

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-04-0284-03

体外制备的晚期糖基化终产物对内皮祖细胞数量的影响

李倩, 沈成兴, 刘乃丰

(东南大学中大医院, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期糖基化终产物; 内皮祖细胞; 人血清白蛋白

[摘要] 目的 观察体外制备的晚期糖基化终产物对内皮祖细胞数量的影响。方法 人血清白蛋白与葡萄糖共同孵育 90 d 后, 行 Bradford 检测法蛋白定量和荧光值测定。从正常成人外周血中分离提取单个核细胞, 培养 7 d 后, 流式细胞仪鉴定细胞表型, 分别加入浓度为 2 mg/L、20 mg/L 和 200 mg/L 的晚期糖基化终产物并设置对照组, 干预不同的时间(0 h、24 h、48 h 和 72 h), 200 倍光学显微镜下随机取 10 个视野计数。结果 该方法制备的晚期糖基化终产物具有荧光性。细胞培养 7 d, CD34/CD133/KDR 单克隆抗体流式细胞仪鉴定细胞, 结果发现表达 KDR 达 78.60% \pm 2.20%、CD34 为 8.60% \pm 2.00% 和 CD133 2.80% \pm 0.60%, 提示大部分细胞为内皮祖细胞。以不同时间(0 h、24 h、48 h 和 72 h)和浓度(2 mg/L、20 mg/L 和 200 mg/L)晚期糖基化终产物干预内皮祖细胞生长, 对比 0 h 组每个视野下细胞数量(186.0 \pm 6.7), 干预 24 h 细胞数量减少(146.67 \pm 4.98), 72 h 降至最低(73.67 \pm 3.76) ($P < 0.001$), 呈现明显的时间效应($r = 0.9658$, $P < 0.01$); 终浓度为 2 mg/L 或 20 mg/L 晚期糖基化终产物干预内皮祖细胞 72 h 后, 与同时培养 72 h 的对照组无显著差异($P > 0.05$), 但随着浓度加大, 浓度效应明显($r = 0.9988$, $P < 0.01$)。结论 此方法制备的晚期糖基化终产物符合文献所述的特性, 晚期糖基化终产物能抑制内皮祖细胞生长, 具有时间效应和浓度效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Depression in Number of Endothelial Progenitor Cells by Advanced Glycation End Products Prepared in Vitro

LI Qian, SHEN Cheng-Xing, and LIU Nai-Feng

(School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China; Corresponding author: LIU Nai-Feng, Tel: 025-83272001, E-mail: li-nai-feng@seu.edu.cn)

[KEY WORDS] Advanced glycation end products Endothelial progenitor cells Human serum albumin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of advanced glycation end products (AGE) on number of endothelial progenitor cells (EPC). **Methods** AGE was prepared by incubating D-glucose and human serum albumin (HSA) for 90 days, and then identified by fluorescence and SDS-PAGE. The mononuclear cells (MNCs) were isolated from peripheral blood of healthy adults, then were plated on fibronectin coated culture 6-well plates respectively in EC basal medium 2. After cultured 7 days, attached cells were identified with antibodies recognizing human CD34, CD133 and KDR, several groups of attached cells plated in the absence or presence of AGE (2 mg/L, 20 mg/L, and 200 mg/L) for 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h respectively, the cells were quantified by viewing 10 random microscopic fields. **Results** AGE showed the absorption and fluorescent spectra. After cultured 7 days, attached cells were identified with antibodies, the results demonstrated the positive expression of antibodies were KDR (78.60% \pm 2.20%), CD34 (8.60% \pm 2.00%) and CD133 (2.80% \pm 0.60%). The decrease number of EPC per field was observed under 200 mg/L AGE at 24 h (146.67 \pm 4.98), while reached to the minimum (73.67 \pm 3.76) at 72 h. However, no statistical change in cell number was identified when cells were treated under low density AGE (2 mg/L and 20 mg/L). **Conclusion** High AGE concentration may inhibit EPC augmentation.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)可以分化为成熟的内皮细胞, 形成血管内皮^[1], 对于维持内皮细胞的持续性有重要作用。Asahara 等^[2]从成人外周血中提取的内皮样细胞并培养, 回输体内

后发现能够参与微血管的形成。之后的研究表明骨髓中的 EPC 可以动员到外周血中, 并分化为内皮样细胞黏附于血管壁上^[3], 这些内皮样细胞同时表达 CD34(+)、AC133(+) 和 VEGFR-2(+)。在体内, 还原糖与蛋白质的一些游离氨基基团反应, 形成不可逆性的晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGE)。体外制备的 AGE 被广泛应用, 通常由葡萄糖(或核糖等)和蛋白质(如白蛋白、血红蛋白等, 或氨基酸如赖氨酸等)在一定的条件下孵育而成^[4]。但是不同方法在不同的条件下制备的 AGE

[收稿日期] 2007-12-17 [修回日期] 2008-04-19

[作者简介] 李倩, 硕士研究生。研究方向为心血管病的分子生物学机制, 联系电话 13913817782。E-mail 为 angel007813@hotmail.com。刘乃丰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。东南大学附属中大医院院长、东南大学临床医学院院长, 主要从事心血管疾病发病机制研究。沈成兴, 副主任医师, 硕士研究生导师。主要从事血管内皮损伤和修复的研究。

修饰程度和生物活性会有较大差别,因此,我们用葡萄糖和人血清白蛋白在设定温度下孵育一定时间后通过检测 AGE 的基本特性明确该方法是否适用于制备 AGE,并用来干预 EPC,观察 EPC 数量变化。

1 材料与方法

1.1 材料

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)购自 Sigma 公司, D-葡萄糖购自 Amresco 公司, 内皮细胞培养基(EGM-2)购自 CAMBREX 公司, 淋巴细胞分离液(histopaque 1077)购自 Sigma 公司, CD34/CD133/KDR 单克隆抗体购自 R&D 公司。

1.2 晚期糖基化终产物的制备和蛋白定量

人血清白蛋白(HSA) 0.2 g, D 葡萄糖 3.0 g 共溶于 10 mL pH 7.4、0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,使 HSA 终浓度为 20 g/L, D 葡萄糖为 1.67 mol/L,室温下搅拌 5 h,用孔径为 0.22 μ m 的针头过滤器过滤灭菌后,封装置于 37℃恒温箱孵育 90 d 后取出,于 20 mmol/L PBS 中充分透析后备用。对照组 HSA 除不加葡萄糖外,余操作同上。用 Bradford 检测法在荧光分光光度计上测定其荧光值,测定条件为 pH 7.4、用 20 mmol/L PBS 调零,激发波长 340 nm 和发射波长 420 nm,狭缝均设为 5 nm。

1.3 内皮祖细胞的分离培养及鉴定

取健康成年志愿者外周血,生理盐水 1:1 稀释后铺于淋巴细胞分离液表面,采用密度梯度离心的方法分离出单个核细胞,调整细胞浓度,将 10^7 个细胞接种于预先用人纤维蛋白包被的培养瓶中,5% CO₂, 37℃在 EGM-2 培养液(含 5% 胎牛血清、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子)中孵育 4 d 时,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗掉未贴壁细胞,更换培养液后至第 7 d, PBS 洗掉非贴壁细胞,吹下细胞后以浓度为 10^9 个/L 接种于培养瓶中。

收集 0.25% 胰蛋白酶消化的培养瓶中细胞,分别将 10^7 个细胞与 CD34/CD133/KDR 单克隆抗体共同孵育 30 min 后, PBS 洗涤 2 次,最后用 300 μ L PBS 悬浮,通过流式细胞仪计数(每个样本测量 10 000 个细胞)。

1.4 内皮祖细胞分组及计数

细胞用不含胎牛血清的培养液培养 24 h 后,随机分组 对照组(200 mg/L AGE 干预 0 h 或 0 mg/L AGE 干预 72 h):用 EGM-2 全培养液培养。④AGE 浓度组为培养液中分别加入 AGE,终浓度为 2 mg/L、20 mg/L 和 200 mg/L,培养 72 h。④培养不同时间

组,用 200 mg/L AGE 分别培养 24 h、48 h 和 72 h。培养结束后,200 倍光学显微镜下随机选取 10 个视野,分别计数细胞数量。

1.5 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件包进行 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 荧光值测定结果

荧光值测定结果见表 1,可见制备的 HSA-AGE 符合实验要求。

表 1. 人血清白蛋白修饰的晚期糖基化终产物的荧光值(单位 nm)

种类	0.3 g/L	0.8 g/L	3.0 g/L	4.8 g/L
AGE	118.27	326.78	535.55	508.38
HSA	10.17	10.64	10.22	10.22

2.2 内皮祖细胞的鉴定

单个核细胞培养 7 d 后形成梭形的内皮样细胞(图 1),流式细胞仪分析贴壁细胞表面标志,结果发现,表达 KDR 为 78.6% \pm 2.2% 表达、CD34 为 8.6% \pm 2.0% 和 CD133 为 2.8% \pm 0.6%。证明这些内皮样细胞为 EPC。

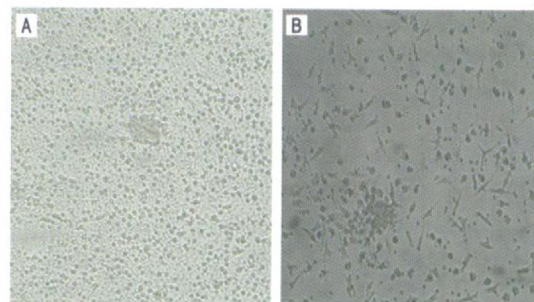


图 1. 单个核细胞和内皮样细胞镜下观察 A 为外周血分离获得的单个核细胞在倒置显微镜下呈圆形($\times 200$); B 为单个核细胞培养 7 d 后洗去非贴壁细胞,贴壁细胞在倒置显微镜下呈梭形($\times 200$)。

2.3 不同浓度的晚期糖基化终产物对内皮祖细胞数量的影响

不同浓度的 AGE 与 EPC 共同培养 72 h 后, EPC 的数量变化见表 2。可见低浓度的 AGE (2 mg/L) 对 EPC 生长几乎无影响,与对照组相比, EPC 数量未见明显差异;而随着浓度升高,内皮祖细胞的数量逐渐减少,呈现浓度效应($r = -0.9988$, $P < 0.01$)。

表 2. 培养 72 h 后晚期糖基化终产物影响内皮祖细胞数量的浓度效应

AGE 浓度	EPC 数量(/随机视野)
0 (对照)	197.33 ± 10.74
2 mg/L	193.00 ± 3.79
20 mg/L	178.67 ± 7.31
200 mg/L	73.67 ± 3.76

2.4 培养不同时间的晚期糖基化终产物对内皮祖细胞数量的影响

用 200 mg/L 的 AGE 与 EPC 共同培养不同时间后, EPC 的数量变化见表 3。可见培养 24 h AGE 就能抑制内皮祖细胞的生长 ($P < 0.05$), 随着培养时间延长, 抑制程度逐渐加深, 呈现明显的时间效应关系 ($r = -0.9658, P < 0.01$)。

表 3. 用 200 mg/L 晚期糖基化终产物培养不同时间内皮祖细胞数量的变化

培养时间	EPC 数量(/随机视野)
0 (对照)	186.00 ± 6.66
24 h	146.67 ± 4.98
48 h	135.67 ± 8.09
72 h	73.67 ± 3.76

3 讨论

晚期糖基化终产物(AGE)与糖尿病慢性并发症的发生发展相关, AGE 浓度已作为监视糖尿病, 尤其是伴有肾脏损害及血管并发症病人治疗效果的一项指标^[5], 因此本方法制备的 AGE 模拟体内形成过程, 直接将白蛋白和葡萄糖放在 PBS 中一起孵育, 没有加入其它还原剂、抗菌素等。我们制备的 AGE 具有荧光特性, 荧光值与未加入葡萄糖的 HSA 比较有明显的升高。在荧光值测定时 4.8 g/L 管低于 3.0 g/L 管, 但仍显著高于 HSA 管荧光值, 因此我们考虑是仪器的误差造成, 并不影响实验的严谨性。我们实验中电泳的结果发现为分子量极不均一的混合物, 也提示 AGE 生成。

有研究表明糖尿病患者体内 EPC 修护血管和生成血管能力减弱, 并且随着糖化血红蛋白量的变化相应改变^[6,7]。本实验通过高浓度的 AGE 干预 EPC, 通过显微镜下观察, 细胞数量减少, 同时细胞生长状态不佳, 表明 AGE 对 EPC 损害作用。大量的研究发现在不同类型的细胞中, 晚期糖基化终产物诱导氧化应激^[8], 氧化应激作为一个重要的介质^[9], 产生氧自由基, 引起脂质过氧化、蛋白质变性胶连、

DNA 断裂, 并参与一系列炎症、变性类疾病的形成过程^[10,11]。而脂质代谢失调, 血液动力学改变, 血管内皮细胞损伤, 血管平滑肌细胞迁移和增殖, 血栓形成最终促成动脉粥样斑块的形成, 造成血管不同程度的狭窄。因此, 我们推测本实验中 AGE 对 EPC 数量的抑制作用是由于 AGE 加速了 EPC 内氧化应激过程, 诱导细胞凋亡, 寻找更多的凋亡诱发因素和提高 EPC 数量是将来工作的重点。其中一种重要的方法是通过基因转染, 基因转染的 EPC 通过体外培养, 筛选后回输体内, 一段时间后能够增殖达治疗需要水平, 这种基因治疗的方法有望治疗甚至治愈缺血性疾病和血液疾病^[12]。在病理状态下, EPC 的数量和功能受限, 因此 EPC 的基因治疗必须要考虑到用于治疗的 EPC 数量不足和较低的归巢率的问题, 尤其在高龄伴有糖尿病, 高脂血症和高胆固醇血症的患者。而基因修正的 EPC 可以超量表达血管生长因子, 上调生长因子受体信号转导能力, 增强 EPC 生物活性, 增加其寿命, 通过这种方法, 可能会给 EPC 的基因治疗带来新的机遇, 因而最大限度的增加缺血部位血管新生。但是这种方法的安全性和有效性仍然需要进一步的体外或体内实验来证明。

[参考文献]

- [1] Chironi G, Walch L, Pernollet MG, et al. Decreased number of circulating CD34⁺ KDR⁺ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **191** (1): 115-120.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, **275**: 964-967.
- [3] Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells [J]. *Blood*, 1998, **92**: 362-367.
- [4] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE [J]. *Circulation*, 1997, **96** (7): 2262-2271.
- [5] 王碧蕾, 魏 芹, 刘乃丰, 等. 晚期糖基化终产物单克隆抗体的特异性和抗原表位鉴定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (5): 409-412.
- [6] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, **89**: e1-e7.
- [7] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type 2 diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures [J]. *Circulation*, 2002, **106**: 2781-2786.
- [8] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 9889-9897.
- [9] Mark A, Brismar H, Eklof A, et al. Role of oxidative stress in advanced glycation end product-induced mesangial cell activation [J]. *Kid Int*, 2002, **61** (6): 2006-2014.
- [10] 张卫茹, 侯凡凡, 刘尚喜, 等. 晚期糖基化终产物增加动脉粥样硬化病变部位的炎症反应[J]. *中华肾脏病杂志*, 2005, **21** (6): 360-363.
- [11] 张桂林, 刘尚喜, 邓鹤秋, 等. 晚期糖基化终产物激活内皮细胞核因子-κB[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 329-331.
- [12] Lin Y, Chang L, Solovev A, et al. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A [J]. *Blood*, 2002, **99**: 457-462.

(此文编辑 胡必利)