

NADPH 氧化酶源性活性氧在糖尿病及其血管并发症发生中的作用机制

黎健, 高丹, 李兰芳, 原慧萍, 李淼, 张小勇

(卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] 糖尿病; 血管并发症; 活性氧

2型糖尿病的发病机制为胰岛素抵抗和胰岛素分泌受损。最新的研究结果显示, 氧化应激在糖尿病及其并发症的发病机制中起重要作用。在高游离脂肪酸 (FFA) 条件下, 由于活性氧 (ROS) 产生过多引起的氧化应激可造成胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能丧失, 导致糖尿病的发生, 而血糖升高进一步加重氧化应激, 引发大血管和微血管病变, 产生糖尿病并发症。通过研究氧化应激在糖尿病及其并发症发病中的作用机制, 为防治糖尿病及其并发症提供新的理论依据。机体内多种酶体参与了 ROS 的生成, 如 NADPH 氧化酶 (NOX)、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 及脂氧合酶 (LOX) 等。本研究旨在探讨 NOX 源性 ROS 在糖尿病及其血管并发症发生中的作用机制。

1 NADPH 氧化酶 3 与游离脂肪酸诱导的肝脏胰岛素抵抗

肥胖引发的 FFA 水平升高可通过多种途径影响胰岛素的作用及葡萄糖代谢, 在胰岛素抵抗的病理过程中占有重要的地位。肝脏是胰岛素的重要靶器官之一, 肝脏的胰岛素抵抗在 2 型糖尿病发生发展过程中发挥重要作用。研究表明, 高 FFA 诱发的氧化应激是导致肝脏胰岛素抵抗的重要原因。为了探讨 NOX3 源性 ROS 在 FFA 诱导的肝脏胰岛素抵抗发生中的作用机制, 首先我们用不同浓度 (0.15~0.35 mmol/L) 棕榈酸处理人肝脏细胞 HepG2 通过 DCFH-DA 荧光染色结合流式细胞术检测 ROS 水平的改变。结果显示, 与正常培养条件相比, 棕榈酸导致 HepG2 细胞中 ROS 水平显著升高, 其作用具有浓度和时间依赖性。分别用 ROS 途径抑制剂如 NOX 抑制剂 DPI、线粒体呼吸链酶复合体抑制剂 Rotenone、环氧合酶抑制剂 L-NAME 和黄嘌呤氧化酶抑制剂 Oxypurinol 预处理, 结果显示 DPI 和 Rotenone 处理组的 ROS 水平显著降低, 其中 DPI 降低 ROS 水平的作用最为显著, 而其他抑制剂处理组的 ROS 水平无明显变化。提示 NOX 是高 FFA 诱导 HepG2 细胞产生 ROS 的主要来源。进

一步应用 Western blot 分析 NOX 亚组分的表达变化, 结果表明 HepG2 表达 NOX3、p22phox、p47phox 和 Rac-1。NOX3、p47phox 和 Rac-1 的表达在 0.25 mmol/L 棕榈酸处理后显著升高, p22phox 则无显著改变。观察棕榈酸对 NOX3 活性的调节机制, 结果表明, 在 0.25 mmol/L 棕榈酸作用下, HepG2 细胞的 NOX3 活性主要是通过 p47phox 的膜移位来调节。用检测细胞内糖原合成和培养上清中葡萄糖的含量来观察细胞的胰岛素抵抗, 结果显示, 棕榈酸处理后 HepG2 细胞内糖原合成量显著降低, 细胞培养上清中葡萄糖的浓度显著升高, 提示棕榈酸诱导 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗。为了确定 NOX3 源性 ROS 在 HepG2 产生胰岛素抵抗中的作用, 我们采取“失去功能”的策略, 将 NOX3-sRNA 转染入 HepG2 细胞, 获得低表达 NOX3 水平的 HepG2 细胞。分析比较这些 HepG2 细胞和对照 HepG2 细胞 (未转入 NOX3-sRNA) 中 ROS 水平与胰岛素抵抗状态, 经 NOX3-sRNA 转染抑制 NOX3 表达后, 棕榈酸所引起的 ROS 升高和胰岛素抵抗均受到抑制。说明 NOX3 参与了 FFA 引起的 ROS 的生成和胰岛素抵抗。在此基础上, 我们进一步探讨 FFA 诱导 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗的机制, 结果显示, 0.25 mmol/L 棕榈酸处理 HepG2 细胞后, 伴随 NOX3 表达和 ROS 水平的升高, 磷酸化的 p38MAPK、PTEN、JNK 和 IRS1 增多, 胰岛素信号通路中的 AKT、GSK 和 FOXO1 的磷酸化水平下降。表明 FFA 通过 NOX3 介导的氧化应激诱导 HepG2 细胞产生胰岛素抵抗, 其机制涉及到 p38MAPK / PTEN、JNK 和胰岛素信号通路。

我们用 DB/DB 小鼠作为胰岛素抵抗模型进一步证实 NOX3 源性 ROS 在 FFA 诱导的肝脏胰岛素抵抗发生中的作用机制。油红 O 染色结果显示 DB/DB 小鼠肝脏中脂肪堆积。与正常对照小鼠相比, DB/DB 小鼠血清中 FFA、GL 浓度显著升高。以血清中的丙二醛 (MDA) 水平、肝脏中 ROS 生成和 NOX3 表达作为评价氧化应激的指标, 结果表明, DB/DB 小鼠 MDA 水平显著升高, 肝脏中 NOX3 表达增强, ROS 生成增多。此外, DB/DB 小鼠血清胰岛素和糖化血红蛋白水平明显高于正常对照小鼠, 提示 DB/DB 小鼠发生了胰岛素抵抗。用检测肝组织中糖原含量进一步分析 DB/DB 小鼠肝脏胰岛素抵抗状况, 结果显示 DB/DB 小鼠肝糖原含量显著低于正常对照小鼠, 表明 DB/DB 小鼠肝脏处于胰

胰岛素抵抗状态。与体外结果相一致, p38MAPK / PTEN、JNK 和胰岛素信号通路参与了肝脏胰岛素抵抗的发生过程。

2 低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白引起胰岛 β 细胞氧化损伤的机制

近年研究发现, 胰岛 β 细胞膜上存在高亲和力的脂蛋白受体, 可摄取低密度脂蛋白 (LDL) 或极低密度脂蛋白 (VLDL) 进入细胞内参与代谢。当 LDL 或 VLDL 的摄取量增多时, 亦对 β 细胞有损伤作用。为了探讨 LDL 和 VLDL 引起胰岛 β 细胞氧化损伤作用的机制, 我们用超速离心法分离制备人血清 LDL 和 VLDL, 酶法测定其脂质含量; 以 LDL 或 VLDL 作用于体外培养的小鼠胰岛 β 细胞系 NIT-1, 利用 DCFH-DA 荧光染色结合流式细胞分选方法检测不同处理浓度与作用时间下, 细胞内 ROS 的产生并明确其来源。RT-PCR 检测 NIT-1 细胞中 NOX 的表达类型。间接免疫荧光法和 Western blot 分析 NOX 在 NIT-1 细胞中的活性调节方式。荧光定量 PCR、ELISA 法分析 LDL 或 VLDL 对 NIT-1 细胞合成与分泌胰岛素功能的变化。核染色、Annexin (V)-PI 双染法及 TUNEL 法检测细胞凋亡。以间接免疫荧光法、Western blot 探讨相关的信号通路。利用高脂喂养联合小剂量 STZ 注射方法建立的大鼠糖尿病模型, 分为对照组、糖尿病组和辛伐他汀干预组, 取大鼠血清, 以电子感应法检测血糖、放免法检测胰岛素和酶法检测血脂谱; 硫代巴比妥酸法 (TBA) 检测 MDA、羟胺法检测超氧化物歧化酶 (SOD); 留取三组大鼠的胰腺组织采用 RT-PCR 观察胰岛 β 细胞内胰岛素 mRNA 表达变化; 免疫组织化学法检测胰岛病理学改变; DHE 荧光染色法检测胰腺内 ROS 的生成; 间接免疫荧光法和 RT-PCR 检测胰岛 β 细胞内 NOX 的表达等。结果显示, LDL 或 VLDL 可使体外培养的 NIT-1 细胞内 ROS 产生量显著升高, 其作用具有浓度依赖性。LDL 或 VLDL 作用不同时间的结果显示, 至 6 h 时 ROS 产生量达到最高点, 之后保持在该水平, 至 24 h 时出现下降趋势 ($P < 0.05$, $n = 3$)。为确定 NIT-1 细胞中 ROS 的来源, 选用 NOX 抑制剂 DPI 线粒体呼吸链酶复合体抑制剂 Rotenone、环氧合酶抑制剂 L-NAME 和黄嘌呤氧化酶抑制剂 Oxypurinol 分别处理 NIT-1 细胞, 发现只有 NOX 和线粒体呼吸链酶复合体抑制剂可以抑制 ROS 的升高。NOX 及其亚组分表达的检测结果显示, NIT-1 细胞与小鼠胰岛细胞中均表达 NOX2 及其亚组分 p47phox、p67phox 和 Rac-1。在 LDL 或 VLDL 作用下, NIT-1 细胞中 NOX2 及其亚组分的表达没有改变, p47phox 也没有转位, 但 Rac-1 呈现自胞浆向胞膜的转位。LDL 或 VLDL 对 NIT-1 细胞损伤作用的研究结果提示, LDL 或 VLDL 均可显著减少 NIT-1 细胞内胰岛素合成 ($P < 0.05$, $n = 3$) 和糖依赖性胰岛素分泌 ($P < 0.05$, $n = 3$), 并导致细胞凋亡。进一步研究表明 LDL 或 VLDL 对 NIT-1 细胞的损伤作用涉及核因子 κ B 和 JNK 途径的激活。

我们应用糖尿病大鼠模型证实体外实验结果。与对照组相比, 糖尿病大鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 分别升高了 60% ($P < 0.05$, $n = 9$) 和 1.40 倍 ($P < 0.05$, $n = 9$), 而胰岛素敏感指数显著降低 ($P < 0.05$, $n = 9$)。糖尿病大鼠

血清中氧化应激指标 MDA 比对照组升高 7.5% ($P < 0.05$, $n = 9$), 但 SOD 没有明显改变 ($P > 0.05$)。糖尿病大鼠胰岛 β 细胞数量及其胞内胰岛素水平下降, 而 ROS 明显升高。

3 NADPH 氧化酶 4 在高糖引起的血管内皮细胞损伤中的作用机制

糖尿病是心血管疾病重要的危险因素, 其中血糖异常是糖尿病血管并发症发生的重要原因之一。高糖引起的血管内皮形态改变和功能异常, 是糖尿病血管并发症的早期标志。研究已表明, 高糖诱发的氧化应激是导致血管内皮损伤的主要原因。为了探讨高糖引起血管内皮细胞氧化应激的作用机制, 我们用高浓度 (20 mmol/L) 葡萄糖处理人脐静脉内皮细胞 (hUVEC), 通过流式细胞术检测 ROS 水平的改变。结果显示, 与正常培养条件相比, 20 mmol/L 葡萄糖处理的 hUVEC 中 ROS 水平显著升高。分别用几个产生 ROS 途径的抑制剂 DPI、Rotenone、Oxypurinol 和 L-NAME 预处理后, NOX 抑制剂 DPI 组 ROS 水平显著降低, 而其他抑制剂组的 ROS 水平无明显变化。提示 NOX 是高浓度葡萄糖诱导 hUVEC 产生 ROS 的主要来源。进一步应用 RT-PCR、Real-time PCR 和 Western blot 分析 NOX 亚组分表达的变化, 结果表明, hUVEC 表达 NOX4 及其亚组分 p22phox、p47phox、p67phox 和 Rac-1。NOX4 的表达在 20 mmol/L 葡萄糖处理后显著升高, 其它亚组分则无显著性改变。同时, 我们应用 SuperArray 公司的第二代功能分类基因芯片技术对葡萄糖处理后 hUVEC 氧化应激与抗氧化相关基因的表达进行了检测, 结果显示, 20 mmol/L 葡萄糖引起氧化应激与抗氧化相关部分基因的表达升高或者降低, 其中值得注意的是, 与对照组相比, Dual oxidase 2 基因表达升高近 13 倍, 而 Superoxide dismutase 3 基因表达水平明显降低。葡萄糖对 NOX4 活性调节机制研究结果表明, 在高浓度葡萄糖条件下, hUVEC 的 NOX4 活性调节主要发生在两个水平上, 一是通过蛋白激酶 C (PKC) 激活 NOX4, 二是通过 p47phox 和 Rac-1 的膜移位来调节 NOX4 的活性。为了研究 NOX4 表达水平的改变对 ROS 产生的影响及其对 hUVEC 损伤的作用, 我们采取“失去功能”和“获得功能”两种策略, 分别将 NOX4-sRNA 或 NOX4 基因转染入 hUVEC, 获得极低表达甚至无表达或高表达 NOX4 水平的 hUVEC。分析比较这些内皮细胞和对照内皮细胞 (未转入 NOX4-sRNA 和 NOX4) 中 ROS 水平与细胞凋亡, 结果表明, 与未转染质粒的对照组和转染 GFP 质粒组相比, 转染 NOX4 质粒组的 hUVEC 中 ROS 明显升高 ($P < 0.05$); 流式细胞术、Hoechst 染色和 TUNEL 染色结果均显示, 转染 NOX4 质粒组的 hUVEC 发生明显凋亡 ($P < 0.05$)。高糖处理 hUVEC 之后, 其 NOX4 mRNA 水平升高, ROS 产量增加, 细胞凋亡的比例也增多, 而经 NOX4-sRNA 转染抑制 NOX4 表达后, 高糖所引起的 ROS 升高和凋亡均受到抑制。说明 NOX4 参与了高糖引起内皮细胞内 ROS 的生成和细胞凋亡。在此基础上, 我们对核因子 κ B 和 p38MAPK 信号通路在高糖诱导内皮细胞凋亡中的作用进行探讨, 结果显示, 20 mmol/L 葡萄糖处理 hUVEC 后, 伴随 ROS 的升高, 磷酸化

的核因子 κ B抑制蛋白 (I κ B)和核因子 κ B均增多, I κ B失去对核因子 κ B的抑制作用, 核因子 κ B移位至细胞核内。另外, 我们还发现, 与对照组相比, 葡萄糖处理组炎症相关因子细胞间粘附分子 1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子 1(VCAM-1)的表达均明显增强 ($P < 0.05$)。这些结果提示, 高糖可以诱导 ROS 的升高, 引起核因子 κ B 的活化, 使得炎症相关因子的表达增加。p38MAPK 是细胞内重要的信号转导通路, 参与内皮细胞凋亡的调节。研究表明, 高糖可导致 p38MAPK 的磷酸化从而进入细胞核启动下游信号通路的转录。我们用 20 mmol/L 葡萄糖及 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理 hUVEC, 用 Western blot 检测 p38MAPK 及磷酸化 p38MAPK (P-p38MAPK) 的水平, 结果显示, 与正常对照组相比, 葡萄糖处理组 p38MAPK 的表达无明显变化, 而 P-p38MAPK 的水平明显升高 ($P < 0.05$); 与葡萄糖处理组相比, SB203580 能明显抑制高糖所致 P-p38MAPK 的升高 ($P < 0.05$), 而对 p38MAPK 的表达并无影响。Hoechst/PI 染色、TUNEL 和 PI/Annexin V-FITC 双染法结果表明, SB203580 预

处理明显抑制葡萄糖引起的细胞凋亡。这些结果提示, p38MAPK 在高糖诱导 hUVEC 凋亡的过程中起重要调节作用。近年研究提示, 他汀类药物除了有降胆固醇作用之外, 还具有抗炎、抗氧化和稳定斑块的作用。我们在前期的研究中发现, 辛伐他汀处理 hUVEC 能下调 NOX4 mRNA 水平, 但不影响 NOX2 的表达。高浓度 (0.8 g/L) LDL 刺激 hUVEC 时, NOX4 表达上调, 细胞内 ROS 生成增加。用辛伐他汀预处理再加高浓度 LDL 刺激时, NOX4 表达下降, ROS 生成量减少。提示辛伐他汀可下调 hUVEC NOX4 表达, 降低 ROS 水平。为了进一步在体内证明辛伐他汀的抗氧化作用, 我们建立了 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠模型, 并用辛伐他汀进行干预, 结果显示, 与对照组小鼠相比, 辛伐他汀能够明显降低 ApoE^{-/-} 小鼠血液中 TG 和 MDA, 也降低动脉粥样硬化斑块的 ROS 水平和 NOX 亚组分的表达。此外, 辛伐他汀干预后, 动脉粥样硬化斑块变小, 纤维帽的厚度和完整性得到明显改善, 提示辛伐他汀可能起到稳定斑块的作用。

(此文编辑 许雪梅)