

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0259-04

·实验研究·

重组腺病毒 I κ B α M 抑制高糖诱导的血管内皮细胞炎症因子的异常分泌

肖彧君, 李春霖, 刘冰熔¹, 黄爱龙¹, 邓华聪²

(中国人民解放军总医院内分泌科, 北京市 100853;

1. 重庆医科大学肝炎研究所; 2. 附属第一医院内分泌科, 重庆市 400010)

[关键词] 内科学; 重组腺病毒 I κ B α M 抑制血管内皮细胞炎症因子; 电泳迁移率变动分析; 核因子 κ B; I κ B α ; 血管内皮细胞; 炎症因子

[摘要] 构建携有核因子 κ B 抑制物 I κ B α 的突变体 I κ B α M 的重组腺病毒(AdI κ B α M), 并感染 ECV304 血管内皮细胞, 采用 Western blot、电泳迁移率变动分析和逆转录-聚合酶链反应等方法研究核因子 κ B 在高浓度葡萄糖刺激的 ECV304 细胞分泌功能中所起的作用以及阻断其活性对内皮细胞分泌功能的影响。结果发现, 高糖能诱导 ECV304 细胞 I κ B α 的降解和核因子 κ B 的激活, 同时上调炎症因子细胞间粘附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和内皮素 1 mRNA 表达水平, 而感染 AdI κ B α M 的 ECV304/I κ B α M 细胞则能拮抗高糖所致的 I κ B α 降解与核因子 κ B 激活, 同时下调这些炎症因子的异常分泌水平。结果提示, 核因子 κ B 的激活在高糖所致的内皮细胞分泌功能改变中起中轴作用, 抑制核因子 κ B 的活化, 有助于改善血管内皮细胞功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Recombinant Adenovirus I κ B α M Inhibit the I κ B α Increased Expression of Inflammatory Factors Mediated by High Doses of Glucose in Vascular Endothelial Cells

XIAO Yu-Jun, LI Chun-Lin, LIU Bing-Rong, HUANG Ai-Long, and DENG Hua-Cong

(Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Nuclear Factor- κ B; I κ B α ; Vascular Endothelial Cell; Inflammatory Factor; Recombinant Adenovirus; High Doses of Glucose

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in high doses of glucose (HG) induced impairment of ECV304 cells, a vascular endothelial cell line. **Methods** Recombinant adenovirus mediated nuclear factor- κ B super-repressor I κ B α M with mutant I κ B α was constructed. Western blot, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay were applied in this study. **Results** HG induced I κ B α degradation and nuclear factor- κ B activation were found in ECV304 cells but not in ECV304/I κ B α M cells infected with I κ B α M recombinant adenovirus. The expression of inflammatory factors such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), endothelin-1 (ET-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) of ECV304 cells incubated with HG was increased obviously, but ECV304/I κ B α M cells could resist HG induced increase of the expression of inflammatory factors. **Conclusions** HG increase the expression of inflammatory factors in vascular endothelial cells. Inhibition of nuclear factor- κ B activation can protect vascular endothelial cells from the cytotoxicity of HG.

血管内皮细胞的损伤是糖尿病血管病变发生的前提^[1], 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展过程中起着重要作用。血管内皮不仅是血管内膜的一道重要屏障, 而且还具有内分泌功能, 能分泌多种活性因子。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)

参与多种与动脉粥样硬化发生有关的炎症因子基因表达的调控^[2-5], 可能在糖尿病动脉粥样硬化的发生中发挥重要作用, 本研究通过构建含有核因子 κ B 的超抑制物 I κ B α 突变体的重组腺病毒 I κ B α M, 并感染 ECV304 细胞, 研究高浓度葡萄糖对血管内皮细胞分泌功能的影响以及核因子 κ B 在此过程中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

人血管内皮细胞株 ECV304 细胞和人胚肾细胞

[收稿日期] 2003-12-22 [修回日期] 2003-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30070297) 和国家 863 重点项目 (2001AA217121) 资助

[作者简介] 肖彧君, 博士, 主治医师, 研究方向为糖尿病及其大血管并发症, 联系电话为 010-66937002, E-mail 为 xiaow626@163.com。李春霖, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病, 联系电话为 01066936403。黄爱龙, 硕士, 教授, 为本实验指导者, 研究方向为心血管病及肿瘤的基因治疗、重要疾病的细胞信号转导机制, 联系电话为 02363825854。

株 293 均购自中国科学院上海细胞所;胎牛血清购自 Hyclone 公司, Gel Shift Assay System 试剂盒(含核因子 κ B 一致序列探针)、鼠抗人 I κ B α 抗体(一抗)和 DAB 显色剂购自 Promega 公司;预染色蛋白质标准分子量标志物和免疫印迹 PVDF 膜购自 Roche 公司; [γ - 32 P]ATP (370 GBq/L) 购自北京亚辉公司; DNA marker 购自 Roche 公司。ECV304 细胞和 293 细胞(包装与扩增)分别培养于含 10% 和 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.2 重组腺病毒 I κ B α M 的构建

应用新型腺病毒载体构建系统 AdEasy 系统(美国 John Hopkins 肿瘤研究中心 Tong-Chuan HE 博士惠赠)^[6], 按文献[7]方法构建含 I κ B α M 基因的 AdI κ B α M。

1.3 重组腺病毒 I κ B α M 的扩增和感染细胞

按文献[7]方法在 293 细胞中扩增重组腺病毒 I κ B α M 及病毒滴度测定。当 ECV304 细胞 80% 汇合即可进行重组腺病毒 I κ B α M 感染。感染前一天将细胞换液,按 2×10^5 /孔接种 6 孔板中,将 AdI κ B α M 原液用无血清的 1 640 培养基稀释,用 0.1、1、10、20、50 及 100 等不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)(病毒颗粒/ECV304 细胞数)的腺病毒感染。AdEasy 系统在细胞内可以表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。

1.4 细胞基因的转导和样品收集

按测定的 MOI 数感染 ECV304 细胞,当几乎 100% 的细胞有荧光时(约 48 h),未加高糖的 ECV304 细胞立即收获,需诱导的细胞弃掉培养基并加入高糖(40 mmol/L),72 h 后再收集细胞,分别于 -20°C 和 -70°C 保存。

1.5 Western 印迹杂交^[8]

-20°C 保存的细胞用 12% SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转、免疫印迹杂交检测 I κ B α 的表达,蛋白上样量为 100 μg ;一抗 I κ B α 抗体工作液稀释比为 1:500,二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗工作液稀释比为 1:500,用新配制的 DAB 显色液进行显色。

1.6 电泳迁移率变动分析法

保存于 -70°C 的细胞按文献[9]提取核蛋白。核因子 κ B 寡核苷酸探针的放射性标记和纯化按 Gel Shift Assay System 试剂盒说明书操作。

电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)按文献[9]进行。将核蛋白与 32 P 标记的核因子 κ B 寡核苷酸探针混匀, 37°C 水浴 45 min,反应体系按纯水:Gel Shift Binding 5 \times buffer:核蛋白:探针为 5:2:2:1 进行配制。总体积 20 μL 上

样,6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。将凝胶放入装有 X 光片的暗盒中, -70°C 曝光 24~72 h 后洗片。

1.7 逆转录—聚合酶链反应

-70°C 保存的细胞总 RNA 用总 RNA 提取试剂盒(购自 QIAGEN 公司)提取。逆转录反应用逆转录试剂盒(购自 Pharmacia 公司),按说明书进行操作。反应体系为 dNTP 2 μL 、Taq 酶 0.5 μL 、10 \times RNA PCR Buffer 3 μL 及引物 1 μL (每种引物在反应体系内的终浓度为 10 pmol/L),灭菌蒸馏水补足体积至 25 μL 。cDNA 片段扩增的反应条件为 95°C 变性 45 s \rightarrow 55°C 退火 55 s \rightarrow 72°C 延伸 3 min, 25 个循环。循环结束后,最后延伸 5 min。

引物序列设计^[10,11]:单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 为 5'-AACT-GAAGCTCGCACTTCTCG-3' 和 3'-TCAGCACAGATCTC-CTTGGC-5', 扩增产物大小为 250 bp。 β -actin 为 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3' 和 3'-TAGCTCTTCT-TCAGGGAGGA-5', 扩增产物大小为 500 bp。内皮素 1 为 5'-CCTTGCTCCTCCTCCTCCTTGATGG-3' 和 5'-AAGTCCCAGCCAGCATGGAGAGCG-3', 扩增产物大小为 543 bp。根据 GenBank 中细胞间粘附分子 1(inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 基因序列,应用 Primer Design 软件设计 ICAM-1 引物为 5'-CCT-CAAAAGTCATCCTGA-3' 和 5'-GGTGAGGAAGGTTT-TAGC-3', 扩增产物大小为 227 bp。取聚合酶链反应产物 5 μL , 加样于 1% 琼脂糖凝胶中,电压 4 V/cm。于紫外灯下观察结果。用凝胶成像分析仪分析 DNA 条带灰度值,以 β -actin mRNA 的 RT-PCR 产物为内参照,计算待测 mRNA 的逆转录—聚合酶链反应产物与 β -actin 灰度值的比值作为待测 mRNA 的表达值。

2 结果

2.1 重组腺病毒 I κ B α M 在 293 细胞中的扩增及病毒滴度

重组腺病毒 I κ B α M 感染细胞 36 h 后,即可观察到明亮的绿色荧光蛋白表达。病毒滴度为 2.5×10^{12} pfu/L。

2.2 重组腺病毒 I κ B α M 感染 ECV304 细胞及 I κ B α 的表达

随 MOI 增高,阳性感染细胞数增多,当 MOI 为 80 时感染效率达到 100%。高糖时 ECV304/I κ B α M 细胞内新表达的 I κ B α M 未降解,而 ECV304 细胞内的 I κ B α 则可降解(图 1, Figure 1)。

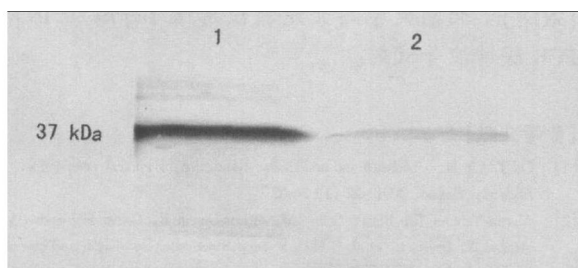


图 1. Western blot 法检测高糖刺激后 ECV304 细胞中 IκBα 的表达 1 为 ECV304/IκBαM 细胞组; 2 为 ECV304 细胞组。

Figure 1. The expression of IκBα in ECV304 cells and ECV304/IκBαM cells treated by high doses of glucose used Western blot

2.3 重组腺病毒 IκBαM 对核因子 κB 激活的抑制作用

高糖未能诱导感染 IκBαM 的 ECV304 细胞核因子 κB 活化,而未感染 IκBαM 的细胞核因子 κB 明显活化(图 2, Figure 2)。

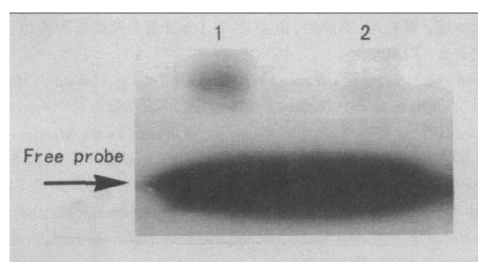


图 2. 电泳迁移率变分析法检测核因子 κB 活性 1 为 ECV304 + HG 细胞组; 2 为 ECV304/IκBαM + HG 细胞组。

Figure 2. The activity of NF-κB using EMSA

2.4 高糖对 ECV304 细胞和 ECV304/IκBαM 细胞分泌炎症因子的影响

高糖使未感染 AdIκBαM 的 ECV304 细胞分泌的 ICAM-1、MCP-1 和内皮素 1 mRNA 表达明显高于对照细胞和感染 AdIκBαM 细胞,感染 AdIκBαM 可拮抗高糖的这种效应(表 1 和图 3, Table 1 and Figure 3)。

表 1. 各待测基因 mRNA 的逆转录—聚合酶链反应产物的灰度比值

Table 1. The ratio of the value of the RT-PCR product of various examined genes

指 标	ECV304	ECV304/ IκBαM	ECV304/ IκBαM + HG	ECV304 + HG
ICAM-1	0.3198	0.3319	0.7447	0.3715
内皮素 1	0.1847	0.2369	0.6521	0.2315
MCP-1	0.3398	0.3313	0.9904	0.3160

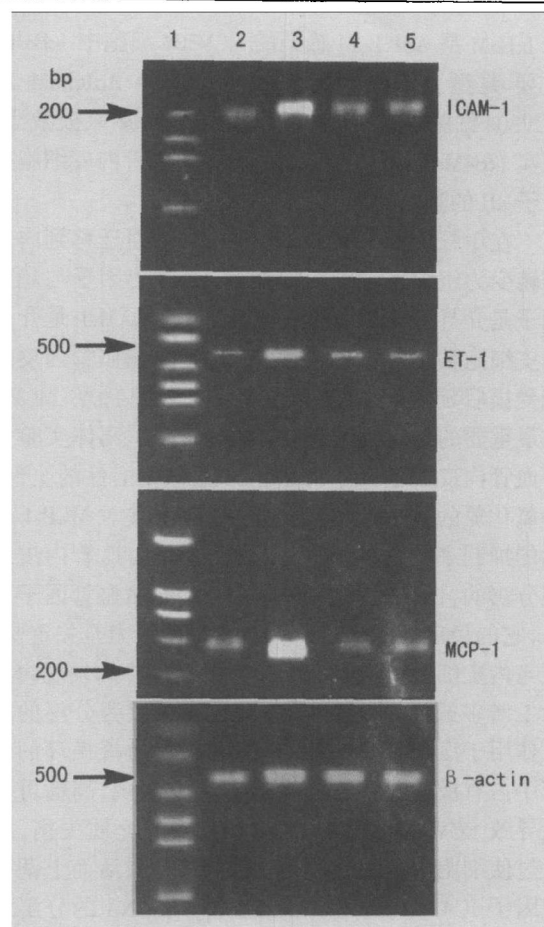


图 3. 细胞间粘附分子 1(A)、内皮素 1(B)和单核细胞趋化蛋白 1(C) mRNA 逆转录—聚合酶链反应产物电泳情况 1 为 DNA Marker; 2 为 ECV304 细胞组; 3 为 ECV304 + HG 细胞组; 4 为 ECV304/IκBαM + HG 细胞组; 5 为 ECV304/IκBαM 细胞组。

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of ICAM-1, MCP-1, and ET-1 mRNA

3 讨论

与逆转录病毒载体相比,腺病毒载体由于其高效、安全常被制成疫苗应用于临床。本研究发现,重组腺病毒转染 293 细胞后,测得其感染滴度为 2.5×10^{12} pfu/L,用不同 MOI 的重组腺病毒感染 ECV304 细胞,随着 MOI 增高,阳性感染的细胞数也增多,当 MOI 为 80 时,ECV304 细胞的感染效率达到 100%,说明重组腺病毒 IκBαM 能有效转导 ECV304 细胞,感染效率较高。

IκBαM 作为 IκBα 的突变体,其磷酸化位点丧失,导致与其结合的核因子 κB 无法解离,从而阻滞了核因子 κB 的激活。Western blot 证实高糖刺激后,感染 AdIκBαM 的 ECV304 细胞 IκBαM 未降解,而未感染 AdIκBαM 的 ECV304 细胞 IκBα 则可降解,说明突变

的 I κ B α M 是 AdI κ B α M 感染的 ECV304 细胞中 I κ B α 的主要类型。EMSA 分析表明,感染 AdI κ B α M 的 ECV304 细胞经高糖诱导后核因子 κ B 不能被激活,证实 I κ B α M 能有效阻滞高糖诱导的血管内皮细胞核因子 κ B 的激活。

在单核细胞与内皮细胞粘附、继而迁移到内皮下转变为组织巨噬细胞的过程中,粘附因子与趋化因子是介导细胞粘附的重要因素。ICAM-1 是介导内皮细胞粘附的主要粘附分子,具有在血管内皮细胞受损后延迟表达和表达持续长久的特点;MCP-1 是最重要的趋化因子之一,几乎占据了离体实验中由血管内皮细胞分泌的单核细胞趋化活性的全部。一氧化氮的抗 As 效应部分就是由于其对 MCP-1 表达的抑制来实现的^[12,13];内皮素 1 是由血管内皮细胞分泌的,也是目前发现的最强大的缩血管因子之一,它的稳定表达对于维持血管基础张力至关重要,在与内皮细胞功能紊乱相关性的疾病中均发现内皮素 1 增多或活性增强^[14-17],内皮素 1 以旁分泌的方式作用于血管平滑肌细胞,这在局部血液循环的调节中占有极其重要的作用。本研究发现,高糖可直接导致 ECV304 血管内皮细胞分泌的介质失衡,即通过使细胞内 I κ B α 降解和核因子 κ B 激活而上调炎症因子 ICAM-1、MCP-1 和内皮素 1 mRNA 的分泌水平;感染 AdI κ B α M 的 ECV304 血管内皮细胞则通过抑制核因子 κ B 的激活拮抗高糖的这种效应,说明核因子 κ B 的激活在上述过程中起中轴作用。

因此,推测高糖所致血管内皮细胞的激活导致 As 发生、发展的可能环节有:内皮细胞激活释放高活性内皮素 1,使细胞表面特性改变,作用于血管壁,促进血管收缩,降低血液切应力,加剧内皮细胞损伤;内皮细胞激活后 ICAM-1 和 MCP-1 分泌增多,使内皮细胞、单核细胞与血管壁的粘附增加,促进 As 以及糖尿病血管并发症的发生发展。干预高血糖所介导的核因子 κ B 的激活,有可能减轻高血糖对内皮细胞的损害,改善血管内皮细胞功能,降低 As 早期的细胞粘附,调节血管紧张度和血液流量,改善局部血液循环,从而延缓或阻滞 As 的发生,产生抗 As 效应。这些均有助于防治糖尿病血管并发症的发生发展,也是防治 As 的又一新的治疗策略。

[致谢] 北京大学马大龙教授惠赠 Taq 酶和 10 × PCR 缓冲液等试剂。

[参考文献]

- [1] Cal J, Cip M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Review*, 2001, 22 (1): 36-52
- [2] Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, et al. 核因子 kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke*, 2004, 35 (2): 458-463
- [3] Yoshizumi M, Fujita Y, Izawa Y, Suzuki Y, Kyaw M, Ali N, et al. Elacsen inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced c-Jun N-terminal kinase activation and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Exp Cell Res*, 2004, 292 (1): 1-10
- [4] Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126 (6): 1 886-891
- [5] Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, et al. Role for nuclear factor-kappaB and signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced endothelin-1 release in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 2003, 64 (4): 923-931
- [6] He TC, Zhou S, do Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant Adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (3): 2 509-514
- [7] 刘冰熔,黄爱龙,肖晓君,沈鼎明. I κ B α M 重组腺病毒的构建. 免疫学杂志, 2003,
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning A laboratory Manual. 3rd ed. Beijing: Science Publishing House, 1992; 880-886
- [9] Lahiri DK, Go Y. Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA-protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000, 5: 257-265
- [10] Hm CG, Park JK, Hong SP. A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemoattractant peptide-1 in human mesangial cells. *J Nephron*, 1998, 79: 33-37
- [11] Alanen K, Deng DX, Chakrabarti. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology*, 2000, 36 (1): 161-167
- [12] Kim SH, Kang YJ, Kim WJ, Woo DK, Lee Y, Kim DI, et al. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J*, 2004, 68 (4): 396-399
- [13] Kitamoto S, Egashira K. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy for cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2003, 1 (3): 393-400
- [14] Pekdemir H, Cicek D, Camsari A, Akkus MN, Cin VG, Doven O, et al. The relationship between plasma endothelin-1, nitric oxide levels, and heart rate variability in patients with coronary slow flow. *Ann Noninvasive Electrocardiol*, 2004, 9 (1): 24-33
- [15] Kirilov G, Tomova A, Dakovska L, Kumanov P, Shinkov A, Alexandrov AS. Elevated plasma endothelin as an additional cardiovascular risk factor in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2003, 149 (6): 549-553
- [16] Amann K, Tyralla K, Gross ML, Eifert T, Adamczak M, Ritz E. Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. *Clin Nephrol*, 2003, 60 (7) Suppl 1: S13-21
- [17] Boussette N, Gaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81 (6): 578-587

(此文编辑 朱雯霞)