

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)18-1697-03

脂联素对 TNF- α 介导的血管炎症反应的影响

刘金波, 邓华聪, 葛倩, 李丙蓉, 郑宏庭, 兰丽珍 (重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

Influence of adiponectin on vascular inflammatory reaction mediated by TNF- α

LIU Jin-Bo, DENG Hua-Cong, GE Qian, LI Bing-Rong, ZHENG Hong-Ting, LAN Li-Zhen

Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To investigate the influence of adiponectin on the inflammatory reaction in vascular endothelial cells induced by TNF- α . **METHODS:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured *in vitro* and divided into normal group, TNF- α stimulation group and adiponectin and TNF- α associated stimulation group. HUVEC were preincubated with human recombinant adiponectin for 30 min to 16 h, then exposed to human recombinant TNF- α for 6 to 12 h (adiponectin and TNF- α associated stimulation group), which was then compared with TNF- α stimulation group in the expressions of NO, iNOS, ET-1 and MCP-1. The interaction between adiponectin and HUVEC was estimated by chemical method, radioimmunoassay and ELISA. **RESULTS:** The expressions of NO, iNOS, ET-1 and MCP-1 were increased in HUVEC stimulated by TNF- α for 6 to 12 h (607.7 \pm 7.6, 42.2 \pm 2.2, 199.3 \pm 11.9, 167.7 \pm 15.9 vs 543.5 \pm 2.2, 23.8 \pm 2.0, 148.4 \pm 5.3, 128.0 \pm 8.4; $P < 0.05$). Compared with TNF- α stimulation group, the expressions of NO, iNOS, ET-1 and MCP-1 in adiponectin and TNF- α associated stimulation group were decreased (565.7 \pm 13.0, 36.5 \pm 2.7, 170.8 \pm 8.3, 142.6 \pm 5.6 vs 607.7 \pm 7.6, 42.2 \pm 2.2, 199.3 \pm 11.9, 167.7 \pm 15.9; $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Adiponectin can modulate endothelial inflammatory response through effecting the expressions of some inflammatory factors, and adiponectin has protective actions against the initiation and progression of atherosclerosis.

【Keywords】 adiponectin; tumor necrosis factor- α ; endothelium, vascular/cytology; arteriosclerosis

收稿日期 2005-12-15; 接受日期 2006-03-18

基金项目 国家自然科学基金项目(30370670, 30570744); 教育部基金项目(2-04-1-5-5012)

作者简介: 刘金波, 博士生(导师邓华聪). Tel: (023)89014243

Email: sanpiliu@163.com

【摘要】目的: 探讨脂联素对肿瘤坏死因子(TNF- α)引起的血管内皮细胞炎症反应的影响。方法: 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。随机分为对照组, TNF- α 刺激组和脂联素 + TNF- α 刺激组。HUVEC 与脂联素联合孵育一段时间后再给予 TNF- α 刺激与单纯 TNF- α 刺激做对照, 分别采用化学法、放免法及 ELISA 法检测脂联素对血管内皮细胞 NO, iNOS, ET-1 及 MCP-1 蛋白表达的影响。结果: HUVEC 经 TNF- α 刺激 6~12 h 后其 NO, iNOS, ET-1 及 MCP-1 蛋白的表达(607.7 \pm 7.6, 42.2 \pm 2.2, 199.3 \pm 11.9, 167.7 \pm 15.9)与对照组(543.5 \pm 2.2, 23.8 \pm 2.0, 148.4 \pm 5.3, 128.0 \pm 8.4)相比明显增强($P < 0.05$)。当 HUVEC 在 TNF- α 刺激之前首先与脂联素共同孵育一段时间后, 则血管内皮细胞 NO, iNOS, ET-1 及 MCP-1 蛋白的表达(565.7 \pm 13.0, 36.5 \pm 2.7, 170.8 \pm 8.3, 142.6 \pm 5.6)与单纯给予 TNF- α 刺激相比明显减弱($P < 0.05$)。结论: 脂联素可以通过抑制血管内皮细胞某些炎症因子的表达水平来调节血管内皮细胞的炎症反应, 从而发挥其抗炎、抗动脉粥样硬化的作用。

【关键词】 脂联素; 肿瘤坏死因子 α ; 内皮; 血管/细胞学; 动脉硬化

【中图分类号】R587.1

【文献标识码】A

0 引言

脂联素(adiponectin)作为一种仅由脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子, 因其具有改善胰岛素抵抗、抗炎及抗动脉粥样硬化活性而成为当前研究的热点。体外研究证实, 生理浓度范围内的脂联素通过抑制 NF- κ B 信号传导通路能够剂量依赖性的抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)介导的血管内皮细胞黏附分子的表达。因此, 设想脂联素对于血管内皮细胞分泌的其他炎症因子有可能也具有相类似的作用。我们通过观察脂联素对血管内皮细胞表达 NO, iNOS, ET-1 及 MCP-1 的影响来进一步明确其抗动脉粥样硬化机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购自中科院细胞库; 重组人脂联素购自美国 R&D 公司; 重组人肿瘤坏死因子购自北京宝赛生物技术有限公司; NO 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 内皮素放免试剂盒购于北京东亚免疫研究所; 人 MCP-1 ELISA 试剂盒购

自美国 BIOSOURCE 公司 722 光栅分光光度计,重庆川仪九厂;自动放免仪中国科大中佳公司;Bio-TEK ELX800 型酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞株培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃,50 mL/L 的 CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化传代。生长至 85% 融合时接种于 96 孔细胞培养板,接种细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL,待细胞贴壁后,改用无血清 RPMI 1640 培养液继续培养 24 h,弃去旧的培养液后用于下一步实验。

1.2.2 脂联素对内皮细胞表达 NO, iNOS, ET-1 的影响 ① 实验分组:按照随机化分组的原则,每组重复 5 孔。对照组, TNF-α 刺激组:根据预实验结果确定 TNF-α 终浓度 10 μg/L; TNF-α + 脂联素刺激组:根据预实验结果确定脂联素终浓度为 10 mg/L; 10 mg/L 脂联素作用 0.5 h 后加入 10 μg/L TNF-α。② NO 测定:上述干预因素作用 6 h 后取细胞培养上清液检测,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。③ 分型 NOS 测定:NOS 主要有结构型(cNOS)和诱导型(iNOS)两类,cNOS 依赖钙,而 iNOS 不依赖钙,据此可分型。上述干预因素作用 6 h 后取细胞培养上清液检测,具体操作严格按说明书进行。④ ET-1 测定:上述干预因素作用 12 h 后取细胞培养上清液检测,采用放免法,¹²⁵I 标记抗原。具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.2.3 脂联素对内皮细胞表达 MCP-1 的影响 ① 实验分组:按照随机化分组的原则,每组重复 4 孔。对照组, TNF-α 刺激组:同上, TNF-α + 脂联素刺激组:加入不同浓度的脂联素(12.5, 25, 50 mg/L)培养细胞 16 h,再加入 10 μg/L TNF-α 继续作用 6 h。② MCP-1 测定:取细胞培养上清液 100 μL,双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 MCP-1 蛋白表达,具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件对资料进行分析,多组均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。方差齐时,两两间比较采用 LSD 法,方差不齐时,两两比较采用 Tamhane's T2 法。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 脂联素对 TNF-α 损伤状态下的内皮细胞 NO, iNOS 及 ET-1 表达的影响 TNF-α 组 NO, 总 NOS, iNOS 及 ET-1 表达水平明显高于对照组(P < 0.01), cNOS 明显降低(P < 0.01); TNF-α + 脂联素刺激组 NO, 总 NOS, iNOS 及 ET-1 表达水平明显低于 TNF-α 组(P < 0.05),但与对照组相比仍明显增高(P < 0.01), cNOS 明显升高(P < 0.01),但未恢复到正常水平,说明脂联素可部分逆转 TNF-α 对内皮细胞的损伤作用(表 1)。

表 1 脂联素对 TNF-α 损伤下的 NO, iNOS 和 ET-1 的影响

(n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	NO (μmol/L)	Total NOS (ukat/L)	iNOS (ukat/L)	cNOS (ukat/L)	ET-1 (ng/L)
对照	543.5 ± 2.2	45.8 ± 4.0	23.8 ± 2.0	23.3 ± 1.0	148.4 ± 5.3
TNF-α 刺激	607.7 ± 7.6 ^b	63.4 ± 2.3 ^b	42.2 ± 2.2 ^b	19.3 ± 5.0 ^b	199.3 ± 11.9 ^b
TNF-α + 脂联素刺激	565.7 ± 13.0 ^{bd}	58.8 ± 2.3 ^{bc}	36.5 ± 2.7 ^{bd}	21.7 ± 8.3 ^{bd}	170.8 ± 8.3 ^{ed}

*P < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照; ^cP < 0.01, ^dP < 0.01 vs TNF-α 刺激。

2.2 脂联素对 TNF-α 损伤状态下的内皮细胞 MCP-1 表达的影响 内皮细胞经 TNF-α 作用 6 h 后其 MCP-1 的表达明显增加(128 ± 8 vs 168 ± 16, P < 0.01)若 HUVEC 首先经脂联素作用 16 h,再加入 10 μg/L TNF-α 继续作用 6 h,与对照组相比,低浓度(12.5 mg/L)的脂联素未能明显抑制 TNF-α 介导的内皮细胞 MCP-1 表达(165 ± 8 vs 168 ± 16, P > 0.05),高浓度(25 mg/L, 50 mg/L)的脂联素可明显的抑制 TNF-α 介导的内皮细胞 MCP-1 表达(143 ± 6, 142 ± 9 vs 168 ± 16, P < 0.01)。

3 讨论

脂联素具有抗动脉粥样硬化及抗炎作用,其通过直接与血小板衍生生长因子(PDGF)-BB 结合而抑制其介导的血管平滑肌细胞的增殖及迁移。Chen 等^[1]研究发现脂联素通过磷脂酰肌醇 3 激酶(PI-3K)途径刺激血管内皮细胞释放 NO,并且 AMPK 磷酸化一氧化氮合酶(eNOS)参与此过程。动物体内研究方面,脂联素基因敲除鼠用金属丝损伤动脉后,出现明显的内膜增厚和血管平滑肌增殖,将表达脂联素的腺病毒载体转染入体内而使其血浆脂联素达到正常水

平后,内膜的增厚和血管平滑肌的增殖明显改善^[2]. Okamoto 等^[3]将含全长的 apM1 cDNA 序列具有表达能力的脂联素腺病毒载体通过尾静脉注入 apoE^{-/-}鼠(鼠动脉粥样硬化模型)体内,2 wk 后检测相关指标,主动脉免疫组化显示实验组粥样斑块面积明显小于对照组,提示脂联素能够延缓动脉粥样硬化病变进展,进一步研究发现脂联素抑制 VCAM-1, SR-A, TNF- α 及 CD36 mRNA 表达水平,而上述炎症因子在动脉粥样硬化的发生发展中具有重要的作用. 临床研究方面,检测反应性充血过程中前臂血流量(forearm blood flow, FBF)是评价血管内皮功能的一种敏感且可靠的方法,对于冠心病患者 FBF 峰值能够很好的预测心血管事件的危险性,新近研究发现,FBF 峰值与肥胖的严重程度存在相关性,如 FBF 峰值与肥胖指数 BMI 呈负相关,而血浆脂联素水平与 FBF 峰值呈正相关^[4]. C 反应蛋白在心血管病变中是一个可靠的预报因子,对冠心病患者进行的一次调查中发现,不但血浆脂联素与 C 反应蛋白水平呈明显的负相关关系,而且脂肪组织中的脂联素和 CRP 也呈负相关关系^[5];颈动脉内膜厚度(intima-media thickness, IMT)与心血管疾病的患病率及心血管事件的危险度密切相关, Pilz 等^[6]对 140 名青少年肥胖者研究发现血浆脂联素水平与颈动脉 IMT 呈明显地负相关关系($P < 0.001$, $r = -0.34$),与高密度脂蛋白及血清载脂蛋白 A1 呈正相关. NO, ET-1 及 MCP-1 在动脉粥样硬化的起始阶段发挥重要的作用, TNF- α 为一重要的炎症介质,在糖尿病及其血管并发症患者中明显升高. 我们观察了在体外 TNF- α 对于血管内皮细胞的干预,结果显示,血管内皮细胞经 TNF- α 刺激后,其 NO 及 iNOS 表达增加, eNOS 表达降低,说明增加的 NO 主要为 iNOS 产生的损伤性 NO,同时 ET-1 及 MCP-1 的表达也明显增加,进一步证实了 TNF- α 对于血管内皮的损伤. 经一定浓度的脂联素作用后,血管内皮细胞 NO 分泌减少,其中 iNOS 活性明显降

低, eNOS 活性升高,且 ET-1 及 MCP-1 表达亦降低,但仍与对照组有差异,说明脂联素可部分逆转 TNF- α 对内皮的损伤. 目前大多数研究认为血管内皮细胞 eNOS 的活性主要受钙离子和 PI-3K 通路的调节, TNF- α 和脂联素是否也通过上述途径尚需进一步研究. NF- κ B 信号通路作为内皮细胞炎症反应的中心环节, TNF- α 主要通过 NF- κ B 信号通路来介导内皮细胞的炎症反应,提示脂联素也可能作用于 NF- κ B 信号通路来发挥抗动脉粥样硬化作用,这有待于进一步研究.

综上所述,脂联素具有抗炎及抗动脉粥样硬化活性,我们通过体外实验也得出同样的结论. 脂联素作为脂肪细胞分泌的在血浆中含量最为丰富的脂肪细胞因子,其抗糖尿病、抗炎、抗动脉粥样硬化活性为以后的临床应用提供了可靠的理论依据和广阔的发展空间.

【参考文献】

- [1] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells [J]. *Biol Chem*, 2003 278(45) : 45021 - 45026.
- [2] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipovascular axis [J]. *J Biol Chem*, 2002 277(40) : 37487 - 37491.
- [3] Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2002, 106(22) : 2767 - 2770.
- [4] Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003 88(7) : 3236 - 3240.
- [5] Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue [J]. *Circulation*, 2003 107(5) : 671 - 674.
- [6] Pilz S, Horejsi R, Moller R, et al. Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005 90(8) : 4792 - 4796.

编辑 袁天峰