

原花青素对高糖环境下大鼠内皮祖细胞血管内皮生长因子受体 2 及其传导通路的影响

廖文筠¹, 刘勇¹, 陈振波², 孙晓磊¹, 曾宏¹, 何虎强¹, 张雪琳¹, 何延政¹

(1. 泸州医学院附属医院血管外科, 四川省泸州市 646000; 2. 解放军总参谋部总医院妇产科, 北京市 100091)

[关键词] 原花青素; 内皮祖细胞; 高糖; 氧化应激; 血管内皮生长因子受体 2

[摘要] **目的** 探讨高糖环境下原花青素(OPC)对体外培养的大鼠内皮祖细胞血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)及其下游相关通路的影响。**方法** 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离大鼠骨髓内皮祖细胞(EPC);分别检测正常糖组(5.5 mmol/L 葡萄糖+25 mmol/L 甘露醇)、高糖组(30 mmol/L 葡萄糖)培养的 EPC 增殖和氧化应激产物产生情况,再在不同原花青素浓度下检测各时间点 EPC 增殖的方法,筛选出最佳原花青素浓度(30 mg/L);分别用 Matrigel 基质胶检测正常糖+OPC 组、正常糖组、高糖+OPC 组、高糖组 EPC 成管能力;最后在 1、3、5、7 天分别检测正常糖+OPC 组、正常糖组、高糖+OPC 组、高糖组 EPC 的丙二醛水平以及 VEGFR-2、p-AKT、核因子 κ B(NF- κ B)和核因子 κ B 抑制蛋白 α (IKB- α)的相对表达量。**结果** 随时间推移,高糖组中 EPC 细胞凋亡和氧化应激产物均较正常糖组逐渐增多;正常糖+OPC 组、正常糖组 EPC 成管数目无明显差异,高糖+OPC 组成管数目较高糖组明显增多;在 1、3、5、7 天时 OPC 在正常糖浓度下对 EPC 产生的氧化应激产物及 VEGFR-2、p-AKT、NF- κ B 和 IKB- α 蛋白的相对表达量没有显著影响,而在高糖环境下可以明显降低氧化应激产物的生成及上调 VEGFR-2、p-AKT 和 NF- κ B 蛋白相对表达量,下调 IKB- α 蛋白相对表达量。**结论** 原花青素可能通过缓解高糖环境对 EPC 的氧化损伤作用,上调内皮祖细胞 VEGFR-2 及其下游通路蛋白表达,进而促进细胞增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Oligomeric Proanthocyanidin Exert a Great Effect on Expression of VEGFR-2 and Signaling Pathways Downstream in Endothelial Progenitor Cell Cultivated in High Concentration of Glucose

LIAO Wen-Jun¹, LIU-Yong¹, CHEN Zhen-Bo², SUN Xiao-Lei¹, ZENG Hong¹, HE Hu-Qiang¹, ZHANG Xue-Lin¹, and HE Yan-Zheng¹

(1. Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, The 309th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100091, China)

[KEY WORDS] Oligomeric Proanthocyanidin; Endothelial Progenitor Cell; High Glucose; Oxidative Stress; Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and signaling pathways downstream in endothelial progenitor cell (EPC) treated with procyanidine under the environment of high glucose. **Methods** To isolate rat bone marrow EPC with Ficoll density gradient centrifugation, the proliferation and oxidative stress production was respectively detected using spectrophotometer and enzyme standard instrument in control glucose group (5.5 mmol/L glucose + 25 mmol/L mannitol) and high glucose group (30 mmol/L glucose). To detect the proliferation of the EPC treated with various concentration of anthocyanins in different time points, in order to select optimum concentration of oligomeric proanthocyanidin (OPC) (30 mg/L). Tube formation capacity was respectively detected using Matrigel matrix in four groups, including control glucose + OPC group, control glucose group, high glucose + OPC group and high glucose group. Finally malondialdehyde (MDA) value and protein expression of VEGFR-2, p-AKT, nu-

[收稿日期] 2014-01-13

[修回日期] 2014-03-01

[作者简介] 廖文筠, 硕士, 医师, 主要从事周围血管病变的发生机制及防治研究, E-mail 为 lwj-710@163.com。刘勇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事周围血管病变的发生机制及防治研究。通讯作者何延政, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事周围血管病变的发生机制及防治研究, E-mail 为 hepda2007@vip.163.com。

clear factor-kappa B (NF- κ B) and inhibitor kappa B- α (IKB- α) was respectively detected in the 1, 3, 5, 7 days. **Results** Compared with control glucose group, the number of cell apoptosis and oxidative stress production were more in high glucose group. Tube formation capacity had no obvious difference between control glucose + OPC group and control glucose group. The number of tube formation in high glucose + OPC group was more than high glucose group. In control glucose group, the protein expression of VEGFR-2, p-AKT, NF- κ B, IKB- α and oxidative stress production had no statistical differences in EPC treated with OPC in 1, 3, 5, 7 days. In high glucose group, oxidative stress production significantly reduced, while the protein expression of VEGFR-2, p-AKT, NF- κ B obviously increase in EPC treated with OPC in 1, 3, 5, 7 days, excluding the protein expression of IKB- α . **Conclusion** OPC can alleviate oxidative damage of EPC affected on high glucose, and improve expression of VEGFR-2, and activate its downstream pathway to promote EPC proliferation.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)是成熟的内皮细胞的前体细胞,在适当的条件下可以分化为内皮细胞并参与血管新生的过程。许多研究表明 EPC 参与了肢体缺血、组织损伤等血管修复的过程,EPC 在损伤血管处细胞集落形成越多,血管新生就越明显,这说明 EPC 的增殖或凋亡对血管修复及新生有明显的影晌作用^[1]。氧化应激是造成 EPC 损伤凋亡的一个重要因素^[2],糖尿病患者因为糖代谢紊乱会诱导活性氧增加,这可能是造成 EPC 数目及功能明显受损的原因所在^[3]。本实验主要研究原花青素(oligomeric proanthocyanidin, OPC)缓解高糖(high glucose, HG)下氧化应激反应,探讨减少 EPC 损伤的作用机制,为原花青素在糖尿病患者血管损伤修复方面的应用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠由泸州医学院动物实验室提供;M199 培养基、特级胎牛血清(美国 GIBCO 公司);大鼠淋巴细胞分离液、0.25%胰蛋白酶(碧云天生物技术研究所);丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物制剂研究所);4%多聚甲醛(北京中山技术有限公司);FITC-UEA-1(Sigma 公司);DiI-ac-LDL(Molecular Probe 公司);血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)等蛋白抗体及 Western blot 试剂盒(海韵生物公司)。

1.2 EPC 的分离、培养及鉴定

将 SD 大鼠采用脊椎脱臼法处死,剪开股骨并用 PBS 冲洗骨髓腔,收集冲洗液并加入大鼠淋巴细胞分离液中,利用差速离心法分离单核细胞。收集白膜层并用 M199 培养基悬浮后接种在培养板中,

将细胞分为两组培养:(1)正常糖(浓度)组:加入 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 25 mmol/L 甘露醇(保持渗透压与高糖组一致);(2)高糖组:加入 30 mmol/L 葡萄糖。每隔 2 天进行半量换液,显微镜照相记录细胞形态变化。在培养到第 7 天时用 4%多聚甲醛固定细胞,滴加 DiI-ac-LDL,孵育 1 h 后继续滴加 FITC-UEA-1, PBS 漂洗、封片后在激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.3 CCK-8 检测不同糖浓度组 EPC 增殖

将两组 EPC 消化,调整细胞密度为 2×10^8 /L,接种到 2 个 96 孔板中,每个孔板设置 4 个时间点,每个时间点设置 5 个复孔,每孔加入 100 μ L 细胞悬液。在培养 1、3、5、7 天后,分别在每组每个时间点加入 10 μ L 的细胞计数试剂盒 8 (cell counter kit-8, CCK-8)试剂,然后在细胞培养箱中培养 1.5 h 后用酶标仪检测吸光度(absorbance, A)值,检测波长为 450 nm。

1.4 检测不同糖浓度组 EPC 的 MDA 浓度

将两组 EPC 分别培养 1、3、5、7 天,从 6 孔板中消化,调整细胞密度为 2×10^8 /L 后制作细胞匀浆,按 MDA 试剂盒说明书操作,在 532 nm 处测各管吸光度值。

1.5 原花青素最佳使用浓度的筛选

将高糖组的 EPC 消化,调整细胞密度为 2×10^8 /L,接种到 8 个 96 孔板中,每个孔板设置 4 个时间点,每个时间点设置 5 个复孔,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,8 个孔板分别加入 0、10、15、20、25、30、35 及 40 mg/L OPC。将实验分为 8 组,在培养 1、3、5、7 天后,分别在每组每个时间点加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,在细胞培养箱中培养 1.5 h 后用酶标仪检测 A 值,检测波长为 450 nm。

1.6 原花青素干预后 EPC 的 MDA 检测

将实验分为 4 组:正常糖 + OPC 组、正常糖组、高糖 + OPC 组、高糖组,在培养 1、3、5、7 天后检测 EPC 的 MDA 浓度,方法详见 MDA 试剂盒说明书。

1.7 蛋白质免疫印迹法检测各组 EPC 中 VEGFR-2、p-AKT、核因子 κ B 和核因子 κ B 抑制蛋白 α 表达水平

将分离后的 EPC 分别接种到 96 孔板中,按照培养基添加物种类将实验分为 4 组,分别为:正常糖 + OPC 组、正常糖组、高糖 + OPC 组、高糖组,每个孔板设置 4 个时间点,在培养 1、3、5、7 天后,收集 EPC,提取总蛋白,离心去除细胞碎片后收集上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,调节蛋白浓度,以 2 g/L 的浓度进行电泳,结束后将蛋白进行转膜。在 37℃ 下用封闭液封闭膜 2 h,加入一抗兔抗鼠 VEGFR-2,4℃ 摇床过夜, PBST 洗膜 3 次。将膜用显影液显影 3 min,蒸馏水冲洗终止显色。其他种类蛋白检测操作步骤一致。

1.8 Matrigel 基质胶检测各组 EPC 成管数目

将 Matrigel 基质胶与培养基按 1:1 混合后铺被在 24 孔板上,在孵箱放置半小时使其凝固,消化正常糖 + OPC 组、正常糖组、高糖 + OPC 组、高糖组 EPC,每孔加入 2×10^4 个细胞,培养 24 h 后随机选取 3 个视野计数管腔数目。

1.9 统计学方法

实验所得 A 值及蛋白相对表达量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,正常糖组与高糖组、正常糖 + OPC 组与正常糖组、高糖 + OPC 组与高糖组的比较均采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 EPC 形态学变化和双吞染色鉴定

EPC 在接种 3 天后,大部分呈圆形,细胞透亮,并逐渐开始贴壁(图 1A);继续培养 7 天后,可见细胞发生形态变化,大部分细胞呈现梭形形态,镜下也可看见聚集生长(图 1B);培养 14 天后可发现细胞变大变圆,透亮度增加,呈现出“鹅卵石”形态分布(图 1C)。EPC 经过 DiI-ac-LDL 及 FITC-UEA-1 处理后,在激光共聚焦显微镜下观察细胞显色,绿色荧光为经 FITC-UEA-1 处理后 EPC(图 2A),红色荧光为经 DiI-ac-LDL 处理后 EPC(图 2B),蓝色荧光为 DAPI 核染色(图 2C),双染色阳性鉴定为正在分化的 EPC(图 2D)。

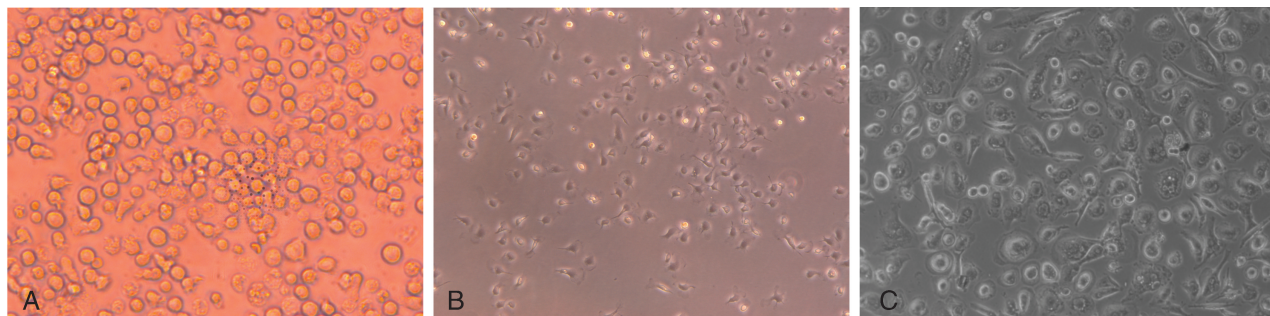


图 1. 各时间点 EPC 形态变化 A 为培养 3 天($\times 200$),B 为培养 7 天($\times 100$),C 为培养 14 天($\times 200$)。

Figure 1. Morphological changes of endothelial progenitor cells at each time point

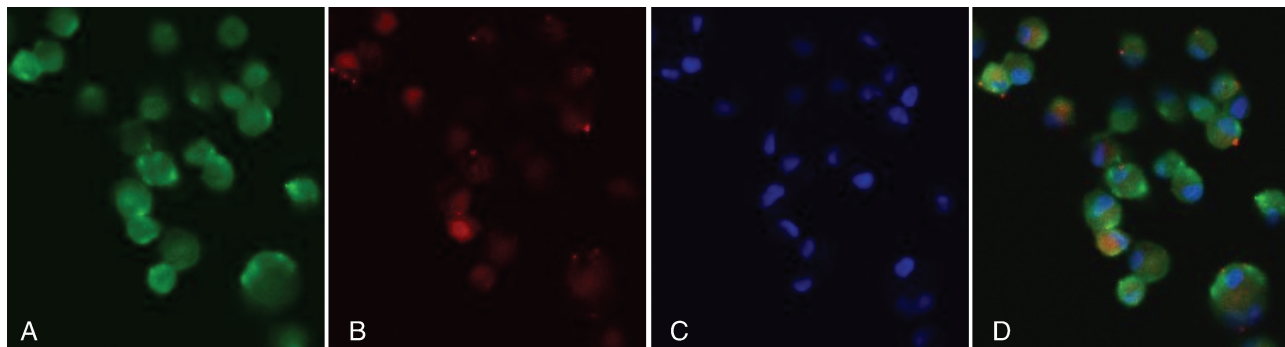


图 2. 双吞实验染色($\times 200$) A 为 FITC-UEA-1 染色,B 为 DiI-ac-LDL 染色,C 为 DAPI 核染色,D 为融合图(双染色阳性)。

Figure 2. EPC were identified with DiI-ac-LDL and FITC-UEA-1 double staining ($\times 200$)

2.2 不同糖浓度组 EPC 增殖

正常糖组 EPC 在 1、3、5、7 天的 A 值呈逐渐增加趋势,高糖组 EPC 的 A 值随时间变化而逐渐降低;高糖组的 A 值明显低于正常糖组($P < 0.05$;表 1)。

表 1. CCK-8 检测不同糖浓度组 EPC 增殖情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1. EPC proliferation detected by CCK-8 in different glucose concentration group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	1 天	3 天	5 天	7 天
正常糖组	0.76 ± 0.03	0.92 ± 0.03	1.50 ± 0.16	2.25 ± 0.30
高糖组	0.37 ± 0.03 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常糖组比较。

2.3 不同糖浓度组 EPC 的 MDA 水平

正常糖组 EPC 的 MDA 水平随着时间增加并没有明显的改变,但是高糖组 MDA 水平随着时间变化而逐渐增高,并且明显高于正常糖组($P < 0.05$;

表 3. 不同浓度原花青素作用下 EPC 增殖情况($\bar{x} \pm s$)

Table 3. EPC proliferation in different OPC concentrations ($\bar{x} \pm s$)

时间	0 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	20 mg/L	25 mg/L	30 mg/L	35 mg/L	40 mg/L
1 天	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.42 ± 0.02
3 天	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.03
5 天	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.02
7 天	0.26 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.01

2.5 原花青素在高糖环境下对 EPC 的 MDA 含量的影响

将正常糖 + OPC 组与正常糖组在 1、3、5、7 天 4 个

表 4. 各组 EPC 的 MDA 浓度变化($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

Table 4. MDA change of EPC in different group ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

分 组	1 天	3 天	5 天	7 天
正常糖 + OPC 组	0.74 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.91 ± 0.01	1.04 ± 0.06
正常糖组	0.74 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.89 ± 0.02	1.06 ± 0.10
高糖 + OPC 组	0.85 ± 0.01 ^a	1.50 ± 0.02 ^a	1.96 ± 0.09 ^a	2.19 ± 0.18 ^a
高糖组	1.25 ± 0.12	3.25 ± 0.11	3.55 ± 0.15	4.56 ± 0.14

a 为 $P < 0.05$,与高糖组比较。

2.6 原花青素在高糖环境下对 EPC 的 VEGFR-2、p-AKT、核因子 κB 和核因子 κB 抑制蛋白 α 表达的影响

将正常糖 + OPC 组与正常糖组在 1、3、5、7 天 4 个时间点的 4 种蛋白的相对表达量分别作比较,并

表 2)。

表 2. 不同糖浓度组 EPC 的 MDA 水平变化($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

Table 2. MDA change of EPC in different glucose concentration group ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

分 组	1 天	3 天	5 天	7 天
正常糖组	0.66 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.70 ± 0.02	0.69 ± 0.01
高糖组	1.28 ± 0.20 ^a	3.44 ± 0.16 ^a	4.02 ± 0.19 ^a	4.58 ± 0.16 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常糖组比较。

2.4 原花青素最佳使用浓度的筛选

在每个时间点中均可发现 OPC 在 30 mg/L 时, EPC 增殖最为明显,且在相同时间点 30 mg/L 浓度下 EPC 的 A 值较 25 mg/L 浓度下 A 值明显增高($P < 0.05$;表 3),而与 35 mg/L 浓度下 A 值比较无明显差异($P > 0.05$;表 3)。这说明 OPC 浓度在 30 mg/L 时 EPC 增殖最为明显,故后续实验均采用 30 mg/L OPC。

时间点的 MDA 水平分别作比较,并无明显差异($P > 0.05$;表 4);高糖 + OPC 组 EPC 在 4 个时间点的 MDA 水平均较高糖组明显降低($P < 0.05$;表 4)。

无明显差异($P > 0.05$)。高糖 + OPC 组在 4 个时间点与高糖组比较,VEGFR-2 相对表达量分别上调了 6.20、6.80、7.64、3.58 倍($P < 0.05$),p-AKT 上调了 3.81、3.46、5.11、6.00 倍($P < 0.05$),核因子 κB (nuclear factor-kappa B, NF- κB)上调了 1.75、2.44、

3.26、3.46 倍 ($P < 0.05$), 核因子 κB 抑制蛋白 α (inhibitor kappa B- α , IKB- α) 下调了 1.41、1.34、1.08、1.09 倍 ($P < 0.05$)。而且高糖 + OPC 组中

VEGFR-2、p-AKT、NF- κB 的相对表达量随着时间的增加而逐渐升高(图 3)。

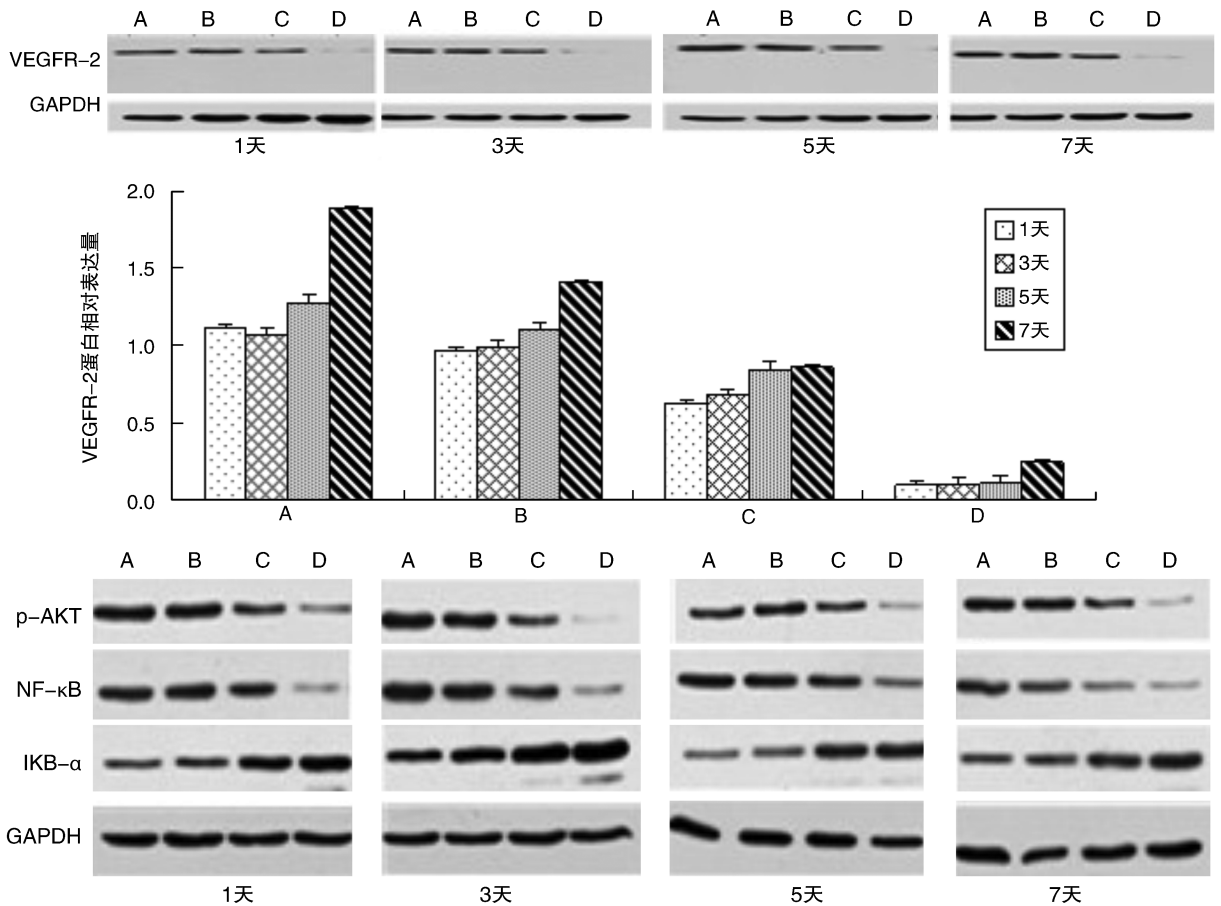


图 3. 各组 EPC 的 VEGFR-2、p-AKT、NF- κB 和 IKB- α 蛋白表达变化 A 为正常糖 + OPC 组, B 为正常糖组, C 为高糖 + OPC 组, D 为高糖组。

Figure 3. Protein expression changes of VEGFR-2, p-AKT, NF- κB and IKB- α in different EPC groups

2.7 OPC 对各组 EPC 成管数目的影响

正常糖 + OPC 组 EPC 成管腔数目与正常糖组比较差异无统计学意义 (21.00 ± 0.45 比 20.00 ± 0.60 , $P > 0.05$); 高糖 + OPC 组 EPC 成管腔数目与高糖组比较差异有统计学意义 (17.00 ± 0.73 比 10.00 ± 0.63 , $P < 0.05$; 图 4)。

3 讨论

糖尿病目前的发病率在全世界范围内呈现增长趋势,它是一种由多种复杂病因引起的以高血糖为主要特征的自身代谢紊乱性疾病。随着糖尿病的病程进展,大血管及微血管会发生慢性病变及损伤^[4],导致视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病足等,这成为了糖尿病患者致残、致死的主要原因,其机

制可能是高糖代谢紊乱导致心血管系统修复能力降低^[5,6]。EPC 是内皮细胞的前体细胞,可以分化成为成熟的内皮细胞并参与血管修复和新生的过程。EPC 会被募集到血管损伤及缺血部位,进而增殖并参与血管修复和新生^[7-9]。糖尿病患者之所以发生血管病变,这可能与 EPC 受损密切相关。本实验将 EPC 在正常糖浓度和高糖浓度下培养,进而探索高糖对 EPC 的影响,结果发现高糖环境下 EPC 增殖能力较正常糖浓度显著降低,而且高糖组 EPC 的 MDA 水平较正常糖组显著增高,这表明高糖浓度下的 EPC 产生了大量的氧化应激产物即活性氧 (reactive oxygen species, ROS)。ROS 是细胞和组织内一类高活性的氧分子,当细胞自身产生过多的 ROS 并且超过其自身清除能力时,会引起细胞膜发生过氧化,蛋白及酶发生变性,进而导致细胞损伤和凋亡。

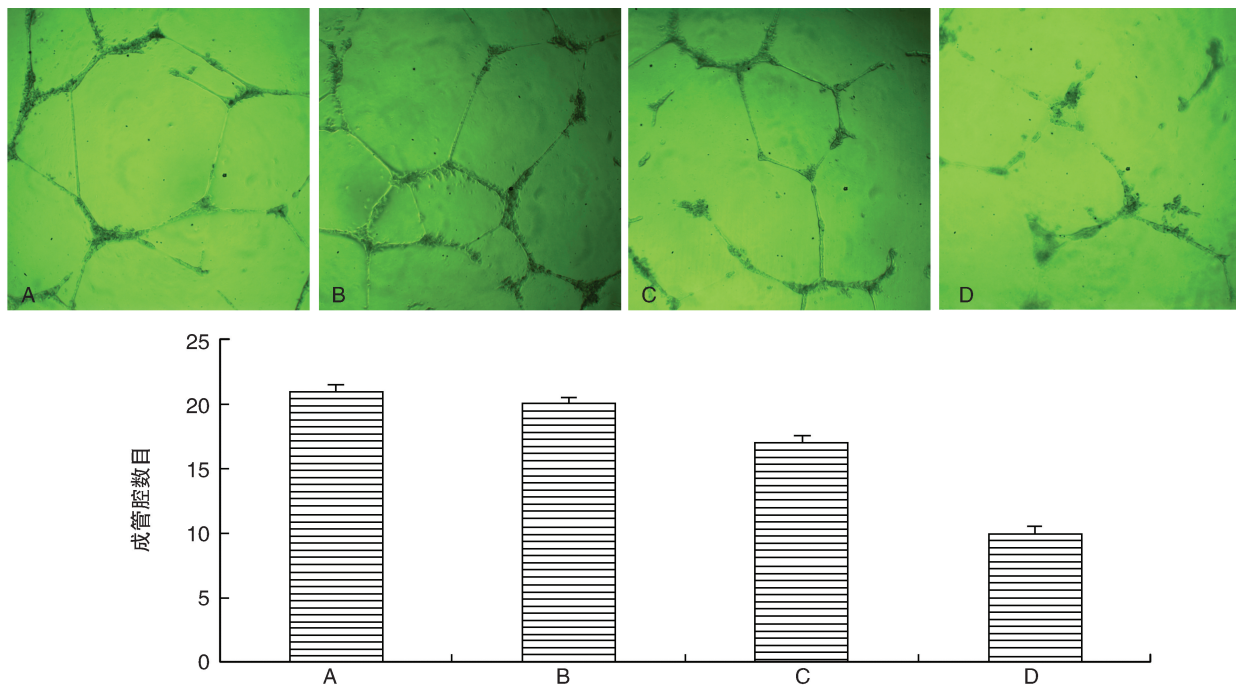


图 4. 成管实验 (×200) A 为正常糖 + OPC 组, B 为正常糖组, C 为高糖 + OPC 组, D 为高糖组。

Figure 4. Angiogenesis experiment (×200)

ROS 使 EPC 发生损伤、凋亡,这可能是糖尿病患者发生血管损伤并且难以修复的原因所在。有学者指出,ROS 可能是高糖浓度下引起 EPC 损伤的关键环节^[10,11]。

原花青素作为一种多酚化合物,广泛存在于植物皮及籽等部位,随着人们研究的深入,逐渐发现了原花青素的抗氧化能力;原花青素在体内氧化后释放 H^+ 离子阻断细胞膜脂质不被自由基氧化,还可以清除氧游离基,有着强效的抗氧化能力^[12]。本实验中在 EPC 的高糖培养基中加入不同浓度 OPC,检测了 1、3、5、7 天的 EPC 增殖情况,通过对比每个 OPC 浓度的 EPC 增殖曲线,发现 OPC 浓度在 30 mg/L 时 EPC 在高糖环境中增殖最为明显,这说明了此浓度下 OPC 抗氧化能力可能最为明显,故将 30 mg/L 用作后续实验的 OPC 使用浓度。在后续实验中采用正常糖 + OPC 组对比正常糖组,高糖 + OPC 组对比高糖组,分别检测了 EPC 的成管数目和在 1、3、5、7 天各组中 EPC 的 MDA 水平,观察 EPC 氧化应激产物的生成情况。结果发现,EPC 的成管数目和氧化应激产物,正常糖 + OPC 组和正常糖组之间无明显差异;而高糖 + OPC 组和高糖组之间存在明显差异,高糖 + OPC 组 EPC 成管数目明显多于高糖组,每个时间点高糖 + OPC 组 EPC 产生氧化应激产物明显少于高糖组,并且随着时间的增加前者的氧化应激产物产生呈递减趋势。上述结果表明,正常

糖浓度环境下可能不会刺激 EPC 产生过多氧化应激产物而超出细胞本身清除能力进而造成细胞损伤;高糖环境下则可明显刺激 EPC 产生氧化应激产物,抑制细胞增殖;OPC 可以明显抑制高糖刺激 EPC 产生氧化应激产物,随着时间延长这一抗氧化效应可能逐渐增强。

血管内皮生长因子受体有 3 种亚型,其中 VEGFR-2 主要分布于淋巴管和血管的内皮细胞膜上^[13],研究表明内皮细胞前体 EPC 也可以表达 VEGFR-2,其激活可调控细胞增殖^[14,15]。其中 PI3K/AKT/NF- κ B 是研究最为广泛的调控细胞增殖的信号通路,VEGFR-2 与相应配体结合而激活此信号通路。由于 AKT 能直接磷酸化多种转录因子,其中 NF- κ B 研究较为深入,通过此信号通路可促进细胞增殖。本实验中以正常糖 + OPC 组对比正常糖组,高糖 + OPC 组对比高糖组,分别检测 1、3、5、7 天各组中 EPC 的 VEGFR-2、p-AKT、NF- κ B 蛋白表达水平,显示原花青素对正常糖浓度下 EPC 的 VEGFR-2 表达无明显影响,而在高糖环境下可显著提高 VEGFR-2 及其下游信号分子的表达,并随时间延长表达量逐渐升高。这为原花青素抗氧化应激作用实际应用于临床提供了理论基础。正常状态下 EPC 胞质中,NF- κ B 与其抑制因子 I κ B 结合在一起而失去转录活性。AKT 可通过激活 I κ B 激酶使 I κ B 磷酸化、降解,并与 NF- κ B 分离,NF- κ B 进入核调控转

录过程进而促进细胞增殖^[16]。我们实验结果显示,培养 1、3、5、7 天,正常糖 + OPC 组和正常糖组比较 IKB- α 的表达量没有统计学差异;高糖 + OPC 组中 IKB- α 表达量比高糖组显著降低。进一步证明原花青素可能通过此通路缓解了高糖环境对 EPC 的氧化损伤。

综上所述,高糖环境下可以刺激 EPC 氧化应激产物产生增多,超出了自身清除能力,于是抑制了 EPC 增殖及成管功能。原花青素可以抑制高糖环境对 EPC 的氧化应激反应,降低了 EPC 的损伤效应,改善了 EPC 增殖及成管功能,这一效应可能是在抑制了氧化应激反应后,通过上调 EPC 的 VEGFR-2、p-AKT、NF- κ B 和下调 IKB- α 蛋白的水平,促进了 EPC 增殖和成管能力。这提示上述蛋白可能是 EPC 自身功能是否完好的关键因素,因此为糖尿病患者 EPC 修复血管损伤提供了新的思路。同时,在今后的实验中还需要进一步的动物体内实验及药物实验加以验证。

[参考文献]

- [1] Piatkowski A, Grieb G, Simons D, et al. Endothelial progenitor cells-potential new avenues to improve neoangiogenesis and reendothelialization[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 306: 43-81.
- [2] Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, 7(2): 101-108.
- [3] Callaghan MJ, Ceradini DJ, Gurtner GC. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11-12): 1 476-482.
- [4] 吴仕平, 陈明. 替米沙坦防治糖尿病大鼠血管内皮损伤的实验研究[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2011, 3(1): 38-40.
- [5] Di Marco E, Gray SP, Jandeleit-Dahm K. Diabetes alters activation and repression of pro- and anti-inflammatory signaling pathways in the vasculature[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 68.
- [6] Su J, Lucchesi PA, Gonzalez-Villalobos RA, et al. Role of

advanced glycation end products with oxidative stress in resistance artery dysfunction in type 2 diabetic mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1 432-438.

- [7] Nakagawa T, Sato W, Sautin YY, et al. Uncoupling of vascular endothelial growth factor with nitric oxide as a mechanism for diabetic vasculopathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(3): 736-745.
- [8] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2004, 95(4): 343-353.
- [9] 李琳, 雷闽湘, 徐寒松, 等. 葡萄糖对人外周血内皮祖细胞凋亡的影响[J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(12): 1 620-622.
- [10] Fadini GP, Sartore S, Agostini C, et al. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(5): 1 305-313.
- [11] Zhang W, Wang XH, Chen SF, et al. Biphasic response of endothelial progenitor cell proliferation induced by high glucose and its relationship with reactive oxygen species[J]. *J Endocrinol*, 2008, 197(3): 463-470.
- [12] Stankovi M, Tesevi V, Vajs V, et al. Antioxidant properties of grape seed extract on human lymphocyte oxidative defence[J]. *Planta Med*, 2008, 74(7): 730-735.
- [13] Nieminen T, Toivanen PI, Rintanen N, et al. The impact of the receptor binding profiles of the vascular endothelial growth factors on their angiogenic features[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1 840(1): 454-463.
- [14] Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2008, 9(12): 1 190-221.
- [15] Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors[J]. *Microcirculation*, 2008, 15(8): 715-38.
- [16] Gliki G, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3-kinase-mediates PKC delta phosphorylation: role of PKC in angiogenesis[J]. *Cell Biol Int*, 2002, 26(9): 751-759.

(此文编辑 曾学清)