

[文章编号] 1007-3949(2006)14-01-0017-04

• 实验研究 •

高糖作用下脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子基因表达与蛋白激酶 C 通路的关系

刘小鹏, 罗春英, 曹仁贤, 刘江华, 文芳, 李云, 文格波

(南华大学附属第一医院临床研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 血管内皮生长因子的表达与蛋白激酶 C 通路的关系; 逆转录聚合酶链反应; 人脐静脉内皮细胞; 血管内皮生长因子; 蛋白激酶 C 通路; 糖尿病

[摘要] 目的 观察高糖作用人脐静脉内皮细胞时血管内皮生长因子 mRNA 和蛋白的表达与蛋白激酶 C 通路被激活和抑制的关系。方法 提取并体外培养人脐静脉内皮细胞, 分别加入不同浓度葡萄糖(5.5、11、22 及 44 mmol/L)、蛋白激酶 C 激活剂和阻断剂并分别作用不同时间, 应用逆转录聚合酶链反应检测血管内皮生长因子 mRNA 水平, 免疫细胞化学检测血管内皮生长因子及蛋白激酶 C 蛋白表达。结果 经高糖处理的人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子 mRNA 的转录水平明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但脐静脉内皮细胞经 22 mmol/L 葡萄糖作用 72 h 或佛波酯作用 6 h, 血管内皮生长因子 mRNA 水平不再升高, 而呈下降趋势 ($P < 0.05$)。经 22 mmol/L 葡萄糖作用 72 h 后, 血管内皮生长因子蛋白表达也逐渐下降。蛋白激酶 C 在 22 mmol/L 葡萄糖处理 2 h 后出现膜转位。而蛋白激酶 C 抑制剂 GF109203X 可阻断上述现象。结论 高糖能引起脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子 mRNA 和蛋白表达增高。高糖引起脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子基因表达增高, 其机制与高糖激活蛋白激酶 C 通路有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

High Glucose Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression Via Protein Kinase C Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro

LIU Xiao-Peng, LUO Chun-Ying, CAO Ren-Xian, LIU Jiang-Hua, WEN Fang, LI Yun, and WEN Ge-Bo

(Department of Clinic Research, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Vascular Endothelial Growth Factor; Protein Kinase C Pathway; Diabetes; Glucose; Gene

[ABSTRACT] **Aim** To observe the transcript and protein expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) cultured with high glucose in vitro and investigate the relationship between it and protein kinase C (PKC) pathway. **Methods** hUVEC were cultured in vitro with glucose at different concentrations or for different cultural time and cultured with PKC inhibitor GF109203X or PKC activator PMA respectively. The transcript of VEGF was measured by RT-PCR. The protein expression of VEGF and PKC β was detected with immunocytochemistry. **Results** The transcript and protein expression levels of VEGF in high glucose groups or PKC activator PMA group were higher than control group or PKC inhibitor GF109203X group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Cultured with glucose at 22 mmol/L, the mRNA and protein expression of VEGF increased in 72 h, the protein expression of VEGF reached the summit at 72 h, and then began to decrease ($P < 0.01$). Cultured with PMA, the transcript of VEGF increased within 6 h, and then decreased. The protein of PKC β seemed to translocate to cell membrane from nucleus after treated with 22 mmol/L glucose for 2 h. However, PKC inhibitor GF109203X can inhibit the phenomena above. **Conclusions** The transcript and protein expression of VEGF gene increased in hUVEC, cultured with high glucose. High glucose induced the expression of VEGF gene via PKC pathway in hUVEC.

糖尿病慢性血管并发症是糖尿病患者致死、致残的主要原因, 而血管内皮细胞出现损伤是糖尿病血管并发症发生的前提, 高血糖可引起血管内皮细

胞功能障碍和内皮细胞损伤。研究表明血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 参与了糖尿病肾病和视网膜病变的发病过程, 在介导糖尿病内皮功能障碍和血管病理过程中发挥了关键性的作用。研究发现, 缺氧条件下高血糖可以促进 M \cdot ller 细胞 VEGF 产生^[1]。Williams 等^[2]认为高糖刺激平滑肌细胞产生 VEGF 可能是通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 介导的。高糖引起平滑肌细胞、单核细胞等细胞内 VEGF 升高已基本得到明确,

[收稿日期] 2004-11-19 [修回日期] 2005-09-12

[基金项目] 湖南省教委和卫生厅科研基金(97B103)资助

[作者简介] 刘小鹏, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病慢性并发症的发病机理, E-mail: liuxiaopeng74@yahoo.com.cn。罗春英, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病并发症。通讯作者文格波, 教授, 博士研究生导师, 主要从事糖尿病和甲状腺疾病的分子生物学研究。

但是否引起内皮细胞合成和分泌 VEGF 增多,国内外报道尚不多。本研究旨在观察在高糖培养条件下人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中 PKC 通路激活和抑制时 VEGF mRNA 和蛋白的表达变化,为糖尿病发病机理的阐明和防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

无菌操作取健康新生儿脐带, PBS 浸泡, 4℃保存, 4 h 内使用; DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品; VEGF 抗体为 Neomarkers 公司产品, 使用浓度为 4 mg/L; PKC β 抗体为 Santa Cruz 公司产品, 使用浓度为 1:1 000; 佛波酯为 Sigma 公司产品, 进口分装, 使用浓度为 10 nmol/L; S-P 试剂盒为深圳晶美公司产品; AMV cDNA 第一链合成试剂盒为 BBI 公司产品; 引物和 PCR 扩增试剂盒为上海生工生物工程公司产品; GF109203X 为 Calbiochem 公司产品, 使用浓度为 5 mmol/L; (11)因子相关抗原抗体为 ZYMED 公司产品, 使用浓度为 1:100。

1.2 细胞培养

参照文献[3, 4]。

1.3 内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜观察细胞的形态特点。(11)因子相关抗原免疫细胞化学检测。

1.4 实验分组及处理

将生长良好的第 2 代或第 3 代细胞用于实验。实验分为 5.5 mmol/L 葡萄糖组(对照组)、11 mmol/L 葡萄糖组、22 mmol/L 葡萄糖、44 mmol/L 葡萄糖、22 mmol/L 葡萄糖+ PKC 抑制剂 GF109203X 组(预先加 PKC 抑制剂 GF109203X 5 mmol/L 处理 0.5 h, 然后再加 22 mmol/L 葡萄糖)、5.5 mmol/L 葡萄糖+ PKC 激动剂佛波酯组及甘露醇(22 mmol/L)组。并选取 22 mmol/L 葡萄糖分别作用 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 为不同观察时间点。

1.5 聚合酶链反应

按照试剂盒说明书进行, 参照物 GAPDH^[5] 上游引物为 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3', 下游引物为 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3', 目的片段长度为 420 bp; VEGF^[5] 上游引物为 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3', 下游引物为 5'-ATGTTGGACTCCTCAGTGGG-3', 目的片段长度为 258 bp。GAPDH 循环参数为 94℃预变性 3 min, 然后 94℃变性 40 s、58℃退火 40 s、72℃延伸 60 s, 循环 30 次; VEGF 循环

参数为 94℃预变性 3 min, 然后 94℃变性 40 s、59℃退火 40 s、72℃延伸 60 s, 循环 30 次。PCR 扩增后的产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于凝胶图像分析系统摄像, 进行灰度分析。

1.6 免疫细胞化学检测

按照试剂盒说明书进行, 一抗为 (11)因子相关抗原抗体、VEGF、PKC β 阴性对照用 0.01 mol/L PBS。

1.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 软件, 采用单向方差分析(one-way ANOVA)法检验。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

脐静脉内皮细胞汇合后在倒置相差显微镜下呈单层铺路卵石样, 免疫细胞化学见 (11)因子抗原胞浆颗粒状表达, 证实 95% 以上的细胞为内皮细胞。

2.2 总 RNA 的鉴定

紫外分光光度计下测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的 OD 比值在 1.8~2.0 之间。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下可见两条清晰的条带, 分别为 28 s 和 18 s, 且 28 s/18 s > 1.5, 提示 RNA 无明显降解。

2.3 血管内皮生长因子的转录

VEGF 和 GAPDH 扩增片段分别为 258 bp 和 420 bp, 与理论设计相符(图 1 和 2)。

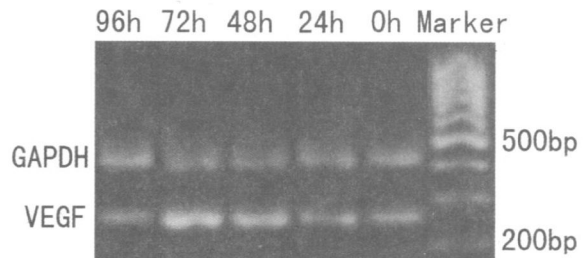


图 1. 22 mmol/L 葡萄糖作用不同时间血管内皮生长因子 mRNA 的转录

2.4 不同浓度葡萄糖对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响

各组 GAPDH mRNA 水平相差不大, 但 VEGF mRNA 的表达随葡萄糖浓度增加而逐渐增高, 44 mmol/L 组则降低(表 1 和图 2)。

2.5 葡萄糖作用不同时间对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响

从图 1 可以看出, VEGF mRNA 水平逐步增高, 96 h 组表达降低($P < 0.01$)。灰度比见表 2。

表 1. 不同浓度葡萄糖对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响 ($n=3$)

分 组	mRNA 表达
5.5 mmol/L	0.93 ± 0.05
11 mmol/L	1.18 ± 0.12 ^{ab}
22 mmol/L	1.54 ± 0.18 ^{ab}
44 mmol/L	0.96 ± 0.11

a 为 $P < 0.01$, 与 5.5 mmol/L 葡萄糖组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 44 mmol/L 葡萄糖组比较。

表 2. 葡萄糖作用不同时间对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响 ($n=3$)

分 组	灰度比
0 h	0.87 ± 0.02
24 h	0.94 ± 0.05 ^b
48 h	1.17 ± 0.04 ^{ac}
72 h	1.36 ± 0.07 ^{ac}
96 h	1.05 ± 0.03 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 96 h 组比较。

2.6 蛋白激酶 C 激动剂和阻断剂对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响

从图 2 可以看出, hUVEC 经佛波酯处理 6 h 后 VEGF mRNA 水平较正常明显增高 ($P < 0.01$), 而经过 GF109203X 预处理后无明显升高。其 VEGF/GAPDH mRNA 比值见表 3。

表 3. 蛋白激酶 C 对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响 ($n=3$)

分 组	比值
5.5 mmol/L 葡萄糖	0.93 ± 0.05
22 mmol/L 葡萄糖	1.54 ± 0.18 ^{ab}
佛波酯	1.58 ± 0.10 ^{ab}
GF109203X	0.91 ± 0.07

a 为 $P < 0.01$, 与 5.5 mmol/L 葡萄糖组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 GF109203X 组比较。

2.7 高糖对血管内皮生长因子蛋白表达的影响

hUVEC 经过 22 mmol/L 葡萄糖处理 72 h 免疫细胞化学检测为阳性, 22 mmol/L 葡萄糖处理 48 h 为弱阳性, 未经葡萄糖处理为阴性, 而预加 GF109203X 后再经 22 mmol/L 葡萄糖处理 72 h 为弱阳性(图 3), 区别明显。

2.8 高糖对蛋白激酶 C β 通路的影响

免疫细胞化学检测发现, 正常浓度葡萄糖组细胞核和胞浆均可见阳性颗粒, 而经 22 mmol/L 葡萄糖处理后, 主要在胞浆表达(图 4)。

2.9 甘露醇对血管内皮生长因子转录的影响

甘露醇组与正常浓度葡萄糖组比较, VEGF mRNA 水平无明显升高(图 2)。灰度比值数据从略。

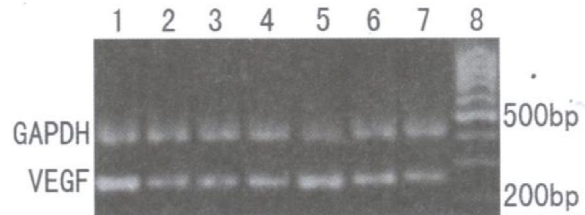
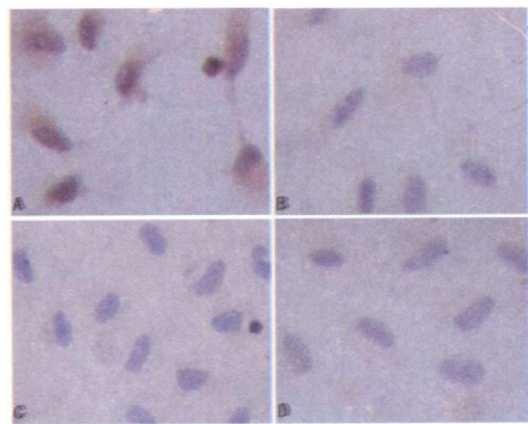
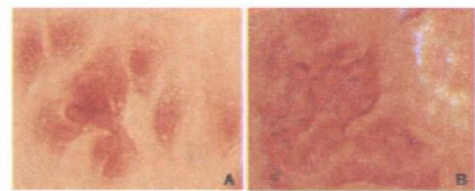


图 2. 不同处理因素对血管内皮生长因子 mRNA 转录的影响

1 为 PMA, 2 为甘露醇, 3 为 GF109203X, 4 为 44 mmol/L 葡萄糖, 5 为 22 mmol/L 葡萄糖, 6 为 11 mmol/L 葡萄糖, 7 为 5.5 mmol/L 葡萄糖, 8 为 Marker。

图 3. 血管内皮生长因子蛋白表达 (S-P 法, 40 \times) A 为 22 mmol/L 葡萄糖作用 72 h, B 为 22 mmol/L 葡萄糖作用 48 h, C 为正常浓度葡萄糖组, D 为加 GF109203X 后经 22 mmol/L 葡萄糖作用 72 h。图 4. 蛋白激酶 C β 蛋白表达 (S-P 法, 40 \times) A 为正常葡萄糖组, B 为 22 mmol/L 葡萄糖处理 2 h。

3 讨论

血管内皮生长因子的生物学作用主要为促进内皮细胞增殖, 提高血管的通透性, 增加微血管特别是毛细血管后静脉和小静脉的渗透性及改变细胞外基质。在胚胎发育、创伤修复等生理过程及炎症、肿瘤生长、糖尿病慢性血管并发症等病理情况下都与血管形成和增生密切相关^[6]。

现已知 VEGF 或血管内皮生长因子受体 (VEGF receptor, VEGFR) 分布于视网膜的全层和肾脏的大部分组织。在高糖条件下, VEGF 通过作用于视网膜

血管内皮细胞上大量高亲和力受体,促进血管内皮细胞分裂、增殖,进而导致视网膜新生血管形成^[7]; Murata 等^[8]认为糖尿病视网膜屏障的破坏可能与 VEGF 表达有关。在糖尿病 1 型和 2 型模型中,肾的 VEGF 表达、肾小球免疫反应活性和 VEGFR 结合力增加^[9]。在 2 型糖尿病患者血浆 VEGF 增加往往伴随尿蛋白排泄增加^[10]。VEGF 的分泌增加量与蛋白尿的严重程度相关^[11]。

糖尿病时 VEGF 增高的原因尚不太清楚。研究表明,高糖刺激肾平滑肌细胞产生 VEGF 可能是通过 PKC 介导或称 PKC 依赖性^[12]。Hoshi 等^[9]发现,高糖条件下,VEGF mRNA 及其蛋白表达上调时,伴随着 PKC α 、PKC β 和 Erk 的活性增加,用佛波酯刺激可诱导 AP-1 依赖性转录因子活化,增加 VEGF 表达;相反用 PKC 抑制剂(GF10902X)和 Erk 抑制剂(PD98059)可抑制其表达。说明 PKC α 、PKC β 参与了糖尿病肾病中 VEGF 的生成过程,这是通过 Erk 依赖的信号途径实现的。本研究发现高糖本身可引起 HUVEC VEGF 转录和蛋白合成增加,VEGF 的 mRNA 水平呈葡萄糖浓度及时间依赖性,但是脐静脉内皮细胞经 22 mmol/L 葡萄糖作用 72 h,VEGF 的 mRNA 水平不再升高,其原因可能与下列因素有关:随着高糖作用时间的延长,凋亡细胞增多,细胞活性下降;④细胞内拮抗 VEGF mRNA 转录的因素增多。随葡萄糖浓度增高 VEGF mRNA 表达量也增加,葡萄糖浓度至 22 mmol/L 达最高峰,44 mmol/L 时下降,其原因可能与细胞凋亡增多、葡萄糖浓度过高毒性作用增加抑制细胞活性等有关。本研究结果发现,VEGF 蛋白表达也随时间延长而逐渐增高,至 72 h 达最高峰,随后下降。PKC 激动剂佛波酯处理 6 h VEGF mRNA 和蛋白表达均明显增高,而 PKC 阻断剂 GF109203X 可阻断上述现象。甘露醇组 VEGF mRNA 转录和蛋白表达无明显增高。正常 PKC β 在胞核胞浆都有表达,以胞核为主,22 mmol/L 葡萄糖作用 2 h 即出现 PKC β 在胞浆胞膜的增加,PKC β 的胞浆胞膜转位提示 PKC β 的活性增高^[13],GF109203X 可阻断这种转位。高糖激活 PKC 通路的机制有: 从头合成途径,即高糖经酵解产生中间产物,逐步酰化合成 DAG,此为高糖激活 PKC 的主要途径^[14]; ④磷脂酶 D 水解磷脂酰胆碱生成 DAG 途

径^[15]; ④山梨醇通路激活、蛋白质非酶糖化、氧化应激均可使 DAG 生成增加而激活 PKC^[16]。因此,我们认为高糖引起 VEGF mRNA 和蛋白表达增高与高糖时 PKC 通路激活有关。

[参考文献]

- [1] Brooks SE, Gu X, Kaufmann PM, Marcus DM, Caldwell RB. Modulation of VEGF production by pH and glucose in retinal Müller cells[J]. *Curr Eye Res*, 1998, **17** (9): 875-882
- [2] Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro[J]. *Diabetes*, 1997, **46**: 1 497-503
- [3] 鄂征. 细胞培养和分子细胞学技术[M]. 北京出版社, 1997
- [4] 王立岩, 冬晓红, 宫桂兰, 朱凤全. 人脐静脉内皮细胞的体外培养、鉴定及形态观察[J]. 白求恩医科大学学报, 2000, **26** (1): 26-28
- [5] Sakurai S, Alam S, Pagarr-Mercado G, Hickman F, Tsai JY, Zelenka P, et al. Retinal capillary pericyte proliferation and c-fos mRNA induction by prostaglandin D2 through the cAMP response element[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, **43**: 2 774-781
- [6] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1995, **146** (5): 1 029-039
- [7] Luttly GA, McLeod DS, Merges C, Diggs A, Plouet J. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid[J]. *Arch Ophthalmol*, 1996, **114** (8): 971-977
- [8] Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata II, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas[J]. *Lab Invest*, 1996, **74** (4): 819-825
- [9] Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, Tomari S, Nagata M. High glucose induced VEGF expression via PKC and Erk in glomerular podocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290**: 177-184
- [10] Wasada T, Kawahara R, Katsumori K, Naruse M, Omori Y. Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking[J]. *Metabolism*, 1998, **47**: 27-30
- [11] Cha DR, Kim NH, Yoon JW, Jo SK, Cho WY, Kim HK, et al. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2000, **77**: S104-S112
- [12] Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro[J]. *Diabetes*, 1997, **46**: 1 497-503
- [13] Feng X, Becker KP, Stribling SD, Peters KG, Hannun YA. Hannun regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation[J]. *Biol Chem*, 2000, **275** (22): 17 024-034
- [14] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. *Nature*, 2000, **407** (6801): 242-248
- [15] Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Horio T, Yoshikawa J. Possible involvement of phospholipase and protein kinase C in vascular growth induced by elevated glucose concentration[J]. *Hypertension*, 1996, **28**: 159-168
- [16] Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β in neonatal mesangial cells[J]. *Am J Physiol*, 2000, **278**: F676-683

(此文编辑 文玉珊)