

透明质酸对游离脂肪酸引起的人主动脉血管平滑肌细胞表达 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的影响

杨兴文¹, 李伟华², 李元², 董莉², 权金星³, 韩平治⁴

(1.宁夏医科大学临床医学院检验系,宁夏银川市 750003;甘肃省人民医院 2.中心实验室, 3.内分泌科 甘肃省内分泌代谢病重点实验室,4.临床检验中心,甘肃省兰州市 730000)

[关键词] 透明质酸; 游离脂肪酸; 人主动脉血管平滑肌细胞; 白细胞介素 6; 白细胞介素 8; 肿瘤坏死因子 α

[摘要] **目的** 探讨透明质酸(HA)对游离脂肪酸(FFA)引起的人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)表达白细胞介素 6(IL-6)、IL-8 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的影响。**方法** 培养 HA-VSMC,用不同浓度(0、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$) FFA 和不同浓度 FFA+高分子量 HA(HMW-HA)或低分子量 HA(LMW-HA)处理细胞 24、48 h。噻唑蓝法检测 FFA 和 FFA+HA 对 HA-VSMC 存活率的影响;EdU 染色检测细胞增殖活性;酶联免疫吸附法检测培养上清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 含量;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 及蛋白表达水平。**结果** (1)FFA 在 400 $\mu\text{mol/L}$ 内呈浓度依赖性诱导 HA-VSMC 增殖;(2)HMW-HA、LMW-HA 均对 FFA 诱导的 HA-VSMC 增殖有抑制作用,且 HMW-HA 抑制作用强于 LMW-HA;(3)FFA 显著促进 HA-VSMC IL-6、IL-8 和 TNF- α 的分泌,且有明显的时间和浓度依赖性;HA 可以抑制上述作用;(4)实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 及蛋白表达水平均低于 FFA 组(均 $P<0.01$),其中 FFA+HMW-HA 组又低于 FFA+LMW-HA 组($P<0.01$)。**结论** (1)FFA 诱导 HA-VSMC IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 和蛋白表达升高;(2)HA 对 FFA 引起的 HA-VSMC IL-6、IL-8 和 TNF- α 的表达有抑制作用,且 HMW-HA 抑制效果强于 LMW-HA。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of hyaluronic acid on the expressions of IL-6, IL-8 and TNF- α in human aortic vascular smooth muscle cells induced by free fatty acid

YANG Xing-Wen¹, LI Wei-Hua², LI Yuan², DONG Li², QUAN Jin-Xing³, HAN Ping-Zhi⁴

(1. Inspection Department, Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750003, China; 2. Central Laboratory, 3. Department of Endocrinology & Key Laboratory of Endocrine and Metabolic Diseases of Gansu Province, 4. Clinical Laboratory Center, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China)

[KEY WORDS] Hyaluronic acid; Free fatty acid; Human aortic vascular smooth muscle cell; Interleukin-6; Interleukin-8; Tumor necrosis factor- α

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of hyaluronic acid (HA) on the expression of interleukin-6 (IL-6), IL-8 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in human aortic vascular smooth muscle cell (HA-VSMC) induced by free fatty acid (FFA). **Methods** HA-VSMCs were cultured and dealt with different concentrations (0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) of FFA and FFA plus high molecular weight HA (HMW-HA) or low molecular weight HA (LMW-HA) for 24, 48 hours.

The effects of FFA and FFA plus HA on the survival rate of HA-VSMCs were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Cell proliferation activity was detected by EdU staining. The contents of IL-6, IL-8 and TNF- α in culture supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression levels of IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA and protein. **Results**

[收稿日期] 2016-07-27

[修回日期] 2016-08-31

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81460155、81260136、30960147)

[作者简介] 杨兴文,硕士研究生,检验医师,主要从事血管疾病的生物化学及分子生物学研究,E-mail 为 yangxingwen199051@163.com。通讯作者李伟华,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事自由基与炎症、糖尿病血管并发症等疾病的研究,E-mail 为 liwhsl@163.com。

(1) FFA showed a concentration-dependent induction to HA-VSMC proliferation in the 400 $\mu\text{mol/L}$. (2) HMW-HA and LMW-HA both inhibited the proliferation of HA-VSMC induced by FFA, and the inhibitory effect of HMW-HA was stronger than that of LMW-HA. (3) FFA significantly promoted the secretions of HA-VSMC IL-6, IL-8 and TNF- α in a apparent time- and concentration-dependent manner; HA could inhibit the above effect. (4) Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot results showed that the expression levels of IL-6, IL-8, TNF- α mRNA and protein in FFA+HMW-HA group and FFA+LMW-HA group were lower than those in FFA group (all $P < 0.01$), where the FFA+HMW-HA group was lower than the FFA+LMW-HA group ($P < 0.01$). **Conclusions** (1) FFA can induce the increases of IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA and protein expressions in HA-VSMCs. (2) HA can inhibit the expressions of IL-6, IL-8 and TNF- α induced by FFA, and the inhibitory effect of HMW-HA is stronger than that of LMW-HA.

糖尿病肾病、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)、糖尿病足是 2 型糖尿病大血管的主要并发症,也是糖尿病患者致死及致残的主要原因^[1]。糖尿病大血管病变的主要病理表现是 As,动脉内皮细胞功能紊乱和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增生是 2 型糖尿病 As 发生的重要病理机制。糖尿病状态下慢性高血糖、高胰岛素血症和高游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 是 2 型糖尿病 As 形成和发展的重要致病因素。FFA 引起的慢性无菌性炎症和氧化应激产生活性氧与糖尿病血管并发症紧密相关^[2-4]。研究发现, FFA 通过多种途径诱导动脉内皮细胞功能紊乱和 VSMC 增生, 促进 As 的发生和发展。

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 为细胞外基质的主要成份之一, 是一个非硫酸化的 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D 葡萄糖胺通过 β -1, 3 配糖键连接的重复聚合物粘多糖组成的双糖^[5-6], 在炎症调节中起关键作用。炎症与多种类型细胞 HA 聚合物的积累和代谢有关。近年来 HA 已成为公认的炎症、血管生成、纤维化和促癌过程的积极参与者。HA 及其结合蛋白调节炎症基因的表达、炎症细胞的募集、炎性细胞因子的释放, 并能减弱炎症过程, 为组织损伤提供保护^[7]。越来越多的证据表明, 细胞反应具有 HA 分子量大小依赖性。高分子量 HA (high molecular weight HA, HMW-HA; >500 kDa) 是生理条件下的主要存在形式, 具有较好的粘弹性、保湿性、抑制炎症反应、润滑等功能; 低分子量 HA (low molecular weight HA, LMW-HA; <500 kDa) 发挥血管生成和免疫调节等作用。FFA 引起人主动脉 VSMC (human aortic VSMC, HA-VSMC) 的炎症反应和氧化应激已被广泛认识, 然而 HA 能否对 FFA 诱导的 HA-VSMC 炎症反应和氧化应激产生影响目前还不清楚, 本实验拟就 HMW-HA 和 LMW-HA 对 FFA 刺激 HA-VSMC 所致炎症反应的影响展开初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

正常 HA-VSMC (美国 ATCC 细胞库); DMEM 培养基、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂、棕榈酸 (Sigma 公司); 胎牛血清 (HyClone 公司); 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司); HMW-HA 与 LMW-HA (R&D 公司); 无 FFA 牛血清白蛋白 (上海生工公司); 5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色试剂盒 (广州锐博公司); 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附实验试剂盒 (R&D 公司); BCA 蛋白检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (碧云天公司); β -actin、IL-6、IL-8、TNF- α 单克隆抗体 (一抗) 及对应的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 (小鼠) IgG (二抗) (Proteintech 公司); IL-6、IL-8、TNF- α 、 β -actin 引物、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, Real-time PCR) 试剂盒 (Takara 公司)。Thermo[®] RMK3 型酶标仪 (上海普林斯顿生物科技发展有限公司); RIX71-A12FL/PH 型荧光倒置显微镜 (Olympus 公司); LightCycler[®] 480 型荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司); ChemiDoc 分子成像系统及 ChemiDoc[™] XRS + BIORAD ImageLab 软件 (Bio-Rad 公司)。

1.2 细胞培养

将 HA-VSMC 接种于含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基的 100 mm 细胞培养皿中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养, 根据细胞生长状况每 1~2 天更换培养液 1 次, 当细胞长满培养皿时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代细胞。当细胞在对数生长期时, 用于实验。

1.3 实验分组与处理

依据有无 HA 和 FFA 作用于细胞, 将实验分为 6 组: (1) 对照组 (Control 组): 加入等量的 DMEM 培

培养基处理;(2)HMW-HA 对照组:用 1 g/L HMW-HA 处理;(3)LMW-HA 对照组:用 1 g/L LMW-HA 处理;(4)FFA 组:用 400 $\mu\text{mol/L}$ FFA 处理;(5)FFA+HMW-HA 组:用 400 $\mu\text{mol/L}$ FFA+1 g/L HMW-HA 处理;(6)FFA+LMW-HA 组:用 400 $\mu\text{mol/L}$ FFA+1 g/L LMW-HA 处理。

1.4 MTT 法检测细胞存活率

无菌条件下,用 0.25%的胰蛋白酶消化对数期生长细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)吹打、收集于 15 mL 离心管中,1500 r/min 离心 2 min;弃去 PBS 后加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,吹打成单细胞悬液,充池并计数;以 1.5×10^5 个/毫升细胞密度接种于 96 孔板,设 5 个复孔(空白对照组只加培养液、MTT、二甲基亚砷),待细胞贴壁后,加含不同浓度 FFA(0、25、50、100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$)和/或分别联合 1 g/L HMW-HA、LMW-HA 的培养液,孵育 24、48 h;每孔加 5 g/L MTT 溶液 20 μL ,孵育 4 h,弃培养液,每孔加二甲基亚砷 150 μL ,振荡 10 min。用酶标仪在 490 nm 波长处测吸光度(absorbance, A)值,计算细胞存活率,细胞存活率=(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)。

1.5 EdU 染色检测细胞增殖活性

96 孔板接种和处理细胞同“1.4”所述。50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 标记细胞 2 h, PBS 洗 2 次,每次 5 min;用 4%多聚甲醛固定 30 min, 2 g/L 甘氨酸中和 5 min;含 0.5% Triton X-100 的 PBS 渗透 10 min, PBS 洗 1 次, 5 min; Apollo[®] 488 荧光染料避光、室温孵育 30 min, 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 渗透 2~3 次,每次 10 min; Hoechst 33342 反应液避光、室温孵育 30 min, PBS 清洗 1~3 次。用荧光显微镜(蓝光激发)观察并拍照记录结果。

1.6 ELISA 检测细胞培养上清中 IL-6、IL-8、TNF- α 含量

在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 条件下培养 HA-VSMC,待细胞生长至 80%~90%汇合时,消化传代并以 7.0×10^6 个/毫升的密度将细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中,待细胞生长状态良好,换用含 0.25%胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h 后进行干预实验。采用不同浓度 FFA(0、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)和/或分别联合 1 g/L HMW-HA、LMW-HA 处理细胞 6、12、24、48 h,每个时间点设对照组(含 5 μL PBS),在相应的时间点收获细胞和培养上清,离心去除细胞碎片,按酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosor-

bent assay, ELISA)试剂盒说明操作,分别检测各组中 IL-6、IL-8、TNF- α 蛋白水平。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平

(1)RNA 提取和逆转录:TRIzol 法提取按实验设计处理后的细胞总 RNA,采用逆转录试剂盒将总 RNA 转录合成为 cDNA 并贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。(2)引物设计:IL-6:上游 5'-AAGCCAGAGCTGTG-CAGATGAGTA-3',下游 5'-TGTCTGCAGCCACTG-GTTC-3'; IL-8:上游 5'-ACACTGCGCCAACA-CAGAAATTA-3',下游 5'-TTTGCTTGAAGTTTCACT-GGCATC-3'; TNF- α :上游 5'-CCATCTATCTGG-GAGGGGTCT-3',下游 5'-CGTTTGGGAAGGTTGGAT-GT-3'; β -actin:上游 5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3',下游 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。扩增片段长度分别为 150、185、154、186 bp。(3)反应体系:25 μL 扩增体系包括上下游引物各 1 μL , cDNA 2 μL , SYBR[®] Green Master Mix PCR 反应混合液 12.5 μL , 双蒸水 8.5 μL 。(4)循环参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 45 个循环。采用 β -actin 作为内参照,以 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 相对定量法来评价目的基因 mRNA 的表达水平。

1.8 Western blot 检测 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白表达

按常规方法提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度;配制 10%SDS-PAGE 分离胶和 5%浓缩胶,每孔上样 15 μg ,分离蛋白样品;300 mA、70 V 恒压转膜 2 h;取出并切割 PVDF 膜,用 5%牛血清白蛋白室温封闭 2 h;分别将膜以 IL-6、IL-8、TNF- α 、 β -actin 抗体(1:1000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;用 PBS-T(含有 0.1%Tween-20 的 PBS)漂洗 5 次,根据一抗来源加入辣根过氧化物酶标志的羊抗兔(小鼠)IgG(1:5000 稀释),室温孵育 2 h;再以 PBS-T 漂洗 5 次后,用 ECL Plus 超敏发光剂显示阳性条带。在 ChemiDoc 分子成像系统及 ImageLab 软件(ChemiDoc[™] XRS+BIORAD)下记录并分析结果。

1.9 统计学处理

统计分析用 SPSS 17.0 软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 验和单因素方差(One-way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率

FFA 在 400 $\mu\text{mol/L}$ 内可诱导 HA-VSMC 增殖

且有浓度依赖性,时间依耐性作用不明显;HMW-HA、LMW-HA 均对 FFA 诱导的 HA-VSMC 增殖有抑

制作用且 HMW-HA 抑制作用强于 LMW-HA(图 1)。

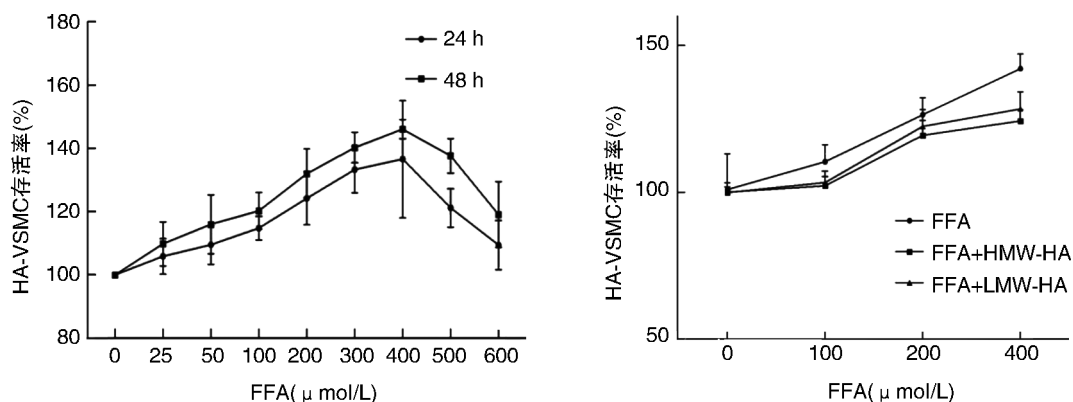


图 1. MTT 法检测不同浓度 FFA 及 FFA+HA 对 HA-VSMC 存活率的影响 (n=5) 左图为为不同浓度 FFA 对 HA-VSMC 作用 24、48 h 的细胞存活率;右图为不同浓度 FFA 及 FFA+HA 对 HA-VSMC 作用 24 h 的细胞存活率。

Figure 1. Effects of different concentrations of FFA and FFA+HA on the survival rate of HA-VSMC detected by MTT method (n=5)

2.2 EdU 染色检测 HA-VSMC 增殖

EdU 染色结果显示,经不同处理 24 h 后显微镜下计数 3 个视野增殖细胞数的平均值,各组的增殖细胞数之间差异有统计学意义 (F = 96.379, P < 0.01)。各实验组间两两比较发现,经 FFA 处理后 HA-VSMC 的增殖活性显著增强,FFA 组细胞增殖活性显著强于对照组、HMW-HA 对照组、LMW-HA 对照组,差异有统计学意义 (t = -9.999, P < 0.01; t =

-12.263, P < 0.01; t = -9.694, P < 0.01)。联合 HMW-HA、LMW-HA 处理后,FFA + HMW-HA 组、FFA + LMW-HA 组的细胞增殖活性显著低于 FFA 组,差异有统计学意义 (t = 11.310, P < 0.01; t = 7.336, P < 0.01)。FFA+HMW-HA 组和 FFA+LMW-HA 组间差异也具有统计学意义 (t = -9.227, P < 0.01),且 FFA+HMW-HA 组增殖细胞数 (35.33 ± 2.52) 显著低于 FFA+LMW-HA 组 (94.33 ± 10.79) (图 2)。

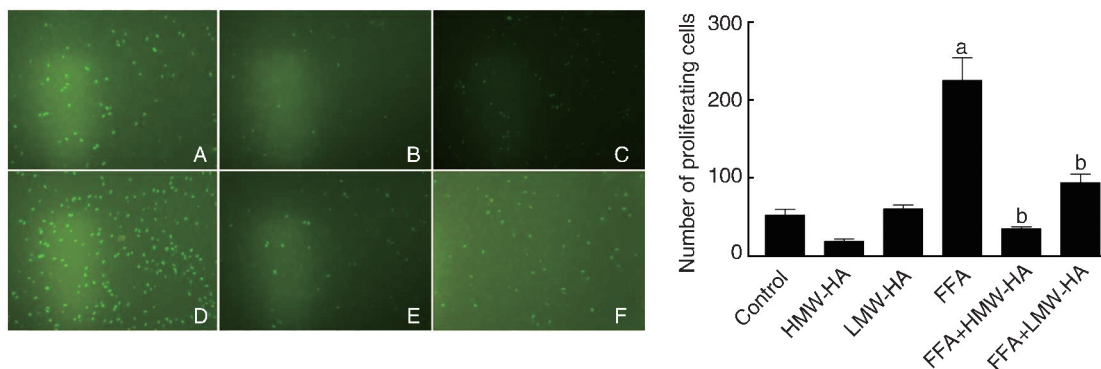


图 2. 不同处理 24 h 后 HA-VSMC 增殖活性比较 (n=3) 显微镜图放大倍数为 400。A 为对照组,B 为 HMW-HA 对照组,C 为 LMW-HA 对照组,D 为 FFA 组,E 为 FFA+HMW-HA 组,F 为 FFA+LMW-HA 组。a 为 P < 0.01,与 Control 组比较;b 为 P < 0.01,与 FFA 组比较。

Figure 2. Comparison of HA-VSMC proliferation activity after different treatment for 24 h (n=3)

2.3 细胞培养上清 IL-6、IL-8 和 TNF-α 表达

ELISA 结果显示,FFA 显著促进 HA-VSMC IL-6、IL-8 和 TNF-α 的分泌,且有明显的时间和浓度依耐性。IL-6、IL-8 和 TNF-α 均在 6 h 开始升高,在 24 h 达高峰,之后表达有所下降,FFA 组、FFA+HMW-

HA 组、FFA+LMW-HA 组各时间点 IL-6、IL-8、TNF-α 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05),且 FFA+HMW-HA 组表达量较 FFA+LMW-HA 组低,其余各组各时间点表达相近,差异无统计学意义。FFA 在浓度为 400 μmol/L 时作用最强,分别约为 3 个对照组的

2.57、1.41、1.34 倍(均 $P < 0.01$), FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组在各时间点 IL-6、IL-8、TNF- α 表

达均明显低于 FFA 组(均 $P < 0.05$; 图 3)。

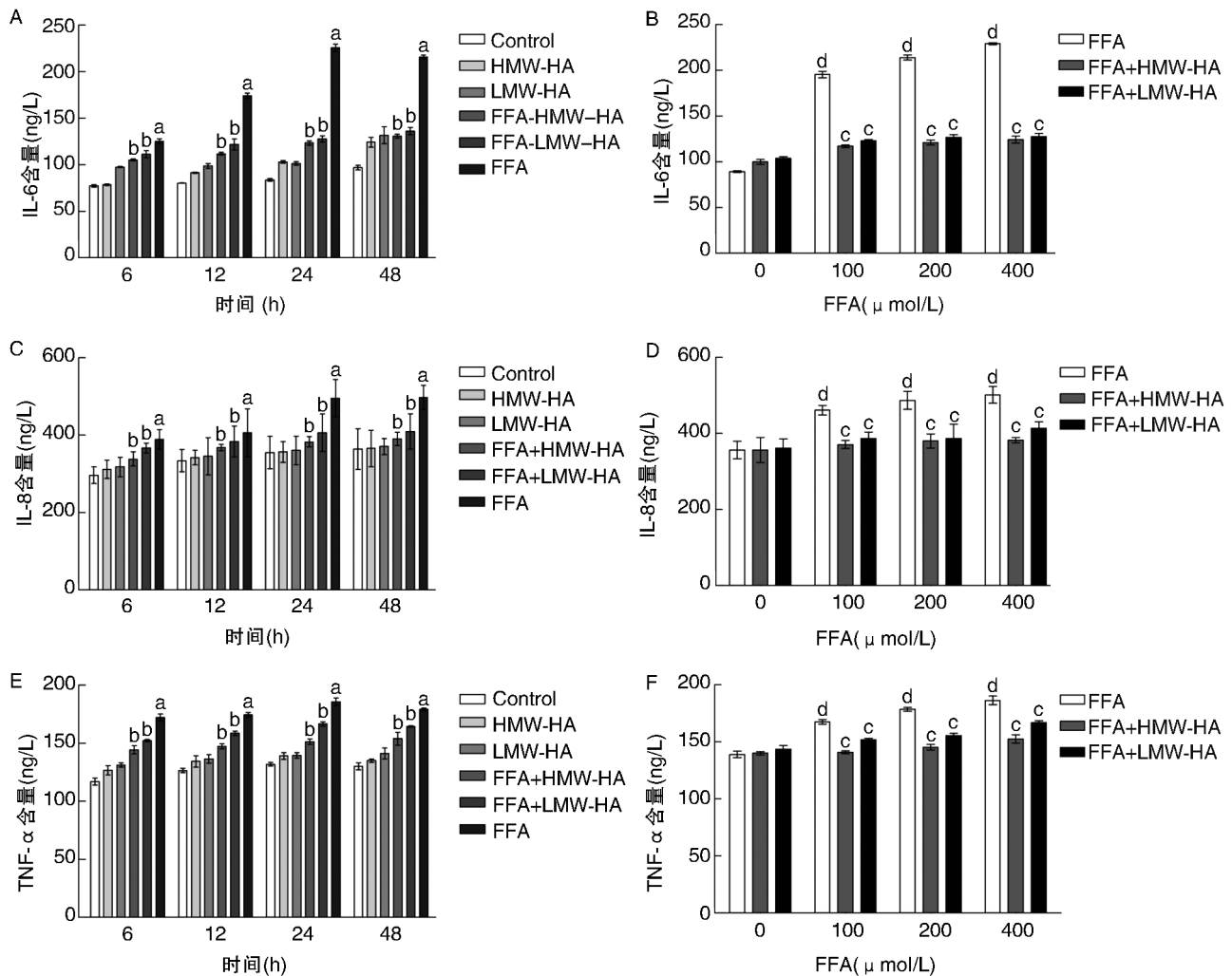


图 3. FFA 及 FFA+HA 对 HA-VSMC 表达 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白的调节 ($n=3$) A、C、E 分别为不同时间点各组 IL-6、IL-8 和 TNF- α 表达水平; B、D、F 分别为不同浓度 FFA 及 FFA+HA 处理 HA-VSMC 24 h 时 IL-6、IL-8 和 TNF- α 表达水平。a 为 $P < 0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 FFA 组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ FFA 比较。

Figure 3. Regulation of FFA and FFA+HA on protein expression of IL-6, IL-8 and TNF- α in HA-VSMC ($n=3$)

2.4 IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 表达水平

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 各实验组 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平均高于对照组、HMW-HA 对照组、LMW-HA 对照组, 且各组差异均具有统计学意义 ($F = 5594.723, P < 0.01$; $F = 4511.586, P < 0.01$; $F = 1141.028, P < 0.01$); FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组的 IL-6 ($t = 77.102, P < 0.01$; $t = 52.920, P < 0.01$)、IL-8 ($t = 69.660, P < 0.01$; $t = 52.461, P < 0.01$) 和 TNF- α ($t = 42.336, P < 0.01$; $t = 53.086, P < 0.01$) 均显著低于 FFA 组; FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组的 IL-6 ($t = 77.102, P <$

0.01)、IL-8 ($t = 77.102, P < 0.01$)、TNF- α ($t = 77.102, P < 0.01$) 差异也有统计学意义, FFA+HMW-HA 组 ($3.24 \pm 0.11, 3.52 \pm 0.19, 2.65 \pm 0.29$) 显著低于 FFA+LMW-HA 组 ($6.04 \pm 0.10, 6.78 \pm 0.15, 5.82 \pm 0.09$); 对照组、HMW-HA 对照组、LMW-HA 对照组间差异无统计学意义(图 4)。

2.5 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白表达水平

Western blot 检测结果显示, 各实验组 IL-6、IL-8、TNF- α 蛋白表达水平均高于对照组、HMW-HA 对照组、LMW-HA 对照组, 且各组差异均具有统计学意义 ($F = 75.920, P < 0.01$; $F = 55.968, P < 0.01$; $F =$

109.745, $P < 0.01$); FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组的 IL-6 ($t = 28.082, P < 0.01$; $t = 6.107, P < 0.01$)、IL-8 ($t = 7.953, P < 0.01$; $t = 4.136, P < 0.05$)、TNF- α ($t = 9.165, P < 0.01$; $t = 6.567, P < 0.01$) 均显著低于 FFA 组; FFA+HMW-HA 组、FFA+LMW-HA 组的 IL-6 ($t = -15.482, P < 0.01$)、IL-8 ($t = -4.431, P < 0.05$)、TNF- α ($t = -3.001, P < 0.05$) 差异也有统计学意义, FFA+HMW-HA 组显著低于 FFA+LMW-HA 组; 对照组、HMW-HA 对照组、LMW-HA 对照组间差异无统计学意义(图 5)。

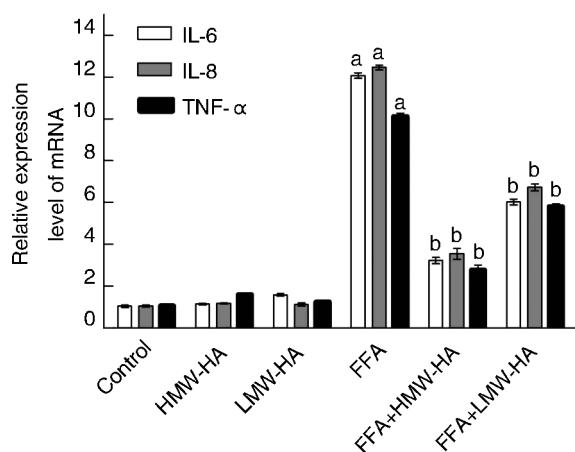


图 4. 实时荧光定量 PCR 检测 FFA 及 FFA+HA 作用后 HA-VSMC 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α mRNA 的表达 ($n = 3$)
a 为 $P < 0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 FFA 组比较。

Figure 4. Expression of IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA in HA-VSMC treated with FFA and FFA+HA detected by real-time fluorescence quantitative PCR ($n = 3$)

3 讨论

越来越多的证据表明, 炎症、炎性细胞因子和氧化应激在 As 的过程中起着重要作用^[8]。糖尿病条件下, 继发于糖代谢异常的脂质代谢紊乱导致过量的 FFA 产生。近来研究表明 FFA 在诱导血管炎症和 As 中起着重要作用, 脂代谢紊乱产生大量 FFA 参与 As 的形成^[4, 9-10]。IL-6、IL-8 和 TNF- α 是主要的炎症因子, 在人和/或兔的 As 斑块中检测到大量的 IL-6、IL-8 和 TNF- α ^[11-12]。FFA 促使 VSMC 产生氧化应激反应和形成无菌性炎症并产生大量 TNF- α 等炎性细胞因子, 后者又反过来促进了内皮细胞黏附分子的表达, 以及炎性细胞的聚集和活化, 刺激 VSMC 迁移和增殖, 并在血管壁内启动炎症级联反应, 加重了 As^[13-14]。在本研究中我们发现 FFA 在 400 $\mu\text{mol/L}$ 内可诱导 HA-VSMC 增殖且有浓度依赖

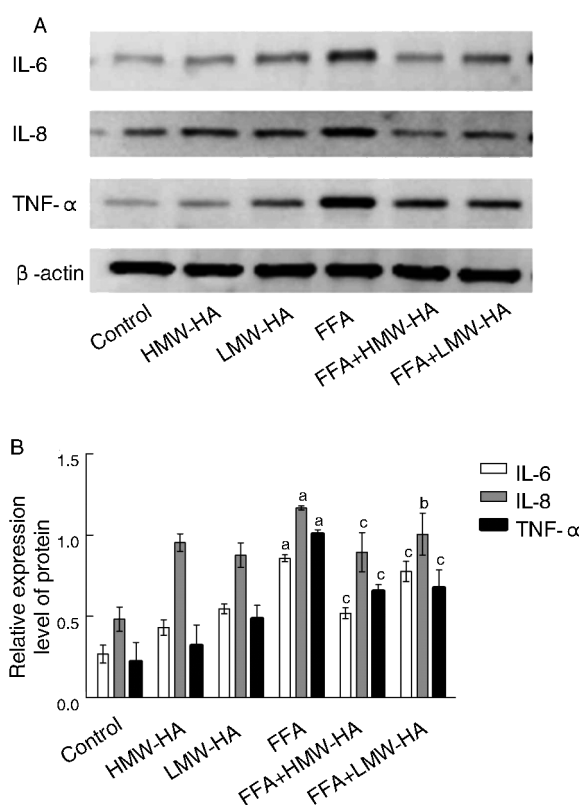


图 5. Western blot 检测 FFA 及 FFA+HA 作用后 HA-VSMC 中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白的表达 ($n = 3$) A 为各组 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白表达量; B 为各组 IL-6、IL-8 和 TNF- α 蛋白灰度相对分析。a 为 $P < 0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 FFA 组比较。

Figure 5. Expression of IL-6, IL-8 and TNF- α protein in HA-VSMC treated with FFA and FFA+HA detected by Western blot ($n = 3$)

性, FFA 可诱导 HA-VSMC IL-6、IL-8 和 TNF- α 分泌增多, 初步证实 FFA 诱导的 HA-VSMC 增殖与炎症有关。进一步研究发现 HA-VSMC 内 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 和蛋白表达水平上调, 这与上述研究结果相符。

细胞外基质在器官的形成、生长、功能和许多人类疾病中起重要作用。HA 是最简单的黏多糖和细胞外基质的主要成分, 存在于各种组织。它参与一些重要的生物学过程, 包括调节细胞的信号转导, 调节细胞的黏附、增殖和分化^[15]。此外, HA 具有抑菌、抗炎、抗水肿、促血管发生和骨诱导等特性^[16]。HA 的生理功能和应用特性与其分子量、分子量分布等分子参数密切相关。LMW-HA 具有抗肿瘤、促进伤口愈合、促进血管生成、免疫调节等作用。HMW-HA 具有抗炎作用; 有报道^[17-18]指出, HMW-HA 抑制血管生成和 IL-1B、IL-6、TNF- α 、前列腺素 E2 的产生。然而, HA 以及不同分子量的 HA

是否对 FFA 引起的 HA-VSMC 表达 IL-6、IL-8 和 TNF- α 有影响目前国内外还没有报道,我们以此为切入点展开研究。在本研究中我们用 MTT 和 EdU 染色法联合检测细胞增殖,发现 HMW-HA 和 LMW-HA 均对 FFA 诱导的 HA-VSMC 增殖有抑制作用,且 HMW-HA 抑制作用强于 LMW-HA;ELISA 检测细胞培养上清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 表达,发现 HMW-HA 和 LMW-HA 均对 FFA 诱导的 HA-VSMC 表达 IL-6、IL-8 和 TNF- α 有抑制作用;进一步研究同样发现,分别用 HMW-HA 和 LMW-HA 处理后,HA-VSMC 内 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 和蛋白表达水平下调,HMW-HA 作用强于 LMW-HA。

综上所述,我们认为 FFA 诱导的 HA-VSMC 增殖和 FFA 引起的无菌性炎症有关;HA 能减缓 FFA 引起的炎症反应,且 HMW-HA 作用强于 LMW-HA。本实验的不足之处在于没有涉及到 HA 抑制 FFA 引起的炎症反应的具体机制,本课题组将在后续的实验继续展开研究。

[参考文献]

- [1] Cooper ME. Diabetes: treating diabetic nephropathy-still an unresolved issue[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(9): 515-516.
- [2] Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management [J]. *JAMA*, 2002, 287(19): 2 570-581.
- [3] Laurenza I, Colognato R, Migliore L, et al. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: evidence of an anti-inflammatory action[J]. *Biofactors*, 2008, 33(4): 237-247.
- [4] Quan J, Liu J, Gao X, et al. Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway [J]. *J Diabetes*, 2014, 6(1): 33-41.
- [5] Weissmann B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord[J]. *J Am Chem Soc*, 1954, 76(7): 1 753-757.
- [6] Weissmann B, Meyer K, Sampson P, et al. Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid [J]. *J Biol Chem*, 1954, 208(1): 417-429.
- [7] Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation[J]. *Front Immuno*, 2014, 5(5): 101-105.
- [8] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *New Engl J Med*, 2005, 352(16): 1 685-695.
- [9] Wu D, Liu J, Pang X, et al. Palmitic acid exerts pro inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor α [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1 706-712.
- [10] Doronzo G, Viretto M, Barale C, et al. Oleic acid increases synthesis and secretion of VEGF in rat vascular smooth muscle cells: role of oxidative stress and impairment in obesity[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18 861-880.
- [11] Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration[J]. *Circ Res*, 2007, 100(5): 607-621.
- [12] 高啸波, 权金星, 杨海静, 等. 果蝇样受体 4 介导游离脂肪酸调节人血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白-1 的表达[J]. *中华糖尿病杂志*, 2013, 5(2): 108-113.
- [13] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Arterioscl Throm Vas*, 2012, 32(9): 2 045-051.
- [14] Skoog T, Dichtl W, Boquist S, et al. Plasma tumour necrosis factor- α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(5): 376-383.
- [15] Zhao N, Wang X, Qin L, et al. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro [J]. *Bioche Bioph Res Co*, 2015, 465(3): 569-574.
- [16] Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy [J]. *North Am J Med Sci*, 2013, 5(5): 309-313.
- [17] Mitsui Y, Gotoh M, Nakama K, et al. Hyaluronic acid inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines and cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 production via CD44 in interleukin-1-stimulated subacromial synovial fibroblasts from patients with rotator cuff disease [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(7): 1 032-037.
- [18] Dogné S, Rath G, Jouret F, et al. Hyaluronidase 1 deficiency preserves endothelial function and glycocalyx integrity in early streptozotocin-induced diabetes [J]. *Diabetes*, 2016, 65(9): 2 742-753.

(此文编辑 曾学清)