

过氧化物酶体增殖物受体 γ 对血管内皮细胞活性氧生成的影响及机制

王兆君, 张宝和[△] (中国人民解放军海军总医院干部保健科, 北京 100048)

【摘要】 目的 分析过氧化物酶体增殖物受体 γ (PPAR γ) 在高糖介导血管内皮细胞活性氧 (ROS) 生成中的影响与机制。**方法** 采用 33.0 mmol/L D-葡萄糖 (高糖) 进行介导的人脐静脉内皮细胞作为高糖介导组, 采用二甲基亚砷处理的人脐静脉内皮细胞作为对照组。分别采用 3 种 PPAR γ 激动剂吡格列酮、GW9662、京尼平作用于高糖介导组。采用一氧化氮与超氧阴离子荧光探针判定 3 种药物对血管内皮细胞一氧化氮与 ROS 的影响, 采用蛋白免疫印迹法评估解耦联蛋白 2 表达水平。**结果** 高糖介导组 ROS 与一氧化氮表达水平与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 种药物中, 吡格列酮对血管内皮细胞 ROS、一氧化氮与解耦联蛋白 2 的作用最强 ($P < 0.05$)。**结论** PPAR γ 能够明显缓解高糖介导下血管内皮细胞 ROS 生成, 主要通过上调解耦联蛋白 2 发挥作用。

【关键词】 血管内皮细胞; 活性氧; 过氧化物酶体增殖物受体 γ ; 高糖介导

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3643-02

Effect and mechanism of PPAR γ on the generation of ROS in vascular endothelial cells WANG Zhao-jun, ZHANG Bao-he[△] (Department of Cadre Health, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of PPAR γ on the generation of reactive oxygen species (ROS) in vascular endothelial cells induced by high concentration glucose. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells cultured with 33.0 mmol/L D-glucose (high concentration glucose) were set as high concentration glucose induced group, which treated by DMSO were set as control group. High concentration glucose induced group was treated by 3 kinds of PPAR γ agonists, including pioglitazone, GW9662 and genipin. Effects of 3 kinds of drugs on NO and ROS in vascular endothelial cells were assessed by using the fluorescent probes of NO and superoxide anion. The expression level of uncoupling protein 2 was determined by Western blot. **Results** There were significant differences of the levels of NO and ROS between high concentration glucose induced group and control group induced by DMSO ($P < 0.05$). Among 3 kinds of drugs, pioglitazone had the strongest effects on the levels of ROS, NO and uncoupling protein 2 ($P < 0.05$). **Conclusion** PPAR γ can significantly alleviate the generation of ROS in vascular endothelial cells induced by high concentration glucose, which plays a role mainly through the up-regulation of uncoupling protein 2.

【Key words】 vascular endothelial cell; reactive oxygen species; PPAR γ ; high concentration glucose induced

糖尿病是影响人类健康的常见疾病, 也是诱发心脑血管病变的主要风险因素, 长期血糖异常极易发生心力衰竭、脑卒中、脑梗死等并发症, 致患者生命健康受到更严重的影响^[1]。血管内皮损伤是心血管疾病发生的早期特征, 高糖状态所形成的糖基化终末产物、线粒体功能障碍等情况均会严重损伤血管内皮细胞, 而氧化应激是多种潜在风险损害过程的共同环节^[2]。既往报道多认为, 过氧化物酶体增殖物受体 γ (PPAR γ) 能够发挥良好的代谢保护作用, 也可通过抗氧化应激缓解心脑血管功能障碍, 但 PPAR γ 对血管内皮细胞活性氧 (ROS) 的影响情况及主要机制尚缺乏准确定论^[3]。本研究通过建立内皮细胞损伤模型, 分析 PPAR γ 在高糖介导血管内皮细胞 ROS 中的影响情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 采用上海汉博生物科技有限公司提供的人脐静脉内皮细胞株。仪器: 三洋二氧化碳培养箱, 美国 Bio-Rad 电泳仪与凝胶成像系统, 瑞士 Kinematica 匀浆机, 美国 Millipore 去离子水过滤器, 上海光学仪器厂荧光显微镜, 美国 Beckman pH 剂与核酸蛋白分析仪。材料: Gibco 胎牛血清、

Sigma 4,5-二氨基乙酰乙酸荧光素、二氢乙啶、抗菌药物、上海通派生物科技有限公司提供的抗 GAPDH 抗体与抗解耦联蛋白 2 抗体、GIBCO DMEM 培养基。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用低糖 DMEM 培养基装置人脐静脉内皮细胞株, 加入 1% 抗菌药物与 10% 胎牛血清, 混合均匀后置入 5% CO₂ 与 37 °C 环境中培养。采用同体积二甲基亚砷处理后为对照组; 采用 33.0 mmol/L D-葡萄糖培养后作为高糖介导组。分别在高糖介导培养中滴入 10 μ mol/L 吡格列酮、5 μ mol/L GW9662 与 10 μ mol/L 吡格列酮、10 μ mol/L 京尼平与 10 μ mol/L 吡格列酮, 培养时间为 1 d。采用 6 孔板装置培养细胞, 各组培养均反复开展 3 次以上。

1.2.2 DHE 染色 采用 DHE 染料与二甲基亚砷配置 0.01 mol/L 储备液, 并给予低温避光储存。将 40 nmol/L 的染色液加入至处理的血管内皮细胞中, 置于 37 °C 环境中培养 30 min。采用 NaCl、KCL、NaHCO₃、MgSO₄、KH₂PO₄、CaCl₂ 与 pH 剂制成 Krebs 溶液, 再对荧光显微镜开展 3 次冲洗。

1.2.3 内皮细胞一氧化氮检测 采用 5 mmol/L 的 DAF-

2DA 加入至处理的血管内皮细胞中,置于 37 ℃ 环境中培养 45 min,再应用 Krebs 溶液冲洗的荧光显微镜观察,选择 FITC 滤光片完成照相。

1.2.4 蛋白免疫印迹检测 提取 100 mg 细胞,并将裂解液加入至细胞中,有效提取蛋白并进行浓度检测。获取 50 μg 蛋白上样通过聚丙烯酰胺凝胶电泳转移至聚偏二氟乙烯膜上,封闭并将Ⅰ抗与Ⅱ抗加入,给予化学发光试剂处理再行 X 线片曝光,最后采用凝胶成像系统完成分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

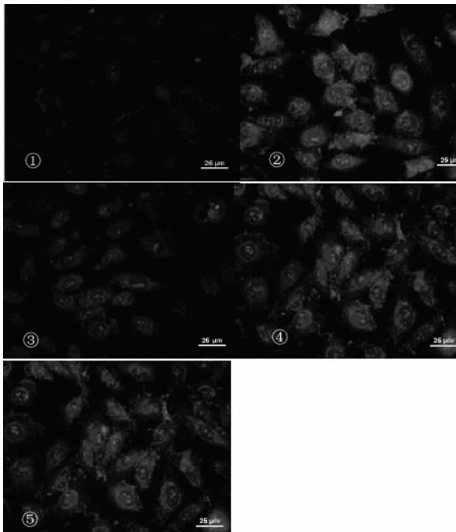
2.1 各组 ROS 荧光强度、一氧化氮荧光强度、解耦联蛋白 2 表达结果 见表 1。高糖介导下 ROS 与一氧化氮表达与同体积二甲基亚砜处理后比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),高糖介导+吡格列酮处理后 ROS、一氧化氮荧光强度与解耦联蛋白 2 表达同高糖介导组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但应用 GW9662 后 ROS、一氧化氮荧光强度及解耦联蛋白 2 表达与吡格列酮组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而应用京尼平后,ROS 与一氧化氮荧光强度同吡格列酮组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 PPARγ 对高糖介导人脐静脉内皮细胞 ROS、一氧化氮与解耦联蛋白 2 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS 荧光强度	一氧化氮 荧光强度	解耦联 蛋白 2 表达
对照组	1.1±0.3	1.0±0.2	—
高糖介导	3.3±0.8 ^a	0.3±0.1 ^a	0.7±0.2
高糖介导+吡格列酮	1.8±0.5 ^b	0.7±0.3 ^b	1.4±0.4 ^b
高糖介导+吡格列酮+GW9662	3.1±0.4 ^c	0.4±0.2 ^c	0.8±0.2 ^c
高糖介导+吡格列酮+京尼平	3.2±0.5 ^c	0.4±0.2 ^c	—

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖介导组比较,^b $P < 0.05$;与高糖介导+吡格列酮组比较,^c $P < 0.05$ 。—表示无数据。

2.2 各组图像表现 见图 1。



注:①为高糖介导;②为高糖介导+吡格列酮;③为高糖介导+吡格列酮+GW9662;④为高糖介导+吡格列酮+京尼平;⑤为对照组。

图 1 各组图像表现

3 讨 论

高糖介导氧化应激水平升高是糖尿病患者发生心脑血管疾病的主要诱发因素,血管内皮细胞则为 ROS 的首要损伤区域^[4]。伴随临床药物不断推陈出新,众多研究均证实 PPARγ 可有效抑制人体代谢变化,对动、静脉血管发挥良好的保护作用^[5-6]。吡格列酮是临床经常用的 PPARγ 激动剂,可显著抑制患者血糖水平,但其血管内皮细胞保护作用仍缺乏证实^[7]。为进一步明确 PPARγ 激动剂吡格列酮对高糖介导血管内皮细胞 ROS 的影响,本研究通过建立损伤细胞模型,经不同方式培养观察明确其药理机制。本研究结果显示,高糖介导下血管内皮细胞 ROS 表达明显上升,而 ROS 生成抑制作用促使血管内皮保护物一氧化氮水平降低,进而会严重加剧血管内皮的损害程度。吡格列酮应用后高糖介导血管内皮细胞的氧化应激受到显著拮抗作用,其 ROS 荧光强度显著低于未应用吡格列酮细胞,而相应一氧化氮荧光强度提高,提示吡格列酮可预防高糖缓解中一氧化氮水平降低情况,从而发挥血管内皮保护的作用。

为进一步明确 PPARγ 对高糖介导血管内皮细胞 ROS 产生影响的主要机制,本研究还进一步开展解耦联蛋白免疫印迹检验。国外研究显示,PPARγ 对解耦联蛋白 2 RNA 转录表达具有上调作用,而解耦联蛋白 2 是线粒体内膜中的主要组成蛋白,其介导质子漏对 ROS 生成具有阻滞作用^[8-9]。解耦联蛋白在氧化应激作用下会迅速提高,其表达提升后可增加抗氧化作用,积极保护正常血管内皮细胞功能,通过调节其表达水平进而加强糖尿病血管内皮损伤的预防性作用^[10]。本研究采用蛋白免疫印迹法检测 PPARγ 对解耦联蛋白的影响,结果证实吡格列酮能够提高高糖环境中的蛋白表达水平,吡格列酮应用前、后解耦联蛋白 2 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$),由此证实药物对 ROS 的主要影响机制为解耦联蛋白 2 表达的变化。

综上所述,PPARγ 能够明显缓解高糖介导下血管内皮细胞 ROS 的生成,主要通过上调解耦联蛋白 2 发挥其药物效果,可为糖尿病患者的心血管疾病预防提供良好作用。

参考文献

- [1] 潘艳丽,郭长策,章秋.吡格列酮对高糖诱导下血管内皮细胞凋亡的影响[J].昆明医科大学学报,2014,35(9):48-51.
- [2] 张楠,丁俊,章秋,等.吡格列酮对血管内皮细胞及 JNK 信号通路的影响[J].安徽医科大学学报,2011,46(2):150-153.
- [3] 王宏,叶丹.二甲双胍联合吡格列酮对 2 型糖尿病患者血管内皮细胞功能机胰岛素抵抗的影响[J].中国现代医生,2013,51(20):25-27.
- [4] 陈培红.吡格列酮对 2 型糖尿病患者血管内皮细胞功能机胰岛素抵抗的影响[J].实用临床医药杂志,2012,16(23):109-111.
- [5] 黄丹丹,雷闽湘,陈本美,等.吡格列酮对高糖诱导血管内皮细胞凋亡的影响及作用机制[J].中国糖尿病杂志,2009,18(9):709-710.
- [6] 卢辉和,黎叶飞,盛臻强,等.吡格列酮抗炎作用对代谢综合征患者胰岛素敏感性、血管内皮细胞功能的影响[J].实用临床医药杂志,2012,16(19):38-39.
- [7] 盛臻强,黎叶飞,卢辉和.吡格列酮的抗氧化(下转第 3647 页)

现。随着病情的进展,血糖及 24 h 尿蛋白明显高于同期对照组,出现肾脏病理损伤加重等 DN 表现,由此表明研究过程中肾功能不断受损,其病理变化表现为肾小球、肾小管肥大,肾小球、肾小管基膜增厚,肾小球系膜区细胞外基质堆积及肾小球硬化。进一步检测反映肾小球硬化和肾小管间质纤维化 2 项指标 CTGF 和 VEGF 的血清学表达水平发现, DN 大鼠血清 CTGF 和 VEGF 水平显著高于对照组,且经过维格列汀治疗后 DN 大鼠血糖及 24 h 尿蛋白及 CTGF 和 VEGF 水平显著下降,且治疗 12 周后以上各项指标比治疗 8 周下降更明显,与文献[7]报道一致。薛菲等^[2]认为, VEGF 与尿清蛋白排泄率呈正相关,表明高水平 VEGF 会促进蛋白尿产生,促进肾脏组织损伤。本研究结果亦显示,经过维格列汀治疗后 CTGF 和 VEGF 水平均显著下降,且治疗前、后 CTGF 和 VEGF 2 项指标呈正相关关系, DN 大鼠中 CTGF 和 VEGF 2 项因子明显高于同期对照组,因此推测 CTGF 和 VEGF 在大鼠 DN 发生和发展过程中起到加速作用,进一步导致肾脏病理损伤加重,最终发展为 DN 所起的作用可能是一对相辅相成的免疫因子。CTGF 是介导肾间质炎性反应最重要炎性反应趋化因子之一,在多种肾脏疾病的发病及进展中发挥作用,是关键性细胞因子之一,参与 DN 的病理过程,是导致糖尿病肾损害的重要原因^[8]。本研究结果显示, CTGF 与 DN 大鼠弥漫性肾小球硬化与巨噬细胞浸润有关,提示长期高血糖刺激,使 CTGF 促使血管内皮细胞 VEGF 表达增加,其结果导致白细胞黏附增加、血管内皮细胞产生慢性炎性反应,进而促进 DN 形成。随 DN 进一步加重 CTGF 呈进行性上升趋势,导致肾小球高滤过、清蛋白排泄、肾小球肥大等,由此提示 CTGF 和 VEGF 参与了 DN 发病及发生和发展。

肠促胰素类药物是目前用于治疗 2 型糖尿病较新的一类药物,肠促胰素类药物有两类:一类是胰高血糖素样肽-1 类似物,一类是 DPP-4 抑制剂^[9]。临床研究显示,此类药物不仅可有效控制血糖,还能减少体重质量增加、降低低血糖发生的风险。与此同时,临床试验及动物研究亦发现,肠促胰素类药物对 DN 具有保护作用,为 DN 的治疗提供了新的思路^[10]。维格列汀治疗组与 DN 组相比,不仅能明显降低血糖、尿蛋白,减轻肾脏体积,用药后肾组织病理损伤也减轻。说明维格列汀具有一定的肾脏保护作用,减少尿蛋白及肾脏保护作用更强。本研究证实,糖尿病患者血 CTGF 水平可作为诊断早期肾损害较敏感的指标,其水平也与 DN 严重程度呈正相关,有助于监测、判断其病程进展情况^[11]。提示 CTGF 与 VEGF 参与 DN 的发病过程,阻断或减弱其表达将成为 DN 更有效的治疗途径。早期对 VEGF 进行干预,如使用小分子 VEGF 受体抑制剂及抗黏附分子治疗,可降低血管高渗透性,减轻蛋白尿及肾小球肥大,

同时阻断或减弱 CTGF 表达,将成为 DN 更有效的治疗途径。

参考文献

- [1] Mahmood D, Singh BK, Akhtar M. Diabetic neuropathy: therapies on the horizon[J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 61 (5): 1137-1145.
- [2] 薛菲, 刘惠兰, 王银娜. 血管内皮细胞生长因子水平及其基因多态性与 2 型糖尿病肾病的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23(12): 813-814.
- [3] Zhou YH, Wang QY. The role and significance of CTGF in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Intern J Endocrinol Metab, 2009, 26(4): 273-276.
- [4] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p213[J]. Circulation, 1996, 93(8): 1493-1495.
- [5] Ito Y, Aten J, Nguyen TQ, et al. Involvement of connective tissue growth factor in human and experimental hypertensive nephrosclerosis [J]. Nephron Exp Nephrol, 2013, 117(1): e9-20.
- [6] 陈瑞林, 陶怡, 张北平, 等. MRL/lpr 狼疮鼠中结缔组织生长因子与 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的表达及相关性研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(5): 317-319.
- [7] Jiang L, Lv HB. Recent progress in the investigation of cy-token and diabetes retinopathy[J]. Chinese Ophthalmic Research, 2009, 27(12): 1165-1168.
- [8] Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, et al. Over expression of connectivetissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice [J]. Kidney Int, 2008, 73 (4): 446-455.
- [9] Wang Y, Landheer S, van Gilst WH, et al. Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE-and DPP4-inhibitory Activity[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46781.
- [10] Mahmood D, Singh BK, Akhtar M. Diabetic neuropathy: therapies on the horizon[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61 (9): 1137-1145.
- [11] El Mesallamy HO, Ahmed HH, Bassyouni AA, et al. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy[J]. Clin Biochem, 2012, 45 (9): 646-650.

(收稿日期: 2015-05-13 修回日期: 2015-08-21)

(上接第 3644 页)

- 作用对代谢综合征患者血管内皮细胞功能的影响[J]. 南通大学学报, 2012, 32(3): 191-193.
- [8] Bugge A, Siersbaek M, Madsen MS, et al. A novel intronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma enhancer in the uncoupling protein (UCP) 3 gene as a regulator of both UCP2 and 3 expression in adipocytes[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17310-17317.

- [9] Ma S, Ma L, Yang D, et al. Uncoupling protein 2 ablation exacerbates high-salt intake-induced vascular dysfunction [J]. Am J Hypertens, 2010, 23(8): 822-828.
- [10] Sasaki S, Inoguchi T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications[J]. Diabetes Metab J, 2012, 36(4): 255-261.

(收稿日期: 2015-05-05 修回日期: 2015-07-15)