

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0336-03

不同蛋白糖基化终产物对大鼠动脉平滑肌细胞增殖的影响

杨汝春, 鲁盈

(杭州市中医院肾病实验室, 浙江省杭州市 310007)

[关键词] 细胞生物学; 糖基化终产物对平滑肌细胞增殖的影响; 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法; 糖基化终产物; 平滑肌细胞; 血管内皮生长因子; 大鼠

[摘要] 探讨大鼠 iv 型胶原及牛血清白蛋白的糖基化终产物对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响。用贴块法培养 SD 大鼠主动脉平滑肌细胞至 3~4 代, 分别用体外合成的大鼠 iv 型胶原糖基化终产物和牛血清白蛋白糖基化终产物刺激, 并以大鼠 iv 型胶原和牛血清白蛋白处理的细胞作为对照, 与此同时加入大鼠抗血管内皮生长因子抗体, 采用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法测定细胞增殖情况。结果发现, 大鼠 iv 型胶原糖基化终产物能够显著地促进主动脉平滑肌细胞增殖, 抗血管内皮生长因子抗体则能有效地抑制上述作用; 牛血清白蛋白糖基化终产物对血管平滑肌细胞的增殖有明显的抑制作用, 加入抗血管内皮生长因子抗体后未见明显影响。结果提示, 不同蛋白的糖基化终产物对血管平滑肌细胞增殖的影响不同, 对细胞因子分泌作用的影响也不相同。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Different Advanced Glycation End Products on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell

YANG Ru-Chun, and LU Ying

(Laboratory of Nephropathy of Hangzhou Traditional Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Product; Smooth Muscle Cell; Vascular Endothelial Growth Factor; Rats; Type iv Collagen; Serum Albumin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of advanced glycation end product (AGE) on the proliferative activity of vascular smooth muscle cell (VSMC) of rats. **Methods** In this study, Type iv Collagen-AGE and Bovine serum albumin-AGE was prepared in vitro. Cultured VSMC were obtained from rat abdominal aorta and used between passage 3 and 4, then stimulated with AGE. The control groups were stimulated with Type iv Collagen and bovine serum albumin. At the same time, anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody was added in cells. $^3\text{H-TdR}$ incorporation into cultured cells was used as a parameter for cell proliferation. **Results** Type iv Collagen-AGE caused the increase in $^3\text{H-TdR}$ incorporation of cells compared with Type iv Collagen, which was abrogated by anti-VEGF antibody. But bovine serum albumin-AGE reduced the proliferation of cells, and anti-VEGF antibody didn't affect cell proliferation. **Conclusion** The effects of Type iv Collagen-AGE and bovine serum albumin-AGE to the proliferation of VSMC and secretion of VEGF on VSMC are different.

血管平滑肌细胞的异常增殖是许多心血管疾病共同的病理基础^[1,2]。糖尿病时心血管疾病的发生率高, 而且发展迅速, 例如动脉粥样硬化。近年来发现, 血浆蛋白或基质蛋白如胶原等的糖基化终产物(advanced glycation end product, AGE)为动脉硬化的重要介质之一^[1], 但其作用机制尚不明确。目前认为, 基质蛋白的非酶糖基化及血浆蛋白非酶糖基化终产物的积累可上调多种细胞因子、炎症因子等的表达, 如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等, 促进细胞外基质增生与基质

蛋白的交联, 并能影响细胞的增殖。本研究通过体外合成大鼠 iv 型胶原和牛血清白蛋白的 AGE, 观察其对血管平滑肌细胞增殖的影响, 以探索糖尿病动脉粥样硬化发生的可能机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠购自浙江医学科学院; 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(tritium-labelled thymidine, $^3\text{H-TdR}$)购自中国原子能研究所; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、D-葡萄糖、羟甲基乙醛、甘氨酸、大鼠 iv 型胶原等购自 Sigma 公司; DMEM、胎牛血清、胰酶等购自 Gibco 公司; 大鼠抗 VEGF 抗体购自 SANTA-CRUZ; EDTA、磷酸氢钠等化学试剂分别为进口或国产分析纯。

[收稿日期] 2002-08-30 [修回日期] 2003-05-26

[作者简介] 杨汝春, 女, 1973 年出生, 山东省陶县人, 硕士, 助理研究员, 主要从事细胞分子生物学实验研究。鲁盈, 女, 1962 年出生, 浙江省杭州市人, 硕士, 副主任医师, 主要从事内科临床及实验研究。

1.2 大鼠 iv 型胶原及其糖基化终产物包被细胞培养板

大鼠 iv 型胶原 AGE 制备参照 Kuzuya^[1] 的方法, 用 2 g/L 大鼠 iv 型胶原 250 μ L/孔包被 24 孔培养板, 晾干, 以 500 μ L/孔加羟甲基乙醛 (50 mmol/L) 置于涂有胶原的 24 孔培养板中, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 用 PBS 洗 2 次, 加 1 mol/L 甘氨酸, 37 $^{\circ}$ C 1 h 终止反应, PBS 洗 2 次, 最后加 500 μ L/孔 PBS, 4 $^{\circ}$ C 过夜。对照组用 PBS 代替羟甲基乙醛, 其余步骤相同, 弃 PBS 后晾干备用。以上所有操作均在无菌条件下进行。AGE 含量用荧光分光光度计以激发波 380 nm, 发射波 460 nm 测定, 并计算出每克蛋白的荧光值。

1.3 牛血清白蛋白糖基化终产物的制备

用 pH 7.2 的 PBS 配制 10% 牛血清白蛋白、0.5 mol/L D-葡萄糖、EDTA、200 ku/L 双抗等混合溶液, 抽滤除菌, 37 $^{\circ}$ C 放置 60 天, 然后用 PBS 透析, 测葡萄糖浓度不高于 0.03 mmol/L, 备用。对照组不加葡萄糖, 其余条件相同。AGE 含量按上述方法测定, 并计算出每克蛋白的荧光值。

1.4 大鼠 iv 型胶原糖基化终产物对平滑肌细胞增殖的影响

取 6 周龄 SD 雄性大鼠, 应用贴块法进行主动脉平滑肌细胞原代培养, 细胞传至 3~4 代用于实验。实验分四组: iv 型胶原组、iv 型胶原 AGE 组、iv 型胶原+抗 VEGF 抗体组及 iv 型胶原 AGE+抗 VEGF 抗体组。用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基调节细胞数在 10^9 /L, 分别接种于包被有大鼠 iv 型胶原 AGE 和 iv 型胶原的 24 孔板, 同时在 iv 型胶原+抗 VEGF 抗体组和 iv 型胶原 AGE+抗 VEGF 抗体组中加入大鼠抗 VEGF 抗体, 继续培养 72 h。测定细胞增殖。

1.5 牛血清白蛋白糖基化终产物对平滑肌细胞增殖的影响

细胞培养同上, 实验分四组: 牛血清白蛋白组、牛血清白蛋白 AGE 组、牛血清白蛋白+抗 VEGF 抗体组及牛血清白蛋白 AGE+抗 VEGF 抗体组。用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基调节细胞数在 10^9 /L, 将细胞接种于空白 24 孔培养板, 12 h 细胞贴壁后, 换用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基过夜, 再加入牛血清白蛋白 AGE 及对照 BSA 进行干预, 与此同时在牛血清白蛋白+抗 VEGF 抗体组及牛血清白蛋白 AGE+抗 VEGF 抗体组中加入大鼠抗 VEGF 抗体, 继续培养 72 h。测定细胞增殖。

1.6 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法测定细胞增殖

在细胞中加含 1 mCi/L 3 H-TdR 的无血清培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h, PBS 轻洗 3 次, 250 μ L 的 1% Triton

裂解, 4 $^{\circ}$ C 2 h, 吹打均匀后取 50 μ L 细胞裂解液, 放入闪烁瓶, 加入 2 mL 闪烁液, 用液体闪烁仪测定同位素脉冲, 以每分钟计数 (count per minute, cpm) 表示。同时测定细胞裂解液的蛋白浓度, 计算出蛋白总量, 然后用每克蛋白质校正每分钟计数值。

1.7 统计学方法

用 Stat-view 统计软件统计, 全部结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间的两两比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 糖基化终产物含量

大鼠 iv 型胶原 AGE 每克蛋白荧光值为 (131.7127 \pm 7.6910) $\times 10^4$, 大鼠 iv 型胶原每克蛋白荧光值为 (94.1945 \pm 5.5159) $\times 10^4$, 大鼠 iv 型胶原 AGE 比大鼠 iv 型胶原的荧光强度增强 39.8%; 牛血清白蛋白 AGE 每克蛋白荧光值为 (125.7070 \pm 19.0324) $\times 10^4$, 牛血清白蛋白每克蛋白荧光值为 (25.2161 \pm 4.5984) $\times 10^4$, 牛血清白蛋白 AGE 的荧光强度约是牛血清白蛋白的 5 倍。

2.2 iv 型胶原糖基化终产物对大鼠平滑肌细胞增殖的影响

大鼠 iv 型胶原 AGE 显著促进细胞增殖 ($P < 0.01$), 抗 VEGF 抗体抑制该作用, 但对 iv 型胶原组细胞无显著影响 (表 1, Table 1)。

表 1. iv 型胶原糖基化终产物对大鼠平滑肌细胞增殖的影响
Table 1. The effects of Type iv Collagen AGE on the proliferation of vascular smooth muscle cell of rat ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	每克蛋白每分钟计数 ($\times 10^7$)
iv 型胶原组	4.218 \pm 0.1445
iv 型胶原 AGE 组	5.487 \pm 0.2532 ^a
iv 型胶原+抗 VEGF 抗体组	4.338 \pm 0.3073
iv 型胶原 AGE+抗 VEGF 抗体组	3.705 \pm 0.1750 ^b

a: $P < 0.01$, 与 iv 型胶原组相比; b: $P < 0.01$, 与 iv 型胶原 AGE 组相比。

2.3 牛血清白蛋白糖基化终产物对大鼠平滑肌细胞增殖的影响

牛血清白蛋白 AGE 显著抑制细胞增殖, 抗 VEGF 抗体处理后未见明显影响, 但显著抑制牛血清白蛋白组的细胞增殖 (表 2, Table 2)。

3 讨论

研究证实, 高浓度葡萄糖及其代谢产物在体内

表 2. 牛血清白蛋白糖基化终产物对大鼠平滑肌细胞增殖的影响

Table 2. The effects of bovine serum albumin-AGE on the proliferation of vascular smooth muscle ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	每克蛋白每分钟 计数 ($\times 10^7$)
牛血清白蛋白组	4.241 \pm 0.1477
牛血清白蛋白 AGE 组	2.905 \pm 0.1614 ^a
牛血清白蛋白+ 抗 VEGF 抗体组	3.537 \pm 0.2750 ^b
牛血清白蛋白 AGE+ 抗 VEGF 抗体组	3.487 \pm 0.2920

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与牛血清白蛋白组相比。

外均可与蛋白质、胶原等大分子物质的氨基发生非酶糖基化反应,形成高度活性、不可逆的 AGE,体内葡萄糖以 D-葡萄糖为主。而含有醛基或羰基的高反应性双碳化合物与大分子形成 AGE 的速率远远大于葡萄糖。AGE 分两种:一种具有荧光性,另一种无荧光性,在糖尿病组织中无荧光性 AGE 占优势,就 AGE 升高的水平而言,组织中显著高于血液中^[3]。本文结果显示,大鼠 iv 型胶原与羟基乙醛可使荧光强度增强 39.8%; D-葡萄糖与牛血清白蛋白经过 60 天的温浴反应,荧光强度约是牛血清白蛋白的 5 倍。iv 型胶原 AGE 的荧光升高水平不高可能由于无荧光性 AGE 占优势,但还需要进一步研究。

在糖尿病大鼠模型中,胶原和血红蛋白的 AGE 增加,同时伴有胶原合成增加^[4]。血浆蛋白或基质蛋白 AGE 是导致动脉硬化的关键因素^[1],在血管平滑肌和血管内皮等多种细胞的细胞膜上都有 AGE 受体(receptor of AGE, RAGE)的表达^[5],在 RAGE 的介导下,AGE 使细胞发生多种行为或病理变化,比如细胞外基质增生、上调多种细胞因子或炎症因子的表达、细胞浸润或细胞增殖等。平滑肌细胞的增殖与迁移是许多心血管疾病的病理基础,而血管疾病是糖尿病最常见的并发症。VEGF 是目前知道的最强的血管再生因子,可由血管内皮细胞自身分泌合成,而且还可与血管内皮细胞膜上的 VEGF 受体结合反作用于细胞本身,高糖和 AGE 可以上调 VEGF 的表达^[6],而且与血管病变相关。

本实验结果发现,大鼠 iv 型胶原 AGE 显著促进细胞增殖,用抗 VEGF 抗体处理后此作用降低,但对大鼠 iv 型胶原组细胞无明显影响。说明大鼠 iv 型胶原 AGE 促细胞增殖作用可能是通过诱导血管平滑肌细胞自分泌 VEGF 而起作用。与此相反,牛血清白蛋白 AGE 抑制细胞增殖。研究发现,大鼠 iv 型胶

原 AGE 显著增强血管平滑肌细胞和血管内皮细胞增殖,牛血清白蛋白 AGE 对平滑肌细胞的增殖没有作用^[2],但能够诱导胶原、纤连蛋白等细胞外基质增生或上调胰岛素样生长因子、转化生长因子等细胞因子^[7]的高表达,用抗转化生长因子抗体处理后,细胞分泌胶原等细胞外基质的行为被抑制。另外,牛血清白蛋白 AGE 能够引起细胞内甘油二酯含量明显升高,它可将外界的刺激信号通过激活蛋白激酶 C,产生生物学效应^[8]。因此,牛血清白蛋白 AGE 对血管平滑肌细胞及其他细胞的影响可能不是直接通过促进细胞增殖,而是通过诱导细胞产生细胞因子间接影响细胞行为或病理改变而起作用的,其作用机制需要进一步研究。抗 VEGF 抗体拮抗牛血清白蛋白组细胞增殖,对牛血清白蛋白 AGE 组的细胞无显著影响,可能与牛血清白蛋白能够上调血管平滑肌细胞 VEGF 及其受体的表达有关^[9]。大鼠 iv 型胶原 AGE 和牛血清白蛋白 AGE 对 VSMC 增殖的不同影响与 Kalfa 等^[10]研究结果相似,他们认为不同蛋白如胶原、层粘蛋白以及牛血清白蛋白的 AGE 对细胞的影响不同,同一种 AGE 对不同细胞的作用也不同。

[参考文献]

- [1] Kuzuya M. Angiogenesis and glycated fibrillar collagen. *Diabetologia*, 1998, **41**: 491-499
- [2] Iino K, Yoshinari M, Kaku K, Yamamoto M, Kaku K, Doi Y, et al. Effect of glycated collagen on proliferation of human smooth muscle cells in vitro. *Diabetologia*, 1996, **39** (7): 800-806
- [3] Fujii E, Iwase H, Ishii-Karakass I, Yajima Y, Hotta k. The presence of 2-ke to-3-deoxygluconic acid and oxoaldehyde dhydrogenase activity in human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, **210** (3): 852-857
- [4] 余路,邱鸿鑫,陈文缘,戎健,陈婉蓉,祝继华,等. 糖尿病大鼠糖基化终产物与主动脉细胞基质成分的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 311-314
- [5] Wang R, Kudo M, Yokoyama M, Asano G. Related articles roles of advanced glycation endproducts (AGE) and receptor for AGE on vascular smooth muscle cell growth. *J Nippon Med Sch*, 2001, **68** (6): 472-481
- [6] Tilton RG. Diabetic vascular dysfunction: links to glucose-induced reductive stress and VEGF. *Microsc Res Tech*, 2002, **57** (5): 390-407
- [7] Pugliese G, Pricci F, Romeo G, Pugliese F, Mene P, Giannini S, et al. Up-regulation of mesangial growth factor and extracellularmatrix synthesis by advanced glycation end products via a receptor-mediated mechanism. *Diabetes*, 1997, **46** (11): 1 881-887
- [8] 严金川,刘乃丰. 维生素 E 对糖基化终产物刺激大鼠主动脉平滑肌细胞信号转导物甘油二酯的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 54-56
- [9] Horita Y, Miyazaki M, Koji T, Kobayachi N, Shibuya M, Razzque MS, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, **13** (10): 2 519-528
- [10] Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, **36** (12): 2 358-367

(此文编辑 文玉珊)