

[文章编号] 1007-3949(2009)17-12-0989-04

• 实验研究 •

糖基化终产物对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶活性和表达的影响及二甲双胍的保护作用

刘 鸣, 姚玉宇, 刘乃丰

(东南大学附属中大医院心内科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 糖基化终产物; 二甲双胍; 内皮细胞; 一氧化氮合酶

[摘 要] 目的 探讨糖基化终产物及二甲双胍对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶活性和表达的影响。方法 用胶原酶法分离人脐静脉内皮细胞并加以培养, 将内皮细胞与不同浓度的糖基化终产物和二甲双胍分别孵育 3、6、12、24 h, CCK-8法测定人脐静脉内皮细胞增殖活性, 硝酸还原酶法测定一氧化氮含量, 分光光度法测定一氧化氮合酶活性, 蛋白免疫印迹法检测内皮型一氧化氮合酶蛋白表达水平。结果 糖基化终产物抑制人脐静脉内皮细胞增殖, 二甲双胍促进人脐静脉内皮细胞增殖。糖基化终产物抑制人脐静脉内皮细胞的一氧化氮生成和一氧化氮合酶活性 ($P < 0.01$), 呈剂量、时间依赖关系。二甲双胍(与对照组相比)或与糖基化终产物共同干预(与糖基化终产物组相比)均增加人脐静脉内皮细胞一氧化氮生成和一氧化氮合酶活性 ($P < 0.01$)。糖基化终产物与人脐静脉内皮细胞共同孵育 24 h后, 内皮型一氧化氮合酶表达水平明显下降; 二甲双胍上调内皮型一氧化氮合酶的表达; 与糖基化终产物组相比, 糖基化终产物与二甲双胍共同干预组内皮型一氧化氮合酶表达上调 ($P < 0.01$)。结论 二甲双胍能够改善糖基化终产物导致的人脐静脉内皮细胞损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Advanced Glycation End Products on Activity and Expression of Nitric Oxide Synthase in Human Umbilical Vein Endothelial Cells and the Protective Effects of Metformin

LIU Ming, YAO Yu-Yu, and LIU Nai-Feng

(Department of Cardiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products, Metformin, Endothelial Cells, Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of advanced glycation end products (AGE) and metformin on activity and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** HUVEC were co-incubated with different concentrations of AGE-BSA and metformin for 3, 6, 12 and 24 hours respectively. HUVEC viability was measured by CCK-8. Nitric oxide (NO) was measured by the technique of nitrate reductase; the activity of NOS was determined by the spectrophotography and protein expression of eNOS was measured by Western Blotting. **Results** AGE-BSA inhibited the proliferation of HUVEC, while metformin promoted the proliferation of HUVEC. AGE-BSA significantly inhibited the generation of NO and the activity of NOS in a concentration and time-dependent manner ($P < 0.01$). Metformin (compared with the control group) or with AGE-BSA co-interventions (compared with the AGE group) significantly increased the generation of NO and the activity of NOS ($P < 0.01$). The expression of eNOS had a significant reduction when HUVEC were incubated with AGE-BSA for 24 hours while the expression of eNOS had a significant increase when incubated with metformin. Compared with AGE-BSA group, the expression of eNOS up-regulated in metformin intervention group ($P < 0.01$). **Conclusion** Metformin ameliorates the dysfunction of HUVEC induced by AGE.

糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 是糖尿病动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及血管并发症的关键致病因素^[1]。内皮功能障

碍是糖尿病患者的普遍特征, 也是 As 血管并发症的始动环节。研究表明, AGE 的蓄积是糖尿病患者发生内皮功能障碍的原因之一, 其可能通过抑制内皮细胞一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性, 减少一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成, 抑制 NO 依赖的血管舒张^[2], 最终导致内皮功能障碍。二甲双胍 (metformin, Met) 是一种被广泛应用于 2 型糖尿病治疗的口服降糖药物。最近两项大规模临床研究表明, 二甲双胍能够改善血管功能, 减少 2 型糖尿

[收稿日期] 2009-11-03 [修回日期] 2009-12-17

[作者简介] 刘鸣, 研究方向为糖尿病动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 liumingxinghua@163.com。姚玉宇, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的病理过程。通讯作者刘乃丰, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病慢性并发症发病机制及其干预策略, Email 为 liunf_2006@126.com。

病患者的死亡率和心血管终点事件,且这种保护作用不完全归结于血糖降低,提示其有独立于降糖作用外的血管保护作用^[3,4]。有研究提示二甲双胍可以增加 NO 生成,改善内皮功能,具有多种心血管保护作用^[5]。本研究以人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 为研究对象,观察 AGE 及二甲双胍对血管内皮细胞 NOS 活性和表达的影响,以探讨糖尿病血管内皮功能障碍的可能机制及二甲双胍的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

M 199 培养基和 iv 型胶原酶 (Gibco 公司);牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA; AMRESCO 公司);糖基化终产物和二甲双胍 (Sigma 公司);胎牛血清 (Hyclone 公司);兔抗人内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 多克隆抗体 IgG 和羊抗兔 IgG2HRP (Santa Cruz 公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的分离培养

新生儿脐带由东南大学附属中大医院提供。参照 Marin 等^[6]的方法,找出脐静脉,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 彻底冲洗其内淤血,排空残留液体。注入预热至 37℃ 的 iv 型胶原酶溶液 12 mL (0.1%) 左右,消化 7~10 min,收集消化液于离心管中,离心 (1 500 r/min, 8 min) 后收集细胞,用含 20% 胎牛血清 M 199 培养液重新悬浮细胞,调整细胞数为 1×10^4 个/L,接种到 50 mL 塑料培养瓶中,37℃、5% CO₂ 条件下静置培养 24 h 后换液,3~4 天后细胞可融合铺满瓶底,呈典型铺路卵石样。传至第 3、4 代用于实验。内皮细胞鉴定应用 (1) 因子抗体免疫荧光染色,结果符合内皮细胞的特征。

1.3 分组

实验分 5 组:以单纯 M 199 完全培养基组作为空白对照组。BSA 组 (刺激终浓度为 200 mg/L)、AGE-BSA 组 (刺激终浓度分别为 100、200 mg/L)^[7,8]、二甲双胍组 (刺激终浓度分别为 1.0×10^{-5} mol/L、 5.0×10^{-5} mol/L、 1.0×10^{-4} mol/L)^[9]、AGE-BSA (刺激终浓度为 200 mg/L) 和二甲双胍 (刺激终浓度为 1.0×10^{-4} mol/L) 共同干预组均为刺激组,各孵育 3、6、12、24 h。以不同供体内皮细胞重复实验。

1.4 细胞增殖活性测定

内皮细胞接种于 96 孔培养板中,培养至 70%~80% 融合时,无血清培养 24 h,然后更换为不同处

理因素的培养基,每组设 6 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 37℃ 孵育 1~2 h,酶标仪上以 450 nm 测吸光度值 (OD)。

1.5 一氧化氮及一氧化氮合酶活性测定

一氧化氮检测采用硝酸还原酶法, NOS 检测采用分光光度法。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,均按说明书严格操作。

1.6 内皮型一氧化氮合酶蛋白表达测定

将内皮细胞加入预冷的内皮细胞裂解缓冲液,刮下细胞收集于 Eppendorf 管中,4℃ 离心 20 min,收集上清,检测总蛋白浓度, -20℃ 保存蛋白样品。取 40 μ g 蛋白样品,经 8% 分离胶十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后,转移至硝酸纤维素膜上,用含 1% 牛血清白蛋白的 TBST (tris-buffered saline tween) 封闭 4 h。随后加入兔抗人 eNOS 多克隆抗体 (1:1 000), 室温孵育 2 h,用 TBST 漂洗 3 次,加入羊抗兔第二抗体 (1:5 000) 孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次。ECL 显色后,用 Bandscan-Kodak 进行灰度分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用组间方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖基化终产物导致人脐静脉内皮细胞损伤以及二甲双胍的保护作用

糖基化终产物干预后抑制 HUVEC 增殖,随着作用浓度增加,细胞增殖活性逐渐降低 ($P < 0.01$)。二甲双胍促进 HUVEC 增殖,与 AGE-BSA 共同干预后对 AGE-BSA 导致的 HUVEC 增殖抑制有保护作用 ($P < 0.01$)。BSA 对 HUVEC 增殖无明显影响 (表 1)。

表 1 CCK-8 法检测不同干预对人脐静脉内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	吸光度值
空白对照组	0.890 ± 0.017
200 mg/L BSA 组	0.890 ± 0.017
100 mg/L AGE-BSA 组	0.798 ± 0.014^a
200 mg/L AGE-BSA 组	0.708 ± 0.012^a
1.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	0.938 ± 0.010^a
5.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	0.980 ± 0.007^a
1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组	1.029 ± 0.024^a
AGE-BSA + 二甲双胍组	0.898 ± 0.011^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 BSA 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 AGE-BSA 组比较。

2.2 糖基化终产物抑制人脐静脉内皮细胞的一氧化氮生成以及二甲双胍的保护作用

基础状态下 HUVEC 生成一定量 NO, AGE-BSA 与内皮细胞孵育后明显抑制 NO 生成 ($P < 0.01$), 且呈浓度和时间依赖性。二甲双胍刺激后 NO 生成明显增加 ($P < 0.01$), 与 AGE-BSA 共同干预后能减轻 AGE-BSA 对 NO 的抑制作用 ($P < 0.01$)。BSA 对 NO 生成无明显影响 (表 2 和表 3)。

表 2 糖基化终产物和二甲双胍分别与 HUVEC 孵育不同时间对一氧化氮生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	作用时间	一氧化氮 ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白)
空白对照组	24 h	8.997 $\pm$ 0.160
200 mg/L BSA 组	24 h	9.000 $\pm$ 0.173
200 mg/L AGE-BSA 组	3 h	8.037 $\pm$ 0.108 ^a
	6 h	7.613 $\pm$ 0.136 ^a
	12 h	7.125 $\pm$ 0.102 ^a
	24 h	6.355 $\pm$ 0.121 ^a
1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组	3 h	9.611 $\pm$ 0.108 ^a
	6 h	11.766 $\pm$ 0.118 ^a
	12 h	13.235 $\pm$ 0.125 ^a
	24 h	14.274 $\pm$ 0.186 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 BSA 组比较。

表 3 不同干预因素与 HUVEC 孵育 24 h 对一氧化氮生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	一氧化氮 ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白)
空白对照组	8.997 $\pm$ 0.160
200 mg/L BSA 组	9.000 $\pm$ 0.173
100 mg/L AGE-BSA 组	7.541 $\pm$ 0.137 ^a
200 mg/L AGE-BSA 组	6.355 $\pm$ 0.121 ^a
1.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	12.288 $\pm$ 0.167 ^a
5.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	13.237 $\pm$ 0.127 ^a
1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组	14.274 $\pm$ 0.186 ^a
AGE-BSA + 二甲双胍组	9.629 $\pm$ 0.147 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 BSA 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 AGE-BSA 组比较。

2.3 糖基化终产物抑制人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶活性以及二甲双胍的保护作用

基础状态下 HUVEC 的 NOS 部分激活, AGE-BSA 明显抑制 NOS 活性 ($P < 0.01$), 其抑制作用随 AGE-BSA 浓度增加和孵育时间延长而增强。二甲双胍刺激后 NOS 活性增加 ($P < 0.01$), 与 AGE-BSA 共同干预后能减轻 AGE-BSA 对 NOS 的抑制作用 (表 4 和表 5)。

表 4 糖基化终产物和二甲双胍分别与 HUVEC 孵育不同时间对一氧化氮合酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	作用时间	一氧化氮合酶 相对活性 (kU/g 蛋白)
空白对照组	24 h	180.976 $\pm$ 3.160
200 mg/L BSA 组	24 h	181.050 $\pm$ 3.537
200 mg/L AGE-BSA 组	3 h	162.331 $\pm$ 4.042 ^a
	6 h	153.751 $\pm$ 2.933 ^a
	12 h	144.407 $\pm$ 3.232 ^a
	24 h	134.371 $\pm$ 3.516 ^a
1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组	3 h	192.716 $\pm$ 3.203 ^a
	6 h	223.627 $\pm$ 3.067 ^a
	12 h	252.898 $\pm$ 2.766 ^a
	24 h	284.065 $\pm$ 3.047 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 BSA 组比较。

表 5 不同干预因素与 HUVEC 孵育 24 h 对一氧化氮合酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	一氧化氮合酶 相对活性 (kU/g 蛋白)
空白对照组	180.976 $\pm$ 3.160
200 mg/L BSA 组	181.050 $\pm$ 3.537
100 mg/L AGE-BSA 组	164.355 $\pm$ 3.757 ^a
200 mg/L AGE-BSA 组	134.371 $\pm$ 3.516 ^a
1.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	231.725 $\pm$ 2.890 ^a
5.0×10^{-5} mol/L 二甲双胍组	263.978 $\pm$ 4.057 ^a
1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组	284.065 $\pm$ 3.047 ^a
AGE-BSA + 二甲双胍组	205.225 $\pm$ 3.305 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组及 BSA 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 AGE-BSA 组比较。

2.4 糖基化终产物抑制人脐静脉内皮细胞内皮型一氧化氮合酶表达以及二甲双胍的保护作用

200 mg/L AGE-BSA 与 HUVEC 孵育 24 h 后 eNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。不同浓度 AGE-BSA 与 HUVEC 共同孵育后, 随着 AGE-BSA 浓度增加, eNOS 表达呈浓度依赖性降低 ($P < 0.01$)。二甲双胍与 HUVEC 共同孵育后, 随着二甲双胍浓度增加, eNOS 表达呈浓度依赖性升高。二甲双胍与 AGE-BSA 共同干预能够逆转 AGE-BSA 对 eNOS 表达的影响 ($P < 0.01$), 而 BSA 对 eNOS 表达无明显影响 (图 1 和表 6)。

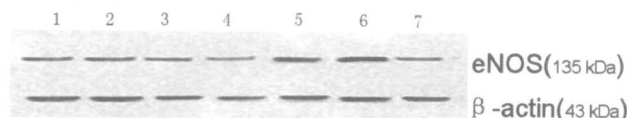


图 1 不同干预因素与 HUVEC 孵育 24 h 对 eNOS 蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 BSA 对照组, 3、4 分别为 100 mg/L、200 mg/L AGE-BSA 组, 5、6 分别为 1.0×10^{-5} mol/L、 1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍组, 7 为 200 mg/L AGE-BSA 与 1.0×10^{-4} mol/L 二甲双胍共同干预组。

表 6 不同干预因素与 HUVEC 孵育 24 h 对 eNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	eNOS/ β -actin
空白对照组	0.421 $\pm$ 0.010
200 mg/L BSA 组	0.425 $\pm$ 0.010
100 mg/L AGE-BSA 组	0.401 $\pm$ 0.012 ^a
200 mg/L AGE-BSA 组	0.370 $\pm$ 0.013 ^a
1.0 $\times 10^{-5}$ mol/L 二甲双胍组	0.690 $\pm$ 0.014 ^a
1.0 $\times 10^{-4}$ mol/L 二甲双胍组	0.888 $\pm$ 0.015 ^a
AGE-BSA + 二甲双胍组	0.421 $\pm$ 0.011 ^b

a 为 $P < 0.01$ 与空白对照组及 BSA 组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 AGE-BSA 组比较。

3 讨论

内皮功能障碍, 特别由于 NO 生物合成减少导致的内皮功能障碍, 普遍存在于糖尿病患者中^[10-11], 可能参与糖尿病微血管和大血管并发症的发生发展^[12]。近年来研究发现, 内皮细胞既是感受细胞又是效应细胞, 可接受来自血管内炎症信号以及激素水平、切应力、压力等变化信息, 通过产生效应分子, 具有抗凝、抗炎、调节血管张力、改善血管重塑等功能。NO 是血管内皮释放的效应分子之一, 目前被认为是体内最强大、最有效的血管舒张因子, 对维持正常内皮舒张功能起着重要作用, 具有抗血小板聚集和血栓形成, 抑制平滑肌细胞增殖、血管通透性增加以及白细胞黏附等作用, 从而有抗动脉粥样硬化作用。本研究显示, AGE 以浓度和时间依赖方式抑制 NOS 活性和 eNOS 表达, 减少 NO 生成, 这可能是其导致内皮损伤的机制之一。二甲双胍能通过增加 NOS 活性及 eNOS 表达, 促进 NO 生成, 从而有一定的血管内皮保护作用。

很多实验已经证实, 糖尿病患者血清 AGE 水平明显升高, AGE 能抑制血管内皮细胞 NOS 活性, 下调其蛋白表达, 提示 AGE 致血管内皮 NO 减少的可能机制, 进而导致血管内皮功能障碍, 加速糖尿病血管并发症发展^[8]。本研究与既往研究结果相同。

实验和临床研究已经证实, 糖尿病患者用二甲双胍治疗具有心血管保护作用^[14]。特别是 UKPDS 研究结果显示, 二甲双胍能够降低糖尿病患者心血管事件发生率, 并且这种心血管保护作用独立于其降糖作用^[3]。最近国外学者证实, 二甲双胍在不引起血糖降低情况下减少糖尿病和非糖尿病小鼠心肌梗死面积, 再次明确二甲双胍的心血管保护作用。以往研究表明, 二甲双胍通过激活一磷酸腺苷活化的蛋白激酶, 进而活化 eNOS 和增加 NO 生成, 改善内皮功能, 可能是其心血管保护作用的机制之

一^[9]。本研究亦证实二甲双胍与脐静脉内皮细胞共同孵育后上调 eNOS 表达, 促进 NO 生物合成, 与以往研究相同。

本研究结果还显示, 二甲双胍与 AGE 共同干预 HUVEC 后, 可以逆转 AGE 对 NO 生成和 eNOS 表达的不利影响, 对血管内皮有保护作用。我们推测二甲双胍能够改善 AGE 对血管内皮的不利影响, 可能是通过抑制糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products RAGE), 进而阻断 AGE-RAGE 的相互作用, 发挥其独立于降糖外的血管保护作用, 这有待于以后进一步研究。

糖基化终产物能够抑制内皮细胞 NO 生成和 eNOS 表达, 是 AGE 导致内皮损伤, 加速糖尿病 As 发展的可能机制之一。二甲双胍能够改善 AGE 对内皮的不利影响, 具有独立于降糖之外的血管内皮保护作用。

【参考文献】

- [1] Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K. Kinetics, role and therapeutic implications of endogenous soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetes [J]. *Curr Drug Targets* 2007; **8** (10): 1138-143
- [2] Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes [J]. *J Clin Invest* 1991; **87** (2): 432-438
- [3] UKPDS Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34): UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group [J]. *Lancet* 1998; **352** (9131): 854-865
- [4] Abbasi F, Chu JW, McLaughlin T, et al. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Metabolism* 2004; **53** (2): 159-164
- [5] Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, et al. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats [J]. *Hypertension* 2000; **35** (1 Pt 1): 108-112
- [6] Marin V, Kaplanski G, Gros S, et al. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells [J]. *J Immunol Methods* 2001; **254** (1-2): 183-190
- [7] 刘宏, 侯凡凡, 梁敏. 糖基化终产物促进培养的人脐静脉内皮细胞选择素 E 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; **13** (4): 406-408
- [8] Xu B, Ji Y, Yao K, et al. Inhibition of human endothelial cell nitric oxide synthesis by advanced glycation end-products but not glucose: relevance to diabetes [J]. *Clin Sci* 2005; **109** (5): 439-446
- [9] Davis BJ, Xie Z, Violette R, et al. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetic drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase [J]. *Diabetes* 2006; **55** (2): 496-505
- [10] Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, et al. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus [J]. *J Am Coll Cardiol* 1996; **27** (3): 567-574
- [11] 张林, 孙子林, 周虹. 2 型糖尿病及其慢性并发症患者血清糖基化终末产物和一氧化氮水平及其相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (7): 625-626
- [12] Huraiah H, Ferro A. The role of the endothelium in the control of vascular function [J]. *Int J Clin Pract* 2004; **58** (2): 173-183

(此文编辑 曾学清)