

内分泌专题

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001730

人外周血晚期内皮祖细胞中的高糖记忆效应

唐 康, 张 敏, 周 波

(重庆医科大学附属第一医院内分泌内科、重庆医科大学附属第一医院脂糖代谢实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探索人外周血晚期内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是否存在高糖代谢记忆。**方法:**密度梯度离心法分离获取人外周血中的单个核细胞, 诱导培养 2 周时间待细胞呈现立体的鹅卵石状后, 即为晚期 EPCs, 采用细胞免疫化学染色对分离培养的细胞进行鉴定。MTT 比色法摸索出高糖作用的浓度和时间梯度后, 分 3 组处理细胞, 即正糖组(NG, 5.5 mmol/L D-葡萄糖 × 6 d), 高糖组(HG, 30 mmol/L D-葡萄糖 × 6 d), 记忆组(MG, 30 mmol/L D-葡萄糖 × 6 d + 5.55 mmol/L D-葡萄糖 × 6 d)处理细胞, 采用粘附实验、MTT 比色法、EdU 实验、Transwell 小室实验、成管实验, 测定 3 组细胞的粘附、增殖、迁移、成管功能。**结果:**粘附结果显示高糖组(38.296 ± 6.615)、记忆组(37.815 ± 6.196)均较正糖组(63.370 ± 10.363)粘附能力下降($P < 0.05$); MTT 结果显示高糖组(79.041 ± 19.678)、记忆组(81.524 ± 6.710)均较正糖组(100.000 ± 0.000)增殖能力下降($P < 0.05$); EdU 结果显示高糖组(45.809 ± 7.945)、记忆组(37.740 ± 8.206)均较正糖组(88.858 ± 5.727)增殖能力下降($P < 0.05$); 迁移结果显示高糖组(25.111 ± 6.051)、记忆组(25.778 ± 6.037)均较正糖组(64.889 ± 10.729)迁移能力下降($P < 0.05$); 成管结果显示高糖组(12.690 ± 3.616)、记忆组(14.198 ± 4.073)均较正糖组(64.407 ± 6.358)成管能力下降($P < 0.05$); 记忆组与高糖组相比, 粘附、增殖、迁移、成管功能均未能改善($P > 0.05$)。**结论:**晚期 EPCs 存在高糖代谢记忆。

【关键词】内皮祖细胞; 密度梯度离心法; 高糖; 代谢记忆

【中图分类号】R587.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-08-30

Hyperglycemia metabolic memory effect in late endothelial progenitor cells from human peripheral blood

Tang Kang, Zhang Min, Zhou Bo

(Department of Endocrinology; Laboratory of Lipid & Glucose Metabolism, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore whether there is a hyperglycemia metabolic memory in late endothelial progenitor cells(EPCs) from human peripheral blood. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were separated by density gradient centrifugation. Then PBMC was induced and cultivated for two weeks to late EPCs. Immunochemical staining was used to identify cultured cells. MTT was used to explore the gradient of concentration and time of high glucose. Cells were divided into three groups, namely: normal glucose group(NG, 5.5 mmol/L treatment for 6 d), high glucose group(HG, 30 mmol/L treatment for 6 d), hyperglycemia memory group(MG, 30 mmol/L treatment for 6 d then 5.5 mmol/L treatment for 6 d). Adhesion test, MTT, EdU experiments, Transwell chamber, angiopoiesis experiments were used to measure the ability of adhesion, proliferation, migration, tube formation respectively. **Results:** The adhesion results showed that the adhesion ability was lower in high glucose(38.296 ± 6.615) group and hyperglycemia memory group(37.815 ± 6.196) than in normal glucose group(63.370 ± 10.363) ($P < 0.05$). MTT analysis showed that the proliferation ability was lower in high glucose(79.041 ± 19.678) group and hyperglycemia memory group(81.524 ± 6.710) than in normal glucose group(100.000 ± 0.000) ($P < 0.05$). EdU analysis showed that the proliferation ability was lower in high glucose(45.809 ± 7.945) group and hyperglycemia memory group(37.740 ± 8.206) than in normal glucose group(88.858 ± 5.727) ($P < 0.05$). The migration results showed that the migration ability was lower in high glucose(25.111 ± 6.051) group and hyperglycemia memory group(25.778 ± 6.037) than in normal glucose group(64.889 ± 10.729) ($P < 0.05$). The tube formation results showed that the tube formation ability was lower in high glucose(12.690 ± 3.616) group and hyperglycemia memory group(14.198 ± 4.073) than in normal glucose group

(64.407 ± 6.358) ($P < 0.05$). Compared with those of high glucose group, the adhesion, proliferation, migration, tube formation of hyperglycemia memory group was still not improved ($P > 0.05$).

Conclusion: Late EPCs exist hyperglycemia metabolic memory.

【Key words】endothelial progenitor cells; density gradient centrifugation; hyperglycemia; metabolic memory

作者介绍: 唐 康, Email: 371916533@qq.com,

研究方向: 糖尿病血管病变的研究与治疗。

通信作者: 周 波, Email: zhoubo915@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81370940)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.0950.024.html>

(2018-05-22)

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)是一类起源于骨髓,在循环血中少量存在,并能够在外周血中增殖分化成为早期、晚期 EPCs,进而成熟为血管内皮细胞的内皮前体细胞^[1-2]。研究已证实内皮功能紊乱是糖尿病血管病变发生发展的始动因素,而高糖环境引起的 EPCs 生物学行为变化所介导的内皮细胞修复能力下降,则是该病理生理过程的关键环节^[3]。多项临床及本小组前期研究发现:既往暴露于高糖环境的器官、组织或靶细胞,即使后期葡萄糖水平趋于正常,但仍有较高的发生糖尿病血管细胞损伤、并发症形成或进展的风险^[4-6],此现象被称为高糖代谢记忆^[7],目前其机制尚未完全阐明。本文选择近年研究提示生物学活性更强的晚期 EPCs 为对象,体外构建高糖代谢记忆模型,从晚期 EPCs 的粘附、增殖、迁移、成管等功能入手,探究高糖对该类细胞的影响、是否存在高糖代谢记忆现象,为下一步糖尿病血管病变的细胞学治疗探索新思路。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人纤维连接蛋白购自 SIGMA 公司;EGM-2 全套培养基购自 LONZA 公司;人外周血淋巴细胞分离液、全血及组织稀释液购自中国天津灏洋公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自中国中杉公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-Ac-LDL)购自 Molecular Probes 公司;FITC 标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-1)购自 SIGMA 公司;鼠抗人 CD31、CD34、CD309 单克隆抗体均购自 BD 公司;鼠抗人 CD133 单克隆抗体购自 Mitenyi 生物公司;FITC 标记的羊抗鼠二抗、RBITC 标记的羊抗鼠二抗购自北京博奥森生物技术公司;D-葡萄糖购自 SIGMA 公司;MTT 试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司;EdU 细胞增殖检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司;Matrigel 胶购自 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离及培养 采志愿者肘静脉血 8 mL,肝素抗凝,密度梯度离心法分离获取单个核细胞,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,将细胞悬液种于包被有人纤维连接蛋白的 12 孔板中,置孵箱培养 4 d 后首次全量换液,以后每 3~4 d 换液 1 次。细胞培养至 14 d 左右时,镜下观察细胞呈立体的鹅卵石样形态,这时用 0.25% 的胰蛋白酶将贴壁细胞消化下来,传代后继续培养。

1.2.2 细胞鉴定 取传代后细胞进行该部分实验。

1.2.2.1 摄取 DiI-Ac-LDL、结合 FITC-UEA-1 能力检测 向传代后细胞培养板中加 10 μ g/mL 的 DiI-Ac-LDL,置孵箱内避光孵育 4 h 后吸弃染液,加 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min,PBS 漂洗 2 遍后加 10 μ g/mL 的 FITC-UEA-1,室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗 2 遍。倒置荧光显微镜下观察并计数双阳性的

细胞。

1.2.2.2 细胞表型检测 细胞免疫化学染色鉴定 CD31、CD34、CD133、CD309 等表面标志物的表达。将传代后细胞接种于预先放置有盖玻片的 12 孔板中,置孵箱中培养至细胞达到 80%左右的融合,4%多聚甲醛浸润爬片,4 $^{\circ}$ C 固定 30 min,PBS 漂洗 2 遍,室温下封闭 30 min。滴加抗体工作液,4 $^{\circ}$ C 过夜。CD31、CD309 为直接免疫荧光,孵育一抗过夜后,第 2 天加 DIPA 染核 10 min,封片后于倒置荧光显微镜下观察摄像;CD34、CD133 为间接免疫荧光,孵育一抗过夜后,第 2 天滴加二抗工作液,室温反应 30 min 后,DIPA 染核,封片后摄像。

1.2.3 MTT 摸索高糖作用的浓度和时间梯度 分别用 5.55、10、15、20、25、30、35 mmol/L 糖浓度培养基培养细胞 8 d 后行 MTT 实验。每个孔板内加入 50 μ L $1 \times$ MTT,置孵箱内孵育 4 h。吸尽孔板内上清液,每孔加入 150 μ L 二甲亚砜(DMSO),于微量振荡器充分震荡 10 min,测定各孔细胞吸光度(absorbance,A)值。选择高糖作用的最佳浓度后,用 30 mmol/L 糖浓度分组干预 0、2、4、6、8、10、12、14 d 后行 MTT 实验,测定不同干预时间下细胞 A 值,选择高糖作用的最佳时间。

1.2.4 分组处理细胞 正糖组 5.5 mmol/L D-葡萄糖处理细胞 6 d;高糖组 30 mmol/L D-葡萄糖处理细胞 6 d;记忆组 30 mmol/L D-葡萄糖处理细胞 6 d 后,换 5.55 mmol/L D-葡萄糖处理 6 d。

1.2.5 不同组细胞功能检测 按实验分组处理细胞后,消化、收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL。

1.2.5.1 粘附能力 将细胞悬液种于包被有人纤维连接蛋白的 24 孔板中,每组设置 3 个复孔。置孵箱内培养 30 min,每孔随机挑选 9 个视野($200 \times$),在显微镜下计数贴壁细胞。

1.2.5.2 增殖功能 ①MTT 法:将细胞悬液种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。置 37 $^{\circ}$ C 孵箱内孵育 24 h,使细胞贴壁。向孔板内加入 $1 \times$ MTT,置 37 $^{\circ}$ C 孵箱内孵育 4 h。吸尽孔板内上清液后加入 DMSO,室温下用平板床摇匀。选择酶标仪 490 nm 波长测定每孔的吸光度,得到各孔细胞的 A 值。②EdU 检测:将细胞悬液种于 96 孔板,置 37 $^{\circ}$ C 孵箱内孵育 24 h,使细胞贴壁。向孔板内加入 50 μ mol/L EdU 培养基室温孵育 2 h,PBS 清洗细胞后按顺序加入细胞固定液(孵育 30 min)、甘氨酸、渗透剂(摇床孵育 10 min),PBS 清洗细胞后加入 $1 \times$ Apollo 染色反应液,避光、室温孵育 30 min,加入渗透剂孵育 20 min 后用甲醇清洗 2 次。加入 $1 \times$ Hoechst33342 反应液避光、室温孵育 30 min 后用 PBS 清洗 2 次。荧光显微镜下观察、摄像并计数,其中 Hoechst33342 染料将细胞核染成蓝色,成功与 EdU 结合的细胞核则被染成红色。

1.2.5.3 迁移能力 按实验分组处理细胞后,消化、收集细胞,将各组细胞消化后重悬于含 10%胎牛血清的 1640 培养基内,调整细胞数量为 1×10^4 个/mL。向 24 孔板内加入 600 μ L EGM-2 培养基,将小室置于孔板中,并向小室内加入 400 μ L 细胞悬液,置孵箱内培养 24 h,取出小室,用棉签轻轻涂擦小室上表面的细胞,PBS 漂洗 1 遍后,4%多聚甲醛固定小室细胞 30 min。再用 30%甲紫蓝染色 10 min,PBS 漂洗 3 遍,镜下观察细胞迁移情况并计数、摄像,成功迁移至下室的细胞被

染成紫色。

1.2.5.4 成管能力 用不含胎血清的 EGM 培养基(4℃预冷)等体积稀释 Mtrigel 胶,向 24 孔板中加稀释后 Mtrigel 胶,置孵箱内孵育 30 min,待 Mtrigel 胶凝固后取出,向 Mtrigel 胶上加不同组别的细胞悬液,每孔 500 μ L,继续放入孵箱内培养,24 h 后观察细胞成管情况并摄像。细胞拉长、变形,长度为宽度的 4 倍及以上即认为形成小管。每孔随机挑选 5 个视野(200 $\times$),在显微镜下计数细胞成管数,并计算成管率^[9]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析,资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。高糖作用的浓度与时间梯度的确定及分组处理后 3 组细胞功能的比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较时采用 Turkey 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞培养

新分离获得的外周血单个核细胞呈亮圆形,如图 1A 所示。细胞培养 1 周时,长梭形细胞增多,如图 1B 所示。细胞培养至 2 周时,长梭形细胞数量减少,细胞呈现立体的鹅卵石样形态,如图 1C 所示,该种形态的细胞增殖能力旺盛。传代后细胞形态体积高度一致,呈立体的鹅卵石样,并呈集落式生长,如图 1D 所示。

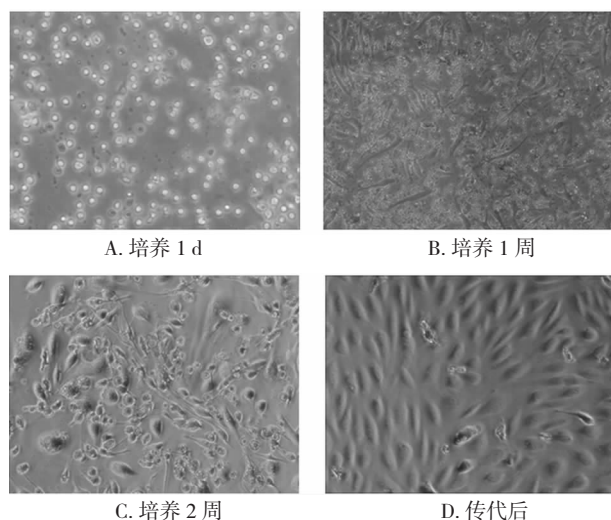


图 1 内皮祖细胞体外培养形态变化图(200 $\times$)

Fig.1 Morphology variation of EPCs *in vitro* culture(200 $\times$)

2.2 细胞鉴定

传代后细胞经免疫荧光染色后,在倒置荧光显微镜下观察、摄像。摄取了 Dil-Ac-LDL 的细胞呈红色,结合了 FITC-UEA-1 的细胞呈绿色,同时结合了 Dil-Ac-LDL 和 FITC-UEA-1 的细胞呈橙色。倒置荧光显微镜下计数双阳性细胞>95%,如图 2 所示。

传代后细胞经免疫荧光染色后,在倒置荧光显微镜下观察、摄像(图 3)。蓝色为使用 DAPI 染出的细胞核。该结果提示此传代细胞既有内皮细胞的特性,又有干祖细胞的特性。

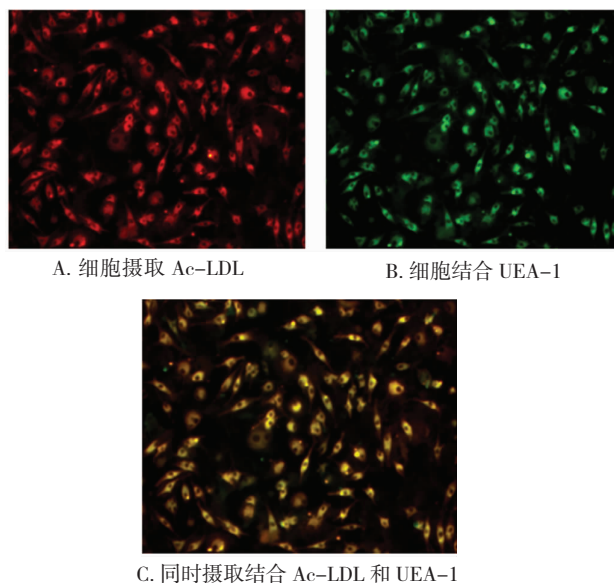


图 2 内皮祖细胞摄取 ac-LDL 和结合 UEA-1 荧光图(200 $\times$)

Fig.2 EPCs absorb ac-LDL and combine with UEA-1(200 $\times$)

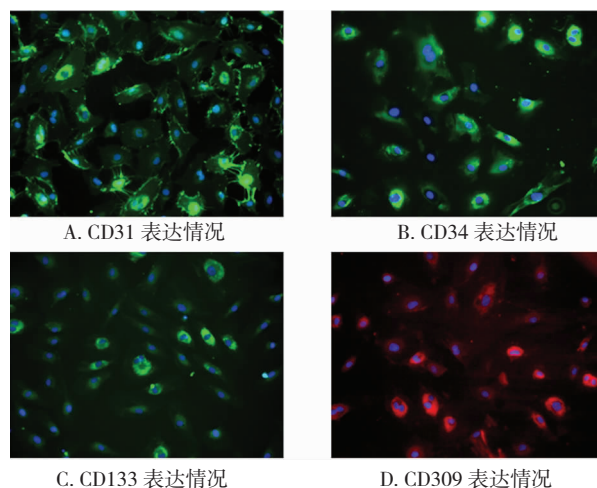


图 3 内皮祖细胞细胞表型鉴定(200 $\times$)

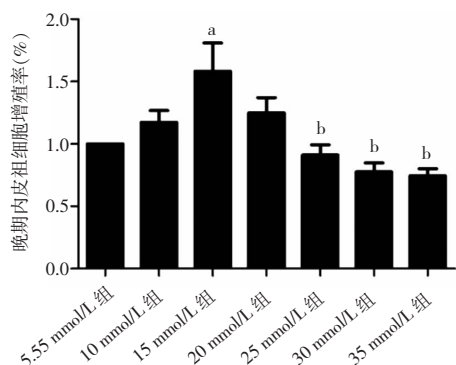
Fig.3 Phenotypic characterization of EPCs (200 $\times$)

2.3 高糖作用的浓度和时间梯度

在高糖环境下培养的第 8 天,与正糖培养基(5.55 mmol/L)相比,细胞在 15 mmol/L 糖浓度条件下增殖得到促进,差异具有统计学意义($P=0.014$);与峰值 15 mmol/L 糖浓度条件相比,细胞在 25 ($P=0.003$)、30 ($P=0.000$)、35 mmol/L ($P=0.000$)糖浓度条件下增殖受到抑制,差异均具有统计学意义(图 4)。其中在 30 mmol/L 糖浓度条件下增殖率基本达到平台,而 35 mmol/L 糖浓度对细胞增殖抑制更明显。由于 35 mmol/L 糖浓度条件下细胞可能会产生糖毒性,故本实验选择 30 mmol/L 糖浓度作为高糖干预实验的最适高糖浓度。

与未经高糖作用的细胞相比,30 mmol/L 糖浓度培养的第 2 和 4 天,细胞增殖得到促进;与峰值 30 mmol/L 糖浓度培养第 4 天相比,30 mmol/L 糖浓度培养的第 6 ($P=0.001$)、8 ($P=0.003$)、10 ($P=0.000$)、12 ($P=0.000$)、14 ($P=0.000$)天,细胞

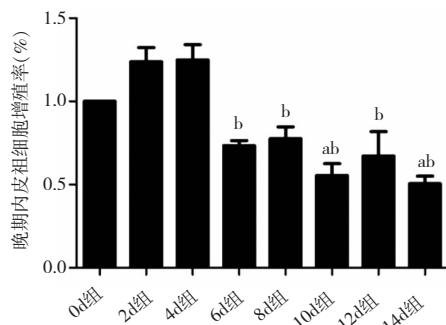
增殖均受到抑制,差异具有统计学意义(图 5)。由于在第 6 天时细胞增殖已有明显下降,故本实验选择 30 mmol/L 糖浓度干预 6 d 作为高糖干预的作用时间。



a: 与 5.55 mmol/L 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);
b: 与 15 mmol/L 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)

图 4 浓度梯度预实验

Fig.4 Experiment of concentration gradient of late EPCs



a: 与培养 0 d 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);
b: 与培养 4 d 组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)

图 5 时间梯度预实验

Fig.5 Experiment of time gradient of late EPCs

2.4 不同组细胞功能结果

2.4.1 不同组细胞粘附能力 由表 1 可见,高糖组和记忆组细胞粘附数与正糖组相比明显减少,差异具有统计学意义($P=0.000$)。记忆组与高糖组细胞粘附数相比,差异无统计学意义($P=0.973$)。

2.4.2 不同组细胞增殖能力 由表 1 可见,采用 MTT 比色法高糖组细胞增殖率较正糖组下降,差异具有统计学意义

($P=0.022$);记忆组细胞增殖率也较正糖组下降,差异具有统计学意义($P=0.044$);记忆组与高糖组细胞增殖率相比,差异无统计学意义($P=0.932$)。

荧光显微镜下观察不同组细胞在 EdU 标记后 DNA 染色的情况(图 6);其中 Hoechst33342 染料将细胞核染成蓝色,成功与 EdU 结合的细胞核则被染成红色。由表 1 可见,高糖组细胞增殖率较正糖组明显下降,差异具有统计学意义($P=0.001$);记忆组细胞增殖率也较正糖组明显下降,差异具有统计学意义($P=0.000$);记忆组与高糖组细胞增殖率相比,差异无统计学意义($P=0.426$)。

2.4.3 不同组细胞迁移能力 镜下观察不同组细胞在 Transwell 小室内的迁移情况(图 7),成功迁移至下室的细胞被染成紫色。由表 1 可见,高糖组和记忆组细胞迁移数较正糖组明显减少,差异具有统计学意义($P=0.000$);记忆组与高糖组细胞迁移数相比,差异无统计学意义($P=0.983$)。

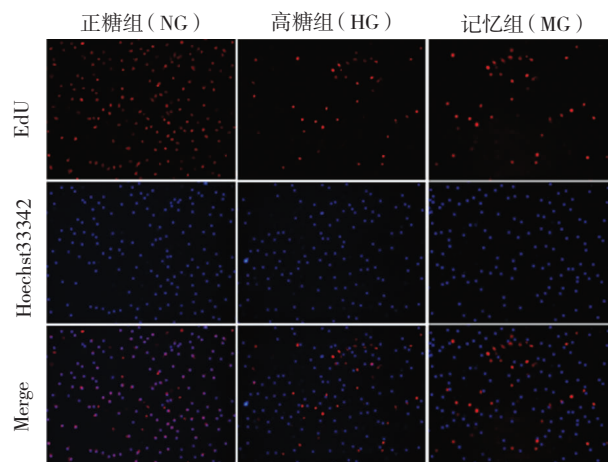


图 6 3 组细胞增殖情况(100×)

Fig.6 EdU result of three groups(100×)

2.4.4 不同组细胞成管能力 镜下观察不同组细胞在 Matrigel 胶上孵育 24 h 后的成管情况(图 8):正糖组细胞明显拉长变梭,首尾相接形成网状;高糖组与记忆组细胞变梭、拉长不明显,大多数细胞仍呈鹅卵石样,未形成首尾相接的网状。由表 1 可见,高糖组和记忆组细胞成管率较正糖组明显下降,差异具有统计学意义($P=0.000$);记忆组与高糖组细胞成管率相比,差异无统计学意义($P=0.876$)。

表 1 不同组细胞功能结果

Tab.1 Function results of different groups

组别	粘附 (n=9)	MTT (n=6)	EdU (n=3)	迁移 (n=9)	成管 (n=5)
正糖组 (NG)	63.370 ± 10.363	100.000 ± 0.000	88.858 ± 5.727	64.889 ± 10.729	64.407 ± 6.358
高糖组 (HG)	38.296 ± 6.615 ^a	79.041 ± 19.678 ^c	45.809 ± 7.945 ^f	25.111 ± 6.051 ⁱ	12.690 ± 3.616 ^k
记忆组 (MG)	37.815 ± 6.196 ^{ab}	81.524 ± 6.710 ^{ab}	37.740 ± 8.206 ^{ab}	25.778 ± 6.037 ^j	14.198 ± 4.073 ^{kl}
F 值	91.310	5.461	41.630	74.430	179.300
P 值	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000

注:a,与正糖组比较, $P=0.000$;b,与高糖组比较, $P=0.973$;c,与正糖组比较, $P=0.022$;d,与正糖组比较, $P=0.044$;e,与高糖组比较, $P=0.932$;f,与正糖组比较, $P=0.001$;g,与正糖组比较, $P=0.000$;h,与高糖组比较, $P=0.426$;i,与正糖组比较, $P=0.000$;j,与高糖组比较, $P=0.983$;k,与正糖组比较, $P=0.000$;l,与高糖组比较, $P=0.876$

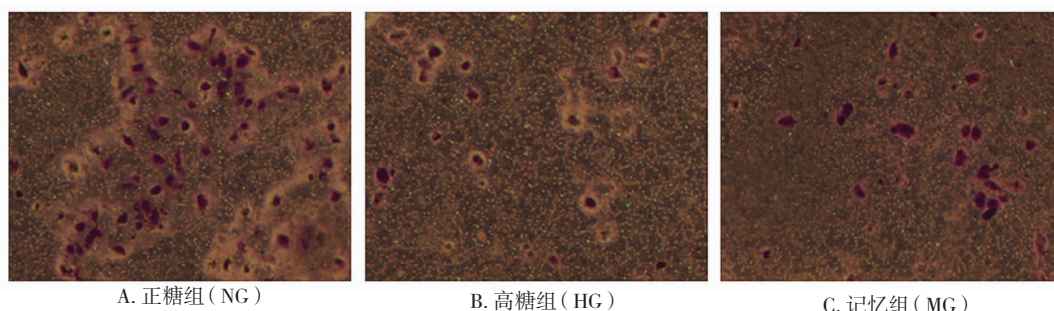


图 7 3 组细胞迁移情况(200×)

Fig.7 Migration result of three groups(200×)

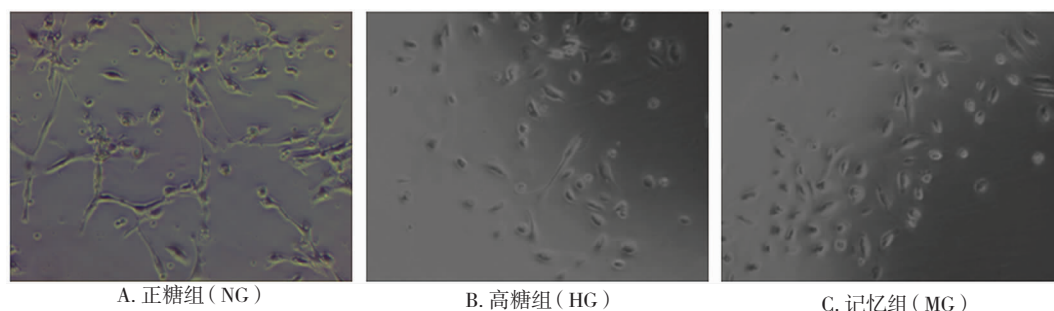


图 8 3 组细胞成管情况(200×)

Fig.8 Tube formation result of three groups(200×)

3 讨论

既往研究认为,短暂高血糖会抑制内皮细胞增殖,诱发血管内皮细胞的氧化应激,损伤血管内皮的舒张功能,增加内皮细胞的凋亡^[8-9]。即使去除高糖刺激后,细胞的氧化应激和增殖抑制作用仍会持续存在,血管内皮细胞存在高糖代谢记忆^[10]。提示代谢记忆效应参与糖尿病的血管内皮损伤,即使恢复正常血糖后,以上效应仍部分持续。而近年的研究显示,EPCs 功能受损和数量减少在糖尿病血管病变的发生发展中扮演着重要角色^[11]。

课题组在摸索高糖作用的浓度和时间梯度时发现,适度的葡萄糖浓度可以促进 EPCs 的增殖(本实验中在糖浓度为 10、15 mmol/L),而高浓度的葡萄糖会抑制细胞的增殖(本实验中在糖浓度为 30、35 mmol/L)。另外,在高糖作用早期(本实验为 30 mmol/L 糖浓度干预前 4 d),细胞的增殖得到促进。而在高糖作用晚期(本实验为 30 mmol/L 糖浓度干预的 6 d 及之后的时间),细胞的增殖受到抑制。显示晚期 EPCs 的增殖能力对高糖作用的浓度和时间呈双向反应。

同时,本研究还探索性地发现了人外周血晚期 EPCs 存在高糖代谢记忆现象,即在短暂的高糖作

用后,晚期 EPCs 的粘附、增殖、迁移、成管功能下降,且在后续高糖状态得到纠正后,细胞的这几项功能仍然得不到改善。这可能很好地补充了对如下现象的认识,即血糖控制情况较好的糖尿病患者,仍有较高的发生糖尿病血管并发症的风险,晚期 EPCs 的高糖代谢记忆现象,可能参与了糖尿病血管病变的发生和发展。

参 考 文 献

- [1] Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, et al. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(6): 660-668.
- [2] Ranjan AK, Kumar U, Hardikar AA, et al. Human blood vessel-derived endothelial progenitors for endothelialization of small diameter vascular prosthesis[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7718.
- [3] Nakamura N, Naruse K, Kobayashi Y, et al. High glucose impairs the proliferation and increases the apoptosis of endothelial progenitor cells by suppression of Akt[J]. J Diabetes Investig, 2011, 2(4): 262-270.
- [4] Dluhy RG, McMahon GT. Intensive glycemic control in the ACCORD and ADVANCE trials[J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2630-2633.
- [5] Yu XY, Geng YJ, Liang JL, et al. High levels of glucose induce "metabolic memory" in cardiomyocyte via epigenetic histone H3 lysine 9 methylation[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(9): 8891-8898.