

不同活性氧产生途径对高糖诱导内皮细胞活性氧生成及高糖对细胞凋亡的影响

王 蕾 苏华斌 卢 琼

摘 要 **目的** 探讨不同活性氧产生途径对高糖诱导的内皮细胞活性氧生成的影响以及高糖对内皮细胞凋亡的影响。**方法** 本实验分为正常对照组、高糖处理组、DPI 处理组、别嘌呤醇处理组、鱼藤酮处理组和吡咯美辛处理组。用流式细胞仪检测各组细胞内活性氧的浓度;流式细胞仪及 Hoechst 染色检测细胞凋亡;Western blot 法检测 NADPH 氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)亚单位 NOX2、NOX4、p22phox、p47phox、p67phox 及 rac 的蛋白表达。**结果** 与对照组相比,高糖组、别嘌呤醇处理组、鱼藤酮处理组和吡咯美辛处理组内皮细胞活性氧的生成明显增高,而 DPI 处理组内皮细胞活性氧的生成与对照组差异无统计学意义;与高糖组相比,DPI 处理组内皮细胞活性氧的生成明显减少;而别嘌呤醇处理组、鱼藤酮处理组和吡咯美辛处理组与高糖组相比差异无统计学意义。与正常对照组相比,高糖处理组细胞 NOX4 蛋白表达显著增高,而 NOX2、p47phox、p67phox、p22phox 和 Rac 表达差异无统计学意义。与对照组相比,高糖处理组细胞凋亡比例显著增高。**结论** 高糖可能通过增加活性氧的生成诱导内皮细胞的凋亡,其中 NADPH 氧化酶可能为内皮细胞活性氧产生的主要来源。

关键词 高糖 活性氧 凋亡 NADPH 氧化酶 黄嘌呤氧化酶 线粒体电子传递链 环氧合酶

中图分类号 R363.1+3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.022

Effect of Different Pathways of ROS on ROS and Apoptosis Induced by High Glucose in HUVECs. Wang Lei, Su Huabin, Lu Qiong. Department of Basical Medicine, Hunan University of Medicine, Hunan 418000, China

Abstract **Objective** To study the effect of different pathways of reactive oxygen species(ROS) on ROS induced by high glucose and to investigate effect of high glucose on apoptosis in HUVECs. **Methods** There were control group, high glucose group, DPI group, oxypurinol group, rotenone group and indometacin group in this study. Intracellular ROS level was detected by flow cytometry. Apoptosis was detected by flow cytometry and Hoechst dyeing. The protein expression of NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22phox, p47phox, p67phox and rac) was detected by western blot. **Results** Compared with control group, intracellular ROS level of high glucose group, oxypurinol group, rotenone group and indometacin group were obviously increased, but there was no significant difference among DPI group and control group. Compared with control group, the protein expression of NOX4 was increased by high glucose, and there was no significant difference in the protein expression of NOX2, p22phox, p47phox, p67phox and rac. Compared with control group, apoptosis was increased by high glucose. **Conclusion** High glucose increases apoptosis possibly by increasing intracellular ROS level, and NADPH oxidase may be the main resource of ROS.

Key words High glucose; ROS; Apoptosis; NADPH oxidase; Xanthine oxidase; Cyclooxygenase; Electron transport chain

糖尿病及其慢性并发症的形成与糖尿病患者体内高血糖引起氧化产物增加,处于氧化应激状态密切相关,氧化应激状态导致血管内皮细胞异常凋亡,易于诱发血栓形成,导致循环障碍,其是心血管疾病的始动因素。机体有多种酶参与活性氧的生成,如 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体、内皮型一氧化氮合酶及脂氧合酶等^[1-4]。为探讨

内皮细胞氧化损伤途径,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究对象,用高糖处理 HUVECs,观察 ROS 生成和内皮细胞凋亡情况,同时分别用 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体电子传递链及环氧合酶的特异抑制剂氯化二亚苯基碘喹(DPI)、别嘌呤醇(oxypurinol)、鱼藤酮(rotenone)、吡咯美辛预处理人脐静脉内皮细胞再加入高浓度葡萄糖,分析 ROS 的水平,初步确定高糖刺激下 ROS 产生主要来源,本实验结果表明 NADPH 氧化酶为高糖刺激下活性氧产生的主要来源,因此本实验进一步检测高糖刺激下内皮细胞

基金项目:湖南省教育厅科研基金资助项目(13C739);湖南医药学院科研基金资助项目

作者单位:418000 怀化,湖南医药学院基础医学部(王蕾、卢琼),临床医学系(苏华斌)

NADPH 氧化酶亚单位 gp91phox (NOX2 和 NOX4) 和 p22phox、p47phox、p67phox 及 rac 蛋白表达变化。

资料与方法

1. 实验分组: ①正常对照组: 正常血清培养; ②高糖处理组: 20mmol/L 葡萄糖处理 4h 组 (预实验后选择浓度); ③DPI 处理组: DPI 5 μ mol 预处理 0.5h 再加入 20mmol/L 葡萄糖处理 4h 组; ④别嘌呤醇处理组: 3 μ mol 别嘌呤醇预处理 0.5h 再加入 20mmol/L 葡萄糖处理 4 小时组; ⑤鱼藤酮处理组: 1 μ mol 鱼藤酮预处理 0.5h 再加入 20mmol/L 葡萄糖处理 4h 组; ⑥吡咯美辛处理组: 5mg 吡咯美辛预处理 0.5h 再加入 20mmol/L 葡萄糖处理 4h 组。

2. 方法: (1) 原代人脐静脉内皮细胞分离: 取长约 20cm 的无菌新鲜脐带, 以生理盐水冲洗脐静脉 3 次, 0.1% 的 II 型胶原酶 (Promega 公司) 灌注脐静脉 15min, 收集灌注液, 800r/min 离心 6min, 收集内皮细胞, 20% 胎牛血清 (HYCLONE 公司) 的 M199 混合培养基 (GIBCO 公司) 培养。(2) 细胞内 ROS 的检测: 用 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光染色检测细胞内 ROS, 严格按照碧云天公司试剂盒说明书操作。(3) Hoechst 染色: ①胰酶消化、离心收集内皮细胞; ②加 PBS 洗 1 遍; ③Hoechst 染液染色 10min; ④加入 PBS 洗两遍; ⑤取 50 μ l 滴于玻片上; ⑥倒置显微镜观察。(4) PI 染色: ①收集细胞, 离心 5min, 弃去培养液; ②PBS 洗涤 1 次; ③离心去 PBS, 加入冰预冷的 70% 的乙醇固定; ④离心弃去固定液, PBS 重悬 5min; ⑤用 PI 染液染色, 4 $^{\circ}$ C 避光 30min; ⑥流式细胞仪检测。(5) Western blot 法检测: 细胞裂解蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上, 封闭过夜后, 与相应一抗 (Santa Cruz 产品) 孵育后, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗 (Promega 产品) 孵育, 洗膜后, 应用 ECL 试剂盒进行化学发光反应, 最后曝光后显影, 定影。

3. 统计学方法: 所有数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理, 采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. DPI、别嘌呤醇、鱼藤酮和吡咯美辛对内皮细胞活性氧生成的影响: 与对照组相比, 高糖组内皮细胞活性氧的生成明显增高, 别嘌呤醇处理组、鱼藤酮处理组和吡咯美辛处理组活性氧生成也都较对照组明显升高, 而 DPI 处理组内皮细胞活性氧的生成与对照组差异无统计学意义; 与高糖组相比, DPI 处理组内皮细胞活性氧的生成明显减少, 而别嘌呤醇处理组、鱼藤酮处理组和吡咯美辛处理组与高糖组相比, 差异无统计学意义 (图 1)。

2. Western blot 法检测高糖对细胞内 NADPH 氧化酶亚单位的蛋白表达水平: DPI 为 NADPH 氧化酶特异抑制剂, 因此本实验进一步检测高糖刺激下内皮

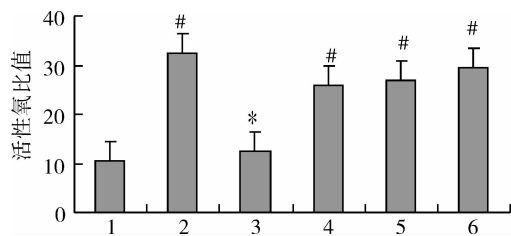


图 1 流式细胞仪检测高糖和 4 种特异性抑制剂对 HUVECs 活性氧生成的影响

1. 正常对照组; 2. 高糖处理组; 3. DPI 处理组; 4. 别嘌呤醇处理组; 5. 鱼藤酮处理组; 6. 吡咯美辛处理组; 与正常对照组相比, # $P < 0.05$; 与高糖处理组相比, * $P < 0.05$

细胞 NADPH 氧化酶亚单位 NOX2、NOX4、p22phox、p47phox、p67phox 及 rac 蛋白表达变化。与对照组相比, 高糖处理组 HUVECs 中细胞 NOX4 蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$, $n = 3$), 而 NOX2、p47phox、p67phox、p22phox 和 Rac 表达差异无统计学意义 (图 2)。

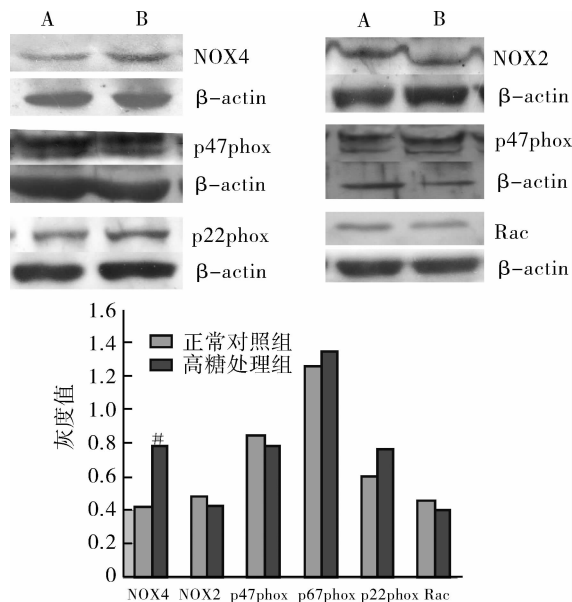


图 2 Western blot 法检测高糖对 HUVECs NADPH 氧化酶亚单位的蛋白表达调节

A. 正常对照组; B. 高糖处理组; 与正常对照组相比, # $P < 0.05$

3. 高糖对内皮细胞凋亡的调节: 流式细胞仪和 Hoechst 染色结果显示, 与对照组相比, 高糖处理组 HUVECs 中细胞凋亡比例显著增高 ($P < 0.05$, $n = 3$, 图 3)。

讨 论

在我国, 糖尿病是导致成人失明和非创伤性截肢的主要原因, 其慢性并发症可累及全身各个重要器

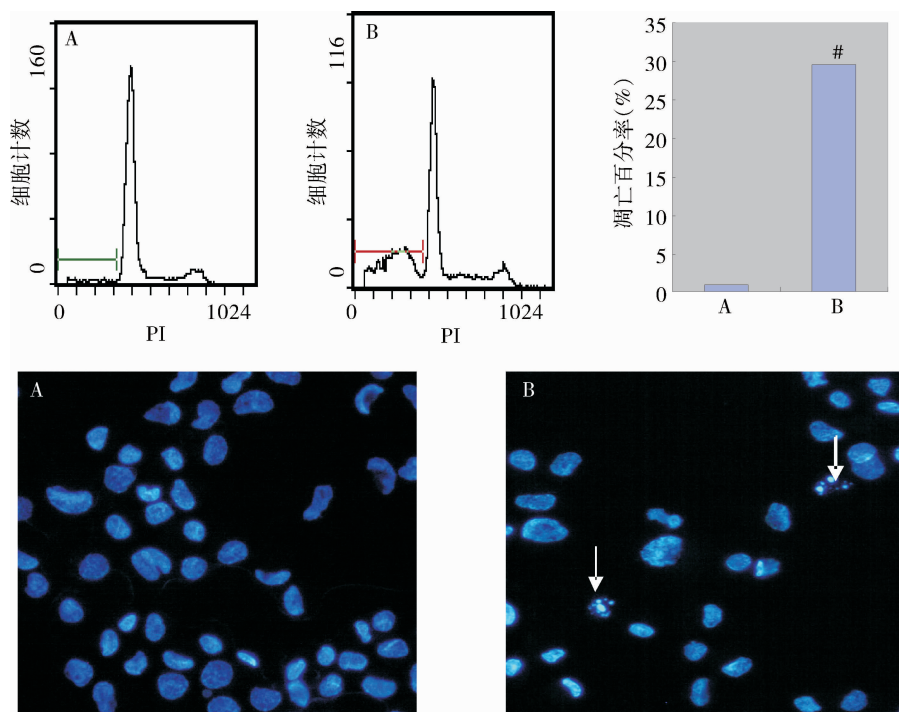


图3 流式细胞仪与Hoechst检测高糖对HUVECs凋亡的调节

A. 正常对照组; B. 高糖处理组; 与正常对照组相比, [#] $P < 0.05$; 箭头所指为凋亡细胞

官。糖尿病及其慢性并发症的形成与糖尿病患者体内高血糖引起氧化产物增多密切相关, 活性氧增多导致血管内皮细胞过度凋亡, 易于诱发血栓形成, 这是心血管疾病的始动因素^[5]。高血糖导致血管损伤与多元醇途径激活、晚期糖基化终末产物形成增加、蛋白激酶C途径激活及己糖胺通路激活等有关, 其中高血糖时线粒体电子传递链过氧化物产生过量引起氧化应激, 是以上各条途径的共同机制^[6~9]。

本实验研究表明, 高糖可诱导内皮细胞活性氧生成增多, 并且伴随细胞凋亡的增高。初步证明高糖诱导细胞损伤的原因与氧化应激有关。因此对糖尿病患者氧化应激机制的研究对寻找有效降低糖尿病慢性并发症的干预措施具有重要的意义。因此本研究进一步检测不同活性氧产生途径对高糖诱导的活性氧生成的影响, 发现NADPH氧化酶特异性抑制剂DPI能够显著抑制高糖诱导的ROS生成, 由此笔者推测高糖可能通过激活NADPH氧化酶使ROS生成增多。NADPH氧化酶包含胞膜成分即细胞色素b558(gp91phox和p22phox)和胞质成分(p47phox、p67phox及小的GTP结合蛋白rac)。现已发现的gp91phox同工酶家族即NOX(NADPH oxidase)家族有NOX1、NOX2(gp91phox)、NOX3、NOX4、NOX5等成员, 内皮细胞主要表达NOX4和NOX2^[8,10]。实验

进一步用Western blot法检测NADPH氧化酶亚单位的表达, 结果发现, 高糖使NADPH氧化酶亚单位NOX4蛋白表达增高, 由此推测NOX4在高糖诱导的氧化应激损伤中发挥主要作用。

综上所述, NADPH氧化酶可能为高糖刺激下内皮细胞活性氧产生的主要来源, 这为预防糖尿病慢性并发症提供新的思路。

参考文献

- Ahmed FN, Naqvi FN, Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Ann NY Acad Sci, 2006, 1084: 481-489
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications[J]. Diabetes Care, 1996, 19(3): 257-267
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(12): 1429-1435
- Guzik TJ, West NE, Black E, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors[J]. Circ Res, 2000, 86(9): 85-90
- Balcerczyk A, Soszynski M, Rybaczek D, et al. Induction of apoptosis and modulation of production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyleneiodonium[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(8): 1263-1273
- 侯广道, 莫新玲. 2型糖尿病与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(12): 1488-1491
- 成永霞, 刘贵波, 颜彬, 等. PKC/NADPH氧化应激途径对大鼠心

- 脏微血管内皮细胞 eNOS 脱偶联的影响[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(1): 82-87
- 8 Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C - dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. Diabetes, 2000(49): 1939-1945
- 9 丁丽, 张锦, 张绍维, 等. 胰高血糖素样肽 1(9-36) 对人脐静脉内皮细胞内皮型一氧化氮合酶的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92

(42): 3003-3011

- 10 Srivastava AK. High glucose - induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes[J]. Int J Mol Med, 2002(9): 85-89

(收稿日期: 2014-06-24)

(修回日期: 2014-07-09)

昆明地区 571 例门诊患者 HPV 感染情况分析

陈俊英 潘 玥 龙海亭 岳耀斐 杨丽娟 孙强明

摘 要 **目的** 探讨昆明地区女性宫颈感染人乳头瘤病毒(human Papillomavirus, HPV)的基因型分布和感染率情况。为预防 HPV 感染和宫颈癌防治提供依据。**方法** 以 MY09/ MY11 为外引物, GP5⁺/ GP6⁺ 为内引物, 通过巢式 PCR(nPCR) 检测妇科门诊样本 571 例, 并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将在 150bp 处有条带的样本送测序, 测序结果通过 NCBI 网站 blast 功能开展核酸比对, 并进行基因分型。**结果** 535 例门诊患者中阳性病例 111 例, 阳性率 20.75%, 其中高危型 77 例, 占总阳性率 69.37%, 低危型 34 例, 占总阳性率 30.63%。**结论** 昆明地区女性宫颈感染 HPV 最常见的亚型依次为 16、58、33、35、18 和 31。低危型最常见的亚型依次为 6、81、11、91。高危型为常见类型, 占总阳性率的 69.37%, 16 型和 58 型为主要高危感染亚型, 6 型为主要低危感染亚型。

关键词 宫颈癌 人乳头状瘤病毒 基因型

中图分类号 R183

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.023

Investigation of Genotype and Infection Rate of Human Papillomavirus in Kunming City. Chen Junying, Pan Yue, Long Haiting, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To investigate the genotype and infection rate of human Papillomavirus (HPV) in Kunming city, and provide theoretical basis for preventing and treating uterine cervical cancer. **Methods** Using MY09/ MY11 as outer primer, GP5⁺/GP6⁺ as inner primer, 571 gynecological outpatient samples were detected by nested PCR (nPCR), PCR products were detected through agarose gel electrophoresis followed by nucleotide sequencing. **Results** A total of 111 of 535 outpatient's samples were HPV positive, with the positive rate of 20.75%. Among 111 positive samples, 77 cases were high risk type (69.37% of the total positive rate), 34 cases were low risk type (30.63% of the total positive rate). The most common HPV subtype in the cervical infected population in Kunming area were subtype 16, 58, 33, 35, 18 and 31 in turn. The most common subtypes of low risk were subtype 6, 81, 11, 91 in turn. **Conclusion** Type 16 and type 58 were the main high risk subtypes, and type 6 was the main low risk subtype in Kunming city. High risk type was the common type among the total positive samples.

Key words Cervical cancer; Human papillomavirus (HPV); Genotype

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一组在人类广泛传播的疾病。已有 120 多个亚型被确

定, 其中约有 40 种涉及生殖道感染, 约有 20 余种与肿瘤有关。HPV 感染可引起头颈癌、乳腺癌、肛门癌、阴茎癌、外阴癌和宫颈癌, 尤其是宫颈癌^[1-4]。在世界范围内宫颈癌的发生率为女性恶性肿瘤发生率的第 2 位, 每年我国宫颈癌的新发病例 > 30 万, 占全球的 1/4 ~ 1/3, 且发病年龄趋于年轻化。人们根据其致癌性把 HPV 分为高危型和低危型, 高危型 HPV 主要有 16、18、58、45、31、33、39、51、52、56、59、68 型; 低危型 HPV 主要有 6、11、42、43、44 型^[5,6]。高危型

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81171946); 云南省自然科学基金资助项目(2009ZC187M, 2012FB188); 云南省科技厅社会发展科技计划项目(2011CA016)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者: 孙强明, 研究员, 博士生导师, 电子信箱: msun08@ yahoo.com