

血管紧张素(1-7)/Mas 受体轴通过调控 ATP 敏感性钾通道对抗高糖引起的人脐静脉内皮细胞损伤

梁伟杰^{1,2}, 陈君^{1,2}, 余盛龙^{1,2}, 陈美姬³, 林佳琼⁴, 吴文⁴

(1.广州市番禺区中心医院心血管内科,2.广州市番禺区心血管疾病研究所,广东省广州市 511400;

3.中山大学附属第一医院黄埔院区儿科,广东省广州市 510700;4.广东省人民医院 广东省医学科学院 广东省老年医学研究所东病区内分泌科,广东省广州市 510080)

[关键词] 血管紧张素(1-7)/Mas 受体轴; ATP 敏感性钾通道; 高糖; 人脐静脉内皮细胞; 细胞损伤

[摘要] **目的** 研究血管紧张素(1-7) [Ang(1-7)]/Mas 受体轴能否通过调控 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP} 通道)对抗高糖引起的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤。**方法** 应用 40 mmol/L 葡萄糖(高糖)作用 HUVEC 24 h 建立糖尿病血管内皮细胞损伤模型,应用蛋白免疫印迹法检测 K_{ATP} 通道蛋白的表达水平,CCK-8 检测细胞存活率,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞培养液中 LDH 活性,Hoechst33258 核染色荧光显微镜照相法检测凋亡细胞数量,双氯荧光素染色荧光显微镜照相法测定细胞内活性氧(ROS)水平,罗丹明 123 染色荧光显微镜照相法测定线粒体膜电位(MMP),ELISA 检测培养液中白细胞介素 1β (IL- 1β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的分泌水平。**结果** 高糖分别作用 HUVEC 1~24 h,从 3 h 起 K_{ATP} 通道蛋白的表达水平呈时间依赖性降低,在 24 h 时 K_{ATP} 通道蛋白的表达下降最明显。20 μ mol/L Ang(1-7)和高糖共处理 HUVEC 24 h 可抑制高糖对 K_{ATP} 通道蛋白表达的下调。此外,20 μ mol/L Ang(1-7)共处理或 100 μ mol/L 吡拉地尔(K_{ATP} 通道开放剂)预处理细胞均能对抗高糖引起的 HUVEC 损伤,使细胞存活率升高,LDH 活性降低,凋亡细胞数量、ROS 生成、MMP 丢失及 IL- 1β 和 TNF- α 的分泌减少。10 μ mol/L A-779 (Mas 受体拮抗剂)共处理或 1 mmol/L 格列本脲(K_{ATP} 通道阻断剂)预处理均能阻断 Ang(1-7)的上述细胞保护作用。**结论** Ang(1-7)/Mas 受体轴通过调控 K_{ATP} 通道对抗高糖引起的 HUVEC 损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Angiotensin(1-7)/Mas receptor axis protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced injury by modulating ATP-sensitive K^+ channels

LIANG Wei-Jie^{1,2}, CHEN Jun^{1,2}, YU Sheng-Long^{1,2}, CHEN Mei-Ji³, LIN Jia-Qiong⁴, WU Wen⁴

(1.Department of Cardiology, Central Hospital of Panyu District, 2.Cardiovascular Institute of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 3.Department of Pediatrics, Huangpu Division of The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 4.Guangdong General Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences & Department of Endocrinology, East Ward, Guangdong Geriatrics Institute, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Angiotensin(1-7)/Mas receptor axis; ATP-sensitive K^+ channels; High glucose; Human umbilical vein endothelial cells; Cell injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether angiotensin(1-7) [Ang(1-7)]/Mas receptor axis protects human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) against high glucose (HG)-induced injury by modulating ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP} channels). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were exposed to 40 mmol/L glucose to establish a model of HG-induced insults. The expression level of K_{ATP} channel protein was determined by Western blot, CCK-8 assay was used to test the cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium was measured with

[收稿日期] 2017-02-17

[修回日期] 2017-03-16

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2015A030313872);番禺区科技计划项目(2015-Z03-57);番禺区中心医院硕博科研基金项目(2015-S-02);番禺区中心医院青年科研基金项目(2016-Q-01)

[作者简介] 梁伟杰,硕士,主治医师,研究方向为心血管介入和心血管疾病的保护机制,E-mail 为 279096515@qq.com。通讯作者吴文,硕士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为糖尿病心血管疾病的发病和保护机制,E-mail 为 wuwen1964@163.com。

commercial kits, Hoechst33258 staining was used to assess the number of apoptotic cells followed by photofluorography, the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) was measured by 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining followed by photofluorography, mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by Rhodamine123 staining followed by photofluorography, the secretion levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA. **Results** Human umbilical vein endothelial cells were treated with 40 mmol/L glucose for 1~24 h, respectively. After human umbilical vein endothelial cells were exposed to HG for 3 h, the level of K_{ATP} channel protein decreased in a time-dependent manner, reaching the maximum decrease at the 24 h point. Co-treatment of the cells with 20 μ mol/L Ang(1-7) and HG for 24 h ameliorated the down-regulation of K_{ATP} channel protein induced by HG. In addition, co-treatment of the cells with 20 μ mol/L Ang(1-7) and HG or pre-treatment of the cells with 100 μ mol/L pinacidil (a K_{ATP} channel opener) antagonized HG-induced injuries, evidenced by an increase in cell viability, a decrease in the activity of LDH, apoptotic cell number, ROS generation, MMP loss as well as the secretion levels of IL-1 β and TNF- α . Co-treatment with 10 μ mol/L A-779 (an inhibitor of Mas receptor) and HG or pre-treatment or 1 mmol/L glibenclamide (a K_{ATP} channel blocker) attenuated the above protective effects of Ang(1-7). **Conclusion** Ang(1-7)/Mas receptor axis protects human umbilical vein endothelial cells against HG-induced injury by modulating K_{ATP} channels.

高血糖不仅是诊断糖尿病的基本要素,更是导致糖尿病心血管并发症发生的一个重要病理生理机制。高血糖引起的血管内皮功能紊乱是糖尿病血管并发症发生的始动因素,但其发生机制尚未完全明了。ATP 敏感性钾通道(K_{ATP}通道)最早于1983年在心肌细胞中发现^[1];随后的研究表明,骨骼肌、平滑肌、神经元和血管内皮细胞也有K_{ATP}通道的表达。K_{ATP}通道被视为细胞内代谢信号感受器,通过偶联细胞能量代谢和细胞兴奋性,调节机体对外界刺激的适应性。有研究指出,高血糖(简称高糖)可损伤K_{ATP}通道功能从而引起心血管系统的损害,通过改善K_{ATP}通道功能可发挥细胞保护作用^[2-4]。因此,寻找能对抗高糖损伤K_{ATP}通道的保护剂将为防治糖尿病心血管损伤拓宽思路,具有重要的临床意义。

血管紧张素(1-7)[angiotensin(1-7), Ang(1-7)]是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)中具有生物活性的七肽分子。G蛋白偶联的Mas蛋白可调节Ang(1-7)的应答反应,是Ang(1-7)的受体,在血管内皮细胞中有大量的表达^[5-6]。近年来,越来越多的证据表明,Ang(1-7)/Mas受体轴能对抗糖尿病引起的血管内皮组织损伤^[7-9],但其保护机制仍未完全清楚。有研究指出,Ang(1-7)能激活K_{ATP}通道从而改善大鼠末梢神经疼痛症状^[10],提示Ang(1-7)对K_{ATP}通道有调控作用,但Ang(1-7)/Mas受体轴能否通过调控K_{ATP}通道从而保护血管内皮细胞对抗高糖引起的损伤,目前未见报道。为此,本研究通过高糖作用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)模拟糖尿病诱导血管内皮细胞损伤,探讨

K_{ATP}通道在Ang(1-7)/Mas受体轴对抗高糖引起的内皮细胞损伤中的作用,为阐明Ang(1-7)/Mas受体轴的血管保护机制提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

抗K_{ATP}通道蛋白抗体购自Cell Signaling;吡拉地尔(pinacidil, Pin, K_{ATP}通道开放剂)、格列本脲(glibenclamide, Gli, K_{ATP}通道阻断剂)购自Cayman Chemical公司;Ang(1-7)、A-779、Hoechst33258染料、罗丹明123(Rhodamine123, Rh123)、双氯荧光素(2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自Sigma-Aldrich公司;CCK-8购自Dojindo Lab;特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco BRL;DMEM培养基(其葡萄糖浓度为5.5 mmol/L)由Hyclone公司供应;白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒由武汉华美生物工程有限公司提供。HUVEC由中山大学实验动物中心细胞库供应。

1.2 细胞培养

在含5%CO₂的37℃恒温培养箱中采用含10% FBS的DMEM培养基培养HUVEC,当细胞生长至约80%汇合状态时可进行实验。

1.3 实验分组

实验分为11组:(1)对照组:DMEM培养基作用HUVEC 24 h;(2)高糖(high glucose, HG)组:40 mmol/L葡萄糖处理HUVEC 24 h;(3)Pin+HG组:100 μ mol/L Pin预处理HUVEC 30 min,然后予40 mmol/L葡萄糖

作用细胞 24 h; (4) Gli+HG 组: 1 mmol/L Gli 预处理 HUVEC 30 min, 然后予 40 mmol/L 葡萄糖处理细胞 24 h; (5) Ang(1-7)+HG 组: 20 μ mol/L Ang(1-7) 与 40 mmol/L 葡萄糖共处理 HUVEC 24 h; (6) Ang(1-7)+A-779+HG 组: 20 μ mol/L Ang(1-7)、10 μ mol/L A-779 与 40 mmol/L 葡萄糖共处理 HUVEC 24 h; (7) Gli+Ang(1-7)+HG 组: 1 mmol/L Gli 预处理 HUVEC 30 min, 然后予 20 μ mol/L Ang(1-7) 和 40 mmol/L 葡萄糖共处理 HUVEC 24 h; (8) Pin 组: 100 μ mol/L Pin 预处理 HUVEC 30 min, 然后予 DMEM 作用细胞 24 h; (9) Gli 组: 1 mmol/L Gli 预处理 HUVEC 30 min, 然后予 DMEM 处理细胞 24 h; (10) Ang(1-7) 组: 20 μ mol/L Ang(1-7) 处理 HUVEC 24 h; (11) A-779 组: 10 μ mol/L A-779 处理 HUVEC 24 h。

1.4 K_{ATP} 通道蛋白表达水平测定

HUVEC 在 60 mm 培养皿中生长至约 80% 汇合度时, 经不同处理后加入细胞裂解液作用 30 min, 高速离心后取上清液进行蛋白定量 (BCA 法)。等量蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉常温孵育 1 h 后加入一抗稀释液 (包括抗 K_{ATP} 通道蛋白抗体和 GAPDH, 浓度均为 1:1000), 4℃ 作用过夜后加入二抗稀释液 (浓度为 1:3000) 孵育 1.5 h。ECL 法使 PVDF 膜显色, 暗室中曝光到 X 线片上, 凝胶成像扫描系统分析结果。实验重复 5 次。

1.5 LDH 活性和细胞存活率测定

在 96 孔板中种植 HUVEC, 经不同处理后, 一方面, 吸取细胞培养液作为检测标本进行 LDH 活性检测, 按照试剂盒说明书操作, 检测并计算出培养液中 LDH 活性; 另一方面, 在 96 孔板中加入 CCK-8 溶液 10 μ L/孔, 于 37℃ 恒温培养箱内孵育 2.5 h, 酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度值 (A 值)。细胞存活率按照公式计算: 细胞存活率 = 处理组 A 值 / 对照组 A 值 \times 100%。实验重复 5 次。

1.6 细胞凋亡检测

HUVEC 在 24 孔板中生长至约 80% 汇合度时, 按照分组给予不同处理后, 予 4% 多聚甲醛固定 10 min, 加入 Hoechst33258 染料稀释液, 于 37℃ 温箱中作用 30 min, 荧光显微镜下可观察到: 正常的细胞呈弥散均匀的低密度荧光, 凋亡细胞的细胞核呈现浓缩致密的固缩形态或颗粒荧光。随机摄取并记录 5 个高倍镜视野, 应用图像分析软件 (Image J 1.47i) 计算出蓝色荧光强度的平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI), 并对各组数据进行统计分析。实验重复 5 次。

1.7 细胞内活性氧水平测定

HUVEC 在 24 孔板中生长至汇合度约 80% 时, 经不同处理后, 加入 DCFH-DA 染液后于 37℃ 温箱中作用 30 min, 荧光显微镜 (TE-2000 Nikon, 日本) 下随机摄取并记录 5 个高倍镜视野, 应用 Image J 1.47i 计算出绿色荧光的 MFI [其数值大小能间接反映细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的高低], 并对各组数据进行统计分析。实验重复 5 次。

1.8 线粒体膜电位水平测定

HUVEC 在 24 孔板中生长至约 80% 汇合度时, 按照分组给予不同处理后, 加入 Rh123 染液, 于 37℃ 温箱中作用 30 min, 荧光显微镜下随机摄取并记录 5 个高倍镜视野, 应用 Image J 1.47i 软件计算出绿色荧光的 MFI [数值大小可反映线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 水平的高低], 并对各组数据进行统计分析。实验重复 5 次。

1.9 炎症因子分泌水平测定

HUVEC 在 96 孔板中生长至汇合度约 80% 时, 给予不同处理后, 收集培养基作为待测标本, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 测定细胞培养液中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平。实验重复 5 次。

1.10 统计学分析

全部数据经 SPSS19.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析用于多个样本均数间的比较, 有统计学显著性再采用 SNK-q 检验进行均数间的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HG 抑制内皮细胞 K_{ATP} 通道蛋白的表达

为观察 HG 对 HUVEC K_{ATP} 通道蛋白表达的影响, 本研究采用 40 mmol/L 葡萄糖分别作用 HUVEC 1~24 h。自 3 h 起, K_{ATP} 通道蛋白的表达呈时间依赖性减少 (P 均 < 0.05); 在 HG 作用 HUVEC 24 h 时, K_{ATP} 蛋白表达减少最明显 (图 1)。

2.2 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的内皮细胞 K_{ATP} 通道蛋白表达减少

20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h, K_{ATP} 通道蛋白的表达水平明显上升 ($P < 0.01$; 图 2); 10 μ mol/L A-779、20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理细胞 24 h 能减轻 Ang(1-7) 对 K_{ATP} 通道蛋白表达的上调作用 ($P < 0.01$); Ang(1-7) 和 A-779 本身对 HUVEC K_{ATP} 通道蛋白的基础表达无明显影响 (图 2)。

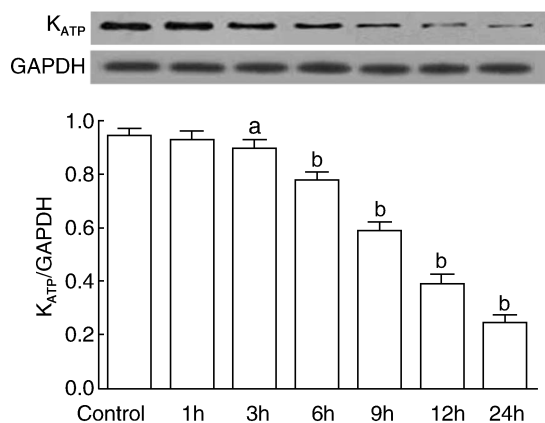


图 1. HG 抑制 HUVEC K_{ATP} 通道蛋白的表达 ($n=5$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较。

Figure 1. High glucose (HG) inhibited the expression of K_{ATP} channel protein in human umbilical vein endothelial cells ($n=5$)

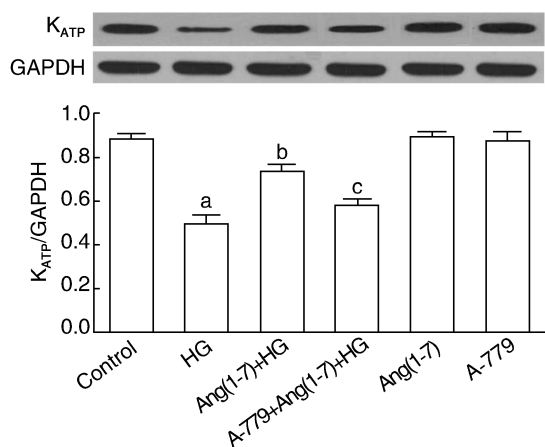


图 2. Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗高糖引起的 HUVEC K_{ATP} 通道蛋白表达下调 ($n=5$)

a 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 HG 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 2. Ang(1-7)/Mas receptor axis attenuated HG-induced down-regulation of K_{ATP} channel protein in HUVEC ($n=5$)

2.3 K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的细胞毒性作用

HG 作用 HUVEC 24 h 可引起明显的细胞毒性, 使细胞存活率降低, 培养液中 LDH 活性增加; 20 $\mu\text{mol/L}$ Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 可使细胞存活率升高, LDH 活性减少 (P 均 <0.01); 100 $\mu\text{mol/L}$ Pin 预处理 HUVEC 30 min 也能抑制 HG 引起的细胞毒性, 升高细胞存活率, 降低 LDH 活性 (P 均 <0.01); 10 $\mu\text{mol/L}$ A-779、20 $\mu\text{mol/L}$ Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 或先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 再予

Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 均能明显减轻 Ang(1-7) 的抗细胞毒性作用, 使细胞存活率降低、LDH 活性升高 (P 均 <0.01); 1 mmol/L Gli 预处理 30 min 再予 HG 作用 HUVEC 24 h 没有加重 HG 的细胞毒性 ($P>0.05$); Ang(1-7)、A-779、Pin、Gli 本身对细胞存活率和 LDH 活性无明显影响 (图 3)。

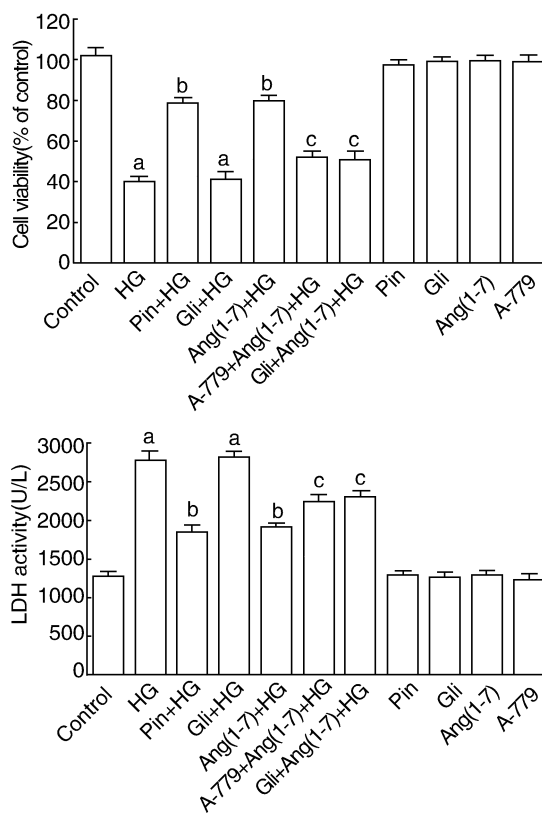


图 3. K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC 细胞毒性作用 ($n=5$)

a 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 HG 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 3. K_{ATP} channel mediated the inhibitory effect of Ang(1-7)/Mas receptor axis on HG-induced cytotoxicity in HUVEC ($n=5$)

2.4 K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的细胞凋亡

HG 可引起明显的细胞凋亡, 荧光显微镜下可见凋亡细胞数量明显增加 ($P<0.01$); 20 $\mu\text{mol/L}$ Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 可使凋亡细胞数量明显减少 ($P<0.01$); 与 Ang(1-7) 的作用相类似, 在 HG 作用前, 予 100 $\mu\text{mol/L}$ Pin 预处理 HUVEC 30 min 也可使凋亡细胞数量减少 ($P<0.01$); 10 $\mu\text{mol/L}$ A-779、20 $\mu\text{mol/L}$ Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 或先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 再予 20 $\mu\text{mol/L}$ Ang(1-7) 和 HG 共处

理内皮细胞 24 h 均能拮抗 Ang(1-7)的抗细胞凋亡效应,使凋亡细胞数量有所增多(P 均 <0.01);在 HG 作用前,先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞

30 min 没有加重 HG 的致细胞凋亡作用($P>0.05$); Ang(1-7)、A-799、Pin、Gli 本身对细胞凋亡无明显影响(图 4)。

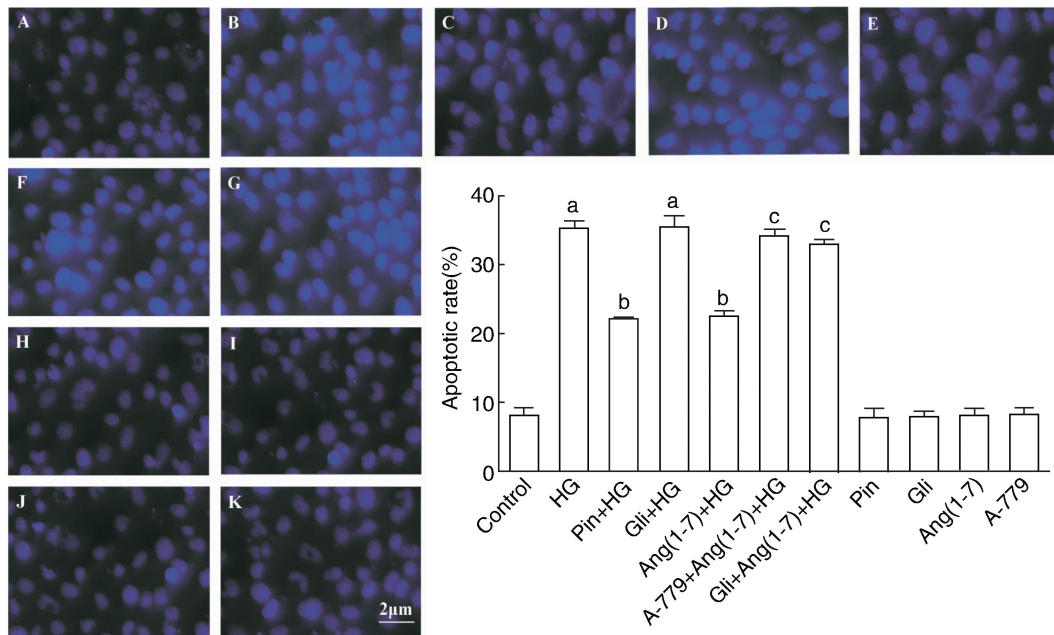


图 4. K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC 凋亡作用($n=5$) A 为 Control 组, B 为 HG 组, C 为 Pin+HG 组, D 为 Gli+HG 组, E 为 Ang(1-7)+HG 组, F 为 A-779+Ang(1-7)+HG 组, G 为 Gli+Ang(1-7)+HG 组, H 为 Pin 组, I 为 Gli 组, J 为 Ang(1-7) 组, K 为 A-779 组。a 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 HG 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 4. K_{ATP} channel mediated the inhibitory effect of Ang(1-7)/Mas receptor axis on HG-induced apoptosis in HUVEC ($n=5$)

2.5 K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的细胞内 ROS 过度生成

HG 作用 HUVEC 24 h 可使细胞内 ROS 生成明显增多($P<0.01$); 20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理细胞 24 h 或在 HG 作用前先予 100 μ mol/L Pin 预处理 HUVEC 30 min 均可使 ROS 生成明显降低(P 均 <0.01); 10 μ mol/L A-779、20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 或先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 再予 Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 能减弱 Ang(1-7) 的抗氧化作用, MFI 分别升高(P 均 <0.01); 在 HG 作用前, 先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min, ROS 生成没有进一步增多($P>0.05$); Ang(1-7)、A-799、Pin、Gli 本身对内皮细胞基础 ROS 生成无明显影响(图 5)。

2.6 K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 MMP 丢失

HG 作用 HUVEC 24 h 可明显损伤细胞内线粒体功能, MFI 明显降低($P<0.01$); 20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理细胞 24 h 或在 HG 作用前先予 100 μ mol/L

Pin 预处理 HUVEC 30 min 均可使 MFI 明显升高(P 均 <0.01); 10 μ mol/L A-779、20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 或先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 再予 Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 能减弱 Ang(1-7) 的线粒体保护作用, MFI 明显降低(P 均 <0.01); 在 HG 作用前, 先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 没有加重 HG 致 MMP 丢失作用($P>0.05$); Ang(1-7)、A-799、Pin、Gli 本身对内皮细胞 MMP 水平无明显影响(图 6)。

2.7 K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的炎症因子分泌增加

HG 作用 HUVEC 24 h, 细胞培养液中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平明显上升(P 均 <0.01); 20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理细胞 24 h 或在 HG 作用前先予 100 μ mol/L Pin 预处理 HUVEC 30 min 均可使 IL-1 β 和 TNF- α 的水平明显降低(P 均 <0.01); 10 μ mol/L A-779、20 μ mol/L Ang(1-7) 和 HG 共处理内皮细胞 24 h 或先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 再予 Ang(1-7) 和 HG 共处理内

皮细胞 24 h 能减弱 Ang(1-7) 的抗炎作用,IL-1 β 和 TNF- α 的水平升高(P 均 <0.01);在 HG 作用前,先予 1 mmol/L Gli 预处理内皮细胞 30 min 没有加重 HG 促进炎症因子分泌的作用($P>0.05$);Ang(1-7)、A-799、Pin、Gli 本身对内皮细胞炎症因子的分泌无明显影响(图 7)。

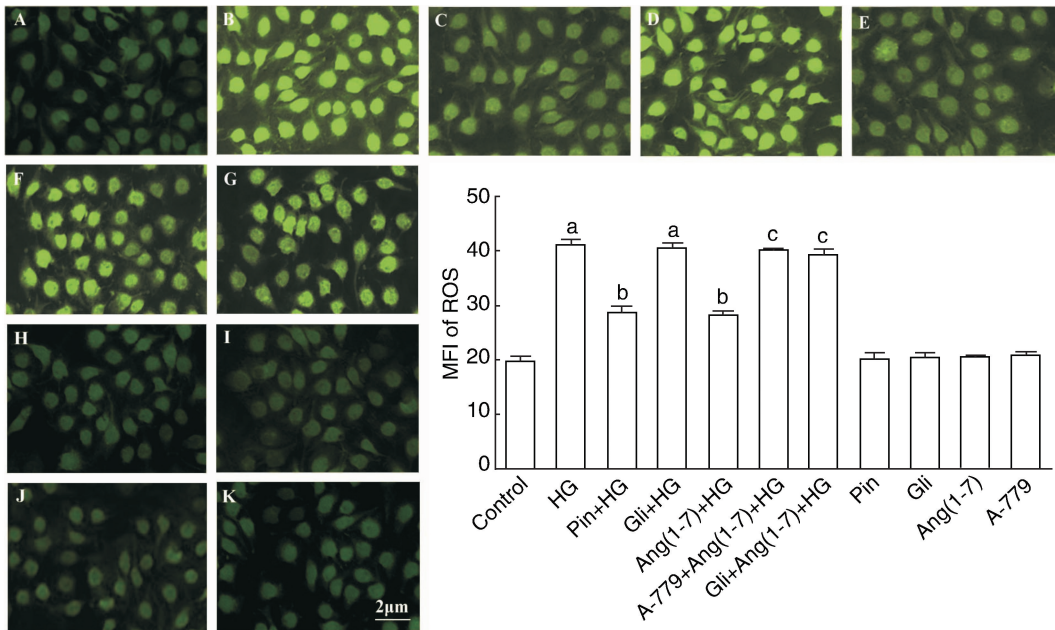


图 5. K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC ROS 过度生成($n=5$) A 为 Control 组,B 为 HG 组,C 为 Pin+HG 组,D 为 Gli+HG 组,E 为 Ang(1-7)+HG 组,F 为 A-799+Ang(1-7)+HG 组,G 为 Gli+Ang(1-7)+HG 组,H 为 Pin 组,I 为 Gli 组,J 为 Ang(1-7)组,K 为 A-799 组。a 为 $P<0.01$,与 Control 组比较;b 为 $P<0.01$,与 HG 组比较;c 为 $P<0.01$,与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 5. K_{ATP} channel mediated the inhibitory effect of Ang(1-7)/Mas receptor axis on HG-induced ROS overproduction in HUVEC($n=5$)

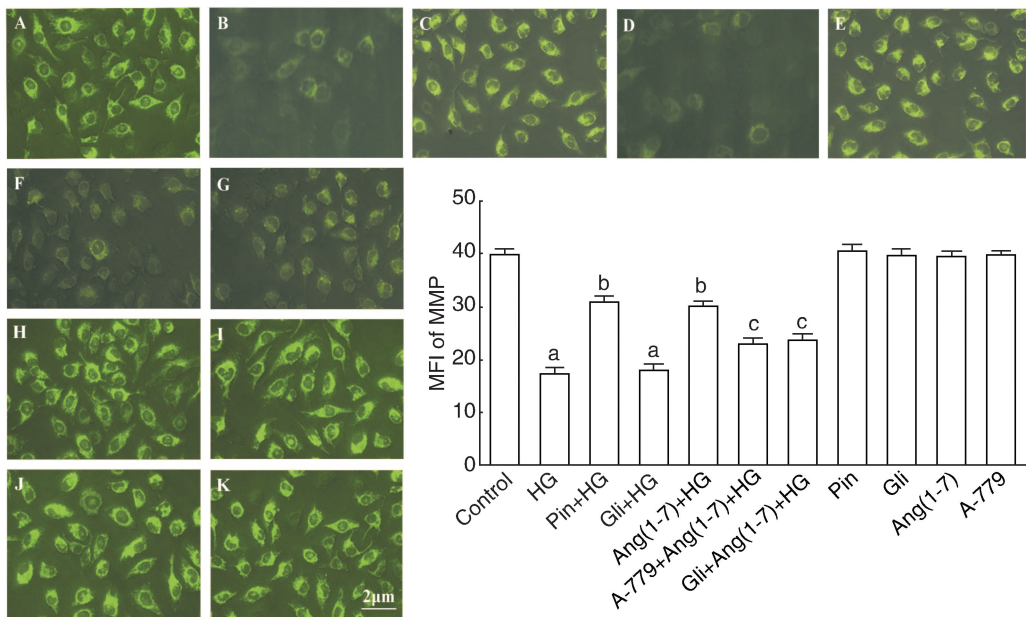


图 6. K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC MMP 丢失($n=5$) A 为 Control 组,B 为 HG 组,C 为 Pin+HG 组,D 为 Gli+HG 组,E 为 Ang(1-7)+HG 组,F 为 A-799+Ang(1-7)+HG 组,G 为 Gli+Ang(1-7)+HG 组,H 为 Pin 组,I 为 Gli 组,J 为 Ang(1-7)组,K 为 A-799 组。a 为 $P<0.01$,与 Control 组比较;b 为 $P<0.01$,与 HG 组比较;c 为 $P<0.01$,与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 6. K_{ATP} channel mediated the inhibitory effect of Ang(1-7)/Mas receptor axis on HG-induced dissipation of MMP in HUVEC($n=5$)

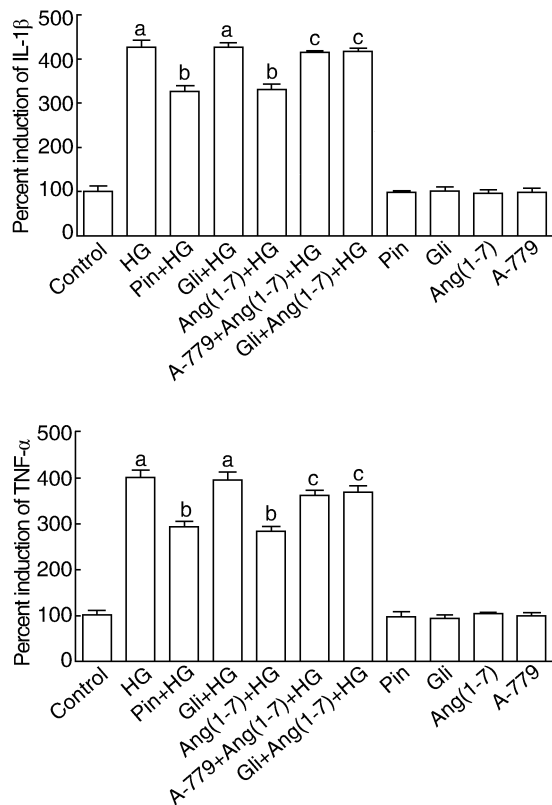


图 7. K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC 炎症因子分泌 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 HG 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 Ang(1-7)+HG 组比较。

Figure 7. K_{ATP} channel mediated the inhibitory effect of Ang(1-7)/Mas receptor axis on HG-induced secretion of inflammatory cytokines in HUVEC ($n=5$)

3 讨论

K_{ATP} 通道是重要的细胞代谢感受器, 开放 K_{ATP} 通道能发挥心血管保护作用已得到了广泛的认可^[4,11-12]。有研究报道, 高血糖可损伤 K_{ATP} 通道从而损伤心肌^[13-14] 和血管^[2-4] 功能, 而开放 K_{ATP} 通道能对抗 HG 引起的心肌细胞损伤^[13-15]。本研究, HG 可抑制 HUVEC K_{ATP} 通道蛋白的表达; 应用 K_{ATP} 通道开放剂能减轻 HG 引起的多种损伤, 包括细胞毒性、致凋亡作用、氧化应激、线粒体损伤和炎症反应, 提示: (1) HG 可通过损伤 K_{ATP} 通道 (包括通道的表达和活性) 继而引起血管内皮的一系列损伤, 这从细胞和分子学水平进一步深化了之前的研究结论^[2-4]; (2) 开放 K_{ATP} 通道具有抗细胞毒性、抗凋亡、抗氧化、保护线粒体功能、抗炎症等细胞保护作用, 这与我们最近在 HG 损伤 H9c2 心肌细胞模型中的研究结论^[13-15] 是相一致的。值得注意的是, 在 HG

作用前, 应用 K_{ATP} 通道阻断剂 Gli 预处理 HUVEC 并没有加重 HG 对细胞的损伤作用, 推测出现这一结果可能的原因是 HG 对 K_{ATP} 通道的损伤非常严重, K_{ATP} 通道的功能已很大程度地丧失, 从而导致药物阻断 K_{ATP} 通道产生的损伤作用和单纯 HG 的损伤作用相比, 作用相对不明显。要深入探讨这一问题, 需进一步利用特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 沉默 K_{ATP} 通道基因的表达后观察 HG 引起内皮细胞损伤的变化。

Ang(1-7) 是 RAS 系统中一种具有重要生物学活性的代谢产物, 可由血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 水解血管紧张素 I 或血管紧张素 II 生成。血管内皮组织不仅是生成和代谢内源性 Ang(1-7) 的重要部位, 也是 Ang(1-7) 作用的主要靶组织之一。近年的研究表明, Ang(1-7)/Mas 受体轴能保护血管内皮组织对抗糖尿病引起的损伤。Zhang 等^[7] 报道, 激活内源性 Ang(1-7)/Mas 受体轴可通过增加一氧化氮的生物利用度和抑制氧化应激反应, 从而保护糖尿病大鼠的内皮功能。Benter 等^[8] 指出, 给予外源性 Ang(1-7) 或 Ang(1-7) 类似物 AVE-0991 能对抗糖尿病诱导的心血管功能障碍。此外, Akhtar 等^[9] 证实, Ang(1-7)/Mas 受体轴通过抑制 HG 诱导的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 反式激活保护血管平滑肌细胞。但是, Ang(1-7) 的心血管保护机制目前仍未完全清楚。有研究指出, Ang(1-7) 能通过开放 K_{ATP} 通道从而减轻大鼠末梢神经疼痛症状, 应用 K_{ATP} 通道阻断剂 Gli 可拮抗 Ang(1-7) 的这一作用^[10]。为此, 我们推测, Ang(1-7)/Mas 受体轴的血管内皮保护作用也可能与调控 K_{ATP} 通道有关。为了验证我们的假设, 我们首先观察了 Ang(1-7) 对 HG 下调 K_{ATP} 通道蛋白表达的影响。结果表明, Ang(1-7) 能明显减轻 HG 对 K_{ATP} 通道蛋白表达的抑制作用。此外, 与 K_{ATP} 通道开放剂 Pin 的作用相类似, Ang(1-7) 可对抗 HG 引起的多种损伤, 使细胞存活率升高, LDH 活性降低, 凋亡细胞数量、ROS 生成、MMP 丢失和炎症因子分泌均减少。应用 Mas 受体拮抗剂 A-779 或 K_{ATP} 通道阻断剂 Gli 均能拮抗 Ang(1-7) 的上述内皮细胞保护作用。上述结果清晰地表明, K_{ATP} 通道介导 Ang(1-7)/Mas 受体轴对抗 HG 引起的 HUVEC 损伤作用。

综上所述, 本研究在 HG 损伤 HUVEC 的细胞模型中首次证实 Ang(1-7)/Mas 受体轴可通过调控 K_{ATP} 通道对抗 HG 引起的损伤, 这可能是 Ang(1-7)/Mas 受体轴发挥心血管保护作用的重要作用机制。

之一。

[参考文献]

- [1] Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle[J]. *Nature*, 1983, 305(5930): 147-148.
- [2] Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR Jr, et al. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles; reduced activity of ATP-sensitive potassium channels[J]. *Circ Res*, 2003, 92(2): 151-158.
- [3] Kinoshita H, Azma T, Iranami H, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists restore impaired vasorelaxation via ATP-sensitive K⁺ channels by high glucose[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 312-318.
- [4] Kawano T, Tanaka K, Mawatari K, et al. Hyperglycemia impairs isoflurane-induced adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activation in vascular smooth muscle cells[J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(3): 858-864.
- [5] Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8 258-263.
- [6] Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways[J]. *Hypertension*, 2007, 49(1): 185-192.
- [7] Zhang Y, Liu J, Luo JY, et al. Upregulation of angiotensin (1-7)-mediated signaling preserves endothelial function through reducing oxidative stress in diabetes[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(11): 880-892.
- [8] Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, et al. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(1): H 666-672.
- [9] Akhtar S, Chandrasekhar B, Attur S, et al. Transactivation of ErbB family of receptor tyrosine kinases is inhibited by angiotensin-(1-7) via its Mas receptor[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141657.
- [10] Costa A, Galdino G, Romero T, et al. Ang(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 37: 11-16.
- [11] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 670-678.
- [12] Minami K, Miki T, Kadowaki T, et al. Roles of ATP-sensitive K⁺ channels as metabolic sensors: studies of Kir6.x null mice[J]. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 3): S176-S180.
- [13] Liang W, Chen J, Mo L, et al. ATP-sensitive K⁺ channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 763-772.
- [14] 梁伟杰, 陈景福, 宋明才, 等. 活性氧与 ATP 敏感性钾通道的相互作用参与高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1 081-088.
- [15] 梁伟杰, 陈美姬, 何洁仪, 等. ATP 敏感性钾通道的开放通过抑制 TLR4/NF-κB 通路对抗高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1 153-160.

(此文编辑 文玉珊)