

SP600125 对 1 型糖尿病小鼠颈动脉内皮功能及单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

王启章^{1,2}, 陈茂刚¹, 李达文¹, 刘朝来¹, 徐格林¹, 刘新峰¹

[1. 南方医科大学南京临床学院(南京军区南京总医院)神经内科, 江苏省南京市 210002;

2. 广州医学院附属深圳沙井医院神经内科, 广东省深圳市 518104]

[关键词] 1 型糖尿病; 颈动脉; JNK 信号通路; 信号转导子和转录激活子 1; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 探讨 c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 特异性抑制剂 SP600125 对 1 型糖尿病小鼠颈动脉内皮功能及单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响。方法 本研究分 5 组。第 1 组为 C57BL/6 野生型雄性小鼠, 喂养 8 周; 第 2 组为 INS2^{AKITA} 雄性小鼠, 每日腹腔注射生理盐水 50 μL, 共 8 周; 第 3、4、5 组为 INS2^{AKITA} 雄性小鼠, 每日各腹腔注射 SP600125 10、20 和 30 mg/kg, 连续 8 周。8 周后麻醉处死动物, 取静脉血检测血清髓过氧化物酶、丙二醛、一氧化氮、一氧化氮合酶; 取双侧颈总动脉分别行凝胶迁移或电泳迁移率实验检测颈动脉信号转导子和转录激活子 1 活性, 行 Western blot 检测 p-JNK、JNK、单核细胞趋化蛋白 1 蛋白表达, 行免疫组化检测颈动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 表达。结果 与野生型雄性小鼠相比, 1 型糖尿病小鼠血清髓过氧化物酶、丙二醛明显增高, 而血清一氧化氮合酶、一氧化氮明显减低($P < 0.01$)。给予 1 型糖尿病小鼠 SP600125 不同剂量干预后, 髓过氧化物酶浓度较 1 型糖尿病组明显减低, 而一氧化氮、一氧化氮合酶浓度明显增高, 且 SP600125 剂量越高, 一氧化氮、一氧化氮合酶浓度增加越明显($P < 0.05$)。同时, 1 型糖尿病小鼠 p-JNK/JNK、单核细胞趋化蛋白 1 蛋白表达、颈动脉信号转导子和转录激活子 1 活性以及颈动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 表达比正常小鼠明显增高($P < 0.05$)。而经过 3 种剂量 SP600125 干预后, 单核细胞趋化蛋白 1 蛋白表达分别下降 21.82%、39.09%、68.18%; 信号转导子和转录激活子 1 活性分别下降 25.70%、33.20%、61.29%; 颈动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 表达分别下降 19.51%、39.14%、59.28%。结论 JNK 特异性抑制剂可通过抑制信号转导子和转录激活子 1, 从而升高糖尿病血清一氧化氮及一氧化氮合酶水平, 改善血管舒张功能, 并且降低单核细胞趋化蛋白 1、髓过氧化物酶表达水平, 并具有剂量依赖性。进一步表明 JNK 通过信号转导子和转录激活子 1 参与了糖尿病颈动脉内皮功能紊乱及炎症因子表达, 并为开发预防 1 型糖尿病大血管并发症的药物提供了一个新的理论依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of SP600125 on Endothelial Function and Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression in Carotid Artery in Type 1 Diabetic Mice

WANG Qi Zhang^{1,2}, CHEN Mao Gang¹, LI Da Wen¹, LIU Chao Lai¹, XU Ge Lin¹, and LIU Xin Feng¹

(1. Department of Neurology, Jinling Hospital, Southern Medical University, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Neurology, The Affiliated Shenzhen Shajing Hospital of Guangzhou Medical University (Shajing People's Hospital), Shenzhen, Guangdong 518104, China)

[KEY WORDS] Type 1 Diabetes; Carotid Artery; c-Jun Amino terminal Kinase Signal Pathway; Signal Transducer and Activator of Transcription 1; Monocyte Chemotactic Protein 1

[ABSTRACT] Aim The incidence of stroke in diabetes is increasing seriously, which is associated with endothelial dysfunction and increased inflammation in carotid artery. Our study is to investigate the effect of c-Jun amino terminal ki-

[收稿日期] 2011-05-23

[基金项目] 国家自然科学基金(青年基金)项目(81000502)及江苏省科技计划项目(BK2009319)资助

[作者简介] 王启章, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为缺血性脑血管病介入及动脉粥样硬化的临床及基础研究, E-mail 为 wqzflm@yahoo.com.cn。陈茂刚, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础及临床研究。通讯作者刘新峰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病介入及动脉粥样硬化的临床及基础研究, E-mail 为 xfliu2@yahoo.com.cn。

nase (JNK) specific inhibitor SP600125 on carotid endothelial function and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) expression in type 1 diabetes. **Methods** Animals were divided into five groups in this study. The 1st group was C57BL/6 wild type male mice; the 2nd group was INS2^{AKITA} male mice, intraperitoneal injection with 0.9% normal saline (NS) each day for 8 weeks; the 3rd, 4th, 5th group were INS2^{AKITA} male mice, intraperitoneal injection with SP600125 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg respectively each day for consecutive 8 weeks. Then the mice were killed and serum myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total nitric oxide synthase (TNOS) were measured.

HE staining was performed in carotid artery and immunohistochemistry was performed to investigate MCP-1 protein expression in endothelial cells of carotid artery. p-JNK, JNK, MCP-1 protein expression in carotid artery was measured by Western blot, signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) DNA binding activity was assayed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Results Compared with wild type mice, serum MPO and MDA expression increased prominently ($P < 0.05$), whereas TNOS, NO decreased and p-JNK/JNK, MCP-1 expression increased significantly in INS2^{AKITA} mice ($P < 0.05$); STAT-1 DNA binding activity increased prominently in type 1 diabetic group compared with that in control group ($P < 0.05$). Compared with type 1 diabetic mice, after treatment with SP600125, MPO decreased and NO, TNOS increased and p-JNK/JNK, endothelial MCP-1 expression decreased ($P < 0.05$). The effects of SP600125 on MPO, NO, TNOS, MCP-1 were increased accordingly as the dose of SP600125 increased. As the dose of SP600125 increased, MCP-1 protein expression decreased 21.82%, 39.09%, 68.18% respectively; STAT-1 DNA binding activity decreased 25.70%, 33.20%, 61.29% respectively compared with type 1 diabetic mice.

Conclusions JNK specific inhibitor SP600125 could inhibit STAT-1 DNA binding activity, thus increase serum NO and TNOS, and improve carotid diastolic function. SP600125 could also decrease MCP-1 and MPO in a dose dependent manner. The results also showed JNK signal pathway is associated with carotid endothelial dysfunction and inflammatory expression via activation of STAT-1 in type 1 diabetes. Our study provides a novel pharmacologic agent to prevent the promotion of macrovascular complication in type 1 diabetes.

近年来基础和临床研究发现,糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者卒中发病率较正常人明显增高,主要原因在于糖尿病患者易出现颈动脉粥样硬化及斑块。而颈动脉内皮功能紊乱及炎症因子表达增高是动脉粥样硬化的重要前提^[1,2]。许多研究显示,改善糖尿病动脉内皮紊乱及炎症因子表达可明显减少动脉粥样硬化的发生发展。c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino terminal kinase, JNK)是促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)信号通路的关键激酶,在参与促炎基因表达、组织重塑和凋亡的调节中起到重要作用,已有研究显示 JNK 抑制剂可显著减少动脉粥样硬化^[3],但关于 JNK 通路与 1 型糖尿病颈动脉内皮功能的研究及其机制尚少,本研究使用特异性 JNK 抑制剂 SP600125,体内作用于 1 型糖尿病小鼠模型(INS2^{AKITA}小鼠),研究 JNK 通路在 1 型糖尿病内皮功能及其研究表达的作用及其机制,并为开发该药物抑制糖尿病动脉粥样硬化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级雄性 INS2^{AKITA}小鼠及同窝出生的野生型 C57BL/6 雄性小鼠[南京大学模式动物研究所,许

可证号:SCXK(苏)2010 0001],雄性 INS2^{AKITA}小鼠为近年新发现的 1 型糖尿病小鼠模型,在 8 周龄时两次检测空腹血糖均在 16.6 mmol/L 的 INS2^{AKITA}小鼠纳入本研究。单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)抗体购自美国 Abcam 公司。JNK、p-JNK 一抗及二抗购自美国 CST 公司。免疫组化 SP 试剂盒购自福州迈新生物科技有限公司。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(total nitric oxide synthase, TNOS)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物模型及分组

实验分 5 组,每组 6 只,均为 C57BL/6 品系雄性小鼠,周龄均为 8 周。第 1 组:C57BL/6 野生型雄性小鼠,喂养 8 周;第 2 组:INS2^{AKITA}雄性小鼠,每日腹腔注射生理盐水 50 μ L,共 8 周;第 3 组:INS2^{AKITA}雄性小鼠,每日腹腔注射 SP600125 10 mg/kg,连续 8 周;第 4 组:INS2^{AKITA}雄性小鼠,每日腹腔注射 SP600125 20 mg/kg,连续 8 周;第 5 组:INS2^{AKITA}雄性小鼠,每日腹腔注射 SP600125 30 mg/kg,连续 8 周。所有小鼠自由进食饮水,单笼饲养,室温 20 ~ 25 $^{\circ}$ C。均喂养 8 周后清晨麻醉处死前采血 2 mL。麻醉处死后,立即取双侧颈总动脉,左侧颈总动脉放入 4% 多聚甲醛固定;右侧颈总动脉放入冻存管,

-80℃保存。

1.3 血清学检测髓过氧化物酶、丙二醛、一氧化氮、一氧化氮合酶水平

分别用 MPO、MDA、NO、TNOS 酶联免疫试剂盒检测血清 MPO、MDA、NO、TNOS 水平。操作步骤由专业人员按试剂盒说明书严格操作。分别设标准孔、待测样品孔及空白孔。用 722 分光光度计(波长 550 nm)依序测量各孔的吸光度(absorbance, A)值。测定后的值以标准品浓度为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线。根据标准曲线测出各血清样本的浓度。

1.4 病理组织学检查及免疫组织化学染色检测颈动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 表达

一侧颈总动脉 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋, 连续切片, 苏木素-伊红(haematoxylin and eosin, HE)染色, 片厚 5 μm, 于光学显微镜下观察病理组织形态学变化。用链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶连结法进行免疫组化染色。将石蜡切片予 1% 甲醇双氧水、蒸馏水洗 1 次, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; 切片上先后滴加抗原修复液、正常羊血清封闭液, 分别加 MCP-1 一抗, 37℃孵育 2 h; 洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(IgG), 37℃孵育 30 min; 二氨基联苯胺显色; 苏木素复染细胞核, 常规脱水、透明、封片镜检。采用 Image Pro Plus 图像分析软件对 MCP-1 表达进行定量检测。

1.5 凝胶迁移率实验检测信号转导子和转录激活因子 1 的活化

称取组织块 25 mg, 加入核蛋白提取液 A 200 μL, 用组织匀浆器碾磨, 于冰浴震荡 30 min, 加 10% NP 40 12.5 μL, 轻震荡 30 s, 4℃下 2 000 g(离心力)离心 10 min。弃上清, 取沉淀, 加入核蛋白提取液 B 100 μL, 混匀, 冰浴震荡 60 min, 4℃下 12 000 g(离心力)离心 10 min。取上清液, 用 Bradford 试剂测定核蛋白的浓度。采用 $\gamma^{32}\text{P}$ ATP 标记下列 DNA 寡核苷酸: 5'-CAT GTT ATG CAT ATT CCT GTA AGT-3', 3'-GTA CAA TAC GTA TAA GGA CAT TCA 5' (南京金斯瑞生物技术科技有限公司合成), 即为信号转导子和转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription, STAT-1)测定探针。将细胞核提取物 10 μg 与同位素标记的探针 1 μL 在 10 μL 的缓冲液体系中充分结合后, 行 7% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 取凝胶, 60℃烘干后, 放入 X 片暗盒中, -40℃下曝光, 根据 STAT-1 与探针的结合强度采取适当的曝光时间。洗片后进行灰度测定, 以蛋

白区带灰度值(IA)作为 STAT-1 活性的量化值。

1.6 Western blot 检测颈动脉 c-Jun 氨基末端激酶、p-JNK 及单核细胞趋化蛋白 1 水平

在低温下将小鼠颈动脉研磨, 加入细胞裂解液, 数分钟后, 10 000 ~ 14 000 g(离心力)离心 3 ~ 5 min, 取上清, 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 按照每 4 μL 蛋白样品加入 1 μL 蛋白上样缓冲液的比例, 混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液(5×)。100℃或沸水浴加热 3 ~ 5 min, 以充分变性蛋白。冷却到室温后, 按每条泳道加核蛋白 25 g/L 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经电转印转移到二氟化树脂膜上。经 BSA 1:100 孵育 2 h, 分别加入兔抗 JNK、p-JNK、MCP-1 多克隆抗体, 稀释度为 1:1 000, 4℃, 孵育 2 h。然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 及甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH) 1:1 000, 室温孵育 1 h。经洗涤后, 化学发光法显色, 在暗室下曝光。图像分析仪测定各条带的 A 值, 以 p-JNK/JNK 的 A 值作为 JNK 的活性蛋白表达量, 以 MCP-1/GAPDH 的 A 值作为 MCP-1 蛋白表达的相对含量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料比较采用两独立样本的 *t* 检验, 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析(one way ANOVA)进行两两比较检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。相关性分析用 Spearman 直线相关分析法。

2 结果

2.1 外周血髓过氧化物酶、一氧化氮合酶、丙二醛、一氧化氮的表达

对照组、1 型糖尿病组及 SP600125 干预组小鼠外周血 MPO、MDA、TNOS、NO 水平见表 1。与对照组相比, 1 型糖尿病组血清 MPO、MDA 明显增高, 且差别具有统计学意义($P < 0.05$); 1 型糖尿病组血清 TNOS、NO 明显减低, 差别具有统计学意义($P < 0.05$)。1 型糖尿病小鼠 SP600125 干预后, MPO 浓度较 1 型糖尿病组 MPO 浓度明显减低, 且 SP600125 剂量越大, MPO 浓度越低, 剂量组间差别具有统计学意义($P < 0.05$)。而与 1 型糖尿病组相比, SP600125 干预组 NO、TNOS 浓度明显增高, 且随 SP600125 剂量增大, NO、TNOS 浓度越高, 剂量组间差别具有统计学意义($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组小鼠外周血 MPO、MDA、TNOS、NO 水平比较

Table 1. Serum MPO, MDA, TNOS and NO level in experimental mice

指 标	n	对照组	DM1 组	DM1 + SP600125 10 mg/kg 组	DM1 + SP600125 20 mg/kg 组	DM1 + SP600125 30 mg/kg 组
MPO(U/L)	6	320.80 ±22.70	733.69 ±44.07 ^a	576.45 ±27.05 ^b	460.91 ±40.21 ^b	382.66 ±82.16 ^b
MDA(μmol/L)	6	7.40 ±1.50	14.86 ±3.55 ^a	16.86 ±3.18 ^c	10.89 ±5.82 ^c	10.17 ±5.62 ^c
TNOS(kU/L)	6	514.31 ±51.95	103.56 ±4.22 ^a	142.40 ±23.28 ^b	222.87 ±61.44 ^b	412.85 ±71.25 ^b
NO(μmol/L)	6	69.78 ±25.11	18.40 ±3.52 ^a	33.63 ±4.17 ^b	43.44 ±5.75 ^b	53.63 ±6.07 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 DM1 组相比; c 为 $P > 0.05$, 与 DM1 组相比。

2.2 SP600125 对颈动脉 p JNK 蛋白活性表达

p JNK/JNK 作为 JNK 蛋白的活化水平, 对照组、1 型糖尿病组、SP600125 10、20、30 mg/kg 治疗组的 p-JNK/JNK 灰度比值分别为 0.45 ± 0.18 、 0.98 ± 0.32 、 0.73 ± 0.26 、 0.52 ± 0.24 、 0.29 ± 0.07 。与对照组相比, 1 型糖尿病小鼠 p JNK/JNK 明显增高, 具有统计学意义, 但 JNK 蛋白水平无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。在 3 个 SP600125 治疗组中, p JNK/JNK 蛋白水平明显减低, SP600125 剂量越高, p JNK 蛋白水平越低, 剂量组间差别具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 1)。

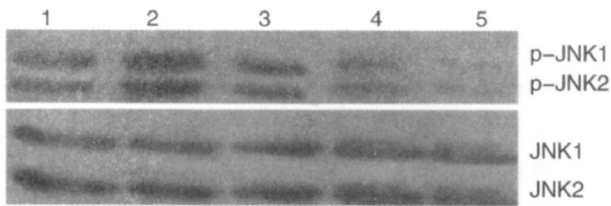


图 1. 不同 SP600125 剂量对 1 型糖尿病小鼠颈动脉 p JNK 蛋白活性表达的影响 1 为正常对照组, 2 为 1 型糖尿病组, 3 为 1 型糖尿病 + SP600125 10 mg/kg 组, 4 为 1 型糖尿病 + SP600125 20 mg/kg 组, 5 为 1 型糖尿病 + SP600125 30 mg/kg 组。

Figure 1. The effect of various dose of SP600125 on p JNK active protein expression in carotid artery in type 1 diabetic mice

2.3 颈动脉信号转导子和转录激活子 1 DNA 结合活性的表达

对照组、1 型糖尿病组、SP600125 10、20、30 mg/kg 治疗组的 STAT-1 灰度值分别为 30.74 ± 7.37 、 73.19 ± 6.77 、 54.38 ± 5.57 、 48.89 ± 6.70 、 28.33 ± 8.27 。与对照组相比, 1 型糖尿病小鼠颈动脉 STAT-1 DNA 结合活性明显增高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而经过 3 种剂量 SP600125 干预后, STAT-1 活性分别下降 25.70%、33.20%、61.29%; 且 SP600125 剂量越高, STAT-1 活性越低, 剂量组间差别具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2)。

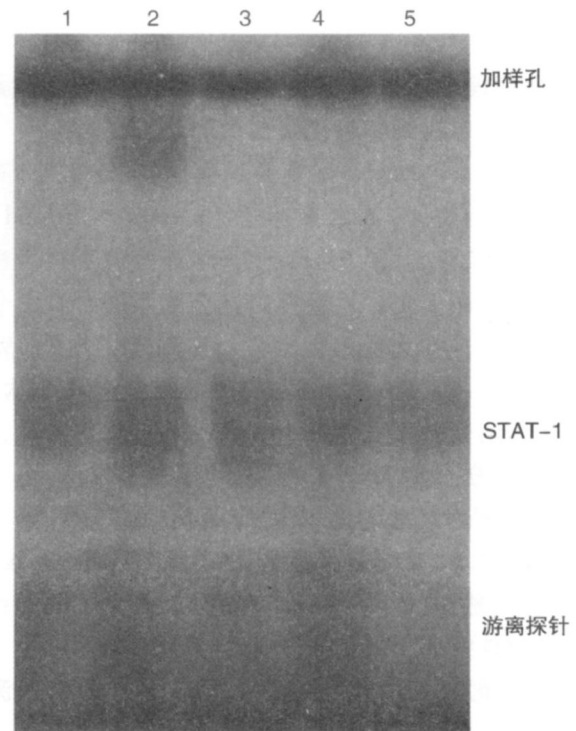


图 2. 不同 SP600125 剂量对 1 型糖尿病小鼠颈动脉 STAT-1 DNA 结合活性表达的影响 1 为正常对照组, 2 为 1 型糖尿病组, 3 为 1 型糖尿病 + SP600125 10 mg/kg 组, 4 为 1 型糖尿病 + SP600125 20 mg/kg 组, 5 为 1 型糖尿病 + SP600125 30 mg/kg 组。

Figure 2. The effect of various dose of SP600125 on STAT-1 DNA binding activity in carotid artery in type 1 diabetic mice

2.4 颈动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 表达

内皮细胞胞质可见连续线状棕黄色阳性染色, 即 MCP-1 阳性表达; 而阴性表达为血管内膜区棕黄色着色明显减弱, 局部出现未表达。对照组、1 型糖尿病组、SP600125 10、20、30 mg/kg 治疗组的颈动脉内皮 MCP-1 表达分别为 9.42 ± 1.35 、 25.37 ± 1.92 、 20.42 ± 1.25 、 15.44 ± 1.52 、 10.33 ± 1.94 。与对照组相比, 1 型糖尿病小鼠颈动脉内皮 MCP-1 表达明显增高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而经过 3 种剂量 SP600125 干预后, 颈动脉内皮 MCP-1 表达分

别下降 19.51%、39.14%、59.28%；且 SP600125 剂量越高, MCP-1 表达越低, 剂量组间差别具有统计学意义($P < 0.05$; 图 3)。

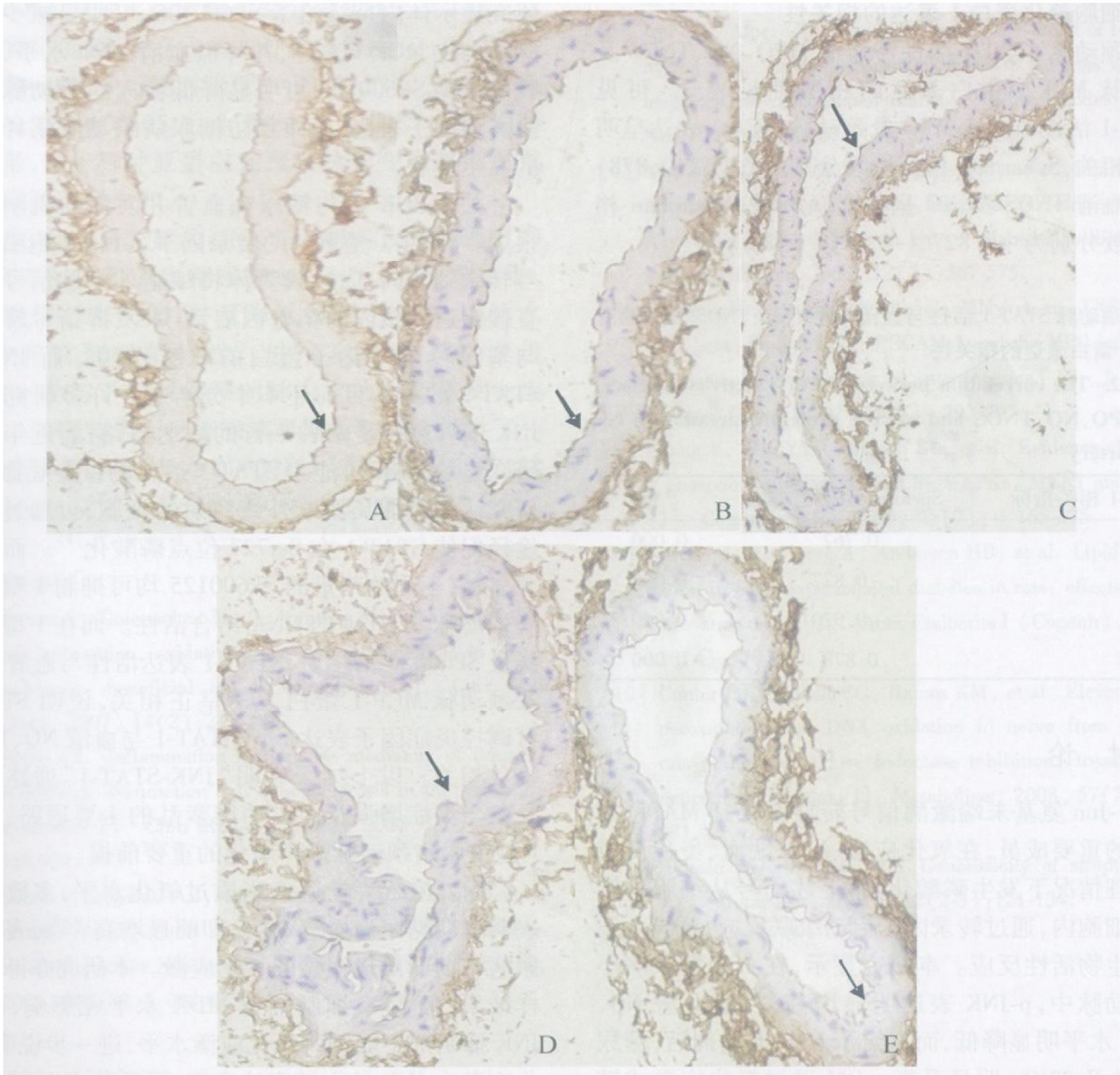


图 3. 各组小鼠颈动脉内皮 MCP-1 表达 箭头为内皮胞浆 MCP-1 表达。A 为正常对照组(1:100), B 为 1 型糖尿病组(1:100), C 为 1 型糖尿病 + SP600125 10 mg/kg 组(1:100), D 为 1 型糖尿病 + SP600125 20 mg/kg 组(1:100), E 为 1 型糖尿病 + SP600125 30 mg/kg 组(1:100)。

Figure 3. Carotid endothelial MCP-1 expression in experimental mice

2.5 颈动脉单核细胞趋化蛋白 1 的表达

对照组、1 型糖尿病组、SP600125 10、20、30 mg/kg 治疗组的颈动脉内皮 MCP-1 表达分别为 0.26 ± 0.03 、 1.10 ± 0.24 、 0.86 ± 0.09 、 0.67 ± 0.06 、 0.35 ± 0.05 。与对照组相比, 1 型糖尿病小鼠颈动脉内皮 MCP-1 表达明显增高, 具有统计学意义($P < 0.05$)。而经过 3 种剂量 SP600125 干预后, MCP-1 蛋白表达分别下降 21.82%、39.09%、68.18%；SP600125 剂量越高, MCP-1 表达越低, 剂量组间差别具有统计学意义($P < 0.05$; 图 4)。

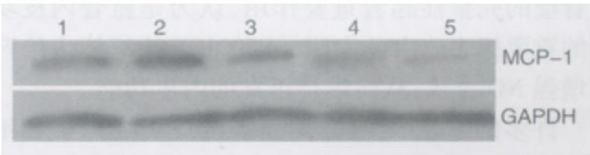


图 4. 不同 SP600125 剂量对 1 型糖尿病小鼠颈动脉 MCP-1 蛋白活性表达的影响 1 为正常对照组, 2 为 1 型糖尿病组, 3 为 1 型糖尿病 + SP600125 10 mg/kg 组, 4 为 1 型糖尿病 + SP600125 20 mg/kg 组, 5 为 1 型糖尿病 + SP600125 30 mg/kg 组。

Figure 4. The effect of various dose of SP600125 on MCP-1 protein expression in carotid artery in type 1 diabetic mice

2.6 颈动脉信号转导子和转录激活子 1 活性与血清髓过氧化物酶、一氧化氮、一氧化氮合酶及颈动脉单核细胞趋化蛋白 1 表达的相关性

颈动脉 STAT 1 活性与血清 MPO、NO、TNOS 及颈动脉 MCP 1 蛋白表达的相关性见表 2。可见 STAT 1 活性与血清 MPO 及颈动脉 MCP 1 表达呈明显正相关, Spearman 相关指数分别为 0.762、0.878; 而与血清 TNOS 及 NO 呈明显负相关, Spearman 相关指数分别为 -0.827、-0.920(表 2)。

表 2. 颈动脉 STAT 1 活性与血清 MPO、NO、TNOS 及颈动脉 MCP 1 蛋白表达的相关性

Table 2. The correlation between STAT 1 activity and serum MPO, NO, TNOS and MCP 1 protein expression in carotid artery

STAT 1 相关指标	Spearman 相关指数	P 值
MPO	0.762	0.000
TNOS	-0.827	0.000
NO	-0.920	0.000
MCP 1	0.878	0.000

基化终末产物大量消耗 NO^[4], 并减少 NOS 的生成, 而后者是 NO 合成的唯一限速酶^[5,6]。NO 来源于血管内皮, 对维持血管正常舒张, 抗血小板聚集, 保持血管壁的完整性起着重要作用, 认为是血管内皮功能的重要标志。由此表明, SP600125 持续体内给药可增强 NO 合成, 从而维持正常的内皮功能。

许多研究显示, 糖尿病血管内皮炎症因子如细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM 1)、MCP 1 等表达增强, 已有大量研究证明, 炎症因子表达增强可明显促进动脉粥样硬化的发生发展。MCP 1 可促进单核细胞向内皮迁移, 进入血管内膜, 促进内膜增生。而 MPO 是吞噬性炎症细胞内的一类特殊的含铁过氧化物酶, 是评价中性粒细胞在组织中浸润程度的可靠指标^[7]。本研究显示,

糖尿病血管内皮 MCP 1 表达明显增强, 且颈动脉 MCP 1 蛋白表达增多, 血清 MPO 水平明显增加。本研究显示体内持续给予 SP600125, 可明显减少颈动脉及内皮 MCP 1 表达, 并降低血清 MPO 水平, 因此我们认为 SP600125 可明显降低糖尿病颈动脉及内皮炎症因子表达, 从而预防糖尿病颈动脉粥样硬化的发生发展。

关于 JNK 参与糖尿病血管并发症的机制研究很少。STAT 1 是重要的转录因子, 可将细胞膜的信号转录到核内, 通过膜受体将细胞外多肽信号信息直接传送到核内的靶基因启动子, 发挥信号转导子与基因转录活化子蛋白的双重作用。而 JNK 与 STAT 1 的关系目前还不十分清楚。许多研究认为 JNK 信号途径是两种平行的表达通路, 而近年来的研究显示, JNK 可能为 STAT 1 活化的重要底物。有研究认为经加长波紫外线照射的细胞, 可通过 JNK 途径促使 STAT 1 在 Ser727 位点磷酸化^[8]。而本研究显示, 不同的剂量的 SP600125 均可抑制 1 型糖尿病颈动脉 STAT 1 的 DNA 结合活性。而在 1 型糖尿病及 SP60025 治疗后, STAT 1 表达活性与血清 MPO

路, 但不能被 JNK 抑制剂所抑制。

本研究采用了体内给药方式, 持续 8 周腹腔给予 SP600125, 以往研究往往集中在细胞培养及体外给药, 不能完全模拟临床糖尿病血管病变及干预效果。且本研究采用 INS2^{AKITA}小鼠为 1 型糖尿病小鼠模型, 该模型主要表现为胰岛 INS2 基因发生显性突变, 导致维持胰岛素分子内结构稳定的二硫键出现断裂, 胰岛素原异常折叠, 最终导致胰岛素合成障碍, 该模型比传统的药物如链脲菌素所致 1 型糖尿病模型更加能模拟人类 1 型糖尿病的发病机制, 并减少了这些药物对血管影响的干扰^[11]。本研究显示, SP600125 在 10 mg/kg 剂量可减低 STAT 1 活性及血清 MPO、MCP 1 水平, 但在 30 mg/kg 降低最明显, 接近正常小鼠表达水平, 说明 SP600125 药物效

果呈浓度依赖性,且体内给予 30 mg/kg 改善血管病变效果更明显。

c-Jun 氨基末端激酶通路分为 JNK1 及 JNK2 两种磷酸化蛋白,研究显示两种蛋白作用有一定差别,由于 SP600125 可同时降低 JNK1 及 JNK2,且本研究显示给予 SP600125 后, p-JNK1 及 p-JNK2 表达均明显降低,至于哪种亚蛋白在颈动脉病变中起到更重要作用还不得而知。

总之,本研究显示, JNK 特异性抑制剂可通过抑制 STAT1,从而升高糖尿病血清 NO 及 TNOS 水平,改善血管舒张功能,并且降低 MCP-1、MPO 表达水平,并具有剂量依赖性。进一步表明 JNK 通过 STAT1 参与了糖尿病颈动脉内皮功能紊乱及炎症表达。本研究为 1 型糖尿病早期血管病变提供了一定理论依据,并为开发 SP600125 抑制糖尿病颈动脉粥样硬化,从而有效预防卒中提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(2): 243-248.
- [2] Rizvi AA. Inflammation markers as mediators of vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(21): 1918-1924.
- [3] Slevin M, Elsalbi AB, Miguel Turu M, et al. Identification of differential protein expression associated with development of unstable human carotid plaques [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(3): 1004-1021.
- [4] 王占华, 郭晓华, 刘湘兰, 等. 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞黏附连接改变及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(7): 505-509.
- [5] Iyer SV, Alper GE, Sezer ED, et al. The effect of l-deprenyl on tissue mRNA expressions of NOS isoforms and NO levels in an experimental diabetes mellitus model [J]. *J Neural Transm*, 2007, 114(6): 811-815.
- [6] Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase alleviates impaired NOS-dependent responses of renal arterioles in type 1 diabetes mellitus [J]. *Microcirculation*, 2006, 13(7): 567-575.
- [7] Oliveira ID, Petrilli AS, Taveira MH, et al. TNF- α , TNF- β , IL-6, IL-10, PECAM-1 and the MPO inflammatory gene polymorphisms in osteosarcoma [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007, 29(5): 293-297.
- [8] Zhang Y, Cho YY, Petersen BL, et al. Evidence of STAT-1 phosphorylation modulated by MAPKs, MEK1 and MSK1 [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(7): 1165-1175.
- [9] Rungby J, Flyvbjerg A, Andersen HB, et al. Lipid peroxidation in early experimental diabetes in rats: effects of diabetes and insulin [J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1992, 126(4): 378-380.
- [10] Cunha JM, Jolivald CG, Ramos KM, et al. Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors [J]. *Metabolism*, 2008, 57(7): 873-881.
- [11] Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin [J]. *Mutat Res*, 2002, 512(2-3): 121-134.

(此文编辑 曾学清)