

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0001-06

• 实验研究 •

糖基化终产物引起晚期内皮祖细胞功能障碍

陈 琴^{1,2}, 黄铭涵³, 康丽娜¹, 徐 标¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏省南京市 210008 2. 福建医科大学附属协和医院, 福建省福州市 350003

3. 福建中医学院附属第二人民医院, 福建省福州市 350003)

[关键词] 糖基化终产物; 内皮祖细胞; 糖基化终产物受体; 糖尿病; 血管新生

[摘要] 目的 观察与糖尿病患者血清浓度类似的糖基化终产物修饰的牛血清白蛋白对体外培养脐血来源晚期内皮祖细胞功能的影响并探讨可能机制。方法 密度梯度离心法分离脐血中单个核细胞, 用差速贴壁法分离、培养晚期内皮祖细胞。流式细胞术、免疫细胞化学染色及荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白、植物凝集素被用于鉴定培养的细胞。将晚期糖基化修饰的牛血清白蛋白与晚期内皮祖细胞共同培养 24 h 后, 利用噻唑蓝法检测细胞的增殖能力, Annexin V/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡; Boyden 小室法检测血管内皮生长因子趋化的细胞迁移; ECM atix-gel 检测形成毛细血管样网状结构的能力。利用逆转录聚合酶链反应、蛋白免疫印迹法测定糖基化终产物受体 mRNA 和蛋白表达水平。结果 脐血单个核细胞在体外培养过程中先后出现两种细胞: 第 5~7 天出现集落样生长细胞, 扩增不明显, 存在 14 天左右即消失, 这类细胞被称为“早期内皮祖细胞”; 10~15 天时, 逐渐出现 20~50 个细胞组成的细胞簇, 1~3 天即可形成大于 500 个细胞簇, 细胞呈铺路石样, 可传代, 大于 95% 的细胞免疫表型为 CD45⁻/CD146⁺/CD105⁺, 表达内皮细胞特有的 vWF 因子, 可摄取乙酰化低密度脂蛋白并可与荆豆凝集素 1 结合, 这类细胞被称为“晚期内皮祖细胞”。50~400 mg/L 晚期糖基化修饰的牛血清白蛋白与晚期内皮祖细胞共培养 24 h 后, 与对照组相比, 细胞的增殖能力未见明显变化 ($P > 0.05$)。当晚期糖基化修饰的牛血清白蛋白浓度大于 100 mg/L 时, 与对照组相比, 晚期内皮祖细胞的凋亡增加 ($P < 0.05$)、血管内皮生长因子趋化的迁移以及在 ECM atix-gel 上形成新生血管的能力下降 ($P < 0.05$), 糖基化终产物受体 mRNA 和蛋白表达均增加 ($P < 0.05$)。结论 糖基化终产物通过促进凋亡、抑制迁移及体外形成新生血管的能力引起晚期内皮祖细胞功能障碍, 这些影响可能与糖基化终产物上调晚期内皮祖细胞上糖基化终产物受体表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Advanced Glycation End Products Impair Function of Endothelial Progenitor Cells

CHEN Q in^{1,2}, HUANG Ming-Han³, KANG Li-Na¹, and XU Biao¹

(1. Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Affiliated Second People's Hospital, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Product; Endothelial Progenitor Cells; Advanced Glycation End Product Receptor; Diabetes; Angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate effects of advanced glycation end products (AGE) modified albumin (AGE-albumin) on functions of late endothelial progenitor cell (EPC) derived from human umbilical cord blood and its mechanisms. **Methods** Mononuclear cells from human umbilical cord blood were cultured by using EGM-2-MV (Clonetics). Expression of CD45, CD146 and CD105 were detected by fluorescence-activated cell sorter analysis (FACS), vWF was detected by immunocytochemistry. Uptake of acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) and binding to Ulex European Agglutinin (UEA-1) were used for fluorescent labeling of EPC. Late EPC were incubated with different concentrations of AGE-albumin which were similar to the diabetic serum for 24 h. MTT was used for EPC proliferation assay. To measure the apoptosis, Annexin V⁺/PI⁺ cells were detected by FACS analysis. Boyden chamber assay was used to detect the migration by vascular endothelial growth factor (VEGF). Tube formation on ECM atix-gel was performed to assess the capacity for vasculogenesis. The mRNA and protein expression of AGE receptor (RAGE) were evaluated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. **Results** There were two types of cells appeared in the culture system. After 3 to 5 d, attached cells appeared and appeared to be clusters. Their number increased for 2 weeks. Thereafter, they did not replicate in vitro and gradually disappeared. We observed another population of cells with different morphology and growth pattern. These appeared in 10 to 15 d after plating with

[收稿日期] 2009-02-17

[修回日期] 2010-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (30170370) 和江苏省自然科学基金 (BK2004083) 资助

[作者简介] 陈琴, 博士, 研究方向为糖尿病血管并发症机制, E-mail: ndeq@163.com. 黄铭涵, 硕士, 研究方向为糖尿病血管并发症机制。通讯作者徐标, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及糖尿病血管并发症, E-mail: xubiao@medmail.com.cn.

smooth cytoplasmic outline and were firmly attached to the plate and showed cobblestone appearance, named late EPC. More than 95% of late EPC were CD45⁺/CD146⁺/CD105⁺ and vWF⁺, took-up ac-LDL and showed UEA-1 binding affinity. AGE-albumin concentration-dependently enhanced apoptosis and depressed migration and tube formation, but did not affect proliferation of late EPC. High AGE-albumin increased RAGE mRNA and protein expression. **Conclusion** These results suggest that AGE-albumin make impaired function of late EPC, through up-regulation of RAGE in these cells.

糖基化终产物 (advanced glycation end products AGE) 是还原糖与蛋白质在非酶促条件下自发生成的一大类物质。高龄以及糖尿病和慢性肾功能衰竭患者中, 心血管疾病的发生率明显高于一般人群, 而这类患者循环中 AGE 增高明显, 这使 AGE 与心血管疾病发病之间的关系越来越引起人们的注意。

当 AGE 与细胞表面 AGE 受体 (AGE receptor RAGE) 相互作用后, 可引发一系列病理生理改变, 参与糖尿病各种微血管及大血管并发症的发生和发展, 如糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、糖尿病肾病等^[1]。AGE 损害成熟内皮细胞功能并加速动脉粥样硬化的进程已被大量研究证实^[2-3]。新近研究发现, 骨髓起源的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell EPC) 功能异常是糖尿病血管并发症发生、发展的新机制。1型和 2型糖尿病患者循环中内皮祖细胞数量显著减少, 增殖、分化、迁移、粘附以及参与血管形成等能力均存在缺陷^[4-5], 即使血糖纠正后内皮祖细胞的功能异常仍不能完全纠正。关于 AGE 对内皮祖细胞功能的影响目前鲜有文献报道。因此, 本研究旨在观察与糖尿病患者血清浓度类似的 AGE 对体外培养脐血来源晚期内皮祖细胞功能的影响并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Merck 公司; 葡萄糖 (分析纯)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、明胶、人淋巴细胞分离液 (Ficoll-Paque 1077)、FITC-UEA-1、噻唑蓝、二甲亚砜、碘化丙啉 (PI)、结晶紫和琼脂糖购自 Sigma 公司; 内皮细胞基础培养液 (EBM-2)、完全培养液 (EGM-2MV Bulletkit) 购自 Clonetics 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司; 小鼠抗人 FITC-CD105、PE-CD146、PerCP-CD45 单克隆抗体、FITC/PE/PerCP-小鼠 isotype IgG、小鼠抗人 vWF 单克隆抗体、ECM atrix-gel 购自 BD 公司; DiI-乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-ac-LDL; Molecule Probe); APC-Annexin V 购自 Bender Medsystems 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; RNA PCR kit 购自 TaKaRa 公司; 小鼠抗人 RAGE 单克隆抗体 (1: 1000 稀释)、小鼠抗人 GAP-

DH 单克隆抗体 (1: 4000 稀释) 购自 Chemicon 公司; 辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG 购自 Jackson ImmunoResearch 公司; 增强的化学荧光素检测试剂盒购自 Pierce Biotechnology 公司; 流式细胞仪 (FACS-Canto) 购自 Becton Dickinson 公司; 96 孔酶标仪购自 SUNRISE 公司; Boyden 小室 (8 μ m 孔径) 购自 Costar 公司; 凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech); Image-Pro Plus 图像分析系统 (Version 5.0.1)。

1.2 标本

本研究遵守 2000 年《赫尔辛基宣言》相关伦理规定, 研究方案得到南京大学医学院伦理委员会批准, 脐血标本均来自本院产科 24~29 岁健康产妇。取足月健康分娩的新生儿脐血 20 份, 产妇排除有妊娠期高血压、妊娠期糖尿病以及其他代谢性疾病。按 1 mL 全血 50 单位普通肝素钠抗凝。

1.3 体外制备晚期糖基化修饰的牛血清白蛋白

以 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液为溶剂, 配制终浓度为 20 g/L 牛血清白蛋白和 50 mmol/L 葡萄糖溶液, 以不加葡萄糖的 20 g/L 牛血清白蛋白溶液作为阴性对照。在超净台内用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤器过滤除菌后密封, 置 37℃ 恒温培养箱内避光孵育 12 周。以 0.01 mmol/L pH 7.2~7.4 无菌磷酸盐缓冲液-生理盐水 (PBS) 充分透析 24 h (4℃), 除去未结合的葡萄糖后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤器过滤除菌, Bradford 法行蛋白定量, 分装, -70℃ 保存备用。

1.4 内皮祖细胞的分离、培养及鉴定

以 3% 明胶溶液等体积稀释血样, 室温静置 1 h, 吸取富含细胞的血浆层, 离心收集细胞并以 PBS 重悬, 利用人淋巴细胞分离液行密度梯度离心, 分离其中单个核细胞。用含 20% 胎牛血清的 EGM-2MV 重悬分离得到的单个核细胞, 细胞密度约 10^{10} /L, 接种至明胶包被的无菌培养瓶中, 放入 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱。原代细胞培养 48 h 后, 收集未贴壁细胞, 重新用含 20% 胎牛血清的 EGM-2MV 重悬, 接种于明胶包被的无菌培养瓶中, 以后每 3 天更换一次培养液, 当出现集落样生长的细胞后, 仔细观察每一个集落的生长情况。

原代细胞培养 10~15 天时, 收集培养瓶中贴壁生长的梭形细胞进行鉴定。以 PBS 复悬细胞并计

数,每个试验管 10^6 个细胞用于实验。在细胞悬液中加入 PerCP-CD45、FITC-CD105、PE-CD146 小鼠抗人单克隆抗体, 4°C 避光孵育 20 min, PBS 洗去未结合抗体,以 500 μL PBS 复悬,流式细胞术检测免疫阳性细胞。制作细胞爬片,95% 酒精固定后,原位免疫细胞化学检测 vWF 表达。胞浆中出现棕褐色颗粒者为 vWF 阳性细胞。将细胞在含 5 mg/L DiI-ac-LDL 的培养液中孵育 4 h,4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗,加入 FITC-UEA-1 (10 mg/L) 室温孵育 1 h。倒置荧光显微镜下观察,DiI-ac-LDL 阳性呈红色荧光,FITC-UEA-1 阳性呈绿色荧光,双阳性者经图像叠加后呈黄色。

1.5 噻唑蓝法检测细胞增殖能力

选取第 3 代内皮祖细胞,在 EBM (含 5% 胎牛血清) 中加入终浓度 50~400 mg/L AGE 或 400 mg/L 对照白蛋白,继续培养 20 h 加入 0.5 g/L 噻唑蓝溶液,继续培养 4 h。小心吸去培养液,加入二甲基亚砷,反复吹打至细胞内蓝色颗粒完全溶解。读取 OD 值 (测定波长 570 nm, 参考波长 620 nm)。

1.6 Annexin V /PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡

收集第 3 代内皮祖细胞,在 EBM (5% FBS) 中加入终浓度 50~400 mg/L AGE 或 400 mg/L 对照蛋白,继续培养 24 h 收集漂浮及贴壁细胞,加入 $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液制成单细胞悬液,加入 APC-Annexin V 和 0.002% PI 溶液, 4°C 避光孵育 15 min,流式细胞术检测 Annexin V⁺ /PI⁺ 细胞 (每个样本计数 10^5 个细胞)。

1.7 Boyden 小室法检测血管内皮生长因子趋化的迁移能力

收集第 3 代内皮祖细胞,以 EBM (无血清) 调整细胞浓度至 10^9 /L, 加入终浓度 50~400 mg/L AGE 或 400 mg/L 对照蛋白。在 Boyden 小室的下室中加入含有 50 μg /L 血管内皮生长因子的无血清 EBM; 上室中加入细胞悬液,继续培养 20 h。吸去上室中液体,用湿润的小棉棒轻轻擦拭 Boyden 上室底部的膜面,以 0.2% 结晶紫溶液室温下染色 10 min, PBS 清洗。随机选取 6 个高倍视野拍照,进行图像分析,计算染色细胞面积占视野总面积的百分数。

1.8 ECM a trix gel 检测内皮祖细胞在体外形成毛细血管样网状结构的能力

按照说明书要求配制 ECM a trix-gel 工作液,加入预冷的 24 孔培养板中,均匀铺满孔底后迅速转移至 37°C 细胞培养箱中,30 min 后即可凝固。收集第 3 代内皮祖细胞,以 EGM-2 MV (5% FBS) 调整细胞

浓度至 10^9 /L, 加入终浓度 50~400 mg/L AGE 或 400 mg/L 对照蛋白。将单细胞悬液加在已凝固的 ECM a trix-gel 上继续培养 16 h。随机选取 6 个高倍视野拍照,进行图像分析,计算染色细胞面积占视野总面积的百分数。

1.9 糖基化终产物受体 mRNA 和蛋白表达水平

利用逆转录聚合酶链反应检测 RAGE mRNA 表达水平。RNA 抽提法及逆转录步骤根据 TaKaRa 公司 RNA PCR kit 使用手册进行。RAGE 引物序列上游 5'-CTG GTG TTC CCA ATA AGG-3', 下游 5'-AGG TCA GGG TTA CGG TT-3', 退火温度 58.5°C , 38 个循环,产物 372 bp。GAPDH 引物序列上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 退火温度 56.0°C , 26 个循环,产物 452 bp。产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶成像系统成像并摄片。进行图像分析,计算 RAGE 条带与 GAPDH 条带的灰度比。

利用蛋白免疫印迹法检测 RAGE 蛋白表达水平。将细胞裂解提取总蛋白后,取 50 μg 总蛋白与上样缓冲液混匀后行 10% SDS-PAGE 电泳,并转印至硝酸纤维素膜上,膜用含 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST) 封闭 1 h,一抗 4°C 过夜, TBST 洗 3 次;二抗室温孵育 1 h,增强的化学荧光素显像并摄片。进行图像分析,计算 RAGE 条带与 GAPDH 条带的灰度比。

1.10 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均值比较,先采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 存在证实组间差异后,行 Dunnett's *t* 检验进行各组均值之间的两两比较。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

在原代培养第 5~7 天时,出现中央圆形、周边梭形的呈集落样贴壁生长的细胞,这些细胞扩增不明显,仅存在约 14 天左右即消失 (图 1A)。第 10~15 天时,贴壁细胞中逐渐出现约 20~50 个细胞组成的细胞簇 (图 1B),细胞簇中的细胞迅速增加,约 1~3 天即可形成大于 500 个细胞的细胞簇 (图 1C 和 1D),细胞簇中的细胞呈铺路石样 (图 1E),可稳定传代,并保持快速增长,其中大于 95% 的细胞胞浆内可见代表 vWF 阳性的棕褐色颗粒 (图 1F)。晚期贴壁的细胞 98.3% 为 CD146⁺ /CD45⁻ (图 1G), 98.5% 为 CD105⁺ /CD45⁻ (图 1H),在 CD45⁻ 细胞

中 99.1% 为 CD105⁺ / CD146⁺ (图 1I)。几乎所有贴壁细胞具备摄取 DiI-ac-LDL 的能力, 呈红色荧光 (图 1J); 并能与 FITC-UEA-1 结合, 呈绿色荧光 (图 1K); 两者双阳性的细胞呈黄色 (图 1L), 被称为“晚期内皮祖细胞”。

2.2 糖基化终产物对晚期内皮祖细胞功能的影响

在培养液中加入不同浓度的 AGE 24 h 后, 实验组与对照组相比存活的内皮祖细胞数量未见明显差异 (表 1)。随 AGE 浓度增加, 出现凋亡的 Annexin V⁺ /PI 细胞比例逐渐增加, 当 AGE 浓度超过 100 mg/L 时, 与对照组相比, Annexin V⁺ /PI 细胞比例明显增加 (表 1 和图 2)。随 AGE 浓度增加, 发生迁移的内皮祖细胞数量呈下降趋势, 当 AGE 浓度超过 100 mg/L 时, 与对照组相比, 发生迁移的细胞明显减少; 当 AGE 浓度达到 400 mg/L 时, 几乎很少内皮祖细胞发生迁移 (表 1 和图 3)。随 AGE 浓度增加, 内皮祖细胞形成毛细血管样网状结构的面积呈下降趋势, 当 AGE 超过 100 mg/L 时, 与对照组相比, 形成毛细血管样网状结构的面积明显减少, 当 AGE 超过 200 mg/L 时, 内皮祖细胞几乎很难形成完整的网状结构 (表 1 和图 4)。

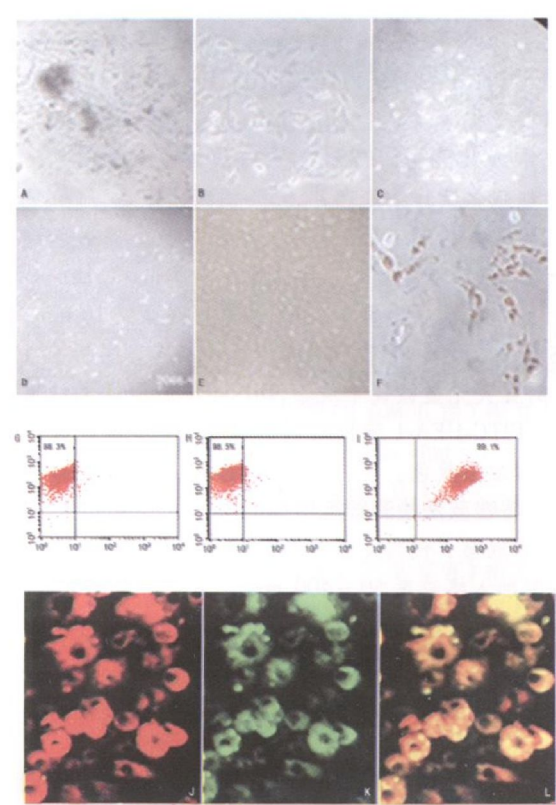


图 1 人脐血来源内皮祖细胞的形态及鉴定

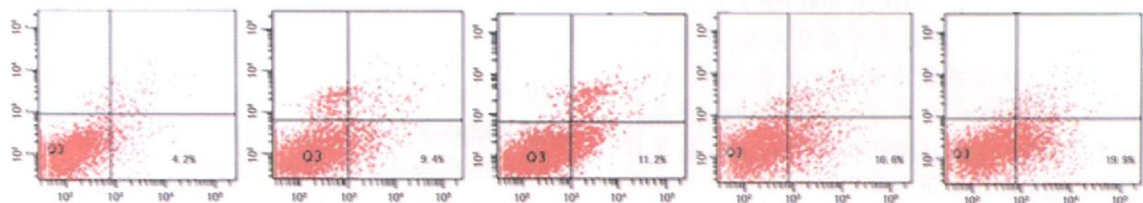


图 2 AGE 促进晚期内皮祖细胞凋亡 从左至右为对照组、50、100、200 及 400 mg/L 糖基化终产物组。

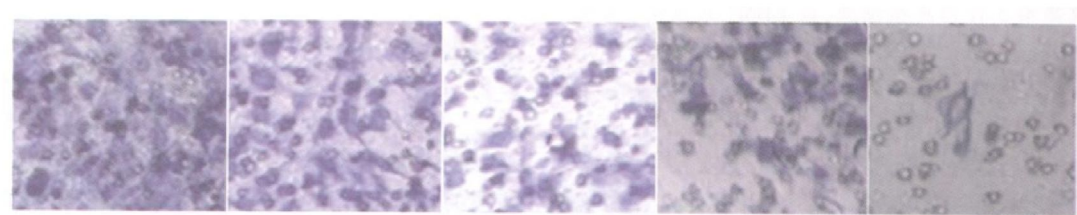


图 3 AGE 抑制血管内皮生长因子趋化的晚期内皮祖细胞迁移 从左至右为对照组、50、100、200 及 400 mg/L 糖基化终产物组。

表 1 AGE 对晚期内皮祖细胞功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

项目	对照组	AGE 浓度 (mg/L)			
		50	100	200	400
存活内皮祖细胞数	100.0% ± 0.0%	96.04% ± 4.51%	96.00% ± 2.45%	95.20% ± 4.15%	93.00% ± 4.00%
凋亡细胞	6.40% ± 1.32%	7.58% ± 1.30%	14.28% ± 0.79% ^b	17.84% ± 0.99% ^b	21.54% ± 2.73% ^b
迁移细胞面积 / 视野总面积	0.56 ± 0.07	0.50 ± 0.03	0.33 ± 0.05 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.03 ^b
管腔样结构面积 / 视野总面积	0.36 ± 0.05	0.35 ± 0.08	0.28 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.04 ^b	0.05 ± 0.02 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

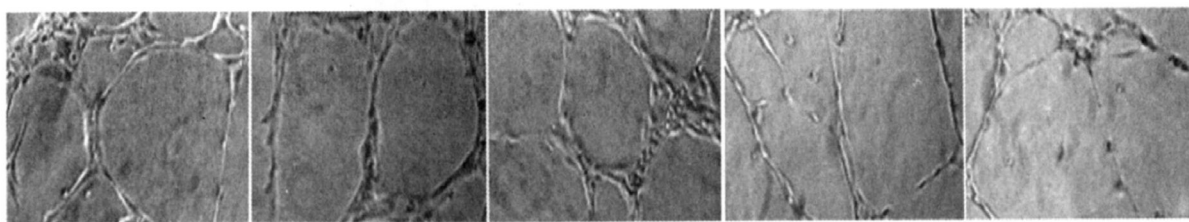


图 4 AGE抑制晚期内皮祖细胞形成毛细血管样网状结构的能力

从左至右为对照组、50、100、200及 400 mg/L糖基化终产物组。

2.3 内皮祖细胞糖基化终产物受体的表达

晚期内皮祖细胞中可以检测到 RAGE mRNA 和蛋白的表达 (图 5)。在对照组和 50 mg/L AGE 组中, RAGE 表达水平都很低; 当 AGE 浓度大于 100 mg/L 时, RAGE 表达水平较对照组显著增加; 当 AGE 浓度达到 400 mg/L 时, RAGE 表达水平与对照组亦无显著差异 (表 2)。

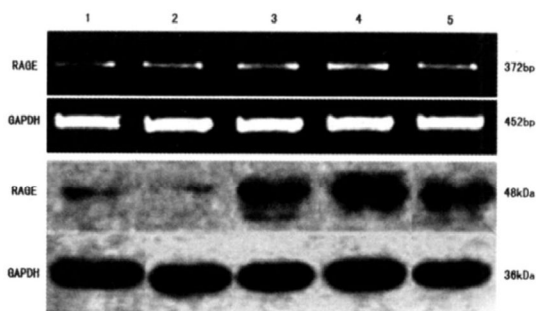


图 5 AGE上调内皮祖细胞中 AGE 受体的表达 从左至右为对照组、50、100、200及 400 mg/L 糖基化终产物组。

表 2 AGE上调内皮祖细胞中 AGE 受体的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

项目	对照组	AGE 浓度 (mg/L)			
		50	100	200	400
mRNA	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.04 ^b	0.13 ± 0.02 ^a
蛋白	0.80 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.40 ± 0.03 ^b	0.59 ± 0.04 ^b	0.08 ± 0.01

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

3 讨论

在体外培养过程中, 先后出现 2 种呈集落样或簇样生长的细胞, 这在不论脐血或外周血来源的内皮祖细胞体外培养过程中均有文献报道, 有学者将其分别命名为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞。在血管新生的过程中, 这两类细胞可能扮演着不同的角色^[6-7]。本研究, 用于实验的细胞为晚期内皮祖细胞, 使用的 AGE 浓度与糖尿病患者血浆中浓度类似^[8]。因此, 观察到的 AGE 对内皮祖细胞功能的影响能够反映糖尿病患者体内的 AGE 所引起的病理变化。

生存能力是从骨髓动员到周围循环的内皮祖细胞发挥生物学功能的先决条件。已有文献中, 研究对象多为由健康个体外周血单个核细胞诱导分化 (体外培养时间多在 7 天左右) 获得的早期内皮祖细胞, AGE 使早期内皮祖细胞凋亡显著增加, 但对其增殖的影响结果不完全一致^[9-11]。朱光旭等^[12]研究表明老年大鼠血清可部分抑制年轻大鼠内皮祖细胞向成熟内皮细胞诱导分化。本研究也首先从增殖和凋亡这两方面来观察 AGE 对脐血单个核细胞来源的晚期内皮祖细胞功能的影响。发现不同浓度 AGE 与晚期内皮祖细胞共培养后, 随 AGE 浓度升高, 越来越多的内皮祖细胞出现凋亡。未观察到高浓度的 AGE 对晚期内皮祖细胞增殖的显著影响, 是否与内皮祖细胞来源不同或共培养时间长短有关, 尚需更多的实验证实。

黏附、迁移以及在体外形成新生血管的能力被认为是衡量内皮祖细胞或成熟内皮细胞功能的常用指标。既往有大量文献对 AGE 抑制成熟内皮细胞黏附、迁移以及在体外形成新生血管的能力作了报道^[2-3]。但鲜有研究就 AGE 对内皮祖细胞上述功能的影响进行报道及深入研究。本研究中, 随 AGE 浓度升高, 血管内皮生长因子诱导的内皮祖细胞迁移和形成新生血管的能力都明显受到抑制。

AGE 在体内主要通过形成交联、与受体相互作用后发挥多种生物学效应, 目前认为后者在 AGE 引起的细胞功能障碍方面更为重要^[1]。目前已知 AGE 的受体有 RAGE、寡糖转移酶 48、80K-H 磷酸蛋白和半乳糖结合蛋白 3、iv 型和 ⑤ 型清道夫受体 A、血管内皮细胞外源性凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1、CD36、清道夫受体 SR-BI 等。RAGE 是实现 AGE 产生影响细胞功能的细胞内信号的主要受体, 其他受体则主要起清除和降低 AGE 细胞毒性的作用。RAGE 在正常的组织和血管中表达量极少, 但当 AGE 与其结合后, 将启动一个与细胞类型特异性的信号链, 在大多数细胞中, 这个信号链启动的结果是激活对氧自由基敏感的转录因子 NF- κ B。

在 RAGE 的启动子中, 包含有两个 NF- κ B 应答元件, 可正向调控基因的启动子, 从而形成 AGE/RAGE/NF- κ B/RAGE 的正反馈机制, 增加 RAGE 的表达^[13]。本研究中, 晚期内皮祖细胞中可检测到 RAGE mRNA 和蛋白表达, 不过表达水平都很低; 用不同浓度的 AGE 与内皮祖细胞共培养后, RAGE 表达都随着 AGE 浓度增加呈上升趋势; 但当 AGE 达到 400 mg/L 时, RAGE mRNA 和蛋白的表达却没有进一步升高反而下降, 这一结果主要与过高浓度的 AGE 可能产生细胞毒性所致。这些结果提示在晚期内皮祖细胞中, AGE 与其受体之间也存在一个配体促进受体表达的正反馈机制, 这个机制可能参与了 AGE 引起的晚期内皮祖细胞功能受损。抗 RAGE 抗体和可溶性 RAGE 可部分或全部阻断 RAGE 所产生的生物学效应^[14-15], 因此, 可使用其特异性的阻断剂进一步证实 AGE 对晚期内皮祖细胞功能的影响是通过与 RAGE 结合后产生。

本研究初步证实了 AGE 通过上调其受体 (RAGE) 引起晚期内皮祖细胞功能障碍, 但 AGE 通过哪些信号通路最终实现对内皮祖细胞功能的影响仍需进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury [J]. *Circulation*, 2006 **114** (6): 597-605
- [2] Creager MA, Loscher TF, Cosentino F, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. Part I [J]. *Circulation*, 2003 **108** (12): 1527-532
- [3] Xu B, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products [J]. *FASEB J*, 2003 **17** (10): 1289-291
- [4] Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2004 **53** (1): 195-199
- [5] Tepper OM, Galiano RD, Capla M, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures [J]. *Circulation*, 2002 **106** (22): 2781-786
- [6] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004 **24** (2): 288-293
- [7] Duan HX, Cheng LM, Wang J, et al. Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood [J]. *Cell Bio Int*, 2006 **30** (12): 1018-027
- [8] Xu B, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products [J]. *FASEB J*, 2003 **17** (10): 1289-291
- [9] Scheubel RJ, Kahrstadt S, Weber H, et al. Depression of progenitor cell function by advanced glycation endproducts (AGEs): potential relevance for impaired angiogenesis in advanced age and diabetes [J]. *Exp Gerontol*, 2006 **41** (5): 540-548
- [10] Sun C, Liang C, Ren Y, et al. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009 **104** (1): 42-49
- [11] 李倩, 沈成兴, 刘乃丰. 体外制备的晚期糖基化终产物对内皮祖细胞数量的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (4): 284-286
- [12] 朱光旭, 黄岚, 武晓静, 等. 不同年龄段大鼠血清影响内皮祖细胞向成熟内皮诱导分化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (9): 647-652
- [13] Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products [J]. *J Biol Chem*, 1997 **272** (26): 16498-506
- [14] Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses [J]. *Circulation*, 2002 **105** (7): 816-822
- [15] Park I, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts [J]. *Nat Med*, 1998 **4** (9): 1025-031

(此文编辑 文玉珊)