

自噬与脂联素诱导的人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的关系

刘 佳,王佑民,胡红琳,冯双双

摘要 目的 研究全长脂联素(Acrp30)在人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、迁移、自噬、凋亡中的作用,并探讨自噬与凋亡的关系。方法 体外培养 MCF-7 细胞,分为对照组(未加入 Acrp30)、加药组(25、50、100、200 ng/ml Acrp30),四亚基偶氮唑盐(MTT)比色法检测各组细胞增殖情况。选取 100 ng/ml Acrp30 浓度组(Acrp 组)作用 MCF-7 细胞,进行培养,倒置显微镜观察细胞形态、贴壁情况;划痕抑制试验了解细胞迁移能力;Western blot 法评价细胞自噬水平;流式细胞仪检测 Acrp 组及 3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理组不同时间细胞的总凋亡率。结果 ① MTT 结果显示:与对照组相比,50、100 ng/ml 组 72 h,200 ng/ml 组 48、72 h 可显著抑制 MCF-7 细胞增殖($P < 0.05$);② 划痕抑制实验结果显示:与对照组相比,Acrp30 组作用 48、72 h,迁移距离显著减小($P < 0.01$);③ Western blot 结果显示:与对照组相比,Acrp30 组自噬水平(LC3B-II/LC3B-I 比值)24、48 h 显著提高($P < 0.05$, $P < 0.01$),但随时间延长,比值逐渐下降,作用 72 h 后 LC3B-II/LC3B-I 比值有所升高但差异无统计学意义;④ 流式细胞仪检测凋亡率结果显示:与对照组相比,Acrp30 组和干预组 48、72 h 总凋亡率明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),与 Acrp30 组相比干预组 72 h 凋亡率显著升高($P < 0.05$)。结论 Acrp30 可抑制 MCF-7 细胞的增殖和迁移,诱导细胞的自噬和凋亡;抑制细胞自噬可促进 Acrp30 对 MCF-7 细胞凋亡的诱导。

关键词 脂联素; MCF-7 细胞; 增殖; 自噬; 凋亡

中图分类号 R 329.55; R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1223-06

乳腺癌是全球最常见的女性肿瘤,在女性肿瘤相关性死亡中排第一位;2008 年新增 1 380 000 例乳腺癌患者,占全球新增癌症总数的 23%;乳腺癌死亡人数 458 000 例,占癌症总死亡人数的 14%^[1],严重危害全球女性的生命健康。对乳腺癌发生机制的研究,涉及最多的是乳腺癌干细胞的增殖、自噬、凋亡等过程。肥胖是女性乳腺癌的一个常见危险因

素,超重或肥胖的乳腺癌女性 5 年死亡率是正常体重乳腺癌女性的 2.5 倍^[2]。脂联素(Acrp30)是一种主要由脂肪组织分泌,在体内含量最高的一种脂肪因子,血清浓度与体质指数(body mass index, BMI)呈显著负相关性。Miyoshi et al^[3]首先报告了 Acrp30 水平与乳腺癌风险降低显著相关,随后的一系列回顾性病例对照研究^[4-5]也相继证实了该相关性。但是关于 Acrp30 与乳腺癌细胞自噬及自噬与凋亡之间的相关性研究,目前国内外报道均较少。该研究拟以自噬相关蛋白 LC3B-II/LC3B-I 的比值作为自噬水平的反应指标,初步了解 Acrp30 与乳腺癌细胞自噬及自噬与对 Acrp30 诱导的凋亡间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌 MCF-7 细胞(本实验室保种);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);高糖改良 Eagle 培养基(DMEM)(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);重组人 Acrp30(美国 peprotech 公司);LC3B 抗体(美国 CST 公司); β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);二抗(美国 bio-world 公司);ECL 发光试剂(美国 Thermo 公司);Annexin V-FITC 试剂盒(美国 BD 公司);四亚基偶氮唑盐(MTT)(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,青/链霉素各 100 U/ml,两性霉素 B 2 μ g/ml),置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 的培养箱中常规培养 MCF-7 细胞。隔天换液 1 次,2~3 d 后,细胞生长到对数期,每天换液,贴壁汇合约 80% 时,0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 MTT 检测细胞活力 取对数生长期的细胞(1×10^3 个/ml),200 μ l/孔接种于 96 孔板,常规培养 24 h,换液,加入含不同浓度的 Acrp30(25、50、100、200 ng/ml)新鲜培养液,对照组不加 Acrp30,每孔设 5 个平行组,分别培养 24、48、72 h,加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,去除培养液,加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150 μ l/孔,低速震荡 5~10 min,用酶标仪于 490 nm 波长条件

2015-04-29 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1206c0805034);中华医学会临床医学科研专项基金项目(编号:13040420427)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院内分泌科、安徽省内分泌代谢病省级实验室,合肥 230022

作者简介:刘 佳,女,硕士研究生;

王佑民,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: youminwang@21.cn, com

下测定每孔光密度(optical density, OD) 值。生长抑制率 = $(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}) / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$, 每次实验重复 3 次。

1.2.3 划痕抑制试验 取对数生长期细胞($1 \sim 3$) $\times 10^5$ 个/ml 约 2 ml 接种于 6 孔板中, 常规培养; 镜下见细胞汇合 100% 时, 无菌微量移液器尖端在汇合完全的单细胞层中划线, PBS 洗 2 次, 去除脱离的细胞; 选取 100 ng/ml 浓度 Acrp30 加入完全培养基, 每组 2 个复孔, 常规培养 24、48、72 h; 倒置显微镜下拍照测量各孔两直线间距离。迁移距离 = 不同时间点距离 - 初始距离。

1.2.4 Western blot 检测 LC3B 的表达 取对数生长期细胞密度为 1×10^5 个/ml MCF-7 乳腺癌细胞 2 ml, 接种于 6 孔板中, 常规培养 24 h 后, 加入 100 ng/ml 浓度 Acrp30 干预 24、48、72 h, 预冷 PBS 清洗 3 遍, 每孔加含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 200 μ l 冰上裂解 30 min。用细胞刮齿将每孔细胞完全收集于离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 低温离心 5 min, 取上清液, BCA 法蛋白定量。与 5 $\times$ 上样缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C, 煮沸变性 5 min, 将 50 μ g 变性后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶为 12%, 分离胶 5%, 40 V 恒压, 约 1 h, 待 Marker 最大分子量进入分离胶后调整电压为 60 V, 当 Marker 最小蛋白条带到达接近分离胶底部时停止电泳。然后 15 V, 25 min 转染到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 3 h, 一抗 (LC3B, β -actin) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min 3 次, 加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, ECL 化学发光、显影、定影、晾干胶片、扫描图像。用 Quantity One 凝胶成像分析软件对 Western blot 条带行半定量分析, β -actin 条带灰度校正。

1.2.5 流式细胞术 将对数生长期 MCF-7 细胞 ($0.1 \sim 1$) $\times 10^5$ 个/ml 2 ml 接种于 6 孔板中, 常规培养 24 h, 加入 100 ng/ml 浓度的 Acrp30, 分别加入低血清培养基及 2 mmol/L MA 预处理 1 h 的低血清培养基 (5% 胎牛血清), 常规培养 24、48、72 h, 收集细胞。低速离心 (1 000 r/min, 5 min), 预冷 PBS 清洗, 收集各组细胞重悬于 100 μ l Binding Buffer 液, 每管再加入 5 μ l AnnexinV-FITC 液及 5 μ l PI 液, 混匀避光 15 min 后, 各管加入 400 μ l Binding Buffer, 用流式细胞仪检测, 结果用 BD Cell Quest 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Acrp30 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖活力的影响 25、50、100、200 ng/ml Acrp30 在作用 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后, 与未加 Acrp30 的乳腺癌细胞 (对照组) 比较, 50、100、200 ng/ml 组培养 72 h OD 值明显降低, MCF-7 细胞增殖活力下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。200 ng/ml 组 48、72 h, 100 ng/ml 组 72 h 对细胞的生长抑制率明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

2.2 光学显微镜下 Acrp30 对乳腺癌细胞形态的影响 倒置显微镜下观察加入 100 ng/ml Acrp30 及对照组 (未加 Acrp30) 乳腺癌细胞常规培养 72 h, 两组细胞的形态。加药组细胞汇合率较对照组低, 细胞贴壁欠好, 细胞形态成不规则形, 培养液中可见大量漂浮的细胞。见图 1。

表 1 不同浓度 Acrp30 培养 MCF-7 细胞不同时间对细胞增殖活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	OD 值					F 值
	对照组	25 ng/ml 组	50 ng/ml 组	100 ng/ml 组	200 ng/ml 组	
24 h	1.16 $\pm$ 0.14	1.20 $\pm$ 0.18	1.18 $\pm$ 0.14	1.15 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.20	0.803
48 h	1.16 $\pm$ 0.21	1.15 $\pm$ 0.21	1.12 $\pm$ 0.20	1.12 $\pm$ 0.22	1.09 $\pm$ 0.23	0.091
72 h	1.13 $\pm$ 0.07	1.07 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.05*	0.98 $\pm$ 0.03**#	0.97 $\pm$ 0.03**#	5.356

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 25 ng/ml 组比较: # $P < 0.05$

表 2 不同浓度 Acrp30 培养 MCF-7 细胞不同时间对细胞生长抑制情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	细胞生长抑制率 (%)					F 值
	对照组	25 ng/ml 组	50 ng/ml 组	100 ng/ml 组	200 ng/ml 组	
24 h	0	-3.49 $\pm$ 7.81	-2.11 $\pm$ 5.06	0.10 $\pm$ 9.39	10.42 $\pm$ 15.32	1.836
48 h	0	0.52 $\pm$ 1.88	3.67 $\pm$ 4.93	3.70 $\pm$ 2.96	6.18 $\pm$ 3.81***	3.191
72 h	0	5.02 $\pm$ 13.97	8.68 $\pm$ 7.95	13.04 $\pm$ 7.97*	14.11 $\pm$ 8.26*	2.179

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 25 ng/ml 组比较: # $P < 0.05$

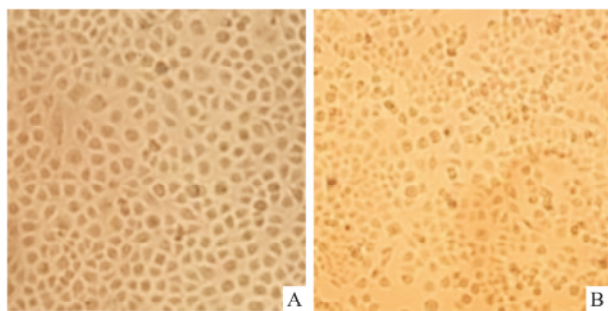


图1 培养细胞72 h后的形态 $\times 200$
A: 对照组; B: 加入 100 ng/ml Acrp30 组

2.3 Acrp30 对细胞迁移能力的影响 两组划痕的 MCF-7 细胞, 一组加入 100 ng/ml Acrp30, 另一组不加作为对照, 常规培养不同时间后, 24 h 对照组与 Acrp30 组细胞爬行距离无显著性差异 ($t = 1.116$), 48、72 h Acrp30 组爬行距离较对照组明显减少 ($t = 19.36, 8.66, P < 0.01$), 爬行距离 = 初始划痕距离 - 不同时间各组细胞间最短距离。见图 2、表 3。

表3 对照组与 Acrp30 组培养 24、48、72 h 后
细胞爬行距离的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	细胞爬行距离 (mm)		F 值
	对照组	Acrp30 组	
24 h	27.02 $\pm$ 0.47	27.71 $\pm$ 0.96	0.917
48 h	35.69 $\pm$ 0.29	31.51 $\pm$ 0.24 **	0.087
72 h	40.18 $\pm$ 0.96	34.08 $\pm$ 0.75 **	0.389

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 Acrp30 对自噬蛋白 LC3B 表达的作用 100 ng/ml Acrp30 作用乳腺癌细胞 MCF-7 不同时间后,

各组自噬水平 (LC3B-II / LC3B-I) 差异有统计学意义 ($F = 7.548, P < 0.05$), 24、48 h 与 0 h 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 72 h 自噬水平高于对照组, 但差异无统计学意义 (图 3)。

2.5 自噬对 Acrp30 诱导的 MCF-7 细胞凋亡的影响 100 ng/ml Acrp30 及自噬抑制剂 3-MA (2 mmol/L 预处理 1 h) + 100 ng/ml Acrp30 作用 MCF-7 细胞, 未加 Acrp30 或 3-MA 的 MCF-7 细胞作为对照组, 培养 24、48、72 h, 48、72 h Acrp30 组和 Acrp30 + MA 组凋亡率与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 24 h 两组与对照组差异无统计学意义; 而 72 h Acrp30 + MA 组凋亡率明显大于 Acrp30 组 ($P < 0.05$)。见图 4、表 3。

表3 Acrp30 及 3-MA 预处理培养 MCF-7 细胞
24、48、72 h 各组细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	细胞凋亡率 (%)			F 值
	对照组	Acrp30 组	Acrp30 + MA 组	
24 h	9.24 $\pm$ 0.91	10.50 $\pm$ 0.49	9.93 $\pm$ 0.41	2.90
48 h	13.88 $\pm$ 0.45	17.22 $\pm$ 0.46 **	17.77 $\pm$ 0.25 **	82.52
72 h	18.82 $\pm$ 0.84	19.92 $\pm$ 0.23 *	21.65 $\pm$ 0.46 ***	18.79

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Acrp30 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

乳腺癌患者血清 Acrp30 水平显著降低, 不依赖于年龄、绝经与否、BMI 等指标, 低 Acrp30 水平的乳腺癌患者肿瘤的恶性度更高^[8], 关于 Acrp30 的抗肿瘤作用尚未完全清楚, 目前认为 Acrp30 直接或间接

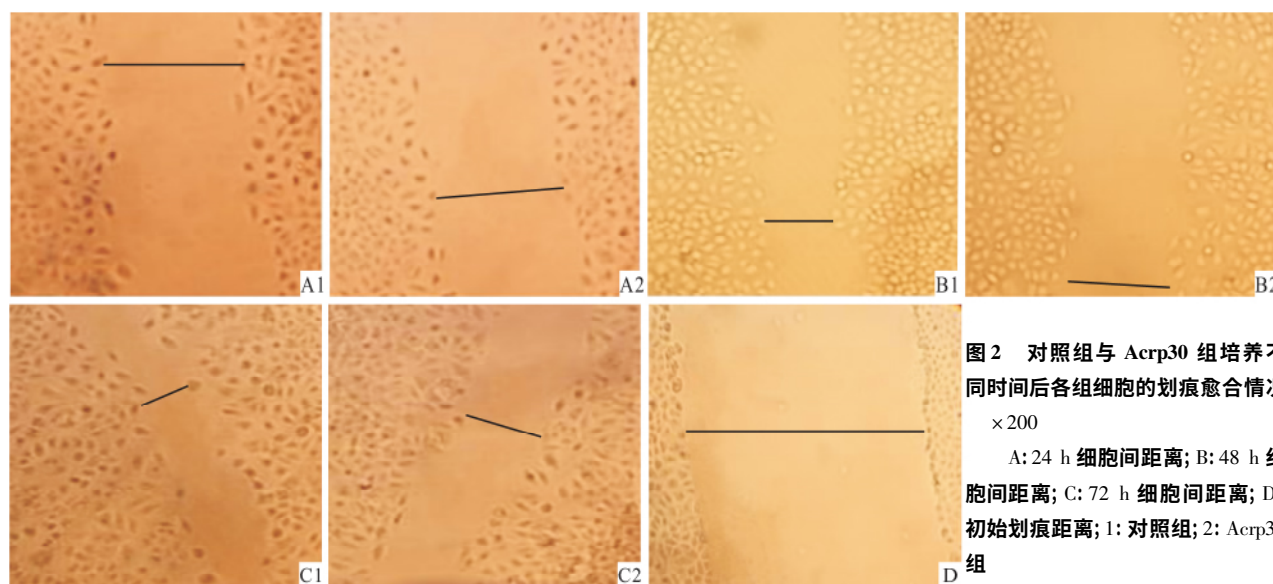


图2 对照组与 Acrp30 组培养不同时间后各组细胞的划痕愈合情况 $\times 200$

A: 24 h 细胞间距离; B: 48 h 细胞间距离; C: 72 h 细胞间距离; D: 初始划痕距离; 1: 对照组; 2: Acrp30 组

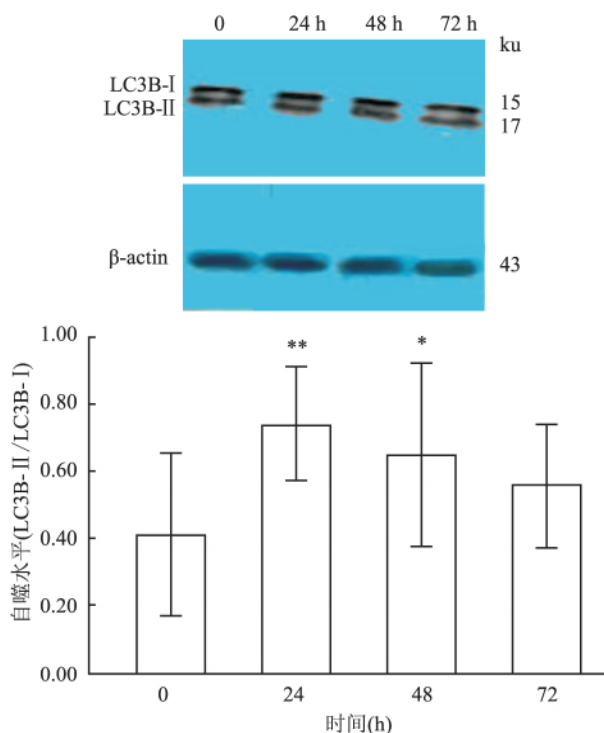


图3 Western blot 法检测 Acrp30 (100 ng/ml) 作用 MCF-7 细胞 0、24、48、72 h 时蛋白 LC3B-II、LC3B-I 表达情况
与 0 h 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

地抑制肿瘤的发生、发展,可能通过调节整体的胰岛素敏感性^[9]及生长因子和类固醇激素的生物活性^[8]。动物及体外细胞实验^[9-10]均表明 Acrp30 可抑制乳腺癌细胞的侵袭性、增殖活性,诱导凋亡,降低乳腺癌的发生风险。与国内外众多学者及本课题组前期对 Acrp30 与乳腺癌关系的研究^[1,10]结果基本相一致,本研究进一步证实 Acrp30 可抑制 MCF-7 细胞增殖和迁移活性,促进细胞凋亡,并且呈现一定的剂量、时间依赖性。

自噬是一种溶酶体依赖的,细胞对自身变性、损伤、衰老或非功能性蛋白质及细胞器的吞噬降解过程,自噬与人类肿瘤、神经退行性变、心肌肥厚等多种疾病存在相关性,参与细胞死亡、存活及肿瘤的发生、发展等很多的病理过程^[11],有研究^[12]表明自噬在乳腺癌的生长、转移、侵袭中起着重要的作用,但自噬是否参与了 Acrp30 诱导 MCF-7 细胞的多种生理病理过程,目前尚不清楚。本研究表明 Acrp30 可诱导 MCF-7 细胞自噬水平的增加,抑制自噬可增加 Acrp30 诱导乳腺癌细胞的凋亡率。

研究^[13]提示,自噬对肿瘤细胞的生存和死亡可

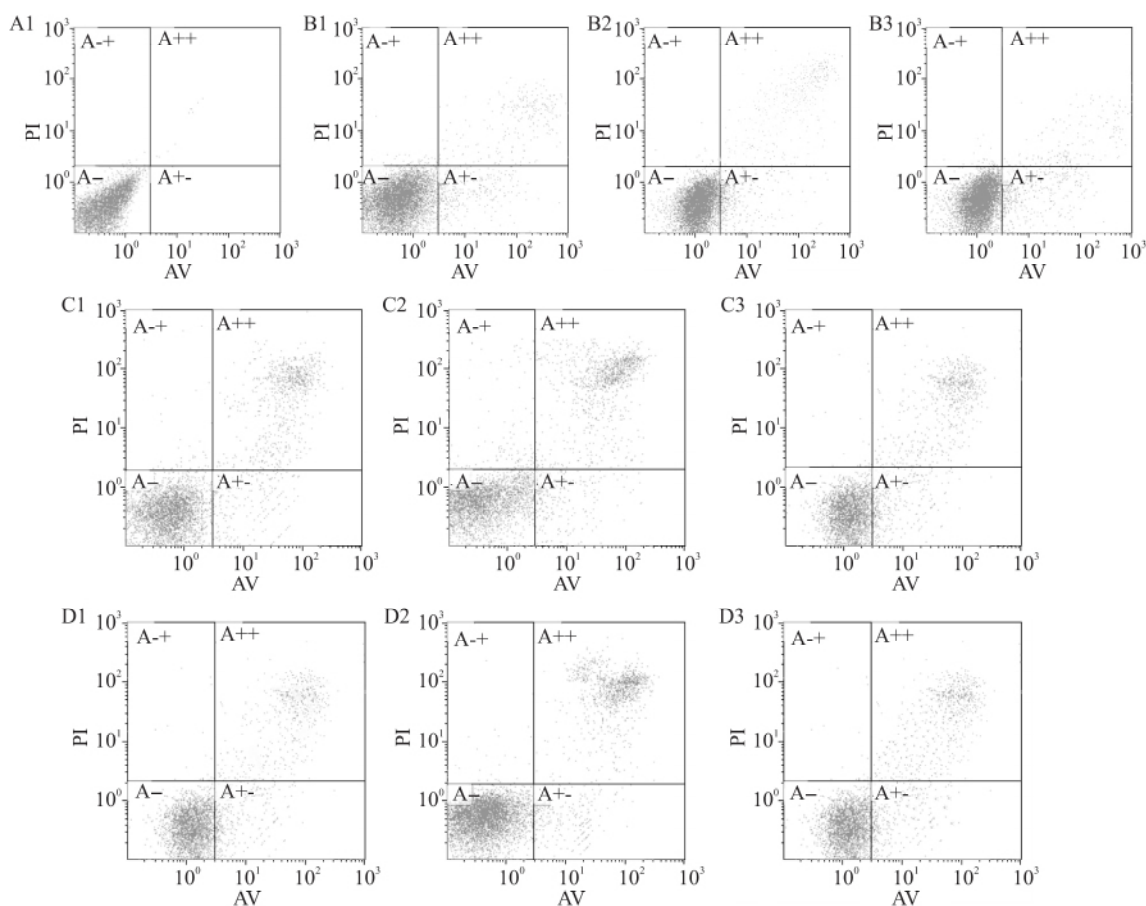


图4 100 ng/ml Acrp30 及 3-MA 预处理,培养 0、24、48、72 h MCF-7 细胞总凋亡的情况

A: 0 h 细胞总凋亡率; B: 24 h 细胞总凋亡率; C: 48 h 细胞总凋亡率; D: 72 h 细胞总凋亡率; 1: 对照组; 2: Acrp30 + 3-MA 组; 3: Acrp30 组

能有着双重的作用,肿瘤细胞发生自噬后会出现两种不同的结果,一种是发生死亡,抑制肿瘤细胞增殖;另一种为保护性的稳定细胞内环境,使肿瘤细胞耐受低氧等应激,保护细胞逃离化疗药物的损害,维持细胞存活。本实验显示,Acrp30 可降低乳腺癌细胞的活性增加细胞的凋亡率,但使用自噬抑制剂特异性抑制自噬后细胞活性进一步下降,凋亡率进一步增加,说明 Acrp30 既能诱导 MCF-7 细胞的凋亡又能诱导其发生自噬;而在 Acrp30 对乳腺癌细胞的作用过程中,自噬可能是作为一种保护机制被诱导发生,用于稳定细胞的内环境,清除 Acrp30 引起的一些受损的细胞器及代谢产物,从而延缓细胞凋亡的发生,部分对抗 Acrp30 对细胞的促凋亡作用的。

综上所述,通过本实验可以初步表明 Acrp30 在乳腺癌的增殖、凋亡、自噬等病理生理过程中发挥着重要的作用,主要是抑制 MCF-7 细胞的增殖、迁移活性,促进细胞的凋亡及诱导细胞自噬水平的增强;在 Acrp30 促进乳腺癌细胞凋亡的过程中,自噬同样被诱导,在一定程度上对细胞起着保护性作用,部分抵抗了细胞的凋亡进程,因此,有理由推测提高体内 Acrp30 水平在一定程度上可降低乳腺癌的发生、发展的风险,如加强体育锻炼、减重、地中海式饮食等^[4];另外 Acrp30 对乳腺癌自噬与凋亡之间的相关性也为乳腺癌提供了一个潜在性的预测因子及治疗靶点,对不同生理条件下自噬水平的干预可能会成为未来治疗乳腺癌的一种新的方向。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Cleary M P, Grossmann M E, Ray A. Effect of obesity on breast cancer development [J]. *Vet Pathol*, 2010, 47(2): 202–13.
- [3] Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(15): 5699–704.
- [4] Hou W K, Xu Y X, Yu T, et al. Adipocytokines and breast cancer risk [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(18): 1592–6.
- [5] Oh S W, Park C Y, Lee E S, et al. Adipokines, insulin resistance, metabolic syndrome, and breast cancer recurrence: a cohort study [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2): R34.
- [6] 钟秀彩, 孔祥顺, 李元栋. 乳腺癌患者血清 Acrp30 测定及其与临床特征的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(10): 2070–2.
- [7] Barb D, Williams C J, Neuirth A K, et al. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(3): s858–66.
- [8] Edwards T L, Velez Edwards D R, Villegas R, et al. HTR1B, ADIPOR1, PPARGC1A, and CYP19A1 and obesity in a cohort of Caucasians and African Americans: an evaluation of gene-environment interactions and candidate genes [J]. *Am J Epidemiol*, 2012, 175(1): 11–21.
- [9] Jeong Y J, Bong J G, Park S H, et al. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer [J]. *J Breast Cancer*, 2011, 14(2): 96–103.
- [10] 母飞飞, 王佑民, 王 琼, 等. 重组人球形脂联素抑制 MCF-7 细胞生长及 NF- κ B 的相关性 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(2): 177–81.
- [11] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069–75.
- [12] Indelicato M, Pucci B, Schito L, et al. Role of hypoxia and autophagy in MDA-MB-231 invasiveness [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2): 359–68.
- [13] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1524–32.
- [14] Dalamaga M, Diakopoulos K N, Mantzoros C S. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence [J]. *Endocr Rev*, 2012, 33(4): 547–94.

The relation of autophagy and apoptosis induced by adiponectin in the MCF-7 cells

Liu Jia, Wang Youmin, Hu Honglin, et al

(*Dept of Endocrinology, Institute of Endocrinology and Metabolism, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To explore the effect of adiponectin(Acrp30) on the proliferation, migration, autophagy, apoptosis of MCF-7 cells and investigate the relation of autophagy and apoptosis induced by adiponectin. **Methods**

Divided the MCF-7 cells into control group (no Acrp30 added), drug added group, then cultured for some hours. The cells viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. An appropriate concentration

二甲双胍对 2 型糖尿病模型大鼠肾组织 nephrin 表达的影响

翟丽敏¹, 叶山东¹, 顾俊菲¹, 杨迪¹, 胡闻²

摘要 目的 观察不同剂量二甲双胍(MET)对 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠肾组织 nephrin 表达的影响,了解其对肾小球足细胞的保护作用。方法 高脂饲料喂养结合腹腔注射小剂量链脲佐菌素(STZ)建立 T2DM 大鼠模型,给予不同剂量[50、300、500 mg/(kg·d)] MET 干预治疗(MET1 组、MET2 组、MET3 组),并设立糖尿病模型组(T2DM 组)和正常对照组(NC 组)。8 周后,观察各组大鼠血糖(BG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、尿素氮(BUN)、尿白蛋白和尿 nephrin 排泄的情况以及肾脏组织病理改变和 nephrin 表达的变化。结果 8 周末,MET 三组 BG、HbA1c、尿白蛋白/尿肌酐(UACR)、基底膜厚度(GBMT)和足突融合率(FRFP)明显低于 T2DM 组,高于 NC 组($P < 0.05$);MET2、MET3 组低于 MET1 组($P < 0.05$)。MET 组血 BUN、尿 nephrin/尿肌酐(UNER)低于 T2DM 组($P < 0.05$),MET3 与 MET1 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。MET 组肾组织 nephrin 蛋白和 mRNA 表达较 T2DM 组显著升高($P < 0.05$),但是低于 NC 组

($P < 0.05$);各 MET 组间 nephrin 蛋白表达差异无统计学意义,MET3 组 nephrin mRNA 表达高于 MET1 组($P < 0.05$)。

结论 MET 可减轻 T2DM 模型大鼠肾组织 nephrin 表达的减少和保护足细胞,并有一定的剂量依赖性。

关键词 2 型糖尿病;糖尿病;二甲双胍;nephrin;足细胞

中图分类号 R 977.15;R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1228-05

二甲双胍(metformin,MET)是治疗 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)的一线首选药物,除降糖作用以外,还可通过抑制炎症反应、抗氧化应激和改善胰岛素抵抗和脂质代谢等机制预防和延缓糖尿病肾病的发生和进展^[1],但确切机制尚不清楚。nephrin 是构成肾小球裂孔膜的主要构架分子,其参与足细胞的信号传导并维持足细胞的形态。该实验观察不同剂量 MET 对 T2DM 大鼠肾组织 nephrin 的表达及尿排泄的影响,旨在探讨不同剂量 MET 对 T2DM 模型大鼠足细胞的保护作用及其与剂量的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 45 只,雄性,2 月

2015-04-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M159);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A157)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹内分泌科、²病理科,合肥 230001

作者简介:翟丽敏,女,硕士研究生;

叶山东,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: ysd196406@163.com

Acrp30(100 ng/ml) was selected to add into the cells after culturing for some hours, the morphological changes, migration and autophagy level were quantified by invert microscope, wound-healing assay and Western blot respectively. The total apoptotic rate of added Acrp30 and pretreated with an autophagy inhibitor 3-methyladenine aggravated (MA) groups were analyzed by flow cytometry. **Results** ① Compared with the control group, the viability of 50, 100 ng/ml cultured 72 h and 200 ng/ml cultured 48, 72 h groups were lower ($P < 0.05$); ② Compared with the control group, the migration lengths of Acrp30 added group 48, 72 h were decreased ($P < 0.01$); ③ The level of autophagy (autophagy associated protein LC3B-II/LC3B-I) was up-regulated after Acrp30 added group cultured 24, 48 h compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but the ratio was reduced along with time, after 72 h, it had no difference with the control; ④ The apoptotic rate of MCF-7 cells increased after 48 h, 72 h treated with 100 ng/ml Acrp30 and pretreated with MA groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared with the control group. Furthermore, the 72 h apoptotic rate of (Acrp30 + MA) group was increased compared with Acrp30 group ($P < 0.05$).

Conclusion Acrp30 can inhibit the growth and migration of MCF-7 cells and induce the autophagy and apoptosis. Inhibit autophagy can promote the apoptosis which induced by adiponectin in MCF-7 cells.

Key words adiponectin; MCF-7 cell; proliferation; autophagy; apoptosis