

## 波动性高糖对内皮细胞血管舒张因子合成的影响

刘江华<sup>1,2</sup>, 宓宝斌<sup>1</sup>, 廖二元<sup>2</sup>, 柏勇平<sup>3</sup>, 刘宗汉<sup>1</sup>, 全智华<sup>1</sup>, 文格波<sup>1</sup>

(1. 南华大学附属第一医院内分泌科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学湘雅二医院内分泌科, 湖南省长沙市 410011;

3. 中南大学湘雅医院心血管内科, 湖南省长沙市 410028)

[关键词] 病理学与病理生理学; 波动性高血糖; 内皮细胞; 血管舒张因子

[摘要] 目的 对比研究波动性与恒定性高糖对血管内皮细胞血管舒张因子合成的影响。方法 以体外培养人脐静脉内皮细胞为研究对象, 分别测定波动性高浓度葡萄糖(5 或 20 mmol/L)与恒定性高浓度葡萄糖(20 mmol/L)环境下内皮细胞合成的血管舒张因子前列环素及一氧化氮的含量, 同时观察培养液中丙二醛含量的变化。前列环素应用放射免疫法测定其稳定代谢产物, 而一氧化氮及丙二醛的检测则分别应用 Griess 法与 Schuh 法。结果 波动性高糖组前列环素与一氧化氮均明显低于恒定高糖组(分别为  $21 \pm 6$  ng/L 比  $36 \pm 8$  ng/L,  $P < 0.01$ ;  $13.6 \pm 2.0$  mmol/L 比  $18.2 \pm 3.7$  mmol/L,  $P < 0.001$ ), 而波动性高糖组的丙二醛则明显高于恒定性高糖组( $16.5 \pm 2.7$  mmol/L 比  $13.2 \pm 2.2$  mmol/L,  $P < 0.05$ )。结论 波动性高血糖较恒定性高血糖对血管内皮细胞可能具有更强的损伤效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effects of Intermittent High Glucose on the Production of Vascular Relaxing Factors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro

LIU Jiang-Hua, MI Bao-Bin, LIAO Er-Yuan, PO Yong-Ping, LIU Zong-Han, QUAN Zhi-Hua, and WEN Ge-Bo

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001; 2. Department of Endocrinology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410011; 3. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410078; China)

[KEY WORDS] Intermittent High Glucose; Endothelial Cell; Vascular Relaxing Factors

[ABSTRACT] **Aim** To compare the effects of intermittent and constant high glucose media on the production of vascular relaxing factors in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods** hUVEC were grown to confluence and were exposed for 7 days to 5 mmol/L glucose (normal control), 20 mmol/L glucose (constant high glucose) and 5 mmol/L alternating with 20 mmol/L glucose (intermittent high glucose) on a daily basis. The concentration of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  (the stable hydrolysed product of prostacyclin) was determined by radioimmunoassay, the nitric oxide (NO) was measured by means of Griess reaction and the malondialdehyde (MDA) content was detected by the method described by Schuh. **Results** Both the 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  and NO in intermittent high glucose group were significantly lower than that in constant high glucose group ( $21 \pm 6$  ng/L vs  $36 \pm 8$  ng/L,  $P < 0.01$ ;  $13.6 \pm 2.0$  mmol/L vs  $18.2 \pm 3.7$  mmol/L,  $P < 0.001$  respectively). However, the intermittent glucose group had increased MDA ( $16.5 \pm 2.7$  mmol/L vs  $13.2 \pm 2.2$  mmol/L,  $P < 0.05$ ) compared with constant glucose group.

**Conclusion** These findings suggest that variability in glycemic control could be more deleterious to endothelial cells.

内皮细胞功能失调与损伤是糖尿病慢性血管并发症的始动环节<sup>[1]</sup>, 高血糖是糖尿病患者糖代谢紊乱的标志之一, 也是导致慢性血管并发症的高危因素。体外研究表明, 高浓度葡萄糖可损伤内皮细胞。然而, 以前的研究观察的是恒定性高浓度葡萄糖的效应。正常人由于存在完善的神经体液调节机制, 血糖被严格控制在正常范围内, 但糖尿病患者的血糖在一天中会出现频繁波动。临床研究发现, 旨在控制波动性高血糖的胰岛素强化治疗可明显降低糖

尿病患者心血管事件的发生, 提示波动性高血糖可能能在糖尿病大血管并发症的发生中有着极其重要的病理学意义<sup>[2]</sup>。本研究旨在证实波动性与恒定性高糖对内皮细胞舒张因子的合成是否有不同影响, 以揭示糖尿病慢性血管并发症发生的可能机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 内皮细胞培养与鉴定

取正常分娩的新生儿脐带, 按照文献[3]介绍的方法分离。用 M199(含胎牛血清 20%) 培养, 并加谷氨酰胺 2 mmol/L (Sigma) 和人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 2 mg/L (Boehringer)。相差显微镜下细胞呈单层鹅卵石样排列, 免疫细胞化学(PAP)法检测第Ⅱ因子相关抗原阳

[收稿日期] 2005-07-02

[修回日期] 2006-01-16

[作者简介] 刘江华, 博士研究生, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病血管病变, 联系电话 0734-8279408, E-mail 为 jianghua990@126.com。通讯作者廖二元, 教授, 博士研究生导师, 主要从事内分泌与代谢病研究, 联系电话 0731-5361473。

性, 鉴定培养细胞为内皮细胞。

## 1.2 实验分组与处理

选择生长良好的第 2~3 代内皮细胞, 用无酚红、无血清 M199 预处理, 即 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 中培养 6 h, 使其处于同步化状态。再在 24 孔板中培养, 细胞密度为  $1.5 \times 10^6/L$ , 每 24 h 换液一次。实验分为 3 组: 恒定性正常浓度葡萄糖组, 加入 5 mmol/L 葡萄糖溶液; 恒定性高浓度葡萄糖组, 加入 20 mmol/L 葡萄糖溶液; 波动性高浓度葡萄糖组, 即每 24 h 轮换加入 5 mmol/L 或 20 mmol/L 葡萄糖溶液。各组细胞在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7 天, 然后收集全部条件培养液, 离心, 取上清液于 -70℃ 保存备检测。

## 1.3 前列环素与丙二醛测定

前列环素测定按药盒说明书, 应用放射免疫法测定其稳定代谢产物 6-Keto-PGF<sub>1</sub>, 测定盒由苏州医学院血栓研究室提供, 批内 CV 6.8%。丙二醛测定应用 Schuh 法, 批内 CV 7.1%。

## 1.4 一氧化氮测定

应用 Griess 法, 通过测定培养液中的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 可间接反映内皮细胞产生一氧化氮(NO) 的量。标本与 Griess 试剂反应, 在酶联免疫仪 570 nm 波长处测样本吸收值, 从亚硝酸钠标准曲线换算出 NO 值。批内 CV 7.5%。

## 1.5 统计学处理

用 SPSS10.0 作统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较用 *F* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

# 2 结果

波动性高糖组与恒定糖组的前列环素及一氧化氮均下降, 但前者下降幅度均高于后者 (*P* < 0.01)。波动性高糖组与恒定糖组的丙二醛均升高, 但以波动性高糖组明显 (*P* < 0.05) (表 1)。

表 1. 高糖对内皮细胞前列环素、一氧化氮和丙二醛的影响

分 组	前列环素 (ng/L)	NO (nmol/L)	丙二醛 (μmol/L)
正常对照	66 ± 11	25.2 ± 5.2	4.2 ± 0.6
恒定高糖	36 ± 8 <sup>a</sup>	18.2 ± 3.7 <sup>a</sup>	13.2 ± 2.2 <sup>a</sup>
波动高糖	21 ± 6 <sup>abc</sup>	13.6 ± 2.0 <sup>abc</sup>	16.5 ± 2.7 <sup>ab</sup>

a 为 *P* < 0.001, 与正常对照组比较; b 为 *P* < 0.05, c 为 *P* < 0.01, 与恒定高糖组比较。

# 3 讨论

糖尿病患者高血糖有两种表现: 慢性恒定性高血糖与慢性波动性高血糖<sup>[4]</sup>。慢性波动性高血糖是指慢性间歇性或阵发性高血糖状态。近年来研究表明, 波动性高血糖相对于恒定性高血糖更能促进糖

尿病患者慢性血管并发症的发生与发展, 从而成为研究热点<sup>[5]</sup>。

研究表明, 高浓度葡萄糖可通过增加血管超氧阴离子的产生与减少血管内皮舒张因子的释放导致内皮细胞功能损伤<sup>[3]</sup>。本文发现, 相对于恒定性高糖, 波动性高糖更能显著地降低内皮细胞 PGI<sub>2</sub> 与 NO 的生成, 同时明显增加丙二醛的含量。文献[6]报道, PGI<sub>2</sub> 具有保护内皮舒张功能的作用; 而 NO 不仅是血管内皮依赖性舒张因子, 还有抑制血小板与中性粒细胞在血管内膜粘附、聚集和激活等作用; 丙二醛则是由氧自由基氧化细胞膜上的不饱和脂肪酸形成, 其含量可以间接反映细胞膜脂质氧化程度, 从而提示波动性高血糖对血管内皮细胞具更强的损伤效应。波动性高血糖损伤血管内皮细胞的机理至今尚未阐明。Piconi 等<sup>[7]</sup>报道, 波动性高浓度葡萄糖可能通过多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 途径促进培养的人脐静脉内皮细胞内硝基酪氨酸的形成及提高 ICAM-1、VCAM-1 和 E 选择素的表达, 介导血管内皮的损伤。Quagliaro 等<sup>[8]</sup>研究提示高浓度葡萄糖, 尤其是波动性高血糖可以增加 PKC 的表达, 改变丝裂原活化蛋白激酶通路, 促使细胞凋亡及 DNA 氧化损伤。同时, 他们还发现波动性与恒定性高浓度葡萄糖均可通过依赖 PKC 活化的还原型辅酶 iv/ NAD (P)H 氧化酶刺激活性氧的过度生成导致细胞凋亡的增加。

## [参考文献]

- [1] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Losalzo J, Zimmernan GA, Mcveer RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. *Blood*, 1998, **91** (10): 3 527-561
- [2] Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001, **281** (5): E924-930
- [3] Jianghua Liu, Gebu Wen, Renxiang Cao, Yangguo OU. Protective effects of taurine against high glucose induced damage to vascular endothelial cells [J]. *J Chin Diabetes*, 2000, **8** (6): 362-364
- [4] Prato SD. Inserch of normoglycemia in diabetes: controlling postprandial glucose [J]. *Int J Obesity*, 2002, **26** (Suppl 3): S9-17
- [5] 李 斌, 刘江华. 波动性高血糖与糖尿病大血管并发症 [J]. 国外医学内分泌分册, 2004, **24** (4): 400-401
- [6] 姚 瑞, 党瑜华, 张菲斐. 非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞功能的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (4): 471-474
- [7] Piconi L, Quagliaro L, Da Ros R, Assaloni R, Giugliano D, Esposito K, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly (ADP-ribose) polymerase [J]. *J Thromb Haemost*, 2004, **2** (8): 1 453-459
- [8] Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuard G, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **183** (2): 259-267

(此文编辑 胡必利)