

文章编号:1005-6947(2008)06-0560-06

· 基础研究 ·

糖尿病对大鼠自体移植静脉内膜增生的影响

王欣¹, 张强¹, 张成作², 张宏伟¹, 霍鑫¹

(1. 中国医科大学附属第一医院 干诊科, 辽宁 沈阳 110001; 2. 辽宁省抚顺市中心医院 外科, 辽宁 抚顺 113008)

摘要:目的 探讨 AGE-RAGE 系统对糖尿病大鼠自体移植静脉内膜增生的作用。方法 雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为糖尿病组及正常对照组。两组均建立自体静脉移植模型, 制模后的 7 d 和 14 d 测定血清 AGE 含量, 取自体静脉移植标本行组织形态学观察, 半定量 RT-PCR 检测 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 mRNA 的表达, Western 蛋白印迹和免疫组化方法检测 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白表达, 并用免疫组化方法检测 PCNA 的表达。结果 术后 7 d 及 14 d, 与对照组比较, 糖尿病组自体移植静脉内膜增生明显为重, PCNA, RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 mRNA 和蛋白表达均增强, 血清 AGE 含量增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 AGE-RAGE 系统激活 NF- κ B, 增强黏附分子的表达, 可能是糖尿病大鼠自体移植静脉内膜增生加重的原因。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(6):560-565]

关键词: 血管内膜; 增生; 晚期糖基化终产物; 移植物闭塞, 血管

中图分类号: R 654.4

文献标识码: A

The effect of diabetes mellitus on intimal hyperplasia in autogenous vein graft of rats

WANG Xin¹, ZHANG Qiang¹, ZHANG Chengzuo², ZHANG Hongwei¹, HUO Xin¹

(1. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Surgery, Fuhum Central Hospital, Fushun, Liaoning 113008, China)

Abstract: Objective To investigate the role of AGE-RAGE system on intimal hyperplasia in autogenous vein graft of diabetic rats. **Methods** The experiments were performed on 40 male Sprague-Dawley rats which divided into two groups: diabetes group and control group. Autogenous vein graft model was established in all rats. Specimens were harvested 7 days and 14 days after surgery for histological examination, and RAGE, NF- κ B p65 and VCAM-1 mRNA were measured by semi-quantitative reverse transcription-PCR. Western Blotting and immunohistochemistry were used to detect the protein expression of RAGE, NF- κ B p65 and VCAM-1. At the same time, the levels of serum AGE were tested. **Results** Compared with non-diabetic rats of control group, the intimal hyperplasia of vein graft in diabetic rats obviously increased ($P < 0.05$). At the same time, the mRNA and protein expression of RAGE, NF- κ B p65 and VCAM-1 obviously increased ($P < 0.05$), and the level of the serum AGE obviously increased ($P < 0.05$). **Conclusions** AGE-RAGE system activated NF- κ B and enhanced the expression of VCAM-1, which might be the cause of increased intimal hyperplasia in autogenous vein graft of diabetic rats.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6):560-565]

Key words: Tunica Intima; Hyperplasia; Advanced Glycation end Products; Graft Occlusion, Vascular

CLC number: R 654.4

Document code: A

收稿日期: 2008-02-13; 修订日期: 2008-04-27。

作者简介: 王欣, 男, 中国医科大学附属第一医院主治医师, 主要从事血管移植方面的研究。

通讯作者: 张强 E-mail: qzhang48@hotmail.com

糖尿病不仅是动脉粥样硬化的独立危险因素,而且对其重要的治疗手段——自体静脉移植术后的通畅率有较大的负面影响^[1-3]。晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)存在于血管内皮细胞和平滑肌细胞^[4],与其配体晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)结合后可损伤血管内皮细胞并促进平滑肌细胞增生。本实验通过动物模型研究 AGE-RAGE 系统在自体移植静脉内膜增生中所起的作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组与糖尿病动物模型的建立

雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180 ~ 220 g,由中国医科大学实验动物中心提供。将动物随机分为糖尿病组和正常对照组两组,每组 20 只。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自 Sigma 公司,将其溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配制为 1% 溶液(pH4.0 ~ 4.5),糖尿病组大鼠禁食 24h 后行单次腹腔注射(60 mg/kg),48 h 后血糖超过 16.7 mmol/L 为模型建立成功。16 只大鼠成模,其余大鼠死亡或建模未成功,剔除。对照组大鼠(20 只)同等条件下腹腔注射相应剂量柠檬酸缓冲液。两组大鼠继续饲养 2 周后建立静脉移植模型。

1.2 静脉移植模型的建立与标本收集

大鼠以 10% 水合氯醛 330 mg/kg 腹腔注射麻醉,在 SXP-1B 型显微镜(10 倍)下按照文献^[5]报道的方法,将右颈总静脉吻合于肾下腹主动脉之间。术后分笼饲养,自由进食饮水。两组大鼠分别于术后 7 d 和 14 d 取出移植静脉标本(糖尿病组各 8 只,对照组各 10 只),均置液氮冻存。每个标本一半用于组织形态学和免疫组化染色,一半用于蛋白印迹和逆转录-聚合酶链式反应检测。每只大鼠处死前取血 1 mL,测定血清 AGE 含量。

1.3 荧光分光光度法检测血清 AGE 含量

血液离心后,取上清液 0.2 mL,蒸馏水稀释至 2 mL,RF-5 000 型荧光分光光度计测定荧光值,激发光和发射光波长分别为 370 nm 和 440 nm。考马斯亮蓝法测定稀释液蛋白质浓度,计算每毫克蛋白质所含的 AGE 荧光单位,用 U/mg(蛋白)表示。

1.4 HE 染色和 Verhoeff 弹力纤维染色进行组织形态学观察

移植静脉标本置入 4% 中性甲醛中固定 24 h,

常规石蜡包埋,切片厚约 5 μm ,按照参考文献^[6]的方法行 HE 染色及 Verhoeff 弹力纤维染色。计算机图像分析系统采集图像。每个标本随机取 5 处不连续的位置,测量内膜厚度及内膜/中层厚度的值,取平均值。

1.5 免疫组化染色检测 RAGE,核因子 KappaB (NF- κ B) p65,血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达

抗 RAGE 多克隆抗体、抗 NF- κ B p65 多克隆抗体及抗 VCAM-1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;PCNA 单克隆抗体购自武汉博士德公司。切片经 3% 过氧化氢室温孵育,水洗,抗原热修复,按试剂盒说明书行常规 SP 法染色。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。400 倍光镜下随机取 5 个视野计数细胞,计算阳性细胞占总观察细胞的百分比,取平均值。

1.6 Western 蛋白印迹检测 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白表达

依据参考文献^[7]配制细胞裂解液。自体移植静脉标本经机械和超声匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温 12 000 r/min 离心 10 min,相对离心力(RCF)为 16 000g。考马斯亮蓝 G250 染色法测总蛋白质浓度,将各组浓度调到同一水平,制备 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶。每孔蛋白样品 100 μg ,电泳后通过半干式电转移仪将蛋白转到硝酸纤维素滤膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液(TBS)室温封闭 2 h,TBS 洗膜 2 次;加入一抗及二抗,用含 0.05% Tween20 的 Tris 缓冲液(TBST)洗膜 3 次后加入显色液,采用凝胶成像分析系统摄像分析。RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白表达结果用光密度值(A 值)表示。

1.7 半定量 RT-PCR 检测 RAGE, NF- κ B p65, VCAM-1 mRNA 表达

取液氮保存的标本加入 Trizol 液分离总 RNA,按试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。软件 Primer Premier 5.0 结合 GenBank 序列设计 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 引物。GAPDH 为内对照。序列如下:RAGE 上游引物 5'-ATGAGCAGAGCGGCTATTCC-3',下游引物 5'-CACGCTTCGGTCAGAGCTCA-3',产物长度 513 bp;NF- κ B p65 上游引物 5'-CAATGGACCAACTGAAC-3',下游引物 5'-TCCGCAATGGAGGAGAA-3',产物长度 657 bp;VCAM-1 上游引物 5'-CGGTCAT-

GGTCAAGTGTGG-3', 下游引物 5'-GAGATCCAGGG-GAGATGTCA-3', 产物长度 570 bp; GAPDH 上游引物 5'-GAGCTGAACGGGAAACTCAC-3', 下游引物 5'-GGTCTGGGATGGAAACTGTG-3', 产物长度 476 bp。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 2 min 后, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min; 循环 35 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳后溴化乙锭染色, 紫外灯下观察, 凝胶成像分析系统摄像。对各条带进行灰度分析, 计算各组 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 mRNA 与 GAPDH mRNA 光密度值的比值, 为该基因表达值。

1.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 统计软件中单因素方差分析进行组间比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血清 AGE 含量

静脉移植术后 7 d 及 14 d, 糖尿病组大鼠血清 AGE 含量分别为 $(31.4 \pm 5.2) \text{ U/mg (蛋白)}$ 及 $(38.5 \pm 6.5) \text{ U/mg (蛋白)}$, 显著高于对照组的

$(20.3 \pm 4.2) \text{ U/mg (蛋白)}$ 及 $(25.6 \pm 4.9) \text{ U/mg (蛋白)}$ (均 $P < 0.05$)。

2.2 组织形态学改变

两组大鼠自体移植静脉术后 7 d 及 14 d 均可见内膜增生。与对照组比较, 糖尿病组内膜增生均明显加重, 内膜厚度及内膜/中层厚度的值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组术后 7 d 的内膜厚度及内膜/中层与 14 d 相比, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 免疫组化染色结果

RAGE 阳性细胞胞浆及胞膜被染成棕褐色, NF- κ B p65 阳性细胞胞浆被染成棕黄色, VCAM-1 阳性细胞胞浆和胞膜被染成棕褐色, PCNA 阳性细胞胞核染成棕黄色。两组移植静脉内均可见上述阳性细胞, 主要位于增生内膜上。静脉移植术后 7 d 及 14 d, 与对照组相比, 糖尿病组 RAGE, NF- κ B p65, VCAM-1 及 PCNA 阳性细胞均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组大鼠的上述 4 指标两时段比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2) (图 1-8)。

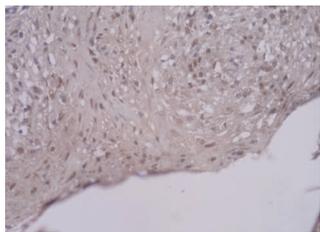


图 1 糖尿病组术后 14 d RAGE 的阳性表达 (SP $\times 400$)

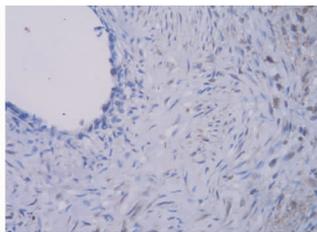


图 2 对照组术后 14 d RAGE 的阴性表达 (SP $\times 400$)

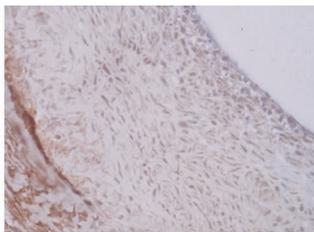


图 3 糖尿病组术后 14 d NF- κ B p65 的阳性表达 (SP $\times 400$)



图 4 对照组术后 14 d NF- κ B p65 的阳性表达 (较少) (SP $\times 400$)

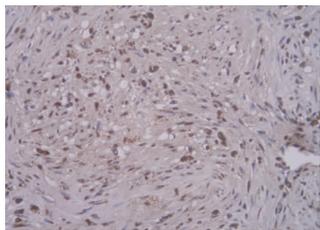


图 5 糖尿病组术后 14 d VCAM-1 的阳性表达 (SP $\times 400$)

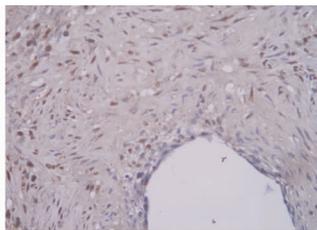


图 6 对照组术后 14 d VCAM-1 的阳性表达 (较少) (SP $\times 400$)



图 7 糖尿病组术后 14 d PCNA 的阳性表达 (SP $\times 400$)

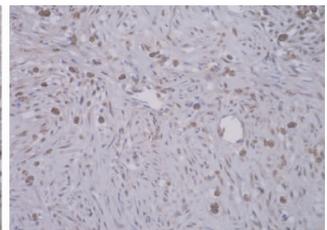


图 8 对照组术后 14 d PCNA 的阳性表达 (较少) (SP $\times 400$)

表1 两组大鼠移植静脉内膜厚度及内膜/中层厚度值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内膜厚度(μm)		内膜/中层厚度值	
		7 d	14 d	7 d	14 d
糖尿病	8	23.3 ± 4.6 ¹⁾	36.2 ± 7.4	1.24 ± 0.38 ¹⁾	1.88 ± 0.46
对照	10	14.6 ± 3.8 ¹⁾	30.1 ± 5.9	0.86 ± 0.30 ¹⁾	1.34 ± 0.33
P 值		0.000	0.007	0.015	0.011

注:1)与术后14 d相比, $P < 0.05$

表2 RAGE, NF- κ B p65, VCAM-1 及 PCNA 免疫组化检测结果(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	RAGE		NF- κ B p65		VCAM-1		PCNA	
		7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
糖尿病	8	20 ± 6 ¹⁾	24 ± 6	31 ± 10 ¹⁾	35 ± 14	13 ± 5 ¹⁾	21 ± 7	33 ± 7 ¹⁾	40 ± 8
对照	10	3 ± 1 ¹⁾	6 ± 2	17 ± 6 ¹⁾	23 ± 7	7 ± 3 ¹⁾	10 ± 4	17 ± 8 ¹⁾	28 ± 10
P 值		0.000	0.000	0.001	0.007	0.002	0.001	0.005	0.006

注:1)与术后14 d相比, $P < 0.05$

2.4 Western 蛋白印迹检测结果

静脉移植术后7 d及14 d,与对照组相比,糖尿病组 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白表达(光密度值)明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组大鼠的上述3指标两时段比较差异亦有有统计学意义($P < 0.05$)(表3)(图9)。

2.5 半定量 RT-PCR 检测结果

静脉移植术后7 d及14 d,与对照组相比,糖尿病组 RAGE mRNA, NF- κ B p65 mRNA 及 VCAM-1 mRNA 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组大鼠的上述3指标两时段比较差异亦有有统计学意义($P < 0.05$)(表4)(图10)。

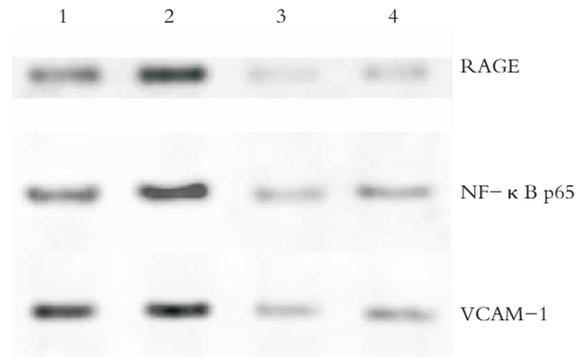


图9 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白印迹结果
1:糖尿病组术后7 d; 2:糖尿病组术后14 d;
3:对照组术后7 d; 4:对照组术后14 d

表3 RAGE, NF- κ B p65 及 VCAM-1 蛋白印迹检测结果($\times 10^3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	RAGE		NF- κ B p65		VCAM-1	
		7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
糖尿病	8	20.56 ± 12.14 ¹⁾	28.77 ± 8.53	44.35 ± 10.26 ¹⁾	59.23 ± 18.41	41.50 ± 13.26 ¹⁾	61.38 ± 17.47
对照	10	8.04 ± 2.20 ¹⁾	12.82 ± 2.78	19.34 ± 6.39 ¹⁾	22.17 ± 11.46	16.33 ± 10.09 ¹⁾	25.83 ± 11.98
P 值		0.005	0.001	0.003	0.000	0.001	0.001

注:1)与术后14 d相比, $P < 0.05$

表4 RAGE mRNA, NF- κ B p65 mRNA 及 VCAM-1 mRNA RT-PCR 检测结果(基因表达值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	RAGE		NF- κ B p65		VCAM-1	
		7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
糖尿病	8	0.51 ± 0.24 ¹⁾	0.78 ± 0.38	0.42 ± 0.24 ¹⁾	0.64 ± 0.26	0.36 ± 0.12 ¹⁾	0.58 ± 0.11
对照	10	0.33 ± 0.14 ¹⁾	0.42 ± 0.18	0.19 ± 0.09 ¹⁾	0.25 ± 0.11	0.16 ± 0.10 ¹⁾	0.28 ± 0.11
P 值		0.015	0.010	0.011	0.003	0.007	0.007

注:1)与术后14 d相比, $P < 0.05$

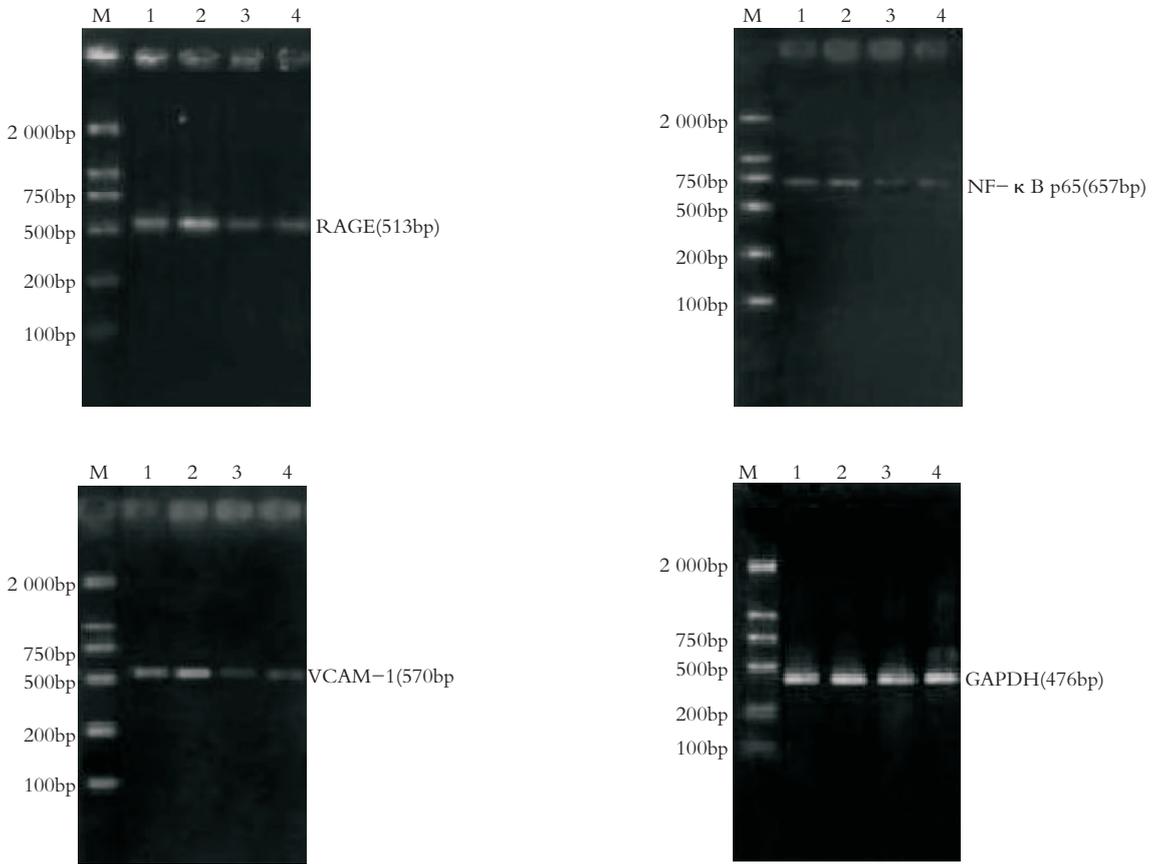


图10 RAGE mRNA, NF- κ B p65 mRNA 及 VCAM-1 mRNA RT-PCR 扩增电泳图 M:Marker 1:糖尿病组术后 7 d; 2:糖尿病组术后 14 d; 3:对照组术后 7 d; 4:对照组术后 14 d

3 讨论

动脉粥样硬化性疾病已经成为困扰中老年人的常见病。利用自体静脉行冠脉搭桥术或下肢动脉旁路移植术是目前治疗该病的重要手段。但由于移植静脉内膜增生引起的狭窄甚至闭塞导致手术远期疗效较差。糖尿病与动脉粥样硬化有着密切的关系,与非糖尿病人群相比,男性 2 型糖尿病患者患动脉粥样硬化危险性高 2 倍,女性高 2~4 倍^[8];不但如此,而且接受静脉移植术后,无论是冠脉搭桥术^[2]还是下肢动脉旁路移植术^[3],糖尿病患者的疗效均更差,其机制尚不明。

糖尿病所带来的一个重要代谢改变是 AGE 的形成。AGE 一旦形成,即不可逆,逐渐在体内蓄积^[9]。王培昌等^[10]发现健康人群中血清 AGE 含量与年龄增长呈正相关,糖尿病人群则显著高于健康人群。AGE 的形成是糖尿病最重要的病理生理改变,其与细胞表面特异性受体的相互作用是糖尿病并发症的重要原因^[11]。RAGE 是近年

来发现的一种细胞膜受体,属于免疫球蛋白超家族成员,由胞外段、跨膜段和胞内段 3 部分组成,包括 400 多个氨基酸,主要分布于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及巨噬细胞等细胞表面。RAGE 与其配体 AGE 结合可引起血管内皮损伤、血流动力学和血液流变学异常以及细胞基质异常增生等一系列病理改变^[12-14],其信号传导是通过 RAGE-p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)-NF- κ B-细胞因子通路来实现的,其中 NF- κ B 的激活是其信号传导过程中最重要的一环^[15]。胡新华等^[16-17]发现 p38 MAPK 和 NF- κ B 的激活均与自体移植静脉内膜增生关系密切。NF- κ B 是一种具有多向转录调节作用的蛋白质,其靶基因包括细胞黏附分子、趋化因子及生长因子等^[7]。它的激活不仅是 AGE-RAGE 在细胞内重要的信号传导途径,同时也增加了下游的黏附分子和细胞因子的表达,参与移植静脉内膜增生过程。

本实验采用 STZ 腹腔注射建立大鼠糖尿病模型,虽病死率略高,但成模确切。研究^[18]表明,正常血管仅表达少量 RAGE,而血管损伤可上调

RAGE 表达。本实验结果显示,自体静脉移植术后 7 d 和 14 d 移植静脉内膜增生即已较对照组明显为重。随着移植静脉 RAGE 表达的升高,其 NF- κ B p65, VCAM-1 的表达也升高,同时 PCNA 表达增加、内膜增生加重。推测 AGE-RAGE 系统有可能是糖尿病大鼠移植静脉内膜增生加重的原因。随着临床上接受静脉移植手术的糖尿病患者增多,阻断 AGE-RAGE 可能成为提高移植血管通畅率的一个重要治疗靶点。

参考文献:

- [1] Salzb erg SP, Filsoufi F, Anyanwu A, *et al.* Increased neointimal formation after surgical vein grafting in a murine model of type 2 diabetes [J]. *Circulation*, 2006, 114 (1 Suppl): 1302 - 307.
- [2] Ashfaq S, Ghazzal Z, Douglas JS, *et al.* Impact of diabetes on five-year outcomes after vein graft interventions performed prior to the drug-eluting stent era [J]. *J Invasive Cardiol*, 2006, 18 (3): 100 - 105.
- [3] Engelhardt M, Bruijnen H, Scharmer C, *et al.* Improvement of quality of life six months after infrageniculate bypass surgery: diabetic patients benefit less than non-diabetic patients [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006, 32 (2): 182 - 187.
- [4] Vlassara H, Bucala R, Striker L, *et al.* Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging [J]. *Lab Invest*, 1994, 70 (2): 138 - 151.
- [5] 刘程伟,胡新华,杨军,等. Egr-1, PDGF-B, TGF- β 1 在自体移植静脉中的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (12): 900 - 904.
- [6] 梁晓俐. 病理学基础与实验技术 [M]. 北京:军事医学科学出版社, 2004. 129 - 138.
- [7] Landry DB, Couper LL, Bryant SR, *et al.* Activation of the NF- κ B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury: induction of vascular cell adhesion molecular-1 and monocyte chemoattractant protein-1 [J]. *Am J Pathol*, 1997, 151 (4): 1085 - 1095.
- [8] Bloomgasden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999. More on cardiovascular disease [J]. *Diabetes Care*, 2000, 23 (6): 845 - 852.
- [9] Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (3): 233 - 238.
- [10] 王培昌,赵琪彦,张建. 北京健康人群 AGEs 水平测定及其增龄性变化的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2006, 6 (26): 725 - 726.
- [11] Stern DM, Yan SD, Yan SF, *et al.* Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes [J]. *Aging Res Rev*, 2002, 1 (1): 1 - 15.
- [12] Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SD, *et al.* Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration and inflammation [J]. *Glycobiology*, 2005, 15 (7): R16 - 28.
- [13] Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The RAGE axis and endothelial dysfunction: maladaptive roles in the diabetic vasculature and beyond [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15 (7): 237 - 243.
- [14] Bierhaus A, Humpert PM, Stern DM, *et al.* Advanced glycation end product receptor-mediated cellular dysfunction [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1043 (6): 676 - 680.
- [15] Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, *et al.* Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion [J]. *Diabetes*, 2001, 50 (6): 1495 - 1504.
- [16] 胡新华,杨军,杨德华,等. p38 MAPK 在自体移植静脉中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (1): 29 - 33.
- [17] 胡新华,张强,孙达欣,等. 核转录因子 κ B 及其抑制基因在自体移植静脉中的表达 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82 (22): 1546 - 1549.
- [18] Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, *et al.* Arterial restenosis: central role of RAGE-dependent neointimal expansion [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (7): 959 - 972.