

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0185-04

• 实验研究 •

## 罗格列酮抑制高糖诱导的内皮细胞黏附作用

彭 扬<sup>1</sup>, 王玉霞<sup>2</sup>, 李 慧<sup>1</sup>, 孟 馨<sup>3</sup>

(中国医科大学 1. 附属盛京医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110004; 2. 附属第四医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110032; 3. 附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 罗格列酮; 葡萄糖; 血管细胞黏附分子 1; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究罗格列酮对高糖诱导的内皮细胞黏附作用的影响。**方法** 应用不同浓度葡萄糖处理内皮细胞后, 加入不同浓度罗格列酮, 用免疫细胞化学法和逆转录聚合酶链反应分别检测血管细胞黏附分子 1 蛋白及 mRNA 的表达。同时各处理组行内皮细胞-单核细胞黏附试验。**结果** 葡萄糖可诱导血管细胞黏附分子蛋白和 mRNA 的表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), 在 16.7 mmol/L 时作用最显著; 应用罗格列酮后, 血管细胞黏附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。葡萄糖可诱导内皮细胞-单核细胞黏附增加, 且与葡萄糖浓度呈正相关; 罗格列酮可抑制内皮细胞-单核细胞黏附 ( $P < 0.05$ )。**结论** 在一定葡萄糖浓度范围内, 罗格列酮可能通过抑制葡萄糖诱导的内皮细胞血管细胞黏附分子 1 的表达来抑制内皮细胞-单核细胞的黏附作用, 这可能是罗格列酮抗糖尿病相关的动脉粥样硬化作用之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Rosiglitazone Inhibits Glucose-Induced Adherent Effects on Human Umbilical Vein Endothelial Cells

PENG Yang<sup>1</sup>, WANG Yu-Xia<sup>2</sup>, LI Hu<sup>1</sup>, and MENG Xin<sup>3</sup>

(1 Department of Geriatrics, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2 Department of Endocrinology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China; 3 Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Rosiglitazone; Glucose; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of rosiglitazone (RSG) on glucose-induced adhesion of human endothelial cells. **Methods** Endothelial cells were incubated with different concentrations of glucose and then treated with different concentrations of rosiglitazone. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) protein and mRNA expression was detected by immunocytochemical method and RT-PCR. Endothelial monocyte adhesion assays were carried out in treated cells. **Results** VCAM-1 mRNA and protein expression were increased significantly with glucose concentration increased, which was obvious at 16.7 mmol/L glucose group ( $P < 0.05$ ). Compared with RSG untreated group, relative VCAM-1 mRNA and protein expression decreased to varying degrees in the RSG treated group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, endothelial monocyte adhesion increased with increment of glucose concentration ( $P < 0.05$ ) and decreased after treatment of high dose RSG ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** RSG may appear to have direct anti-diabetes-associated-atherosclerosis which is at least partly due to effects on VCAM-1 expression induced by glucose, which leads to decreased endothelial monocyte adhesion and macrophage infiltration.

糖尿病是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的独立危险因素。高血糖可促使血管内皮功能紊乱, 加速 As 的发生发展。噻唑烷二酮 (TZD) 类药物罗格列酮 (RSG) 是选择性过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 激动剂, 目前广泛用于 2 型糖尿病治疗中, 除了增加胰岛素敏感性降血糖作用外, 它还可能通

过改善脂质代谢、保护血管内皮功能等方面发挥抗 As 作用<sup>[1-3]</sup>。本研究通过罗格列酮对不同浓度葡萄糖诱导的内皮细胞血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 表达及黏附作用的影响, 进一步阐明它在糖尿病相关 As 中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 和单核细胞株 U937 细胞 (上海细胞所), 1640 培养基和胎牛血清 (郑州佰安生物工程有限公司), D-葡萄糖和胰蛋白酶 (华美公司), 罗格列酮 (Sigma 公司), 兔抗人

[收稿日期] 2009-01-07 [修回日期] 2009-03-02

[作者简介] 彭扬, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病大血管并发症与血脂异常, E-mail 为 pengyangsy@yahoo.com.cn。王玉霞, 博士研究生, 副教授, 研究方向为糖尿病大血管并发症。李慧, 博士研究生, 讲师, 研究方向为胰岛素抵抗。

VCAM-1多克隆抗体(BD公司),免疫组织化学SP试剂盒(福建迈新),Trizol AMV、Oligo(DT)15和RNase抑制剂(美国Promega公司), $\gamma$ -Taq酶(日本TaKaRa公司),VCAM-1引物(北京奥科)。

## 1.2 细胞培养

用含10%胎牛血清的RMP11640培养基培养,0.25%胰酶消化传代,内皮细胞在倒置显微镜下呈铺路石状排列。将传代生长至汇合状态的内皮细胞用无血清培养基培养24h,加入不同浓度葡萄糖(5.5, 11.1, 16.7及33.3 mmol/L)处理细胞,应用5.5 mmol/L葡萄糖加入27.8 mmol/L甘露醇作为渗透压对照组,另一组试验加入不同浓度葡萄糖同时分别加入25  $\mu$ mol/L或50  $\mu$ mol/L罗格列酮共同处理细胞,48h后收集细胞。台盼兰染色鉴定细胞活力。U937细胞用含10%胎牛血清的RMP11640培养基培养。

## 1.3 免疫细胞化学法测定血管细胞黏附分子-1蛋白的表达

各组细胞用PBS洗2次,涂于1%多聚赖氨酸的玻片上,4%多聚甲醛固定15min,按照试剂盒说明书步骤操作。一抗以1:200稀释,以PBS代替一抗作为阴性对照。每张图片任意选择30个细胞,经MetaMorph Imaging System软件测细胞平均积分吸光度值。

## 1.4 逆转录聚合酶链反应检测血管细胞黏附分子-1 mRNA的表达

VCAM-1上游引物5'-CGT CTT GGT CAG CCC TTC CT-3',下游引物5'-ACA TTC ATA TAC TCC CGC ATC CTT C-3'(460 bp);内参照 $\beta$ -actin上游引物5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG GG-3',下游引物5'-ATG ATGG AGT TGA AGG TAG TTT CGT GGA T-3'(366 bp)。用Trizol试剂提取各处理组细胞的总RNA,用紫外分光光度计测总RNA纯度和含量,取2  $\mu$ g总RNA逆转录成cDNA,然后进行PCR扩增。PCR总反应体系20  $\mu$ L,扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性5min,然后94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30

s,72 $^{\circ}$ C延伸45s,循环30次,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,长波紫外灯下观测照相,电泳结果以Quantity One(美国Bio-Rad公司)图像分析系统进行电泳条带光密度分析,计算VCAM-1与 $\beta$ -actin的光密度积分比作为相对VCAM-1 mRNA表达水平。

## 1.5 黏附试验

按照Woolard等<sup>[4]</sup>方法,先将血管内皮细胞接种于放有盖玻片的6孔板内,使内皮细胞生长于盖玻片上,待长成单层后,移去培养液,按上述分组加入不同浓度葡萄糖同时不加或分别加入25  $\mu$ mol/L或50  $\mu$ mol/L罗格列酮共同孵育细胞48h,然后移去培养液,加入U937细胞,每孔 $4 \times 10^4$ 个,37 $^{\circ}$ C共同孵育30min。将盖玻片移至含3%多聚甲醛的PBS中处理30min,然后将盖玻片洗涤3遍,去除未黏附细胞,将此盖玻片放到载玻片上,用光学显微镜计数黏附细胞数。

## 1.6 统计学方法

每组实验重复3次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 11.5软件中的One-way ANOVA进行统计分析,两组间比较采用LSD法,相关分析采用直线相关分析,用Pearson相关系数表示。

## 2 结果

### 2.1 葡萄糖诱导内皮细胞血管细胞黏附分子-1表达增加

葡萄糖诱导VCAM-1表达明显增加,在16.7 mmol/L葡萄糖组最明显( $P < 0.05$ ),33.3 mmol/L葡萄糖组VCAM-1表达呈有下降趋势,但与16.7 mmol/L葡萄糖组差异无显著性( $P > 0.05$ ,表1和图1)。VCAM-1表达与渗透压升高无关(数据略)。

### 2.2 罗格列酮抑制血管细胞黏附分子-1表达

罗格列酮明显抑制VCAM-1表达,尤其在16.7 mmol/L葡萄糖组最为明显( $P < 0.05$ ),呈现浓度依赖性(表1和图1)。

表1 VCAM-1蛋白和mRNA的表达

葡萄糖浓度	蛋白表达			mRNA表达		
	0 $\mu$ mol/L 罗格列酮	25 $\mu$ mol/L 罗格列酮	50 $\mu$ mol/L 罗格列酮	0 $\mu$ mol/L 罗格列酮	25 $\mu$ mol/L 罗格列酮	50 $\mu$ mol/L 罗格列酮
5.5 mmol/L	10.55 $\pm$ 0.90	7.46 $\pm$ 0.98	5.94 $\pm$ 1.38 <sup>c</sup>	0.41 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>cf</sup>
11.1 mmol/L	17.14 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	14.93 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>	11.52 $\pm$ 2.90 <sup>ae</sup>	0.61 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>ade</sup>
16.7 mmol/L	33.36 $\pm$ 2.88 <sup>ab</sup>	19.39 $\pm$ 3.27 <sup>abe</sup>	15.23 $\pm$ 2.50 <sup>ade</sup>	0.92 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.76 $\pm$ 0.07 <sup>abd</sup>	0.67 $\pm$ 0.05 <sup>abd</sup>
33.3 mmol/L	25.74 $\pm$ 4.47 <sup>ab</sup>	20.82 $\pm$ 2.15 <sup>ab</sup>	18.67 $\pm$ 3.18 <sup>ab</sup>	0.81 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.77 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	0.70 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>

a为 $P < 0.05$ 与5.5 mmol/L葡萄糖组比较; b为 $P < 0.05$ 与11.1 mmol/L葡萄糖组比较; c为 $P < 0.05$ 与16.7 mmol/L葡萄糖组比较; d为 $P < 0.05$ 与0  $\mu$ mol/L罗格列酮组比较; e为 $P < 0.05$ 与25  $\mu$ mol/L罗格列酮组比较。

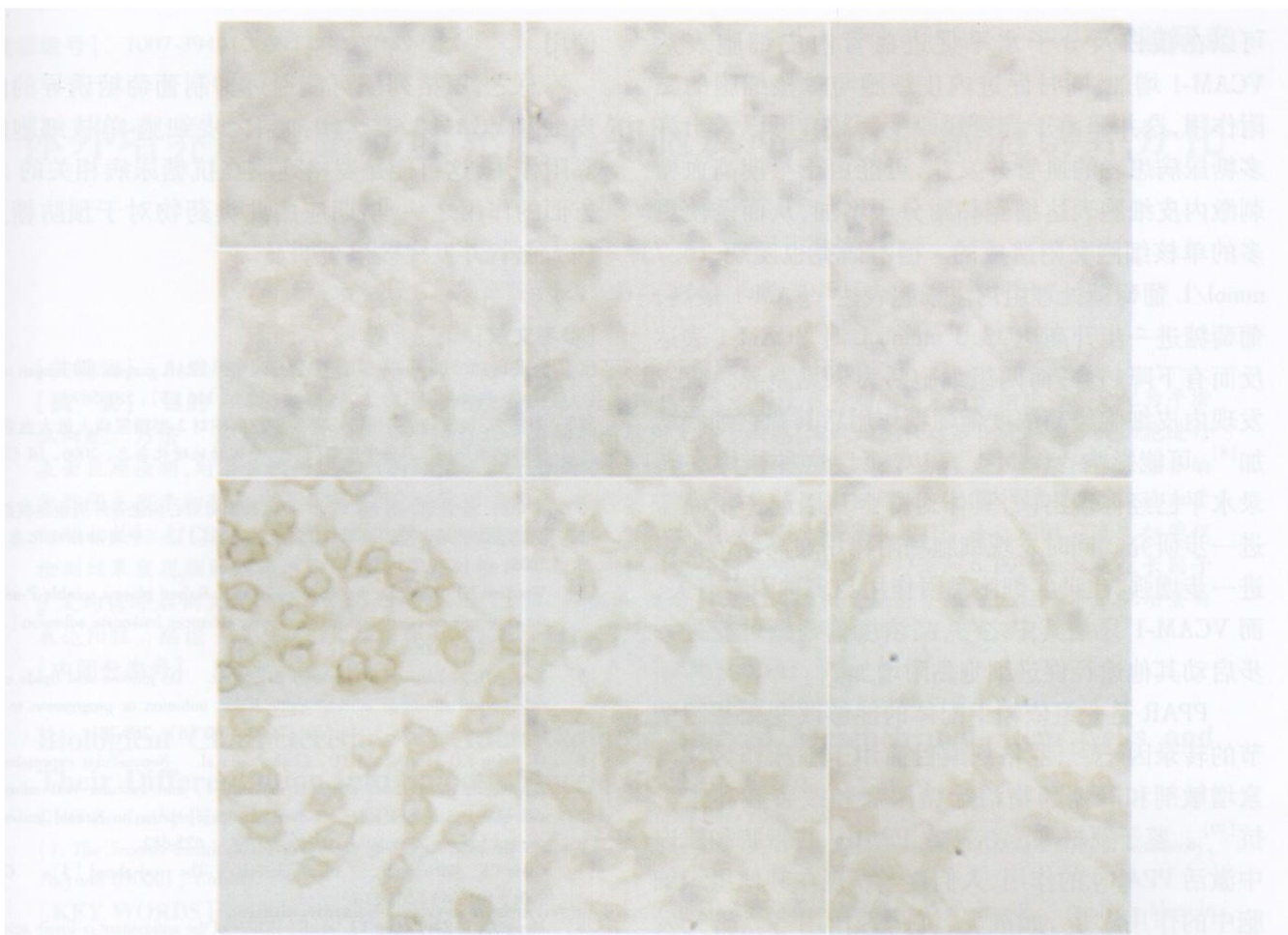


图 1 免疫细胞化学法测定内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达 ( $\times 400$ ) 从左至右为 0、25 和 50  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮组, 从上往下为 5.5、11.1、16.7 和 33.3  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组。

### 2.3 罗格列酮对内皮细胞黏附作用的影响

随着葡萄糖浓度增加, 各组细胞黏附作用明显增强 ( $P < 0.05$ )。罗格列酮使细胞黏附作用减轻, 虽然在 5.5  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组及 33.3  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组差异无显著性, 但在 16.7  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组 25  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮均明显使黏附细胞减少 ( $P < 0.05$ , 表 2)。除 33.3  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组外, 罗格列酮对黏附作用的抑制与 VCAM-1 表达下降密切相关 ( $r = 0.786$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2 内皮细胞-单核细胞黏附数比较

葡萄糖浓度	罗格列酮		
	0 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$
5.5 $\text{mmol/L}$	76.0 $\pm 5.3$	72.7 $\pm 10.1$	63.0 $\pm 10.4$
11.1 $\text{mmol/L}$	115.7 $\pm 11.2^a$	92.0 $\pm 10.6^d$	81.0 $\pm 9.5^d$
16.7 $\text{mmol/L}$	161.0 $\pm 21.0^{ab}$	124.7 $\pm 14.0^{abd}$	96.7 $\pm 16.3^{ade}$
33.3 $\text{mmol/L}$	183.0 $\pm 26.5^{ab}$	167.7 $\pm 28.6^{abc}$	150.7 $\pm 17.5^{abc}$

a 为  $P < 0.05$  与 5.5  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组比较; b 为  $P < 0.05$  与 11.1  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组比较; c 为  $P < 0.05$  与 16.7  $\text{mmol/L}$  葡萄糖组比较; d 为  $P < 0.05$  与 0  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮组比较; e 为  $P < 0.05$  与 25  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮组比较。

### 3 讨论

A<sub>s</sub> 是糖尿病致死的主要原因, 近来研究表明单纯高血糖与单纯高血脂同样会加速 A<sub>s</sub> 斑块的发展, 葡萄糖与脂质对 A<sub>s</sub> 初期病变的形成机制可能是一致的<sup>[5]</sup>。因此糖尿病患者中血糖控制较差的患者心脑血管疾病的发病率及病死率也较高。A<sub>s</sub> 的发生是一种慢性炎症过程, 其最初阶段是单核细胞黏附于受损部位的血管内皮细胞<sup>[6]</sup>, 随后单核细胞向受损部位移动, 吞噬脂质形成泡沫细胞<sup>[7]</sup>, 单核细胞黏附于血管内皮, 既是炎症反应的重要特征, 也是 A<sub>s</sub> 相关疾病的起始步骤, 其中黏附分子起关键作用。VCAM-1 是与 A<sub>s</sub> 发生密切相关的黏附分子, 它是免疫球蛋白家族成员之一, 可由血管内皮细胞、平滑肌细胞产生, 而在单核/巨噬细胞上存在 VCAM-1 配体, 病理状态下, 二者结合激活内皮及单核细胞, 释放某些细胞因子, 促进单核细胞向病变部位迁移, 导致 A<sub>s</sub> 早期事件发生。本研究在正常浓度葡萄糖及大多数糖尿病患者所处葡萄糖水平中间选取几个葡萄糖梯度进行相关研究, 研究发现高浓度葡萄糖

可以在蛋白及分子水平促进血管内皮细胞表达 VCAM-1 增加,同时促进内皮细胞与单核细胞的黏附作用,这并非由于渗透压改变所致。可以看出许多糖尿病患者的血管并发症,可能由于早期高血糖刺激内皮细胞表达细胞黏附分子增加,从而诱使更多的单核细胞黏附造成的。但本研究也发现,16.7 mmol/L 葡萄糖处理组内皮细胞表达 VCAM-1 最高,葡萄糖进一步升高达 33.3 mmol/L 时 VCAM-1 表达反而有下降趋势,而两组细胞活力未见差异。研究发现内皮细胞经高浓度葡萄糖作用后其凋亡细胞增加<sup>[8]</sup>,可能影响 VCAM-1 表达,而且这种作用在转录水平已经体现出来,具体对哪个基因起作用尚需进一步研究。同时发现细胞黏附作用在高葡萄糖组进一步增强,也证实细胞黏附作用与多种因素有关,而 VCAM-1 只是其中之一,高浓度葡萄糖可能进一步启动其他途径促进细胞黏附增加。

PPAR 是一组依赖于配体的能够改变靶基因调节的转录因子<sup>[9]</sup>,罗格列酮目前用于临床作为胰岛素增敏剂和降糖药物治疗糖尿病和改善胰岛素抵抗<sup>[10]</sup>。鉴于罗格列酮在富含 PPAR $\gamma$  的脂肪和肌肉中激活 PPAR $\gamma$  的作用,人们逐渐发现在其他组织细胞中的作用<sup>[11,12]</sup>,如抗炎、抗凋亡作用等。研究发现,血管壁的各种细胞,如内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中也存在 PPAR $\gamma$  表达,激动这一受体可能在抑制炎症反应、减少泡沫细胞形成等多个环节上起到抗 As 作用<sup>[13,14]</sup>。本研究结果也发现罗格列酮能够抑制高糖诱导的血管内皮细胞表达 VCAM-1,尤其在 16.7 mmol/L 葡萄糖处理组随着罗格列酮浓度增加这种抑制作用增强。葡萄糖浓度在 16.7 mmol/L 以下各组中,VCAM-1 表达下降也和内皮细胞-单核细胞黏附作用减弱直接相关,进一步说明罗格列酮不但可以增加胰岛素敏感性,而且在一定葡萄糖浓度范围内对高血糖所致 As 早期事件有直接的抑制作用。但如果葡萄糖浓度过高,这种作用不是很显著。这种现象预示着如果在糖尿病早期应用该药能起到事半功倍的疗效,如果应用时已经存在明显高血糖恐怕效果不很理想,而且多数研究也注意到了该药的钠水潴留作用,晚期及心衰患者不宜

使用。

总之,罗格列酮可能通过抑制葡萄糖诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达来抑制内皮细胞-单核细胞的黏附作用,这可能是罗格列酮在抗糖尿病相关的 As 方面的作用之一,早期应用此类药物对于预防糖尿病大血管并发症效果更明显。

#### [参考文献]

- [1] Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease [J]. *J Clin Invest* 2006 **116** (3): 581-589
- [2] 刘宽芝,吕海莉,王伟超,等. 罗格列酮对 2 型糖尿病大鼠大血管病变的防治作用及其分子机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (2): 93-97
- [3] 李华波,全智华,杨薪,等. 罗格列酮对冠心病患者外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (8): 685-688
- [4] Woollard KJ, Kling D, Kulkarni S, et al. Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion [J]. *Circ Res* 2006 **98** (1): 149-156
- [5] Kanter JE, Johansson E, LeBoeuf RC, et al. Do glucose and lipids exert independent effects on atherosclerotic lesion initiation or progression to advanced plaques [J]? *Circ Res* 2007 **100** (6): 769-781
- [6] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, et al. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content [J]. *Circulation*, 1996 **93** (4): 672-682
- [7] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead [J]. *Cell* 2001 **104** (4): 503-516
- [8] Meng X, Li ZM, Zhou YJ, et al. Effect of the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose [J]. *Clin Exp Med* 2008 **8** (1): 43-49
- [9] Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones [J]. *N Engl J Med* 2004 **351** (11): 1106-1118
- [10] Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, et al. On behalf of the DREAM trial Investigators. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomized controlled trial [J]. *Lancet* 2006 **368** (9541): 1096-1105
- [11] Zeender E, Maedler K, Bosco D, et al. Pioglitazone and sodium salicylate protect human beta-cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1 $\beta$  [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 **89** (10): 5059-5066
- [12] Decker M, Hofflich H, Elias AN. Thiazolidinediones and the preservation of  $\beta$ -cell function: cellular proliferation and apoptosis [J]. *Diabetes Obes Metab* 2007 **10** (8): 617-625
- [13] Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, et al. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators [J]. *Circulation*, 2000 **101** (3): 235-238
- [14] Consoli A, Devangelio E. Thiazolidinediones and inflammation [J]. *Lupus* 2005 **14** (9): 794-797

(此文编辑 文玉珊)