

- 10 张治芬, Salmassi A, Mettler L. 巨噬细胞集落刺激因子在卵泡黄素化颗粒细胞中的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(8):472 - 474
- 11 许嵩, 张治芬. M-CSF 对人卵巢颗粒细胞表达 FSH 与其受体的影响及相互作用研究[J]. 浙江医学, 2014, 36(17):1450 - 1453
- 12 Salmassi A, Mettler L, Jonat W, *et al.* Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human in vitro fertilization outcome[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1):116 - 123
- 13 Takasaki A, Ohba T, Okamura Y, *et al.* Clinical use of colony-stimulating factor-1 in ovulation induction for poor responders[J]. Fertil Steril, 2008, 90(6):2287 - 2290
- 14 Comalada M, Valledor AF, Sanchez-Tillo E, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is medi-

- ated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(11):3091 - 3100
- 15 Lee AW, Mao Y, Penninger JM, *et al.* Gab2 promotes colony-stimulating factor 1-regulated macrophage expansion via alternate effectors at different stages of development[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(22):4563 - 4581
- 16 Popa-Wagner A, Balseanu AT, Rogalewski A, *et al.* Effects of granulocyte-colony stimulating factor after stroke in aged rats[J]. Stroke, 2010, 41(5):1027 - 1031

(收稿日期:2015-05-18)

(修回日期:2015-06-10)

自噬在晚期糖基化产物 (AGEs) 诱导血管平滑肌细胞增殖与迁移中的作用

胡鹏飞 周 辉 陆 明 黄抒伟

摘 要 **目的** 研究自噬在晚期糖基化产物 (AGEs) 诱导的平滑肌细胞增殖和迁移中的具体作用。**方法** 用 AGEs 处理血管平滑肌细胞后, Western blot 法观察自噬相关蛋白 LC3-II 和 SQSTM1/p62 的表达变化; MTT 实验检测细胞增殖水平; 细胞小室实验测定细胞迁移的能力。**结果** AGEs 刺激血管平滑肌细胞后, 自噬相关蛋白 LC3-II 表达增加, SQSTM1/p62 表达减少。与对照组相比, AGEs (100 μg/ml) 处理组显著增强血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力。但是, 使用自噬抑制剂 3-MA 预处理血管平滑肌细胞可减弱这种现象。**结论** 本研究证实 AGEs 诱导的自噬可增强 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力。

关键词 晚期糖基化产物 自噬 血管平滑肌细胞 增殖 迁移

中图分类号 R363.2+1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.026

Role of Autophagy in Advanced Glycation End Product-induced Proliferation and Migration in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. Hu Pengfei, Zhou Hui, Lu Ming, *et al.* Department of Cardiology, Xinhua Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310005, China

Abstract Objective To identify the role of autophagy in advanced glycation end product-induced proliferation and migration in rat vascular smooth muscle cells. **Methods** After cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with advanced glycation end products (AGEs), autophagy-associated protein LC3-I/II and SQSTM1/p62 was detected by Western blot. The cell proliferation was quantified using the MTT assay. The cell migration was evaluated by Transwell migration assay. **Results** After cultured VSMCs were treated with AGEs. The level of LC3-II was up-regulated whereas SQSTM1/p62 was decreased. AGEs (100 μg/ml) increased the proliferation and migration potential significantly as compared to the control group in VSMCs. However, pretreating cells with 3-MA, an autophagy inhibitor, could attenuate these effects. **Conclusion** Our study demonstrated that AGE-induced autophagy accelerated AGE-stimulated proliferation and migration in vascular smooth muscle cells.

Key words Advanced glycation end products; Autophagy; Vascular smooth muscle cells; Proliferation; Migration

晚期糖基化产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是指体内的还原糖通过与蛋白质、脂质

或核酸的非酶促反应形成的可影响酶的活性, 阻碍有害物质的清除和削弱受体识别的产物^[1]。AGEs 能够在糖尿病患者血管壁沉积, 促进细胞凋亡并增加其促凝活性, 从而启动并加速动脉粥样硬化的形成^[2]。自噬 (autophagy) 是细胞内受损细胞器或代谢产物的降解过程^[3]。细胞自噬水平升高时, 自噬相关蛋白

基金项目: 浙江省教育厅基金资助项目 (Y201225030)

作者单位: 310005 杭州, 浙江省新华医院心内科

通讯作者: 黄抒伟, 主任医师, 电子信箱: 1253555421@qq.com

LC3 - I 可向 LC3 - II 转换,同时 SQSTM1/p62 蛋白的表达量下降,本实验以此作为衡量自噬水平的主要指标。目前研究表明,晚期糖基化产物可以通过活化 ERK/MAPK 信号通路和抑制 PI₃K/AKT/mTOR 信号通路诱导自噬的产生^[4,5]。

血管平滑肌细胞的增殖和迁移是动脉粥样硬化发展的关键环节^[6]。据国外文献报道,动脉粥样硬化斑块纤维帽中存在与凋亡无关,但具有典型自噬特性的平滑肌细胞^[7]。本研究证实了 AGEs 可随时间梯度诱导血管平滑肌细胞自噬及其在 AGEs 诱导血管平滑肌细胞增殖与迁移中的作用,为临床上保护血管的正常功能,防治糖尿病合并动脉粥样硬化开辟了新途径。

材料与方法

1. 材料:大鼠血管平滑肌细胞 A7R5 购自上海中科院细胞研究所;抗 LC3 - II 多克隆抗体购自 Novus 公司;胎牛血清培养基购自 Gibco 公司;DMEM 培养基购自杭州吉诺生物有限公司;MTT、BSA 和 3 - MA 购自 Sigma 公司;细胞小室及聚碳酸酯膜滤器购自 Millipore 公司。

2. 方法:(1) A7R5 细胞培养:大鼠血管平滑肌细胞 A7R5 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养。用 0.25% 胰酶(含 EDTA)消化传代。细胞在培养 24h 后加入 AGEs 等处理因素。(2) 晚期糖基化产物 AGEs 的制备:参照参考文献[8], 0.5g BSA、3.0g D - 葡萄糖,溶于 0.5mmol/L PBS (pH 值 7.4) 10ml 中,滤膜除菌后恒温 37℃ 避光孵育 16 周。相同条件下,以不含 D - 葡萄糖的 PBS 孵化 BSA 作为对照组,AGE - BSA 内毒素含量由内毒素检测试剂盒测定并确保 < 2.5U/ml。(3) Western blot 法检测 LC3 - I/II 和 SQSTM1/p62 蛋白的表达:收集血管平滑肌细胞 A7R5 后,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 30min,随后 13000r/min 离心 15min,吸取上清,取 2μl 进行 BCA 法蛋白定量。加入 5 × 上样缓冲液及补水定容后,煮沸 7min。取样品(50μg)进行蛋白凝胶电泳 SDS - PAGE,然后转印至硝酸纤维素膜 PVDF 上。使用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2h,对应的 LC3 - I/II 和 SQSTM1/p62 一抗 4℃ 过夜。TBS - T 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2h,ECL 法显色,图像结果采用 LAS - 4000 - Mini 化学发光成像系统进行分析。(4) MTT 比色法测定细胞增殖水

平:取指数生长期大鼠血管平滑肌细胞 A7R5 细胞接种于 96 孔板,24h 后分别给予不同处理,2mmol/L 3 - MA 处理,100μg/ml AGEs 处理,2mmol/L 3 - MA + 100μg/ml AGEs 共同处理(3 - MA 提前 30min 加入)。30min 后弃去培养液,每孔加入 MTT(5mg/ml)溶液 20μl,继续培养 4h,离心后吸去上清,加入 200μl MDSO 振荡溶解细胞形成的结晶,用酶标仪测定 570nm 处的吸光度(A)值。(5) 细胞小室:用含 8.0μm 聚碳酸酯膜及多孔过滤器的 24 个小室测定血管平滑肌细胞的迁移。胰蛋白酶消化 VSMCs 并使 VSMCs 悬浮在上室(1 × 10⁵ 细胞加入 200μl 含 1% FBS 的无血清 DMEM),而下室装满含 10% FBS 的 DMEM。AGEs 和实验药物分别添加到上室中,细胞在 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养 24h,使之允许迁移出多孔过滤器。然后用 4% 甲醛固定 20min 后浸到结晶紫染色溶液中,10min 后细胞迁移到较低的一侧的过滤器置于显微镜下观察,计数细胞数。

3. 统计学方法:数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件做统计分析,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 LSD - *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AGEs 诱导兔血管平滑肌细胞 A7R5 自噬水平增强:用 100μg/ml AGEs 不同时间点(0、1、2、6、12 和 24h)处理血管平滑肌细胞 A7R5,观察到随着时间变化,自噬相关蛋白 LC3 - II 的表达量先升高后下降,峰值出现在 6h($P < 0.05$,图 1A)。而 SQSTM1/p62 蛋白表达量先降低后升高,于 6h 处达到最低(图 1B)。以上结果表明 AGEs 能诱导血管平滑肌细胞的自噬,并于 6h 处达到峰值,具有一定的时间依赖性。

2. 自噬增强了 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的增殖:用 100mg/L AGEs 处理血管平滑肌细胞 48h,其中 1 组用自噬抑制 3 - MA(2mmol/L)提前预处理 30min,结果显示单用 3 - MA 组与对照组比较,血管平滑肌细胞增殖差异无统计学意义。AGEs 组与对照组相比平滑肌细胞增殖明显增加($P < 0.05$)。预先用 3 - MA 处理后的 AGEs 组平滑肌细胞较单用 AGEs 组增殖能力下降($P < 0.05$,图 2)。以上实验表明,自噬增强了 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的增殖。

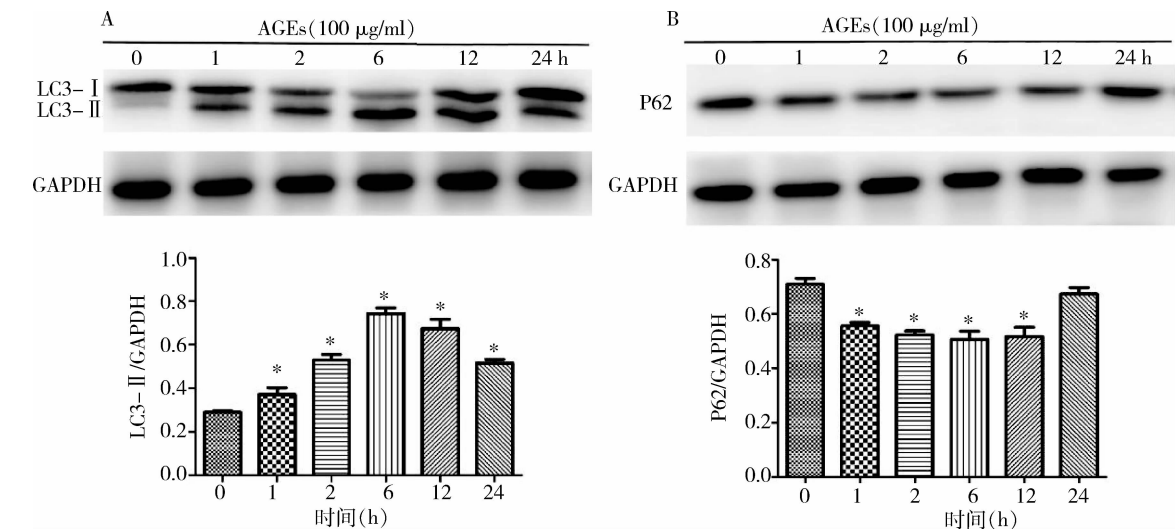


图1 Western blot 法检测 LC3 - I / II 和 SQSTM1/p62 蛋白的表达
与 0h 相比, * $P < 0.05$

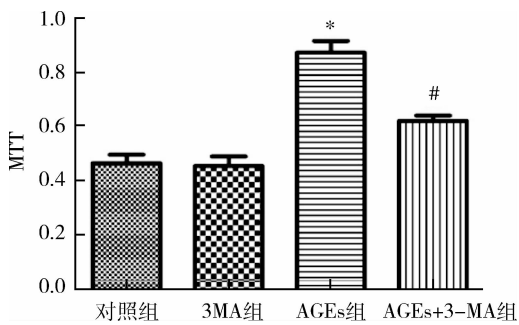


图2 MTT 检测平滑肌细胞增殖水平

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 AGEs 组相比, # $P < 0.05$

3. 自噬增强了 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的迁移:为了证实自噬参与并增强了 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的迁移,笔者用 2mmol/L 的自噬抑制剂 3-MA 处理血管平滑肌细胞,及 1 组用自噬抑制 3-MA (2mmol/L) 提前预处理 30min 后再加入 100mg/L AGEs 处理,细胞小室结果显示 AGEs 可显著增强细胞的迁移能力且预处理的自噬抑制剂 3-MA 减弱了 AGEs 增强的血管平滑肌细胞的迁移。这说明自噬促进了 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的迁移,详见图 3。

讨 论

随着年龄的增长,AGEs 逐渐积累,特别是在糖尿病患者,体内大量 AGEs 的存在能破坏血管细胞和细胞外基质,直接影响血管壁和基膜的完整性,还能与细胞膜上的晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycationendproducts, RAGE) 特异性结合,激活细胞内的 ERK、JNK、p38/ MAPK、NF- κ B 等多条信号转导通路,引起级联反应触发氧化应激、增强炎

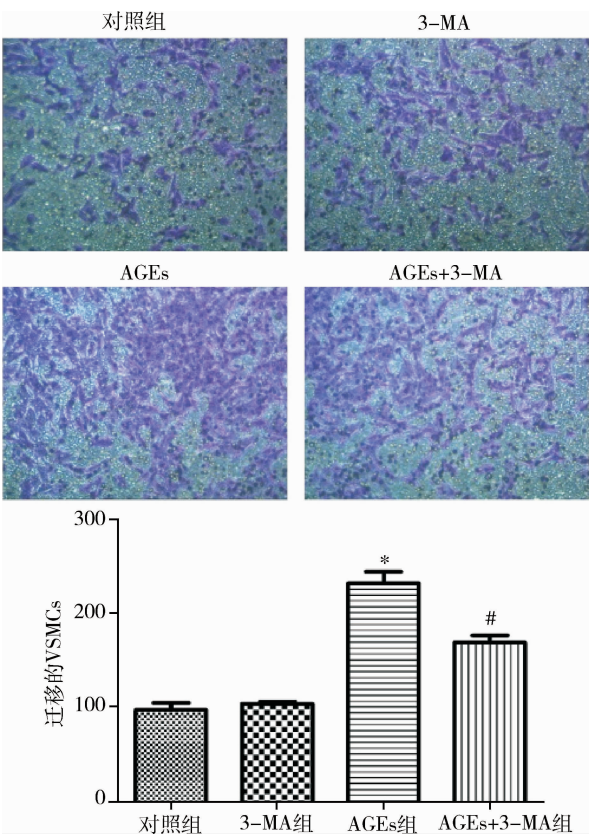


图3 细胞小室实验测定细胞迁移能力

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 AGEs 组相比, # $P < 0.05$

症、促进凋亡等导致糖尿病血管损伤^[9-12]。自噬是细胞内可溶性的高分子物质 (如核酸、蛋白质、糖类和脂质) 及功能失调的细胞器 (如线粒体、核糖体、过氧化物酶体和内质网) 高度保守的非特异性降解过程。在多种病理生理过程中都可以观察到

自噬水平的变化,如肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病、炎症反应等。不同水平的自噬对细胞有不同的意义,基础水平的血管平滑肌细胞自噬一方面可以抑制平滑肌细胞增殖与迁移,延缓动脉粥样硬化病变的进展,另一方面也可以维护粥样斑块的稳定,促进细胞的生存^[6,13];过度的自噬可以使粥样斑块形成纤维帽变薄弱,使斑块趋向于不稳定易引起斑块破裂,引发急性心血管事件^[14]。因此,血管平滑肌细胞自噬在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要作用。在疾病发展的不同阶段,自噬的作用也会不尽相同。在心肌缺血阶段,细胞通过 AMPK 信号通路激活自噬,使用自噬抑制剂 3-MA 能使缺血阶段心肌细胞的生存率下降,细胞死亡增加,这说明在缺血阶段,自噬能对心肌细胞起到保护作用。而在缺血后再灌注阶段,心肌细胞通过 Beclin-1 依赖的信号通路激活细胞自噬,自噬水平较低的 Beclin-1^{+/-} 基因敲除小鼠比野生型小鼠心肌细胞凋亡率有所下降,这说明在缺血后再灌注阶段,自噬对心肌细胞具有损伤作用^[2]。

笔者研究发现,AGEs 能够诱导大鼠血管平滑肌细胞自噬并随暴露时间的延长而增强,自噬可增强 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移,加速动脉粥样硬化的形成,抑制自噬可以减缓血管平滑肌细胞增殖和迁移,说明过度自噬可以促进糖尿病动脉粥样硬化的进程并且增加恶性心血管事件的发生率。因此,对细胞的自噬水平进行干预可能是治疗糖尿病血管并发症新的突破口,但还需要具体的动物学实验进行深入研究。

参考文献

- Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease [J]. *Proteomics*, 2013, 92(27):248-259
- 赵凯,陈文强,徐兴晟,等. 单核细胞自体吞噬相关基因蛋白表达与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(1):37-42
- Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 252-261
- Hu P, Lai D, Lu P, *et al.* ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(4): 613-618
- Hou X, Hu Z, Xu H, *et al.* Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte via RAGE/PI₃K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13: 78
- Liu H, Cao Y, Tong T, *et al.* Autophagy in atherosclerosis: a phenomenon found in human carotid atherosclerotic plaques[J]. *Chin Med J: Engl*, 2015, 128(1):69-74
- Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 812-819
- Hou FF, Chertow GM, Kay J, *et al.* Interaction between beta 2-microglobulin and advanced glycation end products in the development of dialysis related-amyloidosis[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1514-1519
- 杜亚豪,郑月宏,田翠,等. 腹主动脉瘤血管平滑肌细胞凋亡和自噬研究[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2010, 9(3): 217-221
- 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI₃K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(3): 390-397
- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, *et al.* Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17810-17814
- 胡波,张晓刚,曾琳琳. 糖基化终产物诱导心肌细胞炎症反应的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(12): 2341-2345
- Liao X, Sluimer JC, Wang Y, *et al.* Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 545-553
- Sakata N, Meng J, Takebayashi S. Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cells[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2000, 7(3): 169-176

(收稿日期:2015-06-08)

(修回日期:2015-06-11)

(接第 180 页)

- Bathla G, Hegde AN. MRI and CT appearances in metabolic encephalopathies due to systemic diseases in adults[J]. *Clin Radiol*, 2013, 68(6):545-554
- McKinney AM, Kieffer SA, Paylor RT, *et al.* Acute toxic leukoencephalopathy: potential for reversibility clinically and on MRI with diffusion-weighted and FLAIR imaging[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 193(1):192-206
- Dorandeu F, Barbier L, Dhote F, *et al.* Ketamine combinations for the

field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Review of current data and perspectives [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 203(1):154-159

- Rosman Y, Eisenkraft A, Krivoy A, *et al.* Using MRI for the assessment of paraoxon-induced brain damage and efficacy of antidotal treatment[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(6):409-416

(收稿日期:2015-05-15)

(修回日期:2015-06-04)