基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0793-04

丹参酮ⅡA磺酸钠预处理对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞fractalkine表达的影响

周 平，曾得康，李法琦，张 彬，殷 菱
（重庆医科大学附属第一医院老年病科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨丹参酮ⅡA磺酸钠（Sodium tanshinone ⅡA sulfonate，STS）预处理对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）fractalkine（FKN）表达的影响及其可能机制。方法：对数生长期的HUVECs，分为正常组（N），高糖组（HG），STS组（STS），高糖加STS组（HG+STS），高糖加STS与氯化锂组（HG+STS+LiCl），5.5 mm的低糖DMEM培养的HUVECs种板10 h后按以上分组加入5 mg/L的STS和（或）10 mm的LiCl预处理2 h，再用33.3 mm的高糖干预48 h后，免疫组化SABC法检测β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）、免疫荧光FITC法检测FKN蛋白水平变化，RT-PCR检测GSK-3β和FKN mRNA水平变化。结果：与正常组比较，高糖组FKN蛋白及mRNA水平（$P<0.05$），GSK3β mRNA水平（$P<0.05$）明显增加，β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）蛋白表达（$P<0.05$）降低；与高糖组比较，STS组FKN蛋白及mRNA水平（$P<0.05$），GSK3β mRNA水平（$P<0.05$）明显降低，但仍高于正常组，β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）蛋白表达（$P<0.05$）增加，但仍低于正常组；STS与氯化锂共同预处理后以上改变更明显（$P<0.05$）。结论：STS抑制HUVEC FKN表达可能与Wnt信号通路有关。

【关键词】丹参酮ⅡA磺酸钠；高糖；fractalkine；人脐静脉内皮细胞；Wnt信号通路
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-09

The effects of sodium tanshinone ⅡA sulfonate pretreatment on high glucose-induced fractalkine expression in human umbilical vein endothelial cells

ZHOU Ping, ZENG De-kang, LI Fa-qi, ZHANG Bing, YIN Ling
(*Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of sodium tanshinone ⅡA sulfonate (STS) pretreatment on high glucose-induced expression of fractalkine (FKN) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and its possible mechanisms. *Methods*: HUVECs in good condition were divided into 5 groups: normal group (N), high glucose group (HG), STS group (STS), high glucose with STS group (HG+STS) and high glucose with STS and lithium chloride group (HG+STS+LiCl). After planted HUVECs in DMEM/LG (5.5 mmol/L) for 10 h, 5 mg/L STS and/or 10mmol/L LiCl was added for 2 h as above and then 33.3 mmol/L high glucose was added for 48h. Harvested and the protein levels of intracellular β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) were measured by immunohistochemistry staining (SABC) and membrane fractalkine were detected by immunofluorescence (FITC), and the mRNA expression of GSK-3β and FKN were measured by RT-PCR. *Results*: Compare with N, the

作者介绍：周 平（1971-），女，主治医师，硕士，
研究方向：老年心血管基础与临床研究。

[6] Baumann S, Fas S C, Giaisi M, et al. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC {gamma} 1-and Ca^{2+}-dependent apoptosis[J]. Am Soc Hematology, 2008, 111(4): 2354.

[7] Lee D H, Kim C, Zhang L, et al. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(10): 2020-2033.

[8] Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, et al. Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1): 269-274.

[9] Fas S C, Baumann S, Zhu J Y, et al. Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis[J]. Blood, 2006, 108(12): 3700-3706.

[10] Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa, et al. Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid Wogonin among human cancer cells and normal diploid cell[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1-2): 269-274.

（责任编辑：冉明会）

mRNA levels of GSK-3β ($P<0.05$) and both the protein and mRNA level ($P<0.05$) of fracalkine were increased and the protein expression of β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) ($P<0.05$) were decreased in HG; Compare with HG, the mRNA levels of GSK-3β ($P<0.05$) and both the protein and mRNA levels ($P<0.05$) of fractalkine were decreased and the protein levels of β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) were improved ($P<0.05$) in HG+STS; and both STS and lithium chloride pretreatment enhanced the effects above ($P<0.05$). *Conclusion*: STS pretreatment suppress the expression of FKN in HUVEC induced by high glucose and it may be relevant to Wnt signaling pathway.

【Key words】sodium tanshinone ⅡA sulfonate; high glucose; fractalkine; human umbilical vein endothelial cells; Wnt signaling pathway

糖尿病（Diabetes mellitus，DM）及其并发症的发生发展是一个慢性炎症反应过程，趋化因子及其受体在这一过程中起着重要作用。（FKN）Fractalkine 作为一种新发现的 CX_3C 类趋化因子[1]，其与 DM 肾病[2]及冠心病[3]的发生明显相关。另外，经典 Wnt 信号通路在细胞代谢，尤其是糖尿病引起的细胞代谢失调中起着重要作用[4]，高糖可诱导内皮细胞 Wnt1 和 p-GSK-3β 表达均明显降低[5]。有研究发现，高糖可诱导人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）表达 FKN[6]，我们的前期研究证实并进一步发现，高糖诱导 HUVECs 表达 FKN 且可能与经典 Wnt 信号通路有关[7]。另外，丹参酮ⅡA 磺酸钠（Sodium tanshinone ⅡA sulfonate，STS）具有抗炎作用[8]，但其是否影响 HUVECs FKN 表达以及经典 Wnt 信号通路是否参与这一过程未见文献报道。本研究在观察丹参酮ⅡA 磺酸钠预处理对高糖诱导的 HUVECs FKN 表达的基础上，探讨丹参酮ⅡA 磺酸钠可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HUVECs（中南大学湘雅医学院细胞库），DMEM 低糖培养基（GIBCO），胰酶（Sigma-Aldrich），优等胎牛血清（杭州四季青公司），丹参酮ⅡA 磺酸钠注射液（诺新康，上海第一生化药业有限公司，批号：100109），PBS、羊抗兔免疫组化试剂盒、DAB 显色液（武汉博士德生物工程有限公司），兔抗人 p-GSK-3β（Ser^9）单克隆抗体、兔抗人 β-catenin 单克隆抗体（EPITOMICS，Inc），羊抗人 fractalkine 多克隆抗体（Santa Cruz biotechnology，inc），兔抗羊 FITC（北京中杉金桥生物技术有限公司），氯化锂（生工生物工程（上海）有限公司），Trizol 试剂、逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒（宝生物工程（大连）有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs 培养及实验分组 HUVECs 用含 10%胎牛血清、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺的 DMEM/低糖培养基，于 37℃、5% CO_2、100%湿度的孵箱中常规传代培养。取对数生长期的 HUVECs，以 1×10^4 个/孔种于 24 孔板，以 4×10^4 个/孔种于 6 孔板，分为正常对照组（N）、高糖组（HG）、丹参酮ⅡA 磺酸钠组（STS）、高糖+丹参酮ⅡA 磺酸钠组（HG+STS）、高糖+丹参酮ⅡA磺酸钠+氯化锂组（HG+STS+LiCl）。四氮唑盐（MTT）法测定证实，33.3 mmol/L 高糖为最佳高糖建模浓度，10 mmol/L LiCl 为最佳预处理浓度（数据保留）。正常组用 5.5 mmol/L的 DMEM/低糖培养基，高糖组用 33.3 mmol/L 的 DMEM/高糖培养基，STS 组用含终浓度为 5 mg/L STS 的低糖（5.5 mmol/L）培养基，高糖+STS 组用含终浓度为 5 mg/L STS 的高糖（33.3 mmol/L）培养基，高糖+STS+LiCl 组用含终浓度为 5 mg/L STS 及 10 mmol/L LiCl 的高糖（33.3 mmol/L）培养基。DMEM/低糖培养的 HUVECs 种板 10 h 后按以上分组加入 5 mg/L 的 STS 和（或）10 mm 的 LiCl 预处理 2 h，再用 33.3 mmol/L 的高糖干预 48 h 后，细胞 75%~80%融合，检测各项指标。

1.2.2 免疫组化 SABC 法检测 β-catenin、p-GSK-3β（Ser^9）及免疫荧光 FITC 法检测 FKN 蛋白水平 按 1.2.1 处理各组细胞后，按说明书操作。照相后以 Image-Pro Plus 6.0 软件分析得出平均光密度值及荧光强度，进行统计分析。

1.2.3 RT-PCR 检测 GSK-3β 及 FKN m-RNA 水平变化 按 1.2.1 处理各组细胞后，采用 Trizol 试剂法提取总 RNA，严格按宝生物的说明书进行。逆转录和扩增均按宝生物说明书操作。按表 1 设计引物。并按如下条件进行 PCR 扩增：94℃变性 30 s，表 1 中的温度退火 30 s，72℃延伸 45 s，扩增 35 个循环。PCR 扩增产物经行 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后，用 Quantity one v 4.62 软件照相并分析其灰度值，以目的基因与内参的比值进行统计分析。

表 1 目的引物序列

基因	引物序列	目的大小	退火温度
β-actin	上游：5' CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA 3' 下游：5' AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC 3'	564 bp	59.4℃
GSK3B	上游：5' CCT CAA ATT AAG GCA CAT CC 3' 下游：5' CAC GGT CTC CAG TAT TAG CAT C 3'	376 bp	56℃
FKN	上游：5' CCG AAG GAG CAA TGG GTC AAG G 3' 下游：5' CAT CCT GAG CCT TTG GCG TCG 3'	304 bp	63℃

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示。用 SPSS 17.0 统计软件，检验方差齐性，各组间比较用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参酮ⅡA磺酸钠注射液促进高糖诱导的 HUVECs β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达、抑制高糖诱导的FKN蛋白表达

由表 2 可见，与正常组比较，高糖组 HUVECs β-catenin 和 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达明显降低($P<0.05$)、FKN 蛋白表达明显增加($P<0.05$)；STS 预处理可抑制高糖的这一作用，与高糖组比较，STS 加高糖组 β-catenin 和 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达增高($P<0.05$)，但其蛋白水平仍明显低于正常组($P<0.05$)，FKN 表达明显降低($P<0.05$)，但仍高于正常组；STS 与 LiCl 共同预处理后，以上作用进一步加强，与高糖组比较，共同预处理组 β-catenin 和 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达增高($P<0.05$)，FKN 蛋白表达降低($P<0.05$)；与 STS 加高糖组比较，共同预处理组 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达进一步升高($P<0.05$)，FKN 蛋白表达降低，而 β-catenin 蛋白表达稍升高，但无统计学意义；然而，共同预处理组 β-catenin 和 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达仍低于正常组($P<0.05$)，FKN 表达仍高于正常组($P<0.05$)(图 2、表 2)。

表 2 各组 β-catenin，p-GSK-3β(Ser^9)和 FKN 蛋白水平变化

组别	β-catenin	p-GSK-3β (Ser^9)	FKN
N组	0.153 ± 0.021	0.162 ± 0.014	0.038 ± 0.004
HG组	0.102 ± 0.007[a]	0.097 ± 0.008[a]	0.095 ± 0.017[a]
STS组	0.157 ± 0.017	0.165 ± 0.010	0.042 ± 0.011
HG+ STS 组	0.129 ± 0.019[b,c]	0.128 ± 0.009 [b,c]	0.075 ± 0.007 [b,c]
HG+STS+LiCl 组	0.139 ± 0.009 [b,d]	0.151 ± 0.008 [b,d]	0.062 ± 0.005 [b,d]

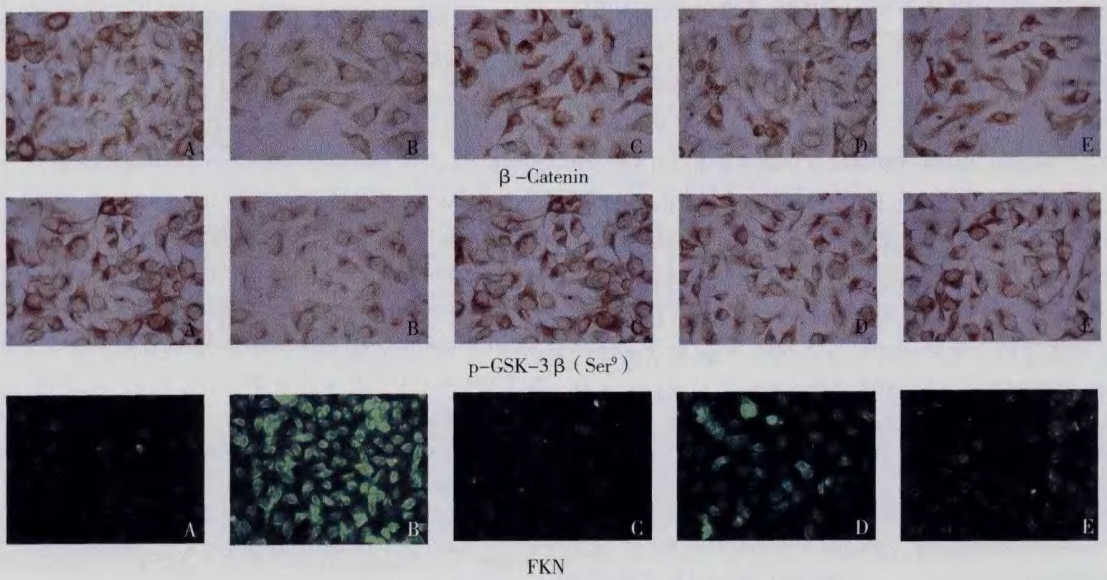
a:$P<0.05$，与正常组比较；b:$P<0.05$，与高糖组比较；c:$P<0.05$，与正常组比较；d:$P<0.05$，与 HG+ STS 组比较($n=7$)

2.2 STS 抑制高糖诱导的 GSK-3β 和 FKN mRNA 表达

与正常组比较，高糖组 HUVECs GSK-3β、FKN mRNA水平均明显升高($P<0.05$)，且可被 STS 预处理部分抑制；与高糖组比较，STS 加高糖组 GSK-3β、FKN mRNA 明显降低，但仍明显高于正常组($P<0.05$)；与高糖组比较，共同预处理组 GSK-3β、FKN mRNA 水平亦降低；与 STS 加高糖组比较，共同预处理组 GSK-3β、FKN mRNA 水平仍降低；但共同预处理组 GSK-3β、FKN mRNA 水平仍高于正常组(图 3、表 3)。

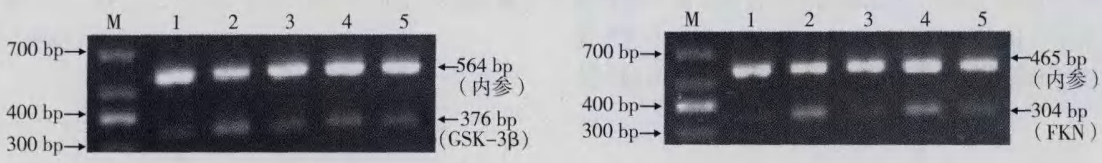
3 讨 论

Fractalkine(FKN)，又称 CX3CL1，是由 Bazan 等[1]发现的一种Ⅰ型跨膜蛋白。TNF-α、INF-γ 等多种促炎因子[9]及高糖和



A. N 组；B. HG 组；C. STS 组；D. HG+STS 组；E. HG+STS+LiCl组

图 2 各组 β-catenin、p-GSK-3β (Ser^9)和 FKN 蛋白水平变化(SABC/FITC × 200)



M. DNA 标准；1. N 组；2. HG 组；3. STS 组；4. HG+STS 组；5. HG+STS+LiCl 组

图 3 RT-PCR 检测各组 GSK-3β (A)及 FKN(B)mRNA 表达

表 3 各组 GSK-3β 和 FKN mRNA 表达

组别	GSK-3β	FKN
N组	0.047 ± 0.001	0.046 ± 0.001
HG组	0.237 ± 0.005	0.503 ± 0.007
STS组	0.059 ± 0.002	0.060 ± 0.002
HG+STS组	0.149 ± 0.007[b,c]	0.394 ± 0.009[b,c]
HG+STS+LiCl组	0.126 ± 0.004[b,d]	0.217 ± 0.009[b,d]

a:$P<0.05$，与正常组比较；b:$P<0.05$，与高糖组比较；c:$P<0.05$，与正常组比较；d:$P<0.05$，与 HG+ STS 组比较（$n=7$）

晚期糖基化终产物（Advanced glycation end products，AGEs）[3]均可诱导 HUVECs[6,7]和血管平滑肌细胞[3]高表达 FKN，进一步促进糖尿病并发症的发生发展[3]。STS 是丹参主要成分丹参酮ⅡA 的衍生物，具有抗炎、抗纤维化等作用，多用于糖尿病肾病的治疗。STS 可使 T2DM 患者 CRP 降低，并抑制内皮细胞损伤[8]。本研究显示，高糖明显诱导 HUVEC 表达 FKN，而 STS 预处理可显著降低高糖诱导的 FKN 蛋白和 mRNA 的表达，进一步揭示其抗炎作用。

本研究发现，高糖致 HUVECs p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达下调且 GSK-3β mRNA 表达上调，增加 GSK-3β 活性而下调 β-catenin 的胞浆水平；经 STS 预处理后，HUVECs β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达上调，GSK-3β mRNA 表达下调，其作用与 LiCl 的作用相似；进一步用 STS 与 LiCl 共同预处理 HUVECs 后 β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9)表达较 STS预处理升高更明显，FKN 表达较 STS 预处理进一步降低，提示 STS与 Wnt 信号通路激活明显相关。因 FKN 的表达可能与 Wnt 信号通路有关[7]，我们推测 STS 可能通过调节 Wnt 信号通路降低 FKN 表达。

大量研究表明，T2DM 的易感性与 Wnt 信号通路有关[4,10-12]。我们的前期研究也提示 Wnt 信号通路对高糖刺激的 HUVEC 具有保护作用[7,13]。复方丹参滴丸可通过调节 Wnt 信号通路等多个基因和信号途径来减少心肌梗死模型大鼠心脏缺血区的心肌损伤[14]，表明丹参类制剂可通过调节 Wnt 信号通路而发挥抗炎作用。本研究亦显示，STS 可下调高糖诱导的 HUVECs 趋化因子 FKN 表达发挥抗炎作用。虽然高糖通过多种途径诱导细胞损伤，但我们的前期研究及本研究提示，经 Wnt 信号激动剂 LiCl 或 STS 干预后，HUVECs Wnt 信号通路激活，高糖诱导的凋亡率降低[7,13]、FKN 表达降低[7]，而经 STS 干预后以上作用加强，表明 STS 可抑制高糖诱导的 FKN 表达和细胞损伤且受 Wnt 信号通路调控，但 STS 是否可通过其他途径调节高糖诱导的细胞损伤有待进一步的研究。

本研究揭示了 STS 可能通过调节经典 Wnt 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC FKN 的表达。从而为 DM 以及并发症的治疗找到了新的切入点，也为 STS 的推广提供了新的实验依据。

参 考 文 献

[1] Bazan J F, Bacon K B, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX_3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640-644.

[2] 魏 琼，董 莉，孙子林，等. 罗格列酮对糖基化终产物干预的人肾系膜细胞 fractalkine 表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志，2008，24(6):660-661.

[3] Meng L, Park J, Cai Q, et al. Diabetic conditions promote binding of monocytes to vascular smooth muscle cells and their subsequent differentiation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(3): H736-H745.

[4] Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2008, 51(10): 1771-1780.

[5] Chong Z Z, Shang Y C, Maiese K. Vascular injury during elevated glucose can be mitigated by erythropoietin and Wnt signaling[J]. Curr Neurovasc Res, 2007, 4(3): 194-204.

[6] Manduteanu I, Pirvulescu M, Gan A M, et al. Similar effects of resistin and high glucose on P-selectin and fractalkine expression and monocyte adhesion in human endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(3): 1443-1448.

[7] 曾得康，李法琦，贾朝莉，等. 高糖诱导的人脐静脉内皮细胞 fractalkine 表达及其凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报，2011，33(7):699-702

[8] 玉树凤. 丹参酮ⅡA 磺酸钠治疗对 2 型糖尿病患者炎性标志物的影响[J]. 中国现代药物应用，2009，3(10):66-67.

[9] Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2004, 11(1): 15-21.

[10] Bordonaro M. Role of Wnt signaling in the development of type 2 diabetes[J]. Vitam Horm, 2009, 80: 563-581.

[11] Struewing I, Boyechko T, Barnett C, et al. The balance of TCF7L2 variants with differential activities in Wnt-signaling is regulated by lithium in a GSK3beta-independent manner[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399(2): 245-250.

[12] Masckauchan T N, Shawber C J, Funahashi Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells[J]. Angiogenesis, 2005, 8(1): 43-51.

[13] 张 彬，李法琦，翟福利，等. 氯化锂对高糖致心肌细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 吉林大学学报·医学版，2010，36(2):323-326.

[14] 王 刚，崔佩佩，宋生有，等. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠基因表达谱的影响[J]. 药物评价研究，2010，33(2):98-102.

（责任编辑：冉明会）