

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0043-04

• 实验研究 •

糖基化终产物对平滑肌细胞增殖及纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因表达的影响

李爱华, 袁晓晨, 高阳

(扬州市第一人民医院暨扬州大学第二临床医院心血管内科
东南大学心血管疾病研究所, 江苏省扬州市 225001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 糖基化终产物; 血管平滑肌细胞; 纤溶酶原激活物抑制剂 1; 基因表达; 糖尿病; 大鼠

[摘要] **目的** 探讨糖基化终产物对大鼠平滑肌细胞增殖以及纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因表达的影响。**方法** 体外分离培养大鼠平滑肌细胞, 以不同浓度(50、100、200 和 400 mg/L) 糖基化终产物作用于平滑肌细胞不同时间(0、4、8、16、24、48、72 和 96 h), MTT 法观察糖基化终产物对平滑肌细胞增殖的影响, 逆转录聚合酶链反应测定纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因的表达。**结果** 不同浓度的糖基化终产物作用 8 h 均对平滑肌细胞增殖无影响, 以后各时间点不同浓度的糖基化终产物均导致平滑肌细胞增殖, 与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。糖基化终产物作用不同时间均可使平滑肌细胞表达纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因水平升高, 且随着浓度升高而增加(分别为 0.85 ± 0.05 、 0.97 ± 0.05 、 1.08 ± 0.12 和 1.41 ± 0.05), 与对照组(0.80 ± 0.03) 比较差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 糖基化终产物诱导血管平滑肌细胞增殖并增加纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因表达是糖尿病患者易患动脉粥样硬化的可能原因。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Advanced Glycation End Product on Cellular Proliferation and Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Rat Vascular Smooth Muscle Cell

LI Ai-Hua, YUAN Xiao-Chen, and GAO Yang

(Department of Cardiology, Cardiovascular Institute of Southeast University, the First People's Hospital of Yangzhou & Second Clinical Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Product; Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferation; Plasminogen Activator Inhibitor-1; Gene Expression; Diabetes; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of advanced glycation end product (AGE) on cellular proliferation and expression of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in cultured rat aortic vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods**

Primary cultures of smooth muscle cell from rat aorta were exposed to AGE of different times and different concentrations. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was adopted for the quantification of the cell proliferation ratio and PAI-1 expression was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Cell proliferation in different AGE concentration medium was greater than that in nonglycated BSA medium ($P < 0.05$), except for 8 hours. After intervention of AGE, plasminogen activator inhibitor 1 mRNA was increased markedly ($P < 0.001$) in a time-related manner. The expression of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA was upregulated in a dose-related manner (0.85 ± 0.05 , 0.97 ± 0.05 , 1.08 ± 0.12 , 1.41 ± 0.05), in comparison with that in control group (0.80 ± 0.03 , $P < 0.05$).

Conclusion AGE induced proliferation and the expression of PAI-1 mRNA in VSMC. This may be involved in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with diabetes mellitus.

大量的循证医学资料证明, 冠心病是糖尿病患者死亡的主要原因之一, 糖尿病是冠心病的等危症, 易并发动脉粥样硬化等血管疾病。持续的高血糖可

使体内蛋白质发生非酶糖基化反应, 最终形成不可逆的糖基化终产物(advanced glycation end product, AGE), AGE 在糖尿病血管并发症的发生发展中起着重要的作用^[1]。纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 是纤溶系统的重要组成部分, 循环中 PAI-1 表达增加能加速动脉粥样硬化的进程并促使血栓形成, 目前研究发现局部血管壁 PAI-1 的作用可能更为重要^[2]。本研究通过观察 AGE 对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,

[收稿日期] 2006-07-19 [修回日期] 2006-11-20

[作者简介] 李爱华, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础和临床研究以及介入治疗, 联系电话为 13585233000。通讯作者袁晓晨, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础和临床研究, 联系电话为 13665288033, E-mail 为 yz_yc@163.com。高阳, 主治医师, 研究方向为冠心病的临床研究, 联系电话为 13511733722。

VSMC) 增殖以及 PAF-1 mRNA 表达的影响,旨在探讨 AGE 致动脉粥样硬化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Sprague-Dawley (SD) 大鼠由本校试验动物中心提供,体重 100~150 g。低糖 DMEM 培养基和 Trizol RNA 提取液(Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程公司);牛血清白蛋白、D-葡萄糖、MTT (Amereco 公司);逆转录酶、5×逆转录酶 Buffer、10×PCR Buffer、Taq DNA 聚合酶、随机引物、MgCl₂ 溶液(Promega 公司);dNTPs、RNasin (Sangon 公司);DNA ladder(申能博彩生物有限公司);其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 平滑肌细胞的培养及鉴定

应用组织块贴壁法进行 SD 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的原代培养。待平滑肌细胞基本长满瓶底,用 0.125% 的胰蛋白酶进行消化、传代,选第 6~10 代处于对数生长期的细胞进行实验。镜下可见血管平滑肌细胞呈典型的“谷峰样”生长特点,电镜下可见胞浆中肌丝,胞膜上密体、密斑存在,证实为血管平滑肌细胞。

1.3 实验分组

在进行干预前,先用不含血清的 DMEM 培养血管平滑肌细胞 24 h,然后分为对照组和实验组。实验组以同一浓度 AGE(BSA 为 200 mg/L)作用平滑肌细胞不同时间(0、4、8、16、24、48、72 和 96 h),或者以不同浓度的 AGE(50、100、200 和 400 mg/L)作用平滑肌细胞 24 h。

1.4 糖基化终产物的制备

在 pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液里加入牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),使浓度为 5.0 g/L,然后加入一定量葡萄糖使其终浓度为 50 mmol/L,对照组 BSA 中不含葡萄糖,其余条件一致,过滤除菌后 37℃ 无菌孵育 12 周。使用前以 pH 7.4 PBS 溶液透析除去未结合的葡萄糖。

1.5 MTT 法测定细胞增殖

将 6~10 代的平滑肌细胞以 4×10^6 /L 的密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔接种 100 μ L,在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养至细胞生长成次汇合状态,无血清培养 24 h 后,根据以上实验分组继续培养,每组设 3 个复孔,干预结束后每孔加入 MTT(5.0 g/L) 20 μ L 培养 4 h,弃去孔内液体,每孔加入 DMSO 150 μ L,震荡 10 min,在自动酶标检测仪上读取波长为

570 nm 的光吸收值(OD)。实验结果以 OD 值表示,OD 值与活细胞的增殖呈正比,OD 值越大,表明细胞增殖越旺盛。

1.6 总 RNA 的提取

按 TRIzol 法抽提细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度,本实验中所提取的总 RNA 纯度(A260/A280 值)均大于 1.7。

1.7 逆转录聚合酶链反应

cDNA 合成总体积为 25 μ L,总 RNA 模板 2.0 μ g,随机引物 1 μ L、5×RT Buffer 5 μ L、dNTPs 2.5 μ L、RNasin 1 μ L、逆转录酶 1 μ L、加适量 DEPC 水,42℃ 60 min 反应后,95℃ 5 min 灭活逆转录酶待用。聚合酶链反应扩增反应总体积 50 μ L,其中 cDNA 模板 2 μ L、10×PCR Buffer 5 μ L、MgCl₂ 溶液 3.5 μ L、dNTPs 1 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L、20 μ mol/L PAF-1 引物上下游各 1.5 μ L、 β -actin 引物上下游各 1.0 μ L,加适量双蒸水。循环条件:94℃ 5 min 预变性,然后以 94℃ 1 min \rightarrow 59℃ 30 s \rightarrow 72℃ 30 s,进行 35 个循环扩增,再以 72℃ 延伸 5 min。扩增产物上样于 1.7% 琼脂糖凝胶电泳,扩增片断由 DNA ladder 进行确定,Total Lab 分析软件进行光密度扫描读数,计算 PAF-1 与 β -actin 的比值,以此代表目的片段的相对表达值。PAF-1 的引物序列:上游 5'-ACC CTC AGC ATG TTC ATT GC-3',下游 5'-CTC GTT CAC CTC GAT CTT GAC-3',预期扩增片段为 297 bp。 β -actin 的引物序列:上游 5'-CAA TTC CAT CAT GAA GTG TGC-3',下游 5'-CCA CAC AGA GTA CTT GCG CTC-3',预期扩增片段为 181 bp。最后对 PCR 产物进行测序,与 Genebank 序列对照,核对无误,进一步证实了 PCR 产物的正确。

1.8 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 软件进行统计学处理,采用单因素方差分析进行显著性检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 糖基化终产物对血管平滑肌细胞增殖的影响

各浓度糖基化终产物作用 8 h 时对 VSMC 增殖几乎无影响,随时间延长各浓度的糖基化终产物均导致 VSMC 增殖,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 糖基化终产物对纤溶酶原激活物抑制剂 1 基因表达的影响

200 mg/L AGE 对平滑肌细胞分别干预不同时

间,基础状态下平滑肌细胞表达一定量的 PAI-1,随着 AGE-BSA 干预时间延长,PAI-1 的表达从 4 h 开始逐步升高,16 h 达到高峰,96 h 仍保持较高水平,与

基础水平比较差异均有显著性 ($P < 0.001$),提示在一定的时间窗内有时间相关性(图 1,表 2)。

表 1. 不同浓度糖基化终产物作用不同时间对血管平滑肌细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	0 h	8 h	16 h	24 h	48 h
对照组	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.07	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.04
实验组					
50 mg/L AGE	0.44 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.57 ± 0.07 ^b	0.64 ± 0.10 ^a	0.65 ± 0.03 ^a
100 mg/L AGE	0.44 ± 0.03	0.48 ± 0.05	0.56 ± 0.05 ^b	0.74 ± 0.09 ^a	0.76 ± 0.09 ^a
200 mg/L AGE	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.57 ± 0.06 ^b	0.85 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.06 ^a
400 mg/L AGE	0.44 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.59 ± 0.04 ^b	0.82 ± 0.09 ^a	0.86 ± 0.03

a 为 $P < 0.001$, b 为 $P < 0.05$, 与对照组(0 h)比较。

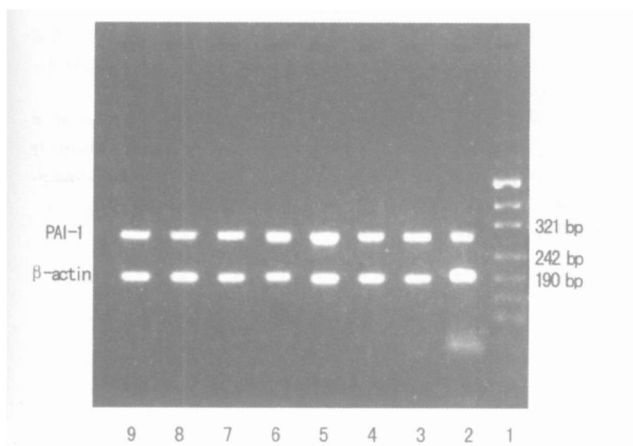


图 1. 200 mg/L AGE 干预平滑肌细胞不同时间后纤溶酶原激活物抑制剂 1 mRNA 表达的变化 1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 分别为 Marker、0 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h。

表 2. 相同浓度糖基化终产物干预平滑肌细胞不同时间后纤溶酶原激活物抑制剂 1/ β -actin mRNA 比值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间	PAI-1/ β -actin mRNA 比值
0 h	0.65 ± 0.04
4 h	0.88 ± 0.05 ^a
8 h	1.11 ± 0.09 ^a
16 h	1.18 ± 0.09 ^a
24 h	1.07 ± 0.10 ^a
48 h	0.96 ± 0.08 ^a
72 h	1.00 ± 0.05 ^a
96 h	0.81 ± 0.06 ^a

a 为 $P < 0.001$, 与 0 h 比较。

不同浓度 AGE(50、100、200 和 400 mg/L) 作用于平滑肌细胞 24 h 后,平滑肌细胞 PAI-1 mRNA 表达较对照组(0.80 ± 0.03)均有增加(分别为 0.85 ± 0.05、0.97 ± 0.05、1.08 ± 0.12 和 1.41 ± 0.05)。50

mg/L AGE 干预组与对照组比较无统计学意义 ($P > 0.05$),100、200 和 400 mg/L AGE 干预组与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

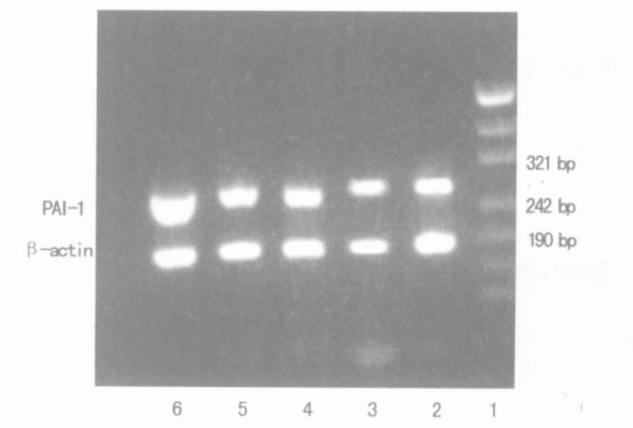


图 2. 不同浓度 AGE 干预平滑肌细胞 24 h 后纤溶酶原激活物抑制剂 1 mRNA 表达的变化 1、2、3、4、5 和 6 分别为 Marker、BSA、50 mg/L AGE、100 mg/L AGE、200 mg/L AGE 和 400 mg/L AGE。

3 讨论

糖尿病患者动脉粥样硬化发生率高,而且发展迅速,目前认为其与 AGE 关系密切。研究发现,在糖尿病患者,AGE 的形成速度明显加快,其动脉粥样硬化病灶中能检出 AGE^[3];血清 AGE 水平与动脉粥样硬化具有相关性^[4]。血管平滑肌细胞的增殖和迁移是动脉粥样硬化发生的重要环节。我们实验发现 AGE 促进大鼠 VSMC 增殖,可能是 AGE 直接激活血管平滑肌细胞引起 VSMC 表型变化,分泌许多生长因子如血管内皮生长因子和胰岛素生长因子 1 等,并通过与 VSMC 细胞膜上的 AGE 受体结合,产生氧化应激,导致氧化还原敏感的转录因子核因子 κ B 激活,引起单核细胞趋化蛋白 1 和白细胞介素 6

等炎症因子的基因表达增加,最终引起 VSMC 增殖和迁移,加速动脉粥样硬化的进程^[5,6]。

纤溶酶原激活物抑制剂 1 是纤溶系统的重要组成部分。研究发现,糖尿病患者循环中 PAF-1 水平升高与心血管事件、死亡率强相关。局部血管壁的 PAF-1 升高促进血栓形成,易引起斑块破裂,导致急性冠状动脉综合征的发生^[2]。PAF-1 除在纤溶活性改变中起主要决定因素外,目前发现,它还增加细胞迁移和细胞外基质重构,与动脉粥样硬化发生发展的关系十分密切^[7]。我们实验发现 AGE 导致 PAF-1 mRNA 在 VSMC 表达增加,与浓度相关,AGE 增加 VSMC 的 PAF-1 mRNA 水平,从 4 h 就开始升高,16 h 达到峰值,较高水平一直维持到 96 h。糖基化终产物使得 VSMC 中 PAF-1 表达增加,导致纤溶活性的下降,细胞外基质的降解减少,使细胞外基质积聚,从而参与了 VSMC 的增殖和迁移,并且促进局部血栓形成增加,可能是糖基化终产物导致动脉粥样硬化的机制之一,也是糖尿病患者易于发生动脉粥样硬化病变的可能原因。

[参考文献]

- [1] Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, et al. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end Product in human atherosclerotic lesions [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **144**: 61-75.
 - [2] Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects [J]. *Arter Thromb Vas Biol*, 2001, **21**: 1 378-385.
 - [3] Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end product and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation [J]. *Glycobiology*, 2005, **15**(7): 16R-28R.
 - [4] Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y. Serum concentrations of advanced glycation end product are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes [J]. *Acta Diabetol*, 2000, **37**(2): 87-92.
 - [5] Kiuchi K, Nejima J, Takano T, Ohta M, Hashimoto H, Baxter GF. Increased serum concentrations of advanced glycation end product: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients [J]. *Heart*, 2001, **85**(1): 87-91.
 - [6] 贾庆哲, 刘乃丰. 糖基化终产物对大鼠主动脉血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白基因表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**(4): 297-299.
 - [7] Schneider DJ, Hayes M, Wadsworth M, Taatjes H, Rincón M, Taatjes DJ, et al. Attenuation of neointimal vascular smooth muscle cellularity in atheroma by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, **52**(8): 1 091-099.
- (此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

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, 我刊也不例外。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, 尤其是当今计算机病毒肆虐, 新的病毒层出不穷, 一不小心染上病毒, 整个文件就要被删除。为规范 E-mail 投稿, 确保其安全性, 我刊特作如下规定:

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。