文章编号:1000-5404(2008)14-1357-03

论著

二甲双胍减轻软脂酸诱导的血管内皮细胞损伤机制探讨

程 莹,母义明,汪保安,潘长玉,陆菊明 (解放军总医院内分泌科,北京 100853)

摘 要:目的 了解二甲双胍在软脂酸(PA)诱导的血管内皮细胞损伤中的保护作用及机制。**方法** 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)在空白对照、PA、二甲双胍和PA联合二甲双胍培养液中培养24 h。RT-PCR方法测定单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的mRNA表达,Western blot测定24 h细胞的ICAM-1、核因子κB p65(NF-κB p65)和磷酸化抑制因子κBα(IκBα)的蛋白表达。**结果** 与对照组相比,PA组的MCP-1和ICAM-1表达显著增加($P<0.05$)。加入二甲双胍后,MCP-1和ICAM-1表达显著减少($P<0.05$)。二甲双胍降低PA诱导的NF-κB p65和磷酸化IκBα表达增加。**结论** 二甲双胍可能通过激活AMPK,阻断PA对NF-κB的激活,减少MCP-1和ICAM-1表达,从而减轻PA诱导的HUVEC损伤。

关键词: 二甲双胍;AMP-激活蛋白激酶;血管内皮细胞;细胞间黏附分子-1;单核细胞趋化蛋白-1;核因子κB
中图法分类号: R322.12;R589.2;R966 **文献标识码:** A

Protective mechanism of metformin in process of human umbilical vein endothelial cell injury induced by palmitic acid *in vitro*

CHENG Ying, MU Yi-ming, WANG Bao-an, PAN Chang-yu, LU Ju-ming (Department of Endocrinology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of metformin in the process of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by palmitic acid (PA). **Methods** HUVECs were cultured in the media of blank, PA, metformin, or PA combined metformin for 24 h, 48 h, 72 h respectively. Expressions of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined by RT-PCR and the expressions of ICAM-1, nuclear factor kappa B p65 (NF-κB p65) and phospho-IκBα was evaluated by Western blotting. **Results** Significant increase of the expressions of MCP-1 and ICAM-1 was found in PA group compared with in the control group ($P<0.05$). However, obvious decrease was observed in both group when metformin was added ($P<0.05$). The increase of the expressions of NF-κB p65 and phospho-IκBα induced by PA was also abated by metformin. **Conclusion** Metformin can alliviate the HUVECs injury induced by PA by activating AMPK, reducing the expression of MCP-1 and ICAM-1 activated by NF-κB.

Key words: metformin; AMP-activated protein kinase; human umbilical vein endothelial cell; intercellular adhesion molecule-1; monocyte chemoattractant protein-1; nuclear factor kappa B

高游离脂肪酸血症作为引起胰岛素抵抗的主要原因,在糖尿病和代谢综合征患者血管内皮细胞损伤的发生、发展过程中具有重要作用。我们以往的研究发现,二甲双胍(metformin,MET)能够减轻软脂酸(palmitic acid, PA)诱导的血管内皮细胞损伤[1],接下来我们进一步探讨二甲双胍减轻PA诱导的血管内皮细胞损伤的可能机制。

作者简介:程 莹,女,江苏省苏州市人,博士,主治医师,主要从事糖尿病及代谢综合征方面的研究,发表论文20余篇。电话:(028)86570131,E-mail:chengyingxgg@sohu.com
通信作者:母义明,E-mail:muyiming@301hospital.com.cn
收稿日期:2007-06-27;修回日期:2007-11-01

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)取自健康产妇的脐静脉(均征得同意),用含10%内皮细胞支持物、20%胎牛血清、1%肝素钠、1%谷氨酰胺和1% Hepes的DMEM培养液,在37 ℃、5% CO_2的孵箱中培养。

1.2 RT-PCR测定单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)mRNA的表达

取对数生长期细胞接种于24孔培养板,按如下顺序分别

加入各种刺激物,包括未加任何刺激物的对照组、PA 组(300 μmol/L)、MET 组(2 mmol/L)、PA + MET 组,继续孵育细胞 24 h,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 3 次后裂解细胞,提取细胞 RNA 并测定浓度。取 5 μg 总 RNA 进行反转录,反应体系参照 Invitrogen 公司 SuperScript™ Ⅱ[aa]逆转录酶试剂盒说明,42 ℃加热 50 min 进行反转录,70 ℃加热 15 min 灭活反转录酶,反转录获得 cDNA。以 1 μl cDNA 为模板,在 30 μl 的 PCR 反应体系中扩增。MCP-1 (391 bp)上游引物 5′-AGAATCACCAGCAGCAAG-3′,下游引物 5′-ACATCCCAGGGGTAGAAC-3′,94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸1 min,共 30 个循环,继续 72 ℃延伸 5 min。ICAM-1 (684 bp)上游引物 5′-GCAAGAAGATAGCCAACCA-3′,下游引物 5′-GCCGGAAAGCTGTAGATG-3′,94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min,共 28 个循环,继续 72 ℃延伸 5 min。取 10 μl PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统分析图像结果。

1.3 Western blot 测定 ICAM-1、核因子 κB p65(nuclear factor kappa B p65, NF-κB p65)和磷酸化抑制因子 κBα(inhibitor κBα, IκBα)蛋白表达

按 1.1 方法培养细胞,各种刺激物处理细胞 24 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解液,提取总蛋白并测定浓度。取 100 μg 蛋白样品 SDS-PAGE 胶电泳,转膜至 PVDF 膜上,封闭、洗膜,分别先后加入小鼠抗人 ICAM-1 一抗(1∶1 000)和 HRP 标记的羊抗小鼠二抗(1∶1 000)、兔抗人 NF-κB p65 一抗(1∶1 000)和 HRP 标记的羊抗兔二抗(1∶1 000)、小鼠抗人磷酸化 IκBα 一抗(1∶1 000)和 HRP 标记的羊抗小鼠二抗(1∶1 000)孵育,洗膜、显色、曝光。

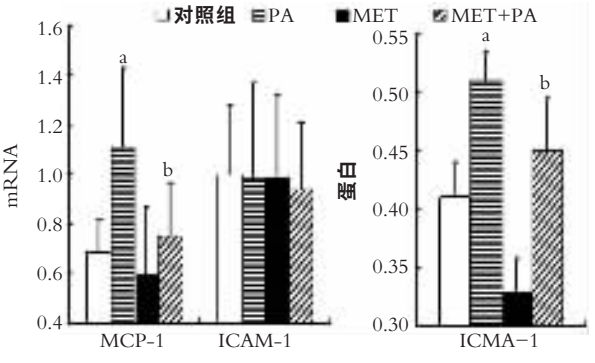
1.4 统计学处理

使用 ImageTool 图像处理软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组细胞 MCP-1 和 ICAM-1 表达水平

300 μmol/L 的 PA 处理细胞 24 h 后,MCP-1 的 mRNA 和 ICAM-1 的蛋白表达显著增加($P<0.05$)。2 mmol/L 的二甲双胍能够显著减少由 PA 造成的 MCP-1 和 ICAM-1 表达增加($P<0.05$),见图 1。

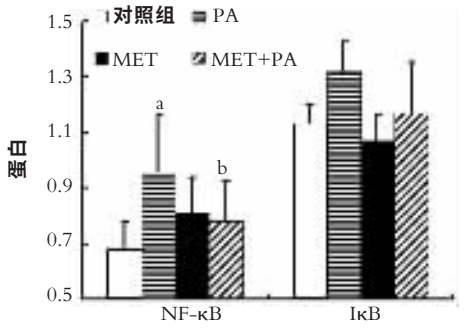


a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 PA 比较

图 1 各组细胞 MCP-1 和 ICAM-1 的表达水平

2.2 各组细胞 NF-κB p65 和磷酸化 IκBα 表达水平

PA 组细胞的 NF-κB p65 和磷酸化 IκBα 表达均增加,加入二甲双胍后能够逆转 NF-κB p65 和磷酸化 IκBα 表达增加,见图 2。



a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 PA 比较

图 2 各组细胞 NF-κB p65 和磷酸化 IκBα 的表达水平

3 讨论

在多种组织细胞中,二甲双胍均能够通过增加细胞内 AMP/ATP 的比值和另外一种直接的信号途径来激活 AMPK[2,3]。我们以往的研究证实,二甲双胍能够通过激活 HUVEC 的 AMPK,减少 PA 诱导的血管内皮细胞损伤[1]。本研究进一步探讨了在高浓度 PA 条件下,二甲双胍激活 AMPK 后对血管内皮细胞黏附因子与趋化因子的影响。

黏附因子和趋化因子在动脉粥样硬化斑块病变形成过程中起着始动作用。MCP-1 是单核细胞黏附并进入血管内皮下间隙的一种重要的趋化因子[4],ICAM-1 是内皮细胞表面表达的一种结构蛋白,无论是否存在心血管病变,ICAM-1 水平升高都是未来发生心血管事件的重要预测因子[5,6]。长期暴露于高游离脂肪酸的环境之下,将不可避免出现血管内皮细胞的损伤,我们的研究显示,PA 能够显著增加 HUVEC 的 MCP-1 和 ICAM-1 表达,说明 PA 引起的 MCP-1 和 ICAM-1 水平增高可能参与了其造成的血管功能的异常;而在加用二甲双胍后,能够减轻这种损害的发生。

NF-κB 是一类广泛存在于真核细胞的转录因子,MCP-1 和 ICAM-1 都是 NF-κB 的下游靶基因。NF-κB 的活性受细胞质中抑制蛋白 IκB 的调节。我们的研究显示,PA 处理的血管内皮细胞 IκBα 磷酸化增加,从而失去了对 NF-κB 的抑制作用,NF-κB 活化[7]后进入细胞核内,启动包括 MCP-1 和 ICAM-1 等一系列基因的转录,上调 MCP-1[8,9]和 ICAM-1 的表达。激活 AMPK 对血管内皮细胞的保护作用与其对 IκB 激酶/NF-κB 系统的改变有关[10],既然 NF-κB 参与调控了 PA 诱导的 HUVEC 的 MCP-1 和 ICAM-1 表达增加,而二甲双胍激活 AMPK 可以减少 PA 诱导的血管内皮细胞 MCP-1 和 ICAM-1 表达增加,因此我们有理由推测,二甲双胍激活 AMPK 后能够通过 NF-κB 途径减少 PA 诱导的 MCP-1 和 ICAM-1 表达。

有研究表明[11],糖耐量受损患者使用二甲双胍后,体内 ICAM-1 水平下降。英国前瞻性糖尿病研究

中服用二甲双胍的糖尿病患者心血管事件的发生率和死亡率较其他组减少[12],提示二甲双胍除了传统的降糖作用之外,还具有独立于降糖作用之外的抗动脉粥样硬化的作用。我们的研究提示,二甲双胍的这种作用可能与其激活AMPK后,通过抑制NF-κB的活化,进而减少游离脂肪酸诱导的HUVEC的MCP-1和ICAM-1表达增加有关。

参考文献:

[1] 程 莹, 母义明, 汪保安, 等. 激活的一磷酸腺苷活化蛋白激酶对软脂酸诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(9): 957-960.
[2] Chau-Van C, Gamba M, Salvi R, *et al*. Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons[J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 507-511.
[3] Fryer L G, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25226-25232.
[4] Gao X, Iwai M, Inaba S, *et al*. attenuation of monocyte chemoattractant protein-1 expression *via* inhibition of nuclear factor-kappab activity in inflammatory vascular injury[J]. Am J Hypertens, 2007, 20(11): 1170-1175.
[5] Dessein P H, Joffe B I, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): R634-R643.
[6] Haim M, Tanne D, Boyko V, *et al*. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(7): 1133-1138.
[7] Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney J F Jr, *et al*. AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(4): 1204-1209.
[8] Denk A, Goebeler M, Schmid S, *et al*. Activation of NF-kappaB *via* the IkappaB kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 28451-28458.
[9] Oh G T, Choi J H, Hong J J, *et al*. Dietary hematein ameliorates fatty streak lesions in the rabbit by the possible mechanism of reducing VCAM-1 and MCP-1 expression[J]. Atherosclerosis, 2001, 159(1): 17-26.
[10] Ruderman N B, Cacicedo J M, Itani S, *et al*. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes[J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(Pt 1): 202-206.
[11] Caballero A E, Delgado A, Aguilar-Salinas C A, *et al*. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(8): 3943-3948.
[12] Abbasi F, Chu J W, McLaughlin T, *et al*. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Metabolism, 2004, 53(2): 159-164.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2008)14-1359-01

个案与短篇

后牙干髓术后残髓炎88例临床分析

赵文峰,陈增力,刘继延,张伶军,王丽英 (北京军区总医院口腔科,北京 100700)

后牙残髓炎多因干髓术后残留的活髓组织发生感染而形成,主要表现为疼痛。由于残留牙髓部位不同,疼痛症状临床表现亦不同,易造成误诊和漏诊[1]。我科1998-2003年治疗后牙干髓术后残髓炎患者88例,临床效果可靠,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

88例患者,其中男性35例;女性53例。年龄28~65岁,平均40.9岁。后牙101颗,上颌后牙33颗,下颌后牙68颗。均为干髓术后出现冷热刺激痛和咬合痛而就诊。X线片显示:根尖区阴影。

1.2 方法

重新开髓、拔髓,分别行牙髓塑化治疗11颗、上颌磨牙腭根和下颌磨牙远中根根管治疗以及余留根管干髓术77颗、干髓术13颗。

2 结果

101颗后牙干髓术后残髓炎重新进行牙髓治疗后,临床观察2年,89颗无自觉症状,X线片显示根尖阴影消失或缩小;12颗因劈裂拔除。

3 讨论

后牙残髓炎的主要原因为干髓术治疗失败。因此,牙髓治疗采用干髓术要严格选择适应证:轻度牙髓炎、慢性牙髓炎无放散痛以及牙髓部分坏死无叩痛[1],干髓术适应证选择不当易造成牙髓治疗失败。另外,干髓剂存放时间过久导致有效成分的降低,亦是干髓术治疗失败的原因之一。

干髓术后残髓炎后牙需要复查病历或追问病史,是否曾经做过牙髓治疗。由于后牙干髓术后残髓炎虽然仍表现为牙髓炎

(下转1363页)

作者简介:赵文峰,男,河南省安阳市人,硕士,主任医师,主要从事口腔正畸、口腔修复和口腔颌面外科方面的研究,发表论文30余篇。电话:(010)66721957

收稿日期:2008-05-09;修回日期:2008-05-29