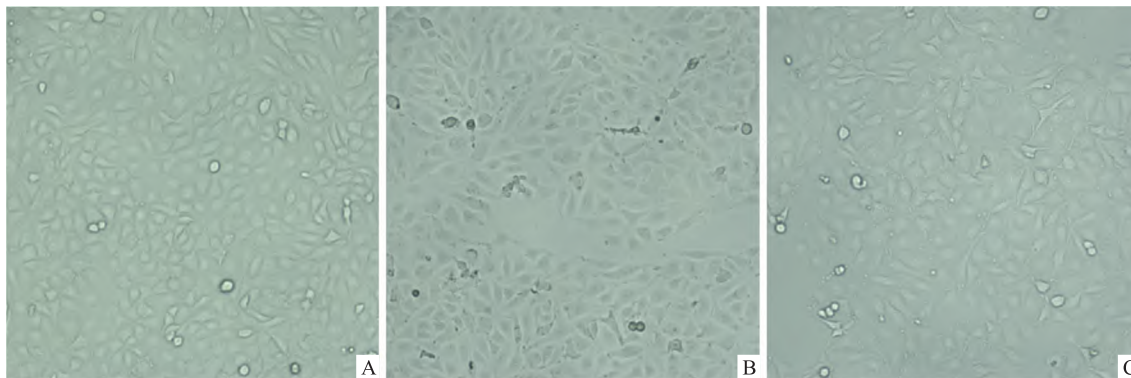


图1 高糖及 MLT 干预 48 h 后细胞培养图片 ×200

A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组

学差异。见表 1、图 1。

表 1 不同浓度 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 增殖的影响 (n=3, x±s)

| 组别 | 浓度 (μmol/L) | A ₄₉₀ | 增殖活力 (%) |
|------|-------------|------------------|----------|
| 对照 | | 0.982 ± 0.017 | 100.000 |
| 溶剂对照 | | 0.970 ± 0.016 | 98.730 |
| 模型 | | 0.658 ± 0.033*** | 67.016 |
| 治疗 | 10 | 0.666 ± 0.017 | 67.810 |
| | 20 | 0.850 ± 0.007# | 86.576 |
| | 40 | 0.866 ± 0.035## | 88.127 |
| | 60 | 0.950 ± 0.038## | 96.735 |
| | 80 | 0.955 ± 0.026## | 97.227 |
| | 100 | 1.010 ± 0.028### | 102.882 |
| | 160 | 0.955 ± 0.021## | 97.224 |

与对照组比较: *** P < 0.001; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001

2.2 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞培养上清液中 LDH 释放量的影响 根据测量所得结果显示, 与对照组相比, 模型组培养上清液中 LDH 释放量增加, 差异有统计学意义 (F = 2.785, P < 0.05); 与模型组相比, 在 MLT 干预下, 治疗组培养上清液中 LDH 释放量减少, 差异有统计学意义 (F = 2.144, P < 0.05)。见图 2。

2.3 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞中 ROS 生成的影响 流式细胞术结果显示, 与对照组相比, 模型组 HUVEC 细胞中 ROS 水平升高, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 与模型组相比, 治疗组 HUVEC 细胞中 ROS 水平下降, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。见图 3。

2.4 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞中 Hoechst 33342/PI 染色变化的影响 共聚焦显微镜拍摄结

果显示, 与对照组相比, 模型组 HUVEC 细胞中蓝色荧光和红色荧光增加; 与模型组相比, 治疗组 HUVEC 细胞中蓝色荧光和红色荧光减少。见图 4。

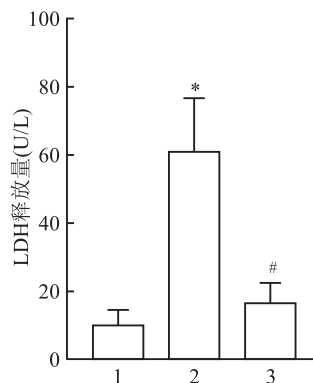


图 2 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞培养上清液中 LDH 释放量的影响 (n=3)

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 治疗组; 与对照组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: # P < 0.05

2.5 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞中内质网应激相关蛋白 GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α 表达的影响 Western blot 结果显示, 与对照组相比, 模型组 HUVEC 细胞中 GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α 蛋白相对表达水平均有升高, 差异有统计学意义 (P < 0.01); 与模型组相比, 治疗组 HUVEC 细胞中 GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α 蛋白相对表达水平均有下降, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。见图 5。

2.6 MLT 对高糖刺激的 HUVEC 细胞中焦亡相关蛋白 NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1β 表达的影响 Western blot 结果显示, 与对照组相比, 模型组 HUVEC 细胞中 NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1β 蛋

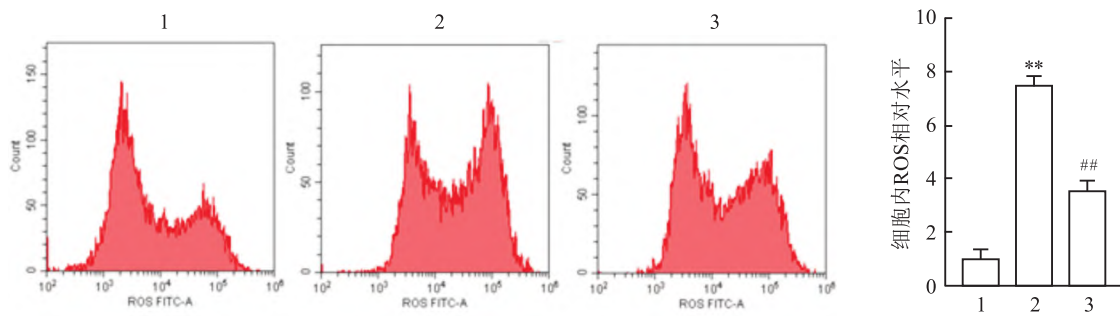


图3 MLT对高糖刺激的HUVEC细胞中ROS生成的影响($n=3$)

1:对照组;2:模型组;3:治疗组;与对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.01$

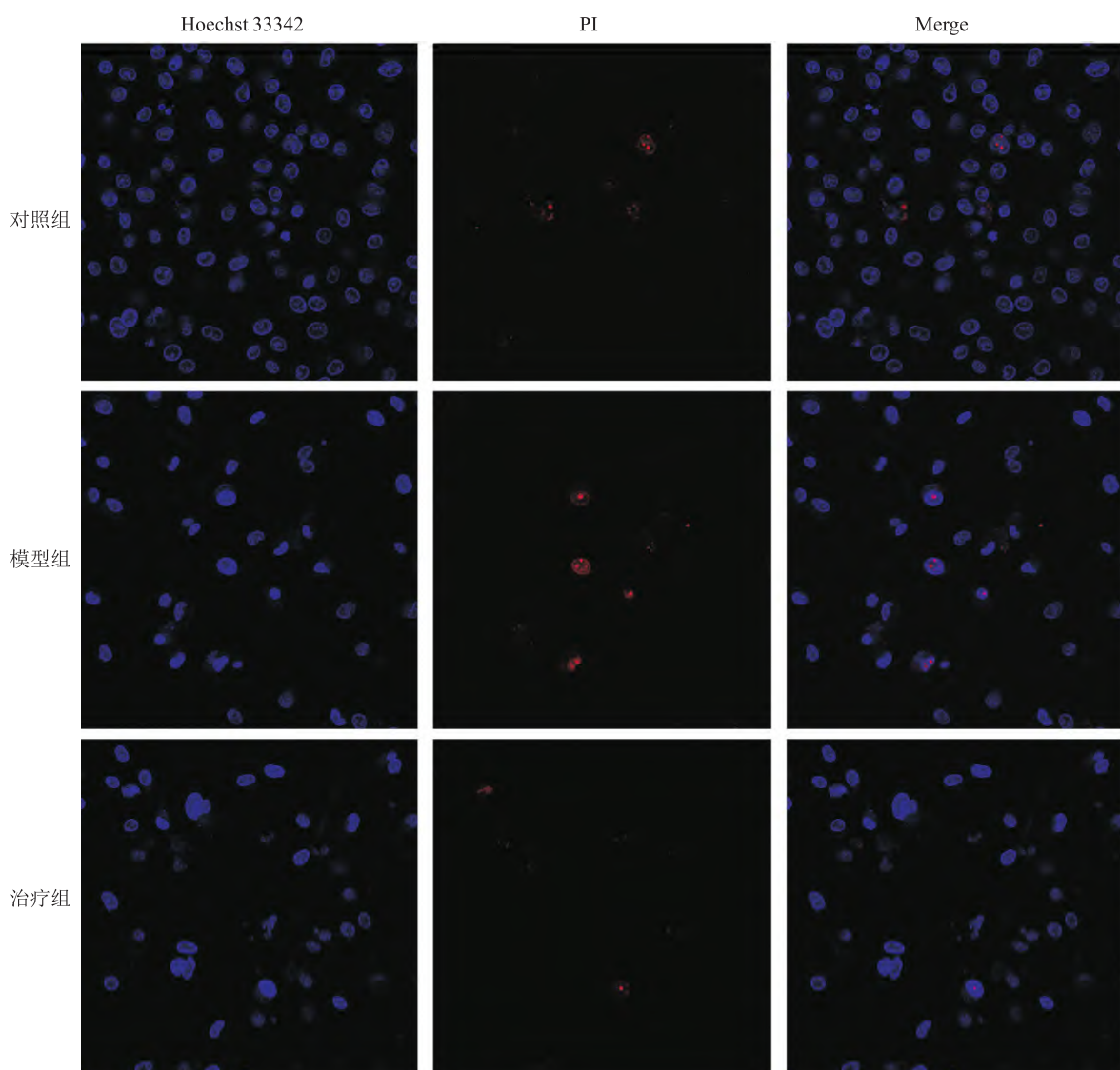


图4 MLT对高糖刺激的HUVEC细胞中Hoechst 33342/PI染色变化的影响 $\times 200$

白相对表达水平均有升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,治疗组HUVEC细胞中NL-

RP3、cleaved caspase-1、IL-1 β 蛋白相对表达水平平均有下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图6。

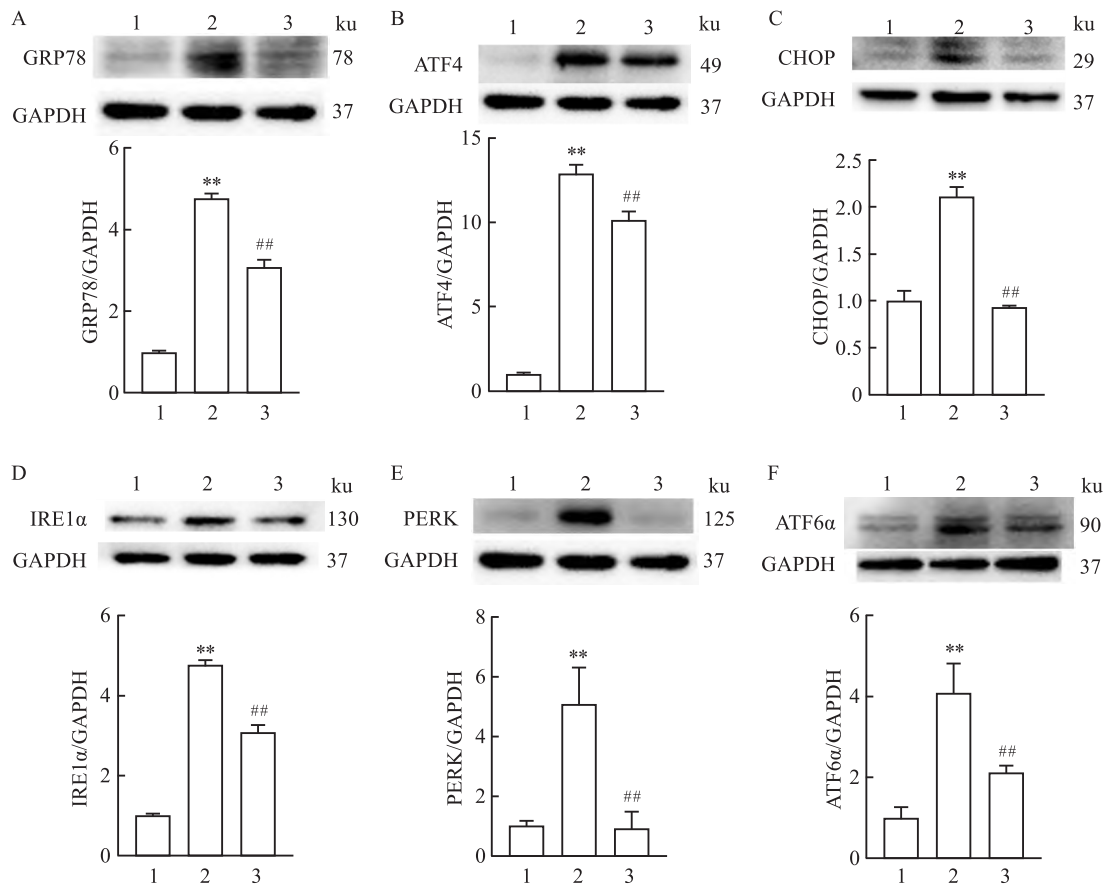


图5 MLT对高糖刺激的HUVEC细胞中GRP78、ATF4、CHOP、IRE1α、PERK、ATF6α蛋白表达的影响

1:对照组;2:模型组;3:治疗组;与对照组比较:**P<0.01;与模型组比较:##P<0.01

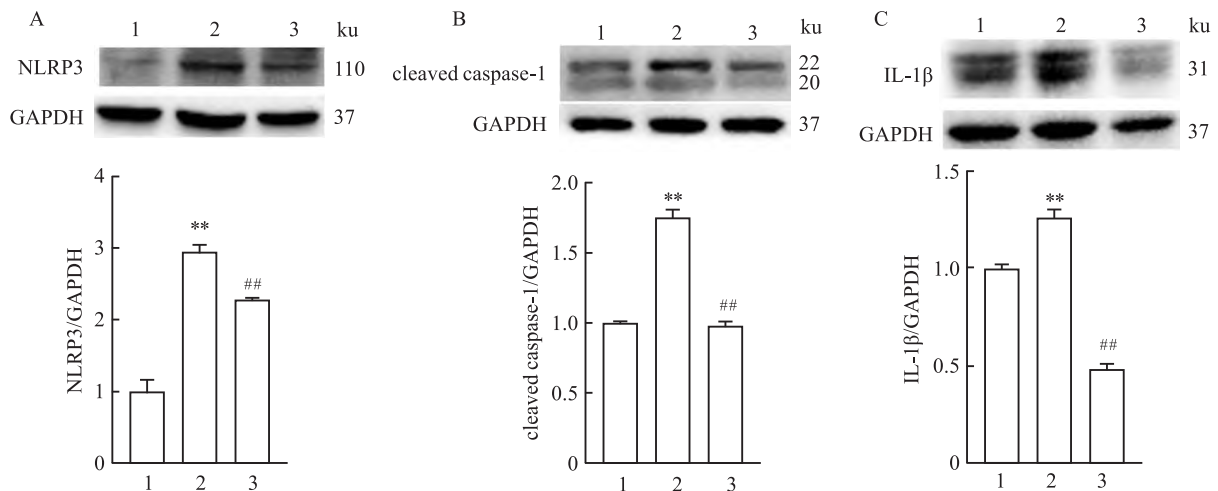


图6 MLT对高糖刺激的HUVEC细胞中NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1β蛋白表达的影响

1:对照组;2:模型组;3:治疗组;与对照组比较:**P<0.01;与模型组比较:##P<0.01

3 讨论

高糖诱导的内皮细胞功能损伤一直是心血管疾病领域的研究热点。在糖尿病病程中,内皮细胞显

著受损,内皮功能发生障碍。但在此过程中内皮细胞的损伤与修复机制一直尚未明确。本实验以HUVEC为例,以含高浓度葡萄糖的细胞培养基模拟体内糖尿病环境,MLT为干预药物,探究了高糖刺激

导致内皮细胞损伤及 MLT 对其调控机制是否与细胞内质网应激和细胞焦亡有关。经上述实验证明,高糖诱导下内皮细胞的增殖水平下降,胞膜完整性被破坏,经 MLT 干预后内皮细胞增殖水平升高,胞膜完整性的破坏得到一定缓解。ROS 是分子氧的活性中间体,当活性氧生成和抗氧化防御之间失去平衡时,内皮功能就会发生障碍,在代谢性和动脉粥样硬化疾病中导致血管损伤^[6]。因此,可以通过检测细胞内 ROS 生成的变化来判断内皮损伤的程度。在本实验中,高糖刺激下的内皮细胞中 ROS 生成量增加,MLT 干预后 ROS 生成量相对下降。上述实验表明 MLT 可以减少内皮细胞中 ROS 的产生,从而缓解高糖刺激对内皮功能的损伤。Hoechst 33342 可以穿透细胞膜,染色后凋亡细胞蓝色荧光会比正常细胞增强。PI 不能穿透细胞膜,对于坏死细胞,其细胞膜的完整性遭到破坏,PI 可以进入坏死细胞对核染色,使细胞红色荧光增强。在本实验中,高糖刺激的内皮细胞中蓝色荧光和红色荧光增加,MLT 干预后的内皮细胞中蓝色荧光和红色荧光减少,表明 MLT 在此过程中对细胞进行了一定的保护作用。

当机体发生低氧、错误折叠、突变蛋白积累或者处于高糖诱导时,细胞中内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)水平升高^[7],将导致未折叠蛋白反应(unfolded protein reaction,UPR)。UPR 的主要功能是恢复内质网的生理活性,调控细胞凋亡和其他适应性反应。有研究^[8]表明,ERS 是糖尿病、肥胖、脂肪肝、心血管疾病、动脉粥样硬化等代谢综合征发病的重要因素。内质网中的葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 能够促进蛋白质折叠和防止蛋白质聚集,是 UPR 信号的主启动子。非 ERS 状态下,GRP78 与蛋白激酶 RNA 样 ER 激酶(PERK)、肌醇酶 1 α (IRE1 α) 和转录激活因子 6 (ATF6) 结合,以复合物的形式存在。当发生细胞损伤时,ERS 启动,GRP78 从复合物状态中解离并激活^[9],通过 PERK、ATF6、IRE1 α 三条途径,激活下游的 eIF2 α 、CHOP、ATF4 等通路^[9-10],加速蛋白质折叠和降解,重新建立 ER 稳态。

NLRP3 炎症小体是一种多蛋白复合物,识别 PAMPs 或损伤相关分子模式(DAMP),并招募和激活炎症蛋白酶 caspase-1^[11]。在细胞焦亡过程中,活化的 cleaved caspase-1 将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 切割形成成熟形式 IL-1 β 、IL-18,同时切割 GSDMD 的 N 端序列,在细胞膜上形成孔道,细胞膜完整性破坏,细胞内容物释放到细胞外,细胞崩解死亡。有研

究^[12]表明,UPR 时 IRE1 α -XBP1 轴的选择性激活可以刺激 NLRP3 的活化。同时有证据^[13]表明内质网应激参与炎症小体诱导的炎症级联反应,它们之间的复杂相互作用是炎症疾病潜在的治疗靶点。

在既往的研究^[14]中,MLT 可以通过调控内质网应激 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 通路来抑制高糖诱导下的成骨细胞凋亡。另有研究^[15]表明,MLT 可以通过抑制链脲佐菌素诱导的糖尿病模型小鼠神经元细胞焦亡和自噬发挥神经保护作用。但在内皮细胞中,MLT 是否可以通过相似的调控方式减轻高糖带来的内皮损伤还尚不明确。该研究中,高糖刺激的内皮细胞中 GRP78、ATF4、CHOP、IRE1 α 、PERK、ATF6 α 蛋白表达水平提升,在 MLT 干预后呈现下降趋势,推测 MLT 的调控过程与 ERS 有关;同时高糖刺激的内皮细胞中 NLRP3、cleaved caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平提升,MLT 干预后同样出现下降趋势,推测 MLT 可能是通过抑制细胞焦亡对内皮细胞发挥保护作用。但在此过程中,这两种调控机制之间是否存在关联,以及关联的具体靶点还仍需进一步探索。

糖尿病心血管并发症是导致糖尿病病死率增加及影响糖尿病患者生活质量的重要因素。该研究结果表明,MLT 可以减轻高糖诱导的内皮细胞损伤,其机制可能与调控内质网应激和细胞焦亡有关。该研究或许为糖尿病等代谢类疾病的治疗提供了新的思路,为后续相关实验提供了有力的佐证。

参考文献

- [1] do Amaral F G, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone[J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2018, 62(4):472-9.
- [2] 陈永昕,刘婉卿,周青,等.褪黑素延缓糖尿病大鼠肾脏细胞衰老的机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(7):1032-6,1041.
- [3] Bhattacharya S, Patel K K, Dehari D, et al. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 462(1-2):133-55.
- [4] 王爽.阿托伐他汀钙对冠心病心力衰竭患者血管内皮损伤的影响研究[J]. *中国医学创新*, 2019, 16(3):127-30.
- [5] Horton W B, Barrett E J. Microvascular dysfunction in diabetes mellitus and cardiometabolic disease[J]. *Endocr Rev*, 2021, 42(1):29-55.
- [6] Incalza M A, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 100:1-19.
- [7] Mohan S, Preetha R, Brown L, et al. Endoplasmic reticulum

- stress: a master regulator of metabolic syndrome[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 860:1 – 10.
- [8] Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, et al. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(7):2231 – 42.
- [9] Binder P, Wang S, Radu M, et al. Pak2 as a novel therapeutic target for cardioprotective endoplasmic reticulum stress response[J]. *Circ Res*, 2019, 124(5):696 – 711.
- [10] Grandjean J M D, Wiseman R L. Small molecule strategies to harness the unfolded protein response: where do we go from here? [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(46):15692 – 711.
- [11] Kim Y G, Kim S M, Kim K P, et al. The role of inflammasome-dependent and inflammasome-independent NLRP3 in the kidney [J]. *Cells*, 2019, 8(11):1389.
- [12] Talty A, Deegan S, Ljujic M, et al. Inhibition of IRE1 α RNase activity reduces NLRP3 inflammasome assembly and processing of pro-IL-1 β [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):622.
- [13] Chong W C, Shastri M D, Peterson G M, et al. The complex interplay between endoplasmic reticulum stress and the NLRP3 inflammasome: a potential therapeutic target for inflammatory disorders[J]. *Clin Transl Immunol*, 2021, 10(2):e1247.
- [14] Zhou R, Ma Y, Tao Z, et al. Melatonin inhibits glucose-induced apoptosis in osteoblastic cell line through PERK-eIF2 α -ATF4 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:602307.
- [15] Che H, Li H, Li Y, et al. Melatonin exerts neuroprotective effects by inhibiting neuronal pyroptosis and autophagy in STZ-induced diabetic mice[J]. *FASEB J*, 2020, 34(10):14042 – 54.

Mechanism of melatonin alleviating human umbilical vein endothelial cell injury induced by high glucose

Liu Wanqing¹, Dan Zhangyong¹, Zhou Qing¹, Wang Yuan¹, Wang Yi², Zhu Huaqing¹

(¹*Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene Utilization for Severe Diseases of Anhui Province, Hefei 230032;*

²*Dept of Bioengineering, College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To explore the effect of melatonin (MLT) on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury induced by high glucose and to explore its probable molecular mechanism. **Methods** HUVEC were cultured and divided into three groups: control group, model group and treatment group. The control group (Ctrl group) was treated with DMEM medium at a normal low glucose level (5.5 mmol/L glucose), and the model group (HG group) was treated with DMEM medium at a high glucose level (30 mmol/L glucose). Treatment group (HG + MLT group) was treated with DMEM medium at a high glucose level containing 100 μ mol/L melatonin. The method of MTT was used to detect the effects of high glucose and melatonin on HUVEC proliferation. The release of lactate dehydrogenase (LDH) in cell culture supernatant was determined. The production of reactive oxygen species (ROS) was detected by flow cytometry. Hoechst 33342/PI double-staining was used to detect cell apoptosis and necrosis. Western blot was used to detect the effects of high glucose and melatonin on endoplasmic reticulum stress and cell pyroptosis related protein expression in HUVEC. **Results** Compared with the control group, cell proliferation level of the model group decreased, LDH releasing in cell culture supernatant increased, ROS production increased, the blue and red fluorescence increased in the double-staining, the expressions of GRP78, ATF4, CHOP, IRE1 α , PERK, ATF6 α , NLRP3, cleaved caspase-1, IL-1 β increased. Compared with model group, cell proliferation level of the treatment group increased, LDH releasing in cell culture supernatant decreased, ROS production decreased, the blue and red fluorescence decreased in the double-staining, the expressions of GRP78, ATF4, CHOP, IRE1 α , PERK, ATF6 α , NLRP3, cleaved caspase-1, IL-1 β decreased. **Conclusion** MLT can alleviate HUVEC damage induced by high glucose, and the probable mechanism may be related to the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell pyroptosis.

Key words high glucose; human umbilical vein endothelial cell; melatonin; endoplasmic reticulum stress; cell pyroptosis