

高糖对人脐静脉内皮细胞表面血栓调节蛋白表达及活性的影响

赖斌¹, 魏玉杰¹, 刘惠亮¹, 李屹¹, 谢玉凤¹, 付玲²

(1. 武警总医院心血管内科, 北京市 100039; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京市 100071)

[关键词] 高糖; 血栓调节蛋白; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] **目的** 观察高糖对血栓调节蛋白在原代人脐静脉内皮细胞的表达和活性的影响。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 实验分为三组: ①对照组; ②10 mmol/L 葡萄糖组; ③20 mmol/L 葡萄糖组, 孵育细胞 24 h。分别用流式细胞术、实时荧光定量聚合酶链反应和酶标仪检测血栓调节蛋白的蛋白、mRNA 表达及活性强度。**结果** 20 mmol/L 葡萄糖组和 10 mmol/L 葡萄糖组相比于对照组在血栓调节蛋白的蛋白 (41.38 ± 3.41 , 32.60 ± 2.59 比 27.96 ± 1.58)、mRNA (2.05 ± 0.19 , 1.44 ± 0.32 比 1) 水平上均升高 ($P < 0.05$), 20 mmol/L 葡萄糖组与对照组相比在血栓调节蛋白活性上也增强 (0.4157 ± 0.0129 比 0.3957 ± 0.0100 , $P < 0.05$), 但 10 mmol/L 葡萄糖组与对照组在血栓调节蛋白活性上差异无显著性。**结论** 高糖可增加血栓调节蛋白表达, 并增强其活性, 提示这可能为内皮细胞对于高糖的一种防御机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of High Glucose on the Expression and Activity of Thrombomodulin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LAI Bin¹, WEI Yu-Jie¹, LIU Hui-Liang¹, LI Yi¹, XIE Yu-Feng¹, and FU Ling²

(1. Department of Cardiology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Thrombomodulin; Human Umbilical Vein Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of high glucose on the expression and activity of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** HUVEC were incubated in vitro, sub-experiment: ①control group; ②10 mmol/L glucose group; ③20 mmol/L glucose group, all incubated for 24 h. Flow cytometric and RT-PCR technique were used for detecting thrombomodulin protein and mRNA, respectively. Microplate Reader was used for detecting thrombomodulin activity. **Results** Compared with control group, both mRNA (2.05 ± 0.19 , 1.44 ± 0.32 vs 1) and protein (41.38 ± 3.41 , 32.60 ± 2.59 vs 27.96 ± 1.58) levels of thrombomodulin increased in 20 mmol/L glucose group and 10 mmol/L glucose group ($P < 0.05$) and the thrombomodulin activity enhanced (0.4157 ± 0.0129 vs 0.3957 ± 0.0100 , $P < 0.05$) in HUVEC of 20 mmol/L glucose group. **Conclusion** Exposure to high glucose increased the expression of thrombomodulin and enhanced the thrombomodulin activity in HUVEC. The upregulation of thrombomodulin in HUVEC cultivated in high glucose conditions may represent a defense mechanism against the stress.

糖尿病血管病变的主要原因是血管内皮细胞功能的紊乱^[1], 内皮细胞的损伤和破坏被认为是各种血管疾病的关键起始因素, 其与动脉粥样硬化、血栓形成关系密切^[2]。血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM) 是普遍存在于内皮细胞膜表面的糖蛋白, 主要通过和凝血酶结合和激活蛋白 C 系统发挥抗

凝与抗炎作用^[3], 其抗凝和抗炎的双重功能被认为是内皮细胞及血管的关键保护因素之一^[4]。当血管内皮细胞受损时, 常常引起内皮细胞表面 TM 断裂和释放入血, 其血液中可溶性血栓调节蛋白(soluble thrombomodulin, sTM) 水平可作为血管内皮细胞损伤的分子标记物^[5], 有研究证实高糖可使体内

[收稿日期] 2014-12-22

[修回日期] 2015-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81370315)

[作者简介] 赖斌, 硕士, 研究方向为冠心病, E-mail 为 laibintiantian@163.com。通讯作者刘惠亮, 教授, 主要从事心血管介入研究, E-mail 为 huiliangl531@163.com。

sTM 浓度升高^[6]。但高糖对 endothelial cells 的表达及活性影响的研究较少,故本研究通过对体外培养的原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)给予不同浓度葡萄糖处理后,检测内皮细胞表达 TM 蛋白及 mRNA 水平;同时检测其活性,进一步揭示高糖与内皮细胞表面 TM 之间的关系。

1 材料和方法

1.1 主要材料

无水 D-葡萄糖购自美国 Amresco 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;I 型胶原酶、Medium 200 培养基、胰蛋白酶、低血清生长添加剂(LSGS)购自美国 Gibco 公司;羊抗鼠 IgG FITC 抗体、鼠抗人 TM 单克隆抗体(表位:类表皮生长因子 5 区)购自英国 Abcam 公司;反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体、DAB 显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;凝血酶、抗凝血酶、蛋白 C、肝素购自美国 Haematologic Technologies 公司;Chromozym PCa 购自日本 SEKISUI 公司。

1.2 原代细胞培养及鉴定

取健康产妇剖宫产所得脐带(取自武警总医院妇产科,孕妇知情同意),37℃、0.1% I 型胶原酶注入脐带脐静脉,37℃ 条件下消化 20~25 min,收集消化液至 50 mL 离心管中,再以 37℃ PBS 冲洗脐静脉,并收集入离心管中,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 HUVEC 专用培养基(Medium200 + LSGS),吹打成悬液,计数并调整细胞密度 1×10^8 /L,种入 25 cm² 培养瓶,37℃、5% CO₂ 孵箱内培养;24 h 后细胞贴壁,更换培养液,以后每 2~3 天换液 1 次,5~7 天细胞 80%~90% 融合时以 0.125% 胰蛋白酶消化传代。VIII 因子相关抗原染色阳性鉴定内皮细胞。实验用第 2~3 代细胞。

1.3 实验分组

入组前以低血清培养基(Medium200 + 2% 胎牛血清)培养细胞 24 h,使所有细胞同步化于 G0/G1 期。分三组:加入与葡萄糖等体积的 PBS 培养细胞 24 h 为对照组;加入终浓度为 10 mmol/L 的葡萄糖培养细胞 24 h 为 10 mmol/L 葡萄糖组;加入终浓度为 20 mmol/L 的葡萄糖培养细胞 24 h 为 20 mmol/L 葡萄糖组。

1.4 CCK-8 检测细胞毒性试验

取对数生长期细胞制成 5×10^8 /L 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μL 培养液,细胞贴壁 24 h 后,每组设 3 个复孔,加入终浓度为 10 mmol/L 和 20 mmol/L 的葡萄糖,设对照组和空白组,37℃、5% CO₂ 孵箱孵育 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 4 h 后,酶标仪(美国 Bio-Tek Instruments 公司)在 450 nm 波长处检测 OD 值。实验重复 5 次。

1.5 流式细胞术检测

细胞分组培养结束,用 0.125% 胰蛋白酶消化细胞,1% FBS + PBS 收集细胞至流式管中,500 r/min 离心 5 min,弃上清,洗细胞 2 次;加入 1:200 鼠抗人 TM 单克隆抗体重悬细胞,4℃ 避光孵育 30 min,洗细胞 2 次,离心弃上清;加入 1:100 羊抗鼠 IgG FITC 抗体重悬细胞,4℃ 避光孵育 30 min,洗细胞 2 次,离心弃上清;0.5 mL 1% FBS + PBS 重悬细胞,流式细胞仪(FACS Calibur 美国 BD 公司)检测其平均荧光强度,每次计数 30000 个细胞,实验重复 5 次。

1.6 实时荧光定量 PCR

用 TRIzol 法提取细胞总 RNA 后,取总 RNA 2 μg, Oligo dT 1 μL,反转录酶 1 μL, dNTP 4 μL 后加 DEPC 水补足 20 μL 反应体系,60℃、30 min,90℃、5 min,4℃、10 min 逆转录为 cDNA。然后取 2 μL cDNA 产物,在 TM 和 β-actin 引物存在下,按反应条件:95℃ 变性 5 min 后,95℃ 15 s,55℃ 20 s,72℃ 20 s 重复 40 个循环,最后 95℃ 15 s,60℃ 延伸 1 min 进行扩增。引物序列为 TM 上游 5'-CCC AAC ACC CAG GCT AGC T-3',下游 5'-CGT CGA TGT CCG TGC AGA T-3';β-actin 上游 5'-TCA CCA ACT GGG ACG ACA-3',下游 5'-ACA GCC TGG ATA GCA ACG-3' (由上海生工生物工程有限公司合成)。实验结果用德国 Roche 实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler 2.0 进行数据采集,各组结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示相对表达量,每组设 3 个复孔,实验重复 5 次。

1.7 TM 活性实验

根据 Huang 等^[7]报道的方法,通过检测激活蛋白 C 的变化来测定每组 TM 活性。每组设 3 个复孔,将各组细胞用缓冲液 A(内含 20 mmol/L Tris, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 5 g/L 牛血清白蛋白)洗 3 次后,弃上清;加入 40 μL 缓冲液 A(提前加入了 37.5 nmol/L 凝血酶和 5 mg/L 蛋白 C)37℃ 孵育 30 min 进行蛋白 C 的激活反应;加

入 40 μL 的缓冲液 A (提前加入了 6 kU/L 抗凝血酶和 12 kU/L 肝素) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 终止反应。活化的蛋白 C 测定: 加入 50 μL 含有 0.5 mmol/L Chromozym PCa 的缓冲液 B (内含 20 mmol/L Tris pH7.4, 0.15 mol/L NaCl, 5 g/L 牛血清白蛋白); 2 h 内用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光率, 从而得到 TM 的活性, 实验重复 5 次。

1.8 统计学处理

所有数据均采用 SPSS13.0 软件分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 SNK-q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态及鉴定

HUVEC 成功分离、贴壁、生长并传代。细胞呈短梭形或多角形, 融合成单层, 核仁清晰可见。VIII 因子免疫细胞化学染色阳性, 培养的内皮细胞 95% 以上胞浆内含有棕色颗粒, 证实为内皮细胞 (图 1)。

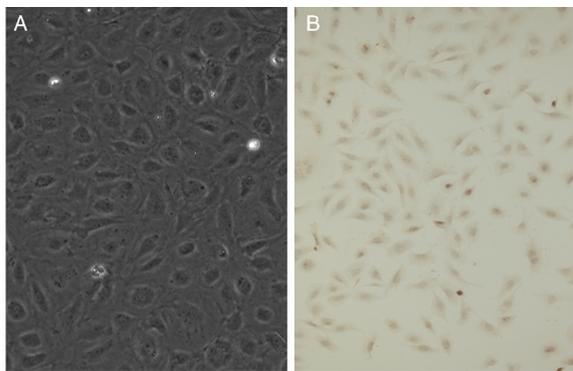


图 1. 人脐静脉内皮细胞形态及鉴定 (10 \times 10) A 为原代人脐静脉内皮细胞, B 为经免疫组化染色 VIII 因子鉴定的人脐静脉内皮细胞。

Figure 1. Morphology and identification of HUVEC (10 \times 10)

2.2 不同浓度葡萄糖对人脐静脉内皮细胞毒性的影响

HUVEC 在不同浓度葡萄糖条件下培养 24 h 后, 三组细胞的抑制率差异无统计学意义 (表 1)。

2.3 流式细胞术检测 TM 蛋白表达

用不同浓度的葡萄糖作用 HUVEC 24 h 后, TM 蛋白表达量随葡萄糖浓度的升高而增加。10 mmol/L 葡萄糖组和 20 mmol/L 葡萄糖组 TM 蛋白表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 且 20 mmol/L 葡萄糖组 TM

蛋白表达量高于 10 mmol/L 葡萄糖组 ($P < 0.05$; 表 2 和图 2)。

表 1. 不同浓度葡萄糖对人脐静脉内皮细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1. Effects of different concentrations of glucose on cell viability in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	OD 值	抑制率
对照组	1.16 \pm 0.12	0
10 mmol/L 葡萄糖组	1.11 \pm 0.11	4.4% \pm 1.1%
20 mmol/L 葡萄糖组	1.07 \pm 0.18	7.8% \pm 1.7%

表 2. 不同浓度葡萄糖对内皮细胞 TM 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2. Effects of different concentrations of glucose on the protein expression of TM in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	TM 蛋白
对照组	27.96 \pm 1.58
10 mmol/L 葡萄糖组	32.60 \pm 2.59 ^a
20 mmol/L 葡萄糖组	41.38 \pm 3.41 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较, b 为 $P < 0.05$, 与 10 mmol/L 葡萄糖组比较。

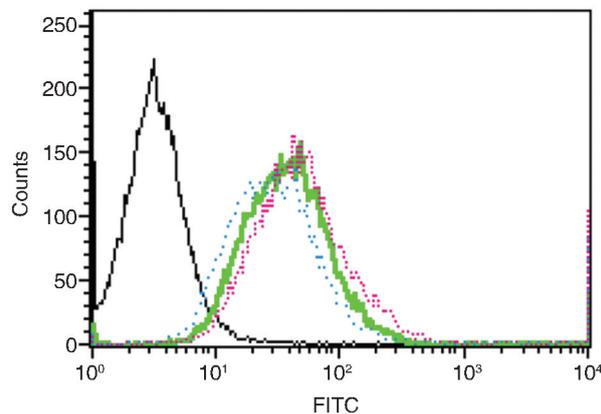


图 2. 不同浓度葡萄糖对内皮细胞 TM 蛋白表达的影响

蓝线表示对照组, 绿线表示 10 mmol/L 葡萄糖组, 红线表示 20 mmol/L 葡萄糖组。

Figure 2. Effects of different concentrations of glucose on the protein expression of TM in HUVEC

2.4 RT-PCR 检测 TM mRNA 表达

用不同浓度葡萄糖作用于内皮细胞 24 h 后, TM mRNA 表达量随葡萄糖浓度的升高而增加。10 mmol/L 葡萄糖组和 20 mmol/L 葡萄糖组 TM mRNA 表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 且 20 mmol/L 葡萄糖组 TM mRNA 表达量高于 10 mmol/L 葡萄糖组 ($P < 0.05$; 表 3)。

表 3. 不同浓度葡萄糖对内皮细胞 TM mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3. Effects of different concentrations of glucose on the mRNA expression of TM in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	TM mRNA
对照组	1
10 mmol/L 葡萄糖组	1.44 ± 0.32 ^a
20 mmol/L 葡萄糖组	2.05 ± 0.19 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 10 mmol/L 葡萄糖组比较。

2.5 TM 活性实验

用不同浓度的葡萄糖作用于内皮细胞 24 h 后, TM 活性随葡萄糖浓度的升高而增加。20 mmol/L 葡萄糖组 TM 活性高于对照组 ($P < 0.05$), 但 10 mmol/L 葡萄糖组与对照组在 TM 活性上差异无显著性, 20 mmol/L 葡萄糖组与 10 mmol/L 葡萄糖组 TM 活性差异也无显著性(表 4)。

表 4. 不同浓度葡萄糖对内皮细胞 TM 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4. Effects of different concentrations of glucose on the activity of TM in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分 组	OD 值
对照组	0.3957 ± 0.0100
10 mmol/L 葡萄糖组	0.4077 ± 0.0123
20 mmol/L 葡萄糖组	0.4157 ± 0.0129 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

目前, 糖尿病血管病变机制研究尚未完全明确, 但高糖诱导的内皮功能紊乱发挥重要作用^[8]。高血糖一方面直接损伤内皮细胞, 诱发内皮细胞分泌和释放黏附分子、趋化因子等炎性介质, 从而刺激血管内皮细胞的炎症反应; 另一方面, 高糖也可引起一系列的病理反应(如氧化应激、内质网应激、脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、糖基化终产物增加等), 引起内皮细胞功能紊乱, 降低内皮细胞存活, 促进内皮细胞凋亡^[9]。本研究通过 CCK-8 实验检测不同浓度的葡萄糖对 HUVEC 的毒性影响, 虽然结果无统计学意义, 但能看出随着葡萄糖浓度的升高其对内皮细胞毒性的增加趋势越明显, 这与先前研究

报道的结果一致。

内皮细胞的损伤将拉开动脉粥样硬化形成的序幕, 导致多种血管疾病的形成, 而 TM 水平是反映血管内皮细胞功能的重要指标^[10]。Isermann 等^[11]人研究表明缺乏 TM 基因的小鼠与对照鼠相比, 出生时就可以观察到其动脉和静脉系统中会自发的形成致死性血栓。在某些病理情况下, 比如脑膜炎球菌败血症、移植排斥反应患者其 TM 的表达下降, 从而可能导致其血栓并发症发生^[12]。研究表明, 几种炎症因子可以下调 TM 的表达(例如肿瘤坏死因子、白细胞介素 1、内毒素、缺氧、同型半胱氨酸和 C 反应蛋白等)^[10, 13]。与此相反, 如环磷酸腺苷、腺苷酸环化酶激活剂、佛波醇酯和视黄酸能增强 TM 的表达^[14-16]。本研究通过使用不同浓度的葡萄糖刺激 HUVEC 24 h 发现, 无论是从蛋白还是基因水平上, 高糖可以提高内皮细胞表达 TM, 并且增强 TM 蛋白的活性。研究报道, 高血糖作用于牛主动脉内皮细胞将增加内皮细胞中 cAMP 的水平^[17], 是否 TM 的上调与 cAMP 水平增加有关目前还不清楚, 但值得进一步研究。高糖对 HUVEC 表面 TM 的上调及活性增加, 可能为内皮细胞对于高糖的一种防御机制, 因为热冲击应力也可导致内皮细胞上调 TM 的表达^[18]。此外, Wang 等人^[19]用人主动脉内皮细胞研究高糖对组织因子和 TM 的影响, 结果显示高糖增加 TM 的表达, 这与本研究的结果一致, 但本研究另外研究了高糖对 TM 活性的影响, 结果显示高糖也增加 TM 的活性。

综上所述, 本文通过体外培养 HUVEC, 分析了高糖对内皮细胞损伤及 TM 的表达和活性的影响, 提示高糖诱导 HUVEC 表面 TM 的上调及活性增加, 可能为内皮细胞对于高糖的一种防御机制。

[参考文献]

- [1] Hartge MM, Kintscher U, Unger T. Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2006, 35(3): 551-560.
- [2] van Hinsbergh VW. Endothelium role in regulation of coagulation and inflammation[J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34(1): 93-106.
- [3] Morser J. Thrombomodulin links coagulation to inflammation and immunity[J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(3): 421-431.
- [4] Ito T, Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (Suppl 1): 168-173.
- [5] 董 焰, 刘秀珍, 刘从彬, 等. 血栓调节蛋白的临床研究

- 进展[J]. 安徽医药, 2010, 14(4): 383-384.
- [6] 佟广辉, 佟威威, 金冬岩, 等. 高糖环境对人脐静脉内皮细胞分泌血栓调节蛋白的影响[J]. 临床误诊误治, 2012, 25(6): 49-51.
- [7] Huang HC, Chang TM, Chang YJ, et al. UVB irradiation regulates ERK1/2- and p53-dependent thrombomodulin expression in human keratinocytes [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67 632.
- [8] Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(1): 94-112.
- [9] 林敏华, 林宇涵, 许双临, 等. 高糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(1): 20-22.
- [10] Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation [J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1): 107-125.
- [11] Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, et al. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis[J]. J Clin Invest, 2001, 108(4): 537-546.
- [12] Iino S, Abeyama K, Kawahara KI, et al. Thrombomodulin expression on Langerhans' islet; can endogenous 'anticoagulant on demand' overcome detrimental thrombotic complications in clinical islet transplantation [J]. J Thromb Haemost, 2004, 2(5): 833-834.
- [13] Nan B, Yang H, Yan S, et al. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells [J]. Surgery, 2005, 138(2): 212-222.
- [14] Maruyama I, Soejima Y, Osame M, et al. Increased expression of thrombomodulin on the cultured human umbilical vein endothelial cells and mouse hemangioma cells by cyclic AMP[J]. Thromb Res, 1991, 61(3): 301-310.
- [15] Horie S, Kizaki K, Ishii H, et al. Retinoic acid stimulates expression of thrombomodulin, a cell surface anticoagulant glycoprotein, on human endothelial cells. Differences between up-regulation of thrombomodulin by retinoic acid and cyclic AMP[J]. Biochem J, 1992, 281 (Pt 1): 149-154.
- [16] Hirokawa K, Aoki N. Up-regulation of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells in vitro[J]. J Biochem, 1990, 108(5): 839-845.
- [17] Zhang Z, Apse K, Pang J, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(51): 40 042-047.
- [18] Conway EM, Liu L, Nowakowski B, et al. Heat shock of vascular endothelial cells induces an up-regulatory transcriptional response of the thrombomodulin gene that is delayed in onset and does not attenuate[J]. J Biol Chem, 1994, 269(36): 22 804-810.
- [19] Wang HJ, Huang HC, Chuang YC, et al. Modulation of tissue factor and thrombomodulin expression in human aortic endothelial cells incubated with high glucose[J]. Acta Diabetol, 2012, 49(2): 125-130.

(此文编辑 许雪梅)