

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0214-03

葡萄糖对人血管内皮细胞多元醇通路的 激活作用及其机理

王双喜, 文格波, 曹仁贤, 刘江华

(南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 葡萄糖; 内皮, 血管; 多元醇通路; 醛糖还原酶; 一氧化氮

[摘要] 观察葡萄糖对人血管内皮细胞多元醇通路的影响, 并探讨其作用机理。体外培养人脐静脉内皮细胞, 加不同浓度葡萄糖或作用不同时间, 采用高效液相色谱仪、硝酸还原酶法、生物化学检测及逆转录聚合酶链反应等方法测定内皮细胞山梨醇、一氧化氮、醛糖还原酶活性及醛糖还原酶基因 mRNA。结果发现, 经高浓度葡萄糖处理的人脐静脉内皮细胞山梨醇浓度明显高于对照组 ($P < 0.05$), 一氧化氮浓度明显低于对照组 ($P < 0.05$)。醛糖还原酶基因 mRNA 水平及其活性均呈浓度及时间依赖性, 但是内皮细胞经 22 mmol/L 葡萄糖作用 48 h 或 44 mmol/L 葡萄糖作用 24 h 后, 醛糖还原酶基因 mRNA 水平及其活性均不再升高, 而呈下降趋势 ($P < 0.05$)。结果提示, 高浓度葡萄糖能引起内皮细胞功能改变, 其机制可能是高浓度葡萄糖能增强醛糖还原酶基因的转录并提高其活性, 从而活化多元醇通路。

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

Activation of Polyol Pathway and Its Mechanisms Induced by Glucose in Human Vascular Endothelial Cells

WANG Shuang-Xi, WEN Ge-Bo, CAO Ren-Xian, and LIU Jiang-Hua

(The First Affiliated Hospital, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[MeSH] Glucose; Endothelium, Vascular; Polyol Pathway; Aldehyde Reductase; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of glucose on the polyol pathway in human vascular endothelial cells and to investigate its potential mechanisms. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured in vitro with glucose at different concentrations or for different cultural time. The level of nitric oxide (NO) and sorbitol, aldose reductase (AR) AR activity and the expression of AR mRNA level were detected with high performance liquid chromatography (HPLC), nitrate reductase method, biochemical assay and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The levels of sorbitol in high glucose groups were higher than in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but the levels of NO in high glucose groups were lower than in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Both AR mRNA expression and its activity were dependent on glucose concentrations or cultural times ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). AR mRNA expression and its activity with glucose at 22 mmol/L for 48 h or at 44 mmol/L for 24 h did not increase accordingly, but began to decrease ($P < 0.05$). **Conclusion** Glucose can affect the function of endothelial cells such as the increasing production of sorbitol and the decreasing synthesis of NO. The mechanisms may be that glucose can upregulate AR gene expression and enhance its activity, then activates the polyol pathway in endothelial cells.

高血糖是一种已公认的糖尿病血管并发症的危险因素, 而糖尿病血管并发症又是糖尿病患者致死致残的主要原因。临床研究表明, 严格地控制血糖能明显减少或延缓糖尿病血管并发症的发生及发展^[1]。血管内皮细胞损伤是糖尿病血管并发症发生的前提, 越来越多的研究证实高血糖可引起血管内皮损伤和内皮功能障碍, 从而诱发糖尿病血管并

症。研究早就证实了多元醇通路的激活参与糖尿病慢性并发症如糖尿病神经病变、糖尿病肾病等的发生发展^[2]。作为糖尿病慢性并发症的一种, 多元醇通路是否参与糖尿病大血管并发症的发生发展, 已引起人们注意。本文以体外培养的人脐静脉内皮细胞为受试对象, 研究葡萄糖作用于人血管内皮细胞后引起的内皮细胞的功能改变, 以探讨糖尿病大血管并发症可能的发病机理。

[收稿日期] 2001-12-25 [修回日期] 2002-04-28

[基金项目] 湖南省教委、卫生厅科研基金(97B103)资助。

[作者简介] 王双喜, 男, 1975年8月出生, 湖北浠水人, 硕士研究生。文格波, 男, 1957年出生, 内分泌学教授, 南华大学副校长, 南华大学附属第一医院临床医学研究所所长, 本文的通讯作者, 主要从事糖尿病血管并发症发病机理的研究。曹仁贤, 男, 1964年出生, 内分泌学教授, 现任南华大学附属第一医院大内科主任。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞的培养及分组

常规应用 0.25% 胰酶消化人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 在含 10% 胎牛血清的 M199 中培养^[3]。倒置相差显微镜下内皮细胞呈铺路卵石样, 经鉴定 (1) 因子抗原阳性。将第 2~3 代细胞随机分成对照组及实验组, 对照组用含 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基培养, 实验组分为 11 mmol/L、22 mmol/L 及 44 mmol/L 葡萄糖组以及 22 mmol/L 葡萄糖+10 μ mol/L 醛糖还原酶抑制剂 (aldose reductase inhibitor, ARI) 组, 其中 22 mmol/L 葡萄糖组又分为 0 h、12 h、24 h 及 48 h 组。

2.2 山梨醇浓度的测定

收集细胞, 破碎细胞后取上清液, 上清液中加入 10.0 nmol 半乳糖作内标, 冷冻干燥, 加入 250 μ L 吡啶和 100 μ L 异氢酸苯酯, 50 $^{\circ}$ C 水浴, 冷却后加入 100 μ L 甲醇, 50 $^{\circ}$ C 水浴, 离心移上清。用吡啶定容至 500 μ L, 取 10 μ L 测定山梨醇含量。山梨醇采用 Waters 高效液相色谱系统检测。

2.3 一氧化氮的测定

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 采用硝酸还原酶法测定 NO, 按试剂盒说明书步骤操作。

2.4 醛糖还原酶活性测定

采用 Ohtaka 等报道的方法测定醛糖还原酶 (aldose reductase, AR) 活性。收集细胞, 破碎细胞后取上清液, 加入 LiSO_4 0.1 mol/L、DL-甘油醛 0.1 mmol/L 及 NADPH 0.03 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后加入 0.5 mmol/L HCl 0.3 mL 终止反应, 再加入 6 mmol/L NaOH (含 10 mmol/L 咪唑) 溶液 1 mL。用分光光度计测 360 nm 处 NADPH 的吸收量, NADPH 的下降程度表示 AR 活性。

2.5 逆转录聚合酶链反应

收集细胞, 用 Trizol 试剂 (Gibco 公司产品) 按试剂盒操作步骤提取细胞总 RNA。取 1 μ L 细胞总 RNA, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后反转录合成 cDNA, 72 $^{\circ}$ C 终止反应, 取 2 μ L 反转录产物 AR, 上游引物序列为 5'-AGAAGCTCAGGGAGCAGGT-3', 下游引物序列为 5'-GGTCACCACGATGCCTTTG-3', 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增产物长度为 443 bp。 β -actin 上游引物序列为 5'-TCGAATTCTG-GAGAAGAGCTATGAGCTGCCG-3', 下游引物序列为 5'-TCGGATCCGTGCCACCAGACAGCACTGTGTG-3' (以上引物均由上海生工生物工程公司合成), 95 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, β -actin 扩增产物长度为 201 bp。将扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色后于 GDS-7600 (UVP) 凝

胶分析系统扫描, 计算 AR 与 β -actin 的灰度比值, 以其比值代表 AR mRNA 的相对量。

1.6 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 葡萄糖对多元醇通路的影响

人脐静脉内皮细胞经 11 mmol/L 及 22 mmol/L 葡萄糖培养 24 h 后, 山梨醇浓度明显增加 (表 1, Table 1)。

2.2 葡萄糖对一氧化氮合成的影响

人脐静脉内皮细胞经 11 mmol/L 及 22 mmol/L 葡萄糖培养 24 h 后, NO 的合成显著减少 (表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度葡萄糖对人脐静脉内皮细胞合成山梨醇和一氧化氮的影响。

Table 1. Effects of glucose with different concentrations on the synthesis of sorbitol and NO in HUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	Sorbitol (nmol/10 ⁵ cells)	NO (μ mol/L)
5.5 mmol/L Glucose	0.3 \pm 0.1	25.7 \pm 0.13
11 mmol/L Glucose	0.8 \pm 0.2 ^a	11.6 \pm 0.58 ^a
22 mmol/L Glucose	1.5 \pm 0.3 ^b	5.6 \pm 0.34 ^b
22 mmol/L Glucose+ ARI	0.5 \pm 0.3	27.6 \pm 0.16

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with 5.5 mmol/L Glucose group.

2.3 葡萄糖对醛糖还原酶基因表达的影响

随着葡萄糖浓度的升高, AR mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 但 44 mmol/L 葡萄糖组 AR mRNA 的表达比 22 mmol/L 葡萄糖组明显减少 ($P < 0.05$)。22 mmol/L 葡萄糖分别作用 0 h、12 h 及 24 h 后, 随着时间的延长, AR mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 但 22 mmol/L 葡萄糖作用 48 h 组中, AR mRNA 的表达比 24 h 组明显减少 ($P < 0.05$), 见表 2 和 3 (Table 2 and 3)。

2.4 葡萄糖对醛糖还原酶活性的影响

随着葡萄糖浓度的升高, AR 活性逐步增强 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 但葡萄糖浓度达 44 mmol/L 以上时, AR 活性反而降低 ($P < 0.05$)。22 mmol/L 葡萄糖分别作用 0 h、12 h 及 24 h 后, 随着时间的延长, AR 活性增强 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 但作用 48 h 组 AR 活性比作用 24 h 组明显减少 ($P < 0.05$), 见表 2 和 3 (Table 2 and 3)。

表 2. 不同浓度葡萄糖对醛糖还原酶 mRNA 的表达及其活性的影响.

Table 2. Effects of glucose with different concentrations on the expression of AR mRNA and AR activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$).

Groups	The ratio of AR to β -actin	AR activity (pmol/10 ⁵ cells)
5.5 mmol/L Glucose	0.82 \pm 0.11	22.3 \pm 0.19
11 mmol/L Glucose	1.07 \pm 0.35 ^a	29.5 \pm 0.24 ^a
22 mmol/L Glucose	1.81 \pm 0.27 ^b	38.5 \pm 0.34 ^b
44 mmol/L Glucose	1.34 \pm 0.29 ^{ac}	34.5 \pm 0.21 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with 5.5 mmol/L Glucose group; c: $P < 0.05$, compared with 22 mmol/L Glucose group.

表 3. 22 mmol/L 葡萄糖作用不同时间对醛糖还原酶 mRNA 的表达及其活性的影响.

Table 3. Effects of 22 mmol/L glucose with different cultural time on the expression of AR mRNA and AR activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$).

Groups	The ratio of AR to β -actin	AR activity (pmol/10 ⁵ cells)
0 h	0.78 \pm 0.12	17.8 \pm 0.17
12 h	1.37 \pm 0.23 ^a	30.5 \pm 0.38 ^a
24 h	1.81 \pm 0.27 ^b	38.5 \pm 0.34 ^b
48 h	1.57 \pm 0.31 ^{ac}	32.3 \pm 0.26 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with 0 h group; c: $P < 0.05$, compared with 24 h group.

3 讨论

糖尿病患者发生血管病变的危险性极高,包括大血管病变及微血管病变。已经有多种理论解释其发生机理,如糖基化终末产物的形成^[4]、细胞凋亡^[5]及血管舒缩功能失调等。高血糖激活 AR,引起多元醇通路亢进,进而引起糖代谢异常,导致细胞内山梨醇产生增加,从而使细胞内渗透性水肿、NO 产生减少和 myo 肌醇的耗竭。

山梨醇是多元醇通路的特异性产物,其水平高低可反映多元醇通路的代谢情况。本研究发现,在高浓度葡萄糖环境下,内皮细胞多元醇通路代谢亢进,且其合成 NO 减少,与 Wu 等^[6]研究结果一致。AR 被认为是以 NADPH 为辅酶的还原酶,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)也是以 NADPH 为辅酶的还原酶,呈相互竞争性抑制,AR 的激活造成 NADPH 大量消耗, NOS 活性低下,造成 NO 合成减

少。NO 减少可导致血管舒缩功能失调,说明多元醇通路活化引起的细胞内渗透性水肿、内皮细胞合成 NO 减少可能参与了糖尿病大血管病变的发生和发展。

本实验发现高浓度葡萄糖使内皮细胞 AR mRNA 的表达以及 AR 活性增强,提示高浓度葡萄糖对多元醇通路的激活可能是通过增强 AR 的基因转录及增加 AR 的活性。糖尿病患者体内呈慢性高血糖且有时达到较高浓度如酮症酸中毒及高渗性昏迷,故本实验选取不同浓度及不同时间点进行研究,结果发现高浓度葡萄糖(44 mmol/L)和作用更长时间(如 48 h)后,AR mRNA 的表达减少以及 AR 的活性受抑。这可能有两方面的原因,一是高浓度葡萄糖引起多元醇通路亢进后的山梨醇负反馈抑制作用,二是高浓度葡萄糖对内皮细胞的毒性作用,如持续高浓度葡萄糖可使细胞死亡加速、复制减少、DNA 损伤。当然我们未在 AR 蛋白水平进行测定,但已有报道称糖基化终末产物可引起人微血管内皮细胞 AR 蛋白合成增加^[7],因此推测高浓度葡萄糖可能引起内皮细胞 AR 蛋白合成增加,提示高浓度葡萄糖对多元醇通路的激活作用可能在基因转录水平、蛋白水平及功能水平都可进行调节。另外,本实验是以体外培养的 HUVEC 为研究对象,至于在糖尿病患者体内葡萄糖能否诱导人血管内皮细胞 AR 基因表达增加及其活性增强,尚须进一步研究。

[参考文献]

- [1] K Prospective Diabetes Study(UKPADS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPADS33). *Lancet*, 1998, **352**: 837-853
- [2] Dunlop M. Aldose reductase and the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2000, **58** (Suppl 77): 3-12
- [3] 王立岩, 冬晓红, 宫桂兰, 等. 人脐静脉内皮细胞的体外培养、鉴定及形态观察. *白求恩医科大学学报*, 2000, **26** (1): 26-28
- [4] Kilhovd BK, Herg TJ, Birkeland KI, et al. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*, 1999, **22** (9): 1543-548
- [5] Du XL, Sui GZ, Stock Klausner-Farber K, et al. Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia*, 1998, **41**: 249-256
- [6] Wu G, Meininger CJ. Impaired arginine metabolism and NO synthase in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol*, 1995, **269**: H1312-318
- [7] Nakamura N, Ohayashi h, Fujii M, et al. Induction of aldose reductase in cultured human microvascular endothelial cells by advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med*, 2000, **29** (1): 17-25

(此文编辑 文玉珊)