

# 可溶性鸟苷酸环化酶激活剂 Cinaciguat 对高糖环境下人脐静脉内皮细胞的保护作用<sup>A</sup>

李亚楠<sup>1\*</sup>, 孙冰<sup>2</sup>, 班博<sup>2</sup>, 张国安<sup>3</sup>, 赵奇<sup>1</sup>, 张梅<sup>2#</sup> (1. 山东大学医学院, 济南 250100; 2. 济宁医学院附属医院内分泌科, 山东济宁 272000; 3. 济宁医学院病理生理学实验室, 山东济宁 272000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0886-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.07

**摘要** 目的: 研究可溶性鸟苷酸环化酶激活剂 Cinaciguat (以下简称 CIN) 对高糖环境下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的保护作用。方法: 以 33.3 mmol/L 的葡萄糖作用于 HUVECs 细胞复制氧化应激损伤模型。将 HUVECs 细胞分为正常组、高糖组和高糖+CIN 0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  组, 采用 MTT 法检测细胞活力, 计算细胞存活率; 另将 HUVECs 细胞分为正常组、正常+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  组、高糖组、高糖+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  组, 采用硫代巴比妥酯法、黄嘌呤氧化酶法检测细胞中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测细胞中细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1) mRNA 的表达。结果: 与正常组比较, 高糖组细胞存活率降低( $P < 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖+CIN 0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞存活率升高( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性, 但高糖+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  组与高糖+CIN 10  $\mu\text{mol/L}$  组间细胞存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与正常组比较, 高糖组细胞中 MDA 含量增加、SOD 活性降低、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达增强( $P < 0.05$ ), 但正常+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  组细胞上述指标无明显变化( $P > 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖组+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  组细胞中 MDA 含量降低、SOD 活性增强、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达减弱( $P < 0.05$ )。结论: CIN 对体外高糖诱导的 HUVECs 细胞损伤具有保护作用, 其机制可能与抑制氧化应激和炎症反应有关。

**关键词** Cinaciguat; 高糖; 人脐静脉内皮细胞; 氧化应激; 炎症反应

## Protective Effects of Soluble Ornithine Cyclase Activator Cinaciguat on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under the Condition of High Glucose

LI Yanan<sup>1</sup>, SUN Bing<sup>2</sup>, BAN Bo<sup>2</sup>, ZHANG Guo'an<sup>3</sup>, ZHAO Qi<sup>1</sup>, ZHANG Mei<sup>2</sup> (1. Shandong University School of Medicine, Jinan 250100, China; 2. Dept. of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Jining Medical College, Shandong Jining 272000, China; 3. Pathological Physiology Laboratory, Jining Medical College, Shandong Jining 272000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effects of soluble ornithine cyclase activator cinaciguat (called CIN for short) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) under the condition of high glucose. METHODS: HUVECs were treated with glucose 33.3 mmol/L to induce oxidative stress injury model. HUVECs were divided into normal group, high glucose group and high glucose+CIN 0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu\text{mol/L}$  groups. The cell viability was detected by MTT assay, and the survival rate of cells was calculated. Besides, HUVECs were divided into normal group, normal+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  group, high glucose group, high glucose+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  group. MDA content and SOD activity were determined by TBA method and xanthine oxidase method; mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 were determined by RT-PCR. RESULTS: Compared with normal group, survival rate decreased in high glucose group ( $P < 0.05$ ); compared with high glucose group, that increased in high glucose+CIN 0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu\text{mol/L}$  groups, in concentration-dependent manner; there was no statistical significance in survival rate between high glucose+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  group and high glucose+CIN 10  $\mu\text{mol/L}$  group ( $P > 0.05$ ). Compared with normal group, MDA content and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 increased in high glucose group, while SOD activity decreased ( $P < 0.05$ ); above indicators had no significant change in normal+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  group ( $P > 0.05$ ). Compared with high glucose group, MDA content and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 decreased in high glucose+CIN 1  $\mu\text{mol/L}$  group, while SOD activity increased ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: CIN can protect high glucose-induced HUVECs injury *in vitro*. The mechanism may be associated with inhibition of oxidative stress and inflammatory response.

**KEYWORDS** Cinaciguat; High glucose; Human umbilical vein endothelial cells; Oxidative stress; Inflammatory response

糖尿病的心血管并发症是糖尿病患者致死致残的首要原

<sup>A</sup> 基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2012HL25); 山东省高校优秀科研创新团队

\* 硕士研究生。研究方向: 糖尿病血管并发症。电话: 0537-5471288。E-mail: 498081028@qq.com

# 通信作者: 副主任医师, 硕士。研究方向: 糖尿病。电话: 0537-2903177。E-mail: 13515374089@163.com

因。据研究表明, 其大多与氧化应激引起的内皮细胞损伤有关<sup>[1]</sup>。在氧化应激的状态下, 一氧化氮(NO)以及可溶性鸟苷酸活化酶(sGC)均被氧化, 导致其活性以及数量降低<sup>[2]</sup>。目前发现一种 sGC 激活剂 Cinaciguat (以下简称 CIN), 可以不依赖 NO, 又可激活氧化型以及血红素自由基脱失的 sGC, 使得 NO/cGMP/PKG 信号通路得以进行下去, 进而产生血管扩张、抑制细胞增殖、抗血小板聚集、抑制炎症反应等一系列生物学效

应,从而达到保护血管内皮细胞的目的<sup>[3]</sup>。过去的研究主要着重于CIN对于急性失代偿性心力衰竭(ADHF)的治疗<sup>[4]</sup>,在糖尿病心血管并发症方面研究较少。本研究通过对CIN抗氧化以及抗炎方面的研究,初步探讨其保护血管内皮细胞损伤的作用机制,针对其在血管损伤性疾病中的作用进行研究,为寻求糖尿病心血管并发症新的治疗药物提供思路和方向。

## 1 材料

### 1.1 仪器

722N型紫外分光光度仪(上海精密科学仪器有限公司);MK3型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);Line-Gene9600型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(杭州博日科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

CIN[美国Apexbio Houston公司,批号:1,纯度:98%,溶于二甲基亚砷(DMSO)];胎牛血清、DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶乙二胺四乙酸(EDTA)(美国Gibco公司);MTT试剂盒(碧云天生物技术有限公司);逆转录以及PCR试剂盒(天根生化科技有限公司);细胞间黏附分子1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物(上海生工生物工程公司合成);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.3 细胞

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株购自江苏齐氏生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 模型建立与分组

HUVECs细胞用含10%胎牛血清的2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM低糖培养基,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中常规传代培养,取对数生长期的HUVECs细胞,以4×10<sup>4</sup>/孔种于96孔板,分为正常组、高糖组和高糖+CIN 0.01、0.1、1、10 μmol/L组;以1×10<sup>5</sup>/孔种于6孔板,分为正常组、正常+CIN 1 μmol/L组、高糖组、高糖+CIN 1 μmol/L组。正常培养的HUVECs细胞种板10 h后按以上分组加入相应浓度的CIN预处理2 h,再用33.3 mmol/L的高糖干预48 h。

### 2.2 细胞存活率的检测

经处理细胞在96孔培养板中培养48 h后,每孔加入1 g/L MTT液100 μl,继续培养4 h,弃上清,加入DMSO 100 μl,振荡10 min,用酶标仪于570 nm波长处测定光密度(OD)。细胞存活率(%)=[(受试组OD值-正常组OD值)/正常组OD值]×100%<sup>[5]</sup>。试验重复6次。

### 2.3 细胞中MDA含量、SOD活性的检测

经处理细胞在6孔培养板中培养48 h后,收集培养的上清液,分别采用硫代巴比妥酸(TBA)法、黄嘌呤氧化酶法按照试剂盒说明书操作,检测各组细胞中SOD活性、MDA含量<sup>[5]</sup>。

### 2.4 细胞中ICAM-1、VCAM-1 mRNA表达的检测

经处理细胞在6孔培养板中培养48 h后,离心提取细胞总RNA,之后进行常规逆转录和PCR检测,引物序列为ICAM-1上游:5'-ACGGGTGGAAGTGGCACCCTC-3',下游:5'-CAAACAGCTCCAGCCCTTGGGGCC-3'(260 bp);VCAM-1上游:5'-GTTGAAGGATGCGGGAGT-3',下游:5'-GCAGG-TATTATTAAGGAGG-3'(159 bp);GAPDH上游:5'-GGAGC-GAGATCCCTCCAAAAT-3',下游:5'-GGCTGTTGTTCATC-TTCTCATGG-3'(200 bp)。试验结束后,以GAPDH为内参,数据分析采用2<sup>-Δ(Δc<sub>t</sub>)</sup>法,其中c<sub>t</sub>为循环阈值,Δc<sub>t</sub>=c<sub>t</sub>(目的基因)-c<sub>t</sub>(GAPDH),ΔΔc<sub>t</sub>=c<sub>t</sub>(受试组)-c<sub>t</sub>(正常组)<sup>[5]</sup>。

## 2.5 统计学方法

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用统计软件SPSS 17.0处理。多组均数比较之前先进行方差齐性检验:当方差齐时,采用SNK-q检验;当方差不齐时,采用Dunnett-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度CIN对高糖环境下HUVECs增殖的影响

与正常组比较,高糖组细胞存活率降低( $P < 0.05$ );与高糖组比较,高糖+CIN 0.01、0.1、1、10 μmol/L组细胞存活率升高( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性。但高糖+CIN 1 μmol/L组与高糖+CIN 10 μmol/L组间细胞存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),故后续选用CIN 1 μmol/L作为试验浓度。各组细胞存活率的测定结果见图1。

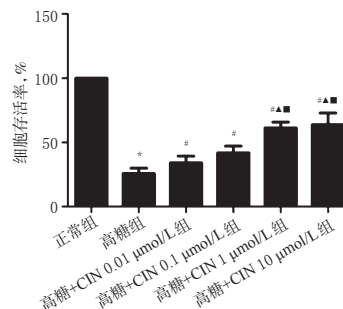


图1 各组细胞存活率的检测结果

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与高糖组比较,# $P < 0.05$ ;与高糖+CIN 0.01 μmol/L组比较,▲ $P < 0.05$ ;与高糖+CIN 0.1 μmol/L组比较,■ $P < 0.05$

### Fig 1 Results of survival rate among those groups

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$ ; vs. high glucose group, # $P < 0.05$ ; vs. high glucose+CIN 0.01 μmol/L group, ▲ $P < 0.05$ ; vs. high glucose+CIN 0.1 μmol/L group, ■ $P < 0.05$

### 3.2 CIN对高糖环境下生成MDA、SOD的影响

与正常组比较,高糖组细胞中MDA含量增加、SOD活性降低( $P < 0.05$ ),但正常+CIN 1 μmol/L组细胞上述指标无明显变化( $P > 0.05$ )。与高糖组比较,高糖组+CIN 1 μmol/L组细胞中MDA含量降低、SOD活性增强( $P < 0.05$ )。各组细胞中MDA含量和SOD活性的测定结果见图2。

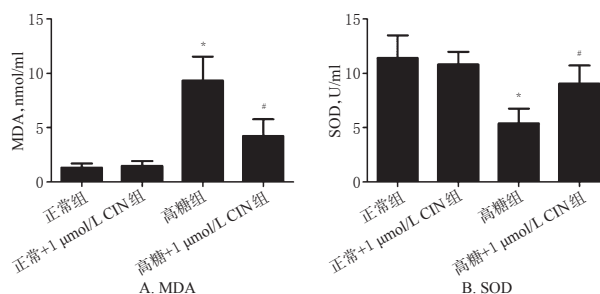


图2 各组细胞中MDA含量和SOD活性的检测结果

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与高糖组比较,# $P < 0.05$

### Fig 2 Results of the content of MDA and the activity of SOD among those groups

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$ ; vs. high glucose group, # $P < 0.05$

### 3.3 CIN对高糖环境下ICAM-1、VCAM-1 mRNA表达的影响

与正常组比较,高糖组细胞中ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达增强( $P < 0.05$ ),但正常+CIN 1 μmol/L组细胞上述指标无明显变化( $P > 0.05$ )。与高糖组比较,高糖组+CIN 1 μmol/L组细胞中ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达减弱( $P < 0.05$ )。各组

细胞中 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的测定结果见图 3。

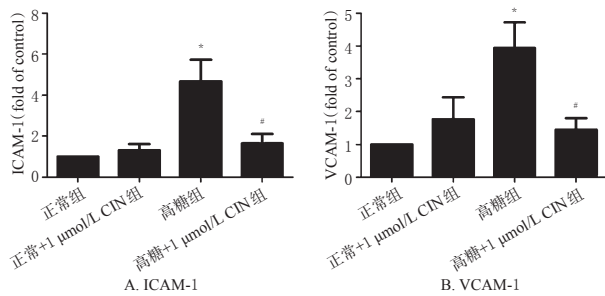


图3 各组细胞中 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的检测结果  
注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与高糖组比较,# $P<0.05$

Fig 3 Results of mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 among those groups

Note: vs. normal group, \* $P<0.05$ ; vs. high glucose group, # $P<0.05$

#### 4 讨论

本研究主要着重于 CIN 对高糖状态下 HUVECs 细胞损伤的保护作用。此次研究证明了 CIN 可通过抑制 MDA、黏附分子的生成以及增加 SOD 的活性来保护血管内皮细胞。这些结果表明, CIN 作为一个保护高糖诱导的内皮损伤的药物, 具有潜在的临床应用价值。笔者先前通过 MTT 试验证明 CIN 浓度为 0.01~10  $\mu\text{mol/L}$  之间对正常的 HUVECs 无毒性作用, 这与文献报道<sup>[6]</sup>一致, 并且发现以 33.3 mmol/L 葡萄糖孵育 HUVECs 细胞 48 h 为最适合的建模浓度和时间。本研究结果表明, 高糖组细胞存活率较正常组明显降低, 而经不同浓度 CIN 处理后, 细胞存活率均较高糖组明显升高, 这提示 CIN 可增加高糖损伤的 HUVECs 细胞的活力, 拮抗高糖引起的 HUVECs 细胞损伤。

动脉粥样硬化早期血管内皮功能紊乱的表现之一, 就是氧自由基(ROS)的生成增多、清除减少<sup>[7]</sup>。MDA 是机体产生氧自由基、引发脂质过氧化而形成的脂质过氧化物, 可间接反映细胞损伤程度。SOD 是存在于体内的极重要的抗氧化酶, 通过催化氧自由基转化为  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$  达到消除自由基的目的, 是一种重要的氧自由基清除剂<sup>[8]</sup>。本试验中高糖培养的 HUVECs 细胞上清液中 SOD 活性明显降低和 MDA 含量明显增加, 表明高糖可诱导 HUVECs 细胞脂质过氧化反应增强, 抗氧化能力下降。而经 CIN 处理后, MDA 含量明显减少、SOD 活性明显增强, 这与文献报道<sup>[9-10]</sup>一致。由此推测, CIN 可抑制 ROS 的生成, 具体情况还需要进一步的验证。

动脉粥样硬化早期血管内皮功能紊乱的另一表现就是黏附因子的诱导与表达导致内皮细胞表面的异常高黏附性, 单独或联合其他机制一起促使单核白细胞的聚集<sup>[11-12]</sup>。有研究表明, 高糖环境、炎性细胞因子、氧化应激、内毒素等多种刺激因素可激活内皮细胞, 启动细胞内 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路, 使黏附分子表达增加, 参与内皮细胞损伤的过程<sup>[13]</sup>。本研究结果证实, 高糖可增强 ICAM-1、VCAM-1 mRNA 的表达, 而 CIN 处理后, 两者表达显著降低。由此推测, CIN 可抑制 NF- $\kappa\text{B}$  的信号途径, 具体情况有待进一步验证。

CIN 作为心力衰竭的药物试验已经进行到 II 期临床试验, 研究发现其对心力衰竭患者有良好的心血管改善功能<sup>[14]</sup>。本次研究发现, CIN 可以逆转被高糖抑制的 HUVECs 细胞活性, 逆转高糖引起的 MDA 含量的增加以及 SOD 活性的降低, 并可有效拮抗高糖诱导的 VCAM-1 与 ICAM-1 mRNA 表达的增强。这提示 CIN 可逆转高糖诱导的内皮损伤, 推测作用机制

与其抑制 ROS 的生成以及抑制 NF- $\kappa\text{B}$  信号途径有关, 由此可以为糖尿病大血管并发症提供新的治疗理论依据和新的靶点。然而, 高血糖引起的血管内皮损伤机制错综复杂, 本研究只是从氧化应激以及炎症损伤方面进行了研究, 且所测的指标偏少, 故此结论有待进一步验证。

#### 参考文献

- [1] 刘英, 陈欣, 江霞. 利拉鲁肽联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病合并冠心病的临床观察[J]. 中国药房, 2015, 26(12): 1644.
- [2] Fritz BG, Hu X, Brailey JL, et al. Oxidation and loss of heme in soluble guanylyl cyclase from *Manduca sexta*[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(26): 5813.
- [3] Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, et al. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation induced degradation[J]. *Brit J Pharmacol*, 2009, 157(5): 781.
- [4] Hingorany S, Frishman WH. Soluble guanylate cyclase activation with cinaciguat, a new approach to the treatment of decompensated heart failure[J]. *Cardiol Rev*, 2011, 19(1): 23.
- [5] 管庆波. H2S 对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及其机制[D]. 济南: 山东大学医学院, 2013.
- [6] Roy B, Mo E, Vernon J, et al. Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(7): 1495.
- [7] 李震霄, 邹洪梅. 氧化应激促进动脉粥样硬化机制研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(8): 702.
- [8] 李晶, 越皓, 李娜, 等. 人参提取物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导人脐静脉内皮 ECV304 细胞损伤的保护作用[J]. 中国药房, 2015, 26(7): 944.
- [9] Loganathan S, Korkmaz-Icöz S, Radovits T, et al. Effects of soluble guanylate cyclase activation on heart transplantation in a rat model[J]. *Heart Lung Transplant*, 2015, 34(10): 1346.
- [10] Irvine JC, Ganthavee V, Love JE, et al. The soluble guanylyl cyclase activator bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e44481.
- [11] Kamari Y, Shaish A, Shemesh S, et al. Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice lacking bone marrow derived interleukin-1 $\alpha$ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(2): 197.
- [12] Haubner F, Leyh M, Ohmann E, et al. Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells[J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8(12): 1.
- [13] Fotis L, Agrogiannis G, Vlachos IS, et al. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model[J]. *In Vivo*, 2012, 26(2): 243.
- [14] Mitrovic V, Hernandez AF, Meyer M, et al. Role of guanylate cyclase modulators in decompensated heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2009, 14(4): 316.

(收稿日期: 2015-09-17 修回日期: 2015-11-19)

(编辑: 邹丽娟)