

# GLP-1 通过 NOX4 信号通路拮抗 AGE 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤

孙慧琳<sup>1</sup>, 黄志秋<sup>1</sup>, 曾海龙<sup>1</sup>, 张艺能<sup>2</sup>, 莫旭旭<sup>1</sup>, 陈宏<sup>3</sup>

(1,2.广东药学院附属第一医院 内分泌科<sup>1</sup>, 中心实验室<sup>2</sup>, 广东 广州 510080; 3. 南方医科大学珠江医院内分泌科, 广东 广州 510280)

**摘要:**【目的】探讨 NOX4 信号通路在胰高血糖素样肽-1(GLP-1)拮抗糖基化终末产物(AGE)诱导的内皮细胞氧化损伤的作用机制。【方法】实验组分为对照组、AGE 组、AGE+GLP-1 组、AGE+NOX4 siRNA 组及 AGE+阴性 siRNA 组, RT-PCR 检测 NOX4 mRNA 表达, Western Blotting 技术检测 NOX4 蛋白表达情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡率、ROS 生成水平。【结果】与对照组相比, AGE 可诱导细胞 NOX4 蛋白表达( $P = 0.001$ )及 NOX4 mRNA 表达( $P < 0.05$ )明显增高; 加入 GLP-1 后, 增高的 NOX4 蛋白( $P = 0.003$ )及 NOX4 mRNA( $P < 0.05$ )明显下降。与 AGE 组相比, NOX4 siRNA 可抑制 AGE 诱导的 ROS 生成( $P = 0.011$ )、细胞凋亡( $P < 0.05$ ); 阴性 siRNA 对 AGE 诱导的 ROS 生成( $P = 0.958$ )、细胞凋亡( $P = 0.169$ )无明显影响。【结论】GLP-1 至少部分通过抑制 NOX4 蛋白表达拮抗 AGE 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤。

**关键词:** 胰高血糖素样肽-1; NOX4 蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 氧化损伤

中图分类号: R78 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2016)02-0197-05

## Glucagon-like Peptide-1 Antagonized Oxidative Damage on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Advanced Glycation Endproducts Through NOX4 Signaling Pathway

SUN Hui-lin<sup>1</sup>, HUANG Zhi-qiu<sup>1</sup>, ZENG Hai-long<sup>1</sup>, ZHANG Yi-neng<sup>2</sup>, MO Xu-xu<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, 2. Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Corresponding to: CHEN Hong, E-mail: rubychq@163.com

**Abstract:** 【Objective】To discuss the role of NOX4 signaling pathway in the antagonistic mechanism of Glucagon-like Peptide-1 against the oxidative damage on vascular endothelial cells induced by advanced glycation endproducts. 【Method】Experimental group was divided into a control group, AGE group, AGE + GLP-1 group, AGE + NOX4 siRNA group and AGE + negative control siRNA group. The expression of NOX4 mRNA was detected by RT-PCR. The expression of NOX4 protein was detected by Western blotting. The apoptosis rate and the levels of ROS were detected by flow cytometry. 【Results】Compared with control group, AGE significantly promoted the expression of NOX4 protein ( $P = 0.001$ ) and NOX4 mRNA ( $P < 0.05$ ). After added GLP-1 into the AGE group, it significantly inhibited the expression of NOX4 protein ( $P = 0.003$ ) and NOX4 mRNA ( $P < 0.05$ ). Compared with AGE group, NOX4 siRNA inhibited the ROS generation ( $P = 0.011$ ), the apoptosis of endothelial cells ( $P < 0.05$ ). Negative control RNA had no influence on the ROS generation ( $P = 0.958$ ), the apoptosis of endothelial cells ( $P = 0.169$ ). 【Conclusion】GLP-1 antagonize oxidative damage on human umbilical endothelial cells induced by advanced glycation endproducts at least partly through inhibiting the expression of NOX4 protein.

**Key word:** glucagon-like peptide-1; NOX4 protein; human umbilical vein endothelial cells; oxidative damage

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2): 197-201]

收稿日期: 2015-11-03

基金项目: 广东省自然科学基金(S2011010002074); 清远市科技计划(2011B011112044)

作者简介: 孙慧琳, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 糖尿病临床与基础研究, E-mail: sun-hui-lin@126.com; 陈宏, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: rubychq@163.com

糖尿病性血管病变是糖尿病致死致残的主要原因。病理浓度的糖基化终末产物(advanced glycation endproducts, AGE)可诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,损伤血管内皮细胞。新型降糖药胰高血糖素样肽 1(Glucagon like Peptide-1, GLP-1)可通过受体或非受体依赖性途径直接改善内皮功能。血管内皮细胞 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)的主要表现形式是 NOX4, 后者是 AGE 诱导内皮细胞氧化损伤中 ROS 生成的重要来源<sup>[1]</sup>。本课题主要研究 NOX4 信号通路在 GLP-1 保护 AGE 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要实验试剂与仪器

NOX4 siRNA(上海吉玛制药技术有限公司), NC-siRNA(上海吉玛制药技术有限公司), DCFH-DA 荧光试剂(美国 Sigma 公司), Annexin V/PI 检测试剂盒(中国宝赛生物技术公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物公司), 流式细胞仪(BIO-RAD, 美国), 荧光显微镜(Nikon eclipse Te2000u, 日本), 酶标仪(BIO-RAD, 美国), Hema9600 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司, 中国)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 HUVEC 的分离、培养及鉴定 HUVEC 的分离、培养及鉴定具体步骤详见本课题前期研究文献<sup>[2]</sup>。

1.2.2 AGE 制备 AGE 的制备具体步骤详见参考文献<sup>[3]</sup>。

1.2.3 实验分组 分为对照组、AGE 组、AGE+GLP-1 组、AGE+NOX4 siRNA 组及 AGE+阴性 siRNA 组。

1.2.4 RT-PCR 检测 HUVEC 的 NOX4 mRNA 表达 选择第 3-4 代 HUVEC, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。实验分为 3 组: 空白对照组、AGE 组、AGE+GLP-1 组, 当细胞铺板面积超过 90%时, 先后加入 100 nmol/L 的 GLP-1 溶液和 400 μg/mL 的 AGE, 培养 24 h 后消化收集各组细胞, 离心取细胞, 按照操作说明提取 RNA。使用 RNase-free 的 DNase 配置反应液, 离心去上清收集 RNA 沉淀, 洗涤风干后加入 10 μL DEPC 水溶解沉淀。

RNA 转移至 PCR 管中, 加入引物混合物, 按操作步骤进行逆转录。以 β-actin Forward: atgtggcgcgag gactttgat Reverse: tggcttttaggatggcaagg 为内参引物, 使用 ViiA7 软件在温度 60 °C ~ 95 °C 条件下, 每分钟读 1 次。

### 1.2.5 Western Blotting 法检测 NOX4 蛋白表达

实验分 3 组: 空白对照组、AGE 组、AGE+GLP-1 组, 各试剂加入浓度及顺序同上。收集细胞转移至离心管冰浴, 充分裂解细胞(裂解液中, PMSF 工作浓度为 1 mmol/L), 离心取上清。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作测定蛋白质浓度。经过电泳、转膜后, 放入 10%脱脂奶粉封闭液中 2 h; 一抗鼠 NOX4 蛋白反应 1.5 h, 二抗 1:3000 辣根过氧化物酶反应 1 h, 洗膜显影。用 Image J 图像系统分析, 以各组细胞 NOX4 蛋白表达与内参 α-Tubulin 表达的比值作为 NOX4 蛋白表达水平。

1.2.6 Western Blotting 检测 NOX4 siRNA 干扰效率 方法同上。通过检测 NOX4 蛋白表达, 分析本实验 NOX4 siRNA 片段及阴性 siRNA 对照是否可抑制细胞 NOX4 表达。

1.2.7 流式细胞仪检测 HUVEC ROS 的生成水平及凋亡率 实验分组包括空白对照组、AGE 组、AGE+NOX4 siRNA 组, 共 3 组。以上每组可 3 孔。NOX4 siRNA 转染成功后加入 GLP-1 (100 nmol/L) 或 AGE(400 μg/mL), 作用 24 h 后收集细胞做细胞凋亡率检测, 作用 24 h 后加入 DCFH-DA 共孵育 30 min 检测 ROS 荧光强度。

### 1.3 统计学处理

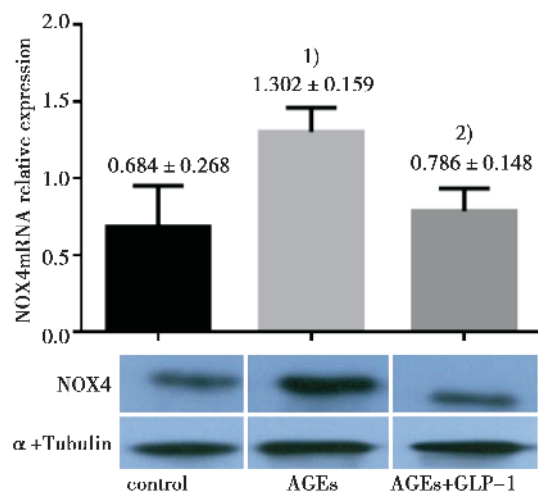
数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理, 计量资料以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 GLP-1 对 AGE 诱导 HUVEC NOX4 蛋白表达的影响

Western Blotting 检测 NOX4 蛋白表达, 目的条带均用 Image J 分析软件对其进行灰度值检测, 结果分析采用灰度值校正(每组条带灰度值/内参 α-Tubulin), 如图 1。方差分析显示, 各组件差异具有统计学意义( $F = 12.367, P = 0.001$ )。与空白组( $0.684 \pm 0.268$ )相比, AGE 可诱导细胞 NOX4 蛋

白表达明显增高 ( $1.302 \pm 0.159$ ;  $P = 0.001$ ), 加入 GLP-1 后, AGE 诱导的 NOX4 蛋白可明显下降 ( $0.786 \pm 0.148$ ;  $P = 0.003$ ), 提示 GLP-1 可抑制 AGE 诱导的 NOX4 蛋白表达作用。



1) vs control group  $P < 0.05$ ; 2) vs AGE-induced group  $P < 0.05$ .

图 1 GLP-1 对 AGE 诱导细胞 NOX4 表达的影响

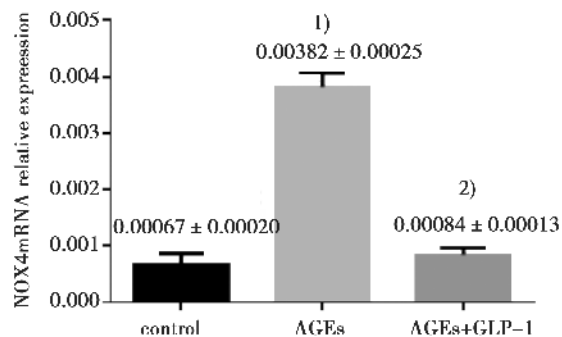
Fig.1 Effects of GLP-1 on the expression of NOX4 induced by AGE

## 2.2 GLP-1 对 AGE 诱导 HUVEC NOX4 mRNA 表达的影响

以  $\alpha$ -Tubulin 内参为对照, NOX4 mRNA 表达水平用相对模板量 (RQ) 表示, RQ 根据 Ct (threshold cycle) 值用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 ( $\Delta Ct =$  目的基因 Ct - 内参 Ct;  $\Delta\Delta Ct =$  待测样品中目的基因  $\Delta Ct$  - 参照样中目的基因  $\Delta Ct$ ; 相对样品模板量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), 结果如图 2 显示, 与空白组 [ $(0.67 \pm 0.20) \times 10^{-3}$ ] 相比, AGE 可诱导细胞 NOX4 mRNA 表达明显增高 [ $(3.82 \pm 0.25) \times 10^{-3}$ ,  $P < 0.05$ ], 加入 GLP-1 后, 增高的 NOX4 mRNA 可明显下降 [ $(0.84 \pm 0.13) \times 10^{-3}$ ,  $P < 0.05$ ]。

## 2.3 HUVEC 的 NOX4 siRNA 的合成及转染

转染及 AGE 干预后, 进行 Western Blotting 检测干扰效率, 结果用 NOX4 蛋白表达条带相对灰度值表示 (图 3)。方差分析显示, 各组间 NOX4 蛋白表达具有统计学差异 ( $F = 5.176$ ,  $P = 0.049$ )。多重比较显示, 与空白组 ( $0.641 \pm 0.069$ ) 比较, 该 NOX4 siRNA 片段可明显抑制 NOX4 蛋白的表达 ( $0.486 \pm 0.078$ ;  $P = 0.033$ ), 而阴性 siRNA 片段

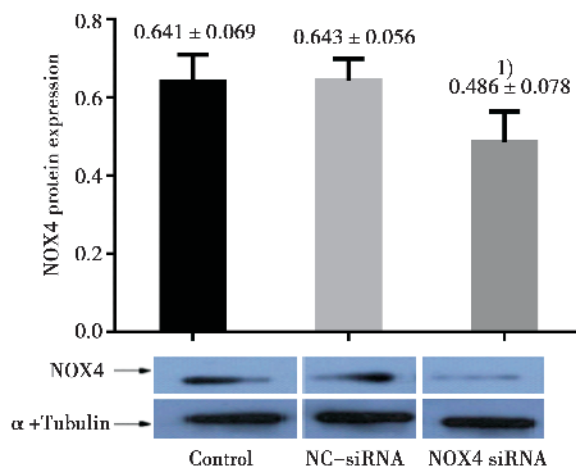


1)  $P < 0.05$  vs blank control group. 2)  $P < 0.05$  vs AGE-induced group.

图 2 GLP-1 对 AGE 诱导 HUVEC NOX4 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effects of GLP-1 on the expression of NOX4 mRNA induced by AGE

(NC-siRNA) 对 NOX4 蛋白表达无影响 ( $0.643 \pm 0.056$ ;  $P = 0.972$ )。



1)  $P < 0.05$  vs blank control group

图 3 NOX4 siRNA 对 AGE 诱导细胞 NOX4 蛋白表达的影响

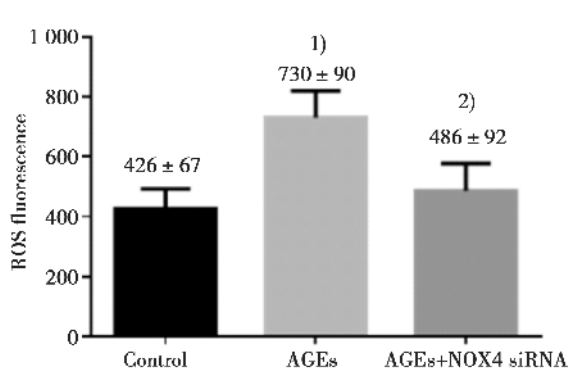
Fig.3 The effect of NOX4 siRNA on NOX4 protein expression induced by AGE

## 2.4 沉默 NOX4 mRNA 对内皮细胞 ROS 生成的影响

方差分析显示, 各组 ROS 生成水平具有显著差异 ( $F = 9.466$ ,  $P = 0.005$ )。两两比较表明, 与单纯 AGE 处理组 ( $731 \pm 90$ ) 比较, NOX4 siRNA 可抑制 AGE 诱导的 ROS 生成 ( $486 \pm 92$ ;  $P = 0.011$ ; 图 4)。

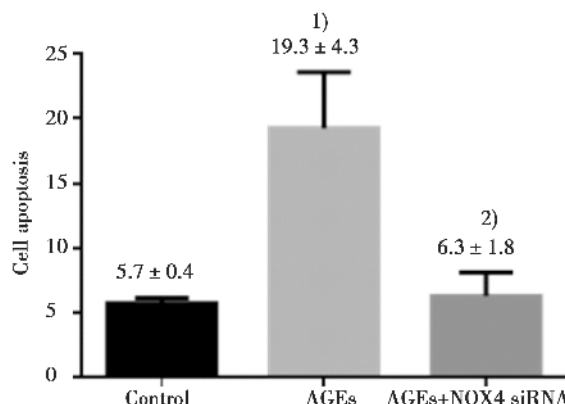
## 2.5 沉默 NOX4 mRNA 对内皮细胞凋亡率的影响

方差分析显示, 各组细胞凋亡率具有显著差



1)  $P < 0.05$  vs blank control group. 2)  $P < 0.05$  vs AGE treatment group.

图 4 NOX4 siRNA 对内皮细胞 ROS 荧光强度的影响  
Fig.4 Effects of NOX4 siRNA on ECs ROS fluorescence



1)  $P < 0.05$  vs blank control group. 2)  $P < 0.05$  vs AGE treatment group.

图 6 NOX4 siRNA 对细胞凋亡率的影响  
Fig.6 Effects of NOX4 siRNA on cell apoptosis

异( $F = 22.553, P < 0.05$ )。两两比较表明,与单纯 AGE 处理组( $19.3 \pm 4.3$ )比较,NOX4 siRNA 可抑制 AGE 诱导的细胞凋亡( $6.3 \pm 1.8; P < 0.05$ ; 图 5、图 6)。

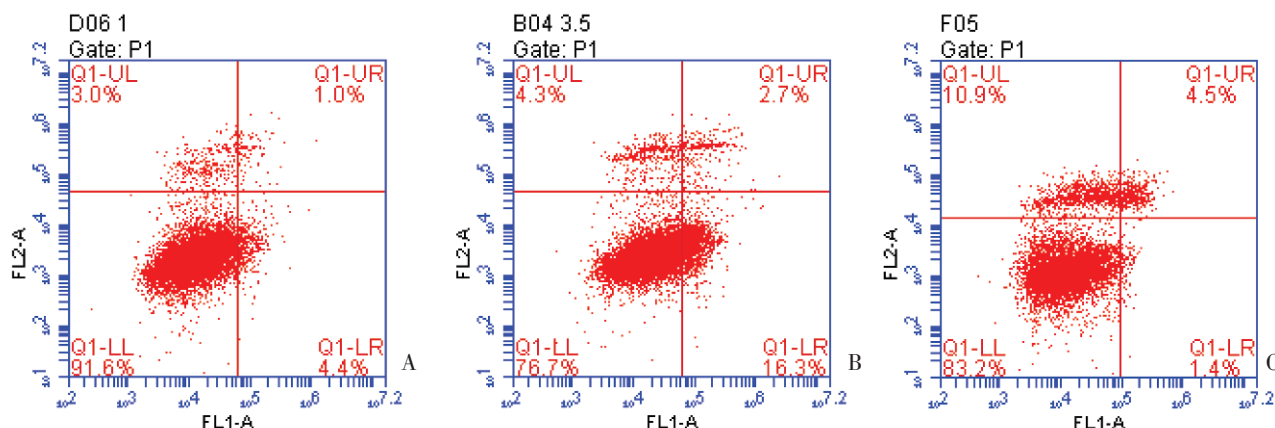
### 3 讨论

《中国成人糖尿病流行与控制现状》研究表明,2010 年中国 18 岁及以上成人糖尿病患病率达 11.6%, 糖尿病前期率为 50.1%<sup>[4]</sup>。糖尿病可导致多种急慢性并发症,其中以糖尿病性血管病变最为显著,是糖尿病致死致残的主要原因。

AGE 在糖尿病血管并发症如动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)等的发生、发展中起重要作

用<sup>[5-6]</sup>。He 等<sup>[7]</sup>的研究表明,病理浓度的 AGE 沉积在血管壁,细胞表面受体(Receptor of Advanced glycation endproducts, RAGE)介导 AGE 激活氧化应激,诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成水平增高,活化 NF- $\kappa$ B、炎症因子,促进血管内皮细胞凋亡,促进 AS 的发生发展。本实验中 AGE 组的 ROS 水平及细胞凋亡率均高于空白对照组,与 He 等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。

在国内外多项证据提示 NADPH 氧化酶或许在调节 ROS 生成及细胞凋亡方面发挥重要作用<sup>[8]</sup>。目前已知 NADPH 氧化酶有 6 个亚型分别为 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、双氧化酶 1(Dual oxidase 1, DUOX1)及 DUOX2,而在内皮细胞中主要表达的为 NOX4<sup>[9-10]</sup>。NOX 家族的分布具有高度组织特异



Flow cytometric analysis of HUVEC apoptosis induced by normal condition(A), AGE(B), AGE+ NOX4 siRNA(C).

图 5 NOX4 siRNA 对 AGE 诱导内皮细胞凋亡的影响  
Fig.5 Effects of NOX4 siRNA on ECs apoptosis induced by AGE

性,其中 NOX4 主要表达于血管和肾脏中,是血管内皮细胞 NOX 的主要表现形式,是 AGE 诱导内皮细胞氧化损伤中 ROS 生成的重要来源,通过抑制 NOX 活性可减轻 AGE 对血管内皮细胞、系膜细胞等的氧化损伤<sup>[11]</sup>。

胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide, GLP-1) 是由肠道内分泌细胞和脑神经细胞分泌的多肽类激素,具有促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素的释放、保护心血管系统等作用<sup>[12]</sup>。诸多文献报道均显示,AGE 可显著诱导内皮细胞 NOX4 mRNA 和蛋白表达,使 ROS 生成增加<sup>[13]</sup>。抗氧化是 GLP-1 有效保护内皮细胞的重要机制之一, GLP-1 呈剂量依赖性降低 AGE 诱导下内皮细胞的 ROS 水平,但其具体保护机制尚未研究透彻。本研究发现 GLP-1 可显著抑制 AGE 诱导的 NOX4 mRNA 和蛋白表达,我们推测 GLP-1 通过抑制 NOX4 蛋白表达降低 ROS 的生成水平,从而起到保护内皮细胞的作用。

Scioli 等<sup>[14]</sup>的研究证实 NOX4 是诱导内皮细胞氧化应激及功能失调的关键因素,阻断 NOX4 可以有效抑制内皮细胞氧化损伤。本研究阻断 NOX4 的生物学效应后,AGE 诱导的内皮细胞 ROS 生成及细胞凋亡率明显降低,提示 NOX4 可能参与了 HUVEC 的 ROS 生成的调控。结合 NOX4 在内皮细胞分布的高度组织特异性,NOX4 可能在内皮细胞 ROS 生成过程中发挥关键作用。这与 Scioli 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。综上所述,GLP-1 至少部分通过抑制 NOX4 蛋白表达拮抗 AGE 诱导的人脐静脉内皮细胞氧化损伤。

GLP-1 作为一种治疗 2 型糖尿病的新型降糖药物,多项体外实验、临床研究都证实其对心血管系统有保护作用,但仍缺乏大规模的随机对照临床研究支持。ELIXA 是第一个报道 GLP-1 受体激动剂治疗糖尿病患者伴心血管事件风险的安全性和疗效的实验。目前该临床试验仍在进行中,大规模的数据采集仍将持续一段时间。目前仍缺乏关于 GLP-1 保护内皮细胞的临床试验证据,本研究通过研究信号通路证实 GLP-1 具有抗氧化保护血管内皮细胞的作用,为 GLP-1 的应用推广提供一定的基础研究支持。同时,本研究也存在不足,如并未进一步探讨下调的 NOX4 蛋白水平与 GLP-1 抗氧化作用的关联性。Krasner 等<sup>[15]</sup>的研究表明利拉鲁肽通过增加胞内钙离子、激活

CAMKK $\beta$ —AMPK 信号通路保护人主动脉内皮细胞作用。本研究重点关注 GLP-1 通过抑制 NOX4 蛋白保护内皮细胞,但并未深入研究其具体分子机制。究竟 NOX4 蛋白是哪条信号通路的产物,其抗氧化作用除了减少 ROS 生成外,还可以有哪些抗氧化机制? 下一步实验将重点研究 NOX4 蛋白的抗氧化机制。

#### 参考文献

- [1] GORIN Y, BLOCK K. Nox as a target for diabetic complications [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 125 (8): 361-382.
- [2] 孙慧琳, 湛奕, 刘珍珍, 等. 人脐静脉内皮细胞的原代培养及鉴定 [J]. *广东医学*, 2012, 33(06): 744-746.
- [3] SUN HL, ZHAN Y, LIU ZZ, et al. Culture and identification of human umbilical Vein Endothelial cells [J]. *Guangdong Med J*, 2012, 33(06): 744-746.
- [4] HORIUCHI S, ARAKI N, MORINO Y, et al. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (12): 7329-7332.
- [5] 康继宏, 宁光, 吴家睿, 等. 中国糖尿病防治研究的现状和挑战 [J]. *转化医学研究(电子版)*, 2012, 2 (03): 1-24.
- [6] KANG JH, LING G, WU JR, et al. Diabetes research in China: current status and future challenges [J]. *Transl Med Res (E Ed)*, 2012, 2(03): 1-24.
- [7] PUGLIESE G, IACOBINI C, BLASETTI FC, et al. The dark and bright side of atherosclerotic calcification [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 238(2): 220-230.
- [8] AL RIFAI M, SCHNEIDER AL, ALONSO A, et al. sRAGE, inflammation, and risk of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study [J]. *J Diab Complic*, 2015, 29 (2): 180-185.
- [9] HE M, SIOW RC, SUGDEN D, et al. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011, 21(4): 277-285.
- [10] WANG J, TOBA H, MORITA Y, et al. Endothelial dysfunction, macrophage infiltration and NADPH oxidase -dependent superoxide production were attenuated by erythropoietin in streptozotocin -induced diabetic rat aorta [J]. *Pharmacology*, 2013, 91(1-2):

(下转第 209 页 to page 209)