

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0309-04

·实验研究·

高浓度葡萄糖条件下血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κ B 和单核细胞趋化蛋白 1 的影响

张 栩, 赵家军, 于 文

(山东省立医院内分泌科, 山东省济南市 250021)

[关键词] 内科学; 内皮细胞; 单核细胞趋化蛋白 1; 血管紧张素 II; 高葡萄糖血症; 核因子 κ B

[摘要] 观察高糖环境下血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κ B 活性、单核细胞趋化蛋白 1 表达及氯沙坦的干预作用。应用激光共聚焦显微镜观察核因子 κ B 活性变化, 逆转录-聚合酶链反应测定内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达, 酶联免疫吸附法检测培养基中单核细胞趋化蛋白 1 含量变化。结果发现, 高糖(25 mmol/L)、 10^{-7} mol/L 血管紧张素 II 均能显著刺激内皮细胞核因子 κ B 活化、单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达, 培养基中单核细胞趋化蛋白 1 含量及其对单核细胞趋化活性亦显著增强, 高糖环境显著增加血管紧张素 II 诱导的核因子 κ B 活化、单核细胞趋化蛋白 1 表达, 氯沙坦有显著抑制作用。提示高糖促进血管紧张素 II 对内皮细胞的刺激作用, 氯沙坦通过抑制内皮细胞核因子 κ B 活化和单核细胞趋化蛋白 1 的表达, 对动脉粥样硬化发展起到防治作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Angiotensin II on Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Nuclear Factor κ B in Endothelial Cell under Conditions of High Concentration Glucose

ZHANG Xu, ZHAO Jia-Jun, and YU Wen

(Department of endocrinology, Shandong provincial hospital, Jinan 250021, China)

[KEY WORDS] Angiotensin II; Endothelial Cell; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin II (Ang II) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) in the endothelial cells under high glucose conditions, and the influence of losartan on MCP-1 and NF- κ B. **Methods** MCP-1 mRNA was analyzed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and the level of MCP-1 in culture media was measured by means of sandwich ELISA method. NF- κ B activation in endothelial cells was determined with laser scanning confocal microscope. **Results** Ang II significantly increased the levels of MCP-1 mRNA and protein expression and NF- κ B activation in the cultured endothelial cells. High glucose (25 mmol/L) could significantly increase the activation of NF- κ B and the expression of MCP-1 in endothelial cells, while normal glucose (5 mmol/L) could not. It was also shown that high glucose promoted Ang II-induced NF- κ B activation and MCP-1 expression in endothelial cells. Losartan significantly inhibited MCP-1 mRNA and protein expression and markedly reduced the contents of MCP-1. **Conclusion** High glucose aggravate Ang II-induced NF- κ B activation and MCP-1 expression in endothelial cell, which can be significantly inhibited by Losartan.

大血管病变 (macroangiopathy, MA) 是 2 型糖尿病患者主要致残致死原因, 其病理基础是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成^[1]。血管内皮细胞易受高糖损害, 受损内皮细胞与血流及血管壁其他细胞相互作用, 分泌多种细胞因子, 从而启动 As 过程^[2]。As 进展过程中有局部肾素-血管紧张素系统活性增强, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 可刺激内皮细胞产生炎症因子, 故 Ang II 在 As 中的炎症作用受到重视^[3]。单核细胞迁入血管内膜下是

As 形成的早期事件, 并贯穿其全过程, 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 是这一过程中的主要细胞因子^[4]。今观察高糖环境下 Ang II 对内皮细胞核因子 κ B 活化、MCP-1 mRNA 和蛋白表达以及对单核细胞趋化活性的影响, 另外应用 Ang II 1 型受体拮抗剂氯沙坦进行干预研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DMEM/F12、RPMI1640 培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司, Ang II 和吡咯二硫氨基甲酯 (pyrrolidone dithiocarbamate, PDTCT) 购于 Sigma 公司, 羊抗 MCP-1 抗体和兔抗人核因子 κ B P65 多克隆抗体购

[收稿日期] 2003-04-09 [修回日期] 2003-0-0

[作者简介] 张栩, 博士, 主治医师, 研究方向为糖尿病与血管病变, 联系电话为 0531-7938911; E-mail 为 zhangxu69@163.net。赵家军, 博士, 内分泌科教授, 博士研究生导师。于文, 硕士研究生, 主治医师。

于 Santacruz 公司, MCP-1 双抗体夹心法酶联免疫试剂盒购于 Endogen 公司, 逆转录聚合酶链反应试剂盒购于上海生物工程公司, 氯沙坦为默沙东公司惠赠, 内皮细胞株购自上海细胞生物学研究所。

1.2 内皮细胞培养

应用 DMEM/F12 培养基加入终浓度 10% 胎牛血清, CO₂ 孵箱中培养, 待细胞贴满培养瓶后可行细胞传代。

1.3 细胞 RNA 提取

应用 Tripure RNA 抽提液提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测吸光度, A260/280 nm 应大于 1.7。

1.4 逆转录聚合酶链反应方法检测

依次加入 1 μL dNTP、1 μL MMLV 逆转录酶、4 μL 5× MMLV 反应缓冲液、1 μL 随机引物和 0.5 μL RNA 酶抑制剂, 混匀, 加入适量 RNA 样品(约 0.5~2 μg), 随后用 DEPC 处理的双蒸水补足至 20 μL 混匀。放置于 37℃ 水浴 2 h。95℃ 变性 5 min, 10 kr/min 离心 5 min 备用。在 0.5 mL 反应管内依次加入 1 μL 逆转录产物、1 μL dNTP、0.5 μL Taq DNA 聚合酶、5 μL 10× 缓冲液和 5 μL 15 mmol/L MgCl₂, 混匀, 加入适量引物, 用 DEPC 处理的双蒸水补足至 50 μL, 上机循环。循环参数为 94℃ 预变性 5 min→94℃ 变性 50 s→55℃ 退火 50 s→72℃ 延伸 1 min, 循环 32 次; 72℃ 再延伸 8 min。聚合酶链反应产物经琼脂糖凝胶电泳后进行 DNA 凝胶成像系统分析。引物参照文献[6]设计: MCP-1(320 bp) 为 5'-CAG CCA GAT GCA ATC ATC C-3'; 5'-GTG GTC CAT GGA ATC CTG AA-3'; β-actin(528 bp) 为 5'-CTA CAA TGA GCT GCC TGT GG-3'; 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT C-3'。

1.5 培养基中单核细胞趋化蛋白 1 浓度测定

依试剂盒说明书, 用夹心酶联免疫吸附法方法完成。

1.6 单核细胞趋化活性测定

应用淋巴细胞分层液分离血中单个核细胞, 用粘附法从单个核细胞中分离单核细胞。应用改良的 Boyden 小室完成单核细胞趋化运动检测。

1.7 激光共聚焦显微镜检查核因子 κB 活性

参照文献[5]有所修改。制备细胞爬片, 应用 4℃ 丙酮固定 5 min, 冷甲醇固定 5 min, PBS 漂洗 2 次, 加入 1:100 稀释的兔抗人核因子 κB P65 抗体, 37℃ 孵育 1 h, 然后 PBS 漂洗 5 min。加入荧光标记羊抗兔抗体, 37℃ 避光孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min。应用激光共聚焦细胞分析仪镜下任选 5 个视野, 分别进行薄层扫描, 以荧光强度最强的层面代表每个视野中细胞的荧光强度, 取平均值。

1.8 观察不同浓度的血管紧张素 II 的影响

内皮细胞接种于 24 孔培养板上, 待细胞完全融合后更换培养基, 用于分组实验: 不同浓度 Ang II (10⁹~10⁶ mol/L) 作用 12 h 后, 收集各标本, 观察内皮细胞 MCP-1 mRNA 表达和核因子 κB 活性变化, 以及培养基中 MCP-1 含量变化及其对单核细胞趋化活性的影响, MCP-1 抗体对趋化活性的影响。每孔重复 6 次, 取平均值。

1.9 血管紧张素 II 影响的实验分组

实验分为 6 组: ① 对照组; ② 正常糖组用 5 mmol/L 葡萄糖作用 24 h; ③ 正常糖 + Ang II 组用 5 mmol/L 葡萄糖作用 12 h 后加入终浓度 10⁷ mol/L Ang II 共同作用 12 h; ④ 高糖组用 25 mmol/L 葡萄糖作用 24 h; ⑤ 高糖 + Ang II 组用 25 mmol/L 葡萄糖作用 12 h 后加入终浓度 10⁷ mol/L Ang II 共同作用 12 h; ⑥ 高糖 + Ang II + PDTIC 组为培养基中终浓度 50 μmol/L PDTIC 先与 25 mmol/L 葡萄糖孵育 12 h, 再加入 10⁷ mol/L Ang II 共同作用 12 h。

1.10 氯沙坦干预实验分组

实验分为 ① 对照组; ② Ang II 组用终浓度 10⁷ mol/L Ang II 培养 12 h; ③ 高糖组用 25 mmol/L 葡萄糖作用 12 h; ④ 高糖 + 氯沙坦组用终浓度 10⁶ mol/L 氯沙坦与 25 mmol/L 葡萄糖共同培养 24 h; ⑤ Ang II + 氯沙坦组用终浓度 10⁶ mol/L 氯沙坦先孵育 30 min, 然后加入 10⁷ mol/L Ang II 共同培养 12 h; ⑥ 高糖 + Ang II 组用 25 mmol/L 葡萄糖培养 12 h, 加入 10⁷ mol/L Ang II 培养 12 h; ⑦ 高糖 + Ang II + 氯沙坦组用 25 mmol/L 糖先与 10⁶ mol/L 氯沙坦共同培养 12 h, 再加入 10⁷ mol/L Ang II 作用 12 h。

1.11 统计学分析

应用 SPSS10.0 分析软件完成, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性差异行 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κB 活性和单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

血管紧张素(Ang) II 呈浓度依赖的方式作用于内皮细胞, 10⁷ mol/L 作用 12 h, 可显著增加 MCP-1 表达, 核因子 κB 活性增强, 培养基中 MCP-1 含量显著增高, 趋化运动显著增强, 经用 MCP-1 抗体完全抑制各培养基对单核细胞的趋化运动(表 1 和图 1, Table 1 and Figure 1)。

表 1. 血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of Ang II in different dose on NF- κ B activation and MCP-1 expression in endothelial cell

浓度分组 (mol/L)	MCP-1 (μ g/l)	mRNA 比 (MCP-1/ β -actin)	高倍视野 细胞数	核因子 κ B 活性
对照组	0.75 \pm 0.12	0.16 \pm 0.03	4.4 \pm 1.1	12.2 \pm 5.5
10 ⁻⁹ 组	0.81 \pm 0.14	0.20 \pm 0.04	5.3 \pm 2.6	12.9 \pm 5.2
10 ⁻⁸ 组	1.25 \pm 0.19 ^a	0.25 \pm 0.03 ^a	10.6 \pm 4.8 ^a	33.7 \pm 15.3 ^a
10 ⁻⁷ 组	1.63 \pm 0.21 ^{ab}	0.40 \pm 0.05 ^{ab}	36.5 \pm 8.6 ^{ab}	75.7 \pm 20.6 ^{ab}
10 ⁻⁶ 组	1.62 \pm 0.28 ^{ab}	0.39 \pm 0.06 ^{ab}	35.3 \pm 8.4 ^{ab}	72.9 \pm 22.6 ^{ab}

a: P < 0.01, 与对照组比较; b: P < 0.01, 与 10⁻⁸ mol/L 组比较。

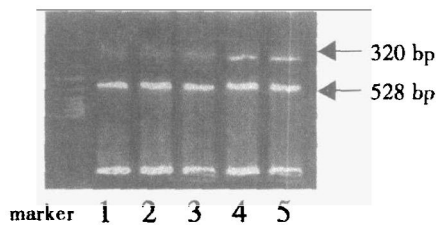


图 1. 不同浓度血管紧张素 II 对内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为 10⁻⁹ mol/L Ang II, 3 为 10⁻⁸ mol/L Ang II, 4 为 10⁻⁷ mol/L Ang II, 5 为 10⁻⁶ mol/L Ang II。

Figure 1. Effect of Ang II in different dose on MCP-1 mRNA expression in endothelial cell

表 2. 高糖环境下血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The effect of Ang II on NF- κ B and MCP-1 in endothelial cell under high glucose conditions

分 组	MCP-1 (μ g/l)	mRNA 比 (MCP-1/ β -actin)	高倍视野 细胞数	核因子 κ B 活性
对照组	0.76 \pm 0.11 ^a	0.16 \pm 0.02 ^a	4.3 \pm 1.1 ^a	11.8 \pm 5.5 ^a
正常糖组	0.78 \pm 0.13 ^a	0.17 \pm 0.03 ^a	4.9 \pm 1.6 ^a	11.9 \pm 5.2 ^a
高糖组	1.29 \pm 0.19 ^{ac}	0.29 \pm 0.05 ^{ab}	14.6 \pm 4.8 ^{ab}	44 \pm 15 ^{ab}
NGAng 组	1.67 \pm 0.27 ^a	0.40 \pm 0.06 ^a	35.5 \pm 7.6 ^a	76.9 \pm 21.6 ^a
HGAng 组	2.49 \pm 0.28 ^{ab}	0.56 \pm 0.05 ^{ab}	49.1 \pm 8.7 ^{ab}	113 \pm 27 ^{ab}
三因素组	0.75 \pm 0.13 ^a	0.16 \pm 0.03 ^a	4.7 \pm 1.6 ^a	11.5 \pm 5.2 ^a

NGAng 组为正常糖 + Ang II 组, HGAng 组为高糖 + Ang II 组, 三因素组为 PDTC + 高糖 + Ang II 组。a: P < 0.01, 与对照组比较; b: P < 0.01, 与正常糖 + Ang II 组比较; c: P < 0.01, 与高糖 + Ang II 组比较。

2.2 高糖环境下血管紧张素 II 对内皮细胞核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

高糖和 Ang II 均可刺激内皮细胞 MCP-1 mRNA 表达增高,核因子 κ B 活性增强,培养基中 MCP-1 含量显著增高,MCA 显著增强;高糖环境下 Ang II 刺激作用更明显。而正常糖组与对照组比较无显著差异

(P > 0.05), PDTC 几乎完全抑制高糖和 Ang II 对 MCP-1 的作用(表 2 和图 2, Table 2 and Figure 2)。

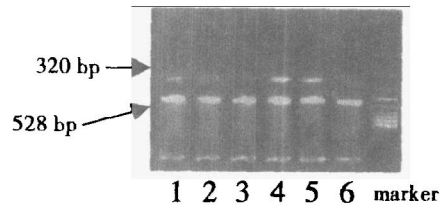


图 2. 高糖环境下血管紧张素 II 对内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达的影响 1 为高糖组, 2 为正常糖组, 3 为 PDTC + Ang II + 高糖组, 4 为高糖 + Ang II 组, 5 为正常糖 + Ang II 组, 6 为对照组。

Figure 2. The effect of Ang II on MCP-1 mRNA expression under high glucose conditions

2.3 氯沙坦对内皮细胞核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 表达及 MCA 的影响

高糖环境下 Ang II 更加显著刺激内皮细胞核因子 κ B 活化和 MCP-1 表达,氯沙坦可显著抑制高糖时 Ang II 对内皮细胞的作用(表 3 和图 3, Table 3 and Figure 3)。

表 3. 氯沙坦对内皮细胞核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The effect of Losartan on NF- κ B and MCP-1 in endothelial cell

分 组	MCP-1 (μ g/l)	mRNA 比 (MCP-1/ β -actin)	高倍视野 细胞数	核因子 κ B 活性
对照组	0.74 \pm 0.14	0.16 \pm 0.04	4.4 \pm 1.8	11.1 \pm 5.2
Ang II 组	1.63 \pm 0.37 ^b	0.40 \pm 0.07 ^b	35.9 \pm 7.3 ^b	75.3 \pm 22.1 ^b
高糖组	1.26 \pm 0.12 ^b	0.28 \pm 0.03 ^b	15.9 \pm 4.3 ^b	44.2 \pm 14.8 ^b
LoAng 组	0.74 \pm 0.13 ^d	0.17 \pm 0.02 ^d	4.9 \pm 1.6 ^d	10.7 \pm 5.2 ^d
LoHG 组	0.92 \pm 0.12 ^{ac}	0.22 \pm 0.05 ^{ac}	9.1 \pm 3.1 ^{ac}	26.6 \pm 7.4 ^{ac}
HGAng 组	2.50 \pm 0.30 ^{cd}	0.55 \pm 0.07 ^{ac}	49.5 \pm 8.7 ^{ac}	114.6 \pm 3 ^c
三因素组	0.94 \pm 0.11 ^{ab}	0.23 \pm 0.06 ^{ad}	10.2 \pm 3.4 ^{ad}	26.4 \pm 8.9 ^{ad}

LoAng 组为氯沙坦 + Ang II 组, LoHG 组为氯沙坦 + 高糖组, HGAng 组为高糖 + Ang II 组, 三因素组为高糖 + Ang II + 氯沙坦组。a: P < 0.05, b: P < 0.01, 与对照组比较; c: P < 0.05, d: P < 0.01, 与 Ang II 组比较; e: P < 0.01, 与高糖组比较。

3 讨论

研究表明, MCP-1 与传统的致 As 危险因素密切相关,其增高是预测心脏猝死和心肌梗死的独立危险因素^[6],动物实验说明 MCP-1 参与 As 进展^[7]。本

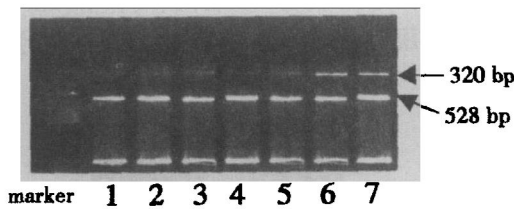


图3. 氯沙坦对内皮细胞单核细胞趋化蛋白1 mRNA表达的影响 1为对照组, 2为高糖+氯沙坦组, 3为高糖组, 4为Ang II+氯沙坦组, 5为高糖+Ang II+氯沙坦组, 6为高糖+Ang II组, 7为Ang II组。

Figure 3. The effect of Losartan on MCP-1 mRNA expression in endothelial cell

组研究资料显示, Ang II促发了内皮细胞 MCP-1 mRNA和蛋白表达, 并且在一定范围内随浓度增加而加强。高糖亦可明显促进内皮细胞 MCP-1 的表达及分泌, 同时高糖环境下显著增强 Ang II 对内皮细胞的作用, 使 MCP-1 表达更加显著, 对单核细胞的趋化活性增强。

核因子 κ B 是 MCP-1 基因转录过程的调控因子, 静息状态时, 它主要位于细胞质中, 活化时, 迅速发生移位, 与核内特异性 κ B 序列结合而启动靶基因转录。研究表明高糖、Ang II 作用于内皮细胞后, 均使内皮细胞核内免疫荧光强度增加, 说明内皮细胞核因子 κ B 活性增强, 进而启动 MCP-1 mRNA 的表达。高糖环境下显著增加 Ang II 对内皮细胞核因子 κ B 的活化, 应用核因子 κ B 抑制剂 PDTC 几乎完全抑制 MCP-1 mRNA 和蛋白表达, 说明高糖促进 Ang II 对内皮细胞 MCP-1 表达的作用是通过增强核因子 κ B 活性完成。

血管紧张素 II 与 AT1R 结合后通过蛋白磷酸化产生一系列细胞效应。氯沙坦可竞争性的与 AT1R 结合, 拮抗血管紧张素 II 的效应, 多中心研究表明氯沙坦可显著改善糖尿病合并高血压病人的预后, 降低病人死亡率, 其有益机制不能单用降低血压解释^[8]。本组研究资料表明氯沙坦显著抑制 Ang II 引起的内皮细胞核因子 κ B 活化, MCP-1 mRNA 及蛋白表达也显著减低, 说明氯沙坦通过抑制核因子 κ B 活化从而降低 MCP-1 生成, 这也部分解释了氯沙坦在防治糖尿病大血管病变中降压以外的有益作用。本

组研究显示, 氯沙坦可抑制高糖对内皮细胞核因子 κ B 活性及 MCP-1 表达, 提示高糖可能通过加强局部 Ang II 的作用进而刺激内皮细胞 MCP-1 产生, 另外, 研究表明高糖明显增加 Ang II 的刺激作用, 而氯沙坦显著抑制 MCP-1 产生, 本研究未检测内皮细胞 Ang II 及其受体(AT1)的变化, 但结合文献[9-11]报道, 可能是高糖激活核因子 κ B, 促进内皮细胞 AT1R 表达, 加速 Ang II 信号传导, 从而促进 Ang II 对 MCP-1 表达的作用, 其具体机制有待进一步探讨。

总之, 本研究表明 Ang II、高糖均能通过激活核因子 κ B 活性进而促进内皮细胞 MCP-1 mRNA 表达和分泌, 增强其对单核细胞趋化活性, 而且高糖能促进 Ang II 对内皮细胞 MCP-1 表达的作用。氯沙坦通过抑制核因子 κ B 活化显著降低内皮细胞 MCP-1 的产生, 从而发挥抗动脉粥样硬化作用。

[参考文献]

- [1] American Diabetes Association. Screening for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2000, 23: S20-23
- [2] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340: 15-126
- [3] Coetzee A, Moretti F, Bungio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, et al. Endothelial activation by angiotensin II through NF kappa B and p38 pathways: Involvement of NF kappa B-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol*, 2003, 195: 402-410
- [4] 于光耀. 单核细胞趋化蛋白1及其在动脉粥样硬化中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1997, 5 (4): 341-345
- [5] 王开颜, 阮旭中, 张智红, 曾绍群. 激光扫描共聚焦显微镜检测核因子 κ B. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23: 141-143
- [6] De Lemos JA, Morrow DA, Sabatine SA, Murphy SA, Gibson GM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003, 107: 690-695
- [7] 崔华, 何作云. 不同阶段食饵性动脉硬化血管壁核因子 κ B 活化和单核细胞趋化蛋白1与蛋白激酶 Ca 的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (4): 312-315
- [8] Dahlof B, Devereux B, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention for endpoint reduction in hyper-tension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*, 2002, 359: 995-003
- [9] Hammou M, Polan J, Natarajan M, Mohan S. High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration. *Atherosclerosis*, 2002, 162: 277-287
- [10] Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates Angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells. The potential role of transcription factor NF- κ B. *Circulation*, 2000, 102: 1970-976
- [11] 李爱民, 何作云, 周小波, 覃军, 耿建萌. 氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化因子-1 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (2): 108-111

(此文编辑 胡必利)