

· 实验研究 ·

载脂蛋白 M 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中相关炎症因子表达的抑制作用

唐皖 罗光华 姚霜 王敏 潘丽莉 喻妙梅 于洋 刘瑶

213003 江苏省常州市,常州市第一人民医院眼科(唐皖、刘瑶),综合实验室(罗光华、姚霜、王敏、潘丽莉、喻妙梅、于洋)

通信作者:刘瑶,Email:jiahl2000@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.03.008

【摘要】 目的 观察高糖培养环境下人视网膜血管内皮细胞(HRECs)中载脂蛋白 M(ApoM)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和单核细胞趋化因子-1(MCP-1)表达的变化,探讨 ApoM 过表达对高糖诱导的 HRECs 中 TNF- α 和 MCP-1 表达的抑制作用。方法 采用含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)和 5.5 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 培养基培养 HRECs 后分为 6 个组。正常对照组细胞进行常规培养,高糖组细胞用含 30 mmol/L D-葡萄糖的高糖培养基进行培养,ApoM 过表达组用载有 ApoM 序列的慢病毒载体感染常规培养的细胞,空载组用无 ApoM 序列的慢病毒载体感染常规培养的细胞,空载+高糖组用高糖培养基培养空载体感染的细胞,ApoM 过表达+高糖组用高糖培养基培养 ApoM 感染的细胞。采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 ApoM、TNF- α 和 MCP-1 mRNA 相对表达量;采用 Western blot 法检测细胞中 ApoM 蛋白相对表达量。结果 实时荧光定量 PCR 法检测显示,高糖组细胞中 ApoM、TNF- α 和 MCP-1 mRNA 相对表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义($t=5.517, 3.295, 2.555$, 均 $P<0.05$)。HRECs 感染慢病毒后生长良好,ApoM 过表达组细胞中 ApoM mRNA 相对表达量为 236.400 ± 39.270 ,明显高于空载组的 1.000 ± 0.153 ,差异有统计学意义($t=5.995, P<0.01$),空载组细胞中未见 ApoM 蛋白表达条带,ApoM 过表达组蛋白表达条带较强。正常培养基和高糖培养基培养后 24 h,ApoM 过表达组中 ApoM 蛋白相对表达量分别为 1.000 ± 0.249 和 2.978 ± 0.285 ,差异有统计学意义($t=5.056, P<0.01$)。空载组、空载+高糖组、ApoM 过表达组、ApoM 过表达+高糖组细胞中 TNF- α 和 MCP-1 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义($F=5.966, P=0.026; F=14.410, P=0.002$),ApoM 过表达+高糖组细胞中 TNF- α mRNA 和 MCP-1 mRNA 相对表达量明显低于空载+高糖组,差异均有统计学意义($P=0.017, 0.004$)。结论 高糖培养早期可上调 HRECs 中 ApoM、MCP-1 和 TNF- α 的表达,过表达 ApoM 能够抑制高糖诱导的 MCP-1 和 TNF- α 表达的上调。

【关键词】 载脂蛋白 M; 葡萄糖/药物作用; 炎症反应; 视网膜; 血管内皮细胞; 人; 单核细胞趋化因子-1; 肿瘤坏死因子- α

Inhibitory effects of apolipoprotein M on inflammatory factors induced by high glucose in human retinal vascular endothelial cells Tang Huan, Luo Guanghua, Yao Shuang, Wang Min, Pan Lili, Yu Miaomei, Yu Yang, Liu Yao

Department of Ophthalmology (Tang H, Liu Y), Comprehensive laboratory (Luo GH, Yao S, Wang M, Pan LL, Yu MM, Yu Y), The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China

Corresponding author: Liu Yao, Email: jiahl2000@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expressing changes of apolipoprotein M (ApoM), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human retinal vascular endothelial cells (HRECs) under the high glucose culture condition and investigate the inhibitory effects of ApoM overexpression on the expressions of TNF- α and MCP-1. **Methods** HRECs were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 5.5 mmol/L D-glucose and assigned to 6 groups. The cells in the normal control group were cultured in above culture medium; the cells in the high glucose group were treated using the DMEM with 30 mmol/L D-glucose; ApoM was transfected into the cells using lentiviral vector in the ApoM transfected group; lentiviral vector without ApoM sequence was transfected in the empty vector group; the cells transfected by empty vector were cultured in high glucose culture medium in the empty vector+high glucose group; the cells in the ApoM transfection+high glucose group were treated by ApoM sequence transfection and high glucose incubation. The relative expression of ApoM, TNF- α and MCP-1 mRNA was detected using real-time quantitative PCR, and the relative expression of ApoM protein was evaluated using Western blot assay. **Results** Compared with the normal control group, the mRNA expression levels

of ApoM, TNF- α and MCP-1 in the high glucose group were significantly increased ($t=5.517, 3.295, 2.555$; all $P<0.05$). HRECs grew well after infected with lentivirus. The relative expression level of ApoM mRNA in the ApoM transfected group was 236.400 ± 39.270 , which was significantly higher than 1.000 ± 0.153 in the empty vector group ($t=5.995, P<0.01$). An enhanced protein band of ApoM was seen in the ApoM transfected group, and the protein band was absent in the empty vector group. The relative expression band in the ApoM transfected group was 1.000 ± 0.249 and 2.978 ± 0.285 in the cells cultured with normal culture medium or high glucose culture medium, respectively, with a significant difference between them ($t=5.056, P<0.01$). The relative expressions of TNF- α and MCP-1 in the mRNA levels were significantly different among the empty vector group, empty vector+high glucose group, ApoM transfected group and ApoM transfection+high glucose group ($F=5.966, P=0.026; F=14.410, P=0.002$). Compared with the empty vector+high glucose group, the relative expressions of TNF- α and MCP-1 mRNA were considerably reduced in the ApoM transfection+high glucose group ($P=0.017, 0.004$). **Conclusions** High glucose environment up-regulates the expression of ApoM, MCP-1 and TNF- α in HRECs. Overexpression of ApoM inhibits the up-regulation of MCP-1 and TNF- α expression induced by high glucose.

[Key words] Apolipoprotein M; Glucose/pharmacology; Inflammation; Retina; Endothelial cells, vascular; Humans; Monocyte chemotactic factor-1; Tumor necrosis factor- α

载脂蛋白 M (apolipoprotein M, ApoM) 是从乳糜微粒分离及克隆的人类载脂蛋白, 主要存在于人血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 中。目前的研究显示, ApoM 可能与心血管疾病相关, 在体内可参与肝脏的脂质代谢和糖代谢^[1]。有研究发现, 高糖可下调 SD 大鼠血清及肝脏中的 ApoM mRNA 水平^[2]。2 型糖尿病患者较正常人血浆 ApoM 水平降低^[3], 中国东部汉族人群中 ApoM 启动子区 C-724del 多态性与 2 型糖尿病易感性相关^[4]。以上这些研究提示, ApoM 可能与糖尿病及其并发症, 如糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 的发生密切相关。DR 是一种多因素疾病, 其发病机制至今尚未完全明确, 目前认为主要与炎症和免疫因素、氧自由基和氧化应激、聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶激活、多元醇通路、蛋白激酶 C 激活等因素有关^[5]。随着研究的深入, 越来越多的证据表明 DR 可能是一种慢性低度炎症性病变, 炎症反应贯穿于 DR 的整个病程中, 并与其他因素相互作用、互相影响^[6-7]。视网膜毛细血管由血管内皮细胞、基底膜及周细胞共同组成, 其中血管内皮细胞之间连接紧密, 构成血-视网膜屏障 (blood retinal barrier, BRB) 中的内屏障, 高糖引起的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 的表达上调可通过破坏视网膜内皮细胞的紧密连接、刺激内皮细胞表达黏附分子而引起血流阻滞和血栓栓塞、活化白细胞并诱导周细胞凋亡等机制, 从而破坏 BRB^[8]。已有研究认为, ApoM 是一种急性期反应蛋白, 对炎症损伤有抑制作用^[9], 但其作用机制尚未完全阐明, 尤其是对于 ApoM 在高糖引起的低度慢性炎症中的作用鲜有报道。本研究观察高糖环境下人视网膜血管内皮细胞 (human retinal vascular endothelial cells, HRECs)

中 ApoM 的表达变化, 探讨过表达 ApoM 在高糖环境下对 HRECs 中 MCP-1 和 TNF- α 表达是否具有抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HRECs 细胞株 (上海雅吉生物科技有限公司)。D-葡萄糖 (美国 Sigma 公司); ApoM 慢病毒 (上海吉凯基因化学公司); 胰蛋白酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司); 高糖及低糖 DMEM 培养基、PBS (美国 HyClone 公司); RNA 抽提试剂盒 (上海申能博彩生物科技有限公司); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); 总蛋白提取试剂盒 (上海贝博公司); Western blot 试剂盒 (上海碧云天公司); 鼠抗人 ApoM 单克隆抗体 (H00055937-M03) (中国台湾 Abnova 公司); 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (60004-1-1g)、HRP 标记羊抗鼠二抗 (SA00001-1) (美国 Proteintech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRECs 培养及分组 取 -80°C 冻存的 HRECs 细胞株, 常规方法复苏, 采用含体积分数 10% FBS 和 5.5 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 培养基在 37°C 、体积分数 5% CO_2 的恒温培养箱中培养并传代。将培养的细胞分为 6 个组, 正常对照组细胞用正常培养基 (含 D-葡萄糖 5.5 mmol/L) 培养; 高糖组细胞用高糖培养基 (含 D-葡萄糖 30 mmol/L) 培养; ApoM 过表达组用载有 ApoM 序列的慢病毒载体感染正常培养的细胞; 空载组用不含 ApoM 序列的慢病毒载体感染正常培养的细胞; 空载+高糖组将空载细胞用高糖培养基培养; ApoM 过表达+高糖组 ApoM 过表达细胞用高糖培养基培养。

1.2.2 ApoM 慢病毒感染细胞 HRECs 以 $3\times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种于 6 孔板培养 12 h, 将载有 ApoM 序列的

慢病毒及空载病毒按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 50 感染细胞加入培养基处理 12 h, 然后更换培养基继续培养。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 ApoM 和 TNF- α mRNA 相对表达量 按照 RNA 提取试剂盒说明书分别提取各组 HRECs 细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 采用双重荧光实时定量 PCR 法扩增 cDNA, 各基因引物序列见表 1, 人 ApoM、MCP-1、TNF- α 以及 GAPDH 基因均采用 25.00 μ l 的反应体系, 包括 cDNA 2.00 μ l, 双蒸水 17.01 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.50 μ l, 10 倍 PCR 反应缓冲液 2.50 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, MgCl₂ 2.50 μ l, 目的基因和 GAPDH 正义引物、反义引物、探针各 0.04 μ l, 反义引物、探针各 0.04 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 15 s (温度转换率为 4.4 $^{\circ}$ C/s), 共 40 个循环。60 $^{\circ}$ C 收集荧光数据, 荧光强度达到阈值时的循环数为 Ct 值, 记录每个基因的 Ct 值, 以 GAPDH 为内参照, 采用公式 $2^{-\Delta Ct}$ 计算各目的基因相对含量。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

基因	引物序列(5'→3')
GAPDH	F: CAGGGCTGCTTTAACTCTGCT R: CATGGGTGGAATCATATTGGAAC
GAPDH 探针	Cy5-TGGATATGTTGCCATCAATGACCCT-BHQ2
ApoM	F: CTGACAACCTGGGCGTGGAT R: TGTCCACAGGTCAAAAGTTGC
ApoM 探针	FAM-AGTTCCAGAGGTCCACTTGGGCCA-BHQ1
TNF- α	F: GGACTCTCTCTAATCAGCCCTCT R: GCTACAACATGGGCTACAGGCT
TNF- α 探针	FAM-CAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCC-BHQ1
MCP-1	F: GCTCATAGCAGCCACCTTCAT R: GCGAGCCTCTGCACTGAGAT
MCP-1 探针	FAM-CCAAGGGCTCGCTCAGCCAGAT-BHQ1

注: Apo: 载脂蛋白; TNF: 肿瘤坏死因子; MCP: 单核细胞趋化蛋白

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中 ApoM 蛋白相对表达水平 根据总蛋白提取试剂盒说明书所述步骤提取各组细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, SDS-PAGE 电泳约 2 h, 用湿法电转移法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 质量分数 3% 牛血清蛋白 (bull serum albumin, BSA) 封闭 1 h, 加入 ApoM 单克隆抗体 (抗体稀释比例为 1:1 000) 孵育过夜, 次日洗膜后加入相应二抗 (抗体稀释比例为 1:3 000) 室温孵育 2 h, 洗膜后经 ECL 发光检测, 用 Quantity One 软件检测灰度值, 计算各目的蛋白表达量, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism7.0 统计学软件进行统计分析及绘图。本研究测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 正常对照组与高糖组细胞中 ApoM、MCP-1 和 TNF- α mRNA 相对表达量, 空载组和 ApoM 过表达组细胞中 ApoM mRNA 相对表达量, ApoM 过表达组细胞在正常和高糖环境下培养后 ApoM 蛋白相对表达量的差异比较均采用独立样本 t 检验; 空载组、空载+高糖组、ApoM 过表达组和 ApoM 过表达+高糖组细胞中 TNF- α mRNA 和 MCP-1 mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖培养后细胞中 ApoM、MCP-1 和 TNF- α mRNA 相对表达量变化

HRECs 分别在正常和高糖培养基中培养后 24 h, 高糖组细胞中 ApoM、TNF- α 和 MCP-1 mRNA 的相对表达量分别为 1.866 ± 0.148 、 1.328 ± 0.085 和 1.354 ± 0.102 , 明显高于正常对照组的 1.000 ± 0.053 、 1.000 ± 0.037 和 1.000 ± 0.093 , 差异均有统计学意义 (ApoM: $t = 5.517, P = 0.000$; TNF- α : $t = 3.295, P = 0.009$; MCP-1: $t = 2.555, P = 0.033$) (图 1)。

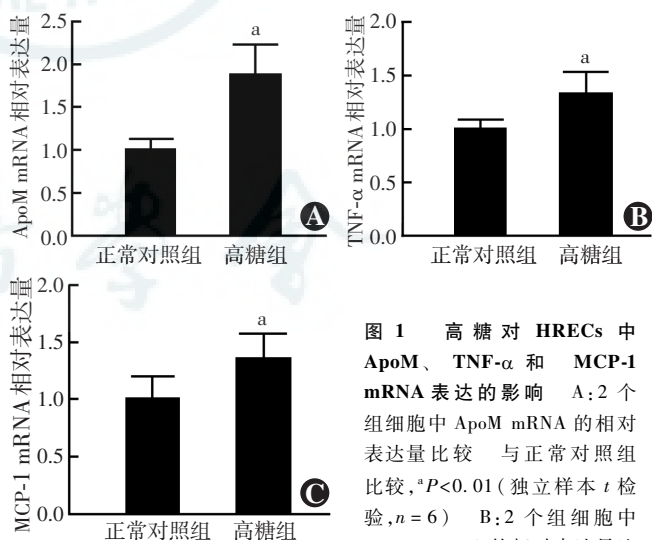


图 1 高糖对 HRECs 中 ApoM、TNF- α 和 MCP-1 mRNA 表达的影响 A: 2 个组细胞中 ApoM mRNA 的相对表达量比较 与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) B: 2 个组细胞中 TNF- α mRNA 的相对表达量比较 与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) C: 2 个组 MCP-1 mRNA 的相对表达量比较 与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) Apo: 载脂蛋白; TNF: 肿瘤坏死因子; MCP: 单核细胞趋化因子

2.2 慢病毒感染后各组细胞中 ApoM 表达变化

实时荧光定量 PCR 法检测显示, ApoM 过表达组

细胞中 ApoM mRNA 相对表达量为 236.400 ± 39.270 , 明显高于空载组的 1.000 ± 0.153 , 差异有统计学意义 ($t = 5.995, P = 0.000$) (图 2)。Western blot 检测显示, 空载组细胞中未见 ApoM 蛋白表达条带, ApoM 过表达组蛋白表达条带较强。正常培养基和高糖培养基培养 24 h 后 ApoM 蛋白相对表达量分别为 1.000 ± 0.249 和 2.978 ± 0.285 , 差异有统计学意义 ($t = 5.056, P = 0.002$) (图 3)。

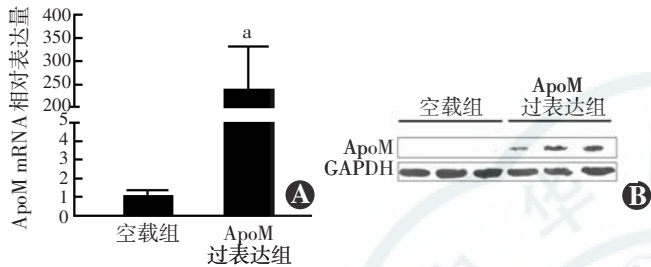


图 2 不同转染组细胞中 ApoM mRNA 及其蛋白表达量的比较
A: 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 ApoM mRNA 相对表达量 与空载组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) B: Western blot 法检测 2 个组细胞中 ApoM 蛋白表达电泳图 空载组细胞中未发现 ApoM 蛋白表达条带, ApoM 过表达组细胞中 ApoM 蛋白表达条带较强 Apo: 载脂蛋白

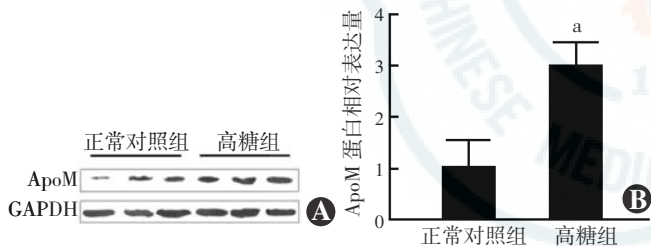


图 3 Western blot 法检测不同培养组细胞中 ApoM 蛋白表达量
A: 2 个组细胞中 ApoM 蛋白表达电泳图 高糖组细胞中 ApoM 蛋白表达条带明显强于正常对照组 B: 2 个组细胞中 ApoM 蛋白相对表达量量化比较 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) Apo: 载脂蛋白

2.3 ApoM 对正常和高糖环境下细胞中 MCP-1 mRNA 和 TNF- α mRNA 表达的影响

空载组、空载+高糖组、ApoM 过表达组、ApoM 过表达+高糖组细胞中 TNF- α mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.027 、 1.186 ± 0.017 、 1.006 ± 0.051 和 1.035 ± 0.028 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 5.966, P = 0.026$), 空载+高糖组细胞中 TNF- α mRNA 相对表达量明显高于空载组和 ApoM 过表达+高糖组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.003, 0.017$), ApoM 过表达组与空载组、ApoM 过表达+高糖组间比较 TNF- α mRNA 相对表达量的差异均无统计学意义 ($P = 0.999, 0.924$) (图 4A)。4 个组中 MCP-1 mRNA 的相对表达量分别为 1.000 ± 0.041 、 1.957 ± 0.106 、 1.085 ± 0.051 和 $1.541 \pm$

0.065 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 14.410, P = 0.002$), 空载+高糖组细胞中 MCP-1 mRNA 相对表达量高于空载组和 ApoM 过表达+高糖组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.000, 0.004$), ApoM 过表达+高糖组细胞中 MCP-1 mRNA 相对表达量高于 ApoM 过表达组, 差异有统计学意义 ($P = 0.001$), 空载组与 ApoM 过表达组间细胞中 MCP-1 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P = 0.772$) (图 4B)。

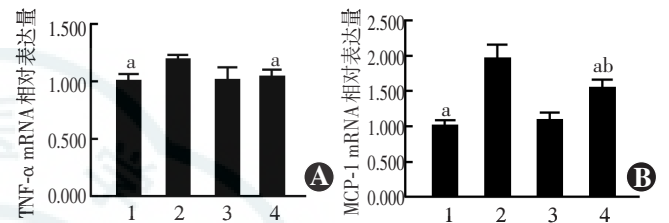


图 4 各组细胞中 TNF- α mRNA 和 MCP-1 mRNA 相对表达量比较
A: 各组 HRECs 中 TNF- α mRNA 相对表达量比较 $F = 5.966, P = 0.026$. 与空载+高糖组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 6$) B: 各组 HRECs 中 MCP-1 mRNA 相对表达量比较 $F = 14.410, P = 0.002$ 与空载+高糖组比较, $^a P < 0.01$; 与 ApoM 过表达+高糖组比较, $^b P < 0.01$; 与 ApoM 过表达组比较, $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 6$) 1: 空载组 2: 空载+高糖组 3: ApoM 过表达组 4: ApoM 过表达+高糖组 TNF: 肿瘤坏死因子; MCP: 单核细胞趋化因子

3 讨论

DR 是糖尿病常见的并发症之一, 是视力丧失的重要原因之一。高糖环境可引起组织细胞的慢性炎症反应过程, 损伤血管内皮细胞, 血-视网膜屏障遭到破坏, 进而造成视网膜水肿、出血及新生血管形成。在 DR 的发生和发展过程中, 血管内皮细胞损伤是 DR 的最早期病理变化。本研究中发现, 高糖培养 HRECs 后可诱发炎症反应, MCP-1 和 TNF- α 等炎症因子的表达量均明显升高, 进而加速视网膜血管内皮的损伤, 增加血管的通透性, 证实视网膜血管内皮细胞本身直接参与 DR 过程中的局部炎症反应, 与相关研究结果相符^[10-11]。以往曾有研究探讨高糖对 ApoM 影响, 主要通过体内实验检测 ApoM 在血清、肝脏组织中的表达水平, 而体外实验主要是通过研究肝脏 HepG2 细胞株中 ApoM 的表达情况。本研究中发现, 高糖可上调 HRECs 中 ApoM 的表达, 但与全身及肝脏 HepG2 细胞内 ApoM 表达变化趋势不一致。肝细胞作为 ApoM 表达和分泌的主要来源, 高糖可抑制肝细胞对 ApoM 的表达和分泌, 其机制尚未阐明。而视网膜血管内皮细胞并不是 ApoM 的主要来源, 因此二者在高糖环境下对 ApoM 的调节机制可能不尽相同。关于 ApoM 的早期研究主要集中于糖尿病、肥胖症、冠心病等方面, 近

