

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-09-0736-03

糖基化终末产物对体外诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响

崔丹¹, 王哲², 杨向红²

(1 辽宁医学院病理学教研室, 辽宁省锦州市 121001; 2 中国医科大学附属盛京医院病理科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 糖基化终末产物; 视网膜微血管内皮细胞; 血管形成

[摘要] 目的 应用 Matrigel 建立大鼠视网膜微血管内皮细胞血管形成的体外培养体系, 研究糖基化终末产物对诱导视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响, 从而探讨糖基化终末产物在糖尿病微血管病血管新生中的作用。方法 体外培养视网膜微血管内皮细胞, 制备糖基化白蛋白。在 Matrigel 上建立血管形成的体外培养体系, 实验分浓度效应组和时间效应组, 并进行 CD34 免疫细胞化学染色。采用光镜下计数管腔数及计算机图像分析对结果进行测定和分析。结果 经分离培养的视网膜微血管内皮细胞在 Matrigel 上培养形成管腔样结构。糖基化白蛋白(糖基化终末产物)作用于培养的视网膜微血管内皮细胞后, 可见管腔形成数目增加, 且在一定范围内呈时间和剂量依赖效应 ($P < 0.01$)。结论 糖基化终末产物可以促进 Matrigel 体外诱导视网膜微血管内皮细胞的血管形成。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effect of Advanced Glycation End Products on Inducing Rat Retinal Microvascular Endothelial Cells to Form New Blood Vessels

CUI Dan¹, WANG Zhe², and YANG Xianghong²

(1 Department of Pathology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China; 2 Department of Pathology, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Retinal Microvascular Endothelial Cells; Angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the influence of advanced glycation end products (AGE) on inducing rat retinal microvascular endothelial cells (RMEC) to form new blood vessels by setting up a stable angiogenesis culture system on Matrigel and further discuss the effect of AGE on diabetic retinopathy. **Methods** RMEC were cultured in vitro and AGE-BSA were prepared. A stable angiogenesis culture system was set up on Matrigel. The experiment was divided into different concentration and different time groups. The expression of CD34 was detected by immunocytochemical method. The results were tested by calculating the number of tubules in microscopic observation and computer image analysis. Finally the data was analyzed by statistics. **Results** RMEC were in tube formation on Matrigel. After treatment with AGE-BSA, the number of tubules increased and in certain ranges showing a dose-dependent and time-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** AGE can promote inducing RMEC on Matrigel in vitro.

血管内皮在结构和功能上具有重要性, 它作为衬在血管壁的单层扁平细胞, 能感受血流、激素和炎症等刺激的变化, 并通过合成和释放多种细胞因子参与机体的正常生理功能; 同时, 也密切参与糖尿病微血管病和肿瘤血管新生等病理过程^[1, 2]。视网膜微血管内皮细胞 (retinal microvascular endothelial cell, RMEC) 能合成和分泌多种物质, 是糖尿病微血管病中各种生理、病理因素作用的靶细胞。本实验在体外培养 RMEC, 应用 Matrigel 建立血管形成的体外培养体系, 研究 AGE 对诱导 RMEC 血管形成的影响, 探讨糖尿病微血管病 AGE 与血管新生的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞分离培养

SD 大鼠 (中国医科大学实验动物部, 体重 100 ~ 150 g), 过量乙醚处死, 完整摘除眼球, 70% 乙醇浸泡 30 s, 沿角膜缘剪开, 去除晶状体和角膜, 分离出视网膜组织, 除去可见的主枝大血管, 于 PBS 中简单漂洗、剪碎。将剪碎的视网膜组织首先经过 80 目尼龙筛网滤过, 收集网下液; 再经过 200 目筛网, 收集网上液 2 500 r/min 离心 12 min 弃上清, 得到视网膜微血管段。加入 5~10 倍体积的 0.1% Ⅳ型胶原酶 (Gibco) 消化, 37℃ 振荡水浴 30~50 min, 吹打 10 min 离心, 沉淀物用 DMEM (Sigma) 清洗两次, 将视网膜微血管段置于事先用 0.5% 明胶铺过的培养瓶内, 加入适量 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 孵

[收稿日期] 2009-07-13

[修回日期] 2009-09-10

[作者简介] 崔丹, 讲师, E-mail 为 cnzh2006@hotmail.com。通讯作者杨向红, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的发病机制。

育箱培养。每日倒置相差显微镜下行形态学观察。

1.2 视网膜微血管内皮细胞的鉴定

1.2.1 形态学观察 用倒置相差显微镜直接观察细胞的生长过程及形态特点。

1.2.2 免疫荧光法检测第Ⅱ因子相关抗原 将培养的细胞接种于铺有盖玻片的24孔板中,进行免疫荧光染色,荧光显微镜观察结果。

1.3 糖基化白蛋白的制备

参照文献[3],制备糖基化白蛋白(AGE-BSA)。对照组为BSA,不含葡萄糖及EDTA,余条件与AGE-BSA制备一致。经荧光光谱扫描(激发波长370 nm,发射波长440 nm)对AGE-BSA进行检测。

1.4 Matrigel上诱导血管形成

Matrigel冻存于-20℃,使用前置于4℃过夜,使其融化成胶状液体备用。将Matrigel以100 μL/孔滴在24孔培养板内,轻轻摇晃培养板,使其铺平。把培养板置入37℃、5% CO₂ 孵育箱内,待Matrigel聚合,30 min后即可使用。细胞消化成单细胞悬液后接种于Matrigel上,观察管腔形成情况,待形成血管样结构后施加实验因素。

1.5 实验分组

待细胞生长至80%~90%汇合时换用无血清的DMEM同步化饥饿24 h,按下述分组进行干预。分为浓度效应组和时间效应组。浓度效应组:不同浓度AGE-BSA(对照组和50、100、200 mg/L)分别作用24 h;时间效应组:相同浓度AGE-BSA(100 mg/L)作用不同时间(6、12和24 h)。对照组加含未修饰BSA的无血清培养液培养。

1.6 免疫细胞化学染色

用SP法进行CD34单克隆抗体的免疫细胞化学染色。光镜下观察,内皮细胞连接成C形即算一个管腔,每张玻片在低倍镜(×40)下选取3处管腔密集的视野,在每个放大100倍的视野计数管腔数。

1.7 统计学分析

应用SPSS11.5软件进行统计分析,实验结果采用方差分析及t检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 视网膜微血管内皮细胞的鉴定

视网膜组织经筛网过滤及胶原酶消化后,得到高纯度的微血管段。原代培养1天时即开始贴壁,2天时贴壁显著增多。倒置相差显微镜下观察发现贴壁后可见RMEC自微血管段中游出,早期细胞呈短梭形,逐渐长成单层,呈“铺路石样”排列生长(图

1A)。经第Ⅱ因子间接免疫荧光鉴定,RMEC胞质和胞膜处呈绿色荧光(图1B),即表达较高密度的Ⅱ因子相关抗原,证实其为RMEC。

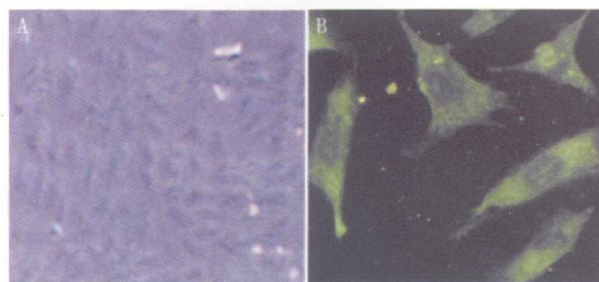


图1 倒置相差显微镜下观察原代培养的视网膜微血管内皮细胞(×100)和第Ⅱ因子间接免疫荧光鉴定结果(×400)

2.2 糖基化白蛋白对Matrigel诱导的视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响

在Matrigel上培养的细胞形成明显的网络状管腔样结构(图2A)。用CD34免疫细胞化学方法标记RMEC呈阳性反应(图2B)。不同浓度的AGE-BSA(对照组,50、100、200 mg/L)作用24 h后,培养体系的管腔数逐渐增加,呈剂量依赖效应(表1和图3)。100 mg/L AGE-BSA作用不同时间(6、12和24 h)后,培养体系的管腔数也逐渐增加,呈时间依赖效应(表2和图4)。

表1 不同浓度糖基化白蛋白对视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响($\bar{x} \pm s$)

AGE-BSA 浓度 (mg/L)	管腔数 (个)
0(对照组)	5.45 ± 0.32
50	8.07 ± 0.66 ^a
100	12.67 ± 0.53 ^{ab}
200	15.67 ± 0.53 ^{abc}

a为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与50 mg/L组比较; c为 $P < 0.05$ 与100 mg/L组比较。

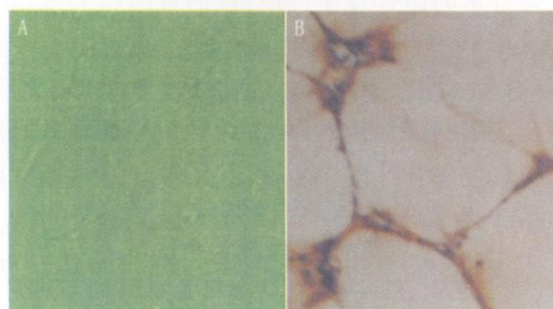


图2 视网膜微血管内皮细胞在Matrigel上培养形成明显的网络状管腔样结构(×100)和CD34免疫细胞化学方法标记视网膜微血管内皮细胞呈阳性反应

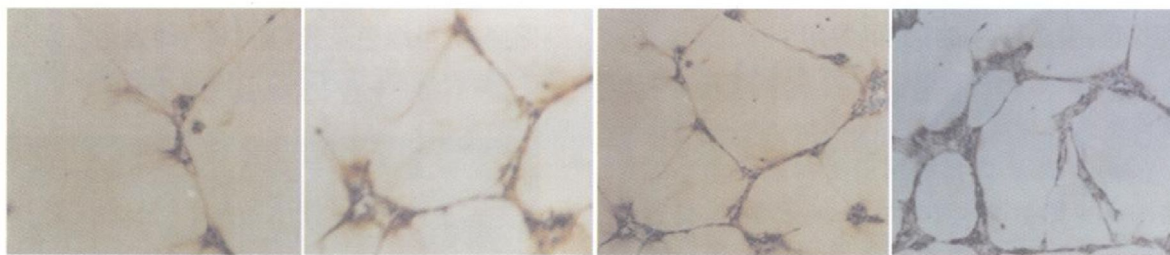


图3. 不同浓度糖基化白蛋白对视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响($\times 100$) 从左至右分别为对照组、50 mg/L组、100 mg/L组和200 mg/L组。



图4. 100 mg/L糖基化白蛋白作用不同时间对视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响($\times 100$) 从左至右分别为6 h组、12 h组和24 h组。

表2 100 mg/L糖基化白蛋白作用不同时间对视网膜微血管内皮细胞血管形成的影响($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	管腔数(个)
6	3.67 ± 0.33
12	6.33 ± 0.37^a
24	12.06 ± 0.58^{ab}

a为 $P < 0.05$ 与6 h比较; b为 $P < 0.05$ 与12 h比较。

3 讨论

血管新生是由既存的血管以出芽的方式形成新血管的生物学过程,它受到体内多种调节因素的严格控制。血管新生可见于许多病理情况,如缺血、创伤修复、糖尿病视网膜病、肿瘤、动脉粥样硬化和风湿性关节炎等^[4-5]。糖尿病增殖型视网膜病变的特征是异常的血管发生、进行性的视网膜周细胞丢失和血栓形成^[6]。脆弱的新生血管易引起反复出血,伴有视网膜纤维组织增生。新生血管形成是从血管内皮细胞芽开始,可通过内界膜伸展到视网膜表面。新生血管纤维增生,可导致玻璃体出血和牵拉性视网膜脱离。

Matrigel是一种从EHS(Engelbreth-Holm-Swarm)小鼠肉瘤中提取的可溶性基底膜样物质,这种肉瘤富含细胞外基质(extracellular matrix protein, ECM)蛋白。Matrigel为细胞的迁移和侵袭、管腔结构的形成及细胞的生物化学功能、基因表达的研究

提供了相关的环境。本实验应用AGE-BSA作用于培养的RMEC,可以观察到细胞在Matrigel上培养形成明显的网络状管腔样结构,这是内皮细胞的典型特点。与对照组相比,培养体系中的管腔数增多,且在一定范围内呈时间和剂量依赖效应,表明AGE-BSA可以促进RMEC的管腔形成——血管新生的关键步骤。

体外培养内皮细胞是研究内皮细胞与多种疾病病理生理过程相关的重要方法。深入研究AGE对微血管内皮细胞的作用必然为进一步探讨视网膜相关疾病提供实验基础。

[参考文献]

- [1] Nacci G, Tarquinio M, Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes [J]. *Intern Emerg Med*, 2009, 4(2): 107-116
- [2] Potenza MA, Gagliardi S, Nacci G. Endothelial dysfunction in diabetes from mechanisms to therapeutic targets [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(1): 94-112
- [3] 孙子林, 刘乃丰, 弓玉祥, 等. 糖基化终产物-牛血清白蛋白的制备和纯化[J]. *铁道医学*, 1999, 27(6): 361-363
- [4] 姜志盛, 唐朝枢. 血管新生及其意义[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8(2): 178-181
- [5] 杨志明. 促血管新生研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(2): 182-184
- [6] Shor-ichi Yanagishi, Takanori Matsui, Kazuo Nakamura. Ohsertan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression [J]. 2008, 75(1): 130-134

(此文编辑 许雪梅)