

[文章编号] 1007-3949(2010)18-04-0265-04

• 实验研究 •

罗格列酮对高糖诱导的血管内皮细胞炎症的抑制作用

牛红心¹, 刘章锁², 龙海波¹

(1. 南方医科大学珠江医院肾内科, 广东省广州市 510282; 2. 郑州大学第一附属医院肾内科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 糖尿病; 罗格列酮; 血管内皮细胞; 内皮功能失常

[摘要] 目的 阐明罗格列酮对糖尿病血管并发症保护作用的分子机制。方法 用凝胶迁移分析和免疫荧光法测定不同浓度罗格列酮干预前后高糖诱导的血管内皮细胞核因子 KB激活和血管细胞黏附分子 1表达的改变。

结果 25 mmol/L D-葡萄糖刺激 30 min 可诱导细胞核因子 KB向核内迁移(与基础水平相比, $P < 0.001$); 5、25 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮以剂量依赖的方式抑制了 D-葡萄糖诱导这种效应, 抑制率分别为 25.17% ($P = 0.001$) 和 51.79% ($P < 0.001$)。罗格列酮还抑制了 D-葡萄糖诱导的血管细胞黏附分子 1高表达。结论 罗格列酮通过抑制血管内皮细胞炎症起到直接保护血管作用, 可能是其延缓和改善糖尿病血管并发症的机制之一。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Rosiglitazone Prevents High Glucose-Induced Inflammation in Vascular Endothelial Cells

NIU Hong-Xin¹, LIU Zhang-Suo², and LONG Hai-Bo¹

(1. Department of Nephrology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] Diabetes; Rosiglitazone; Vascular Endothelial Cells; Endothelial Dysfunction

[ABSTRACT] Aim To clarify the molecular mechanism of protective effect of rosiglitazone on vascular complication of diabetes. Methods Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were exposed to medium or high glucose in the presence or absence of different doses of rosiglitazone. Nuclear translocation of nuclear factor- κB (NF- κB) was measured using the electrophoretic mobility shift assay and immunofluorescence. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was determined by immunofluorescence.Results 25 mmol/L D-glucose significantly induced nuclear translocation of NF- κB in HUVEC ($P < 0.001$ vs that of basal level), which was prevented by 5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ of rosiglitazone in a dose-dependent manner. The suppression rate was 25.17% ($P = 0.001$) and 51.79% ($P < 0.001$).

Rosiglitazone also prevented the increased expression of VCAM-1 induced by D-glucose. Conclusion Rosiglitazone directly protects vascular function via inhibition of inflammation in vascular endothelial cells and that is perhaps one of the mechanisms of rosiglitazone improving vascular complication of diabetes.

噻唑烷二酮 (tiazolidinediones, TZD) 是治疗 2 型糖尿病的口服药, 属于胰岛素增敏剂, 通过激活过氧化物增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator activated receptors gamma, PPAR γ) 起作用, 主要调节糖、脂代谢, 改善胰岛素抵抗, 还具有改善内皮功能、抑制系统炎症等作用, 对糖尿病大血管^[1] 和微血管^[2] 并发症起保护作用。近期研究显示, 在细胞和分子水平, TZD 的生物学作用还可通过不依赖 PPAR γ 激活的途径来实现, 如通过减少内皮素的合成和释放、增加一氧化氮生物利用度、减少高糖诱导

的氧化应激等^[3], 然而其机制并不十分清楚。为了进一步明确 TZD 对糖尿病血管并发症保护作用的分子机制, 本文以体外培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 作为内皮模型, 观察罗格列酮干预前后高糖诱导的核因子 KB (nuclear factor- κB , NF- κB) 激活和血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 表达的改变。

1 材料和方法

1.1 试剂

RPMI 1640 培养液 (HyClone, Logan, Utah), D-葡萄糖 (Sigma-Aldrich, Louis, MO), 罗格列酮 (葛兰素史克, 天津, 中国), 兔抗人 NF- κB /p65、NF- κB /p50、VCAM-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), FITC 标记猪抗兔 IgG (DakoCytom ar

[收稿日期] 2010-02-21 [修回日期] 2010-04-08

[基金项目] 广东省自然科学基金 (9451051501002540)

[作者简介] 牛红心, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为氧化应激与肾脏疾病诊治, Email 为 nhongxin@126.com。刘章锁, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病肾病发病机制, Email 为 zhangsuoliu@sina.com。龙海波, 博士, 主任医师, 副教授, 主要研究方向为糖尿病肾病发病机制, Email 为 lymhb@hotmail.com。

tion, Glostrup, Denmark), 碘化丙啉 (propidium iodide, PI, Sigma), Dig Gel Shift Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), NF- κ B 双链寡核苷酸探针 (Promega Madison, WI), 尼龙膜 (Amersham, Sweden)。

1.2 细胞培养

按照我们以往的方法^[4]分离和培养 HUVEC。在 37℃、5% CO₂ 和 95% 空气条件下, 细胞生长于含 20% 人 AB 血清、80 kU/L 青霉素、80 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 以 1:2 传代, 第 1~3 代细胞用于实验。

1.3 凝胶迁移分析法测定核因子 κ B 激活

HUVEC 培养至接近汇合, 在含 1% 人 AB 血清的 RPMI 1640 培养液中静止 12 h, 分别将 5、25 μ mol/L 罗格列酮提前 1 h 加入培养液, 再以 25 mmol/L D-葡萄糖刺激细胞 30 min, 以 25 mmol/L 甘露醇作为对照。收集细胞, 按照我们以往的方法^[5]提取细胞核蛋白。按照试剂盒说明用 Digoxigenin 标记 NF- κ B 寡核苷酸探针 (探针序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' 和 3'-TCA ACT CCC CTC AAA GCG TCC G-5')。在结合反应体系 (结合缓冲液 4 μ L, poly [d(I-C)] 1 μ g, poly L-lysine 0.1 μ g, 样品核蛋白 10 μ g, 寡核苷酸探针 3.5 μ mol) 中使核蛋白样本中 NF- κ B 与已标记的寡核苷酸探针结合。为了检测特异性, 在一组反应体系中提前 1 h 加入 125 倍未标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针, 行竞争试验。在另两组反应体系中分别加入兔抗 NF- κ B/p65 或 NF- κ B/p50 抗体各 2.5 μ g, 4℃ 条件下孵育 12 h, 行超迁移试验。反应结束后, 在上述反应体系中各加入 5 μ L 上样缓冲液, 行 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转印至正电荷尼龙膜, 120℃ 烤 20 min, 漂洗和封闭后, 加入碱性磷酸酶标记的抗 Digoxigenin 抗体, 加入 CSPD 显影、曝光, 以 Quantity One 凝胶图像分析系统 (Bio-Rad Hercules CA) 分析结果。

1.4 免疫荧光观察核因子 κ B 激活

HUVEC 培养在置有盖玻片的细胞培养板上, 生长至 70% 汇合, 静止后, 分别将 5、25 μ mol/L 罗格列酮提前 1 h 加入培养液中, 再以 25 mmol/L D-葡萄糖刺激细胞 30 min。固定、漂洗、封闭后, 加入兔抗 NF- κ B/p65 抗体 (10 mg/L), 4℃ 过夜, 洗板, FITC 标记猪抗兔 IgG (1:20) 37℃ 避光孵育 45 min。洗后, PI (10 mg/L) 室温避光孵育 10 min。在共聚焦显微镜 (Leica TCS SP2 AOB, Leica Microsystems, Cambridge, UK) 下观察、摄像。

1.5 血管细胞黏附分子 1 表达的测定

HUVEC 培养于置有盖玻片的细胞培养板上, 生长至 70% 汇合, 静止后, 将 25 μ mol/L 罗格列酮提前 1 h 加入培养液, 再以 25 mmol/L D-葡萄糖刺激细胞 6 h。用免疫荧光化学染色法检测 VCAM-1 表达。一抗为兔抗 VCAM-1 抗体 (1:100), 其余方法同上。

1.6 细胞活力的测定

HUVEC 培养至接近汇合, 静止后, 用分别以 25 mmol/L D-葡萄糖处理细胞 30 min 和 6 h 及 25 μ mol/L 罗格列酮处理 1 h。用 MTT 法测定细胞活力。

1.7 统计学处理

实验重复 3 次或以上, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 One-way ANOVA 比较总体及组间差异, 对于方差齐的数据采用 SNK 和 LSD 作两两比较, 对于方差不齐的数据采用 Dunnett T3 作两两比较。

2 结果

2.1 高糖对血管内皮细胞核因子 κ B 的影响

2.1.1 凝胶迁移分析结果 25 mmol/L D-葡萄糖刺激 30 min 可诱导细胞 NF- κ B 向核内迁移, 为基础水平的 9.52 倍 ($P < 0.001$), 而甘露醇对 NF- κ B 无影响 ($P = 0.985$), 提示 NF- κ B 的激活是 D-葡萄糖本身而非高渗透性作用造成的 (表 1 和图 1)。竞争试验中使用过量未标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针抑制了 NF- κ B 与标记的寡核苷酸探针的结合, 抑制率为 86.45% (与高糖组相比, $P = 0.011$), 证实了核蛋白与 DNA 结合的特异性。在超迁移试验中, 使用特异性抗 p65 和 p50 抗体抑制了 NF- κ B 与寡核苷酸探针的结合, 抑制率分别为 64.77% (与高糖组相比, $P = 0.038$) 和 70.51% (与高糖组相比, $P = 0.024$), 说明 NF- κ B 复合物主要由 p65 和 p50 构成 (表 2 和图 2)。又由于 D-葡萄糖刺激 30 min 对细胞活力没有影响 ($P = 0.678$), 提示高糖对细胞 NF- κ B 的影响也并非因细胞活力改变所致 (表 3)。

2.1.2 免疫荧光结果 为了进一步证实高糖对血管内皮细胞 NF- κ B 的激活作用, 用兔抗人 p65 抗体进行免疫荧光化学染色, 共聚焦显微镜观察发现未受刺激细胞胞浆有较强的绿色荧光 (p65), 而细胞核显示红色荧光 (PI); 25 mmol/L D-葡萄糖刺激 30 min 后, 多数细胞胞核有明显的绿色荧光着色, 与 PI 的红色荧光叠加后呈桔黄色 (图 3)。提示 25 mmol/L D-葡萄糖可诱导 NF- κ B/p65 亚单位从胞浆

向核内迁移。

2 2 罗格列酮对高糖诱导的内皮细胞核因子 κ B 的抑制作用

罗格列酮以剂量依赖方式抑制 D-葡萄糖诱导的 NF- κ B 激活, 抑制率分别为 25.17% ($P = 0.001$) 和 51.79% ($P < 0.001$; 表 1 和图 1)。25 μ mol/L 罗格列酮对细胞活力没有影响 (与溶媒对照组相比, $P = 0.794$) (表 3), 提示罗格列酮对高糖诱导的 NF- κ B 激活的抑制作用并非因抑制细胞活力所致。

免疫荧光化学染色显示, 随着罗格列酮浓度的增加, 细胞核内绿色荧光 (p65) 强度减弱, PI 的红色荧光强度增加。说明罗格列酮可以抑制 D-葡萄糖诱导的 NF- κ B 激活和 NF- κ B 的核迁移, 这种抑制作用随罗格列酮剂量增加而增强 (图 3)。

表 1. 罗格列酮对高糖诱导的核因子 κ B 激活的抑制作用

分 组	<i>n</i>	光密度比值
溶媒对照组	3	1.00 \pm 0.21
高糖组	3	9.52 \pm 0.96 ^a
高糖 + 5 μ mol/L 罗格列酮组	3	7.12 \pm 1.07 ^{ab}
高糖 + 25 μ mol/L 罗格列酮组	3	4.59 \pm 0.34 ^{ab}
甘露醇组	3	1.01 \pm 0.20

a 为 $P < 0.01$, 与溶媒对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与高糖组相比。

表 2. 竞争试验和超迁移试验

分 组	<i>n</i>	光密度比值
高糖组	3	1.00 \pm 0.13
高糖 + 未标记寡核苷酸探针组	3	0.14 \pm 0.06 ^a
高糖 + 抗 p65 组	3	0.35 \pm 0.02 ^a
高糖 + 抗 p50 组	3	0.29 \pm 0.04 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与高糖组相比。

表 3. 高糖和罗格列酮对细胞活力的影响

分 组	<i>n</i>	吸光度比值
溶媒对照	3	1.00 \pm 0.12
高糖处理 30 min	3	0.95 \pm 0.23
高糖处理 6 h	3	0.94 \pm 0.05
罗格列酮	3	0.97 \pm 0.12

2 3 罗格列酮对高糖诱导的内皮细胞血管细胞黏附分子 1 表达的抑制作用

免疫荧光化学染色可见 HUVEC 胞质中和胞膜上均有 VCAM-1 表达, 细胞暴露于 25 mmol/L D-葡萄糖 6 h 后, VCAM-1 蛋白表达增加, 荧光强度增强。25 μ mol/L 罗格列酮预孵育细胞明显抑制了高糖诱导的 VCAM-1 蛋白高表达 (图 4)。同样, 25

mmol/L D-葡萄糖刺激 6 h (与溶媒对照组相比, $P = 0.641$) 和 25 μ mol/L 罗格列酮刺激 1 h 对细胞活力没有影响 (表 3), 说明高糖诱导 VCAM-1 高表达和罗格列酮对高糖诱导的 VCAM-1 的抑制作用与细胞活力的改变无关。

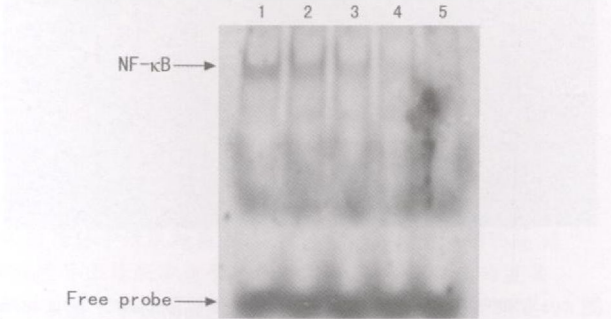


图 1. 罗格列酮对高糖诱导核因子 κ B 激活的抑制作用 1 为高糖组, 2 为高糖 + 5 μ mol/L 罗格列酮组, 3 为高糖 + 25 μ mol/L 罗格列酮组, 4 为甘露醇组, 5 为溶媒对照组。

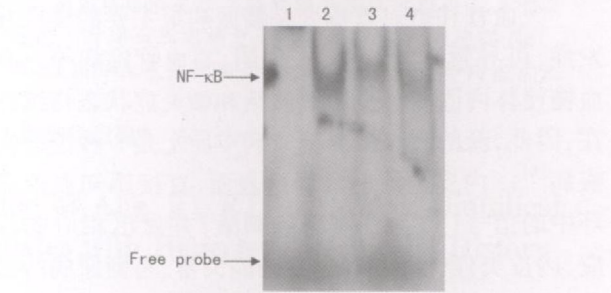


图 2. 竞争试验和超迁移试验 1 为高糖 + 未标记寡核苷酸探针组, 2 为高糖组, 3 为高糖 + 抗 p65 组, 4 为高糖 + 抗 p50 组。

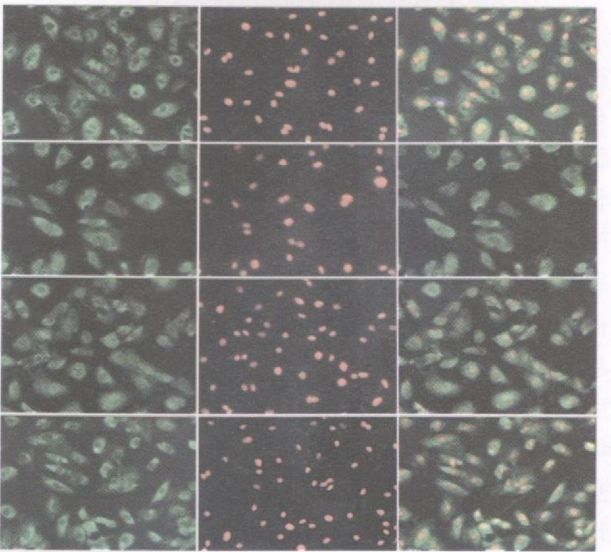


图 3. 罗格列酮对高糖诱导的核因子 κ B 激活的影响 ($\times 400$) 从左到右依次为 p65、PI 和 p65 + PI; 从上到下依次为溶媒对照组、高糖组、5 μ mol/L 和 25 μ mol/L 罗格列酮组。

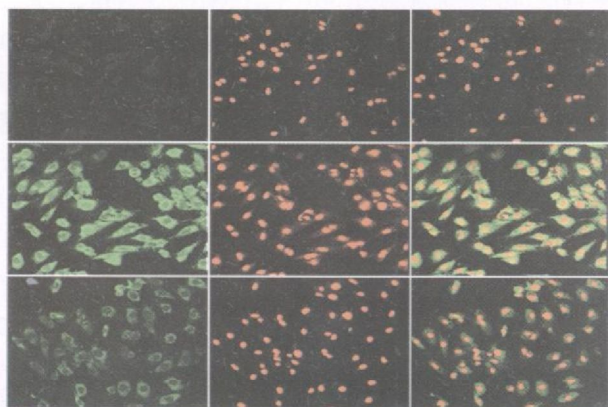


图4 罗格列酮对高糖诱导的血管细胞黏附分子1激活的影响($\times 400$) 从左到右依次为VCAM-1、PI和VCAM-1+PI从下到上依次为溶剂对照组、高糖组和25 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组。

3 讨论

大血管和微血管病变是糖尿病最主要的慢性并发症,可导致肾功能不全、失明、心血管疾病等。高血糖使体内固有免疫系统激活和微炎症状态持续存在,因此,新的观点认为糖尿病本质上是一种炎症性疾病^[6]。内皮被覆于血管壁表面,直接感知血液循环中的信号(包括高血糖的刺激)并做出相应的反应,内皮炎症性损伤和内皮功能失常,与糖尿病的血管并发症关系更为密切^[7]。因此,将内皮炎症和内皮功能失常作为干预的靶点,可能是预防和延缓糖尿病的血管并发症的有效策略。

NF- κB 是氧化应激敏感的转录因子,激活后进入细胞核,与多种炎症因子的DNA启动子上NF- κB 序列结合,启动多种促炎症细胞因子、黏附分子、趋化因子和生长因子等的基因转录,从而参与机体防御功能和炎症反应。NF- κB 存在于内皮细胞,对血管内皮炎症因子表达起关键调控作用。因此,抑制NF- κB 活性,可能成为控制血管炎症、延缓和改善糖尿病血管并发症的关键途径。Ceolotto等^[3]发现罗格列酮可完全消除高糖诱导的血管内皮细胞内活性氧产生,由于NF- κB 对氧化应激敏感,推测罗格列酮可能对NF- κB 起作用。我们在用高糖刺激血管内皮细胞之前,在培养液中加入不同浓度的罗格列酮,结果显示罗格列酮以剂量依赖的方式抑制了高糖诱导的血管内皮细胞NF- κB 的激活。

黏附分子是一类存在于细胞表面,介导细胞与

细胞、细胞与细胞外基质相互作用的糖蛋白分子,其基因的表达受到NF- κB 等转录因子的调控。VCAM-1主要由血管内皮细胞表达,在胞外含有免疫球蛋白样结构域,可作为配体与白细胞表面表达的淋巴细胞相关抗原1(LFA-1)和巨噬细胞1(Mac-1)分子结合,介导白细胞(特别是单核细胞)与血管内皮细胞黏附和白细胞活化,促发炎症反应。本研究结果显示罗格列酮可以抑制高糖诱导的VCAM-1高表达,提示罗格列酮具有抑制糖尿病血管内皮炎症的作用,这种作用可能是通过抑制转录因子的激活实现的。其它研究也表明,TZD可通过减轻氧化应激,改善糖尿病大鼠的内皮功能^[8],抑制TNF- α 诱导的内皮细胞细胞间黏附分子1(ICAM-1)表达^[9],这些作用与PPAR γ 和代谢作用无关。

本研究证明罗格列酮通过抑制血管内皮细胞NF- κB 激活和黏附分子表达,而抑制糖尿病血管内皮炎症,对糖尿病血管内皮功能起直接保护作用,为糖尿病慢性并发症的防治提供了新的途径和理论依据。

[参考文献]

- [1] 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): 93-96
- [2] 刘章锁,牛红心,程根阳,等. 罗格列酮对糖尿病大鼠肾保护机制的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2004 20(2): 109-112
- [3] Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, et al. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007 27(12): 2627-633
- [4] 牛红心,吕文成,阎晓. 人脐静脉内皮细胞培养方法的改进及其优势[J]. 广东医学, 2009 30(11): 1621-624
- [5] Guo ZJ, Ni HX, Hou FF, et al. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway[J]. Antioxid Redox Signal, 2008 10(10): 1699-712
- [6] Rivero A, Mora C, Muros M, et al. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy[J]. Clin Sci (Lond), 2009 116(6): 479-492
- [7] Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009 94(9): 3171-182
- [8] Nankoshi T, Satoh M, Tomita N, et al. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction in obese rats with nephropathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007 361(4): 835-840
- [9] Jung Y, Song S, Choi C. Peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists suppress TNF alpha-induced ICAM-1 expression by endothelial cells in a manner potentially dependent on inhibition of reactive oxygen species[J]. Immunol Lett, 2008 117(1): 63-69

(此文编辑 许雪梅)