

γ- 分泌酶抑制剂对糖基化终产物作用下心肌微血管 内皮细胞的影响 *

蔺 杰 李 飞 刘 超 张荣庆 王海昌[△]

(第四军医大学西京医院心血管内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨 Notch 信号特异性阻断剂 γ- 分泌酶抑制剂(DAPT)对 AGEs 作用下的心肌微血管内皮细胞的增殖、迁移、管样结构的影响。方法 SD 大鼠心肌微血管内皮细胞体外分离培养后,以不同浓度 DAPT(0.25、0.5、1.0、5.0、10 μmol/L)干预 200mg/L AGEs 作用下的 CMECs 24h,或者与 DAPT(5 μmol/L)孵育不同时间(24h、48h、72h、96h、120h),采用 MTT 比色法检测细胞的增值能力,用 Transwell 法检测细胞的迁移能力,用毛细血管管样结构形成实验检测 DAPT 对血管新生的影响。结果 DAPT 显著抑制 AGEs 作用下的心肌微血管内皮细胞的存活,同时浓度越高、时间越长,其抑制效果越明显。结论 DAPT 通过阻断 Notch 信号通路,能抑制 AGEs 作用下的心肌微血管内皮细胞的增殖及血管新生,促进细胞凋亡。

关键词 AGEs 心肌微血管内皮细胞 DAPT Notch 管样结构

中图分类号 Q95-3 R543 R587.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)07-1229-04

The Effects of DAPT Under Advanced Glycation End Products on Microvascular Endothelial Cells*

LIN Jie, LI Fei, LIU Chao, ZHANG Rong-qing, WANG Hai-chang[△]

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of DAPT under the advanced glycation end products (AGEs) on proliferation, migration, angiogenesis and lumen formation of cardiac microvascular endothelial cells (CMECs). **Methods** CMECs isolated from the hearts of adult rats were exposed to hypoxia (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂). The cells were incubated with different concentrations (in μmol/L: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0) of DAPT for 24h, or incubated with DAPT (5 μmol/L) for 24h, 48h, 72h, 96h and 120h. The cell viability of CMECs was measured by MTT method and migration ability of CMECs was detected by Transwell method. Capillary lumen formation test was applied to detect the angiogenesis. **Results** The viability of CMECs depressed with DAPT incubation. **Conclusion** DAPT can interrupt the transduction of Notch signaling pathway in cardiac microvascular endothelial cells (CMECs) and inhibit the viability of the cells and increase their apoptosis.

Key words AGEs; CMECs; DAPT; Notch; Tube formation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R543, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1229-04

前言

糖尿病(Diabetes mellitus DM)是一种严重危害人类健康的疾病。研究认为,慢性高血糖引起体内各种糖基化蛋白的过量堆积,形成糖基化终产物(Advanced Glycation End-products, AGEs),它的增加是造成糖尿病血管病变的主要因素^[1]。研究证明,Notch 信号通路在心血管系统的发生、发育、病理和生理过程中发挥重要作用^[2],但其在出生后心血管系统中作用研究甚少。γ- 分泌酶抑制剂(DAPT)是 Notch 信号转导途径的特异性阻断剂,常用于 Notch 信号通路的研究,但 DAPT 本身对心肌微血管内皮细胞的影响还不清楚。研究观察了 DAPT 对 AGEs 作用下的 CMECs 活性的影响,同时确定 DAPT 浓度、作用时间与其效应的关系,为糖尿病心血管病变的治疗提供部分理论

基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

雄性 SD 大鼠,体重(110±5)g(第四军医大学实验动物中心)。DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);型胶原酶(美国 Invitrogen 公司);胰蛋白酶及基质胶(美国 Sigma 公司);牛血清白蛋白(BSA)及 D-葡萄糖(Roche 公司);CO₂ 培养箱(德国 HERAEUS 公司);高速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 AGEs 的制备 将 5 g BSA、9 g D-葡萄糖及 10 g/L 的青链霉素加入到 100 ml PBS 中,经 0.22 μm 微孔膜过滤除菌 2

* 基金项目 陕西省科学技术研究发展计划项目(2010K16-04-03)

作者简介 蔺杰(1985-),女,硕士生 E-mail jinjie1964@hotmail.com Tel :13571953789

△通讯作者 王海昌,主任医师,教授,主要从事冠心病的基础研究 E-mail wanghc@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-10-21 接受日期 2011-11-16)

遍后,置于37℃、50 ml/L CO₂ 恒温孵箱中避光作用90 d,同时设置无D-葡萄糖的BSA对照组^[9]。90 d后,将生成的棕色产物经透析除去未结合的葡萄糖,并测量其终浓度。本实验制备的AGEs-BSA经荧光分光光度计鉴定,其AGEs含量为98.6 kU/g,对照组为2.2 kU/g。

1.2.2 CMECs的分离培养和鉴定 取(110±5)g成年雄性大鼠,腹腔注射3 g/L戊巴比妥钠麻醉后,无菌条件下取大鼠心室置于含低分子肝素的PBS中,冲洗后浸泡于75%酒精中灭活20 S。以PBS冲洗3遍后,修剪除去心外膜,用弯剪剪碎心肌组织,加入0.2% Ⅱ型胶原酶,置于37℃水浴中消化5 min。再加入等体积的0.25%胰蛋白酶,于37℃水浴中消化5 min后加入等量的含10%胎牛血清的DMEM培养液中和。静置后小心吸走上清液离心(1000 r/min, 10 min),弃上清液,将细胞重悬于完全培养液(含20%胎牛血清的低糖DMEM培养液)中,接种于培养皿上,于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中恒温培养6 h。细胞贴壁后换液,培养至24 h再次换液,以后每2-3 d换液1次,约7~10 d即呈现典型的铺路石样生长的细胞。待细胞80%汇合后,用0.25%胰蛋白酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代,经组织分离及AcLDL染色阳性结果,确认实验所用为心肌微血管内皮细胞^[4],取第2-3代的细胞用于下一步实验。

1.2.3 不同浓度DAPT的处理 以0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化对数生长期的单层汇合细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养液重悬后,接种于96孔板内,接种密度为1×10⁴个细胞/每孔200 μl,于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中恒温培养,待贴壁后,每孔加入200 mg/L AGEs^[5],分别加入不同浓度的DAPT(μmol/L 0、0.25、0.5、1.0、5.0、10.0)。每种浓度分别设8个复孔(n=8)。将96孔板水平放置于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中继续培养24 h,在倒置显微镜下观察各组细胞生长状况。

1.2.4 DAPT不同处理时间对细胞的影响 用1.2.3观察出的对细胞影响较明显的浓度作为处理浓度,分别在24 h、48 h、72 h、96 h、120 h时间点收集细胞,记录结果。

1.2.5 MTT法检测细胞活性 各组细胞处理完后,每孔加入MTT溶液20 μl,37℃继续孵育4-6小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μl二甲基亚砷,震荡10 min使甲臞充分溶解。选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,实验重复3次。

1.2.6 Transwell法检测细胞迁移能力 选用孔径为8 μm的millecell小室,消化处于对数生长期的细胞并用无血清的低糖培养液重悬,调整细胞浓度至2×10⁵/L。将小室放入24孔板中,上室加入无血清的细胞悬液200 μl,下室分别加入浓度200 mg/L AGEs和10%胎牛血清的培养液,并以1.2.3所述不同浓度DAPT分别处理,于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中恒温孵育48 h。取出小室,吸弃培养液,以PBS洗涤3遍后,将细胞依次进行30 L戊二醛固定及结晶紫染色,用棉签轻柔擦去小室上层的细胞,于倒置显微镜下放大150倍取直径5个视野计数微孔膜下层的细胞,求平均值,每组3个小室,重复3次。

1.2.7 DAPT对血管新生的影响 采用管样结构形成实验^[6]。将基质胶按100 μl/孔均匀铺于24孔板的底部,置于37℃、相对湿度95%、50 ml/L CO₂ 孵箱中2 h使胶原凝固。取对数生长

期单层汇合95%的CMECs制备密度为5×10⁴个细胞/ml的悬液。将细胞悬液按100 μl/孔接种到预先铺有基质胶的24孔板内,于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱内6 h后,每孔分别加入200 mg/L AGEs,每组设4个复孔。轻轻晃动24孔板使孔内药物充分混匀,置于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中,待管样结构形成后,按实验分组加入不同浓度DAPT,置于37℃、50 ml/L CO₂ 孵箱中24 h后在倒置显微镜下观察结果。

1.3 统计学处理

所有数据采用SPSS14.0软件进行处理,结果以(Mean±SD)表示。组间均数比较采用t检验,P<0.05为显著性差异。

2 结果

2.1 细胞活性检测

MTT检测发现,不同浓度的DAPT(0、0.25、0.5、1.0、5.0、10 μmol/L)作用于细胞24 h后,细胞的增值能力明显减弱,OD值显著减少,分别为(0.5501±0.0144, 0.5375±0.0125, 0.5320±0.0800, 0.5193±0.0675, 0.5117±0.0176, 0.4967±0.0252)(P<0.05)(图1)。

MTT检测发现,相同浓度的DAPT(5 μmol/L)不同处理时间点对细胞增殖能力的影响是随着DAPT处理时间的延长,细胞活力被抑制程度也随之增加,OD值显著减少,分别为(0.5025±0.0490, 0.4701±0.0770, 0.4028±0.0497, 0.3521±0.0501, 0.2172±0.0827)(P<0.05)(图2)。

2.2 细胞迁移的Transwell法检测

Transwell小室迁移实验结果显示,不同浓度DAPT组(0.25、0.5、1.0、5.0、10 μmol/L)细胞数均明显低于对照组(0 μmol/L)(P<0.05)(图3)。

2.3 DAPT对血管新生的影响

管样结构形成实验的结果显示,随着浓度增高,DAPT对管样结构形成抑制越明显,且长度明显减少,分别为(5.482±0.820, 4.737±1.131, 3.761±0.356, 3.487±1.732, 3.240±0.701)mm²,与对照组(7.470±1.890)mm²比较,均可见明显统计学差异(P<0.05)(图4)。

3 讨论

近年来的心脏健康研究(CHS)和欧洲心力衰竭研究(HFS)调查结果显示糖尿病心肌病以其高发生率、高致死率的临床特点,已成为近30年来一种重要的疾病^[7]。糖尿病血管并发症的发病机制复杂,在众多可能的机制中,蛋白质非酶糖化越来越受到重视。AGEs是还原糖(如葡萄糖等)与蛋白质、氨基酸、肽等游离氨基酸,通过非酶糖基化反应(Maillard反应)生成稳定的聚合物^[8]。体内AGEs的不断累积与其心血管疾病的发生和发展密切相关^[9-10]。内皮细胞功能障碍是糖尿病血管病变的重点研究领域。AGEs可以通过直接效应和间接效应来发挥其生物学效应,引起生物学活性物质含量和作用的失衡,使内皮细胞增殖、胶原纤维增多、弹性纤维减少等,最终导致血管通透性增加、血液高凝状态、动脉顺应性降低和舒张功能减弱^[11-12]。研究证明,在心血管系统中,Notch信号中的受体或配体的突变或失活可引起多种先天性心脏畸形^[13]。Notch信号通路和PI3K/Akt、NF-κB等信号通路通过复杂的分子网络互相影响,而这些信号通路是心肌保护中已知的重要效应因子^[14-15]。血管

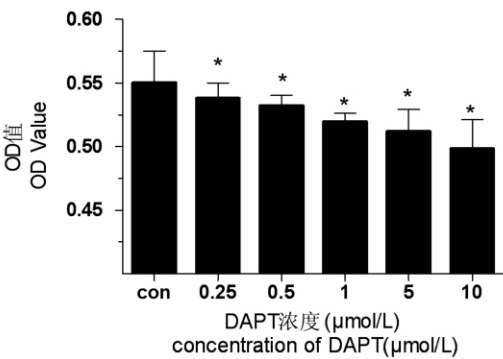


图 1 不同浓度 DAPT 作用 24h 后对各组细胞增值能力的影响
Fig.1 Effects of different concentration of DAPT on proliferation of cells after 24h

注 :* 与对照组相比 P<0.05
Note:*Compared with the control group, P<0.05

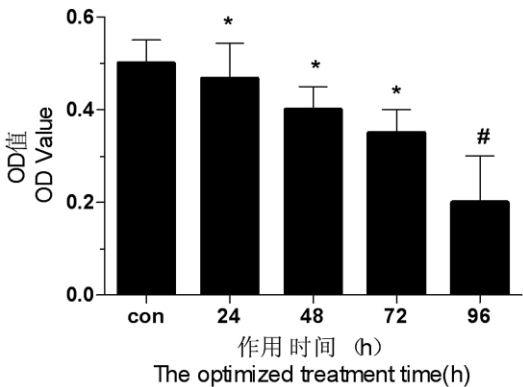


图 2 相同浓度 DAPT(5 μmol/L)不同处理时间对各组细胞活力的影响
Fig. 2 Effects of the same concentrations of DAPT(5 μ mol/L) on cells activity at different time points

注 :* 与对照组相比 P<0.05 # 与对照组相比 P<0.01
Note:*Compared with the control group, P<0.05; #Compared with the control group, P<0.01

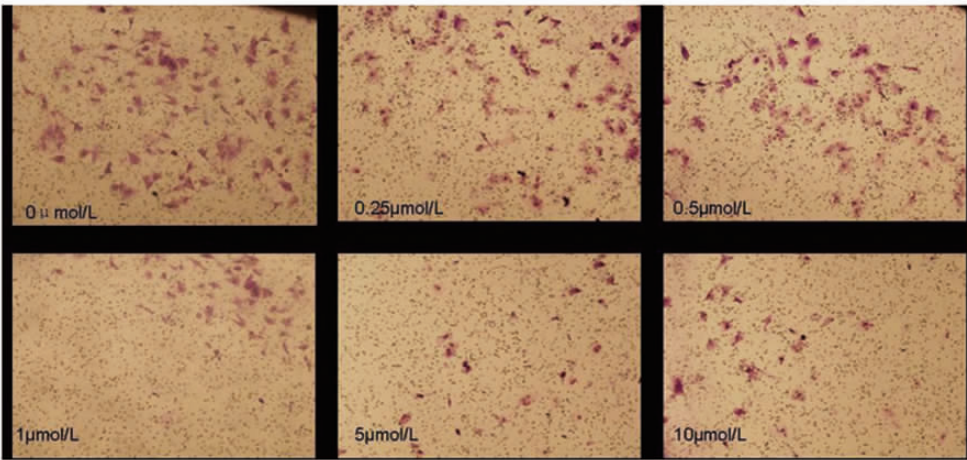


图 3 不同浓度 DAPT 对细胞迁移作用的影响
Fig.3 Effects of different concentrations of DAPT on cell migration

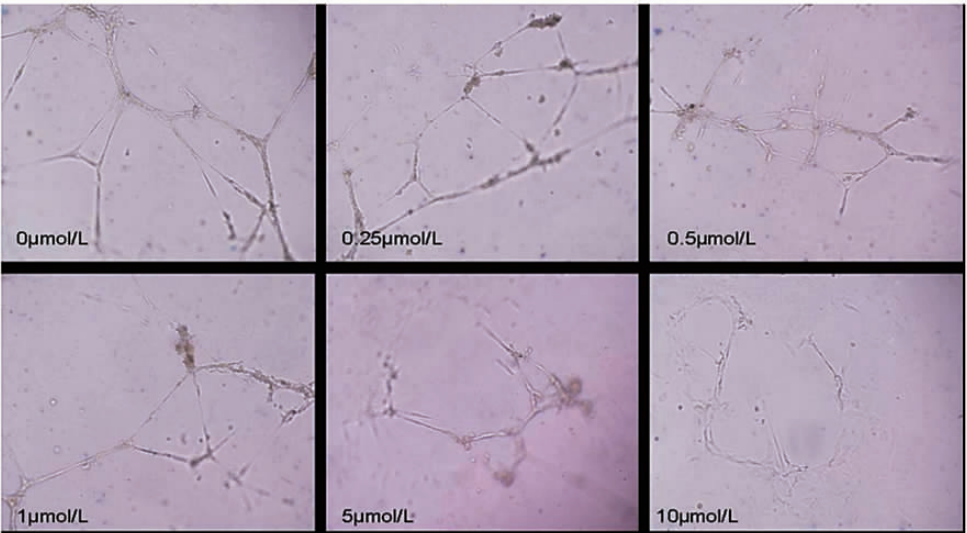


图 4 不同浓度 DAPT 对细胞管样结构形成的影响
Fig. 4 Effects of different concentrations of DAPT on tubule-like formation structure of cells

新生(angiogenesis)是指血管丛萌发和分支以形成复杂的血管网络的过程,即从现存的血管形成新血管,并得以广泛地重建^[16-17]。新生血管的形成和生长是组织修复、胚胎发育等许多发育问题的基本需要,它的异常与许多疾病密切相关,而血管新生不足则可导致冠状动脉硬化等疾病的出现。已有研究表明,Notch受体介导的信号转导途径参与了新生血管的形成^[18],而近年来一系列研究表明Notch受体与邻近细胞的Delta样配体4共同调节了该过程^[19]。DAPT作为Notch信号通路的阻断剂,能够特异性阻断 γ -分泌酶的作用,从而阻止Notch信号通路的活化^[20]。

本研究主要探讨Notch信号通路特异性阻断剂DAPT对AGEs作用下的心肌微血管内皮细胞的影响,并确定其作用浓度、作用时间与效应关系。实验中我们用不同浓度和不同时间长度DAPT处理细胞,MTT实验表明DAPT可抑制AGEs作用下CMECs的存活,且具有浓度和时间依赖性;Transwell迁移实验检测结果表明DAPT处理细胞后,可有效阻断心肌细胞的Notch信号途径,并有促进凋亡的作用,管样结构形成实验表明随着DAPT浓度增高管样结构形成抑制越明显。

根据本实验研究的结果,将有助于对糖尿病中心肌微血管病变更进一步的认知,并为临床治疗提供实验的依据,同时我们推断Notch信号通路在出生后心肌存活及心肌保护中发挥重要作用,由于本实验没有在在体动物上进一步说明这一问题,这将是下一步实验中研究的目标。

参考文献(References)

- [1] Vlassara H. Recent progress in advanced glycation endproducts and diabetic complications[J]. Diabetes, 1997, 46(2): S19-S25
- [2] Nemir M, Pedrazzini T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(4): 495-504
- [3] 杨启红,徐强,司良毅. 糖基化终产物对单核细胞源性巨噬细胞过氧化物酶体增殖物激活型受体7表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2008, 10(3): 214-217
Yang Qi-hong, Xu Qiang, Si Liang-yi. Advanced glycation end-products decreases THP-1 macrophages expression of peroxisome proliferator activated receptor- γ [J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2008, 10(3):214-217(In Chinese)
- [4] 尹志勇,魏丽萍,郝媛媛,等.LY333531对高糖所致心肌微血管内皮细胞通透性上调的拮抗作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25: 303-305
Yin Zhi-yong, Wei Li-ping, Hao Yuan-yuan, et al. Antagonism of LY333531 on high glucose induced permeability upregulation of cardiac microvascular endothelial cells [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2009, 25(4):303-305(In Chinese)
- [5] 粟妍晖,李飞,王东娟,等. AGEs通过SDF-1/CXCR4轴信号通路对心肌微血管内皮细胞血管新生的影响及机制[J]. 现代生物医学进

展, 2010, 07:1270-1272

- Su Yan-hui, Li Fei, Wang Dong-juan, et al. Effect of AGEs on microvascular endothelial-cells angiogenesis by SDF-1/CXCR4 axis signaling pathway [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 07: 1270-1272(In Chinese)
- [6] Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, et al. Current methods as saying angiogenesis in vitro and in vivo[J]. Int J Exp Pathol, 2004, 85 (5):233-248
- [7] Aneia A, Tang WH, Bansilal S, et al. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into pathogenesis, diagnostic challenges and therapeutic options[J]. Am J Med, 2008, 121(9):748-757
- [8] Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(10):973-978
- [9] Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis [J]. Curr Diab Rep, 2004, 4(1):31-36
- [10] Bucala R. Recent Progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation end product receptors [J]. Diabetes, 1996, 45: 65-66
- [11] Hayat SA, Patel B, Khattar RS, et al. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms, diagnosis and treatment [J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107: 539-557
- [12] Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products and diabetic foot disease[J]. Diabet Metab Res Rev, 2008, 24(1): S19-S24
- [13] Niessen K, Karsan A. Notch signaling in the developing cardiovascular system[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293: C1-C11
- [14] Liu Z, Li Y, Kong Q, et al. Immunohistochemical profiling of Wnt, NF- κ B, Stat3 and Notch signaling in human epidermal tumors [J]. J Dermatol Sci, 2008, 52(2):133-136
- [15] Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, et al. An essential role for NF- κ B in the cardioadaptive response to ischemia [J]. Ann Thorac Surg, 1999, 68(2): 377-382
- [16] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis [J]. Nat Med, 2000, 6(4): 389-395
- [17] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance [J]. Science, 1997, 277(5322): 48-50
- [18] Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment [J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12(2):88-96
- [19] Hellstrom M, Phng Li-Kun, Hofmann JJ, et al. Dll4 signaling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis [J]. Nature, 2007, 445(7129): 776-780
- [20] Sastre M, Steiner H, Fuchs K, et al. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch [J]. EMBO Rep, 2001, 2(9): 835-841