

· 博士之窗 ·

丹参多酚酸盐修复糖基化终产物引起的晚期 EPCs 功能障碍及其分子机制

陈 琴¹ 黄铭涵² 江时森³ 徐 标¹

摘要 目的 观察丹参多酚酸盐对糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)引起的晚期内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)功能障碍的修复作用,并探讨其中分子机制。**方法** 密度梯度离心法分离脐血中单个核细胞,采用 EGM-2-MV 培养液培养晚期 EPCs;利用牛血清白蛋白及葡萄糖制备晚期糖基化修饰的白蛋白(AGE modified bovine serum albumin, AGE-albumin)。实验分为单独加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-albumin 的 AGE 组;同时加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-albumin 及 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹参多酚酸盐低、中、高剂量组;加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未经修饰白蛋白的对照组。采用 Annexin V/PI 双染法检测晚期 EPCs 凋亡;ECMatrx-gel 检测晚期 EPCs 形成新生血管的能力。采用 RT-PCR 法检测细胞中糖基化终产物受体(the receptor for AGE, RAGE)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) mRNA 水平;Western blot 法检测 RAGE、eNOS 及蛋白激酶 Akt 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,AGE 组 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例增加,在 ECMatrx-gel 上形成新生血管能力降低;晚期 EPCs 中 rage mRNA 及 RAGE 蛋白表达增加,enos mRNA 及 eNOS 及 Akt 蛋白表达减少。丹参多酚酸盐 1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,与 AGE 组比较,晚期 EPCs 凋亡明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),在 ECMatrx-gel 上形成新生血管能力增加($P < 0.01$),晚期 EPCs 中 RAGE 表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),eNOS、Akt 表达增加($P < 0.05$);与对照组比较,丹参多酚酸盐 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组对晚期 EPCs 凋亡及在 ECMatrx-gel 上形成新生血管能力,rage mRNA 及 RAGE,enos mRNA 及 eNOS, Akt 蛋白表达,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** AGE 使 EPCs 功能受损,表现为凋亡增加、迁移及体外形成新生血管的能力下降,丹参多酚酸盐可修复由 AGE-albumin 引起的 EPCs 功能损害。

关键词 丹参多酚酸盐;糖基化终产物;晚期内皮祖细胞;血管新生

Effect of Depside Salt from *Salvia Miltiorrhizae* in Repairing Advanced Glycation End Products-induced Late Endothelial Progenitor Cell Dysfunction and Its Molecular Mechanism CHEN Qin, HUANG Ming-han, JIANG Shi-sen, et al *Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing (210008)*

ABSTRACT Objective To investigate the effects of deposite salt from *salvia miltiorrhizae* (DSSM) in repairing advanced glycation end products (AGE)-induced late endothelial progenitor cell (EPC) dysfunction, and its possible molecular mechanism. **Methods** Mononuclear cells (MNCs) were separated using density gradient centrifugation from human umbilical cord blood, and cultured with EGM-2-MV culture fluid to late EPCs. Then the EPCs were divided into 5 groups: Group A incubated with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-modified bovine serum albumin (AGE-albumin) alone (A), Groups B, C and D with equal dosage of AGE-albumin plus DSSM at different dosages (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Group E with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of unmodified-AGE. The late EPCs apoptosis was detected by Annexin V⁺/PI double-stain, angiogenic capacity was detected by ECMatrx-gel, mRNA expressions of the receptor for AGE (RAGE) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were measured by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and the protein expressions of RAGE, eNOS and protein kinase (Akt) were measured by Western blot. **Results** Compared with Group E, in Group A, the Annexin V⁺/PI⁻ ratio and expression of RAGE in EPCs increased, the angiogenic capacity, mRNA and protein expressions of eNOS, and protein expression of Akt decreased significantly. These abnormal changes in Groups C and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30170370);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2004083)

作者单位:1. 南京大学医学院附属鼓楼医院心内科(南京 210008);2. 福建中医学院附属第二人民医院;3. 南京军区南京总医院心血管内科

通讯作者:徐 标, Tel:025-83105205, E-mail: xubiao@medmail.com.cn

D were significantly smaller than those in Group A ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And all the indices in Group D were adjacent to those in Group E, showing insignificant difference between the two groups ($P > 0.05$).

Conclusions AGE could injure the function of EPCs, revealing increase of cell apoptosis and migration, deprivation of angiogenic capacity *in vitro*. DSSM could repair the EPCs dysfunction induced by AGE-albumin. Up-regulation of eNOS and Akt in these cells may be involved in the mechanism.

KEYWORDS deposite salt from salvia miltiorrhizae; advanced glycation end products; late endothelial progenitor cell; angiogenesis

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,参与了衰老、阿尔茨海默(Alzheimer's)病、糖尿病慢性并发症及动脉粥样硬化等的发生、发展^[1]。骨髓来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)参与了组织缺血、损伤后的血管新生过程^[2],许多生理和病理因素都可能影响 EPCs 的数量和功能^[3-5]。AGE 引起的 EPCs 功能受损是许多缺血性疾病发生、发展的新机制^[6,7]。丹参在临床上广泛应用于包括冠心病在内的缺血性疾病的防治。丹参多酚酸盐(depside salt from salvia miltiorrhiza)是中药丹参提取物中最重要的水溶性成分,通过抗血小板聚集、抗血栓形成、改善微循环、抗氧化损伤等多途径发挥其对缺血性疾病的治疗作用^[8,9]。本研究通过观察丹参多酚酸盐对 AGE 引起的 EPCs 功能障碍的修复作用并探讨其中可能的分子机制,进一步阐明丹参多酚酸盐对缺血性疾病防治的作用机制。

材料与方法

1 材料

1.1 标本 本研究遵守 2000 年《赫尔辛基宣言》相关伦理规定,研究前向每名被收集标本对象充分解释本研究的风险及意义,并签署知情同意书。本实验的研究方案得到南京大学医学院伦理委员会批准,并遵守该委员会相应规定。脐血标本均来自南京大学医学院附属鼓楼医院产科 24~29 岁健康产妇,排除有妊娠期高血压、妊娠期糖尿病以及其他代谢性疾病。取足月健康分娩的新生儿脐血 20 份,每份 50~100 mL,1 mL 全血以 50 U 普通肝素钠抗凝。

1.2 药物 注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷集团产品,批号 20071004),终浓度 0.1、1.0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,实验时新鲜配制。

1.3 主要试剂及仪器 牛血清白蛋白(BSA, low endotoxin, Merck);明胶、人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque 1077)、FITC-荆豆凝集素-1(UEA-1)、碘化丙啉(propidium iodide, PI),以上试剂均为 Sigma 公司产

品;内皮细胞基础培养液(endothelial cell basal medium-2, EBM-2)、完全培养液(EGM-2 MV Bulletkit), Clonetics 产品;胎牛血清(FBS), GIBCO 产品;小鼠抗人 vWF 单克隆抗体、ECMatrix-gel, Becton Dickinson 产品;DiI-乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, DiI-ac-LDL), Molecule Probe 产品;APC-Annexin V, Bender Medsystems 产品;Trizol, Invitrogen 产品;RNA PCR kit, TAKARA 产品;100 bp DNA ladder, 上海华美生物工程公司产品;小鼠抗人糖基化终产物受体(the receptor for AGE, RAGE)单克隆抗体(1:1000 稀释)、小鼠抗人内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)单克隆抗体(1:1000 稀释)、小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(1:4000 稀释,用作内参),以上单克隆抗体均为 Chemicon 产品;HRP-羊抗小鼠 IgG, Jackson Immuno Research 产品;增强的化学荧光素检测试剂盒, Pierce Biotechnology 产品;流式细胞仪(FACSCanto), Becton Dickinson 产品;凝胶成像系统, Phannacia Biotech 产品。

2 方法

2.1 晚期糖基化修饰白蛋白(AGE modified bovine serum albumin, AGE-albumin)制备 以 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液为溶剂,配制终浓度为 20 mg/mL BSA 和 50 mmol/L 葡萄糖的溶液,以不加葡萄糖的 20 mg/mL BSA 溶液作为阴性对照。在超净台内用 0.22 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 微孔滤膜过滤器过滤除菌后密封,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 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(PBS)充分透析 24 h (4 $^{\circ}\text{C}$),除去未结合的葡萄糖后,用 0.45 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 微孔滤膜过滤器过滤除菌,Bradford 法行蛋白定量,分装, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[10]。

2.2 晚期 EPCs 的分离、培养及鉴定 利用人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque 1077)对脐血标本行密度梯度离心,分离其中单个核细胞,用含 20% FBS 的 EGM-2 MV 培养液接种至明胶包被的无菌培养瓶中,细胞密度约 $10^7/\text{mL}$ 。48 h 后,收集未贴壁细胞,如前

法继续培养,以后每 3 天更换培养液 1 次,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。10~15 天时,收集培养瓶中贴壁生长的梭形细胞进行鉴定:(1)行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。(2)将细胞在含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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^[7]。

2.3 晚期 EPCs 凋亡、血管新生能力及相关蛋白的检测 实验分为单独加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-albumin 的 AGE 组;同时加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE-albumin 及 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹参多酚酸盐低、中、高剂量组;加入 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未经修饰白蛋白的对照组。

2.3.1 检测凋亡的晚期 EPCs 取第 3 代晚期 EPCs,按照实验分组在培养液中加入各种实验液后继续培养 24 h。收集漂浮及贴壁细胞,以 $1 \times \text{Annexin V}$ 结合缓冲液制成单细胞悬液,加入 APC-Annexin V 和 0.002% PI 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min,行流式细胞术检测每份样品中 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞的比例(每个样本计数 10^5 个细胞)。

2.3.2 晚期 EPCs 形成新生血管的能力 按照说明书要求配制 ECM arix-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 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中,30 min 后即可凝固。收集第 3 代 EPCs,以 EGM-2 MV(5% FBS)制备细胞浓度为 $10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液,按照实验分组在单细胞悬液中加入各种实验液,将单细胞悬液加在已凝固的 ECMatrix-gel 上继续培养 16 h。随机选取 6 个高倍视野(目镜 10 \times ,物镜 20 \times)拍照,以 Image-Pro Plus 图像分析系统(Version 5.0.1)进行图像分析,计算形成网状结构细胞面积占视野总面积的百分数。

2.4 晚期 EPCs 中 rage、enos mRNA 表达的检测 采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法。取第 3 代晚期 EPCs,按照实验分组在培养液中加入各种实验液后继续培养 24 h。胰酶消化收集细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 完整性。取 2 μg 总 RNA 根据 TAKARA 公司 RNA PCR kit 使用手册建立 10 μL 体系进行逆转录为 cDNA。建立 20 μL PCR 反应体系,混匀后进行扩增:预变性(94 $^{\circ}\text{C}$ \times 4 min) \rightarrow 变性(94 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 s) \rightarrow 退火 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s \rightarrow 重复 n 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min \rightarrow PCR 产物。各

目标基因引物序列及其产物长度、退火温度和循环数见表 1。将 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,以 100 bp DNA ladder 确定目标条带,以 Quantity One software (Bio-Rad)进行图像分析,计算目标条带与内参(管家基因 gapdh)条带灰度的比值。

表 1 引物序列及 PCR 条件

基因名	双向引物序列	产物长度 (bp)	Ta($^{\circ}\text{C}$) / 循环数
rage	5'-CTGGTGTCCCAATAAGG-3' 5'-AGGTCAGGGTTACGGTT-3'	372	58.5/38
enos	5'-GTTTGTCTGCGGCGATGT-3' 5'-GTGCGTATGCGGCTTGTC-3'	192	58.0/38
gapdh	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452	56.0/26

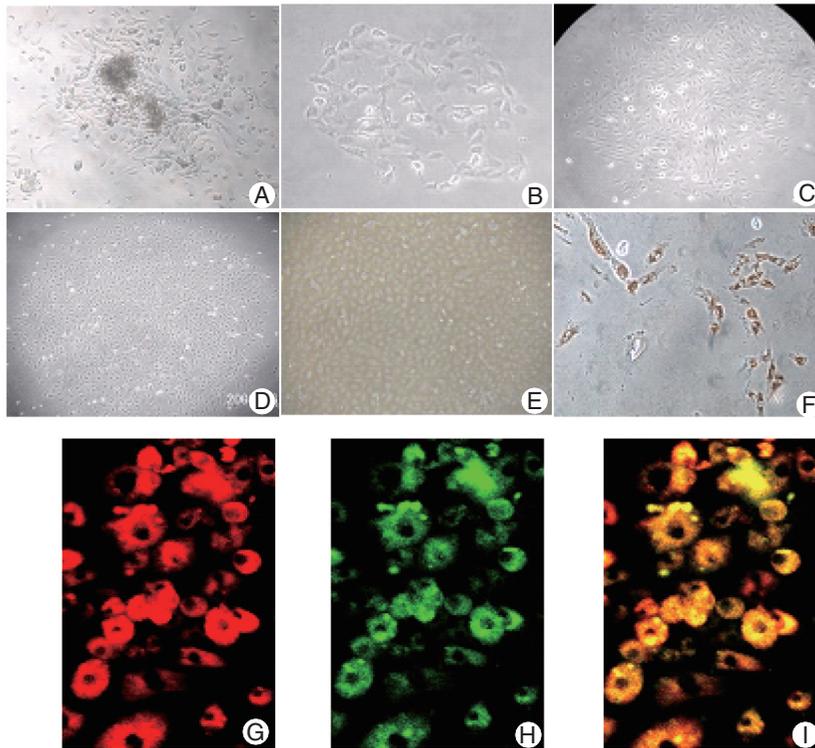
注:Ta 为退火温度

2.5 晚期 EPCs 中 RAGE、eNOS、Akt 蛋白表达的检测 采用 Western blot 法。取第 3 代晚期 EPCs,按照实验分组在培养液中加入各种实验液后继续培养 24 h。将细胞裂解提取总蛋白^[10]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 TBST 封闭 1 h,分别用抗 rage、eNOS、Akt 的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(稀释度在材料中已述),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。以 Quantity One software (Bio-Rad)进行图像分析,计算目标条带与内参(管家基因 GAPDH)条带灰度的比值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理。多组样本均值比较,先采用单因素方差分析(One-way ANOVA)证实存在组间差异后,行 Dunnett's *t* 检验进行各组均值之间的两两比较。

结 果

1 晚期 EPCs 的培养及鉴定 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),被称为“早期内皮祖细胞”。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,D),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,细胞免疫化学示细胞簇中大于 95% 的细胞胞浆内可见代表 vWF 阳性的棕褐色颗粒(图 1F)。几乎所有贴壁细胞具备摄取 DiI-ac-LDL 的能力,呈红色荧光(图 1G);并能与 FITC-UEA-1 结合,呈绿色荧光(图 1H);两者双阳性的细胞呈黄色(图 1I),为晚期 EPCs。



注：早期内皮祖细胞集落 (A)；晚期 EPCs 形成的细胞簇 (B-D)，其中的细胞呈铺路石样 (E)，表达 vWF (F)，同时具备摄取 DiI-ac-LDL (G) 和结合 FITC-UEA-1 (H) 的能力 (I)

图 1 晚期 EPCs 的特征及鉴定

2 丹参多酚酸盐对晚期 EPCs 凋亡的影响(表 1) 与对照组比较,AGE 组 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例显著增加($P < 0.01$)；丹参多酚酸盐 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,随着丹参多酚酸盐浓度的升高,Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例逐渐降低,1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,与 AGE 组比较,Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)；丹参多酚酸盐 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 丹参多酚酸盐对晚期 EPCs 形成新生血管的能力的影响(表 1) 与对照组比较,AGE 组网状结构面积/视野总面积明显降低($P < 0.01$)；丹参多酚酸盐 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,随着丹参多酚酸盐浓度的升高,网状结构面积/视野总面积逐渐增加,与 AGE 组比

表 1 各组晚期 EPCs 凋亡及形成新生血管能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Annexin V ⁺ /PI ⁻ 细胞比例 (%)	网状结构面积/视野总面积
对照	5	5.22 ± 1.95	0.36 ± 0.05
AGE	5	16.94 ± 5.18**	0.11 ± 0.03**
丹参多酚酸盐 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	15.20 ± 3.70**	0.26 ± 0.05* $\Delta\Delta$
1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	10.80 ± 1.30* Δ	0.31 ± 0.06 $\Delta\Delta$
10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	7.26 ± 1.27 $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.08 $\Delta\Delta$

注：与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ；与 AGE 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)；丹参多酚酸盐 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 丹参多酚酸盐对晚期 EPCs 中 rage 及 enos mRNA 表达的影响 与对照组比较,AGE 组 rage mRNA 表达明显升高,enos mRNA 表达减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)；丹参多酚酸盐 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,随着丹参多酚酸盐浓度的升高,rage mRNA 表达逐渐减少,enos mRNA 表达逐渐增加(图 2A)。1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,与 AGE 组比较,EPCs 中 rage mRNA 表达减少,enos mRNA 表达增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)；丹参多酚酸盐 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,EPCs 中 rage 及 enos mRNA 表达与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2B)。

5 丹参多酚酸盐对晚期 EPCs 中 RAGE、eNOS 及 Akt 蛋白表达的影响 与对照组比较,AGE 组 RAGE 表达升高,eNOS、Akt 表达减少($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)；丹参多酚酸盐 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,随着丹参多酚酸盐浓度的升高,RAGE 表达逐渐减少,eNOS、Akt 表达逐渐增加(图 3A)。1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与 AGE 组比较,EPCs 中 RAGE 表达明显减少,

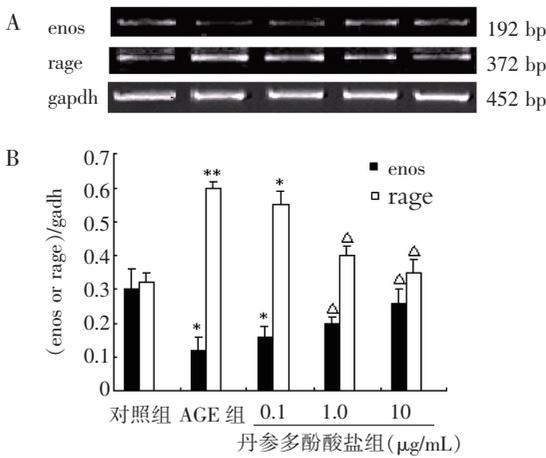
eNOS、Akt 表达明显增加,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);丹参多酚酸盐 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,EPCs 中 RAGE、eNOS 及 Akt 表达与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 3B)。

程^[11]。不论脐血或外周血来源的 EPCs 体外培养过程中均可先后出现 2 种 EPCs,分别被命名为早期 EPCs (early EPCs)和晚期 EPCs(late EPCs)。在血管新生的过程中,这两类细胞扮演着不同的角色^[12,13]。早期 EPCs 在体外培养体系中出现的时间较早(多在 14 天之内在培养体系中消失),在参与血管新生的过程中主要以分泌促进细胞生长的细胞因子如(VEGF 等)为主;晚期 EPCs 多在 48 h 以后贴壁,出现的时间较迟(多在原代培养 2 周以后),在参与血管新生的过程中主要以直接参与形成新生的血管样结构为主。高龄、高血压、糖尿病、高脂血症等均可引起 EPCs 数量和功能的减退,在临床实践中,我们不难发现这些人群中缺血性疾病的发生率及预后往往都较差。在这些人群体内,由于高龄、高血糖等原因导致糖基化速度加快,AGE 排泄减少,蓄积于体内。已有研究表明 AGE 对体外培养的 EPCs 数量和功能都存在不利影响^[7]。

丹参作为一种临床上应用广泛的中药,具有众多的药理作用,对包括冠心病在内的缺血性疾病有肯定的保护作用。丹参的有效成分是水溶性的酚酸类和脂溶性的二萜类化合物。丹参多酚酸盐是中药丹参提取物中最重要的水溶性成分,其主要成分丹参乙酸镁的含量超过 80%,其余为丹参乙酸镁的同系物,如紫草酸镁、紫草酸二钾等。既往对丹参多酚酸盐的研究主要集中在拮抗血小板活化、抗炎、抗氧化等方面,对于血管新生方面的研究报道较少。既往研究提示丹参及其提取物丹参多酚酸盐可能通过改善 EPCs 功能达到促进血管新生的作用,但其中的机制还不甚明了^[14]。本研究发现丹参多酚酸盐对 AGE 引起的 EPCs 功能障碍有修复作用,并探讨其中的分子机制。

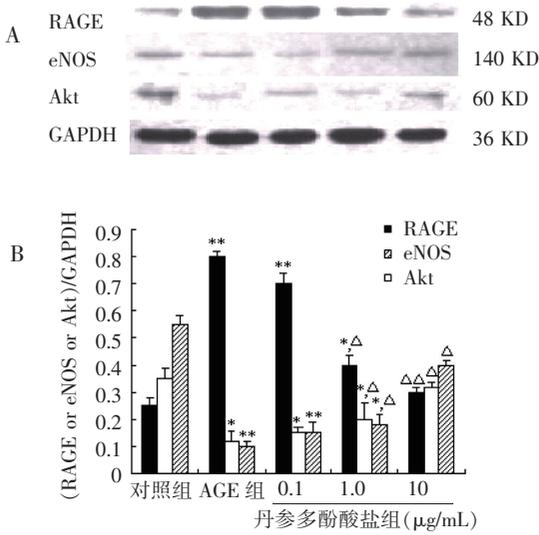
AGE 在体内主要通过形成交联、与受体相互作用后发挥多种生物学效应,目前认为后者在 AGE 引起的细胞功能障碍方面更为重要^[1]。目前已知 AGE 的受体有 RAGE、寡糖转移酶 48、80K-H 磷酸蛋白和半乳糖结合蛋白 3、I 型和 II 型清道夫受体 A、血管内皮细胞外源性凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1、CD36、清道夫受体 SR-B1 等。RAGE 是实现 AGE 产生影响细胞功能的细胞内信号的主要受体,其他受体则主要起清除和降低 AGE 细胞毒性的作用。

RAGE 在正常的组织和血管中表达量极少 (minimally),但当 AGE 与 RAGE 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 RAGE 基因的启动子,从而形成 AGEs



注:每组 $n=5$;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AGE 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 丹参多酚酸盐对内皮祖细胞中 rage 及 enos mRNA 表达的影响



注:每组 $n=5$;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AGE 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 3 丹参多酚酸盐对内皮祖细胞中 RAGE、eNOS 及 Akt 蛋白表达的影响

讨 论

外周血 EPCs 的发现改变了人们对出生后机体血管新生的观念。外周血 EPCs 可以在生理、病理因素刺激(如组织缺血、血管损伤)或药物作用下,由骨髓动员并释放到外周血后归巢到损伤或缺血部位,增殖、分化为成熟内皮细胞,参与缺血组织的血管新生过

/ RAGE / NF- κ B / RAGE 的正反馈机制,增加 RAGE 的表达^[15]。本研究中,晚期 EPCs 中可检测到 RAGE 的 mRNA 及蛋白表达,不过表达水平都很低;用高浓度的 AGE-albumin 与 EPCs 共培养后,RAGE 表达明显增加,这一结果提示在晚期 EPCs 中,AGE 与 RAGE 之间也存在一个配体促进受体表达的正反馈机制。

RAGE 激活后将触发一系列的细胞内信号传导过程,其中调节蛋白激酶 Akt 表达及磷酸化,进而调控 eNOS 的表达与活性,对内皮祖细胞的功能影响最为密切^[16]。本研究中,我们观察到随着丹参多酚酸盐浓度的增加,AGE 引起的 EPCs 中 eNOS 及 Akt 表达的下降被部分或全部纠正,这一机制可能参与了丹参多酚酸盐修复 AGE 引起的 EPCs 功能障碍。需完全证实这一通路,尚需进一步检测 eNOS 和 Akt 磷酸化水平、eNOS 活性并行该信号通路上相关蛋白的阻断。

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] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997;275(5302):964-967.
- [3] Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2003, 108(4):457-463.
- [4] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7):593-600.
- [5] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(9):2140-2146.
- [6] Scheubel RJ, Kahrstedt 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.
- [7] Chen Q, Dong L, Wang L, et al. Advanced glycation end products impair function of late endothelial progenitor cells through effects on protein kinase Akt and cyclooxygenase-2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(2):192-197.
- [8] 王稳,徐标. 丹参多酚酸盐对健康人血小板内皮型一氧化氮合酶活性的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(7):554-556.
Wang W, Xu B. Effects of depside salt from *salvia miltiorrhiza* on platelet endothelial nitric oxide synthase activity[J]. *Chin J Hypertens*, 2007, 15(7):554-556.
- [9] 徐杰,范维琥. 丹参多酚酸盐对人血管内皮细胞迁移的影响[J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(3):211-214.
Xu J, Fan WH. Effect of salvianolate on migration of human vascular endothelial cells[J]. *J Chin Integr Med*, 2003, 1(3):211-214.
- [10] Xu B, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products[J]. *FASEB*, 2003, 17(10):1289-1291.
- [11] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. *Circ Res*, 1999, 85(3):221-228.
- [12] 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.
- [13] 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 Biol Int*, 2006, 30(12):1018-1027.
- [14] 季亢挺,张怀勤,杨鹏麟,等. 复方丹参注射液对内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(3):246-249.
Ji KT, Zhang HQ, Yang PL, et al. Effects of compound *salvia* injection on number and activity of endothelial progenitor cells[J]. *China J Chin Mater Med*, 2006, 31(3):246-249.
- [15] 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):16498-16506.
- [16] Guo WX, Yang QD, Liu YH, et al. Palmitic and linoleic acids impair endothelial progenitor cells by inhibition of Akt/eNOS pathway[J]. *Arch Med Res*, 2008, 39(4):434-442.

(收稿:2009-12-02 修回:2010-03-15)