

激活 Nrf2-ARE 通路改善尿毒症患者血清诱导的内皮细胞功能障碍及其机制

邓文婕^{1,2}, 张群子¹, 邓琼霞¹, 彭 晖¹, 王 成¹, 娄探奇¹

(1. 中山大学附属第三医院肾脏内科, 广东 广州 510630; 2. 韶关学院医学院临床系内科教研室, 广东 韶关 512026)

摘要:【目的】探讨激活核因子E2相关因子2(Nrf2)-抗氧化反应元件(ARE)通路改善尿毒症患者血清诱导的内皮细胞功能障碍的作用及其机制。【方法】体外培养人主动脉内皮细胞,分别与10%正常人血清、10%非糖尿病尿毒症患者血清及10%糖尿病尿毒症患者血清共培养,同时用20 μmol/L叔丁基对苯二酚(tBHQ)预处理人主动脉内皮细胞4 h,实验分为6组:正常人血清组、非糖尿病尿毒症患者血清组、糖尿病尿毒症患者血清组、正常人血清+tBHQ组、非糖尿病尿毒症患者血清+tBHQ组、糖尿病尿毒症患者血清+tBHQ组。流式细胞学技术检测细胞凋亡率、一氧化氮(NO)含量;Western blotting检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、醌氧化还原酶1(NQO1)的表达情况,同时检测细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽(GSH)的水平。【结果】尿毒症患者血清培养的人主动脉内皮细胞有显著的功能障碍,细胞凋亡率、MDA水平增高($P < 0.05$);NO含量、P-eNOS^{Ser1177}/eNOS(丝氨酸1177磷酸化内皮型一氧化氮合酶,P-eNOS^{Ser1177})、SOD、CAT及GSH的水平均降低($P < 0.05$);tBHQ预处理可降低尿毒症血清条件下人主动脉内皮细胞的凋亡率和MDA含量($P < 0.05$),增加NO的产生、eNOS-mRNA表达、P-eNOS^{Ser1177}/eNOS、SOD、CAT和GSH的水平($P < 0.05$)。【结论】激活Nrf2-ARE通路可改善尿毒症血清诱导的人主动脉内皮细胞功能障碍,增强抗氧化应激反应可能是其机制之一。

关键词:尿毒症;内皮细胞功能障碍;氧化应激;内皮型一氧化氮合酶(eNOS);核因子E2相关因子2-抗氧化反应元件(Nrf2-ARE);叔丁基对苯二酚(tBHQ)

中图分类号:R692.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)03-0341-09

Investigation of Effects And Mechanisms of Nrf2-ARE Pathway on Uremic Serum-Mediated Endothelial Dysfunction in Human Aortic Endothelial Cells

DENG Wen-jie^{1,2}, ZHANG Qun-zi¹, DENG Qiong-xia, PENG Hui¹, WANG Cheng¹, LOU Tan-qi¹

(1. Department of Nephrology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Internal Medicine, Medical College of Shaoguan University, Shaoguan 512026, China)

Corresponding to: WANG Cheng, E-mail: wt770716@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects and mechanisms of Nrf2-ARE (nuclear factor erythroid-2 related factor-anti-oxidant response element) pathway on uremic serum-mediated endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. 【Methods】 Human aortic endothelial cells were incubated in endothelial cell medium containing 10% normal serum, 10% non-diabetic uremic serum or 10% diabetic uremic serum respectively, and 20 μmol/L tertiary butyl hydroquinone (tBHQ) were pretreated with cells to active Nrf2-ARE pathway. The cells apoptosis rate were measured by flow cytometry, and the synthesis of NO was detected by flow cytometry and immune fluorescent confocal, while the expression of P-eNOS^{Ser1177}/eNOS, and quinone oxidoreductase-1 (NQO1) were measured by western blotting. The levels of malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase, and glutathione in these cells were also measured with kits. 【Results】 Aortic endothelial cells incubated with uremic serum had a higher level of apoptosis rate and MDA ($P < 0.05$), and a lower level of NO synthesis, P-eNOS^{Ser1177}/eNOS expression, CAT, SOD, GSH ($P < 0.05$). Pretreated with tBHQ can reduce the apoptosis rate and MDA level ($P < 0.05$), improve the amount of NO synthesis, the expression of P-eNOS^{Ser1177}/eNOS,

收稿日期:2016-10-10

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313077)

作者简介:邓文婕,医学硕士,助教,研究方向:肾脏病尿毒症,E-mail:mnidwj@163.com;王成,通信作者,医学博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:肾脏内科学,E-mail:wt770716@163.com

the levels of CAT, SOD, and GSH in these cells ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Activation of Nrf2-ARE pathway can improve endothelial dysfunction in aortic endothelial cells induced by uremic serum, and its mechanism might be related with enhancement of the antioxidant stress.

Key words: uremic serum; endothelial dysfunction; oxidative stress; endothelial nitric oxide synthase (eNOS); nuclear factor erythroid-2 related factor-antioxidant response element (Nrf2-ARE); tert-Butylhydroquinone (tBHQ)

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(3):341-349]

全球目前有约261.8万的终末期肾功能衰竭的慢性肾脏病患者正在接受肾脏替代治疗,还有超过700万的患者需要肾脏替代治疗^[1]。尿毒症的治疗需要耗费大量的社会卫生资源。心血管疾病是尿毒症病人最主要的并发症,是导致其死亡的重要原因^[2-3]。血管内皮功能障碍是心血管病变发生的始发环节^[4]。血管内皮细胞作为血管的第一道屏障,最易受到尿毒症毒素等危险因素的侵害导致功能障碍。氧化应激是导致其内皮功能障碍的最重要机制之一^[5-6]。通常临床应用丙二醛(malondialdehyde, MDA)反映机体氧化应激水平^[7];超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)及谷胱甘肽(glutathione, GSH)可反映机体的抗氧化应激水平^[8]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf2)是目前已知的最重要的抗氧化应激系统的调控因子,其激活后能够降低机体的氧化应激反应水平^[9]。而叔丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, tBHQ)是广泛应用的Nrf2激动剂^[10]。因此,我们的实验假设激活Nrf2-ARE(nuclear factor erythroid-2 related factor-antioxidant response element)通路能改善尿毒症患者血清诱导的内皮细胞氧化应激反应及内皮功能障碍。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人主动脉内皮细胞细胞株(Sciencell, carlsbad, CA, USA)复苏后放入37℃培养箱培养,条件为95% O₂和体积分数5% CO₂,培养基为内皮细胞培养基,每1~2 d换液或传代一次;当细胞生长至70%~80%后可用于实验。实验使用5~7代的细胞。

1.2 实验分组

1.2.1 血清收集 实验组尿毒症患者血清是收集我院血透中心随机选取非糖尿病肾病以及糖尿病

肾病维持性血液透析患者各10例,其中男性5例,女性5例。入选患者均进行维持性血液透析6个月以上;透析充分, Kt/V > 1.3;病情稳定。非糖尿病尿毒症患者血清组:平均年龄(52 ± 12)岁,维持性血液透析(30 ± 26)个月;原发肾病为慢性肾小球肾炎7例,多囊肾1例,梗阻性肾病1例,慢性肾盂肾炎1例。糖尿病尿毒症患者血清组:年龄(50 ± 16)岁(30~72岁),维持性血液透析治疗(32 ± 20)个月,血糖(11 ± 4)mmol/L。所有患者统一使用金宝一次性透析器,透析频率为2~3次/周,4 h/次。

正常血清组是同期收集的10例年龄性别匹配的健康人静脉血,采自我院健康体检中心,经体检排除肝肾疾病、糖尿病及心脑血管等疾病。

收集方法:禁食一晚,每个受试对象抽取6 mL 静脉血,4℃离心(20 913×g)15 min,获取血清,储存于-80℃冰箱^[11]。

1.2.2 实验分组 正常人血清组(normal serum组, N组):人主动脉内皮细胞与含10%正常人血清的内皮细胞培养基培养24 h;尿毒症患者血清组分为:非糖尿病尿毒症患者血清组(Non-diabetic uremic serum组, ND组)和糖尿病尿毒症患者血清组(Diabetic uremic serum组, D组);非糖尿病尿毒症患者血清组(ND组):人主动脉内皮细胞与含10%非糖尿病尿毒症患者血清的内皮细胞培养基培养24 h;糖尿病尿毒症患者血清组(D组):人主动脉内皮细胞与含10%糖尿病尿毒症患者血清的内皮细胞培养基培养24 h。tBHQ组刺激组:正常血清加tBHQ组(tBHQ+N组):加入20 μmol/L的tBHQ预处理人主动脉内皮细胞4 h,再加入10%正常人血清的内皮细胞培养基共培养24 h;非糖尿病尿毒症患者血清加tBHQ组(tBHQ+ND组):加入20 μmol/L的tBHQ预处理人主动脉内皮细胞4 h,再加入10%非糖尿病尿毒症患者血清的内皮细胞培养基共培养24 h;糖尿病尿毒症患者血清加tBHQ组(tBHQ+D组):加入20 μmol/L的

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

Name		Sequence(5'→3')	Length/bp
Nrf2	Sense	TTTTCCATTCCCGAATTACAGT	130
	Antisense	AGGAGATCGATGAGTAAAAATGGT	
GAPDH	Sense	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	150
	Antisense	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

tBHQ 预刺激人主动脉内皮细胞 4 h, 再加入 10% 糖尿病尿毒症患者血清的内皮细胞培养基共培养 24 h;

1.3 细胞凋亡检测

流式细胞仪检测细胞凋亡 (Annexin-FITC apoptosis detection kit I, BD Biosciences), 用胰酶消化细胞, 离心后弃去上清, 用 PBS 缓冲液重悬细胞, 调整细胞数量为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 加入流式管, 再分别加入 5 μL Annexin V-FITC (AV) 和 5 μL 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI), 轻微振荡, 于室温避光孵育 15 min, 之后再加入 400 μL PBS 缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡。AV(-) 和 PI(-) 为活体细胞, AV(-) 和 PI(+) 为坏死细胞, AV(+) 和 PI(-) 为早期凋亡细胞, AV(+) 和 PI(+) 为晚期凋亡细胞, 内皮细胞凋亡的评价是早期凋亡加晚期凋亡。

1.4 NO 的检测

流式细胞仪检测细胞中 NO (50 μg DAF-FM diacetate 溶于 20 μL DMSO 中, 配成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ DAF-FM 溶液), 用胰酶消化下细胞, 并用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 调整细胞数量为每管 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。离心 (20 913 $\times g$), 5 min/次, 弃去 PBS, 每个离心管加入稀释的 DAF-FM 溶液 1 mL, 避光室温孵育 30 min; 弃去 DAF-FM 溶液, 再加入 PBS 孵育 15 min, 室温, 避光, 以清除多余的染色剂; 弃去 PBS, 并每管加入新的 PBS 500 μL , 重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞 NO 的含量。峰值表示 NO 的含量。

1.5 RT-PCR 测定

按 RNA 提取试剂盒提取内皮细胞 RNA。按照逆转录试剂盒说明书进行 RT-PCR: 先用逆转录试剂盒合成 cDNA, 具体操作步骤按说明书。然后用 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, GAPDH 为内对照, 引物由上海生物工程有限公司合成 (表 1)。具体操作步骤及反应条件按说明书。

1.6 Western blot 检测

提取总蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转膜, 封闭, 分别加入抗激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf2) (1:500, Santa Cruz Biotechnology), 醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase-1, NQO1) (1:1 000, Abcam), eNOS (1:500) P-eNOS^{Ser1177} (1:1 000, CST), GAPDH (1:10 000, ProteinTech Group), 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:10 000 稀释), ECL 发光液曝光。用 WCIF ImageJ 图像分析软件分析目标条带的光密度值, 数值以各干预组与 GAPDH 的比值表示。

1.7 其他指标的检测

检测细胞内丙二醛 (malondialdehyde, MDA; 丙二醇测试盒, 南京凯基)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD; 超氧化物歧化酶测试盒, 南京凯基)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH; 谷胱甘肽测试盒, 南京凯基) 及过氧化氢酶 (catalase, CAT; 过氧化氢酶测试盒, 南京凯基), 操作按相应说明书进行^[16]。

1.8 统计学分析

所有数据用均数 \pm 标准差表示, 计量资料比较采用析因设计方差分析, 计数资料使用卡方检验, 组间比较采用 Bonferroni 法, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计。

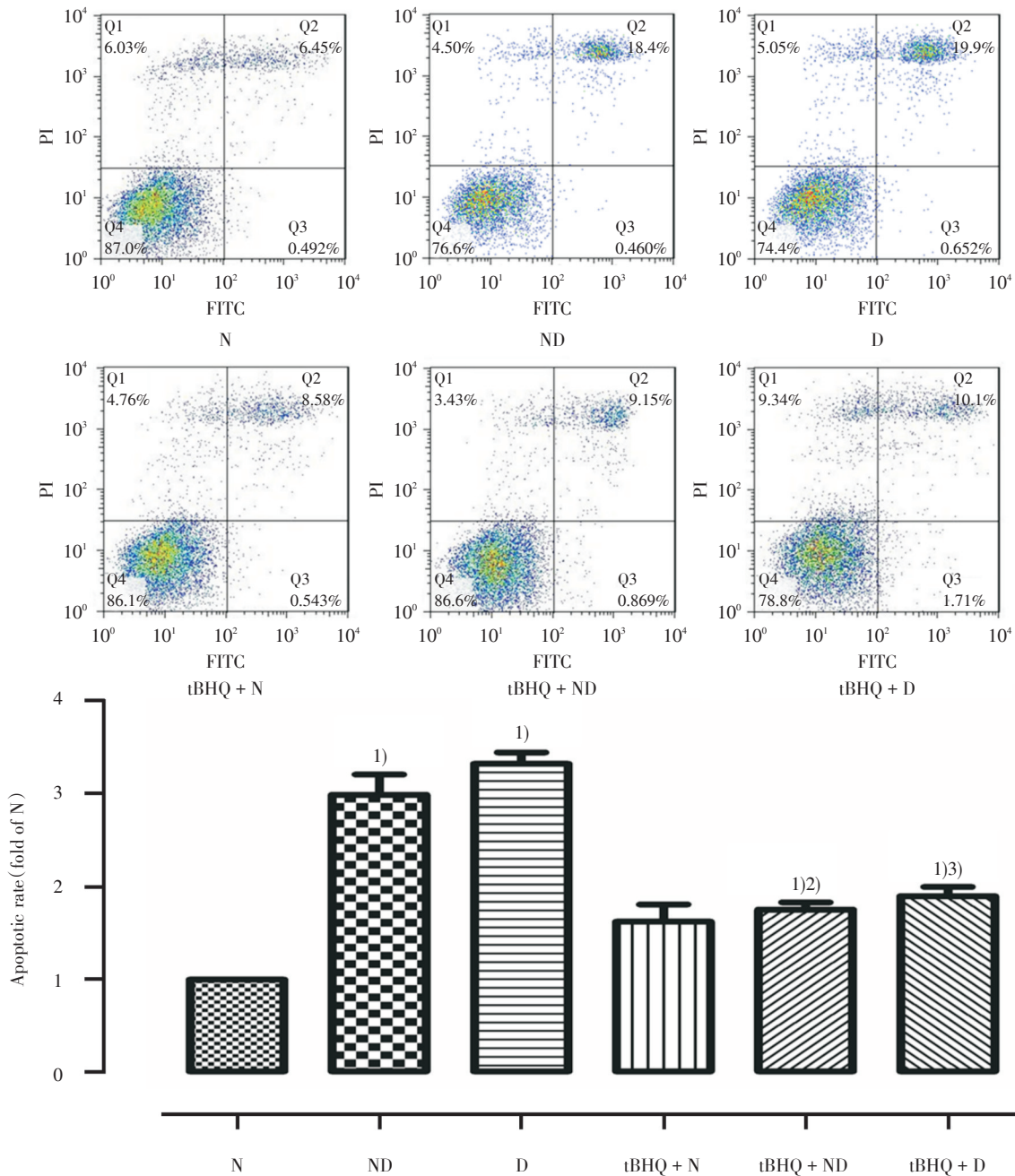
2 结果

2.1 人主动脉内皮细胞凋亡的比较

尿毒症血清可诱导人主动脉内皮细胞凋亡: ND 和 D 组的人主动脉内皮细胞的凋亡率分别为 N 组的 2.99 和 3.31 倍 ($P < 0.0001$); 但是 ND 组和 D 组的人主动脉内皮细胞凋亡率差异无显著性。tBHQ 预处理可降低尿毒症血清诱导的内皮细胞的凋亡率: tBHQ + ND 组的人主动脉内皮细胞的凋亡率为 ND 组的 0.57 ($P = 0.001$), 较 N 组

高,为N组的1.75倍($P = 0.033$);tBHQ + D组的人主动脉内皮细胞的凋亡率为D组的0.57($P < 0.001$),较N组高,为N组的1.9倍($P = 0.009$)。N和tBHQ+N组凋亡率的差异无显著性($P = 0.109$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞的凋

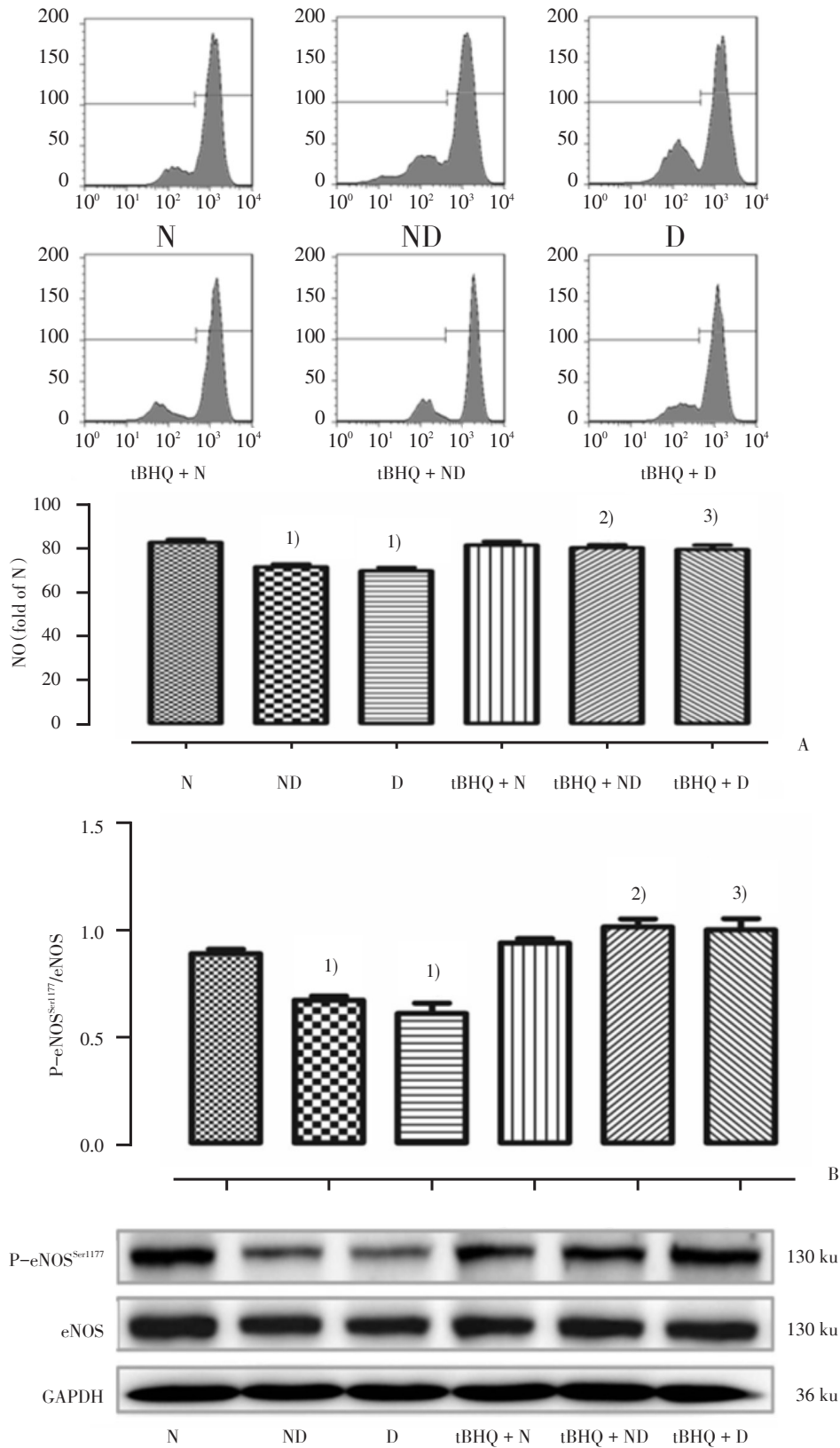
亡率差异有显著性($F = 36.43, P < 0.0001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞的凋亡率差异有显著性($F = 50.55, P < 0.001$),血清及tBHQ两因素间的交互效应有统计学意义($F = 33.99, P < 0.001$,图1)。



N: Normal serum; ND: Non-diabetic hemodialysis serum; D: Diabetic hemodialysis serum; tBHQ + N: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + N; tBHQ + ND: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + ND; tBHQ + D: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + D; $n = 3$, 1) $P < 0.05$ vs N; 2) $P < 0.05$ vs ND; 3) $P < 0.05$ vs D

图1 不同组人主动脉内皮细胞中细胞凋亡的比较

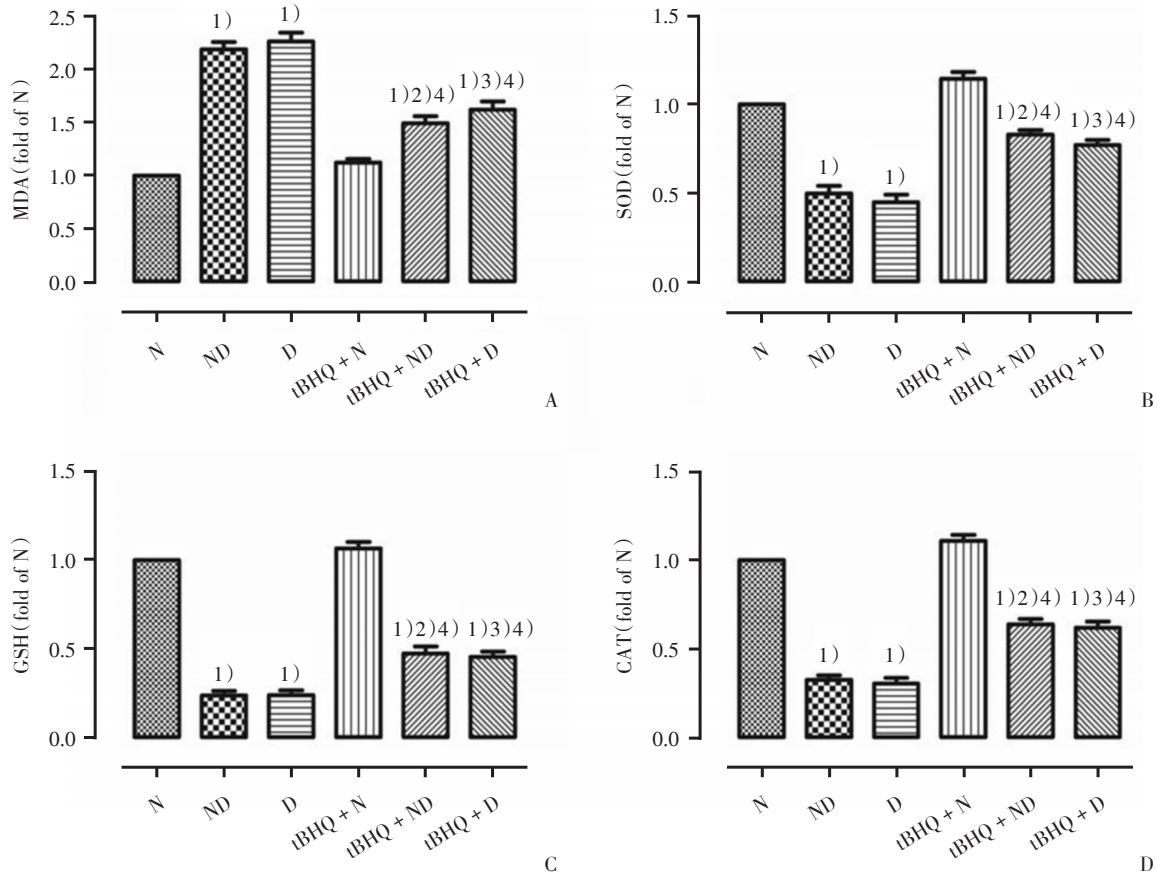
Fig.1 Comparison of the apoptotic rate in aortic endothelial cells



A: Comparison of NO in aortic endothelial cells; B: Comparison of P-eNOS^{Ser1177}/eNOS in aortic endothelial cells. N: Normal serum; ND: Non-diabetic hemodialysis serum; D: Diabetic hemodialysis serum; tBHQ + N: 20 μmol/L tert-butylhydroquinone + N; tBHQ + ND: 20 μmol/L tert-butylhydroquinone + ND; tBHQ + D: 20 μmol/L tert-butylhydroquinone + D. n = 3. 1) P < 0.05 vs N; 2) P < 0.05 vs ND; 3) P < 0.05 vs D

图2 不同组人主动脉内皮细胞NO流式和eNOS Western的比较

Fig.2 Comparison of NO and eNOS in aortic endothelial cells



A, B, C, D: the level of MDA, SOD, GSH, CAT in aortic endothelial cells respectively. N: Normal serum; ND: Non-diabetic hemodialysis serum; D: Diabetic hemodialysis serum; tBHQ + N: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + N; tBHQ+ND: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + ND; tBHQ + D: 20 $\mu\text{mol/L}$ tert-butylhydroquinone + D; $n = 3$. 1) $P < 0.05$ vs N; 2) $P < 0.05$ vs ND; 3) $P < 0.05$ vs D; 4) $P < 0.05$ vs tBHQ + N

图3 不同组人主动脉内皮细胞中MDA, SOD, GSH及CAT的比较
Fig.3 Comparison of MDA, SOD, GSH and CAT in aortic endothelial cells

2.2 人主动脉内皮细胞NO和eNOS的比较

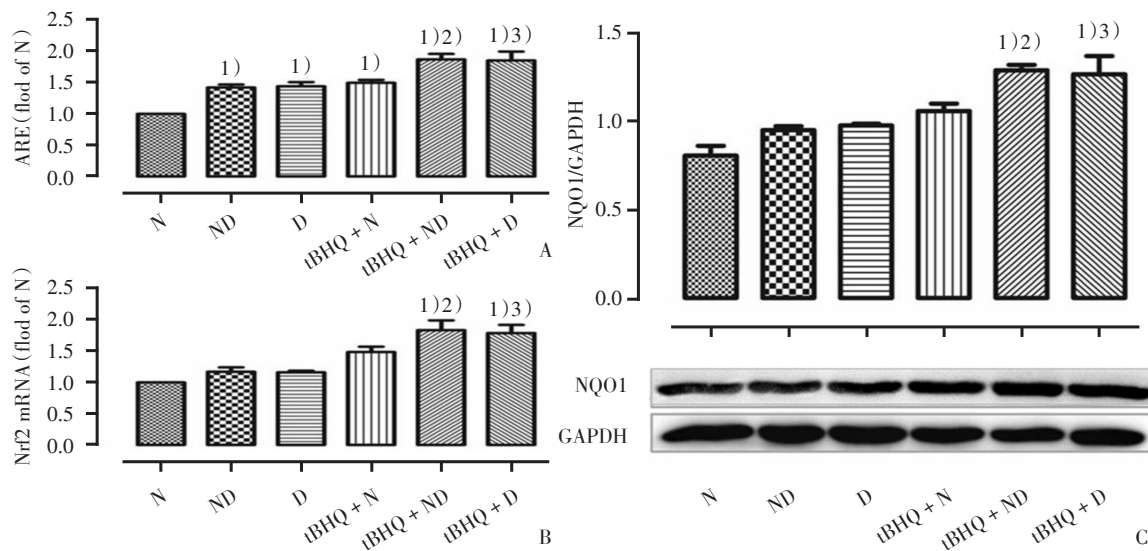
尿毒症血清可抑制人主动脉内皮细胞NO合成;流式细胞学检测显示ND和D组的NO分别为N组的0.81和0.78($P < 0.001$);但ND组和D组的人主动脉内皮细胞中NO含量的差异无显著性。tBHQ预处理可改善尿毒症血清诱导的人主动脉内皮细胞NO含量降低;tBHQ+ND组的人主动脉内皮细胞的NO为ND组的1.22倍($P = 0.009$),与N组比,差异无显著性;tBHQ+D组的人主动脉内皮细胞的NO为D组的1.24倍($P = 0.001$),与N组比,差异无显著性。不同血清培养的人主动脉内皮细胞的NO含量的差异有显著性($F = 32.73$, $P < 0.001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞的NO含量的差异有显著性($F = 26.91$, $P < 0.001$),血清及tBHQ两因素间的交互效应有统计学意义($F = 11.64$, $P = 0.0015$,图2A)。

尿毒症血清可抑制人主动脉内皮细胞eNOS

的表达;Western结果显示人主动脉内皮细胞中P-eNOS^{Ser1177}/eNOS,ND和D组分别为N组的0.67和0.61($P = 0.016$ 和 $P = 0.002$);但ND组和D组的人主动脉内皮细胞P-eNOS^{Ser1177}/eNOS差异无显著性。tBHQ预处理可改善尿毒症血清诱导人主动脉内皮细胞eNOS降低;tBHQ + ND组为ND组的1.52倍($P < 0.001$);而tBHQ + D组为D组的1.64倍,差异有显著性($P < 0.001$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞P-eNOS^{Ser1177}/eNOS的差异有显著性($F = 77.89$, $P < 0.001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞P-eNOS^{Ser1177}/eNOS的差异有显著性($F = 4.742$, $P = 0.030$),血清及tBHQ两因素间的交互效应有统计学意义($F = 13.10$, $P = 0.001$,图2B)。

2.3 人主动脉内皮细胞MDA, SOD, GSH及CAT的比较

尿毒症血清可增强人主动脉内皮细胞氧化



A: the activity of ARE dual luciferase; B: the mRNA expression of Nrf2; C: the protein expression of NQO1. N: Normal serum; ND: Non-diabetic hemodialysis serum; D: Diabetic hemodialysis serum; tBHQ + N: 20 μ mol/L tert-butylhydroquinone + N; tBHQ+ND: 20 μ mol/L tert-butylhydroquinone + ND; tBHQ + D: 20 μ mol/L tert-butylhydroquinone + D; $n = 3$, 1) $P < 0.05$ vs N; 2) $P < 0.05$ vs ND; 3) $P < 0.05$ vs D

图4 不同组人主动脉内皮细胞中Nrf2、NQO1的比较

Fig.4 Comparison of Nrf2 and NQO1 in aortic endothelial cells

应激水平,降低抗氧化应激反应:ND和D组的人主动脉内皮细胞的MDA分别为N组的2.18($P < 0.0001$)和2.26倍($P < 0.001$),但ND组和D组的人主动脉内皮细胞中MDA水平的差异无显著性;与N组相比,ND和D组的人主动脉内皮细胞的SOD、GSH和CAT显著下降($P < 0.001$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.001$);但ND组和D组的SOD、GSH和CAT无显著性。tBHQ预处理可改善尿毒症血清诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激障碍:tBHQ + ND组的MDA为ND组的0.68($P < 0.001$),较N组高,为N组的1.49倍($P < 0.001$),tBHQ + ND组为tBHQ + N组的1.33倍($P = 0.006$);tBHQ + D组为D组的0.71($P < 0.001$),较N组高,为N组的1.62倍($P < 0.001$);与ND组比较,tBHQ + ND及tBHQ + D组的SOD、GSH、CAT均有明显增加($P < 0.001$),但均较N组低($P < 0.05$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞MDA、SOD、GSH及CAT的差异有统计学意义($F = 65.84$, $P < 0.001$, $F = 97.56$, $P < 0.001$, $F = 50.45$, $P < 0.001$ 及 $F = 119.1$, $P < 0.001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞MDA、SOD、GSH及CAT的差异有统计学意义($F = 124.6$, $P < 0.001$, $F = 116.2$, $P < 0.001$, $F = 346.8$, $P < 0.001$ 及 $F = 306.0$, $P < 0.001$),血清及tBHQ两因素间的交互效应有统计学意义($F = 27.91$, $P < 0.001$, $F = 5.052$,

$P = 0.0181$, $F = 4.724$, $P = 0.0224$ 及 $F = 8.874$, $P = 0.0021$,图3)。

2.4 tBHQ对人主动脉内皮细胞的Nrf2-ARE通路激活的影响

tBHQ可增强人主动脉内皮细胞中Nrf2的mRNA表达:tBHQ+ND组的Nrf2-mRNA为ND组的1.57倍($P = 0.005$),为N组的1.83倍($P = 0.001$);而tBHQ+D组的Nrf2-mRNA为D组的1.54倍($P = 0.008$),为N组的1.79倍($P = 0.001$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞的Nrf2-mRNA差异有显著性($F = 58.21$, $P < 0.001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞的Nrf2-mRNA差异有显著性($F = 4.501$, $P = 0.035$),但血清及tBHQ两因素间的交互效应无统计学意义($F = 0.4836$, $P = 0.628$,图4B)。

tBHQ可增强人主动脉内皮细胞NQO1表达:tBHQ + ND组的NQO1蛋白量为ND组的1.35倍($P = 0.01$),为N组的1.6倍($P < 0.001$);同样tBHQ + D组的NQO1是D组的1.3倍($P = 0.035$),为N组的1.57倍($P = 0.001$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞的NQO1表达差异有统计学意义($F = 45.75$, $P < 0.001$),tBHQ预处理的人主动脉内皮细胞的NQO1表达差异有统计学意义($F = 8.343$, $P = 0.005$),但血清及tBHQ两因素间的交互效应

无统计学意义($F = 0.338, P = 0.720$, 图4C)。

ARE 双荧光素酶报告基因检测结果显示 tBHQ 可增加人主动脉内皮细胞的 Nrf2 的活性: tBHQ + ND 组的 ARE 双荧光素酶活性为 ND 组的 1.27 倍($P = 0.012$), 为 N 组的 1.86 倍($P < 0.001$); 同样 tBHQ + D 组的 ARE 双荧光素酶活性也较 D 组高, 是 D 组的 1.28 倍($P = 0.023$), 为 N 组的 1.85 倍($P < 0.001$), 而 tBHQ + N 组较 N 组的 ARE 双荧光素酶活性高, 为 N 组的 1.49 倍($P = 0.004$)。不同血清培养的人主动脉内皮细胞的 ARE 双荧光素酶活性差异有显著性($F = 49.86, P < 0.001$), tBHQ 预处理的人主动脉内皮细胞的 ARE 双荧光素酶活性差异有显著性($F = 17.18, P < 0.001$), 但血清及 tBHQ 两因素间的交互效应无统计学意义($F = 0.144, P = 0.867$, 图4A)。

3 讨论

我们发现非糖尿病和糖尿病尿毒症患者血清均可诱导人主动脉内皮细胞功能障碍, 氧化应激反应增强, 抗氧化系统受损; 而使用 tBHQ 激活 Nrf2-ARE 通路可减轻人主动脉内皮细胞损伤, 降低内皮细胞氧化应激反应, 增强抗氧化活性。这表明, 激活 Nrf2-ARE 通路, 可改善尿毒症血清诱导的内皮细胞功能障碍, 而抗氧化系统活化, 氧化应激减轻可能是其重要的机制之一。

尿毒症患者由于肾脏功能衰竭, 体内多种代谢产物和毒素不能被排出, 这些物质在血液中蓄积, 对心血管系统、肾脏等系统和器官造成损伤, 并且引起尿毒症的一系列临床症状^[12]。血液中的尿毒症毒素与血管的内皮细胞直接接触, 可损伤内皮细胞, 导致其功能障碍^[13]。同时尿毒症状态下, 机体普遍存在氧化反应与抗氧化防御失衡, 氧化应激增强。有实验发现, 尿毒症患者血清与脐静脉内皮细胞共培养, 可导致细胞 MDA、活性氧产生增加, 炎症反应加强, NO 含量减少, 细胞增殖活力减弱^[11]。在本研究中, 同样发现在尿毒症患者血清刺激下, 人主动脉内皮细胞发生氧化应激反应, 抗氧化酶系统受损, 细胞凋亡率增加, 出现内皮细胞功能障碍。

Nrf2-ARE 信号通路是强大的内源性抗氧化调控通路, 其激活可编码超过 200 个保护基因, 形成交互作用的抗氧化网络^[14]。我们前期实验使用

tBHQ 激活 Nrf2-ARE 通路, 可改善高糖条件下小鼠足细胞内氧化应激损伤, 增加抗氧化酶活性, 减轻足细胞的损伤^[15]。亦有研究表明改变 Nrf2 的活性可以调节内皮细胞 eNOS 的活性, 调控 NO 的产生, 最终引起内皮细胞的一系列功能改变^[16]。关于激活 Nrf2-ARE 通路是否能改善尿毒症血清诱导的内皮细胞功能障碍的研究甚少。在本实验发现尿毒症患者血清能诱导内皮细胞中 Nrf2-ARE 基因增加, 这可能是由于尿毒症病变与氧化应激密切相关, 能代偿性的激活抗氧化系统, 但这种激活程度非常有限, 不足以限制氧化应激的状态^[16-17]。而使用激动剂进一步激活 Nrf2-ARE 通路, 发现其下游的抗氧化系统中的 NOQ1 蛋白表达增多, 氧化代谢产物 MDA 产生减少, 抗氧化系统表达增加, 细胞凋亡和内皮细胞功能障碍改善。

糖尿病是尿毒症患者心血管事件的危险因素之一, 并且在临床上我们也发现糖尿病尿毒症患者的血管事件通常较非糖尿病尿毒症患者更严重^[18-19]。但是在本实验中, 我们把血清分成非糖尿病尿毒症患者血清组和糖尿病尿毒症患者血清组, 发现虽然糖尿病尿毒症患者血清组的内皮细胞功能、细胞凋亡率以及抗氧化系统的损伤较非糖尿病尿毒症患者血清组严重, 但其差异却没有统计学意义。这可能是由于在本研究中, 细胞是在体外培养的, 体外环境与实际机体内环境有一定的差别, 血清与细胞共培养时间较短等多种因素造成。

本实验还有一些不足。第一, 本实验为体外实验, 其构建的反应环境与体内环境有所差别, 得到的实验结果可能与动物实验及临床研究不同; 第二, 本研究中的样本量较少, 并且主要为我院血液透析患者, 可能存在一定的抽样差异。因此, 我们还需要更多大样本实验研究以进一步探讨; 第三, 还需下调 Nrf2 表达, 以便更加完善的论证激活 Nrf2-ARE 信号通路可改善尿毒症患者血清诱导的人主动脉内皮细胞功能障碍, 减轻氧化应激, 但由于本次试验细胞是原代细胞, 尿毒症血清对细胞的损伤较大, 使细胞转染成功率低, 转染后细胞的死亡率较高, 因此我们未能完成下调 Nrf2 表达的实验, 需要今后进一步完善。此外, 我们需要动物实验进一步证实 Nrf2-ARE 通路对尿毒症诱导内皮细胞氧化应激反应和内皮功能障碍的保护作用及其机制。

综上所述,尿毒症血清能诱导人主动脉内皮细胞氧化应激增强和内皮功能障碍;激活 Nrf2-ARE 信号通路可减轻尿毒症患者血清诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激和内皮功能障碍。

参考文献:

- [1] Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9981): 1975-1982.
- [2] Mohamed B, Yang W, Litt H, et al. Valvular calcification, inflammation, and mortality in dialysis patients [J]. *Heart Valve Dis*, 2013, 22(4): 584-590.
- [3] Bakhtawar K, Kunihiro M, Mark W, et al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without hypertension: a meta-analysis [J]. *Lancet*, 2012, 380 (9854): 1649-1661.
- [4] Gunthner T, Jankowski V, Kretschmer A, et al. Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia [J]. *Semin Dial*, 2009, 22(4): 428-432.
- [5] 于治利. 一氧化氮与血管内皮细胞功能障碍 [J]. *吉林医学*, 2011, 32 (2): 318-320.
Yu ZL. Nitric oxide and endothelium dysfunction [J]. *J Jilin med*, 2011, 32 (2): 318-320.
- [6] Widlansky M, Gokce N, Keaney J, et al. The clinical implications of endothelial dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(7): 1149-1160.
- [7] Stentz F, Umpierrez G, Cuervo R, et al. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises [J]. *Diabetes*, 2004, 53(8): 2079-2086.
- [8] Sohal R, Arnold L, Sohal B. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species [J]. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9 (6): 495-500.
- [9] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [10] Shen G, Jeong WS, Hu R, et al. Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents [J]. *J Antioxid Redox Signal*, 2005, 7 (11-12): 1648-1663.
- [11] 隋伟,袁伟杰,于青,等. 尿毒症血清促进脐静脉内皮细胞活性氧? 白介素-6的产生及左旋肉毒碱的干预作用 [J]. *中国血液净化*, 2007, 6(10): 534-537.
- [12] Sui W, Yuan WJ, Yu Q, et al. Effect of L-carnitine on the expression of IL-6 and reactive oxygen species in human umbilical vein endothelial cells cultured in medium containing uremic serum [J]. *Chin J Blood Purif*, 2007, 6(10): 534-537.
- [13] Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(7): 1258-1270.
- [14] Meert N, Schepers E, De SR, et al. Inconsistency of reported uremic toxin concentrations [J]. *J Artif Organs*, 2007, 31(8): 600-611.
- [15] 高鹏,唐修文,王秀.Nrf2 /ARE 通路在消化道肿瘤预防中的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2012, 41(4): 453-463.
Gao P, Tang XW, Wang X. The progress of Nrf2/ARE pathways in the digestive tumor prevention [J]. *J zhejiang univ (med edit)*, 2012, 41(4): 453-463.
- [16] 李翠翠,叶增纯,龚文玉,等. 激活核因子E2相关因子2信号通路减轻高糖诱导足细胞的凋亡 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(6): 831-837.
Li CC, Ye ZC, Gong WY, et al. Activation of nuclear factor erythroid-2 related factor signal pathway reduced apoptosis in podocyte induced by high glucose [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2013, 34(6): 831-837.
- [17] Lou Z, Aslam S, Welch WJ, et al. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 coordinates dimethylarginine dimethylaminohydrolase/PPAR-gamma/endothelial nitric oxide synthase pathways that enhance nitric oxide generation in human glomerular endothelial Cells [J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 896-902.
- [18] Choi BH, Kang KS, Kwak MK. Effect of redox modulating Nrf2 activators on chronic kidney disease [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12727-12759.
- [19] Yang YF, Li TC, Li CI, et al. Visit-to-visit glucose variability predicts the development of end-stage renal disease in type 2 diabetes: 10-year follow-up of Taiwan diabetes study [J]. *Medicine*, 2015, 94 (44): e1804.
- [20] Chang YT, Wu JL, Hsu CC, et al. Diabetes and end-stage renal disease synergistically contribute to increased incidence of cardiovascular events: A nationwide follow-up study during 1998-2009 [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(1): 277-285.

(编辑 孙慧兰)