

胰高血糖素样肽 1 受体激动剂对高糖诱导的血管内皮细胞 NF- κ B、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

李珊, 郑丽丽, 李冲

(郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 胰高血糖素样肽 1; 核因子 κ B; 细胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1

[摘要] **目的** 观察胰高血糖素样肽 1 受体激动剂艾塞那肽对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞核因子 κ B (NF- κ B) 活性及细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 表达的影响, 探讨胰高血糖素样肽 1 受体激动剂降糖外对改善糖尿病患者血管内皮损伤的作用及其可能的机制。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 以不同浓度艾塞那肽和高糖共同孵育 48 h, 应用酶联免疫吸附法检测细胞培养上清液中 ICAM-1 和 VCAM-1 浓度, 应用逆转录聚合酶链反应测定 NF- κ B p65、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达。**结果** 与正常对照组比较, 高糖组 NF- κ B p65、ICAM-1 和 VCAM-1 的表达显著升高 ($P < 0.01$)。艾塞那肽干预后, NF- κ B p65、ICAM-1 及 VCAM-1 的表达较高糖组显著降低 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性。**结论** 艾塞那肽可能通过抑制高糖环境下 NF- κ B 活性影响其下游黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的高表达, 由此稳定血管内皮环境, 减轻高糖引起的内皮细胞损伤, 有助于延缓糖尿病动脉粥样硬化病程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist on the Expression of NF- κ B, ICAM-1 and VCAM-1 Induced by High Glucose in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Li Shan, ZHENG Li-Li, and LI Chong

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] Glucagon-Like Peptide-1; Nuclear Factor- κ B; Intracellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists exenatide on nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity as well as the expression of its downstream inflammatory cytokines such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and to explore mechanism of protective effect of exenatide on vascular complication of diabetes. **Methods** HUVEC were cultured in vitro and incubated under serum-free conditions with 25 mmol/L glucose for 48 hours. Exenatide at different concentrations (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L and 10^{-6} mol/L) was added concurrently with glucose stimulation. Meanwhile ICAM-1 and VCAM-1 in the cell culture supernatant was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of NF- κ B p65, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** 25 mmol/L D-glucose significantly increased NF- κ B p65 mRNA expression as well as the supernatant content and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC ($P < 0.01$), which was inhibited by different concentrations of exenatide ($P < 0.01$), in a dose-dependent manner. **Conclusions** GLP-1 receptor agonist exenatide could improve endothelial dysfunction via inhibition of NF- κ B activity and its downstream inflammatory response in vascular endothelial cells induced by high glucose in a dose-dependent manner, which could prevent and improve vascular complication of diabetes.

[收稿日期] 2011-10-26

[作者简介] 李珊, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治, E-mail 为 qlishan423@163.com。通讯作者郑丽丽, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治, E-mail 为 zhengli1012@126.com。李冲, 硕士, 住院医师, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治。

糖尿病血管并发症是造成糖尿病患者死亡率增加的主要原因。高血糖所致的血管内皮细胞损伤被认为是糖尿病血管病变发生的始动环节。近年来的研究发现,胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 除能控制血糖外,对心血管系统也有独特的作用。边云飞等^[1] 研究发现 GLP-1 可以逆转高糖所致的心室肌细胞氧化应激损伤及凋亡,对心室肌细胞起保护作用。Nyström 等^[2] 研究发现, GLP-1 可通过增加 2 型糖尿病患者动脉内皮依赖的血流,改善内皮功能,但对健康人群无此影响。然而 GLP-1 调节心血管系统功能的机制是十分复杂且尚未完全阐明,特别是 GLP-1 受体激动剂艾塞那肽对高糖诱导的血管内皮炎症损伤的影响报道较少。因此,本研究采用体外高糖诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 损伤,建立 HUVEC 高糖损伤模型,观察 GLP-1 受体激动剂艾塞那肽对高糖损伤的血管内皮细胞是否起到保护作用,并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC 购自美国 ATCC 公司;艾塞那肽注射液由美国礼来公司惠赠;低糖含双抗 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物科技公司;D-葡萄糖、胰蛋白酶和琼脂糖购自 Sigma 公司;ELISA 试剂盒、兔抗人 VIII 因子单克隆抗体和 FITC 标记的二抗购自武汉博士德公司;Trizol 和 RT-PCR 试剂盒购自北京天根生物公司;PCR 引物由上海生工有限公司合成。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

HUVEC 培养于含 10% ~ 15% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液中,其中 D-葡萄糖终浓度为 5.5 mmol/L,置于 5% CO₂ 饱和湿度 37℃ 培养箱内孵育,每两天换培养液一次。应用免疫细胞学检测第 VIII 因子相关抗原阳性鉴定内皮细胞。

1.3 实验分组及干预

取生长状态佳、对数生长期的 3 代 HUVEC 用于药物干预实验。待细胞长至 80% 融合状态时,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化、计数,以每孔 1×10^5 个细胞总数接种于 6 孔培养板,待细胞生长达 60% ~ 70% 融合时更换无血清的低糖 DMEM 培养基培养 24 h,使细胞处于同步化状态 (此时设为 0 h),然后随机分组加入不同处理因素的培养液培养 48 h。实验共分 6 组,每组设平行测量 6 份:正常对照组培养液葡萄糖

浓度为 5.5 mmol/L;正常 + 艾塞那肽组培养液葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L,艾塞那肽浓度为 10^{-6} mol/L;高糖组培养液葡萄糖浓度为 25 mmol/L;高糖 + 低、中、高剂量艾塞那肽组分别给予 10^{-8} 、 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L 艾塞那肽加入高糖培养液中共同孵育。以上各组作用 48 h 后进行后续实验。

1.4 细胞上清液中 ICAM-1、VCAM-1 浓度的测定

采用酶联免疫吸附法测定不同培养条件下细胞上清液中的细胞间黏附分子 1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 浓度。具体检测步骤按照试剂盒说明书操作,用酶标仪测得各孔 450 nm 处 OD 值,根据不同浓度标准品的 A_{450nm} 值做标准曲线,计算出样品中 ICAM-1、VCAM-1 的浓度。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 NF-κB p65、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达

Trizol 法提取总细胞 RNA (按试剂盒说明书操作),在 260 nm 条件下测定吸光度值,计算 RNA 纯度和含量。取 1 g 总 RNA 为模板按试剂盒说明书进行逆转录扩增出 PCR 产物。核因了 κB (NF-κB) p65 引物 (243 bp): 上游 5'-GTT CAC AGA CCT GGC ATC CGT-3', 下游 5'-GAG AAG TCC ATG TCC GCA AGT-3'; ICAM-1 引物 (369 bp): 上游 5'-CCG AGC TCA AGT GTC TAA AG-3', 下游 5'-TGC CAC CAA TAT GGG AAG GC-3'; VCAM-1 引物 (453 bp): 上游 5'-GAT ACA ACC GTC TTG GTC AGC CC-3', 下游 5'-CGC ATC CTT CAA CTG GGC CTT-3'; GAPDH 引物 (454 bp): 上游 5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC-3', 下游 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶电泳图像分析仪 (GelPro Analyzer Version 3.0) 进行数据分析,以目的基因光密度值与内参照 GAPDH 光密度值的比值表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据进行正态分布检验及方差齐性检验,组间差异比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),以 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜下,细胞形态呈鹅卵石样镶嵌排列成单层细胞,细胞胞浆丰富,为梭形或多角形,可见 1 ~ 2 个清晰的细胞核。经 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定为阳性,细胞纯度在 90% 以上,符合本

研究要求(图1)。

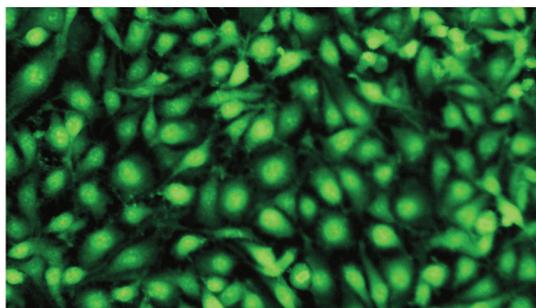


图1. 荧光显微镜下鉴定人脐静脉内皮细胞

Figure 1. The human umbilical vein endothelial cells were identified by immunofluorescence microscopy

2.2 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞上清液中 ICAM-1、VCAM-1 浓度的影响

与正常对照组比较,高糖能明显增加细胞上清液中 ICAM-1、VCAM-1 的浓度($P < 0.01$);艾塞那肽干预后能明显降低高糖诱导的细胞上清液中 ICAM-1、VCAM-1 的浓度($P < 0.01$),并随着艾塞那肽浓度的增加这种抑制作用增强,呈剂量依赖性(表1)。

2.3 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响

与正常对照组比较,高糖能明显增加内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 的 mRNA 表达($P < 0.01$);艾塞那

肽干预后能显著抑制高糖诱导的 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达($P < 0.01$),并随着艾塞那肽浓度的增加这种抑制作用增强,呈剂量依赖性(表2和图2)。

2.4 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞 NF- κ B 活性的影响

与正常对照组比较,高糖能明显增加内皮细胞 NF- κ B p65 mRNA 的表达($P < 0.01$);艾塞那肽干预后能显著抑制高糖诱导的 NF- κ B p65 mRNA 的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并随着艾塞那肽浓度的增加这种抑制作用增强,呈剂量依赖性(表2和图2)。

表1. 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞上清液中 ICAM-1、VCAM-1 浓度的影响($\mu\text{g/L}$, $n = 6$)

Table 1. Effects of high glucose and exenatide on ICAM-1 and VCAM-1 levels in HUVEC supernatant

分 组	ICAM-1	VCAM-1
正常对照组	1.553 ± 0.250	1.190 ± 0.197
正常 + 艾塞那肽组	1.819 ± 0.197	1.533 ± 0.370
高糖组	9.795 ± 0.144 ^a	12.202 ± 0.427 ^a
高糖 + 低剂量艾塞那肽组	7.740 ± 0.245 ^b	9.140 ± 0.350 ^b
高糖 + 中剂量艾塞那肽组	5.955 ± 0.364 ^{bc}	6.655 ± 0.404 ^{bc}
高糖 + 高剂量艾塞那肽组	5.089 ± 0.305 ^{bcd}	5.423 ± 0.549 ^{bed}

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高糖组比较;c 为 $P < 0.01$,与高糖 + 低剂量艾塞那肽组比较;d 为 $P < 0.01$,与高糖 + 中剂量艾塞那肽组比较。

表2. 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞 NF- κ B p65、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. Effects of high glucose and exenatide on mRNA expression of NF- κ B p65, ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC

分 组	NF- κ B p65	ICAM-1	VCAM-1
正常对照组	0.171 ± 0.021	0.160 ± 0.031	0.228 ± 0.015
正常 + 艾塞那肽组	0.165 ± 0.027	0.157 ± 0.034	0.241 ± 0.022
高糖组	0.760 ± 0.104 ^a	0.660 ± 0.025 ^a	0.753 ± 0.029 ^a
高糖 + 低剂量艾塞那肽组	0.644 ± 0.064 ^b	0.501 ± 0.043 ^c	0.671 ± 0.029 ^c
高糖 + 中剂量艾塞那肽组	0.493 ± 0.052 ^{cd}	0.392 ± 0.025 ^{cd}	0.568 ± 0.025 ^{ce}
高糖 + 高剂量艾塞那肽组	0.369 ± 0.035 ^{cde}	0.232 ± 0.032 ^{cde}	0.480 ± 0.031 ^{cef}

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与高糖组比较;d 为 $P < 0.05$,e 为 $P < 0.01$,与高糖 + 低剂量艾塞那肽组比较;f 为 $P < 0.05$,与高糖 + 中剂量艾塞那肽组比较。

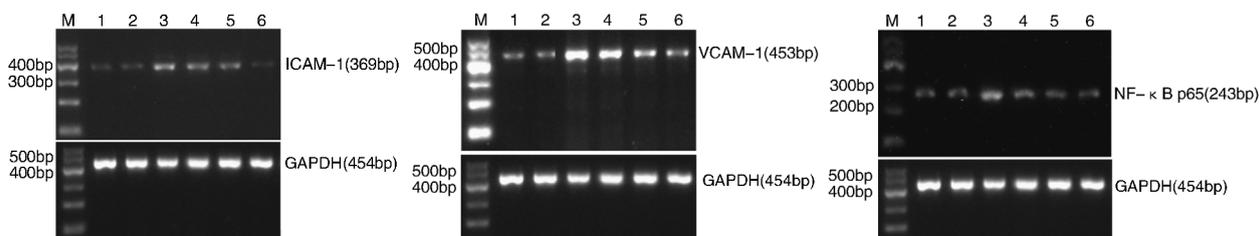


图2. 艾塞那肽对高糖诱导的内皮细胞 ICAM-1、VCAM-1 及 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 M 为 Marker,1 为正常对照组,2 为正常 + 艾塞那肽组,3 为高糖组,4-6 分别为高糖 + 低、中、高剂量艾塞那肽组。

Figure 2. Effect of exenatide on mRNA expression of ICAM-1 in HUVEC induced by high glucose

3 讨论

动脉粥样硬化是糖尿病大血管病变的病理基础。慢性炎症学说认为动脉粥样硬化是动脉血管壁的一种慢性炎症反应,多种炎症细胞和炎症因子参与这一病理过程^[3]。因此,将高糖诱导的血管内皮炎症损伤作为干预的靶点,对预防和延缓糖尿病动脉粥样硬化具有指导意义。

GLP-1 是一种由肠道 L 细胞分泌的重要的肠促胰岛素激素,它通过葡萄糖依赖方式促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、延缓胃排空、增加饱腹感等作用维持血糖的稳定^[4]。艾塞那肽是人工合成的 GLP-1 受体激动剂,其通过与 GLP-1 受体特异性结合发挥作用。研究表明,GLP-1 对心血管系统也有保护作用。目前认为,GLP-1 可改善炎症导致的内皮功能损伤,减少渗出^[1,5],但其机制尚未明确。

NF- κ B 是调节细胞基因转录的关键因子之一,参与许多与炎症反应有关的基因的表达调控。高糖环境可增加内皮细胞氧化应激的发生,活性氧自由基激活关键核转录因子 NF- κ B。NF- κ B 激活后 NF- κ B p65 和 NF- κ B p50 转录增加,并可增强各种前炎症因子的转录和蛋白质表达,由此引发细胞黏附增强、炎性细胞趋化、细胞分化和细胞外基质降解,参与并促进动脉粥样硬化进展^[6]。因此,抑制 NF- κ B 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。Kodera 等^[7]研究发现 GLP-1 受体激动剂 Exendin-4 可抑制糖尿病大鼠肾脏组织氧化应激反应及 NF- κ B 活性起到抗炎作用。由于血管内皮细胞亦有 GLP-1 受体表达,由此推测艾塞那肽可能对高糖诱导血管内皮细胞 NF- κ B 激活起作用。本研究中,艾塞那肽以剂量依赖方式抑制高糖诱导的 NF- κ B 活性增加。ICAM-1、VCAM-1 作为 NF- κ B 激活后的下游炎症因子,在高糖环境下的表达增加可促进血浆中单核细胞与内皮细胞的黏附,对粥样硬化斑块的形成起到核心作用^[8]。Liu 等^[9]发现 GLP-1 类似物具有抑制 C11-STH 和初级人血管内皮细胞上 TNF- α 诱导 PAI-1、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的作用,但其并未阐明 NF- κ B 通路是否参与了此过程。本研究观察到艾塞那肽在高糖环境下可能通过抑制 NF- κ B 通路从而使内皮细胞生成 ICAM-1 和 VCAM-1 减少,抑制白细胞向内皮细胞的

迁移和黏附,起到稳定血管内皮环境、抑制炎症反应的作用。

综上所述,高糖可显著增加人内皮细胞 NF- κ B 活性和黏附因子的表达,GLP-1 受体激动剂艾塞那肽可能通过抑制 NF- κ B 活性降低 ICAM-1 和 VCAM-1 的高表达,对抗高糖对内皮的致炎效应,起到保护血管内皮细胞的作用。这一结果可能为糖尿病血管并发症的防治提供新的药物治疗策略。

[参考文献]

- [1] 边云飞,王冬雪,杨慧宇,等. 胰高血糖素 1 对高糖所致乳鼠心肌细胞氧化应激的影响及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 247.
- [2] Nyström T, Gutniak MK, Zhang Q, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287 (6): 1 209-215.
- [3] Jianglin Fan, Teruo Watanabe, 王燕翻,等. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (7): 706-708.
- [4] Drucker DJ. The biology of incretin hormones [J]. *Cell Metab*, 2006, 3: 153-165.
- [5] Dozier KC, Cureton EL, Kwan RO, et al. Glucagon-like peptide-1 protects mesenteric endothelium from injury during inflammation [J]. *Peptides*, 2009, 30 (9): 1 735-741.
- [6] Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 645-651.
- [7] Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2011, 54 (4): 965-978.
- [8] Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 160: 91-102.
- [9] Liu HB, Dear AE, Knudsen LB, et al. A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules [J]. *J Endocrinol*, 2009, 201: 59-66.

(此文编辑 文玉珊)