

· 论 著 ·

波动性高糖对人脐静脉内皮细胞炎症因子表达的影响

刘挺松, 宫剑滨, 程训民, 王立军, 彭永平, 刘 晶, 王 静, 江时森

〔摘要〕 **目的** 研究体外波动性和持续性高糖对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)炎症因子表达的影响。**方法** 分别在正常葡萄糖(5.5 mmol/L, NG)、持续性高糖(25 mmol/L, PHG)、波动性高糖(5.5 mmol/L 和 25 mmol/L 葡萄糖每 24 h 交替, OHG)和波动性高渗环境(不加入葡萄糖, 加入不同量甘露醇控制渗透压与波动性高糖组一致, OC)中连续培养 HUVEC 7d。采用 ELISA 法和实时定量 PCR 法分别检测 HUVEC 在不同血糖环境中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和细胞间黏附因子-1(ICAM-1)中蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与 NG 组和 OC 组比较, 发现持续性高糖可以显著升高 HUVEC 的 IL-6、TNF- α 和 ICAM-1 蛋白表达($P < 0.05$), 而波动性高糖可以进一步放大这种差异($P < 0.05$)。在 mRNA 水平, PHG 组较 NG 组和 OC 组显著增加 IL-6、TNF- α 和 ICAM-1 表达($P < 0.05$), 而这一趋势在波动性高糖组最为明显($P < 0.05$)。**结论** 持续性高糖可以显著增强 HUVEC 炎症反应, 而波动性高糖进一步放大这一效应。

〔关键词〕 波动性高糖; 内皮细胞; 炎症

〔中图分类号〕 R587.23 **〔文献标志码〕** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-271X.2013.03.001

Impact of oscillating high glucose on pro-inflammatory cytokines expression in human umbilical vein endothelial cells

LIU Ting-song, GONG Jian-bin, CHENG Xun-min, WANG Li-jun, PENG Yong-ping, LIU Jing, WANG Jing, JIANG Shi-sen. Department of Cardiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the inflammatory responses of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to persistent and oscillating high glucose in vitro. **Methods** HUVEC was incubated for continuous 7 days in 5.5 mmol/L, 25 mmol/L glucose, oscillating high (5.5 and 25 mmol/L glucose alternating every 24 hours) and mannitol respectively. Concentration of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) proteins in the supernatants of cell culture were measured by use of ELISA kit. The mRNA of IL-6, TNF- α and ICAM-1 were evaluated by real-time quantitative PCR. **Results** Persistent high glucose caused a more intense inflammatory response than normal glucose and osmotic control in HUVEC with a marked increase of IL-6, TNF- α and ICAM-1 proteins in supernatants of cell culture($P < 0.05$), and the differences was amplified when cells cultured under oscillating high glucose. The concentration of the three pro-inflammatory cytokines mRNA were higher in cells exposed to oscillating high glucose than that exposed to persistent high glucose and normal glucose($P < 0.05$). **Conclusion** In cultured HUVEC, oscillating high glucose evoked more intense inflammatory response than persistent high glucose.

〔Key words〕 oscillating high glucose; endothelial cells; inflammation

糖尿病心血管并发症是危害人类健康和生命安全的严重疾患, 虽然多年来在研究和认识这一系列病变的领域取得了长足的进展, 但其内在复杂机制仍不明。当前的观点认为, 糖尿病是一种慢性系统性炎症疾病, 其进展特征伴随一系列具备多效生物学活性的炎症因子的激活, 包括细胞间黏附因子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor

necrosis factor- α , TNF- α) 等。血糖波动目前被认为是独立于血糖水平和糖化血红蛋白的第三种糖尿病糖代谢异常状况。不断有临床研究表明, 异常升高的血糖波动会放大机体氧化应激反应, 并且和心血管不良预后密切相关^[1-3]。体外实验也证明波动性高糖培养的血管内皮细胞其氧化应激程度较在持续性高糖环境培养下明显增强, 细胞凋亡趋势显著增加^[4-5]。但关于波动性高糖环境下血管内皮细胞的局部炎症反应, 迄今仍未见报道。本实验以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象, 探讨体外模拟波动性高糖对内皮细胞炎症反应的影响。

基金项目: 中国博士后科学基金特别资助(2012T50897)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院心脏内科

通讯作者: 江时森, E-mail: www.jiangshisen@sina.com

1 材料与方法

1.1 主要材料 RMPI-1640 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; HUVEC 细胞株、IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 ELISA 检测试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司。Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。实时定量 PCR 扩增试剂盒购自日本 TOYOBO 公司。

1.2 细胞培养及分组 取 HUVEC 接种于含胎牛血清的 RMPI-1640 培养液中, 置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养, 细胞呈单层贴壁生长后, 每 2 d 更换培养液 1 次, 每 2~3 d 传代一次。培养 12 h 后将细胞依培养条件不同分为 4 组: 第 1 组, 正常葡萄糖组 (normal glucose, NG), 葡萄糖浓度为 5.0 mmol/L; 第 2 组, 持续性高糖组 (persistent high glucose, PHG), 葡萄糖浓度为 25 mmol/L; 第 3 组, 波动性高糖组 (oscillating high glucose, OHG) 葡萄糖浓度为 5.0 mmol/L 和 25 mmol/L, 每 24 h 更替; 第 4 组, 渗透压对照组 (osmotic control, OC), 不加入葡萄糖, 加入不同量甘露醇控制渗透压, 操作同波动性高糖组。

1.3 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 蛋白测定 在 HUVEC 培养于不同葡萄糖水平 7 d 后, 测定细胞培养液中 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 蛋白浓度, 具体操作见厂家技术说明书。

1.4 实时定量 PCR 分析 在 HUVEC 暴露于不同葡萄糖水平 7 d 后按说明书进行实时定量 PCR 扩增测定 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 的 mRNA 表达。使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 经纯化后反转录为单链 cDNA, 再利用实时定量 PCR 测定。扩增过程包括 95 ℃ 5 min、95 ℃ 15 s、60 ℃ 20 s 和 72 ℃ 40 s, 共 40 个循环。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理, 正态分布的计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同葡萄糖环境下 HUVEC 的 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 蛋白表达差异 在不同葡萄糖浓度环境集中连续培养 7 d 后, 与 NG 组和 OC 组比较, PHG 组 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 而 OHG 组较其他 3 组上述炎症因子升高更为显著 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 不同葡萄糖环境下 HUVEC 的 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 蛋白表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
NG	107.19 ± 4.48	267.19 ± 13.82	3.34 ± 0.10
PHG	181.50 ± 18.75 [△]	521.82 ± 29.68 [△]	5.78 ± 0.11 [△]
OHG	342.96 ± 17.82 ^{△#}	812.71 ± 18.28 ^{△#}	10.18 ± 0.73 ^{△#}
OC	117.08 ± 8.58	274.38 ± 17.16	3.47 ± 0.35

注: 与 NG 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 PHG 组比较, [#] $P < 0.05$

2.2 不同葡萄糖环境下 HUVEC 的 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 的 mRNA 表达差异 在连续 7 d 培养后, PHG 组的 HUVEC 的 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 mRNA 表达显著高于 NG 组和 OC 组 ($P < 0.05$), 而 OHG 组较所有其他组均明显升高 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 不同葡萄糖环境下 HUVEC 的 IL-6、TNF-α 和 ICAM-1 的 mRNA 表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)
NG	0.97 ± 0.06	1.02 ± 0.11	0.97 ± 0.09
PHG	2.16 ± 0.37 [△]	2.75 ± 0.22 [△]	2.18 ± 0.44 [△]
OHG	6.19 ± 0.63 ^{△#}	8.65 ± 0.89 ^{△#}	4.06 ± 0.41 ^{△#}
OC	1.04 ± 0.16	1.09 ± 0.11	1.09 ± 0.13

注: 与 NG 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 PHG 组比较, [#] $P < 0.05$

3 讨论

血糖波动异常对于人体慢性代谢性疾病的影响已引起广泛关注^[6], 其和心血管不良预后的密切关系更是愈来愈受到国内外专家的重视^[7]。炎症反应全程参与糖尿病及其心血管并发症的发生发展已得到公认, 炎症因子已成为评估糖尿病患者罹患动脉粥样硬化风险的重要生物学标志。在住院患者中, 高血糖已被证明能够触发包括 IL-6、TNF-α 和黏附分子等炎症因子的过表达^[8]。作为白细胞介素家族的重要成员之一, IL-6 可以由多种细胞合成分泌并作用于一系列组织和器官。有研究表明 IL-6 水平为冠心病的一个独立危险因素^[9-10], 而且实验研究也证明其在动脉粥样硬化中的作用^[11-12]。在本实验中, 暴露于持续性高糖环境的 HUVEC 的 IL-6 的分泌量明显高于 NG 及 OC 组, 而这一差异在波动性高糖中则更为明显。我国学者在体外波动性高糖环境下培养的人巨噬细胞中亦观察到类似趋势^[13], 但本实验结果中波动性高糖诱导 HUVEC 表达 IL-6 的作用较单核细胞更强, 这可能与本实验选择了不同的细胞来源有关。

本实验同时测定了不同葡萄糖环境下 TNF-α 的表达量, 持续性高糖可以显著升高 HUVEC 的

TNF- α 分泌,而波动性高糖环境下其分泌量进一步增加。TNF- α 是一种多功能炎症因子,它在介导糖尿病大血管并发症发生中发挥重要作用。TNF- α 水平升高亦被证明和老年患者动脉粥样硬化高发生率密切相关^[14]。更值得注意的是,Esposito 等^[15]发现急性高血糖可以诱导 TNF- α 水平升高,而这一作用则会被抗氧化剂谷胱甘肽完全消除。这些发现提示血糖骤升在短期内对于细胞因子浓度的影响可能要超过持续性高血糖。本文研究结果表明,波动性高糖较之持续性高糖更易引起 TNF- α 的高表达。作为一种重要的自分泌和内分泌器官,血管内皮部分通过调节血管局部炎症反应来维持内皮功能的稳定。血管内皮细胞过多分泌的 TNF- α 不仅可以加入机体循环,还可以作用于自身,从而产生一种恶性生物反馈作用。

本实验中可溶性细胞间黏附因子在不同葡萄糖培养液中含量亦不相同,其中以波动性高糖培养基中浓度最高。ICAM-1 是一种重要的细胞黏附分子,部分由内皮细胞合成,往往出现在冠状动脉受损部位。糖尿病患者较无糖尿病患者可溶性 ICAM-1 水平更高^[16-17]。从本实验的结果可以看出,以 ICAM-1 过表达为特征的局部血管炎性反应的增强可能参与白细胞的跨膜迁移。因此,可认为波动性高糖促进了炎症介导的动脉粥样硬化的形成和进展。

在本研究中 OC 组中渗透压的大小和改变方式和 OHG 组完全一致,但其诱导炎症因子表达的能力却和 NG 组基本一致。这就说明波动性高糖诱导炎症因子的过表达主要是由于葡萄糖水平而非渗透压的频繁更替所致。综上所述,在本研究中发现持续性高糖可以显著促进炎症因子 IL-6、TNF- α 和 ICAM-1 的表达,而波动性高糖进一步放大这一效应。这一不良效应有可能部分参与了糖尿病动脉粥样硬化的形成和加速,因此全面阻断这一低强度的冠状动脉局部炎症反应,有可能为防治糖尿病心血管并发症提供新的干预靶点。

【参考文献】

- [1] Colette C, Monnier L. Acute glucose fluctuations and chronic sustained hyperglycemia as risk factors for cardiovascular diseases in patients with type 2 diabetes[J]. Horm Metab Res, 2007, 39(9): 683-686.
- [2] Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes[J]. JAMA, 2006, 295(14): 1681-1687.

- [3] Ceriello A, Esposito K, Piconi L, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients[J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1349-1354.
- [4] Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 281(5): 924-930.
- [5] Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, et al. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2006, 22(3): 198-203.
- [6] 周 玮, 杜云翔, 王建国, 等. 高糖波动对 MG63 细胞株护骨素与 TRAIL 表达的影响[J]. 东南国防医药, 2012, 14(2): 141-144.
- [7] 张 金, 陈锐华. 急性心肌梗死与高血糖[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(3): 298-301.
- [8] Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, et al. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: Relevance to cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(4A): 15B-26B.
- [9] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? [J]. Atherosclerosis, 2000, 148(2): 209-214.
- [10] Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(7): 1255-1261.
- [11] Hou T, Tieu BC, Ray S, et al. Roles of IL-6-gp130 signaling in vascular inflammation[J]. Curr Cardiol Rev, 2008, 4(3): 179-192.
- [12] Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, et al. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis [J]. Thromb Haemost, 2009, 102(2): 215-222.
- [13] Li-Bo Y, Wen-Bo Q, Xiao-Hong L, et al. Intermittent high glucose promotes expression of proinflammatory cytokines in monocytes [J]. Inflamm Res, 2011, 60(4): 367-370.
- [14] Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, et al. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 121(2): 255-260.
- [15] Esposito K, Nappo F, Marfella R, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress[J]. Circulation, 2002, 106(16): 2067-2072.
- [16] Rizzoni D, Muesan ML, Porteri E, et al. Circulating adhesion molecules and carotid artery structural changes in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus [J]. J Hum Hypertens, 2003, 17(7): 463-470.
- [17] Bluhner M, Unger R, Rassoul F, et al. Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes [J]. Diabetologia, 2002, 45(2): 210-216.

(收稿日期: 2013-01-18; 修回日期: 2013-03-01)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)