论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1430-04

# Exendin-4 对猪髂动脉内皮细胞 NO 释放的影响

刘浩宇*,胡小春*,张冬颖,覃 数 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心血管内科)

[摘要] **目的** 观察 Exendin-4(Ex-4)对猪髂动脉内皮细胞(pig iliac endothelium cell lines,PIEC)释放一氧化氮(NO)的影响,及其与细胞内外钙浓度的关系。**方法** 免疫荧光法检测确认 PIEC 上存在胰高血糖素样肽-1 受体(glucagon-like peptide-1,GLP-1R);Griess 重氮化反应检测 Ex-4 对有钙、无钙 2 种培养基条件下内皮细胞 NO 释放的影响,流式细胞仪检测细胞内钙浓度,评价 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的时效-量效关系。给予内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)信号阻断剂左旋-硝基精氨酸甲脂(L-NAME)预处理后,观察 Ex-4 对 PIEC 释放 NO 的影响。**结果** PIEC 上有 GLP-1 受体表达。Ex-4 能刺激 PIEC 释放 NO,作用有剂量及时间依赖关系,同时细胞内钙离子浓度也有升高[(62.67±1.53)*vs*(57.36±1.42),$P<0.01$]。无钙培养液组 PIEC 释放 NO 较有钙培养液组升高更明显[(2.014±1.040)μmol/L *vs* (1.624±0.424)μmol/L,$P=0.03$]。Ex-4 刺激 PIEC 释放 NO L-NAME 预处理后,Ex-4 诱导的 PIEC 释放 NO 减少($P<0.01$)。**结论** Ex-4 通过激活 eNOS 增加内皮细胞 NO 释放,其 eNOS 激活作用可能与细胞内外钙离子变化相关。

[关键词] 胰高血糖素样肽-1;一氧化氮;内皮细胞

[中图法分类号] R322.121;R329.26;R977.15 [文献标志码] A

# Effect of Exendin-4 on nitric oxide release from pig iliac endothelial cells

Liu Haoyu, Hu Xiaochun, Zhang Dongying, Qin Shu (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of Exendin-4(Ex-4)on nitric oxide (NO)release from pig iliac endothelial cells (PIEC) and its relation with intra- and extracellular calcium concentrations. **Methods** Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) was detected in PIEC with immunofluorescence assay. Effect of Ex-4 on NO release from PIEC was detected by Griess diazonium reaction in medium with calcium or without calcium. Intracellular calcium concentration was measured with a flow cytometer. Relation between time and concentration effectiveness of Ex-4-induced NO release from PIEC was assessed. Effect of Ex-4 on NO release from PIEC was observed after pretreated with the eNOS signal blocker, L-NAME. **Results** The GLP-1R was expressed in PIEC. Ex-4 stimulated the NO release from PIEC in a dose- and time-dependent manner. The intracellular calcium concentration was higher than the extracellular calcium concentration (62.67±1.53 *vs* 57.36±1.42, $P<0.01$). The NO release level was significantly higher from PIEC in the medium without calcium than in the medium with calcium (2.014±1.040 *vs* 1.624±0.424 μmol/L, $P=0.03$). The Ex-4-induced NO release from PIEC after pretreatment than before pretreatment with L-NAME($P<0.01$). **Conclusion** Ex-4 increases NO release from PIEC by activating eNOS. The role of Ex-4 in activating eNOS may be related with the intracellular calcium concentration.

[**Key words**] glucagon-like peptide-1;nitric oxide;endothelial cells

Liu Haoyu and Hu Xiaochun are the first authors who contributed equally to the article. Corresponding author:Zhang Dongying,E-mail: zdy.chris@gmail.com; Qin Shu,E-mail: qinshu@21cn.com

* 同等贡献者

[通信作者] 张冬颖,E-mail:zdy.chris@gmail.com

覃 数,E-mail:qinshu@21cn.com

胰高血糖素-1(glucagon-like peptide-1,GLP-1)是由末端空肠、回肠和结肠的郎罕氏细胞分泌的一种多肽激素,具有葡萄糖依赖性促胰岛素分泌和合成作用,因半衰期短,分泌入血后 1 ~2 min 即被降解而限制其临床应用[1]。GLP-1 类似物与 GLP-1 有高度相似的分子结构和生物学作用,半衰期较长,目前已用于 2 型糖尿病治疗[2-4]。有研究[5-8]报道 GLP-1 类似物可能具有心血管保护作用,该作用可能与诱导内皮细胞一氧化氮(nitric oxide,NO)释放相关。该研究显示 GLP-1 类似物 Liraglutide 可引起人脐静脉内皮细胞 eNOS 磷酸化,浓度依赖性的诱导 NO 升高;但给予 PI3K/Akt 通路及 PKA 信号转导通路的抑制剂均不能抑制 eNOS 磷酸化,提示 GLP-1 类似物激活 eNOS,诱导 NO 释放的作用可能与其他信号相关。钙信号对 eNOS 活性调节具有重要作用[6],GLP-1 类似物是否通过钙信号激活 eNOS 增加内皮细胞 NO 浓度有待研究。本研究拟用 GLP-1 类似物 Exendin-4(Ex-4)及 eNOS 阻断剂 L-NAME 处理有钙或无钙培养基(DMEM/RPMI1640)培养的猪髂动脉内皮细胞(pig iliac endothelium cell lines,PIEC),检测 NO 和细胞内钙的变化,探讨 Ex-4 改善内皮功能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

PIEC 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。Ex-4 为 Eli Lilly America 公司惠赠。DMEM(含钙)、RPMI1640 培养基(无钙)和胎牛血清购自 HyClone 公司。胰蛋白酶、多聚甲醛、BSA、防荧光淬灭封闭剂、EDTA、Griess Reagent、BSA、eNOS 阻断剂 L-NAME、Fluo-3 AM 钙离子荧光探针均购自碧云天生物技术研究所。使用美国 MD SPectraMax M2 多功能酶标仪测定光密度。荧光素标记抗 GLP-1R 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。美国 BD 公司 Flow Cytometer FACS Vantage SE 流式细胞仪进行细胞内钙测定。

### 1.2 方法

1.2.1 PIEC 培养 将 PIEC 分别培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM、RPMI1640 培养液中,分组标记后 5% $CO_2$ 培养箱 37 ℃ 贴壁培养,待细胞 80% 融合时加入含有 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化传代。拟用免疫荧光测 GLP-1 受体抗体的细胞组接种于 24 孔板,拟用 Ex-4 及 L-NAME 处理,Griess Reagent 测 NO 的细胞组接种于 96 孔板,流式细胞仪测细胞内钙组使用 6 孔板培养,细胞达到同步化后给予相应的处理因素。

1.2.2 PIEC 细胞膜上 GLP-1 受体检测 细胞接种于每孔预置一片盖玻片的 24 孔板爬片,爬片长到 60% ~80% 时用 37 ℃ PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。5% BSA 封闭 30 min。加入 1% BSA 稀释的 FITC 标记抗 GLP-1R 抗体,37 ℃湿盒过夜;翌日晨用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。防荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察(激发波长 490 nm,发射波长 530 nm)。

1.2.3 选 Ex-4 的干预浓度、时间及给予预处理因素

1.2.3.1 粗筛 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的 Ex-4 浓度范围 6 个梯度浓度处理组($n$=8),分别含有 0.001、0.01、0.1、1、10、25 μg/ml Ex-4,同时在有钙/无钙培养液内孵育内皮细胞 6 h,测定 NO 浓度。

1.2.3.2 筛查 Ex-4 的最佳处理时间 5 个时间处理组($n$=8)均给予 8 μg/ml Ex-4 在无钙培养液内孵育 2、4、8、12、24 h 后测定 NO 浓度。

1.2.3.3 细筛诱导 PIEC 释放 NO 的 Ex-4 浓度范围 以 5 个梯度浓度($n$=8),分别含有 0.5、1、2、4、8 μg/ml Ex-4,同时在有钙/无钙培养液中孵育 PIEC 8 h,测定 NO 浓度。

1.2.3.4 eNOS 阻断剂预处理 用含 0、10、100、1 000 μmol/L 的 L-NAME 预处理 12 h,再给予终浓度 8 μg/ml Ex-4 共孵育内皮细胞 24 h($n$=8)。

1.2.4 细胞上清液 NO 水平测定 使用 Griess 法,按试剂盒操作说明进行操作,细胞培养液为 DMEM + 10% FBS 或 PRMI1640 + 10% FBS 时,则采用 DMEM + 10% FBS 或 PRMI1640 + 10% FBS 为稀释标准品。酶标仪 540 nm 测定光密度值[$D$(540)]。

1.2.5 细胞内钙测定 6 孔板培养细胞,同步化后给予相应的处理因素。取其上清培养液 Griess 法测 NO 浓度,剩下的细胞和使用 PBS 稀释到 5 μmol/L 的 Fluo-3 AM (Fluo-3 AM 钙离子探针)一起在 37 ℃孵育 60 min 进行荧光探针装载,随后用 PBS 洗涤 5 min ×3 次,洗涤后再孵育 30 min,用胰酶消化重悬细胞后,在流式细胞仪以激发波长 488 nm,发射波长 525 nm 进行细胞内钙浓度检测。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,成组设计资料的 2 组比较使用独立样本均数 $t$ 检验,多样本均数比较使用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 GLP-1 受体在 PIEC 的表达

荧光显微镜下观察到黑色背景下细胞膜和细胞质可见明亮的绿色荧光信号,细胞核处绿色荧光暗淡,提示 PIEC 有 GLP-1 受体主要表达于细胞膜及细胞质(图 1)。

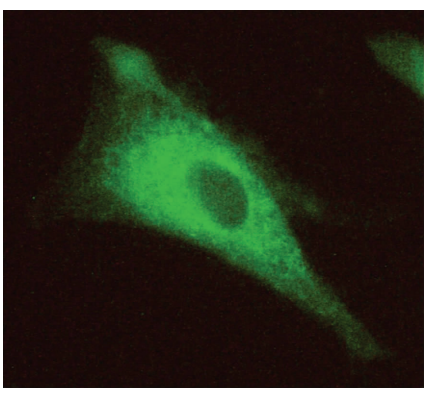


**图 1 荧光显微镜观察 GLP-1 受体在 PIEC 上的表达**

**表1 粗筛 Ex-4 不同浓度诱导 PIEC 释放 NO 的量效关系**（μmol/L，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | 25 μg/ml | 10 μg/ml | 1 μg/ml | 0.1 μg/ml | 0.01 μg/ml | 0.001 μg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DMEM 组 | 1.368 ± 0.020[a] | 1.471 ± 0.032 | 1.369 ± 0.014[a] | 1.294 ± 0.042[a] | 1.349 ± 0.012[a] | 1.344 ± 0.013[a] |
| RPMI1640 组 | 1.367 ± 0.010[a] | 1.498 ± 0.048 | 1.414 ± 0.027[a] | 1.392 ± 0.024[a] | 1.377 ± 0.023[a] | 1.375 ± 0.021[a] |

a：$P<0.01$，与 Ex-4 10 μg/ml 比较

**表2 细筛 Ex-4 不同浓度诱导 PIEC 释放 NO 的量效关系**（μmol/L，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | 8 μg/ml | 4 μg/ml | 2 μg/ml | 1 μg/ml | 0.5 μg/ml |
|---|---|---|---|---|---|
| DMEM 组 | 2.424 ± 0.078 | 1.597 ± 0.173[a] | 1.333 ± 0.000[a] | 1.388 ± 0.001[a] | 1.380 ± 0.044[a] |
| RPMI1640 组 | 4.056 ± 0.145 | 1.550 ± 0.067[a] | 1.463 ± 0.079[a] | 1.584 ± 0.115[a] | 1.417 ± 0.074[a] |

a：$P<0.01$，与 Ex-4 8 μg/ml 比较

### 2.2 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的时效和量效关系

2.2.1 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的量效关系 粗筛实验显示在 DMEM 和 RPMI1640 两种培养液中，1 μg/ml 及 10 μg/ml Ex-4 处理组的 NO 升高位于量效曲线的峰段，10 μg/ml Ex-4 处理组 NO 升高较其他组更明显（$P<0.05$，表1）；不同培养液的组间比较提示，RPMI1640 组 NO［(1.404 ± 0.052) μmol/L］较 DMEM 组［(1.366 ± 0.058) μmol/L］升高更明显（$P<0.01$）。细筛实验显示在相同培养液、不同 Ex-4 浓度处理组中，8 μg/ml Ex-4处理组 NO 较其他各组升高更明显（$P<0.01$，表2）；不同培养液的组间比较提示，RPMI1640 组 NO［(2.014 ± 1.040) μmol/L］较 DMEM 组［(1.624 ± 0.424) μmol/L］升高更明显（$P=0.03$）。

2.2.2 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的时效关系 Ex-4 处理后 NO 有逐渐升高的趋势，在 8 h 后逐渐降低；Ex-4 处理 PIEC 8 h［(4.018 ± 0.208) μmol/L］时 NO 较 2 h［(1.393 ± 0.023) μmol/L］、4 h［(1.862 ± 0.100) μmol/L］、12 h［(2.865 ± 0.052) μmol/L］、24 h［(2.524 ± 0.112) μmol/L］显著升高（$P<0.01$）。

### 2.3 eNOS 阻断剂 L-NAME 对 Ex-4 诱导的 PIEC 释放 NO 的阻断作用

eNOS 阻断剂 L-NAME 对 Ex-4 引起的内皮细胞 NO 释放有明显阻断作用。DMEM 和 RPMI1640 两种培养液组均显示出：10、100、1 000 μmol/L L-NAME 预处理后，PIEC 释放 NO 较对照组显著减少（$P<0.01$）；而 10 μmol/L 和 100 μmol/L L-NAME 预处理组二者之间无显著差异（$P>0.05$），见表3。

**表3 L-NAME 不同浓度对 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 的阻断作用**（μmol/L，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | 0 μg/ml | 10 μg/ml | 100 μg/ml | 1 000 μg/ml |
|---|---|---|---|---|
| DMEM 组 | 2.291 ± 0.138 | 1.579 ± 0.046[a] | 1.533 ± 0.021[a] | 1.702 ± 0.139[a] |
| RPMI1640 组 | 3.102 ± 0.012 | 2.225 ± 0.141[a] | 2.111 ± 0.282[a] | 2.545 ± 0.278[a] |

a：$P<0.01$，与 L-NAME 0 μg/ml 比较

### 2.4 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 与细胞内外钙浓度的关系

无钙培养液培养条件下，8 μg/ml Ex-4 预处理组（Ex-4 组）PIEC 后 8 h 后，流式细胞仪检测发现 Ex-4 处理组细胞内钙浓度（62.67 ± 1.53）较对照组（57.36 ± 1.42）明显升高（$P<0.01$）。

## 3 讨论

GLP-1 类似物受体除了在胰腺组织外，还广泛分布于胰腺、胃肠道、心脏、内皮等组织，为它可能存在降糖外作用奠定了组织基础。本实验采用免疫荧光法，鉴定 PIEC 细胞膜上存在 GLP-1 受体，通过观察细胞培养液中 NO 变化，确定 Ex-4 呈时间及浓度依赖性诱导 PIEC 释放 NO，这与 Hattori 等[5]报道 GLP-1 类似物 Liraglutide 可诱导人脐静脉内皮细胞释放 NO 的结果相似。

在摸索 Ex-4 诱导 NO 释放的时间-量效关系中，我们先采用 0.001 ~ 25 μg/ml 6 个梯度浓度的 Ex-4 处理 PIEC，结果显示 1 μg/ml 和 10 μg/ml Ex-4 处理组 NO 升高较其他组更明显。我们缩小筛选浓度范围到 0.5 ~ 8 μg/ml 之间，证实：8 μg/ml Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO 最显著。在探索 Ex-4 处理 PIEC 最佳时间的实验中，结果显示 NO 含量变化呈现单峰曲线，由此确定最佳作用时间为 8 h。这与 Hattori 等[5]报道 Liraglutide 有效浓度为 0.01 ~ 100 μg/ml、NO 升高达峰时间为4 ~ 5 h 不一致，差异可能与处理药物不同、细胞种属不同相关。

GLP-1 类似物主要用于糖尿病治疗，GLP-1 类似物可能存在的心血管保护作用，最早也是在糖尿病患者的研究中被报道[9-16]，但其心血管保护机制是什么，其作用是否有普遍意义还未得以论证。本实验证实 Ex-4 呈时间及浓度依赖性诱导 PIEC 释放 NO，提示 Ex-4 的心血管保护作用可能与 NO 和血管内皮功能相关。NO 由一氧化氮合酶（NOS）通过 L-Arg-NO-cGMP 通路产生，NO 具有舒张血管、抑制血小板黏附聚集、抑制平滑肌增生等作用，是血管内皮细胞功能完整的标志。NO 产量和活性的降低往往是动脉粥样硬化发生的最早期标志之一[17-18]。本实验证实 eNOS 阻断剂 L-NAME 能显著抑制 Ex-4 诱导 PIEC 释放 NO，提示

eNOS 可能是 Ex-4 诱导 NO 释放,发挥心血管保护作用的关键。

GLP-1 类似物通过何种机制调控激活 eNOS,目前尚不清楚。Hattori 等[5]研究了 PI3K/Akt 通路和 PKA 通路,证实 GLP-1 类似物 Liraglutide 对 eNOS 的调控与前述两个通路无关。钙是细胞内重要的第二信使,参与多种重要细胞功能的调节,钙是否参与 GLP-1 类似物诱导 NO 释放,尚少相关报道。我们假设 GLP-1 类似物通过钙信号调节 NO 的产生。内皮细胞的细胞内钙水平受细胞膜上钙通道钙内流及细胞内钙库钙释放的影响[19-21]。本研究探索了不同的外钙环境对 Ex-4 作用 PIEC 后 NO 产生的影响。我们采用两种培养液:含钙的 DMEM 培养液和不含钙的 RPMI1640 培养液,结果显示无钙培养液培养的 PIEC 在 Ex-4 处理后 NO 升高较有钙培养液组显著,表明细胞外钙浓度对该过程有影响,提示在 Ex-4 诱导内皮细胞 NO 释放过程中,可能没有细胞外钙内流的参与。其次,本研究用 Fluo-3 AM 荧光探针染色、流式细胞仪测定细胞内钙变化。发现无钙培养液培养条件下,Ex-4 诱导 NO 释放达高达峰时,细胞内钙浓度也显著升高,提示 Ex-4 诱导内皮细胞 NO 升高可能与细胞内钙库钙释放有关,但具体的机制还有待于进一步的研究和探讨。

本研究从一个新的角度揭示了 Ex-4 的心血管保护机制,可能与通过激活 eNOS 增加内皮细胞 NO 浓度相关,钙信号与这一过程相关,细胞内钙库钙释放可能是其中的关键。

## 参考文献:

[1] Garber A J. Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability[J]. Diabetes Care, 2011, 34 (Suppl 2): S279 - S284.

[2] Sennik D, Ahmed F, Russell-Jones D. Exenatide, a GLP-1 agonist in the treatment of Type 2 diabetes[J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2012, 7(1): 15 - 26.

[3] Goto H, Nomiyama T, Mita T, *et al*. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 405(1): 79 - 84.

[4] McDougall C, McKay G A, Fisher M. Drugs for diabetes: part 6 GLP-1 receptor agonists[J]. Br J Cardiol, 2011, 18(4): 167 - 169.

[5] Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, *et al*. A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells[J]. Diabetologia, 2010, 53(10): 2256 - 2263.

[6] Xia Y. Superoxide generation from nitric oxide synthases[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(10): 1773 - 1778.

[7] Sivertsen J, Rosenmeier J, Holst J J, *et al*. The effect of glucagon-like peptide-1 on cardiovascular risk [J]. Nature Reviews Cardiology, 2012, 9(4): 209 - 222.

[8] Ceriello A, Esposito K, Testa R, *et al*. The possible protective role of glucagon-like peptide-1 on endothelium during the meal and evidence for an "endothelial resistance" to glucagon-like peptide-1 in diabetes [J]. Diabetes Care, 2011, 34(3): 697 - 702.

[9] Ha S J, Kim W, Woo J S, *et al*. Preventive Effects of Exenatide on Endothelial Dysfunction Induced by Ischemia-Reperfusion Injury *via* KATP Channels [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2012, 32: 474 - 480.

[10] Mundil D, Cameron-Vendrig A, Husain M. GLP-1 receptor agonists: A clinical perspective on cardiovascular effects [J]. Diabetes and Vascular Disease Research, 2012, 9 (2): 95 - 108.

[11] Davidson M H. Cardiovascular effects of glucagonlike peptide-1 agonists[J]. Am J Cardiol, 2011, 108(3 Suppl): 33B - 41B.

[12] Best J H, Hoogwerf B J, Herman W H, *et al*. Risk of cardiovascular disease events in patients with type 2 diabetes prescribed the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonist exenatide twice daily or other glucose-lowering therapies: a retrospective analysis of the LifeLink database[J]. Diabetes Care, 2011, 34(1): 90 - 95.

[13] Arakawa M, Mita T, Azuma K, *et al*. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4 [J]. Diabetes, 2010, 59(4): 1030 - 1037.

[14] Grieve D J, Cassidy R S, Green B D. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(8): 1340 - 1351.

[15] Hirata K, Kume S, Araki S, *et al*. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(1): 44 - 49.

[16] Okerson T, Yan P, Stonehouse A, *et al*. Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes[J]. Am J Hypertens, 2010, 23(3): 334 - 339.

[17] Bellien J, Favre J, Iacob M, *et al*. Arterial stiffness is regulated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor during changes in blood flow in humans[J]. Hypertension, 2010, 55(3): 674 - 680.

[18] Huang P L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease [J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(6): 295 - 302.

[19] Yamamoto K, Ando J. Blood flow sensing mechanism *via* calcium signaling in vascular endothelium[J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130 (11): 1407 - 1411.

[20] Liang C F, Au A L, Leung S W, *et al*. Endothelium-derived nitric oxide inhibits the relaxation of the porcine coronary artery to natriuretic peptides by desensitizing big conductance calcium-activated potassium channels of vascular smooth muscle[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 334(1): 223 - 231.

[21] Zhang D, Freedman B I, Flekac M, *et al*. Evaluation of genetic association and expression reduction of TRPC1 in the development of diabetic nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2009, 29(3): 244 - 251.

(**收稿**:2012-01-25;**修回**:2012-03-30)

(编辑 栾 嘉)