

抵抗素诱导脐静脉内皮细胞功能异常

李志臻, 黎 锋, 严 励, 李芳萍, 李 焱, 程 桦, 傅祖植

(中山大学附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】研究抵抗素(resistin)对脐静脉内皮细胞功能的影响,以探讨抵抗素在粥样硬化性疾病中的作用及其机制。【方法】原代培养人脐静脉内皮细胞,不同浓度人抵抗素(0、50、100 ng/mL)培养 24 h。流式细胞检测抵抗素对内皮细胞间黏附分子(ICAM-1)、血管细胞间黏附分子(VCAM-1)与活性氧簇(ROS)表达的影响;RT-PCR 检测抵抗素对内皮素(ET-1)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达的影响。【结果】人脐静脉内皮细胞经人抵抗素(50 ng/mL、100 ng/mL)处理 24 h 后 ICAM-1 和 ET-1 mRNA 表达显著增高,而各组间 VCAM-1 表达、ROS 生成,以及 eNOS 和 iNOS mRNA 表达无明显差别。【结论】抵抗素可通过增加 ICAM-1 表达,上调 ET-1 表达直接促进内皮细胞激活,提示脂肪细胞与内皮细胞的相互作用可能是动脉粥样硬化性疾病的发病因素之一。

关键词:抵抗素;人脐静脉内皮细胞;细胞间黏附分子;血管细胞间黏附分子

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)03-0258-04

Dysfunction of Human Umbilical Vein Endothelial Cell Induced by Resistin

LI Zhi-zhen, LI Feng, YAN Li, LI Fang-ping, LI Yan, CHENG Hua, FU Zu-zhi

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of resistin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and to explore the role and mechanisms of resistin on atherosclerosis. 【Methods】Human umbilical vein endothelial cells were incubated with recombinant human resistin (0, 50, and 100 ng/ml) for 24 hours. ICAM-1, VCAM-1, and ROS were assessed using flow cytometry. ET-1, eNOS, and iNOS mRNA expression were measured by semi-quantitative RT-PCR. 【Results】Incubation of HUVEC with resistin resulted in an increase in ICAM-1 and ET-1 mRNA expression. But resistin had no effect on VCAM-1 expression and ROS release. eNOS and iNOS mRNA expression were not altered by resistin stimulation. 【Conclusion】Adipokine resistin exerts direct effects to promote HUVEC dysfunction by promoting ICAM-1 and ET-1 expression. These data suggest that adipocyte-endothelium cross talk might play an important role in pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes.

Key words: resistin; human umbilical vein endothelial cells; ICAM-1, VCAM-1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):258-261]

近年来,许多研究关注于胰岛素抵抗和内皮功能异常之间的相互作用,特别是脂肪细胞因子以及它们对血管病变的影响。脂肪组织可分泌多种细胞因子,如 leptin、adiponectin、TNF- α 、PAI-1、抵抗素、omentin、visfatin 等。其中有些细胞因子不仅在胰岛素抵抗发病中起重要作用,而且是重要的血管活性因子,它们能够直接影响血管内皮功能^[1]。抵抗素(resistin)是新近发现的一种脂肪细胞

因子。研究发现,抵抗素可能在肥胖、胰岛素抵抗发病中起一定作用^[2]。我们推测抵抗素可能直接影响血管内皮功能,并为此观察了人抵抗素对人脐静脉内皮细胞间黏附分子(ICAM-1)和血管细胞间黏附分子(VCAM-1)表达、活性氧簇(ROS)产生以及对内皮素(ET-1)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达影响,为抵抗素对血管内皮功能的影响提供证据。

收稿日期:2005-12-24

基金项目:教育部博士点基金资助项目(002000001);卫生部基金资助项目(000099009)

作者简介:李志臻(1976-),男,河南洛阳人,博士;傅祖植,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: LZZ940537@163.com

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人重组抵抗素 (Phoenix.Inc), Trizol 总 RNA 提取液 (Invitrogen 公司), RT 第一链合成试剂盒 (Fermentas 公司), anti-human CD54 (ICAM-1)/PE 和 anti-human CD106 (VCAM-1)/PE (BD Pharmingen), H2DCFDA(Sigma 公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞原代培养和鉴定

取健康产妇分娩后 12 h 内的脐带(取自本院妇产科, 行剖宫产的正常产妇), PBS 液灌洗脐静脉后将胰酶灌入静脉腔消化, 收集消化液, 离心沉淀细胞。用含 200 mL/L 胎牛血清的 M199 培养液 (75 μg/mL 内皮细胞生长支持物, 0.1 mg/mL 肝素) 培养, 第 3-5 代的细胞用于实验。用 VWF 相关抗原间接免疫显色法鉴定人脐静脉内皮细胞。

1.3 人脐静脉内皮细胞 ICAM-1/VCAM-1 表达、ROS 生成检测

处于对数生长期人脐静脉内皮细胞用抵抗素 (50 ng/mL、100 ng/mL) 干预 24 h。干预完成后用 PBS 洗涤细胞, 加入 PE 标记的 ICAM-1/CD54、VCAM-1/CD106 抗体或 H2DCFDA (5 μmol/L), 室温孵育 30 min, PBS 冲洗, 多聚甲醛固定, 用 FACS 流式细胞仪检测上述抗原及 ROS 表达情况。每种条件重复 3 次以上。

1.4 人脐静脉内皮细胞 ET-1、eNOS、iNOS mRNA 表达检测

采用半定量 RT-PCR 方法。HUVEC 总 RNA 提取参照 Trizol 试剂说明进行。以紫外分光光度仪检测提取 RNA 的含量和纯度。取 1 μg RNA 逆转录合成单链 cDNA 后进行 PCR 扩增。引物序列为, ET-1: 5'-GGACATCATTTGGGTC AACACTCC-3 和 5'-CAAGCTTGGAACAGTCTTTTCCT-3, 269 bp; iNOS: 5'-TCTTGGTCAAAGCTGTGCTC-3 和 5'-CATTGCCAAACGTA CTGGTC-3, 237 bp; eNOS: 5'-GAAGAGGAAGGAGTCCAGTAACACAGAC-3 和 5'-GGACTTGCTGCTTTGCAGGTTTTTC-3, 438 bp; 以 -actin 作为内参: 5'-GTCCACCTTCCAGCAGATGT-3 和 5'-AACCGACTGCTGTCACCTTC-3, 287 bp。反应条件为, ET-1: 95 预变性 3 min, 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min, 34 个循环, 最后 72 延伸 5 min。eNOS 和 iNOS: 95 预

变性 3 min, 94 30 s, 60 30 s, 72 1min, 34 个循环, 最后 72 延伸 5 min。扩增产物以 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 图像分析软件进行光密度扫描, 以目的条带光密度与内参 -actin 光密度比值表示目的基因表达水平。

1.5 统计学分析

全部数据采用 SPSS 11.0 For Windows 统计软件进行统计学分析。数据以均数 ± 标准差表示。多组数据间比较采用 ANOVA, 取 α=0.05。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞形态学特征及鉴定

细胞分离接种后第 2 天换液时可见贴壁细胞形态呈扁平的短梭形、多角形, 呈铺路卵石状排列。抗人 von-willebrand 因子抗体免疫显色检测显示: 人脐静脉内皮细胞胞浆出现黄褐色颗粒, 靠近核周围颗粒较密。

2.2 抵抗素对 ICAM-1/VCAM-1 表达、ROS 生成的影响

50 ng/mL 和 100 ng/mL 抵抗素组与空白对照

表 1 ICAM-1、VCAM-1、ROS 表达阳性细胞百分率

Table 1 The percentage of ICAM-1, VCAM-1, Ros expressed cells by FCM (%)

Group	ICAM-1	VCAM-1	ROS
Control	93.87 ± 1.67	0.17 ± 0.05	89.94 ± 1.34
50 ng/mL resistin	98.64 ± 0.28 ¹⁾	0.11 ± 0.01	91.13 ± 0.87
100 ng/mL resistin	97.29 ± 0.87 ²⁾	0.11 ± 0.12	92.10 ± 1.09
F	14.98	3.48	1.51
P	0.005	0.099	0.294

LSD- t, compared with control, 1) P < 0.01; 2) P < 0.01

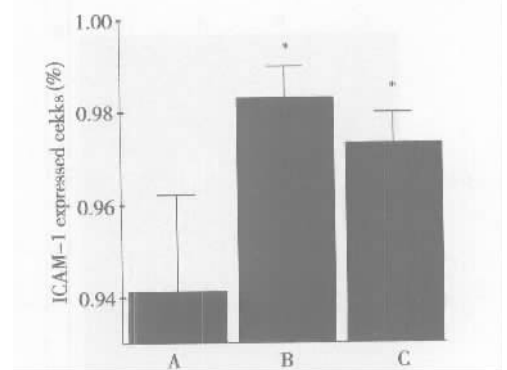


图 1 人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达

Fig.1 Expression of ICAM-1 in HUVEC

A: control; B: 50 ng/mL resistin; C: 100 ng/mL resistin;

*: cincreared wutg cibtrik, P < 0.05

组相比 ICAM-1 表达增高 ($P < 0.05$), 100 ng/mL 组与 50 ng/mL 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组间 VCAM-1 表达均较弱, 差异无统计学意义 (表 1, 图 1)。

各组 ROS 阳性率均较高。与对照组相比, 50 ng/mL 和 100 ng/mL 抵抗素组对人脐静脉内皮细胞 ROS 的生成无明显作用 ($P > 0.05$)。

2.3 抵抗素对 ET-1、eNOS、iNOS mRNA 表达的影响

50 ng/mL 和 100 ng/mL 抵抗素组与空白对照

表 2 人脐静脉内皮细胞 ET-1、eNOS mRNA 的表达

Table 2 Expression of ET-1, eNOS mRNA in HUVEC

Group	ET-1 [A(ET-1)/A(β -actin)]	eNOS [A(eNOS)/A(β -actin)]
Control	0.79 \pm 0.05	0.43 \pm 0.07
50 ng/mL resistin	0.99 \pm 0.04 ¹⁾	0.44 \pm 0.03
100 ng/mL resistin	1.02 \pm 0.10 ²⁾	0.43 \pm 0.04
F	9.72	0.06
P	0.013	0.946

LSD-t, compared with control, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

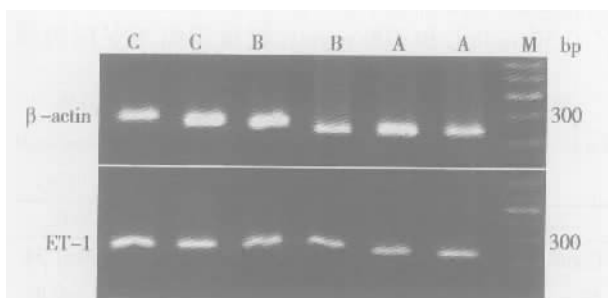


图 2 人脐静脉内皮细胞 ET-1 mRNA 表达

Fig.2 ET-1 mRNA expression in HUVEC

A: control; B: 50 ng/mL resistin; C: 100 ng/mL resistin;

M: marker

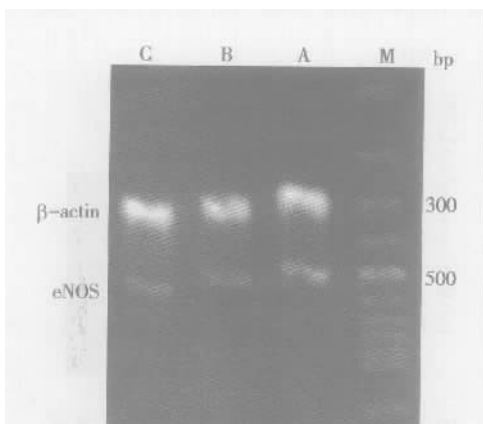


图 3 人脐静脉内皮细胞 eNOS mRNA 表达

Fig.3 eNOS mRNA expression in HUVEC

A: control; B: 50 ng/mL resistin; C: 100 ng/mL resistin; M: marker

组相比 ET-1 mRNA 表达增高 ($P < 0.05$), 100 ng/mL 组比 50 ng/mL 组表达有所增高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对照组相比, 50 ng/mL 和 100 ng/mL 抵抗素组对 eNOS mRNA 表达无明显作用 ($P > 0.05$), 各组均无 iNOS mRNA 表达 (表 2, 图 2, 3)。

3 讨论

位于血管内膜的单层血管内皮细胞, 对动脉粥样硬化起“第一道防线”的作用。最近证据表明, 某些脂肪细胞因子 (如脂联素、瘦素等) 可损害内皮细胞功能, 提示脂肪细胞和内皮细胞功能之间可能存在一定相互作用。抵抗素是近年发现的一种脂肪细胞因子, 基因敲除和持续高抵抗素血症的动物模型均证实抵抗素在胰岛素抵抗中起一定作用^[3,4]。初步研究表明, 糖尿病人群中抵抗素水平约为 40 ng/mL^[5]。

动脉粥样硬化的早期阶段包括循环中炎症细胞的聚集及跨内皮转移。这一过程主要由细胞黏附分子如 ICAM-1、VCAM-1 等介导。Kawanami 等^[6]发现抵抗素可诱导人主动脉内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达, 并且 ICAM-1 和 VCAM-1 表达增加可被 adiponectin 阻断。Verma 等^[7]的研究发现抵抗素可使人隐静脉内皮细胞 VCAM-1 和 MCP-1 表达增加。有研究者探讨了不同糖耐量状态下血清抵抗素与可溶性细胞间黏附分子 1 (sICAM1) 质量浓度的变化^[8]。结果糖尿病和糖耐量异常者血清抵抗素和 sICAM-1 均高于正常对照者。这提示 resistin 和 sICAM-1 二者可能参与 2 型糖尿病发病过程。本研究发现抵抗素对 ICAM-1 表达呈促进作用, 而对 VCAM-1 表达无明显作用。抵抗素诱导 VCAM-1 表达研究结果有差异的可能解释是: 内皮细胞来源不同对抵抗素的反应不同;

作用的浓度和时间不同, ICAM-1 和 VCAM-1 对炎症因子刺激有不同的动力学效应, VCAM-1 在内皮细胞呈非构成性表达, 受炎症因子等刺激后其表达在 8-24 h 迅速增强, 随后逐渐下降。本研究发现, 抵抗素在 50 ng/mL 时即可明显增加 ICAM-1 表达, 与 100 ng/mL 水平相比无明显差异, 说明增高的抵抗素水平即可损害内皮功能。

研究显示 ROS 参与调节内皮细胞黏附分子表达。有研究报道, 40 ng/mL 抵抗素处理猪冠状动

脉后, ROS产生明显增加, 并能被 SeMet(一种抗氧化剂)所抑制^[9]。据此, 本研究检测内皮细胞 ROS生成, 发现不同处理组人脐静脉内皮细胞 ROS产生均在 90%以上, 且经抵抗素刺激导致的 ICAM-1 表达增加过程中 ROS产生并未增高。H2DCFDA 是一种细胞渗透性荧光染料, 用于检测细胞内 ROS。细胞内 ICAM-1 表达受多种信号通路调控, 本研究采用流式细胞检测并未精确定量, ROS生成是否在抵抗素导致的 ICAM-1 表达增高中起一定作用尚需进一步研究。

一氧化氮(NO)具有潜在的血管保护作用, 生成 NO 也是内皮细胞的一个重要的生理功能。Kougiyas 等^[9]的研究发现, 抵抗素可降低猪冠状动脉内皮细胞 eNOS mRNA 的表达, 而 Verma 等^[7]的研究采用检测培养细胞上清中硝酸盐水平来评价内皮细胞的 NO 生成, 发现抵抗素对内皮细胞 NO 生成无明显影响。本实验发现抵抗素对人脐静脉内皮细胞 eNOS mRNA 表达无影响, 亦未诱导 iNOS 的表达, 但未检测细胞内 NO 产生量的变化。结果的不一致可能是由于研究所采用不同细胞类型或者检测方法影响。人脐静脉内皮细胞 NOS 表达及 NO 释放受多种通路调控如: Ca^{2+} 水平、胰岛素信号通路、AMPK 通路等, 我们下一步将采用荧光定量细胞内 NO 生成量的方法来探讨抵抗素对人脐静脉内皮细胞 NO 产生量是否确有影响。

ET-1 是一种内皮源性血管活性因子, 研究表明它在多种心血管疾病的发病中起重要作用, 包括肥胖相关的高血压等。本实验发现抵抗素在 50 ng/mL 水平即可使内皮细胞 ET-1 mRNA 表达增高, 这与 Verma 等^[7]的研究类似, 他们也发现抵抗素能促进培养的内皮细胞 ET-1 mRNA 表达和 ET-1 释放, 而抵抗素中和抗体能阻断其影响。这表明抵抗素能通过增加 ET-1 表达而直接影响内皮细胞功能。

总之, 本研究发现抵抗素能增加人脐静脉内

皮细胞 ICAM-1 表达, 上调 ET-1 mRNA 表达, 进一步证实脂肪细胞来源的细胞因子具有血管活性作用。

参考文献:

- [1] COOKE J P, OKA P K, Does leptin cause vascular disease[J]. *Circulation*, 2002, 106(15): 1904- 1905.
- [2] STEPPAN C M, BAILEY S T, BHAT S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 307- 312.
- [3] BANERJEE R R, RANGWALA S M, SHAPIRO J S, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin [J]. *Science*, 2004, 303(5661):1195- 1198.
- [4] RANGWALA S M, RICH A S, RHOADES B, et al. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia [J]. *Diabetes*, 2004, 53(8):1937- 1941.
- [5] FEHMANN H C, HEYN J. Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls[J]. *Horm Metab Res*, 2002, 34(11- 12): 671- 673.
- [6] KAWANAMI D, MAEMURA K, TAKEDA N, et al. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine- endothelial cell interactions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(2):415- 419.
- [7] VERMA S, LI S H, WANG C H, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine- endothelial interaction [J]. *Circulation*, 2003, 108(6):736- 740.
- [8] 赵晓娟, 于学满. 不同糖耐量状态下血清抵抗素和可溶性细胞间黏附分子质量浓度的变化 [J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25(6):510- 511.
- [9] KOUGIAS P, CHAI H, LIN P H, et al. Adipocyte-derived cytokine resistin causes endothelial dysfunction of porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41 (4):691- 698.

(编辑 张恩健)