

[文章编号] 1007-3949(2007)15-06-0405-05

• 实验研究 •

高葡萄糖刺激血管内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调、活性氧增加及细胞凋亡

丁莉^{1,2}, 屈顺林^{1,2}, 王蕾^{1,2}, 黄秀清¹, 满永¹, 王抒¹, 杨向东², 黎健¹

(1. 卫生部北京医院老年医学研究所, 北京市 100730; 2. 南华大学医学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 人脐静脉内皮细胞; 葡萄糖; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4; 活性氧; 细胞凋亡

[摘要] 目的 研究在高葡萄糖刺激的条件下, 人脐静脉内皮细胞中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 的表达、细胞内活性氧以及细胞凋亡的变化。方法 倒置显微镜下观察人脐静脉内皮细胞形态; 免疫荧光法检测人脐静脉内皮细胞 (I) 因子相关抗原的表达; 高葡萄糖刺激人脐静脉内皮细胞, 用逆转录聚合酶链反应检测尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 mRNA 水平, Western blotting 检测尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 蛋白表达的变化, DCFH-DA 检测细胞内活性氧生成量, 流式细胞仪和 Hoechst 染色检测细胞凋亡。结果 高葡萄糖刺激人脐静脉内皮细胞时, 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 mRNA 及蛋白表达上调, 细胞内活性氧生成增加, 细胞凋亡增加。结论 高葡萄糖处理促进人脐静脉内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调并引起细胞内活性氧生成和凋亡增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

High Glucose Induce Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4 Expression, Reactive Oxygen Species Generation and Cell Apoptosis to Human Umbilical Endothelial Cells

DING Li^{1,2}, QU Shun-Lin^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, HUANG Xiu-Qing¹, MANG Yong¹, WANG Shu¹, YANG Xiang-Dong², and LI Jian¹

(1. Beijing Institute of Geriatrics & Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730; 2. Medical School of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Glucose; Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase; Reactive Oxygen Species; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX4) expression, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and cell apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) when stimulated with high concentration of glucose. **Methods** Morphology of HUVEC was observed with inverted microscope, expression of factor (I) related antigen in HUVEC was detected by immunofluorescence. NOX expression in HUVEC was convicted by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with positive control. Intracellular ROS generation was measured by DCFH-DA, cell apoptosis were measured by PI and Hoechst 33342 staining respectively. **Results** With high glucose in media, expression of NOX4, intracellular ROS generation and cell apoptosis were all increased. **Conclusions** High glucose could up-regulate NOX4 expression, intracellular ROS production and then lead to cell apoptosis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种慢性炎症性疾病, 血管内皮细胞损伤可能是 As 病变的始动因素。血液中葡萄糖高水平不仅诱导内皮细胞凋亡, 还促进平滑肌细胞增殖、单核-巨噬细胞浸润、血小板功能等改变^[1]。活性氧 (reactive oxygen spe-

cies, ROS) 作为细胞信号传导通路中的重要信号分子, 在内皮细胞的生长与损伤中起关键作用; 过多的活性氧则能够导致内皮功能失调, 促进血管内皮的炎症损伤及 As 的形成。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX) 目前被认为是血管内生成活性氧的主要酶体, 内皮细胞中主要表达 NOX 家族中的 NOX4^[2,3]。据文献[4,5]报道在高葡萄糖刺激条件下, 内皮细胞中活性氧生成增加, 并可导致细胞凋亡, 但这是否与 NOX4 相关尚不清楚。本实验通过检测 NOX 在人内皮细胞中的表达, 并用高葡萄糖处

[收稿日期] 2006-03-01 [修回日期] 2007-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (30440065, 30572082); 北京市自然科学基金 (7052059) 和湖南省卫生厅医药卫生科研基金 (B2006-101)

[作者简介] 丁莉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 dl789521@yahoo.com.cn。屈顺林, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 qushunlin78@126.com。通讯作者黎健, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化及糖尿病方面的研究, E-mail 为 lijli@hotmail.com。

理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 观察 NOX4 表达、细胞内活性氧和细胞凋亡的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

M199 培养基、青霉素、链霉素和 Trizol 为 Gibco 产品; 胰蛋白酶和 EDTA 为 Sigma 产品; 胎牛血清为 Hyclone 产品; 逆转录试剂盒、鼠抗人 (ID) 因子相关抗原抗体、FITC 标记的羊抗鼠 IgG、Hoechst33342、Tag 酶和 Ⅲ型胶原酶为 Promega 产品; 细胞内活性氧检测试剂盒购自江苏碧云天公司。

1.2 细胞分离与培养

取长度约 20 cm 的无菌新鲜脐带, 用生理盐水冲洗脐静脉, 然后用 0.1% 的 Ⅲ型胶原酶 (Sigma 公司) 灌注脐静脉 15 min, 收集灌注液, 800 r/min 离心 6 min, 收集内皮细胞到 25 cm² 培养瓶中加入 5 mL 含 20% 胎牛血清的 M199 混合培养基在 37℃ 含 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 12 h 后更换新鲜培养基。以后每隔 2 天换液 1 次, 待第 2、3 代细胞长至亚汇合状态时用于实验。

1.3 人脐静脉内皮细胞鉴定

用倒置显微镜观察 HUVEC 细胞形态; 免疫荧光法检测 HUVEC 内 (ID) 因子相关抗原的表达: 将 HUVEC 接种于放有盖玻片的 6 孔板中, 细胞生长至 60% 汇合后取出盖玻片, 用 PBS 洗 1 次, 预冷无水甲醇-20℃ 固定 20 min, PBS 洗 3 次 × 5 min, 3% 牛血清蛋白常温下封闭 10 min, 兔抗人 (ID) 因子相关抗原的抗体 (Promega 公司) 在 37℃ 下孵育 1 min (阴性对照组用 PBS 代替一抗孵育), PBS 洗 3 次 × 5 min, 3% BSA 封闭 10 min, 加 FITC 标记的羊抗兔 IgG 在 37℃ 下孵育 40 min, PBS 洗 3 次 × 5 min, 50% 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.4 实验分组

先以不同浓度葡萄糖处理 4 h: (1) 不加葡萄糖的对照组; (2) 10 mmol/L 葡萄糖组; (3) 20 mmol/L 葡萄糖组; (4) 30 mmol/L 葡萄糖组。再以 20 mmol/L 葡萄糖设计不同处理时间: (1) 不加葡萄糖的对照组; (2) 处理 4 h 组; (3) 处理 8 h 组; (4) 处理 16 h 组。

1.5 流式细胞仪检测细胞内活性氧水平

以 DCFH-DA (江苏碧云天公司) 作为荧光探针, 对细胞内活性氧进行荧光标记, 用流式细胞仪检测每组细胞内的平均荧光强度。未加 DCFH-DA 的阴性对照组的自发荧光值定为 1, 而其它各组的荧光

值均为相对阴性对照的相对值 (各组的荧光强度/阴性对照的荧光强度)。将处理好的 HUVEC 用无血清培养基洗 2 次, 加 5 mL 无血清培养基和 7 μL DCFH-DA 到 25 cm² 的培养瓶中, 在 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 用胰酶消化, 加血清终止反应, 用无血清培养基洗 2 次, 用 3 mL 无血清培养基重悬细胞; 其中阳性对照组加阳性药物活性氧 (试剂盒提供) 3 μL, 常温下孵育 1 h; PBS 洗 2 次后用流式细胞仪检测细胞内活性氧。

1.6 细胞凋亡的检测

用葡萄糖处理 HUVEC 后收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 Hoechst33342 (Gibco 公司) 使终浓度为 10 mg/L, 常温下孵育 15 min, 离心去上清, 滴片后于荧光显微镜下观察。用高葡萄糖处理 HUVEC 后收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 用 70% 的乙醇 5 mL 固定细胞过夜; 800 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次; 加入含 RNase A (终浓度 50 mg/L) 的 PBS 500 μL, 37℃ 水浴孵育 30 min; 再加入碘化丙啶 (PI), 使其终浓度为 50 mg/L, 4℃ 避光 30 min; 300 目尼龙网过滤, 上流式细胞仪检测, 计数 10 000 个细胞, 测定凋亡的细胞数。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测人脐静脉内皮细胞内尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 mRNA 表达

按 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 逆转录反应按照 Promega 公司试剂盒的实验程序完成。PCR 引物序列: β-actin 为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' 和 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3', 扩增片段长度为 539 bp; NOX4 为 5'-CAG GAG GGC TGC TGA AGT ATC AA-3' 和 5'-TGA CTG GCT TAT TGC TCC GGA TA-3', 扩增片段长度为 303 bp。PCR 反应条件: β-actin 为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min → 68℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72℃ 继续延伸 7 min; NOX4 为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min → 68℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72℃ 继续延伸 7 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 加样量为 8 μL。电泳条带采用 Pharmacia Biotech 凝胶成像系统分析。

1.8 Western blotting 检测尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 蛋白的表达

去除培养液, 用冰冷的 PBS 洗涤细胞两次; 将 25 cm² 培养瓶置至碎冰上, 加入预冷裂解液 200 μL, 冰上孵育 20 min, 收集细胞裂片及裂解缓冲液 4℃ 12 000 g 离心 10 min 收集上清液, 测定蛋白浓度。取总蛋白与 6× 蛋白上样缓冲液混匀总蛋白约 30 μL,

100℃加热 5 min, 稍离心; 配制并灌注 12% SDS-PAGE 胶, 恒压 80 V 电泳, 待溴酚蓝染料带进入分离胶后将电流调至 120 V, 当溴酚蓝带到达凝胶底部时, 停止电泳。将硝酸纤维素膜浸入转膜缓冲液中 15 min, 350 mA 进行恒流电转移 1 h。取出硝酸纤维素膜用 TTBS 洗两遍, 用含 5% 封闭液封闭膜 1 h, 加入 1:300 稀释的一抗室温孵育 2 h, TTBS 洗膜 5 min \times 3, 加入 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育 1 h, 洗膜 5 min \times 4, ECL 化学发光法压片显影。

1.9 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 进行统计处理, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 判定为差异

有显著性。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

分离培养的 HUVEC, 倒置显微镜下可见它们贴壁生长呈鹅卵石样排列(图 1A)。内皮细胞 (1) 因子相关抗原是内皮细胞所特有, 用免疫荧光检测其表达。FITC 标记的羊抗兔 IgG 为二抗孵育后, HUVEC 内可见明亮的绿色荧光(图 1B), 而未加一抗(用 PBS 代替一抗)的对照组 HUVEC 内仅有微弱自发荧光(图 1C)。证实从人脐静脉分离得到的细胞是内皮细胞。

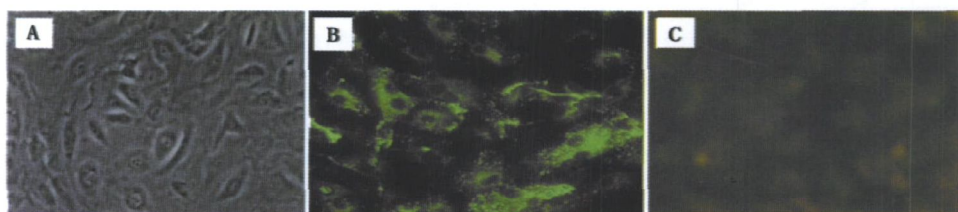


图 1. 人脐静脉内皮细胞鉴定

2.2 高葡萄糖培养促进人脐静脉内皮细胞中活性氧的生成

以 DCFH-DA 为荧光探针, 用流式细胞仪检测 HUVEC 内活性氧水平。结果表明, 与对照组 HU-

VEC 内活性氧 (2.6 ± 0.3) 相比, 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组细胞内活性氧生成量明显增加 (4.1 ± 0.5 , $P < 0.05$, $n = 3$), 说明高葡萄糖培养可以刺激 HUVEC 产生过多的活性氧(图 2)。

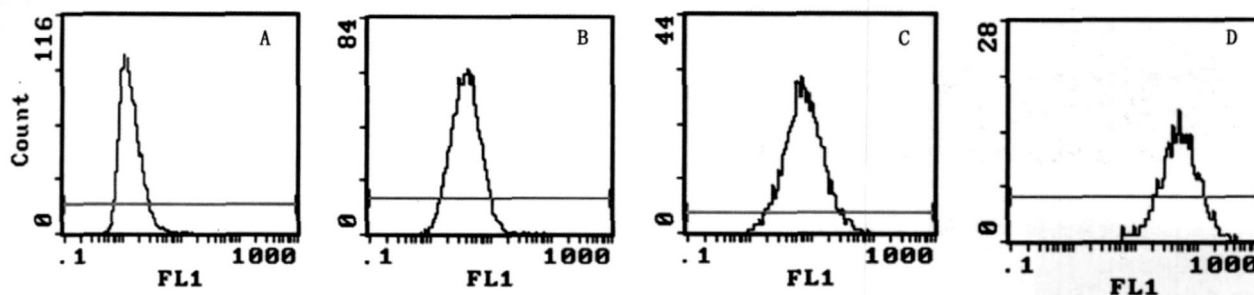


图 2. 流式细胞仪检测人脐静脉内皮细胞内活性氧生成量
A 为阴性对照组(未加 DCFH-DA), B 为对照组, C 为 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组, D 为阳性对照组。

A 为阴性对照组(未加 DCFH-DA), B 为对照组, C 为 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组, D 为阳性对照组。

2.3 高葡萄糖培养引起人脐静脉内皮细胞凋亡

流式细胞仪检测细胞凋亡率发现, 与对照组 HUVEC 细胞凋亡率 ($2.8\% \pm 0.8\%$) 相比, 应用 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组细胞凋亡率 ($12.5\% \pm 1.2\%$) 显著增加 ($P < 0.05$, $n = 3$; 图 3); Hoechst 染色结果发现对照组 HUVEC 细胞核形态正常, 而应用 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组部分细胞胞核出现染

色质浓缩、边缘化(图 4)。表明在高葡萄糖培养条件下, 内皮细胞内活性氧生成升高的同时, 细胞凋亡发生率亦增加。

2.4 高葡萄糖上调人脐静脉内皮细胞中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 的表达

不同浓度葡萄糖处理 HUVEC 4 h, RT-PCR 分析 NOX4 mRNA 水平发现, 与不加葡萄糖的对照组

(1.05 ± 0.21) 相比, 10、20 和 30 mmol/L 葡萄糖处理组 NOX4 mRNA 表达(分别为 1.24 ± 0.30 、 2.42 ± 0.62 和 2.31 ± 0.64) 均增强 ($P < 0.05$, 图 5); 用 20 mmol/L 葡萄糖分别处理 HUVEC 4 h、8 h 和 16 h, RT-PCR 结果表明, 葡萄糖促进 NOX4 mRNA 表达(对照组为 0.52 ± 0.03 , 处理 4 h、8 h 和 16 h 组分别为 1.33 ± 0.40 、 1.34 ± 0.39 和 1.36 ± 0.43) 呈时间依赖性 ($P < 0.05$, 图 5)。20 mmol/L 葡萄糖处理 HUVEC 16 h 提取细胞总蛋白, Western blotting 检测到 NOX4 蛋白水平(1.16 ± 0.29) 较对照组(0.78 ± 0.09) 明显升高 ($P < 0.05$, 图 6)。这些结果表明, 高葡萄糖处理通过上调 HUVEC 中 NOX4 的表达水平, 增加活性氧的生成, 引起细胞凋亡。

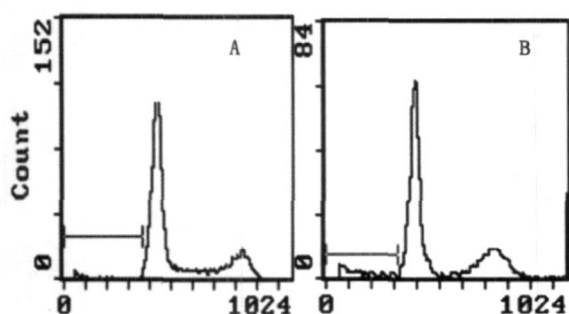


图 3. 流式细胞仪检测人脐静脉内皮细胞的凋亡 A 为未加葡萄糖的对照组, B 为 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组。

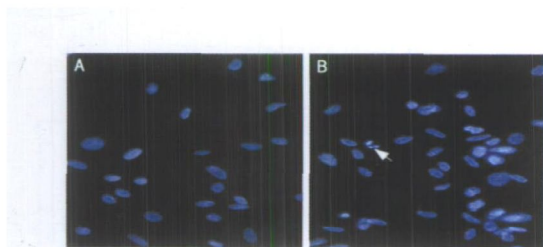


图 4. Hoechst 染色荧光显微镜下观察人脐静脉内皮细胞的胞核形态($\times 200$) A 为正常培养基培养的对照组; B 为 20 mmol/L 葡萄糖处理 16 h 组。

3 讨论

糖尿病患者常常并发 As, 而内皮细胞损伤是 As 的始动因素, 氧化应激与炎症学说是 As 可能的发病机制。用高水平葡萄糖处理血管内皮细胞能够使之产生过量的活性氧并促进细胞内核因子 κB 表达上调, 最终通过它介导的炎症通路导致内皮细胞功能失调^[6]; 此外, 高糖刺激状态下的脐静脉内皮细胞还能够造成细胞 DNA 氧化损伤并上调细胞间粘附分

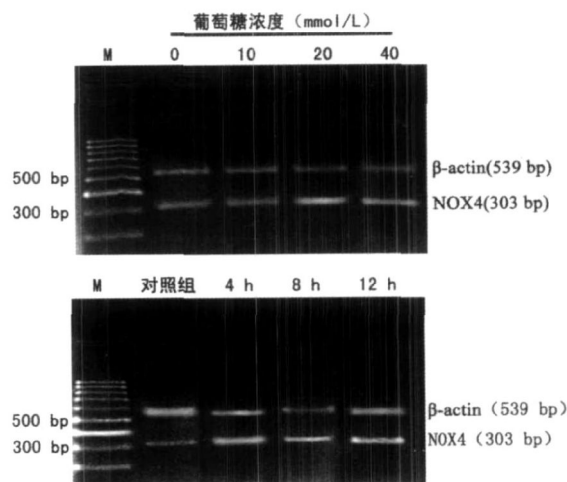


图 5. 不同浓度葡萄糖处理 4 h (上) 及 20 mmol/L 葡萄糖处理不同时间(下) 对人脐静脉内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 mRNA 表达的影响

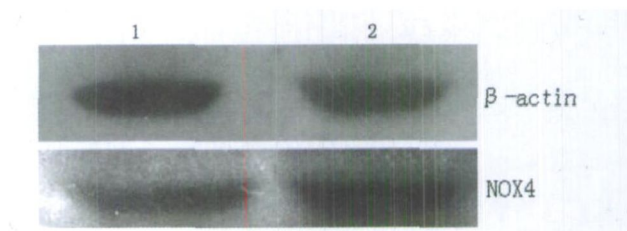


图 6. 20 mmol/L 葡萄糖处理人脐静脉内皮细胞 16 h 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 蛋白的表达 1 为不加葡萄糖的对照组, 2 为 20 mmol/L 葡萄糖处理组。

子 1、血管细胞粘附分子 1 和 E-选择素的表达^[7]。内皮细胞活性氧的来源包括: NOX、NOS、线粒体电子传递链、黄嘌呤氧化酶和脂氧合酶, 但只有 NOX 才是内皮细胞中活性氧的主要来源。NOX 的同工酶家族分别被称为 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4 和 NOX5, Ago 等^[2] 最近发现在 HUVEC 中主要表达 NOX4 mRNA, 用反义核酸技术抑制 NOX4 的表达能显著地降低内皮细胞中活性氧的生成, 从而推测 NOX4 可能参与了内皮细胞内活性氧的生成。Yano 等^[8] 将高葡萄糖(25 mmol/L) 与牛大动脉内皮细胞一起孵育 3 h 能显著增加细胞内活性氧的生成, 且加入 NOX 抑制剂能抑制活性氧的生成。因此, 我们设想 NOX4 可能在各种致 As 危险因子所致的内皮细胞损伤中起重要作用。本实验结果表明, 在高葡萄糖培养时 NOX4 mRNA 及蛋白表达、细胞内活性氧水平和凋亡均较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 说明 NOX4 可能参与了内皮细胞内活性氧的生成和凋亡。高水平葡萄糖可能通过直接刺激或“致敏”血管细胞, 激活 NOX4 等使细胞内活性氧生成增多, 后者

和它们修饰的靶分子将细胞外信号传入细胞内, 致使 As 相关的基因表达上调, 并进一步促进单核细胞向血管浸润及释放炎症因子, 从而形成一个正反馈, 不断加强局部炎症反应, 使内皮细胞的正常功能受损而促进 As 的形成。但 Lass•gue 等^[9]发现血管紧张素 ①(angiotensin ②)Ang ③使鼠血管平滑肌细胞内活性氧生成增加的同时能上调 NOX1 的表达且下调 NOX4 表达, 这可能是由于 NOX4 在不同类型的细胞中作用不同, 也可能是其它 NOX 如 NOX2 和 p22phox 等共同参与了细胞活性氧的生成, 其机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Salmi M, Stolen C, Jousilahti P, Yegutkin GG, Tapanainen P, Janatuinen T, et al. Insulin regulated increase of soluble vascular adhesion protein 1 in diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2002, **161** (6): 2 255-262.
- [2] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, et al. NOX4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase [J]. *Circulation*, 2004, **109** (2): 227-233.
- [3] 屈顺林, 唐蔚青, 黎健. NADPH 氧化酶与动脉粥样硬化[J]. 中国

动脉硬化杂志, 2005, **13** (2): 228-232.

- [4] Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Inamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulates reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADP(H) oxidase in culture vascular cells [J]. *Diabetes*, 2000, **49** (11): 1 937-945.
- [5] Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high glucose induced human vascular endothelial cell apoptosis [J]. *Am J Physiol*, 1999, **277** (6Pt1): C1 229-C238.
- [6] Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor ③ and stimulates ③ in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86** (7): 3 257-265.
- [7] Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zudar 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.
- [8] Yano M, Hasegawa G, Ishii M, Yamasaki M, Fukui M, Nakamura N, et al. Short-term of high glucose concentration induces generation of reactive species in endothelial cells: implication for the oxidative stress associated with postprandial hyperglycemia [J]. *Redox Rep*, 2004, **9** (2): 111-116.
- [9] Lass•gue B, Sorescu D, Szcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells nox1 mediates angiotensin ③-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways [J]. *Circ Res*, 2001, **88** (9): 888-894.

(此文编辑 许雪梅)