维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)08-0830-05

高糖对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶及细胞周期的影响

彭 惠[1],洪苏玲[2],李平华[1],李 静[3],周 希[1],张 黎[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016;
3. 重庆医科大学组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨高浓度葡萄糖作用于脐静脉内皮细胞后,对脐静脉血管内皮细胞系的基质金属蛋白酶(MMP-2)表达、超微结构及细胞周期的影响,为阐明高血糖在糖尿病血管病变、糖尿病视网膜病变的早期发病中作用与机制提供依据。方法:在高浓度葡萄糖条件下培养人脐静脉内皮细胞,采用 RT-PCR、Western-blot 法检测细胞基质金属蛋白酶(MMP-2)mRNA 和蛋白表达情况、电镜观察超微结构及流式细胞仪检测细胞周期的变化。结果:高浓度葡萄糖可使内皮细胞 MMP-2 表达增加、细胞增生活跃,细胞出现肿胀,体积增大,细胞质溶解、核溶解,异染色质边集,内质网扩张,出现固缩线粒体、环形线粒体,髓样结构等改变。结论:高糖诱导的 MMP-2mRNA 和蛋白表达增加,可能在糖尿病视网膜病变的早期发病中起重要作用。

【关键词】血管内皮细胞;葡萄糖浓度;MMP-2;糖尿病视网膜病变
【中国图书分类法分类号】R774.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-04

Effects of high glucose concentration on MMP-2 expression and cell cycle in cultured human umbilical vein endothelial cells

PENG Hui, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To examine the effects of glucose on the expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2)and the changes of ultramicrostructure, cell cycle in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Methods*: Human umbilical vein endothelial cells(hUVEC)were incubated in a culture medium with 11.2mmol/L, 16.8mmol/L and 33.6mmol/L glucose concentrations for 24h, 48h, 72h respectively. The expression of MMP-2 was measured by RT-PCR and Western-blot. *Results*: When D-glucose concentrations rose, hUVEC exposed to high glucose concentration(11.2mmol/L, 16.8mmol/L and 33.6mmol/L)increased in cell expression of MMP-2 after 48 h and 72 h of exposure, as compared with those cultured in medium with a low glucose concentration (5.6mmol/L). And cell cycle changed too. *Conclusion*: High concentration of glucose can arrest the proliferative response and show that even a short-term exposure of endothelial cells(ECs)to high glucose concentration leads to their activation associated with increased expression of MMP-2 and that this effect may appear more significantly along with time of exposure to high concentration of glucose.

【Key words】 Vascular endothelial cell; Glucose concentrations; MMP-2; Diabetic retinopathy

糖尿病视网膜病变 (Diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最为常见和严重的并发症之一,也是糖尿病主要的致盲原因。糖尿病视网膜新生血管形成、细胞外基质(ECM,包括基底膜)的代谢异常被认为是发生 DR 时血管功能障碍的病理学基础。这一过程中, 基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMP)活化引起 ECM 的降解,被认为是新生血管形成及血管浸润的一个重要生物化学及细胞学调节因素。我们在高葡萄糖浓度条件下培养人脐静脉内皮细胞,观察细胞 MMP-2mRNA 和蛋白表达情况及细胞周期的变化。为 MMP-2 参与糖尿病视网膜病变的发病机制提供实验依据。

作者介绍:彭 惠(1967-),女,副教授,副主任医师,博士生,主要研究方向:眼底病。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 细胞培养 复苏后的人脐静脉血管内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) 放在 75cm² 的细胞培养瓶中,加入含有 10%新生牛血清、青霉素 100μg/ml、链

维普资讯 http://www.cqvip.com

霉素 100μg/ml 的 RPMI1640 低糖完全培养液,37℃ 5%CO_2 条件下培养,约 2～3 天细胞铺满 80%瓶底后,用 0.25%胰酶/0.5mol/l EDTA 液消化约 2 min 后传代。部分细胞继续传代培养,部分收集计数后加入细胞冻存液二甲亚砜(DMSO),-80℃冻存备用。

1.1.2 实验分组 对照组:正常生长内皮细胞,培养液葡萄糖浓度为 5.6mmol/L。实验组:分为 3 组,培养液葡萄糖浓度分别为 11.2、16.8、33.6mmol/L,各浓度组分别培养不同时间(24、48、72h)。

1.2 方 法

1.2.1 RT-PCR 法检测 MMP-2mRNA 表达 按照 Tripure 产品说明提取细胞总 RNA。1%甲醛凝胶电泳测定 RNA 的完整性。提取的 RNA 用紫外分光光度仪分别检测 260、280nm 吸光度,并求出 A_{260}/A_{280},结果示所提 RNA 比值在 1.8～2.0 之间,说明纯度符合要求。

MMP-2 上游:5'-TCTTGACCAGAATACCATCG' 和下游:5'-CACATCGCTCCAGACTTG-3',扩增片段长度为 199 bp;β-actin 上游:5'-GTGGGGCGCCCCGGCACCA-3' 和下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'扩增片段长度为 500 bp。先逆转录成 cDNA,反应条件:42℃60min;合成的 cDNA 用 β-actin 引物扩增作为内参照进行 MMP-2 的扩增,其反应条件:94℃预变性 5min;94℃变性 1min,49℃ 退火 50s,72℃延伸 50s,共进行 27 个循环;最后 72℃延伸 5min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,Bio-RAD 凝胶成像系统照相,SXimage 软件分析,以同一标本的 β-actin 校正作相对量分析。

1.2.2 MMP-2 蛋白表达的检测 取等量的细胞(5×10^5个)用磷酸缓冲液清洗后,经 RIPA 细胞裂解液(50mmol/L Tris·Cl (pH8.0),150mmol/L NaCl,0.02% NaN_3,0.1% SDS,1% NP-40,0.5%去氧胆酸钠,0.1mmol/L 钒酸钠,1mmol/L 氟化钠)裂解,之前加入蛋白酶抑制剂 400μmol/L PMSF 和 40μg/ml Leupeptin,提取细胞总蛋白,经考马斯亮蓝法定量。

MMP-2 表达量采用 Western-blot 法检测,取 40μg 总蛋白加入等量 2×上样缓冲液,100℃加热 5min。进行 SDS-PAGE,转膜后用 5%BSA 室温下封闭 2h、用 1:200 MMP-2 小鼠单克隆抗体 40℃孵育过夜,第二抗体为抗兔 HRP-IgG(1:5000),37℃孵育 1h,化学发光试剂显色,实验重复 3 次。结果经北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统,对目的条带进行密度分析,结果用积分光密度表示。

1.2.3 流式细胞仪检测 hUVEC 细胞周期的变化 取 10^5个/ml 浓度 hUVEC 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,待细胞回缩成单个细胞,加 PBS 终止消化,离心收集细胞,PBS 漂洗细胞后,加入 80%冷乙醇与细胞混匀,放在 -20℃冰箱过夜。用 TACSCalibur 型流式细胞仪检测。

1.2.4 人脐静脉内皮细胞超微结构的观察 用 0.25%胰蛋白酶消化使细胞脱落后,用 PBS 液清洗两遍,3000 r/min 离心 15min,使细胞沉淀结块;去上清液,用电镜固定液(2.5%戊二醛及 1%四氧锇酸)固定;常规脱水,包埋,超薄切片,醋酸铀－柠檬酸铅双染色,透射电镜观察超微结构变化并摄片。

1.3 统计学方法

本研究数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析进行统计学分析,$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度葡萄糖培养液作用不同时间对 MMP-2mRNA 的影响

细胞在不同培养时间与不同浓度的情况下,对照组与 3 个实验组相比,MMP-2mRNA 的表达随浓度和时间的增加有增加,除 24h 外,其余差异均有统计学意义($P<0.05$,表 1,图 1)。

2.2 不同浓度葡萄糖培养液作用不同时间对 MMP-2 蛋白表达的影响

细胞在不同培养时间与不同浓度的情况下,对照组与 3 个实验组相比,MMP-2 蛋白表达随浓度和时间的增加有增加,除 24h 外,其余差异有统计学意义($P<0.05$,表 2,图 2)。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期结果

暴露于高浓度葡萄糖,培养 24h 后细胞数量随浓度增加较对照组明显增加,增生活跃。继续暴露于高浓度葡萄糖 48h 和 72h 随浓度增加出现增生反应减慢(表 3)。

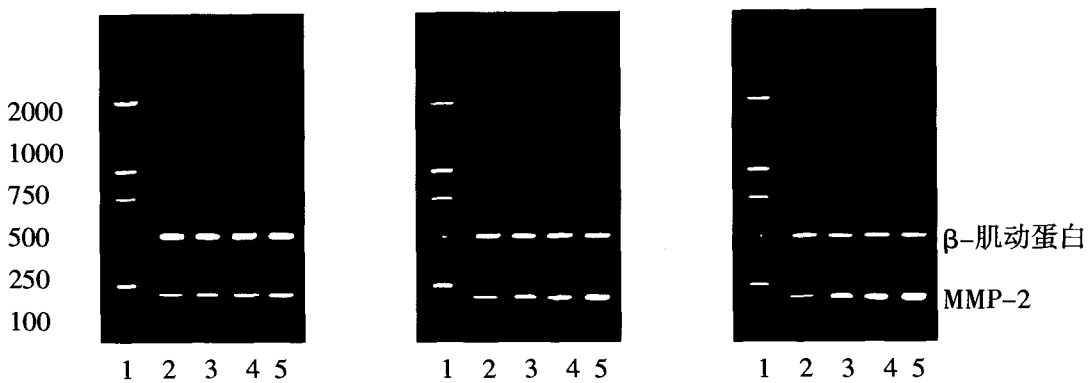
2.4 电镜观察细胞超微结构的改变

表 1 不同浓度葡萄糖作用不同时间对 MMP-2mRNA 的影响($\bar{x}\pm s$)

Group	24h	48h	72h
5.6mmol/l	0.382±0.029	0.577±0.103	0.568±0.034
11.2mmol/l	0.416±0.022	0.738±0.008*	1.214±0.021*
16.8mmol/l	0.452±0.030	0.835±0.016*	1.335±0.031*
33.6mmol/l	0.505±0.026	1.095±0.013*	1.707±0.031*

*$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com



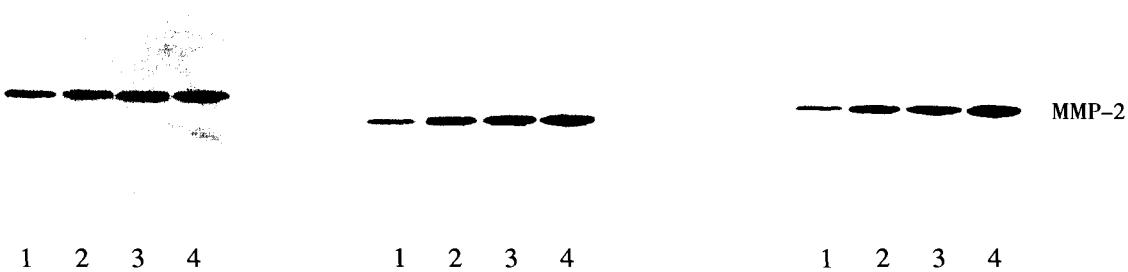
1. Marker 2. 5.6mmol/L Group 3. 11.2mmol/L Group 4. 16.8mmol/L Group 5. 33.6mmol/L Group

图 1 β-肌动蛋白、MMP-2 RT-PCR 产物电泳图 (Marker DL 2000)

表 2 不同浓度葡萄糖作用不同时间对 MMP-2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Group	24h	48h	72h
5.6mmol/l	0.278 ± 0.023	0.299 ± 0.018	0.296 ± 0.032
11.2mmol/l	0.306 ± 0.015	0.830 ± 0.021*	1.015 ± 0.023*
16.8mmol/l	0.408 ± 0.012	0.948 ± 0.022*	1.188 ± 0.018*
33.6mmol/l	0.495 ± 0.026	1.002 ± 0.035*	1.256 ± 0.030*

*P<0.05



1. 5.6mmol/L Group 2. 11.2mmol/L Group 3. 16.8mmol/L Group 4. 33.6mmol/L Group

图 2 各组 MMP-2 蛋白表达

表 3 流式细胞仪检测不同时间不同浓度组细胞周期 S 期结果(%)

Time\Concentration	5.6mmol/l	11.2mmol/l	16.8mmol/l	33.6mmol/l
	S 期			
24h	29.19	41.13	43.30	47.42
48h	31.67	32.61	34.25	35.51
72h	28.02	30.01	32.61	34.72

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞暴露于高浓度葡萄糖 11.2mmol/L、16.8mmol/L 和 33.6mmol/l 72h，细胞出现肿胀，体积增大，细胞质溶解、核溶解，异染色质边集，内质网扩张，出现固缩线粒体、环形线粒体，髓样结构等（图 3~6）。

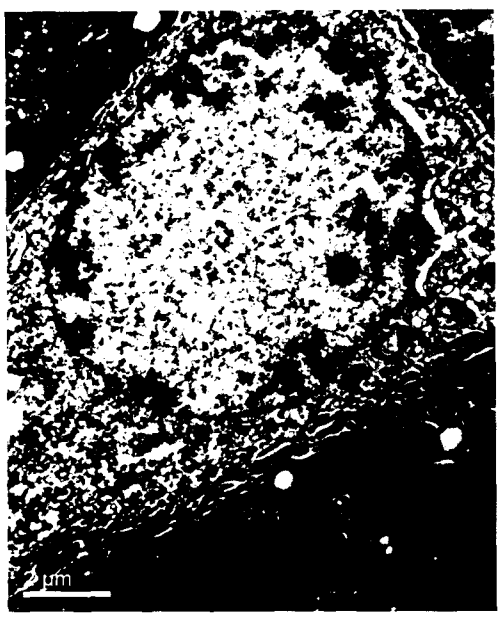


图 3 正常的 hUVEC 细胞×6000



图 4 细胞体积增大，可见环形线粒体×5000

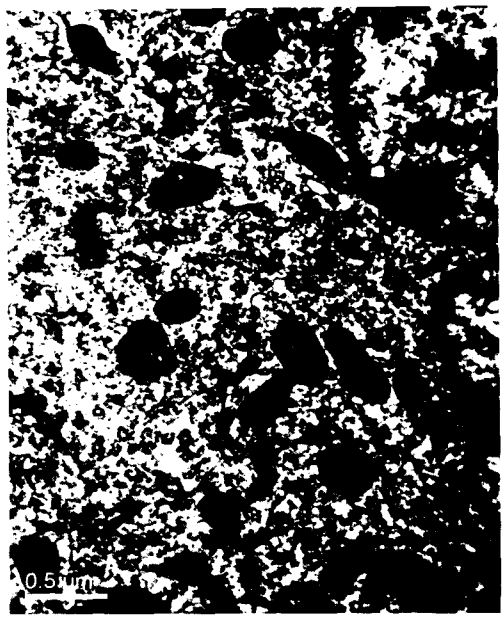


图 5 细胞质内可见固缩的线粒体×30000



图 6 细胞核肿胀、核溶解、细胞质溶解×8000

3 讨 论

糖尿病视网膜病变（DR）是糖尿病的常见并发症，也是主要致盲眼病之一，其特点是视网膜前新生血管和纤维血管膜的形成。目前，DR 的发病机制还不十分清楚。DR 的早期表现为选择性视网膜毛细血管周细胞丧失，视网膜内屏障的破坏，随后由于致血管生成因子的产生和细胞外基质（ECM）的

维普资讯 http://www.cqvip.com

合成,引起新生血管的形成。同时,视网膜组织在新生血管附近逐渐发生纤维增殖,最终导致视网膜前增殖膜的形成[1]。近年来,国内外对 DR 的发病机制进行了大量的研究,但都主要集中在对致血管形成因子的研究,对 ECM 在 DR 发病机制中所发挥的作用研究较少。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一组降解细胞外基质(ECM)的内源性蛋白酶系。MMP-2、MMP-9 是 MMPs 最主要的两个成员,能降解明胶、Ⅳ型胶原、Ⅴ型胶原、Ⅶ型胶原、纤维连接蛋白和弹性蛋白,在 ECM 降解和组织重建中起非常重要的作用[2]。已有研究表明,MMP-2、MMP-9 与肿瘤浸润、肝纤维化以及新生血管形成密切相关。目前,对 MMP-2 和 MMP-9 在 DR 纤维血管膜形成过程中是否发挥作用,尚不十分清楚。目前在玻璃体内和视网膜下液都发现多种 MMPs,这些 MMPs 的细胞来源尚不明了,玻璃体细胞有分泌这些 MMPs 的能力,但玻璃体切除术后的玻璃体腔内仍然发现有 MMPs 的存在[3]。Vaughan-Thomas A 等[4]分析尸体眼玻璃体 MMPs 的含量,发现"正常"玻璃体内不仅含有 MMP-2 ,也含有 MMP-9 前体,但不随着年龄的增加而增加。而 Plantner JJ 等[5]还在玻璃体内发现 MMP-3 以及 MMPs 的组织抑制因子(Tissue inhibitors of metalloproteinases,TIMPs),这些酶是玻璃体内源性 MMPs,为人眼玻璃体中最重要的胶原酶,对于在偶然损伤中的胶原重建起着"监视"作用。

糖尿病造成 DR 的病理原因是高血糖对微小血管的损伤,它使视网膜毛细血管的内皮细胞与周细胞受损,从而导致毛细血管失去正常的屏障功能,出现渗漏现象,造成周围组织水肿、出血,继而毛细血管的闭塞引起视网膜缺血,血供与营养缺乏,导致组织坏死及新生血管生长因子的释放及因之而产生的新生血管,从而将引起视网膜大量出血与玻璃体的大量积血,导致视网膜增殖性改变,甚至视网膜脱离,或并发白内障[6]。我们研究采用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)法、免疫印迹(Western-blot)法等分析了培养的血管内皮细胞中 MMP 随不同葡萄糖培养液浓度和时间的变化,细胞周期的变化情况及超微结构的改变。结果显示高浓度葡萄糖可使内皮细胞 MMP-2 表达增加、细胞增生活跃,细胞出现肿胀,体积增大,细胞质溶解、核溶解,异染色质边集,内质网扩张,出现固缩线粒体、环形线粒体,髓样结构等改变。此对于 MMPs 的进一步研究为早期诊治 DR 等微血管病变提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Itoh M,Omi H,Okouchi M,et al. The mechanisms of inhibitory actions of gliclazide on neutrophils-endothelial cells adhesion and surface expression of endothelial adhesion molecules mediated by a high glucose concentration[J]. J Diabetes Complications,2003;17(1):22-26.

[2] Visse R,Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases:structure,function and biochemistry[J]. Circ Res,2003;92(8):827-839.

[3] Sethi CS,Bailey TA,Luthert PJ,et al. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders[J]. Br J Ophthalmol,2000;84(6):654-666.

[4] Vaughan-Thomas A,Gilbert SJ,Duance VC. Elevated levels of proteolytic enzymes in the aging human vitreous[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000;41(11):3299-3304.

[5] Plantner JJ,Smine A,Quinn TA. Matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in human interphotoreceptor matrix and vitreous[J]. Curr Eye Res,1998;17(2):132-140.

[6] Raingeaud J,Gupta S,Rogers J,et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine[J]. J Biol Chem,1995;270(13):7420-7426.

(上接第 825 页)

suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB[J]. Nature, 2003;424:797-801.

[8] Damm-Welk C FUWWBA. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference[J]. Semin Cancer Biol,2003;13:283-292.

[9] Ge Q MMNTSCSPEHea. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003;100:2718-2723.

[10] Coburn GA CB. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference[J]. J Virol,2002;76:9225-9231.