

罗格列酮对同型半胱氨酸硫内酯所致内皮细胞损伤的保护作用与 PPAR γ 介导的抗氧化相关

杨旭红¹, 李鹏², 戴文¹, 熊小明¹, 涂江华¹, 吴树金¹, 刘立英¹

(1. 中南大学药学院药理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 2. 新乡医学院临床药理学教研室, 河南省新乡市 453003)

[关键词] 罗格列酮; 同型半胱氨酸硫内酯; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 内皮细胞; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨罗格列酮对同型半胱氨酸硫内酯 (HTL) 所致血管内皮细胞损伤的保护作用及其机制。 **方法** 在培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 用 HTL 与 HUVEC 共孵, 用罗格列酮、卡托普利、夹竹桃麻素、过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 拮抗剂 GW9662、核因子 κ B (NF- κ B) 信号传导通路抑制剂吡咯二硫代氨基甲酸乙酯 (PDTC) 进行干预, MTT 比色法检测细胞活力, 逆转录聚合酶链反应检测 PPAR γ mRNA 的表达, 荧光探针 DCFA-DA 检测细胞内活性氧簇 (ROS), 免疫荧光检测法测定 NF- κ B P65, 酶标法检测可溶性细胞间黏附分子 1 (sICAM-1)。 **结果** HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h, 明显降低内皮细胞活力, 增加细胞内 ROS 水平和 NF- κ B 的活化, 升高细胞培养液中 sICAM-1 的浓度 ($P < 0.01$)。罗格列酮 (0.001、0.01、0.1 mmol/L) 能浓度依赖性地拮抗 HTL 所致的内皮细胞活力降低, 抑制细胞内 ROS 水平的增加和 NF- κ B 的活化, 降低细胞培养液中 sICAM-1 的浓度, 与单独 HTL 损伤组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。上述保护作用可被选择性的 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 所拮抗。夹竹桃麻素、卡托普利、PDTC 对 HTL 引起的上述指标改变也有明显改善作用。 **结论** 罗格列酮对 HTL 所致的 HUVEC 损伤有显著保护作用, 其机制可能与 PPAR γ 介导的氧化应激反应的抑制有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Rosiglitazone Against Homocysteine Thiollactone Induced the Injuries of Endothelial Cell Related to PPAR γ -mediated Antioxidant Effects

YANG Xu-Hong¹, LI Peng², DAI Wen¹, XIONG Xiao-Ming¹, TU Jiang-Hua¹, WU Shu-Jin¹, and LIU Li-Ying¹

(1. School of Pharmacy, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China; 2. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

[KEY WORDS] Rosiglitazone; Homocysteine Thiollactone; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; Endothelial Cells; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether rosiglitazone, exerts beneficial effects on injuries of endothelial cells induced by homocysteine thiollactone (HTL) and to investigate the potential mechanisms. **Methods** The cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were respectively preincubated with rosiglitazone, and other interference factors including apocynin, captopril, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and antagonist of peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) GW9662 for 1 hour, and then sequentially incubated with HTL (1 mmol/L) for 24 hours. The cell viability, the level of reactive oxygen species (ROS), the activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B), the concentration of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), the expression of PPAR γ mRNA were examined. **Results** HTL decreased obviously the HUVEC viability, enhanced the level of ROS and activation of NF- κ B, the concentration of sICAM-1 and down-regulated the expression of PPAR γ mRNA. Preincubation of HUVEC with rosiglitazone (0.001, 0.01, 0.1 mmol/L), apocynin (0.1 mmol/L), captopril (0.03 mmol/L), PDTC (0.1 mmol/L) for 1 hour reversed these effects induced by HTL, compared with alone HTL group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Further, co-incubation with PPAR γ antagonist GW9662 (0.01 mmol/L), abolished the protective effects of rosiglitazone on HTL-treated cells. **Conclusions**

[收稿日期] 2014-08-26

[修回日期] 2014-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金(81270395); 湖南省卫生厅课题(B20082023); 长沙市科技局课题(K0802085231)

[作者简介] 杨旭红, 硕士, 讲师, 现工作于内蒙古鄂尔多斯市实验中心, E-mail 为 yxuhong@gmail.com。通讯作者刘立英, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理学研究, E-mail 为 1326437855@qq.com。

Rosiglitazone has protective effects against injuries of endothelial cells induced by HTL, which is related to PPAR γ -mediated suppression of oxidative stress.

高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHCY) 是致动脉粥样硬化 (As) 的独立危险因素之一, 其机制与同型半胱氨酸生成的硫内酯 (homocysteine thiolactone, HTL) 有关^[1]。HTL 引起血管病变和 As 可通过直接和 (或) 间接两种途径。直接途径是 HTL 的酞键与蛋白质赖氨酸 ϵ -氨基反应, 导致血管内皮及血浆蛋白的理化性质和结构改变, 继而促进 As 形成。间接途径与其改变细胞内信号转导机制有关。文献报道卡托普利和依那普利对 HTL 所诱导的 NF- κ B 的活化及可溶性细胞间黏附分子 (soluble intercellular adhesion molecule, sICAM-1) 的表达均有抑制作用, 其机制不依赖抑制血管紧张素转化酶 I^[2-3]。PPAR 是一类由配体激活的核转录因子, 有 PPAR α 、PPAR β/δ 与 PPAR γ 等亚型, 除了增强胰岛素的敏感性外, 还有抗炎、抗氧化等作用^[4]。已有研究证明, PPAR 激动剂罗格列酮可改善高同型半胱氨酸血症引起的心肌肥厚和减少 NF- κ B 依赖的 ICAM-1 和 TNF- α 的产生^[5-7]。因此, 我们推测 HTL 对血管内皮功能的损伤作用可能与 HTL 下调 PPAR γ , 引起 NADPH 氧化酶依赖的 NF- κ B 的活化及活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和一系列炎症损伤因子的产生有关。PPAR γ 是一类由配体激活的核转录因子, PPAR γ 激动剂罗格列酮等有增强胰岛素敏感性的作用, 我们前已证明罗格列酮对 HTL 引起的离体和在大鼠血管内皮功能损伤均有明显保护作用, 但对其机制未进行深入探讨^[8]。本研究在培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 模型, 用 HTL 作为损伤因素, 用 PPAR γ 激动剂罗格列酮为治疗药物, 用卡托普利、PPAR γ 拮抗剂 GW9662 等作为对照药, 对比观察它们对 HTL 所致内皮细胞损伤的保护作用, 探讨罗格列酮对 HTL 所致内皮细胞损伤的保护作用机制与 HTL 诱导的 NF- κ B 活化及其下游细胞因子 ROS、sICAM-1 等的关系。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

人脐静脉内皮细胞株 (HUVEC, 编号 ZH1020) 由中南大学湘雅三医院中心实验室提供。罗格列酮 (RSG) 购自北京云迪同创医药科技有限公司; 同型半胱氨酸硫内酯 (HTL)、GW9662、卡托普利 (Cap-

topril, Cap)、夹竹桃麻素 (Apocynin, Apo) 等均购自 Sigma 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; NF- κ B 活性试剂盒购自碧云天生物技术研究; sICAM-1 的 ELISA 检测试剂盒购自美国 ADL 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

取 HUVEC 解冻复苏后加入含 10% 小牛血清 DMEM 培养基制成细胞悬液, 将细胞悬液接种于 50 mL 细胞培养瓶中, 置于充有 95% O₂、5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中, 每隔 2~3 天换液一次, 待细胞融合长满至 80% 后用 0.25% 胰酶消化传代, 将 4~6 代细胞用于后续实验。

1.3 实验设计与分组

实验分为 10 组: ①正常对照组; ②HTL (1 mmol/L) 损伤组; ③~⑤分别为 HTL + RSG (0.001、0.01、0.1 mmol/L) 处理组; ⑥HTL + RSG (0.1 mmol/L) + GW9662 (0.01 mmol/L) 处理组; ⑦HTL + Apo (0.1 mmol/L) 处理组; ⑧HTL + Cap (0.03 mmol/L) 处理组; ⑨HTL + PDTC (0.1 mmol/L) 处理组; ⑩RSG (0.1 mmol/L) 对照组。HTL 损伤组为用含 HTL (1 mmol/L) 的培养基孵育 HUVEC 24 h; 药物处理组为先用含不同浓度药物的培养基与 HUVEC 孵育 1 h, 再加入 HTL (1 mmol/L) 共同孵育 24 h。

1.4 MTT 比色法检测内皮细胞活力

参照 MTT 比色法试剂盒指导, 将培养的 4~6 代 HUVEC, 用 0.25% 胰酶消化, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基制备成细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^7 /L, 于 96 孔培养板每孔加入 100 μ L 细胞悬液。待细胞贴壁后, 用无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗一次, 加入含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 24 h, 使细胞生长同步化。按照实验设计与分组加入不同的处理因素, 继续培养。培养结束后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 10 μ L, 于细胞培养箱继续孵育 4 h, 终止培养, 每孔加入 DMSO 75 μ L, 振荡 10 min 后, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光值。

1.5 细胞内活性氧检测

将细胞接种于 96 孔板, 按实验分组法加入不同的处理因素, 培养结束后, 参照细胞内活性氧检测试剂盒指导制备终浓度为 10 μ mol/L 的 DCFH-DA。用无血清细胞培养液洗涤细胞, 去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用荧光分光光度计 (488 nm 激发波

长,525 nm 发射波长)检测荧光强弱,倒置荧光显微镜下测定绿色荧光。

1.6 核因子 κ B 的检测

参照试剂盒指导进行操作(细胞处理方法同 1.4)。按实验分组法加入不同的处理因素,继续培养。培养结束后,用 PBS 液洗涤细胞 1 次。加固定液固定 15 min。弃固定液,再用 PBS 洗涤 3 次。用免疫染色封闭液室温下封闭 1 h,弃免疫染色液,加入 NF- κ B P65 抗体,室温下孵育 1 h 后,用 PBS 液洗涤 3 次。加入 1 mL 抗兔 Cy3,室温孵育 1 h。洗涤 2 次后加入 1 mL 细胞核染色液(DAPI),室温下染色 5 min。再用 PBS 液洗涤 3 次。滴加适量的抗荧光淬灭封片液,荧光显微镜下观察。NF- κ B 的染色为红色荧光,细胞核的 DAPI 染色为蓝色荧光。

1.7 可溶性细胞间黏附分子 1 的检测

参照 sICAM-1 检测试剂盒说明,取培养在 96 孔板的细胞上清液 50 μ L 加入到酶标板的孔中,标准管和对照管分别加标准液或培养液 50 μ L(以下同);依次加生物素化抗体工作液(10 μ L/孔);加入新鲜酶结合物工作液(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后,洗涤液洗板 4 次;各孔加显色溶液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;各孔加反应终止液 50 μ L,混匀,30 min 内在酶标仪 450 nm 波长处,测定 OD 值(检测灵敏度为 1.0 ng/mL,批内和批间变异系数均为 10%)。sICAM-1 浓度单位为 μ g/L。

1.8 逆转录聚合酶链反应检测 PPAR γ mRNA 的表达

参照试剂盒说明,将干预后的 HUVEC,按 Trizol 试剂盒说明书的步骤依次加入 Trizol、氯仿、异丙醇,提取总 RNA。每组取 4 μ L 总 RNA 采用 Promega 公司产品的一步法 Access RT-PCR 系统进行反应。PPAR γ 引物序列:上游为 5'-TCTCCAGT-GATATCGACCAGC-3',下游 5'-TAGCCACCTCTTT-GCTCTGC-3',扩增片长 246 bp;GAPDH 引物序列:上游为 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3',下游 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增片长 496 bp。逆转录条件:48 $^{\circ}$ C 逆转录反应 45 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s;循环 35 周期,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 2 μ L 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中,90 V 电泳 30 min,最后用凝胶成像系统记录,Image J 软件分析灰度值。

1.9 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用

ANOVA 及 Newman-Student 多重比较 t 检验分析,由 SPSS 13.0 统计软件完成,双侧 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 HTL 对内皮细胞相对活力的影响及罗格列酮等药物的干预作用

HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h,明显降低了细胞的相对活力;罗格列酮浓度依赖性地改善了 HTL 诱导的内皮细胞活力下降;预先使用 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 进行干预,可以取消罗格列酮的这种保护作用;NADPH 氧化酶抑制剂夹竹桃麻素、ACEI 抑制剂卡托普利、NF- κ B 信号转导通路抑制剂 PDTC 也明显减轻了 HTL 诱导的内皮细胞活力下降,与 HTL 损伤组比差异有显著性;单独的罗格列酮对内皮细胞相对活力无显著影响(图 1)。

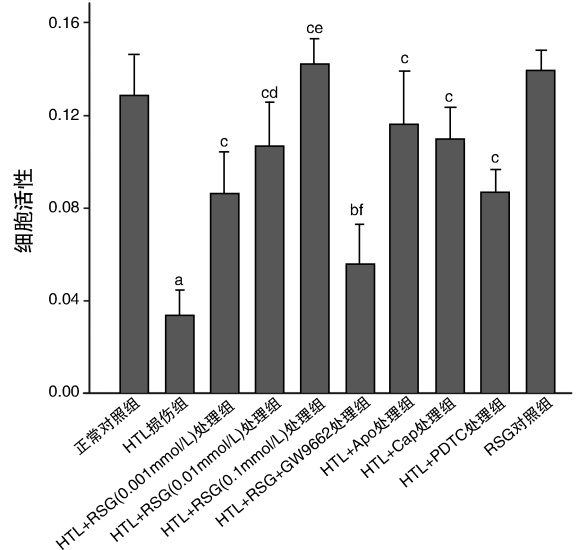


图 1. 不同浓度的罗格列酮和 GW9662 对 HTL 诱导的内皮细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$) a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 HTL 损伤组比较;d 为 $P < 0.05$,与 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组比较;e 为 $P < 0.05$,与 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组比较;f 为 $P < 0.01$,与 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组比较。

Figure 1. The influences of Rosiglitazone in different concentration and GW9662 on endothelial cell viability induced by HTL in HUVEC cells

2.2 HTL 对细胞内 ROS 水平的的影响及罗格列酮等药物的干预效应

HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h,明显升高了内皮细胞的 ROS 水平;罗格列酮剂量依赖性地抑制了 HTL 引起的 ROS 水平升高;PPAR γ 特异性拮抗剂

GW9662 可取消罗格列酮的作用;夹竹桃麻素、卡托普利、PDTC 对 HTL 引起的 ROS 水平升高也有明显

的抑制作用;单独的罗格列酮对 ROS 水平无明显影响(图 2)。

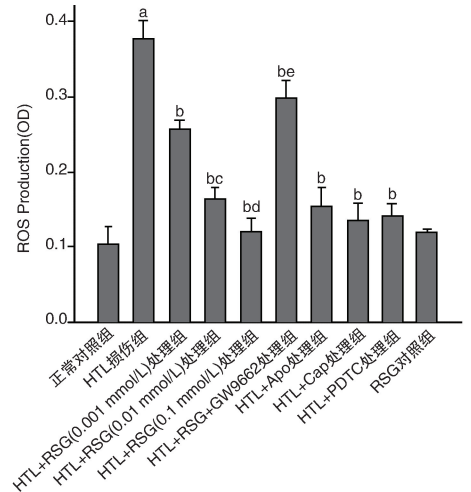
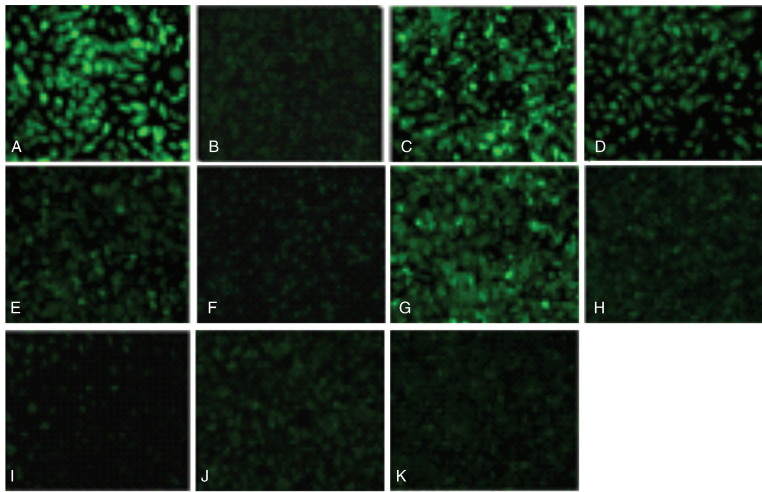


图 2. 不同浓度罗格列酮和 GW9662 对 HTL 诱导的内皮细胞活性氧生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) A 为 ROS 阳性对照组, B 为正常对照组, C 为 HTL 损伤组, D 为 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组, E 为 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组, F 为 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组, G 为 HTL + RSG + GW9662 处理组, H 为 HTL + Apo 处理组, I 为 HTL + Cap 处理组, J 为 HTL + PDTC 处理组, K 为 RSG 对照组。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 HTL 损伤组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组比较; e 为 $P < 0.01$, 与 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组比较。

Figure 2. The influences of Rosiglitazone in different concentration and GW9662 on the generation of reactive oxygen species induced by HTL in HUVEC cells

2.3 HTL 对内皮细胞 NF- κ B 水平的的影响及罗格列酮等药物的干预作用

HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h 可使内皮细胞中 NF- κ B P65 核转位显著增加;罗格列酮可剂量依赖性地抑制内皮细胞中 NF- κ B P65 的核转位;预先使

用 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 可取消罗格列酮的这种效应;夹竹桃麻素、卡托普利、PDTC 均能显著抑制 HTL 引起的 NF- κ B P65 的核转位;单独的罗格列酮对内皮细胞中的 NF- κ B 活性无显著影响(图 3)。

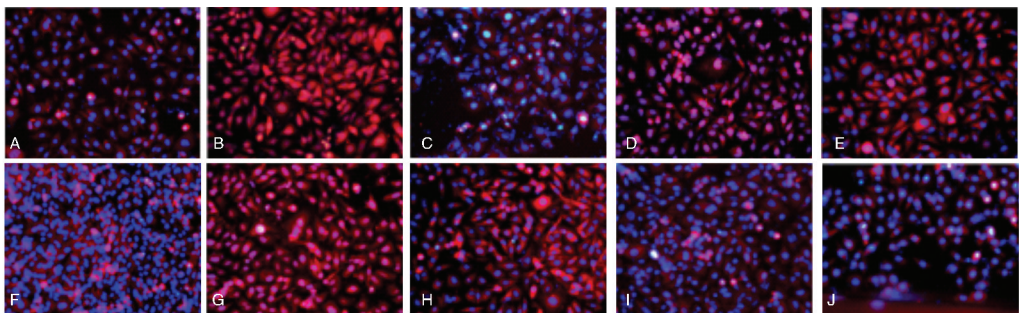


图 3. 不同浓度罗格列酮和 GW9662 对 HTL 诱导的内皮细胞 NF- κ B 活性的影响 A 为正常对照组, B 为 HTL 损伤组, C 为 RSG 对照组, D 为 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组, E 为 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组, F 为 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组, G 为 HTL + RSG + GW9662 处理组, H 为 HTL + Apo 处理组, I 为 HTL + Cap 处理组, J 为 HTL + PDTC 处理组。

Figure 3. The influences of Rosiglitazone in different concentrations and GW9662 on NF-kappa B activity induced by HTL in HUVEC cells

2.4 HTL 对细胞培养液 sICAM-1 浓度的影响及罗格列酮等药物的干预作用

HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h, 能明显升高细胞

培养液中 sICAM-1 的浓度;罗格列酮剂量依赖性地抑制了 sICAM-1 的升高;预先使用 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 进行干预, 可取消罗格列酮的这种效

应;夹竹桃麻素、卡托普利、PDTC 也可显著抑制 sI-CAM-1 的升高;单独的罗格列酮对细胞培养液中 sI-CAM-1 无显著影响(表 1)。

2.5 HTL 对内皮细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响及罗格列酮等药物的干预作用

HTL 与 HUVEC 共孵育 24 h 明显下调 HUVEC 中 PPAR γ mRNA 表达,与正常对照组比差异有显著

性;罗格列酮、夹竹桃麻素、卡托普利及 PDTC 也显著抑制 HTL 所引起的细胞 PPAR γ mRNA 表达的下调,与 HTL 损伤组比差异均有显著性,以罗格列酮高剂量组的保护作用更为明显。预先使用 PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 进行干预,可以取消罗格列酮的这种保护作用。单独的罗格列酮对内皮细胞 PPAR γ mRNA 表达无显著影响(图 4)。

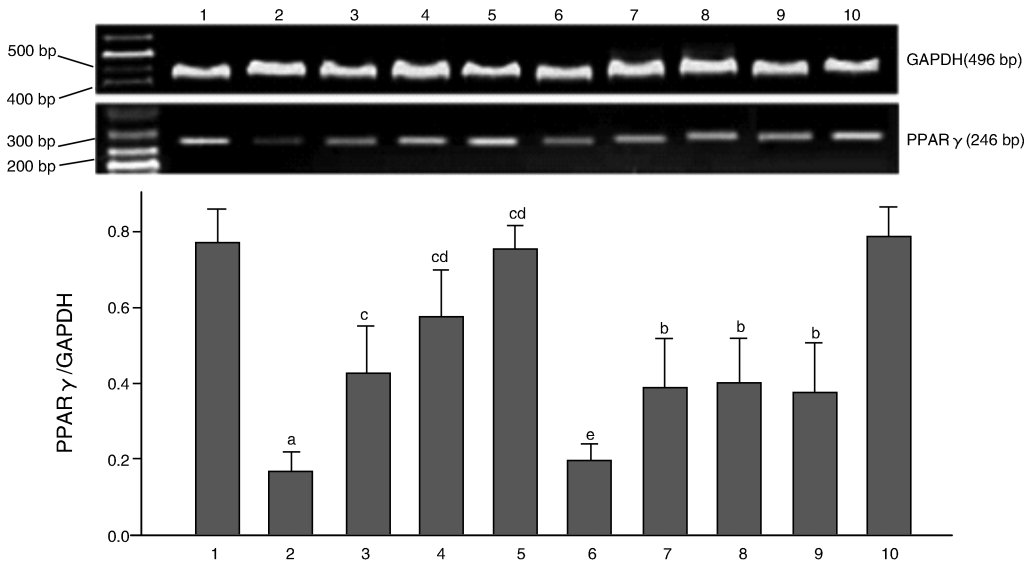


图 4. 罗格列酮等不同药物及 GW9662 对 HTL 诱导的内皮细胞 PPAR γ mRNA 表达水平的影响 1 为正常对照组,2 为 HTL 损伤组,3 为 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组,4 为 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组,5 为 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组,6 为 HTL + RSG + GW9662 处理组,7 为 HTL + Apo 处理组,8 为 HTL + Cap 处理组,9 为 HTL + PDTC 处理组,10 为 RSG 对照组。a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 HTL 损伤组比较;d 为 $P < 0.05$,与 HTL + RSG(0.001 mmol/L)组比较;e 为 $P < 0.01$,与 HTL + RSG(0.1 mmol/L)组比较。

Figure 4. The influences of Rosiglitazone in different concentrations and GW9662 on PPAR gamma mRNA expression level induced by HTL in HUVEC cells

表 1. 不同浓度罗格列酮和 GW9662 对 HTL 诱导的内皮细胞中 sICAM-1 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$, $n = 3$)

Table 1. The influences of Rosiglitazone in different concentrations and GW9662 on sICAM-1 content induced by HTL in HUVEC cells ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$, $n = 3$)

分 组	sICAM-1 含量
正常对照组	17.44 \pm 2.56
HTL 损伤组	69.56 \pm 1.56 ^a
HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组	43.12 \pm 2.46 ^b
HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组	25.52 \pm 1.25 ^{bc}
HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组	19.18 \pm 2.15 ^{bcd}
HTL + RSG + GW9662 处理组	58.55 \pm 1.03 ^e
HTL + Apo 处理组	26.78 \pm 2.67 ^b
HTL + Cap 处理组	21.78 \pm 2.17 ^b
HTL + PDTC 处理组	24.12 \pm 1.13 ^b
RSG 对照组	17.98 \pm 1.12

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 HTL 损伤组比较;c 为 $P < 0.05$,与 HTL + RSG(0.001 mmol/L)处理组比较;d 为 $P < 0.05$,与 HTL + RSG(0.01 mmol/L)处理组比较;e 为 $P < 0.01$,与 HTL + RSG(0.1 mmol/L)处理组比较。

3 讨 论

大量文献报道,高同型半胱氨酸血症除可引起外周血管性疾病外,也是致 As 的独立危险因素之一。同型半胱氨酸在转化和代谢过程中产生的 HTL 是高同型半胱氨酸血症致病的物质基础^[9]。前已述及 HTL 主要通过直接及间接两种途径导致血管病变的发生和发展。HTL 的间接途径可能是通过其激活一系列信号转导途径最终导致细胞损伤有关,其具体机制尚未完全阐明,推测与其促进细胞内 ROS 以及脂质过氧化物增加有关^[10-12]。我们前期在离体和在大鼠血管模型的研究发现:HTL 引起的血管内皮功能损伤主要与增加氧化应激有关^[2],但对其细胞内的信号通路机制尚未进行深入研究。本研究发现,HTL 与 HUVEC 孵育 24 h 后,导致了 ROS 的明显升高。已知氧化应激增强可产生过多的 ROS,ROS 可通过损伤膜磷脂、蛋白质、

核酸等,引起细胞水肿、线粒体肿胀,破坏细胞的正常结构和生理功能;ROS 也可通过减少一氧化氮(NO)的产生或利用,抑制 NO 对血管内皮细胞的保护作用^[13-15]。

NF- κ B 是普遍存在于真核细胞胞浆中的一种介导细胞内信号传递的核转录因子,是由 P50 和 P65 两种亚基组成的异源二聚体^[16-17]。正常情况下 NF- κ B 的 P65 亚基与其抑制蛋白 I κ B 结合,覆盖 P50 的核定位信号,以无活性的三聚体形式存在于胞浆中。氧化应激^[18-20]等外界刺激通过活化 I κ B 激酶,诱导 I κ B 发生磷酸化而被降解,NF- κ B 得以释放,继而进入细胞核内与 DNA 上的 κ B 序列结合,调控与炎症有关的多种细胞因子的表达,如 TNF- α 、IL-1、ICAM-1 等因子参与细胞生长、凋亡等过程,因此与动脉硬化的发生和发展密切相关。

ICAM-1 属于免疫球蛋白基因家族成员,表达于激活的或损伤的内皮细胞,有助于中性粒细胞等炎症细胞的黏附和聚集,促进 As 病程的发展。ICAM-1 的细胞外部分可被酶水解,存在于血清或细胞培养液中,称为 sICAM-1。目前认为 sICAM-1 和 sV-CAM-1 浓度可反映 As 的炎症程度和斑块稳定性状况^[21]。本研究发现,HTL 与 HUVEC 共孵可增加 NF- κ B 的活化和细胞培养液中 sICAM-1 浓度,说明 HTL 致内皮细胞损伤与 HTL 刺激氧化应激和增加细胞因子的活化有关。

文献报道^[22],罗格列酮可以通过激活 PPAR γ ,抑制 NADPH 氧化酶的活化,减少 ROS 的生成,从而减少 NF- κ B 的活化。本研究在培养的 HUVC 模型证明了 HTL 能明显增加细胞内 NF- κ B 的活化和细胞培养液中 sICAM-1 的含量,罗格列酮、夹竹桃麻素、卡托普利及 PDTC 显著减少了 HTL 诱导的 sICAM-1 含量增加。罗格列酮和 NF- κ B 阻断剂 PDTC 能显著抑制 HTL 诱导的 NF- κ B 活化,而 HTL 刺激 NF- κ B 活化的同时也导致 PPAR γ mRNA 表达下调。而 PPAR γ 阻滞剂 GW9662 可取消罗格列酮的这种保护作用,说明罗格列酮对 HTL 诱导的 NF- κ B 活化及其下游 ICAM-1 产生的抑制作用可能由 PPAR γ 所介导^[23]。

我们前已证明卡托普利对 HTL 的保护作用不依赖于降低血浆血管紧张素 II (Ang II) 的含量^[2],而与抑制 NADPH 氧化酶的活性、减少氧化应激和保护血清 PON1 活性有关。而罗格列酮也有保护血清 PON1 活性和抑制氧化应激的作用,卡托普利、Apocynin 和 PDTC 也有部分上调 PPAR γ 表达的作用,进一步证明了 HTL 诱导的体内外血管内皮损伤

与下调 PPAR γ 表达有关。

本研究通过培养的 HUVC 模型,利用荧光探针、PCR 等研究手段,首次证明 PPAR γ 激动剂罗格列酮能保护 HTL 引起的血管内皮损伤,其保护机制可能与干扰 PPAR γ 信号通路有关。其信号通路可能为:HTL \rightarrow PPAR γ 下调 \rightarrow NADPH 氧化酶活性增加 \rightarrow ROS 增加 \rightarrow NF- κ B 活化 \rightarrow sICAM-1 等致炎症增加 \rightarrow 引起内皮细胞损伤。罗格列酮通过上调 PPAR γ 受体活性,对抗 HTL 对内皮细胞的损伤。该研究为高同型半胱氨酸血症致血管性疾病和 As 的干预治疗提供了新的靶点,为心血管疾病的防治拓宽了新的思路。

[参考文献]

- [1] Malinowska J, Kolodziejczyk-Czepas J, Moniuszko-Szajwaj B, et al. Phenolic fractions from *Trifolium pallidum* and *Trifolium scabrum* aerial parts in human plasma protect against changes induced by hyperhomocysteinemia in vitro [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4 023-027.
- [2] You Y, Song T, Wu SJ, et al. Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(2): 155-161.
- [3] 刘玉晖,游宇,宋涛,等.卡托普利对同型半胱氨酸硫内酯损伤血管内皮功能的保护作用[J].*中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(1): 33-37.
- [4] Sharma S, Barton J, Rafikov R, et al. Chronic inhibition of PPAR-gamma signaling induces endothelial dysfunction in the juvenile lamb [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26: 271-280.
- [5] Pal Singh A, Kaur T, Singh Dahiya R, et al. Ameliorative role of rosiglitazone in hyperhomocysteinemia-induced experimental cardiac hypertrophy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(1): 53-59.
- [6] Bai YP, Liu YH, Cgen J, et al. Rosiglitazone attenuates NF-kappaB-dependent ICAM-1 and TNF-alpha production caused by homocysteine via inhibiting ERK1/2p38MAPK activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 20-26.
- [7] Camps I, Garcia-Heredia A, Rull A, et al. PPARs in regulation of paraoxonases: control of oxidative stress and inflammation pathways [J]. *PPAR Res*, 2012, 2012: 616 371.
- [8] 杨旭红,戴雯,刘立英,等.同型半胱氨酸硫内酯致血管内皮功能损伤机制与过氧化体增殖物激活型受体 γ 的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(12): 975-979.
- [9] Mercié P, Garnier O, Lascoste L, et al. Homocysteine-thi-

- olactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features[J]. *Apoptosis*, 2000, 5 (5): 403-411.
- [10] Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thio-lactone-mediated vascular disease [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(12): 1 704-716.
- [11] Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(7): 802-810.
- [12] Liu Y, Tian T, Zhang H, et al. The effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on flow-mediated vasodilation in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235: 31-35.
- [13] Wang S, Zhang M, Liang B, et al. AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes [J]. *Circ Res*, 2010, 106: 1 117-128.
- [14] Yi J, Zheng Y, Miao C, et al. Desflurane preconditioning induces oscillation of NF-kappaB in human umbilical vein endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e66576.
- [15] Lakshmi SP, Reddy AT, Zhang Y, et al. Down-regulated peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in lung epithelial cells promotes a PPAR γ agonist-reversible proinflammatory phenotype in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (10): 6 383-393.
- [16] Yin Y, Hou G, Li ER, et al. Regulation of cigarette smoke-induced toll-like receptor 4 expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in bronchial epithelial cells [J]. *Respirology*, 2013, Suppl 3: 30-39.
- [17] Wang S, Zhang C, Zhang M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase alpha2 by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo[J]. *Nature Med*, 2012, 18: 902-910.
- [18] Malinowska J, Kolodziejczyk J, Olas B. The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia: the role of antioxidants [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59: 185-194.
- [19] Williams CR, Lu X, Sutliff RL, et al. Rosiglitazone attenuates NF- κ B-mediated Nox4 upregulation in hyperglycemia-activated endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303(2): C213-223.
- [20] Kim JC, Lee YH, Yu MK, et al. Anti-inflammatory mechanism of PPAR γ on LPS-induced pulp cells: role of the ROS removal activity [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57 (4): 392-400.
- [21] Štulc T, Svobodová H, Krupičková Z, et al. Rosiglitazone influences the expression of leukocyte adhesion molecules and CD14 receptor in type 2 diabetes mellitus patients [J]. *Physiol Res*, 2014, 63 Suppl 2: S293-298.
- [22] Oishi PE, Sharma S, Datar SA, et al. Rosiglitazone preserves pulmonary vascular function in lambs with increased pulmonary blood flow [J]. *Pediatr Res*, 2013, 73 (1): 54-61.
- [23] Omae T, Nagaoka T, Tanano I, et al. Homocysteine inhibition of endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of porcine retinal arterioles via enhanced superoxide production [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (3): 2 288-295.
- (此文编辑 许雪梅)