

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0406-03

糖基化终产物促进培养的人脐静脉
内皮细胞选择素 E 的表达刘 宏¹, 侯凡凡², 梁 敏²

(1. 广州军区广州总医院肾内科, 广东省广州市 510010; 2. 南方医院肾内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 细胞生物学; 糖基化终产物; 流式细胞仪; 脐静脉内皮细胞; 选择素 E; 动脉粥样硬化; 人血清白蛋白

[摘要] 目的 探讨糖基化终产物在糖尿病动脉粥样硬化形成中的作用机理。方法 分离正常人脐静脉内皮细胞, 将糖基化终产物修饰的人血清白蛋白及未修饰人血清白蛋白与人脐静脉内皮细胞在体外共同培养, 用荧光单克隆抗体染色, 流式细胞仪定量检测内皮细胞表面选择素 E 的表达。结果 正常人脐静脉内皮细胞未表达选择素 E。糖基化终产物修饰的人血清白蛋白能以时间和剂量依赖的方式上调血管内皮细胞粘附分子选择素 E 的表达 ($P < 0.05$), 而人血清白蛋白对人脐静脉内皮细胞粘附分子选择素 E 的表达无影响。结论 糖基化终产物能上调人脐静脉内皮细胞粘附分子的表达, 从而促进动脉粥样硬化时单核/巨噬细胞的浸润。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Advanced Glycation End Products Modified Protein Up-regulate Expression of Adhesion Molecules E-selectin on Human Umbilical Vein Endothelial Cell

LIU Hong¹, HOU Fan-Fan², and LIANG Min²

(1. Division of Nephrology, Lihuaqiao Hospital, Guangzhou 510010; 2. Division of Nephrology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Atherosclerosis; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; E-selectin; Flow Cytometry; Human Serum Albumin

[ABSTRACT] **Aim** Progressive vascular disease is the leading cause of death in patient with diabetes mellitus. Advanced glycation end products (AGE) modified proteins are found in plasma and atherosclerosis lesion of diabetes mellitus patients. The study was conducted to elucidate the infection of AGE on expression of adhesion molecules E-selectin on human endothelial cell.

Methods Human umbilical vein endothelial cell were coincubated in vitro with native human serum albumin(HSA), HSA modified with advanced glycation end products(AGE-HSA). The expression of adhesion molecule E-selectin was determined by immunofluorescence staining and flow cytometer analysis.

Results E-selectin was not constitutively expressed on hUVEC. AGE-HSA enhanced the express of E-selectin on hUVEC in a time- and dose- dependent manner. HSA had no effect on the expression of adhesion molecule.

Conclusion AGE up-regulates the expression of adhesion molecule on human endothelial cell and this can promote the infiltration of monocytes/macrophages in the intima and the formation of atherosclerosis.

加速性血管病变是糖尿病主要合并症及死亡原因, 发生率高, 进展迅速, 主要病理表现为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)。但目前对其发病机理的认识仍不完善。已经证实糖尿病患者血浆中晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)蓄积水平明显增高^[1]。AGE 修饰的蛋白有许多生物学活性作用, 体外实验表明 AGE 修饰蛋白可增加血管内皮细胞单层的通透性^[2], AGE 修饰蛋白对单核细胞具有趋化作用^[3], 提示 AGE 在糖尿病加速性血管

病变的发生中可能起重要作用。为此, 本研究以体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)为模型, 观察 AGE 修饰蛋白对血管内皮细胞粘附分子选择素 E(E-selectin)表达的影响, 以探讨 AGE 在糖尿病 As 形成与发展中的致病机理。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞的分离与培养

用胰酶消化法获取 hUVEC。即 PBS 灌洗脐静脉, 注入 0.2% 胰蛋白酶消化液, 37℃ 水浴 5~6 min 后分离, 用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 贴壁培养, 待细胞亚汇合时传代。选第二代细胞供实验用。内皮细胞鉴定采用第(1)因子抗体免疫

[收稿日期] 2004-09-15 [修回日期] 2005-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(39970341)

[作者简介] 刘 宏, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病血管合并症, 联系电话为 020-36653563。侯凡凡, 教授, 主任医师, 研究方向为慢性肾功能不全的合并症, 联系电话为 020-61641595。梁敏, 博士, 主治医师, 研究方向为慢性肾功能不全合并症。

荧光染色。结果符合内皮细胞的特征^[4]。

1.2 体外制备糖基化终产物修饰的蛋白质

按文献[5]方法将 1.75 g/L 纯化的人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)分别置于含或不含 0.1 mol/L D-葡萄糖的磷酸盐缓冲液中, 37℃下孵育 8 周制备 AGE 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA)和未修饰的人血清白蛋白, 用磷酸盐缓冲液透析以去除葡萄糖。体外制备的 AGE-HSA 经抗 AGE 抗体酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和荧光分光光度法鉴定, AGE-HSA 中 AGE 含量为 48 U/mg 蛋白质。

1.3 实验分组

以单纯 RPMI-1640 完全培养基组作为阴性对照组。AGE-HSA 组、HSA 组均为刺激组, 刺激终浓度分别为 12.5 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L, 各孵育 2 h、4 h、6 h 和 12 h 后消化、收集。实验观察各刺激组浓度为 100 mg/L 时的时间曲线及培养 6 h 时的浓度曲线。各浓度每一时间点取 3 孔细胞, 以不同供体内皮细胞重复实验。

1.4 抗体标记内皮细胞及流式细胞仪检测

上述细胞经 FACS 缓冲液重悬, 离心, 去上清, 与鼠抗人选择素 E 单克隆抗体于 4℃孵育, 以同亚型非免疫鼠 IgG 作为阴性对照。30 min 后用 FACS 缓冲液洗涤细胞, 加 FITC 标记的绵羊抗大鼠 IgG, 4℃避光孵育 30 min, FACS 缓冲液洗涤细胞, 2% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各实验组间采用配对资料 *t* 检验, 组内数据分析采用单因素方差分析。统计软件使用 SPSS11.0。

2 结果

表 1. 晚期糖基化终产物刺激内皮细胞粘附分子选择素 E 表达的时间依赖性($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Time-dependent of adhesion molecules. E-selectin

分 组	n	2 h	4 h	6 h	12 h
对照组	3	1.054 ± 0.041	1.081 ± 0.044	1.092 ± 0.082	1.042 ± 0.053
AGE-HAGE-HAS 组	3	1.052 ± 0.017	1.588 ± 0.033 ^b	1.271 ± 0.075 ^a	1.054 ± 0.092
HSAHSA 组	3	1.017 ± 0.014	1.112 ± 0.060	1.089 ± 0.077	1.088 ± 0.039

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

单核细胞浸润聚集血管内膜是 As 早期的重要病理组织学征象。血管内皮细胞表面的粘附分子可介导循环血单核细胞与内皮细胞的接触、滚动、粘附

阴性对照组 hUVEC 经抗选择素 E 染色后其荧光检测峰与无关抗体染色的荧光检测峰大致重叠, 表明内皮细胞无选择素 E 的基础表达。内皮细胞经 AGE-HSA 刺激后表达峰明显上调(图 1, Figure 1), 而与 HSA 共同培养 2~24 h 的内皮细胞选择素 E 的表达无明显变化($P > 0.05$)(图中未给出资料)。

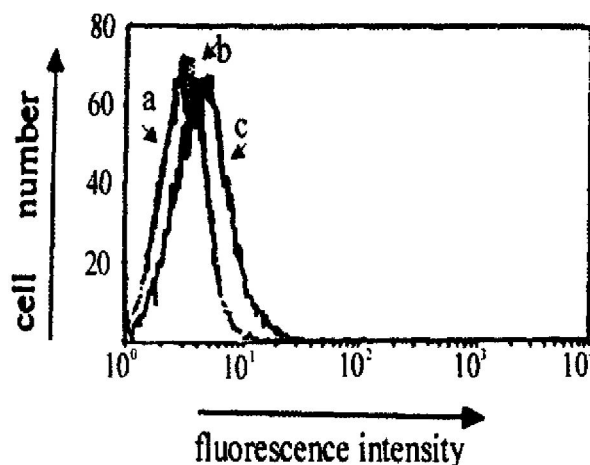


图 1. 流式细胞仪检测人血管内皮细胞选择素 E 的表达(4 h) a 为 RPMI-1640 组用同亚型非免疫鼠 IgG 抗体染色; b 为 RPMI-1640 组用抗选择素 E 抗体染色; c 为 AGE-HAS 100 mg/L 组用抗选择素 E 抗体染色。

Figure 1. The expression of E-selectin on hUVEC detected by flow cytometry

晚期糖基化终产物刺激内皮细胞粘附分子选择素 E 的表达呈时间及剂量依赖关系。选择素 E 在 AGE-HSA(100 mg/L)刺激 4 h 后达到高峰(表 1, Table 1)。以不同浓度的 AGE-HSA 与内皮细胞共同培养 4 h 发现, 随着 AGE-HSA 浓度的增加, 选择素 E 的表达亦增加。以不同供体的内皮细胞进行重复实验得到类似结果。

及跨内皮迁移。已证实内皮细胞粘附分子的上调参与了动脉粥样斑块的形成与发展。选择素 E 是分布于内皮细胞表面的选择素家族成员, 是支持白细胞粘附和穿越内皮细胞的重要粘附分子。单核细胞表面存在此粘附分子的配基。糖尿病患者体内终末

糖基化产物浓度明显高于正常人。有报道糖尿病患者主动脉粥样硬化斑块中有 AGE 修饰蛋白沉积^[6], 体外实验证实 AGE-HSA 可促进 hUVEC 表达单核细胞趋化蛋白 1^[7], AGE 修饰的牛血清白蛋白对大鼠主动脉平滑肌细胞 MCP-1 的表达也有促进作用^[8], 提示 AGE 可能介导糖尿病加速性血管病变的发生。但高 AGE 水平参与 As 发生的机制不清。我们采用体外培养的人脐静脉内皮细胞模型观察内皮细胞暴露于 AGE-HSA 时粘附分子的表达。结果发现 AGE-HSA 可使内皮细胞选择素 E 的表达上调, 并呈时间和剂量依赖关系。因此, 我们推测循环及组织中 AGE 修饰蛋白能通过上调血管内皮细胞粘附分子选择素 E 的表达介导单核细胞在内皮的浸润及动脉粥样硬化的形成。

AGE-RAGE 途径是介导 AGE 细胞学效应的关键途径之一。内皮细胞表面存在 AGE 受体 RAGE。高糖作用下外周血单核细胞对内皮细胞的粘附可被抗 RAGE 抗体阻断^[9]。AGE 介导内皮细胞表达粘附分子的细胞内途径还有待于进一步研究。

综上所述, AGE 修饰蛋白能上调血管内皮细胞粘附分子选择素 E 的表达, 介导循环单核细胞在血管内膜的粘附及迁移, 是 AGE 促进糖尿病动脉粥样硬化形成和发展的机制之一。阻断或抑制 AGE 对

内皮细胞粘附分子表达的影响包括 AGE 合成抑制剂、抗 RAGE 抗体等, 可能是防治糖尿病加速性血管病变的新途径。

[参考文献]

- [1] Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2002, **25** (6): 1 055-059
- [2] Leto G, Pricci F, Amadio L, Iacobini C, Cordone S, Diaz Horta O, et al. Increased retinal endothelial cell monolayer permeability induced by the diabetic milieu: role of advanced non-enzymatic glycation and polyol pathway activation. *Diabetes Metab Res Rev*, 2001, **17** (6): 448-458
- [3] Miyata T, Iida Y, Ueda Y. Monocyte/macrophage response to beta2-microglobulin modified with the. *Kidney Int*, 1996, **49** (2): 538-550
- [4] 杨小平, 陈国芬, 张英珊. 人脐静脉内皮细胞培养及形态观察. *中华心血管杂志*, 1988, **16** (5): 298-300
- [5] Hou FF, Chertow GM, Kay J, Wang L, Zhang X, Liu ZQ. The interaction between β 2-microglobulin and advanced glycation end products in the development of dialysis related amyloidosis. *Kidney Int*, 1997, **51** (5): 1 514-519
- [6] Sakata N, Imanaga Y, Meng J. Immunohistochemical location of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1998, **144** (1): 61-75
- [7] Guo ZJ, Hou FF, Liang M. Advanced glycation end products stimulate human endothelial cell to produce monocyte chemoattractant protein-1. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, **83** (12): 1 075-079
- [8] 贾庆哲, 刘乃丰. 糖基化终产物对大鼠主动脉平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 297-299
- [9] Esposito C, Fasoli G, Plati AR, Bellotti N, Conte MM, Cornacchia F, et al. Long-term exposure to high glucose upregulates VCAM-induced endothelial cell adhesiveness to PBMC. *Kidney Int*, 2001, **59** (5): 1 842-849

(此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

中国动脉硬化杂志编辑部 关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

由于网络的发展, E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部采用, 本刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较, E-mail 投稿具有快捷、方便、直观等特点, 且费用低廉。然而, 在接受 E-mail 投稿过程中我们发现, 稿件文本不一, 格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内, 经过传输, 文章早已面目全非, 又没有纸打印稿作对照, 不知文章里写了些什么, 编辑部收到这些稿件, 只能废除。尤其是当今病毒肆虐, 新的病毒层出不穷, 一不小心染上病毒, 整个文件就会被删除。为规范 E-mail 投稿, 确保其安全性, 本刊编辑部特作如下规定:

1、E-mail 投稿时, 必须把文章作为附件发送, 严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。

2、附件中的文章应为 Word 格式。书写时, 进入 Word 界面后, 应首先进入页面设置窗口设置页面, 参数如下: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm, 下为 2.0 mm, 左为 2.2 mm, 右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字, 每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。然后点击选择其它参数, 如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。

3、插图粘贴于正文相应位置中, 表格直接在正文中绘制; 标题与注释直接写于正文相应位置, 严禁以文本框形式插入。

4、E-mail 投稿时, 科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信这两件不要扫描放入 E-mail 内, 请另用信函形式邮寄编辑部, 以方便存档。

5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。