

以促进成骨。诸多等研究表明 rhBMP-2 对骨延长有明显的促进新生骨形成作用^[10,11]。研究发现, rh-BMP-2 最佳局部浓度与动物种属级别正相关;犬类下颌骨最佳浓度约为人类下颌骨 1/2。由此可以推断,兔下颌骨的用量应该更少。根据本研究者测得,人体下颌骨体部的冠状截面积约为 $2.7\text{cm} \times 1.2\text{cm}$;兔本实验的截骨部位处截面积约为 $1.0\text{cm} \times 0.6\text{cm}$,为前者的 1/5.4。以此可以推断,兔局部下颌骨截骨处的 rhBMP-2 用量应该少于人的 1/10。本研究中骨延长的截骨间隙仅约 2mm,而且兔下颌骨体部短小,仅能容纳约 2.0mg 的 rhBMP-2 复合材料。该剂量约为厂商人体推荐用量的 1/10,而且也有研究证实 1.5mg 的 rhBMP-2 完全能促进新骨形成^[11]。因此,术中同期置入量是合理的。

Wurzler 等^[3]研究还发现在促进大鼠放射后颅骨缺损的修复时, rhBMP-2 剂量高效果较剂量低者好。在本部分研究中,两组的新生骨没有明显的差别。是 2.0mg rhBMP-2 不足以促进成骨? 或者是 rhBMP-2 本身对放射后骨延长新生骨的形成没有促进作用? 这尚需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Simon Y, Zarana SP, James DK, *et al.* Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9):2347-2362
- 2 Hamilton DK, Smith JS, Reames DL, *et al.* Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct for instrumented

- posterior arthrodesis in the occipital cervical region: an analysis of safety, efficacy, and dosing [J]. *J Craniovertebr Junction Spine*, 2010, 1(2):107-112
- 3 Wurzler KK, DeWeese TL, Sebald W, *et al.* Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Craniofac Surg*, 1998, 9(2):131-137
- 4 Li HW, Dai KR, Tang TT, *et al.* Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2 [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 356(4):836-842
- 5 郭勇, 张西正, 武继民, 等. 人骨形成蛋白 2 基因成骨诱导作用研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(7):579-581
- 6 孙健, 余优成, 顾章愉, 等. BMP-2 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨作用的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(4):26-31
- 7 Gerard KJ, Harvinder SS, James F. Bone morphogenetic proteins: applications in spinal surgery [J]. *HSS J*, 2005, 1(1):110-117
- 8 Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures [J]. *Biologics*, 2008, 2(3):345-354
- 9 Lssa JP, do Nascimento C, Iyomasa MM, *et al.* Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers [J]. *Micron*, 2008, 39(1):17-24
- 10 Norine A, René St-A, Dominique L, *et al.* Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(12):3190-3198
- 11 田璐鸣, 王稚英. 重组人骨形态发生蛋白 2 在下颌骨牵引成骨过程中的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15):2670-2674

(收稿:2011-09-22)

(修回:2011-10-27)

晚期糖基化终产物引起内皮细胞 connexin43 表达上调

章顺荣 高 越 封 菲 洪鸣鸣

摘 要 **目的** 研究晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 对体外培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白 (gap junction protein) connexin43 基因表达的影响。**方法** D-葡萄糖孵育牛血清白蛋白制备糖基化牛血清白蛋白作为晚期糖基化终产物。体外常规培养的人脐静脉内皮细胞分为 4 组, 分别为对照组, 100、200 和 400mg/L AGEs 干预组, 干预 24h 后通过 RT-PCR 方法检测各组 connexin43 基因 mRNA 的表达有无差别; 通过免疫荧光方法检测对照组和 200mg/L AGEs 干预组之间 connexin43 蛋白的表达水平有无差别。**结果** 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 干预 24h 均能引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 的表达上调 ($P < 0.01$); 200mg/L 的 AGEs 干预 24h 引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。**结论** AGEs 体外短期干预可引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的 mRNA 和蛋白表达水平上调。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2008B145)

作者单位: 310006 杭州市第一人民医院老年医学科

通讯作者: 高越, 电子信箱: gy9821@sina.com.cn

关键词 Connexin43 晚期糖基化终产物 人脐静脉内皮细胞 基因表达

Effect of Advanced Glycation End Products on The Expression of Connexin43 Gene in Cultured Human Umbilical Vein Endothelium Cells.

Zhang Shunrong, Gao Yue, Feng Fei, Hong Mingming. Department of Gerontology, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the effect of advanced glycation end products (AGEs) on the expression of gap junction protein Connexin43 gene in cultured human umbilical vein endothelium cells (HUVECs) *in vitro*. **Methods** Bovine serum albumin (BSA) was incubated with D-glucose to produce AGE-BSA. Human umbilical vein endothelial cells cultured in normal condition *in vitro* were divided into blank control group, 100, 200 and 400mg/L AGEs intervention groups respectively. 24 hours after AGEs was given, the mRNA expression of connexin43 gene of cultured HUVECs was detected with RT-PCR method. While the protein expression level of connexin43 gene was detected and compared with immunofluorescence method between the control and 200mg/L AGEs intervention groups. **Results** Different concentrations (100, 200, 400mg/L) of AGEs all can up-regulate the mRNA expression level of connexin43 gene in cultured HUVECs after 24 hours intervention ($P < 0.01$). Similarly, the protein expression level of connexin43 gene of HUVECs in the group intervened with 200mg/L AGEs for 24 hours was up-regulated as compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** AGEs may up-regulate the mRNA and protein expression level of connexin43 gene in cultured human vein endothelium cells within short time *in vitro*, indicating that connexin43 may play an important role in the pro-atherosclerotic effect of AGEs.

Key words Connexin43; Advanced glycation end products; Human umbilical vein endothelium cells; Gene expression

糖尿病常引起大小血管病变,大血管病变中最常见的是动脉粥样硬化,糖尿病是冠心病的等危症,然而糖尿病易患动脉粥样硬化的机制仍未完全明了。糖尿病血管并发症的发病机制中晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 起着重要作用,AGEs 可以通过多种机制促进动脉粥样硬化的发生发展^[1]。AGEs 能引起内皮细胞结构和功能异常,而后者在动脉粥样硬化的发病机制中起着关键作用。组成缝隙连接的蛋白亚单位称为 connexins,现已发现 20 种以上的 connexins 亚型,内皮细胞表面有 connexin37、40 和 43 的表达^[2]。connexins 在维持内皮整体功能协调中起着重要作用,研究表明 connexin43 的改变与内皮功能异常及动脉粥样硬化的发生发展相关^[3]。AGEs 是否可以通过影响内皮细胞 connexin43 表达而促进动脉粥样硬化的发生发展尚不明确。本研究对 AGEs 是否可影响体外培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelium cells, HUVECs) connexin43 的表达做一探索。

材料与方法

1. 材料:牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), D-葡萄糖, 1640 细胞培养液, 胰酶, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 和胎牛血清购自上海泽衡生物科技有限公司, 内皮细胞株购自南京凯基生物科技有限公司, Trizol 和 RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司, connexin43 和 GAPDH 引物对由上海泽衡生物科技有限公司合成, 兔抗人 connexin43 多克隆抗体购于 Abcam 公司 (Catalog Number ab62689), 荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体, 山羊血清, C 液购自北京中杉金桥生物科技有限公司, Triton X-100 购自上海生工生物工程有限公司, DAB 显色液购自福州迈新生物

技术开发有限公司。

2. AGEs 的制备: 0.5mol/L 的 D-葡萄糖和 50mg/ml 牛血清白蛋白溶解在 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 用 0.2 μ m 的滤器过滤除菌后置于 37℃ 恒温箱内避光孵育。90 天后取出, AGE-BSA 呈深黄色, 装入低分子量透析袋, 以 PBS 液充分透析 72h, 中途更换透析液 1~2 次以除去未结合的低分子物质。透析后用 0.2 μ m 的滤器过滤除菌后 -80℃ 保存。用荧光分光光度计检测 AGE-BSA 最大发射波长为 460nm, 最大激发波长为 360nm, 检测 AGE-BSA 的蛋白浓度为 50mg/ml。

3. 内皮细胞培养及 AGEs 的干预: 人脐静脉内皮细胞株接种于 6 孔板培养基, 常规传代, 待内皮细胞生长至约 80% 满后换液, 对照组继续以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养, 而另外 3 组则在 10% 胎牛血清的 1640 培养液中分别加入不同浓度的 AGEs, 使 AGEs 的终浓度分别为 100mg/L, 200mg/L, 400mg/L。继续培养 24h 后, 去除培养液, PBS 液冲洗后, 加入 Trizol 2ml, 提取各组的总 RNA, -20℃ 条件下保存。另两组内皮细胞按 2×10^4 /ml 浓度接种于含有载玻片的 6 孔板培养基, 分为对照组和 200mg/L AGEs 干预组, 待内皮细胞生长至铺满 80% 玻片后换液, 对照组继续以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养, 干预组则在培养液中加入终浓度为 200mg/L 的 AGEs, 继续培养 24h 后去除培养液, PBS 液冲洗后进行免疫荧光染色。

4. connexin43 基因 mRNA 表达水平的检测: 提取的各组 RNA 通过紫外分光光度计测定 260 和 280nm 处吸光度值, 计算 RNA 纯度和浓度。按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA, 再进行 PCR 扩增。Premier5.0 软件设计 PCR 引物对, connexin43 基因的 PCR 引物序列为 5'-GAGCGGATACAGAGGAG GA-3' (上游), 5'-CTCCACCCATCTACCCCATAC-3' (下游)。内参 GAPDH 的引物序列为: 5'-CGT-GAAAGATGTCGTGGAA-3' (上游), 5'-TGGAAGATGCTGA

TG GGAT-3' (下游)。connexin43 基因 PCR 扩增条件为: 95℃ 5min 1 循环, 之后 95℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 10min 1 循环, 产物长度为 383 次/分; 内参 GAPDH 基因 PCR 扩增条件为: 95℃ 5min 1 循环, 之后 95℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 32 个循环, 最后 72℃ 10min 1 循环, 产物长度为 223bp。PCR 反应体系为 20 μ l 体系。PCR 反应产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳判断结果, Bio RAD 成像系统拍摄照片用于分析。

5. connexin43 蛋白表达水平的检测: 主要步骤如下: ① PBS 清洗标本 3 次 各 1min; ② 4% 的多聚甲醛固定 20min; ③ 空气干燥 5min; ④ PBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑤ 0.5% Triton X-100 孵育 1 次 20min; ⑥ PBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑦ 3% H₂O₂ 孵育 15min, DPBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑧ 标本予以兔抗人 connexin43 多克隆抗体 (效价 1:200) 4℃ 孵育过夜; ⑨ PBS 液冲洗 4 次, 各 5min, 加入荧光标记的二抗, 室温孵育 30min; ⑩ PBS 液冲洗 4 次后 90% 甘油封片。最后在荧光显微镜下观察结果, 拍摄照片用于分析。

6. 统计学方法: 运用 ImageJ 1.43 图像分析软件对 mRNA 电泳图片和免疫细胞荧光染色图片进行灰度扫描半定量分析。运用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据统计分析。mRNA 电泳图片采用各组 connexin43 条带与其 GAPDH 条带的灰度比值作为统计变量, 采用 *t* 检验分析; 免疫细胞荧光染色图片以细胞灰度值作为统计变量, 采用 *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. AGEs 对内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 表达的影响: 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 干预 24h 后引起内皮细胞 connexin43 mRNA 的表达水平上调 (表 1 和图 1)。

表 1 不同浓度 AGEs 对 HUVECs connexin43 mRNA 表达的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	灰度比值
对照组	0.38 $\pm$ 0.024
100mg/L AGEs 干预组	0.94 $\pm$ 0.037 *
200mg/L AGEs 干预组	1.01 $\pm$ 0.034 *
400mg/L AGEs 干预组	0.92 $\pm$ 0.065 *

* 与对照组相比, $P < 0.01$

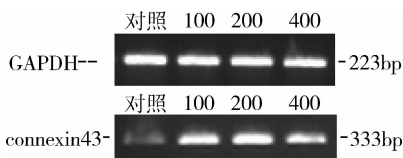


图 1 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 刺激后内皮细胞 connexin43 mRNA 表达水平

2. AGEs 对内皮细胞 connexin43 基因蛋白表达的

影响: 见图 2。对照组及 200mg/L 的 AGEs 干预组 24h 后 connexin43 灰度值分别为 64.28 ± 4.34 、 97.41 ± 6.80 。免疫荧光方法检测发现内皮细胞 connexin43 的蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$)。

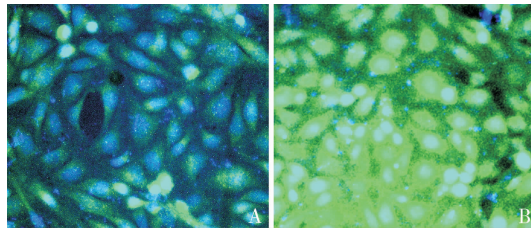


图 2 免疫荧光染色结果

A. 对照组, 内皮细胞表面和细胞质显示的绿色荧光较淡, 细胞核染色呈蓝色; B. 干预组, 200mg/L 的 AGEs 干预 24h, 内皮细胞外形与对照组相比未发现明显变化, 而内皮细胞表面和细胞质显示较强的绿色荧光染色, 提示 connexin43 蛋白表达增强

讨 论

糖尿病常引起全身大血管和小血管病变, 研究表明合并糖尿病的冠心病患者冠状动脉粥样硬化病变更严重、更弥漫, AGEs 在糖尿病血管病变的发生发展中起着关键的作用^[4]。AGEs 的形成先由还原葡萄糖的醛基或酮基与生物分子如蛋白质或脂质的游离氨基反应形成早期可逆产物碱, 再经分子内重排形成更稳定的产物进一步脱水和凝聚形成不可逆的终末产物, 呈棕黄色, 可发荧光, 糖尿病及慢性肾功能不全患者, 体内 AGEs 的积聚明显增加^[5]。AGEs 能通过多种途径促进动脉粥样硬化的发生发展。AGEs 刺激血管内皮细胞能增加诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达, 诱导内皮细胞表达内皮素-1、血管细胞黏附分子-1、细胞间黏附分子-1、E-选择素、组织因子、血栓素、白细胞介素 IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子, 以及 AGEs 受体 (RAGE) 等, 促使内皮细胞凋亡, 引起单核-吞噬细胞迁移, 吞噬脂质, 启动动脉粥样硬化的病理过程, 促进早期动脉粥样硬化斑块的形成^[6]。研究表明, 抑制糖尿病患者体内 AGEs 的形成能有效延缓动脉粥样硬化的进展^[7]。

近年来 connexin43 在动脉粥样硬化发病机制中的作用日益引起人们的重视^[8]。人类冠状动脉粥样硬化的早期, 其增厚的内膜中缝隙连接蛋白 connexin43 表达明显增强^[9]。Kwak 等^[10]研究表明通过 connexin43 基因半敲除的 LDL 受体基因缺陷的小鼠 (LDLR^{-/-} Cx43^{+/-}) 与 LDL 受体基因缺陷的带有正常 connexin43 基因的小鼠 (LDLR^{-/-} Cx43^{+/+}) 相比, 其 connexin43 蛋白表达减少, 喂养高胆固醇

饲料 14 周后其胸腹主动脉和主动根部动脉粥样病变比 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 减少 50% ($P < 0.01$), 且 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 小鼠粥样硬化斑块中含更少的炎症细胞, 有更厚的纤维帽, 含更多的胶原和平滑肌细胞。他汀类调脂药能减少血管内皮细胞 connexin43 的表达, 而他汀类药物的抗动脉粥样硬化作用可能也与此有关^[11]。Dai 等^[12]模拟斑块易感和抵抗区域的动脉波型, 应用于培养的内皮细胞, 对其表型进行了观察, 结果发现斑块易感波形引起 connexin43 表达上调。Chadjichristos 等研究发现 connexin43 基因半敲除的 LDL 受体基因缺陷的小鼠 (LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+}) 球囊损伤颈动脉内膜后其新生内膜的厚度比 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 的小鼠减小, 巨噬细胞浸润也更少。总之, 目前的研究提示内皮 connexin43 可能具有促动脉粥样硬化作用, 减少 connexin43 的表达能相应的减轻动脉粥样硬化病变的程度。而作为糖尿病血管病变关键因素的 AGEs 能否影响内皮细胞 connexin43 的表达尚不清楚, 这是一个值得研究的靶点。

本研究用 AGEs 干预体外培养的人脐静脉内皮细胞, 以观察 AGEs 能否影响人脐静脉内皮细胞 connexin43 的表达。结果发现不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 均能引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 的表达增加; 200mg/L 的 AGEs 干预人脐静脉内皮细胞 24h 后可引起 connexin43 蛋白的表达水平增加。这些结果提示 AGEs 干预内皮细胞后在转录水平引起缝隙连接蛋白 connexin43 基因的表达上调。由于内皮 connexin43 可能有促动脉粥样硬化作用, AGEs 可通过上调血管内皮细胞 connexin43 的表达而促进动脉粥样硬化的发生发展。

AGEs 引起内皮细胞 connexin43 基因表达上调的机制尚有待于进一步研究明确。目前研究表明人类 connexin43 基因的转录调控, 涉及转录因子 Sp1、Sp3、AP1、Nkx2.5、Tbx2 等, 此外, 几条信号通路也参与了 connexin43 的转录调控。AGEs 与其受体 RAGE 结合可激活内皮细胞多种信号转导通路, 引起多种核转录因子的激活和转位, 启动多种靶基因的转录, 其中也可能包括 connexin43 基因, 进而引起内皮细胞 connexin43 的表达上调, 当然尚有待于进一步研究证实。

总之, 本实验研究初步提示, AGEs 短期干预能引起体外培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白 connexin43 基因 mRNA 和蛋白的表达水平增加, 提示内皮 connexin43 在 AGEs 促动脉粥样硬化的发病机制中起着重要的作用。本研究对糖尿病患者动脉粥样硬化发病机制的进一步探索具有一定的意义, 对动脉粥样硬化的防治也有一定启示作用。

参考文献

- Méndez JD, Xie J, Aguilar - Hernández M, *et al.* Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 341(1-2): 33-41
- Tymk K. Role of connexins in microvascular dysfunction during inflammation[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(1): 1-12
- 章顺荣, 洪鸣鸣. 缝隙连接蛋白与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8): 662-664
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes[J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(4): 217-224
- Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy [J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(4): 244-252
- Jandeleit - Dahm K, Watson A, Soro - Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes - accelerated atherosclerosis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(3): 329-334
- Josephine F, Louis TL, Vicki T, *et al.* Advanced glycation end product interventions reduce diabetes - accelerated atherosclerosis[J]. *Diabetes*, 2004, 53(7): 1813-1823
- Morel S, Burnier L, Kwak BR. Connexins participate in the initiation and progression of atherosclerosis[J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31(1): 49-61
- Chadjichristos CE, Morel S, Derouette JP, *et al.* Targeting connexin 43 prevents platelet - derived growth factor - BB - induced phenotypic change in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2008, 102(6): 653-660
- Kwak BR, Veillard N, Pelli G, *et al.* Reduced Connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low - density lipoprotein receptor - deficient mice[J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 1033-1039
- Wang LH, Chen JZ, Sun YL, *et al.* Statins reduce connexin40 and Connexin43 expression in atherosclerotic aorta of rabbits [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(3): 467-475
- Dai G, Kaazempur - Mofrad MR, Natarajan S, *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis - susceptible and - resistant regions of human vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14871-14876

(收稿: 2011-09-15)

(修回: 2011-11-08)