高糖诱导内质网应激对血管内皮细胞炎症反应的作用

丘雅维[1]，陈燕铭[1]，吕秋菊[1]，李晓峰[2]，江 玮[1]，曾龙驿[1*]
（中山大学附属第三医院 1.内分泌与代谢病学科，2.儿科，广东 广州 510630）

摘 要：【目的】探讨高糖通过诱导内质网应激(ERS)引起人脐静脉内皮细胞(EAhy926)炎症反应的作用机制。【方法】人脐静脉内皮细胞给予正常浓度糖(5.5 mmol/L)或高浓度糖(25 mmol/L)干预 0、2、4、8、12 h，或 ERS 诱导剂毒胡萝卜素(TG)0.5 μmol/L 干预 24 h。Western blot 检测下列蛋白表达水平：细胞间黏附因子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)等炎症因子；葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、磷酸化真核细胞翻译起始因子 2α(p-eIF2α)、活化转录因子 4(ATF4)等 ERS 标志蛋白；以及磷酸化信息传递与转录活化因子 3(p-STAT3)和总信息传递与转录活化因子 3(t-STAT3)。【结果】炎症因子 ICAM-1、TNFα，ERS 标志蛋白 GRP78、p-eIF2α、ATF4 以及 p-STAT3 等蛋白的表达均随高糖干预时间的延长而逐步增加，除 GRP78 在干预 8 h 后达到峰值($P<0.05$)，其余蛋白均在干预 12 h 后达到峰值($P<0.05$)。给予 ERS 诱导剂 TG 干预细胞 24 h，GRP78、p-eIF2α、ICAM-1、TNFα 的表达水平均明显增加，分别是对照组的 5.55 倍、1.63 倍、1.76 倍、2.07 倍($P<0.05$)；此外，p-STAT3 的表达水平也有所增加，为对照组的 2.15 倍($P<0.05$)，但 t-STAT3 水平无明显变化($P>0.05$)。【结论】高糖可诱导内皮细胞发生 ERS 与炎症反应，ERS 诱导剂可诱发细胞的炎症反应，磷酸化的 STAT3 信号途径可能起到连接 ERS 与炎症反应的重要作用。

关键词：内质网应激；炎症反应；人脐静脉内皮细胞；信息传递与转录活化因子 3
中图分类号：R774.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2013)01-0059-06

Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Inducing Inflammation in Vascular Endothelial Cell

QIU Ya-wei[1], CHEN Yan-ming[1], LV Qiu-ju[1], LI Xiao-feng[2], JIANG Wei[1], ZENG Long-yi[1*]
(1.Department of Endocrinology & Metabolism; 2.Department of Pediatrics, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the relationship between endoplasmic reticulum stress (ERS) and inflammation in human umbilical vein endothelial cell lines (EAhy926) exposed to high glucose. 【Methods】 The EAhy926 cells were incubated in normal glucose (NC, 5.5 mmol/L) or high glucose (HG, 25 mmol/L) for 0, 2, 4, 8, 12 hours, or exposed to ERS inducer thapsigargin (TG, 0.5 μmol/L) for 24 hours. Western blot analysis was employed to assess the protein expression of inflammatory factors: intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor-α (TNFα), ERS markers: glucose-regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor-2α (p-eIF2α), activating transcription factor 4 (ATF4), and phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3(p-STAT3), total STAT3 (t-STAT3).【Results】The protein expression of inflammatory factors, ERS markers and p-STAT3, were significantly increased in a time-dependent manner after HG treatment. Except the level of GRP78 was peaked at 8 hours ($P<0.05$), all the others were peaked at 12 hours ($P<0.05$). Moreover, after exposure of EAhy926 cells to ERS inducer TG, the protein expression of GRP78, p-eIF2α, ICAM-1, TNFα increased 5.55, 1.63, 1.76, and 2.07 folds of NC group, respectively (all $P<0.05$), and p-STAT3 protein expression increased 2.15 folds of NC group ($P<0.05$), but there was no significant difference in the protein expression of t-STAT3 between NC and TG groups.【Conclusion】 High glucose could induce ERS and inflammation in EAhy926 cells. ERS inducer also could induce inflammation in EAhy926 cells. Phosphorylated STAT3 pathway may play an important role in bridging ERS and inflammation.

Key words: endoplasmic reticulum stress; inflammation; human umbilical vein endothelial cell; signal transducer and activator of transcription 3

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(1):59-64]

收稿日期：2012-09-29
基金项目：广东省自然科学基金(S2011010004811)；广东省科技计划项目(2011B031800155)
作者简介：丘雅维，硕士研究生，E-mail：yaweiqiu@yahoo.com.cn；*通信作者：曾龙驿，博士生导师，教授，E-mail：ly.zeng@medmail.com.cn

血管内皮细胞作为人体重要的内分泌器官，不仅起屏障作用，还具有调节血管舒缩状态，防止炎性细胞浸润等多种功能。有观点认为血管内皮功能可能早在糖尿病起始阶段即已受损[1]。而近年研究提示糖尿病可能是一种慢性低度炎症性疾病，炎症因子参与糖尿病及其血管并发症如糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy，DR)的发生、发展[2]，但是由高糖直接触发还是通过其他机制间接引起炎症反应，目前尚无定论。本研究拟探讨高糖通过诱导内质网应激 (endoplasmic reticulum stress，ERS)引起人血管内皮细胞炎症反应的作用机制，为 DR 的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材 料

人脐静脉内皮细胞株 EAhy926 由中山大学附属第三医院心内科钱孝贤教授惠赠。主要试剂：RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司；胎牛血清购自美国 Hyclone 公司；二甲基亚砜(DMSO)购自南京凯基公司；毒胡萝卜素(thapsigargin，TG)购自美国 ENZO 公司；*D*-葡萄糖、甘露醇、细胞裂解液均购自广州捷倍斯公司；蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自美国 Pierce 公司；PVDF 膜购自美国 Millipore 公司；兔抗人细胞间黏附因子-1 (intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1) 单抗、兔抗人肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α，TNFα)单抗、兔抗人葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78，GRP78)单抗、兔抗人磷酸化真核细胞翻译起始因子 2α (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor-2α，p-eIF2α) 多抗、兔抗人总 eIF2α(total eIF2α，t-eIF2α)多抗、兔抗人磷酸化信息传递与转录活化因子 3 (phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3，p-STAT3)多抗、兔抗人总 STAT3(total STAT 3，t-STAT3)单抗、兔抗人 β-actin 单抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司；鼠抗人活化转录因子 4 (activating transcription factor 4，ATF4)单抗购自英国 Abcam 公司；荧光标记的羊抗兔二抗及羊抗鼠二抗均购自美国 Odyssey 公司。

1.2 细胞株培养

EAhy926 细胞常规培养于含体积分数 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，置于体积百分比为 5%CO_2 的 37 ℃培养箱中，隔天换液 1 次，待细胞长至 70% ~ 80%融合后，换上无血清 RPMI 1640 培养基过夜孵育细胞，使细胞生长同步化，然后将细胞按实验设计分组。

1.3 实验分组

正常糖组(NC，5.5 mmol/L *D*-葡萄糖)、高糖组 (HG，25 mmol/L *D*-葡萄糖)、渗透压对照组(Mannitol，NC+19.5 mmol/L 甘露醇)、毒胡萝卜素组 (TG，NC+0.5 μmol/L 毒胡萝卜素)。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

各组细胞用细胞裂解液裂解后 4℃(16 000 ×*g*)离心 15 min 取上清液即可得总蛋白，BCA 法测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)约 2 h，用电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉或 5%BSA 室温封闭 2 h，加入一抗［兔抗人 ICAM-1 单抗、兔抗人 TNFα 单抗、兔抗人 GRP78 单抗、兔抗人 p-eIF2α 多抗、兔抗人 t-eIF2α 多抗、兔抗人 p-STAT3 多抗、鼠抗人 ATF4 单抗(1∶1 000)，兔抗人 t-STAT3 单抗 (1∶2 000)、兔抗人 β-actin 单抗(1∶1 500)］4 ℃过夜。经荧光标记的羊抗兔二抗或羊抗小鼠二抗(1∶10 000)室温孵育 1 h 和洗膜后，将膜置于 Odyssey 近红外光荧光扫描仪上进行扫描。以目的蛋白与 β-actin 条带光密度值之比值表示目的蛋白表达水平。

1.5 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差表示，采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，符合正态分布的两组数据间比较采用独立样本 *t* 检验，符合正态分布及方差齐性条件的多组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高糖对内皮细胞炎症因子表达的影响

高糖干预内皮细胞 0、2、4、8 和 12 h，Western blot 方法检测炎症因子：ICAM-1、TNFα，发现高糖干预 2 h 后，ICAM-1 和 TNFα 的蛋白表达水平即开始升高，随干预时间延长，两者的表达量逐渐增加，在干预 12 h 后达到峰值($P < 0.05$)。而经过甘露醇干预细胞 8 h 或 12 h，ICAM-1 和 TNFα 的蛋白表达水平与正常糖组相比无差别，提示高糖而不是高渗透压诱导内皮细胞发生炎症反应 (图 1、2)。

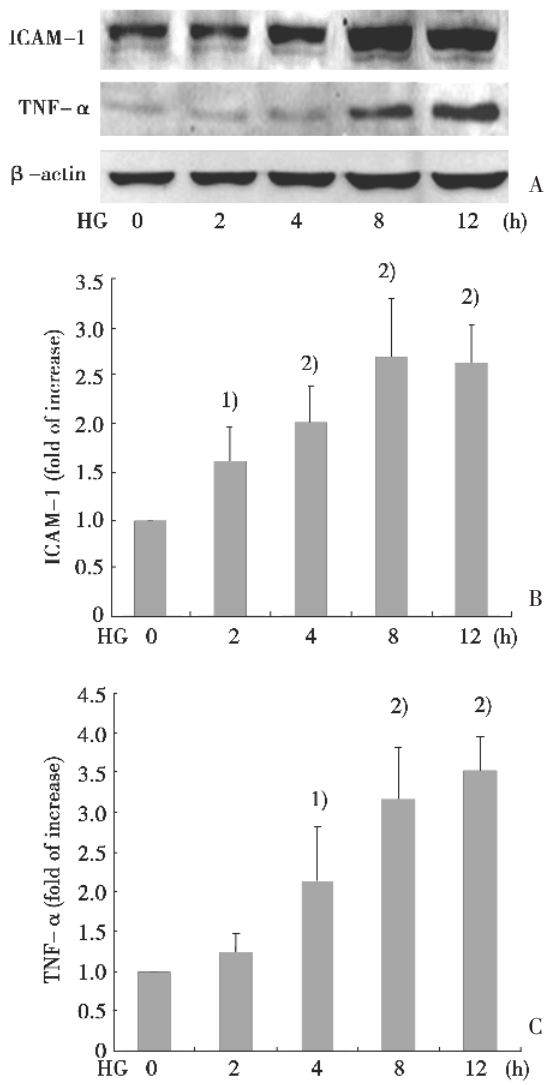

图 1　高糖对血管内皮细胞炎症因子表达的影响

Fig.1　Effect of high glucose on the expression of inflammatory factors in vascular endothelial cells

The protein expression of inflammatory factors ICAM-1 and TNFα (A-C) were up-regulated after high glucose (HG) challenge in a time-dependent manner. Value in Fig. B,C: mean ± SD, $n = 3$, 1)$P < 0.05$, 2)$P < 0.01$

2.2　高糖对内皮细胞 ERS 的影响

高糖干预内皮细胞 0、2、4、8 和 12 h，Western blot 方法检测 ERS 标志蛋白：GRP78、p-eIF2α、ATF4，发现随干预时间延长，上述 ERS 标志蛋白的表达量逐渐增加，即呈时间依赖性，在干预 8 h 或 12 h 后达到峰值($P < 0.05$)。而经过甘露醇干预细胞 8 h 或 12 h，GRP78 的蛋白表达水平与正常糖组相比无差别。提示高糖而不是高渗透压诱导内皮细胞发生 ERS(图 2、3)。

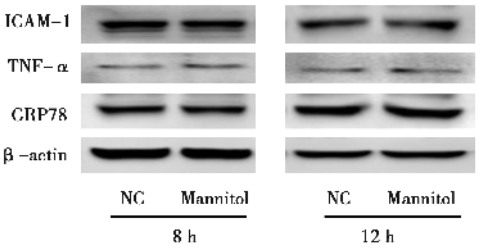

图 2　等渗甘露醇对血管内皮细胞炎症因子的表达及 ERS 的影响

Fig.2　Effect of mannitol on the expression of inflammatory factors and ERS marker in vascular endothelial cells

Representative blots from four independent experiments showing no difference in the protein expression of inflammatory factors and ERS marker between normal control group (NC) and mannitol osmotic control group (Mannitol).

2.3　ERS 诱导剂对内皮细胞 ERS 和炎症因子表达的影响

ERS 诱导剂 TG 干预内皮细胞 24 h 后，GRP78、p-eIF2α 的表达均较正常糖组明显增加，分别是正常对照的 5.55 倍、1.63 倍($P < 0.05$)，提示 ERS 的 PERK/eIF2α 通路被激活。另一方面，炎症因子 ICAM-1、TNFα 的蛋白表达水平也有明显增加，分别是正常对照的 1.76 倍、2.07 倍($P < 0.05$；图 4)。

2.4　高糖或 ERS 诱导剂对 STAT3 信号通路的影响

高糖干预内皮细胞 0、2、4、8 和 12 h，p-STAT3 的表达随高糖干预的时间延长而逐步增加，干预 12 h 后达到峰值($P < 0.05$)，t-STAT3 的表达也随高糖干预时间的延长而增加，但尚未达到有统计学意义。给予 ERS 诱导剂 TG 干预细胞 24 h，STAT3 的磷酸化水平也有所提高，为对照组的 2.15 倍($P < 0.05$)，但总的 STAT3 水平无明显变化($P > 0.05$；图 5)。

3　讨　论

近年来糖尿病及其眼部并发症 DR 被认为可能是一种慢性低度炎症疾病。机体处于促炎状态下时，白细胞黏附于血管内皮细胞表面并损伤内皮细胞，而这些停留在视网膜血管床中的白细胞

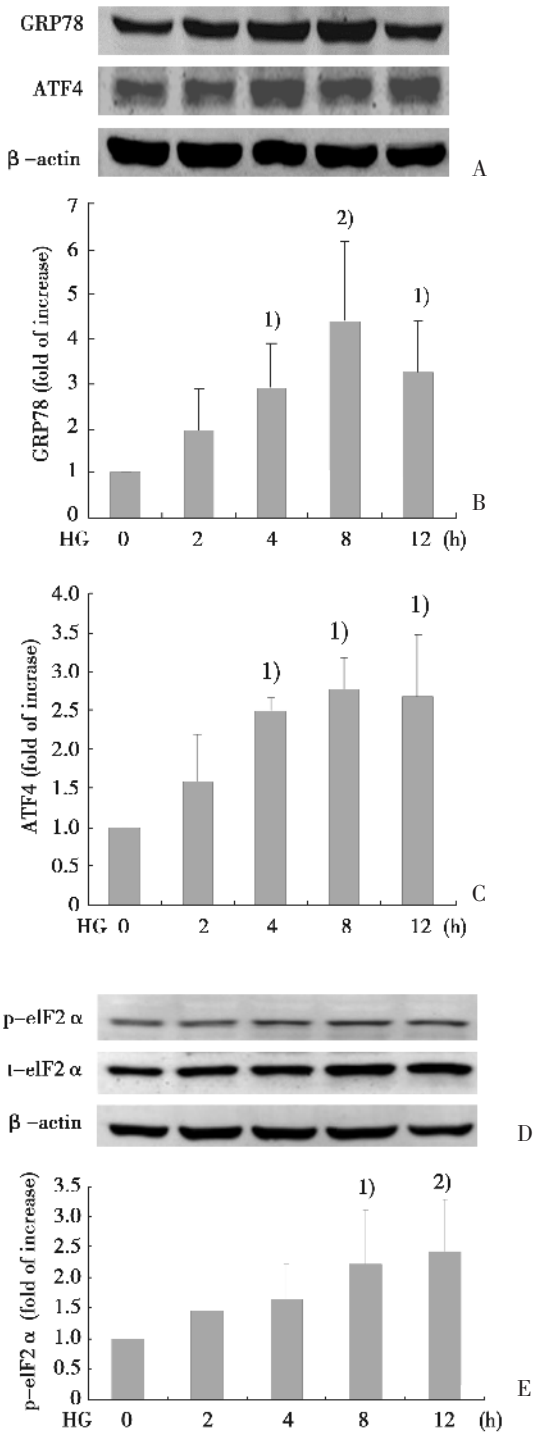

图 3 高糖对血管内皮细胞 ERS 的影响

Fig.3 Effect of high glucose on the expression of ERS markers in vascular endothelial cells

The protein expression of ERS markers GRP78, ATF4 (A-C) and p-eIF2α (D-E) were up-regulated after high glucose (HG) challenge in a time-dependent manner. Value in Fig. B,C,E: mean ± SD, $n = 3$, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

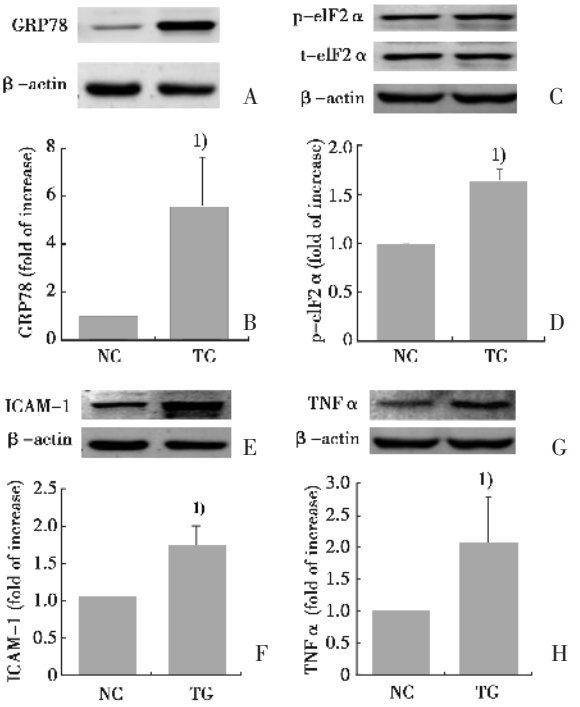

图 4 TG 对血管内皮细胞 ERS 及炎症因子表达的影响

Fig.4 Effect of thapsigargin on the expression of ERS markers and inflammatory factors in vascular endothelial cells

The protein expression of ERS markers GRP78 (A-B), p-eIF2α (C-D) and inflammatory factors ICAM-1 (E-F), TNFα (G-H) were significantly increased after thapsigargin (TG) treatment when compared with normal control(NC). Value in Fig. B,D,F,H: mean± SD, $n = 3$, 1) $P < 0.05$ vs NC.

形成“白细胞淤滞”,阻塞毛细血管导致无灌注区的形成,引起局部的视网膜组织缺血。随着疾病的进展,周细胞、内皮细胞等血管细胞的凋亡将导致血-视网膜屏障的破坏,视网膜组织的渗出增加进而引起视网膜水肿;而长期的组织缺血将导致生长因子与细胞因子如 VEGF 的释放,启动新生血管形成的恶性循环[3]。本课题组前期临床研究发现,与正常对照及无 DR 的糖尿病患者相比,非增殖型 DR 和增殖型 DR 的患者血清中炎症因子 ICAM-1、TNFα、高敏 C-反应蛋白的水平明显增加,并且上述指标随着 DR 病变程度加重而显著升高;而抗炎因子脂联素的变化则与此相反[4],提示糖尿病及 DR 患者体内存在炎症反应,且炎症反应可能与 DR 的病情进展相关。

人视网膜组织来源有限,而国内外均有使用人脐静脉内皮细胞来研究 DR 或眼部新生血管形成的报道[5-6],所以本研究选择人脐静脉内皮细胞

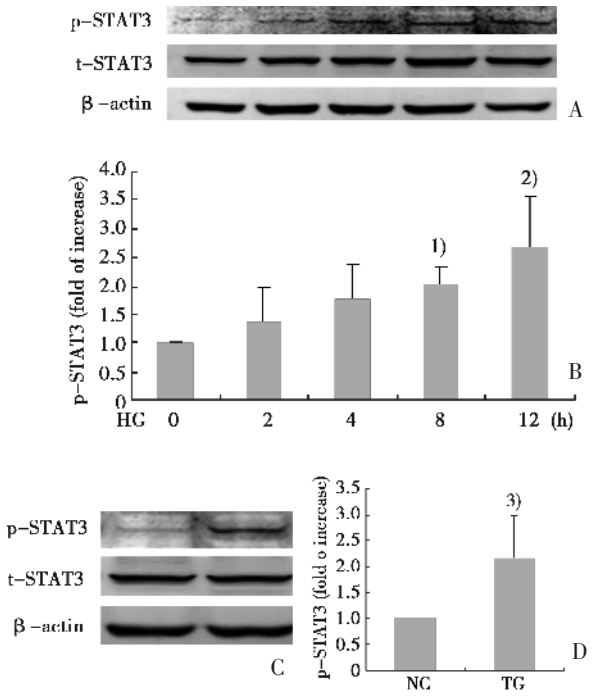

图 5　高糖或 TG 对 STAT3 信号通路的影响

Fig.5　Effect of high glucose or thapsigargin on the STAT3 pathway

The protein expression of p-STAT3 was up-regulated after high glucose (HG) challenge in a time-dependent manner. It was also significantly increased after thapsigargin(TG)treatment when compared with normal control (NC). Value in Fig. B, D: mean±SD, $n = 5$, 1)$P < 0.05$, 2)$P < 0.01$, 3)$P < 0.05$ vs NC.

作为研究对象，发现高糖培养下的血管内皮细胞，炎症因子 ICAM-1 和 TNFα 的表达均较对照组明显升高，结合前期临床研究结果，提示炎症反应可被高糖诱导并参与 DR 的发生发展。

内质网是多种蛋白的主要合成场所，当各种因素导致内质网稳态被打破，将引起 ERS，此时原来与 GRP78 结合处于失活状态的 3 个内质网跨膜蛋白：双链 RNA 依赖蛋白激酶样内质网激酶（RNA-dependent protein kinase-like ER kinase，PERK）、肌醇需求激酶 1（inositol-requiring enzyme 1，IRE1）、ATF6，与 GRP78 解离进而被激活。其中 PERK 可催化 eIF2α 发生磷酸化，而磷酸化的 eIF2α 能选择性地提高特定 mRNA 如 ATF4 的翻译。近年研究显示 ERS 可能参与了 DR 的病理生理过程。Akita 小鼠和氧诱导视网膜病变小鼠作为常用的研究非增殖型 DR 和增殖型 DR 的动物模型，两者的视网膜中均能发现 ERS 通路 PERK / eIF2α/ATF4 被激活[7]。本研究也观察到在高糖干预后的血管内皮细胞中，ERS 的 PERK 通路被激活。提示高糖可诱导内皮细胞发生 ERS，后者可能参与了 DR 病程发展的各个阶段。

ERS 作为近年的研究热点，其与炎症反应的关系也引起了广泛关注。当发生 ERS 时，3 个内质网跨膜蛋白均被激活，并启动一系列的炎症通路。其中 PERK 通过激活 eIF2α 使多种蛋白的翻译水平减少从而使 NF-κB 从其抑制物中释放出来，随后 NF-κB 转位至核内并启动多种参与炎症通路的基因表达，包括 TNFα 及 IL-1[8]。本研究观察到：高糖干预内皮细胞后，ERS 的 PERK/eIF2α/ATF4 通路被激活，炎症因子表达增加。应用 ERS 诱导剂 TG 干预细胞后，不仅可诱发 ERS，而且炎症因子的表达显著升高。据此推测高糖通过诱导 ERS 触发炎症反应，进而导致 DR 的发生、发展。现阶段的一些研究也初步支持上述推断。体外实验发现高糖环境培养下，视网膜色素上皮细胞内的同型半胱氨酸水平增加，后者通过激活 ATF4 上调 VEGF 的表达[9]。视网膜 Müller 细胞在高糖干预下，ATF4 被激活并通过调节 c-Jun 氨基末端激酶通路来上调 VEGF 的表达，抑制 ERS 或阻断 ATF4 的激活则出现相反结果。在糖尿病小鼠视网膜中，ATF4 和 VEGF 表达增高，局部注射 ERS 抑制剂或抑制 ATF4 的激活则能下调 VEGF 的表达并减少视网膜的血管渗漏[10]。以上研究结合本实验的结果提示：高糖可通过激活 ERS 的 PERK/eIF2α/ATF4 通路进而上调炎症因子的表达，诱发炎症反应。

STAT 家族是一类将信息从胞浆传递到核内的转录因子，参与调节炎症及免疫反应。在链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）诱导的糖尿病大鼠视网膜中，可观察到 VEGF、ICAM-1 以及 p-STAT3 表达水平均明显增加。阻断 STAT3 磷酸化后，炎症因子的表达明显下调，并且糖尿病大鼠的血-视网膜屏障破坏程度明显减轻[11]。另一方面，既往研究发现 ATF4 转基因小鼠的乳腺组织中，STAT3 的磷酸化水平较野生型明显增加[12]。本研究观察到在高糖培养下的内皮细胞，STAT3 的磷酸化水平呈时间依赖性增加，并且 ERS 诱导剂 TG 干预细胞后可诱导 STAT3 发生磷酸化激活。推测在高糖环境下，STAT3 起到连接 ERS 与炎症反应的作用。近年的一些研究也初步支持上述猜想。Coe 等[13]研究发现，定位于内质网腔内的促蛋白折叠酶 ERp57，

可阻断 STAT3 信号通路,抑制其发生磷酸化,首次发现 STAT3 通路可被来自内质网的信号所调节。提示 STAT3 可能与定位在内质网的蛋白发生直接的相互作用并调节 ERS。最新研究发现,增强 ERS 或过表达 ATF4 可通过激活 STAT3 诱导炎症反应的发生;在高糖环境下抑制 STAT3 的激活,有助于内质网稳态的恢复。用 STZ 诱导 ATF4 基因敲除小鼠发生 1 型糖尿病后,与野生型小鼠相比,前者的视网膜炎症反应及血管渗漏现象明显减轻,且磷酸化的 STAT3 显著减少[14]。以上研究结合本实验结果提示:高糖激活的 PERK /eIF2α /ATF4 通路可通过诱导 STAT3 的磷酸化进而引起炎症反应。

综上所述,本研究结果显示高糖可诱导血管内皮细胞发生 ERS 与炎症反应,ERS 诱导剂可诱发细胞的炎症反应,磷酸化的 STAT3 信号途径可能起到连接 ERS 与炎症反应的重要作用。

参考文献:

[1] Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction [J]. Clin Sci, 2005, 109(2): 143-159.

[2] Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(9): 3171-3182.

[3] Patel N. Targeting leukostasis for the treatment of early diabetic retinopathy [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2009, 9(3): 222-229.

[4] 陈燕铭, 王一娜, 钟毅敏, 等. 2 型糖尿病视网膜病变患者血清炎症因子和脂联素水平的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6): 1154-1158.
Chen YM, Wang YN, Zhong YM, et al. Serum levels of inflammatory factors and adiponectin in type 2 diabetic retinopathy patients[J]. Chin J Pathophysiol, 2011, 27(6): 1154-1158.

[5] 林雪波, 周 波, 孙 芳, 等. 蛋白激酶 Cβ2 通过调控 PPARα 介导高糖诱导的人内皮细胞损伤[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(1): 10-14.
Lin XB, Zhou B, Sun F, et al. Protein kinase Cβ2 mediated high glucose-induced human umbilical vein endothelial cells injury via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor α[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2010, 26(1): 10-14.

[6] Jiang J, Xia XB, Xu HZ, et al. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1α and VEGF [J]. J Cell Physiol, 2009, 218(1): 66-74.

[7] Li J, Wang JJ, Yu Q, et al. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy[J]. FEBS Lett, 2009, 583(9): 1521-1527.

[8] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell, 2010, 140(6): 900-917.

[9] Roybal CN, Yang S, Sun CW, et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(15): 14844-14852.

[10] Zhong Y, Li J, Chen Y, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes[J]. Diabetes, 2012, 61(2): 492-504.

[11] Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, et al. Role of NADPH oxidase and Stat3 in statin-mediated protection against diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(7): 3231-3238.

[12] Bagheri-Yarmand R, Vadlamudi RK, Kumar R. Activating transcription factor 4 overexpression inhibits proliferation and differentiation of mammary epithelium resulting in impaired lactation and accelerated involution [J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 17421-17429.

[13] Coe H, Jung J, Groenendyk J, et al. ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2010, 285(9): 6725-6738.

[14] Chen Y, Wang JJ, Li J, et al. Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2012, 55(9): 2533-2545.

(编辑 刘清海)