

[文章编号] 1007-3949(2009)17-07-0519-04

• 实验研究 •

抑制 p22phox 表达对高糖所致的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡的影响

盛顺良^{1,2}, 屈顺林¹, 张弛¹, 朱红林³, 王佐¹

(南华大学 1 心血管病研究所, 2 附属第二医院妇产科, 湖南省衡阳市 421001;

3 中南大学湘雅医学院病理生理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] p22phox 葡萄糖; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨 p22phox 基因沉默在高浓度葡萄糖诱导的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡中的作用。方法 将原代培养的人脐静脉内皮细胞分为对照组、高糖组、高糖 + sRNA 转染组和 sRNA 转染组, 采用 Western-blot 检测 p22phox 蛋白的表达, 流式细胞仪检测细胞内活性氧水平及细胞凋亡率。结果 sRNA 能有效抑制 p22phox 表达, 高糖能诱导内皮细胞 p22phox 表达增加。高糖 + sRNA 转染组的细胞内活性氧水平和细胞凋亡率明显低于高糖组 ($P < 0.05$)。结论 抑制 p22phox 表达能降低高糖所致的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Inhibiting p22phox Expression on Endothelial Reactive Oxygen Species Induction and Cell Apoptosis Induced by High-Glucose

SHENG Shun-Liang^{1,2}, QU Shun-Lin¹, ZHANG Chi¹, ZHU Hong-Lin³, and WANG Zuo¹

(1 Institute of Cardiovascular Disease, 2 Department of Obstetrics and Gynecology of the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001; 3 Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] p22phox; Glucose; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of NAD(P)H oxidase subunits p22phox on endothelial reactive oxygen species (ROS) induction and cell apoptosis induced by high-glucose. **Methods** Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) were divided into four groups: control group, high glucose group, sRNA group and high glucose + sRNA group. Expression of p22phox, intracellular ROS level and cell apoptosis in HUVEC were detected by Western-blot and flow cytometry respectively. **Results** p22phox-sRNA could induce NAD(P)H oxidase subunit p22phox gene silence; high glucose could induce p22phox expression. Compared with high glucose group, ROS level and cell apoptosis was decreased in high glucose + sRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibiting p22phox expression could decrease ROS level and cell apoptosis induced by high-glucose.

糖尿病和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重威胁人类健康的两大疾病。糖尿病的主要临床特点是血糖升高, 而高糖可以刺激血管产生氧化应激, 损伤内皮细胞, 诱发动脉粥样硬化^[1]。体内有多种酶参与了活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成, 如 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体和内皮型一氧化氮合酶等。目前 NADPH 氧化酶被认为是血管内生成活性氧的主要酶体。NADPH 氧化酶是由多个亚基组成的酶复合体, 包含胞膜成分细胞色素 b558 (gp91phox 和

p22phox, 其中 gp91phox 有 NADPH、heme 和 FAD 的潜在结合位点) 和胞浆成分 p47phox、p67phox 及小的 GTP 结合蛋白 RAC 五个亚组分。研究^[2]发现间断的高浓度葡萄糖刺激内皮细胞时, NADPH 氧化酶被激活, 细胞凋亡增加。但在高糖诱导内皮细胞时 NADPH 氧化酶与细胞凋亡的关系还不清楚。本研究采用体外细胞培养方法, 观察抑制 p22phox 表达对高浓度葡萄糖所致的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡的影响, 探讨高糖刺激时活性氧生成的调节机制, 为探寻保护内皮细胞免受高糖状态下的氧化损伤提供新的线索。

[收稿日期] 2009-03-02 [修回日期] 2009-07-03

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (07JJ3034) 和湖南省教育厅课题 (07C617)

[作者简介] 盛顺良, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, Email 为 xiaoqian263@126.com。通讯作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机制的研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

参照本科室^[3]以前的方法分离人脐静脉内皮

细胞 (human umbilical vein endothelial cell HUVEC), 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 ku/L 青链霉素) 中。葡萄糖购自北京鼎国生物公司, 用双蒸水配制成 2 mol/L 的储备液, -20℃ 保存。胎牛血清购自 Hyclone 公司, p22phox 多克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司, DCFH-DA 购自美国 Gibco 公司。

1.2 sRNA 合成

根据 GenBank 人类 p22phox 基因 (编号 NM_000101.1) 已知序列, 依据李虹^[4]等设计的 p22phox-sRNA 在上海吉凯基因技术有限公司合成, sRNA 双链: 正义链 5'-GAAGGGCUCCACCAUGGAGTT-3' 反义链 5'-UCCAUGGUGGAGCCCUUCTT-3'。

1.3 细胞分组

原代分离得到的 HUVEC 接种于 6 孔培养板, 进行如下分组: 对照组 (含 10% 胎牛血清的 DMEM 孵育)、高糖组 (加入终浓度为 20 mmol/L 的葡萄糖持续刺激 72 h)、sRNA 组 (sRNA 终浓度为 100 nmol/L) 和高糖 + sRNA 组 (终浓度为 100 nmol/L 的 sRNA 转染 6 h 后, 加入终浓度为 20 mmol/L 的葡萄糖, 持续刺激 72 h)。

1.4 转染 sRNA

HUVEC 接种于 6 孔培养板, 细胞融合至 60% 时进行转染, 转染前 2 h 更换无血清无双抗 DMEM 培养液。用无血清无双抗 DMEM 培养液稀释 sRNA 和转染试剂 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA), 将稀释液混合, 形成 sRNA 转染试剂复合物, 将其加入细胞中, sRNA 终浓度为 100 nmol/L。转染 6 h 后, 加入葡萄糖使高糖组和高糖 + sRNA 组葡萄糖终浓度达到 20 mmol/L。

1.5 Western-blot 检测 p22phox 蛋白表达

提取细胞总蛋白, 蛋白浓度用 Lowry 法定量。调整蛋白浓度, 煮沸变性 10 min, 以 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 加入 1:300 稀释的 p22phox 一抗, 4℃ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1.5 h, 洗膜后化学发光法显色, 在 Odyssey 荧光扫描分析系统下扫描, β -actin 为内对照。

1.6 流式细胞仪检测细胞内活性氧水平和细胞凋亡率

以 DCFH-DA 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荧光强度。未加 DCFH-DA 的阴性对照组自发荧光值定为 1, 而其它各组的荧光值均为相对阴性对照的相

对值 (各组荧光强度/阴性对照荧光强度)。将处理好的 HUVEC 用无血清培养基冲洗 2 次, 加 5 mL 无血清培养基和 7 μ L DCFH-DA 到 25 cm² 的培养瓶中, 在 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 45 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 Rosup (试剂盒提供) 5 μ L, 常温下孵育 1 h, PBS 冲洗 2 次后用流式细胞仪检测细胞内活性氧。收集各组细胞, 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 的 PBS 500 μ L (终浓度 50 mg/L), 37℃ 水浴孵育 30 min, 再加入碘化丙啶, 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, 测定凋亡细胞的数量。

1.7 统计学方法

所有实验结果均重复 4 次, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 转染 p22phox-sRNA 对内皮细胞 p22phox 表达的影响

与对照组比较, 高糖组 p22phox 蛋白表达显著增高, sRNA 组显著减低 ($P < 0.05$); 而高糖 + sRNA 组 p22phox 蛋白表达显著低于高糖组 ($P < 0.05$, 图 1 和表 1)。

表 1 转染 p22phox-sRNA 对内皮细胞 p22phox 蛋白表达的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	p22phox 蛋白
对照组	0.48 \pm 0.12
高糖组	0.69 \pm 0.20 ^a
高糖 + sRNA 组	0.22 \pm 0.06 ^b
sRNA 组	0.16 \pm 0.04 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与高糖组比较。

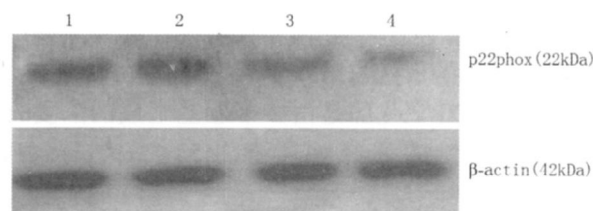


图 1 转染 p22phox-sRNA 对内皮细胞 p22phox 蛋白表达的抑制作用 1 为对照组, 2 为高糖组, 3 为高糖 + sRNA 组, 4 为 sRNA 组。

2.2 抑制 p22phox 表达对高糖诱导的内皮细胞内活性氧生成的影响

与对照组比较, 高糖组细胞内活性氧含量显著增高, 说明高糖能诱导内皮细胞活性氧生成; 抑制 p22phox 表达后可明显抑制由高糖刺激的活性氧生成 ($P < 0.05$); 而 sRNA 转染组活性氧水平与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 2)。

2.3 抑制 p22phox 表达对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, 高糖组细胞内活性氧含量增加的同时细胞凋亡率也明显增加 ($P < 0.05$), 说明高糖可能通过诱导内皮细胞活性氧产生而增加细胞凋亡; 而抑制 p22phox 表达后可明显抑制由高糖诱导的细胞凋亡 ($P < 0.05$); sRNA 转染组细胞凋亡率与对照组相比差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 2)。

表 2 p22phox-sRNA 对人脐静脉内皮细胞内活性氧生成和细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	ROS 的相对值	细胞凋亡率
对照组	2.8 ± 0.9	5.5% ± 1.7%
高糖组	8.3 ± 2.4 ^a	23.8% ± 6.5% ^a
高糖 + sRNA 组	3.5 ± 1.0 ^b	15.9% ± 3.2% ^b
sRNA 组	3.0 ± 0.9	5.2% ± 1.4%

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与高糖组比较。

3 讨论

RNAi 目前已成为研究基因功能和信号通路不可缺少的工具, 是一种可快速高效获得基因功能缺失的有效方式。RNAi 是通过诱导 mRNA 序列特异性降解引起转录后基因沉默。大量研究证实, 体外合成的 sRNA 在低等生物和高等生物的细胞中均能发挥强大的特异性基因抑制功能^[5,6], 对非靶基因的表达无影响, 是一种高效特异性抑制基因表达的新途径。

动脉粥样硬化是糖尿病的并发症之一, 血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的始动因素。在高水平葡萄糖状态下, 内皮细胞功能失调, 主要原因有: 氧化应激增强, 氧自由基生成增多; ④一氧化氮活性降低; ④前列环素 (prostacyclin, PGI_2) 功能缺陷; 内皮细胞凋亡; ④激发炎症反应。降低细胞内活性氧的水平是保护内皮细胞功能完整性及防治糖尿病并发动脉粥样硬化的关键途径之一^[7]。

NAD(P)H 氧化酶是内皮细胞活性氧的主要来

源, 我们以前的研究证实^[3] NAD(P)H 氧化酶 NOX4 可由高糖激活。p22phox 是 NAD(P)H 氧化酶活性必需的亚单位。p22phox 亚单位由基因座 CYBA 编码, 位于染色体 16q24, 有大约 600 bp 的开放阅读框, 由 6 个外显子所编码, 长约 8.5 kb, 有 5 个内含子。p22phox 基因多态性共有 10 种^[8]。据报道, 在日本人群中, p22phox C242T 的多态性影响低密度脂蛋白颗粒的大小及胰岛素抵抗, 与糖尿病及动脉粥样硬化的发生密切相关^[9]。Weidling 等^[10]用 22 mmol/L 葡萄糖处理冠状动脉血管内皮细胞 7 天, 观察到还原型谷胱甘肽减少 50%, 并检测到 p22phox 的表达上调; Christ 等^[11]用高浓度葡萄糖处理猪的冠状动脉以及 Avogaro 等^[12]在糖尿病患者血液中分离出的单个核细胞中都观察到 p22phox 的表达上调。许多研究也证实在血管平滑肌细胞中加入血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等均能上调 p22phox mRNA 的表达并导致活性氧的生成; 而在内皮细胞中加入血管紧张素 ④ (angiotensin ④ , Ang ④) 也能上调 p22phox mRNA 的表达, 导致活性氧的水平升高^[13-15]。李虹等^[4]最近研究发现 sRNA 靶向沉默 p22phox 表达能抑制由 Ang ④ 诱导的 ECV-304 内皮细胞活性氧生成。这些研究提示 p22phox 可能参与了血管细胞活性氧的生成, 但高浓度葡萄糖诱导 HUVEC 凋亡的机制仍不清楚。本研究用原代分离得到的 HUVEC 为模型, 采用 RNAi 技术抑制 p22phox 表达, 以观察 p22phox 在高浓度葡萄糖所致的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡的影响, 结果发现转染 p22phox 后能有效抑制 p22phox 表达 ($P < 0.05$), 且抑制 p22phox 表达后能显著降低高浓度葡萄糖所致的内皮细胞活性氧生成和细胞凋亡率。我们的前期研究发现高浓度葡萄糖能诱导 NADPH 氧化酶 NOX4 表达升高^[3]。因此, 在高浓度葡萄糖刺激 HUVEC 时, NOX4 和 p22phox 是否存在相互作用, 是否协同参与了细胞内活性氧生成, 过多的活性氧是否是高浓度葡萄糖诱导 HUVEC 凋亡的直接原因, 这些问题都有待于下一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Jousilahti P, Yegutkin GG, Tapanainen P, et al. Insulin-regulated increase of soluble vascular adhesion protein-1 in diabetes [J]. *Am J Pathol* 2002; 161 (6): 2255-262
- [2] Xia L, Wang H, Snezana Munk, et al. Reactive oxygen species PKC- β 1, and PKC- ζ mediate high-glucose-induced vascular endothelial growth factor expression in mesangial cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293 E1280 - E1288

- [3] 丁莉, 屈顺林, 王蕾, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (6): 405-409.
- [4] 李虹, 白小涓, 刘强, 等. siRNA靶向沉默p22phox表达对内皮细胞衰老抑制作用的研究[J]. 遗传, 2008, **30** (9): 1175-181.
- [5] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNA mediate RNA interference in mammalian cell culture [J]. *Nature* 2001, **411** (6836): 494-498.
- [6] Hiscott A, McLellan DS. Graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation: the role of monoclonal antibodies in prevention and treatment [J]. *Br J Biomed Sci* 2000, **57** (2): 163-169.
- [7] Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Diabetes* 2003, **52**: 2795 - 804.
- [8] Dinanier MC, Pierce EA, Bruns GAP, et al. Human neutrophil cytochrome B light chain (p22phox) gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome b gene in autosomal recessive chronic granulomatous disease [J]. *J Clin Invest* 1990, **86**: 1729-737.
- [9] Hayashi Okano R, Yamasaki Y, Ohtoshi K, et al. NAD(P)H oxidase p22phox C242T polymorphism affects LDL particle size and insulin resistance in Japanese subjects [J]. *J Atheroscler Thromb* 2002, **9** (4): 200-205.
- [10] Weidig P, Mäster D, Bayraktutan U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells [J]. *Diabetes Obes Metab* 2004, **(6)**: 432-441.
- [11] Christ M, Auerbach J, Liebetrau C, et al. Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NAD(P)H oxidase activation [J]. *Diabetes* 2002, **51**: 2648 - 652.
- [12] Avogaro A, Pagnin E, Calo L. Monocyte NADPH oxidase subunit p22phox and inducible hem oxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**: 1753 - 759.
- [13] Gorlach A, Brandes RP, Bassus S, et al. Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the upregulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets [J]. *FASEB J* 2000, **14**: 1518 - 528.
- [14] De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, et al. Tumour necrosis factor α activates p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle [J]. *Biochem J* 1998, **329**: 653 - 657.
- [15] Inoue I, Goto S, Matsunaga T, et al. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells [J]. *Metabolism* 2001, **50**: 3 - 11.
- (此文编辑 许雪梅)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》

中文核心期刊

作为专业性极强的高级学术期刊,《中国动脉硬化杂志》主要刊载国内外防治动脉硬化性疾病(如高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、高血压、缺血性脑血管病和其它动脉硬化性疾病)中的研究论文(含流行病学研究、实验研究、临床研究和药理学研究)。长期以来,以办刊严谨、内容丰富、编排新颖、对稿件处理快速及时、文章发表周期短、可读性强而深受广大作者和读者厚爱。现为中文核心期刊、科技部《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,被美国《化学文摘(CA)》、俄罗斯《文摘杂志(AJ)》和国内全部数据库收录。现为月刊,每月26日出版,A4开本,高档双胶纸印刷。定价11元,全年132元。由湖南省报刊发行局发行,医药卫生类,邮发代号42-165。《中国动脉硬化杂志》热忱欢迎海内外同仁和社会各界朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。为感谢广大作者和读者对本刊的支持,自2009年1月1日起,凡在《中国动脉硬化杂志》上发表的论文被SCI和EI源刊引用,论文第一作者和引用者凭当期封面、目次页和文章的复印件可获南华大学期刊社一定金额的现金奖励。

主编杨永宗教授和编辑部主任李小玲副教授率全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢!祝愿您健康长寿,万事如意!