

文章编号:1001-6880(2014)1-0019-05

番茄红素对高糖所致内皮祖细胞功能障碍的保护作用及机制初探

曾瑶池*, 穆桂萍, 黄淑芬, 曾学辉, 周熙临

深圳市中医院, 深圳 518033

摘要:本文阐述了番茄红素对高糖所致人外周血内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)功能障碍的影响, 并探讨了其可能机制。EPCs 分为空白对照组、高糖组、番茄红素 10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 低、中、高剂量和信号阻断剂(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SB203580)组, 用 33 mmol/L 葡萄糖诱导 EPCs 损伤, 分别采用 MTT 比色法、黏附能力测定实验、改良的 Boyden 小室检测 EPCs 黏附、迁移能力, Matrigel 成血管网实验评价体外小管形成能力, Western-blot 检测磷酸化和非磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达量。实验表明番茄红素可改善高糖环境下 EPCs 黏附、迁移和体外小管形成能力, 其机制可能与番茄红素抑制 EPCs 中 p38 MAPK 激活有关。

关键词:番茄红素; 高糖; 内皮祖细胞; p38 MAPK

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

Effect of Lycopene on the Function and Mechanism of Human Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells Cultivated in High Concentration Glucose

ZENG Yao-chi*, MU Gui-ping, HUANG Shu-fen, ZENG Xue-hui, ZHOU Xi-lin

Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China

Abstract: The objectives of this study were to investigate the effects of lycopene on migratory, adhesive, tube formation capacity and the activity of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) of endothelial progenitor cells (EPCs) with high concentration of glucose and to explore the protection mechanism of EPCs of human peripheral blood by lycopene. Mononuclear cells (MNCs) were isolated from endothelial progenitor cells of human peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, cultured and identified. The third generation of EPCs was incubated with high concentration glucose (33 mmol/L) and with lycopene plus high glucose. EPCs migration was assessed with MTT assay and modified Boyden chamber assay. EPCs adhesion assay was performed by replating those on fibronectin-coated dishes, and then adherent cells were counted. Tube formation activity was assayed by matrigel network formation assay. Western blot assay was used to analyze phosphorylated and non-phosphorylated p-38 mitogen activated protein kinases (MAPKs) protein expression. The results showed high concentration glucose attenuated migratory, adhesive, capacity of EPCs and increased phosphorylation of p38 MAP kinase. Lycopene improved function of EPCs to high concentration glucose through inhibiting p38 MAP kinase pathway, which was one of mechanisms responsible for protecting EPCs.

Key words: Lycopene; high concentration of glucose; endothelial progenitor cells; p38 MAPK

糖尿病患者发生大血管病变的风险明显高于普通人群, 糖尿病已被列为心血管疾病的等危症。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一类能增殖并分化为血管内皮细胞, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型, 也未形成血管的前体细胞, 不仅参与人胚胎血管生成, 同时也参与出生后血管新生和内皮损伤后的修复过程, 新生血管中 25% 的内皮细

胞是由 EPCs 分化而来的^[1]。糖尿病血管病变的发生发展过程中 EPCs 数量减少和增殖、黏附及血管形成能力受损起主导作用^[2]。增加 EPCs 数量并改善其功能, 可以增强血管再生和损伤血管的再内皮化过程, 对糖尿病患者损伤血管的修复和缺血组织侧枝循环的形成发挥重要作用。我们的前期研究已证实番茄红素可以保护高糖环境下 EPCs 的增殖能力并抑制其凋亡^[3], 本实验旨在观察番茄红素对高糖环境下人外周血 EPCs 黏附、迁移和体外小管形成能力的影响, 并探索其可能的作用机理。

收稿日期:2013-03-01 接受日期:2013-07-23

基金项目:广东省医学科研基金立项课题(A2012568);广东省深圳市科技计划项目(201103378)

* 通讯作者 Tel:86-013923735856; E-mail:0731zyc@163.com

1 材料与方法

1.1 标本

抽取健康成人空腹肘静脉血 15 份, 15 mL/份, 其中男性 8 份, 女性 7 份。所有供血者均排除吸烟、近期外伤、手术史、皮肤溃疡等影响内皮祖细胞增殖、迁移、血管形成能力及存活率的因素, 所采集的血液标本均在 1 h 以内分离单个核细胞。

1.2 材料与试剂

番茄红素(纯度≥90%, 分离纯化于番茄)、人纤维连接蛋白、FITC-UEA-I、Dil-acLDL 和 p38 MAPKs 抑制剂 SB203580 均购于 Sigma 公司; M199 培养基和牛胎血清购自 Hyclone 公司; 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物技术公司; VEGF、bFGF、EGF 及 IGF-1 购自 Protech 公司; 改良 Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂; 磷酸化和非磷酸化 p38 MAPK 抗体购自美国 CellSignaling Technology 公司。番茄红素纯品溶解于四氢呋喃(THF)中, 用培养基稀释至所需浓度, 所有操作在暗光下进行。

1.3 EPCs 的培养、鉴定

参照文献^[4], 简述如下: 取空腹外周静脉血 15 mL, 常规密度梯度离心法获取单个核细胞, 并悬浮于 5 mL M199 培养基(含 20% 胎牛血清、VEGF10、bFGF 2、EGF5 μg/L、青霉素 1 × 10⁵ μg/L、链霉素 100 mg/L)中, 将其铺在纤维连接蛋白包被 20 min 的培养瓶内, 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 温箱中培养 4 d。然后以 M199 培养基轻轻洗去未贴壁细胞, 继续以上述完全培养基培养至第 7 d。将 Dil-acLDL (2.4 mg/L) 加入 EPCs 培养体系中, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后, 加入 FITC 标记的 UEA-I (10 mg/L), 37 °C 继续孵育 1 h, 4% 多聚甲醛固定 10 min 后于荧光显微镜下观察。单个核细胞培养 7 d 后, 用 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞染色, 然后通过激光共聚焦显微镜鉴定, 可观察到 EPCs 特异性生物学特性: 能摄取 acLDL(激光共聚焦显微镜下呈红色, 激发波长 543 nm), 结合 UEA-I(激光共聚焦显微镜下呈绿色, 激发波长 477 nm)。FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs。倒置荧光显微镜对 EPCs 进行计数, 取培养第 3 代 EPCs 用于实验。

1.4 实验分组及培养

第 3 代 EPCs 作为靶细胞, 细胞随机分为 6 个组: 空白对照(Normal control, NC)组; 高糖(high glu-

cose, HG)组; 高糖 + 番茄红素 10 μg/mL 组; 高糖 + 番茄红素 30 μg/mL 组; 高糖 + 番茄红素 50 μg/mL 组; 高糖 + 信号阻断剂(SB203580 1 μmol/L)组。除空白对照组外, 葡萄糖终浓度均为 33 mmol/L 的 M199 培养基(含 20% 胎牛血清)培养 EPCs 24 h。

1.5 EPCs 黏附能力检测

0.25% 胰蛋白酶消化搜集贴壁细胞, 先悬浮在 500 μL 不同番茄红素浓度的培养液中培养 24 h, 计数。然后将同等数目的 EPCs 接种在包被有纤维连接蛋白的 96 孔培养板, 在 37 °C 下培养 30 min, 洗掉未贴壁细胞, 随机选择每孔 5 个高倍镜视野(×200)计数贴壁细胞, 取平均数。

1.6 EPCs 迁移能力检测

分别将 2 × 10⁴ EPCs 悬浮在不含 VEGF、bFGF 的 200 μL 培养液中, 注入 Boyden 上室; 将含 VEGF、bFGF 的 200 μL 培养液, 注入下室。培养 24 h, 刮去滤膜上面的未移动细胞, 甲醇固定 5 min, Giemsa 染色, 随机选择 5 个高倍镜视野(×200)计数迁移到下层的细胞, 取平均数。

1.7 EPCs 小管形成能力实验

Matrigel 成血管网实验评价 EPCs 在体外的小管形成能力。4 °C 下于 24 孔培养板底加入 0.3 mL Matrigel, 铺平于培养箱 37 °C 固定 10 h, 将培养板获得的 EPCs 与 ECM-2 培养液混合(10000/孔, 每孔 0.25 mL)。混匀后加入培养板。37 °C、5% CO₂ 于培养箱培养, 24 h 后, 用 100 倍倒置显微镜观察管样结构形成情况, 细胞拉长变形, 长度为宽度的 4 倍以上即可被认为形成小管。随机选取 5 个视野, 计数完整微管网状结构。

1.8 Western blot 分析

各组干预 24 h 后, 冰上裂解细胞, 离心取上清测浓度, 取 30 μg 蛋白与加样缓冲液混匀变性, 电泳、转膜、封闭, 分别加入磷酸化和非磷酸化 p38 MAPK 或 β-actin 抗体, 4 °C 孵育过夜, 加入二抗孵育 1 h, 进行后续发光、压片、显影、定影, β-actin 为内参。BioRad-Jeldoc2000 图像分析系统进行光密度扫描, 蛋白相对表达量以目的蛋白与内参 β-actin 的比值表示。

1.9 统计学分析

实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。多个样本均数比较进行方差齐性检验, 采用单因素方差分析; 多组之间的两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 EPCs 的鉴定

用 FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I) 和

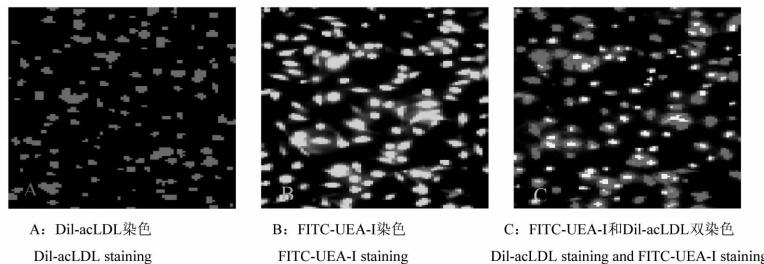


图 1 激光共聚焦显微镜鉴定 EPCs ($\times 200$)

Fig. 1 Characterization of EPCs under laser-scanning confocal microscope ($\times 200$)

A: Dil-acLDL 染色 B: FITC-UEA-I 染色 C: FITC-UEA-I 和 Dil-acLDL 双染色

Dil-acLDL staining FITC-UEA-I staining Dil-acLDL staining and FITC-UEA-I staining

2.2 番茄红素对 EPCs 功能的影响

33 mmol/L 的葡萄糖作用于 EPCs 24 h 后, 细胞黏附、迁移能力均被抑制, 由表 1 可见高糖组 EPCs 黏附、迁移能力明显低于空白对照组、高糖 + 番茄红素 (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和高糖 + 信号阻断剂组 ($P < 0.05$); 番茄红素显著增加 EPCs 的黏附、迁移能力, 尤以高糖 + 番茄红素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组作用最明显, 其黏附能力、迁移能力均高于番茄红素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; 高糖 + 番茄红素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与高糖 + 信号阻断剂 SB203580 组比较, 迁移能力差异无统计学意义, 黏附能力优于信号阻断剂组 ($P < 0.05$) (表 1)。

EPCs 于 Matrigel 胶上培养 24 h, 可形成微血管网状结构, 由于番茄红素剂量不同, 各组 EPCs 的成血管网能力有明显差别。番茄红素显著增强高糖环境下 EPCs 的体外小管形成能力并呈一定的量效关系, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 番茄红素组增强 EPCs 的体外血管生成能力最为显著 ($P < 0.05$, 表 1), 且形成的管腔样结构也较其他剂量组和高糖 + 信号阻断剂 (SB203580 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组复杂。由图 2 可以看出高糖刺激可以显著抑制 EPCs 的成血管网能力, 而番茄红素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或信号阻断剂 (SB203580 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预可以显著改善 EPCs 的成血管网能力 (表 1、图 2)。

表 1 番茄红素对 EPCs 功能的影响 ($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of lycopene on the functions of EPCs ($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	黏附 Adhesion (cells/ $\times 200$)	迁移 Migration (cells/ $\times 200$)	小管形成 Tube formation (tubules/ $\times 100$)
Normal control group	$147.28 \pm 11.13^*\Delta\blacktriangle$	$144.15 \pm 15.48^*\Delta\blacktriangle$	$14.63 \pm 2.87^*\Delta\blacktriangle$
HG group	$85.83 \pm 9.53^{\Delta\blacktriangle}$	$36.23 \pm 9.50^{\Delta\blacktriangle}$	$0.20 \pm 0.41^{\Delta\blacktriangle}$
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lycopene group	$91.46 \pm 9.37^{\Delta\blacktriangle}$	$70.51 \pm 10.89^{\Delta\blacktriangle}$	$4.74 \pm 2.71^{\Delta\blacktriangle}$
30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lycopene group	$117.08 \pm 12.02^*\Delta$	$112.86 \pm 9.95^*\Delta$	$10.86 \pm 3.43^*\Delta$
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lycopene group	$95.26 \pm 8.78^{\Delta\blacktriangle}$	$103.25 \pm 13.34^{\Delta\blacktriangle}$	$5.79 \pm 1.87^{\Delta\blacktriangle}$
SB203580 group	$105.19 \pm 13.75^{\Delta\blacktriangle}$	$111.75 \pm 12.19^*\Delta$	$7.59 \pm 2.30^{\Delta\blacktriangle}$
F value	77.34	198.13	62.32
P value	0.000	0.000	0.000

注: * 与空白对照组比较, $P < 0.05$; Δ 与高糖组比较, $P < 0.05$; \blacktriangle 与高糖 + 番茄红素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; Compare with high glucose group, $\Delta P < 0.05$; Compare with lycopene 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group, $\blacktriangle P < 0.05$.

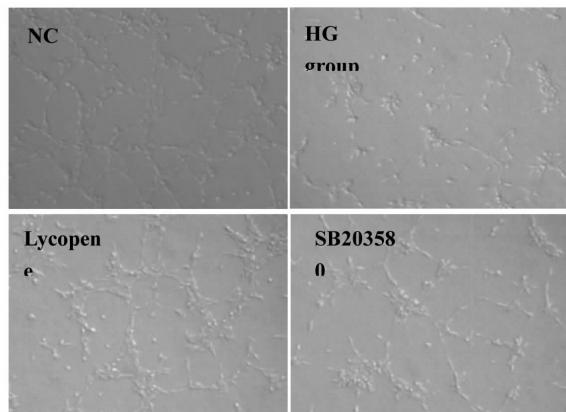


图 2 番茄红素对 EPCs 体外小管形成的影响 ($\times 100$)

Fig. 2 Effects of lycopene on tube formation activity of EPCs ($\times 100$)

2.3 番茄红素对 EPCs p38 MAPK 表达的影响

33 mmol/L 葡萄糖作用于 EPCs 后, p38 MAPK 磷酸化表达增加, 但对 p38 MAPK 总蛋白表达无影响。以不同浓度番茄红素及 SB203580 加入高葡萄糖刺激的 EPCs 24 h 后, 检测 p38 MAPK 磷酸化表达, 结果显示: 随番茄红素浓度增加, 其对高葡萄糖所致的 p38 MAPK 磷酸化表达抑制作用加强 ($P < 0.05$), 但浓度增加至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制 p38 MAPK 磷酸化表达作用较 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组明显降低 ($P < 0.05$), SB203580 亦明显抑制 p38 MAPK 磷酸化表达 ($P < 0.05$, 图 3)。

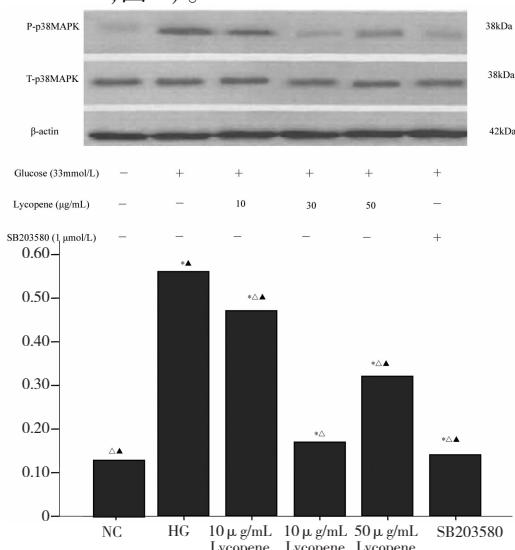


图 3 番茄红素对高糖诱导的 EPCs p38 MAPK 激活的影响

Fig. 3 Effects of lycopene on p38 MAPKs activation in EPCs induced by high concentration glucose ($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

EPCs 又称成血管细胞, 是一类能循环、增殖并具有多重分化潜能, 但尚未表达成熟血管内皮细胞表型的前体细胞, 与血管内皮功能密切相关^[5]。EPCs 的生物学特性及其促进缺血组织的血管新生作用使其可作为糖尿病血管病变的治疗靶点。Schattman 等^[6]的研究提示将 EPCs 注入糖尿病患者或使用动员剂将 EPCs 动员至缺血部位, 是改善糖尿病患者血管新生能力的新方法。糖尿病、高脂血症、代谢综合征等均可损伤 EPCs 的动员、增殖、分化功能, 他汀类调脂药、胰岛素增敏剂可以增加 EPCs 数量, 增强 EPCs 增殖、迁移及分化能力, 进而促进缺血组织血管新生, 提示这类药物除了惯有的治疗作用外, 在糖尿病血管病变的治疗上可能发挥重要作用^[7]; 糖尿病血管并发症已被逐渐认识, 血管内皮细胞生长因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子可以增加其数量、改善其功能; 但是上述方案费用较高、副作用较大、限制了其在临床中的应用。

既往研究发现高糖能减少内皮祖细胞的数量并损伤其功能^[8], 我们的前期研究亦显示: 高糖抑制 EPCs 增殖, 促进其凋亡; 番茄红素可保护高糖环境下 EPCs 的增殖能力并抑制其凋亡, 抑制高糖诱导的 EPCs 数量减少^[3]。本实验结果显示番茄红素除了影响高糖环境下 EPCs 的数量外, 还可以改善其黏附、迁移及小管形成能力。研究已表明 p38 MAPK 在调节 EPCs 数目的信号传导通路中有中枢性作用^[9]。EPCs 中 p38 MAPK 磷酸化程度与葡萄糖浓度呈正相关, p38 MAPK 抑制剂 SB203580 能抑制高糖诱导的 EPCs 衰老, 提高 EPCs 的增殖和分化, 部分逆转 EPCs 体内受损的血管新生能力^[9]。Kuki 等^[10]发现, 高血糖通过 P38 MAPK 的激活而促进 EPCs 的衰老、凋亡。因此, 高糖加速 EPCs 的凋亡、损伤其功能、导致 EPCs 功能障碍, 可能与 p38 MAPK 的磷酸化有关。

已有研究表明番茄红素对多种原因引起内皮功能障碍具有保护作用^[11,12], 最新研究发现, 番茄红素可通过抑制 p38 MAPK 磷酸化而抑制巨噬细胞炎症因子的生成, 发挥抗炎效应^[13]。本实验用 33 mmol/L 葡萄糖可诱导 EPCs 中 p38 MAPK 激活。不同浓度的番茄红素干预可阻断高糖诱导 p38 MAPK 激活。为了进一步明确干扰 p38 MAPK 激活介导了番茄红素对高糖环境下 EPCs 功能的保护效应, 我们用 p38 MAPK 阻断剂 SB203580 干预, 发现阻断

p38 MAPK 后, EPCs 的黏附、迁移和体外血管新生能力明显增强, 表明 p38 MAPK 激活在高糖诱导的 EPCs 功能失调中起着重要作用, 番茄红素可通过阻断 p38 MAPK 激活, 进而保护 EPCs 功能。然而, 我们的实验也显示:SB203580 干预并不能完全阻断高糖对 EPCs 功能的损伤, 表明高糖对 EPCs 的影响机制复杂, p38 MAPK 激活只是途径之一; 番茄红素 30 μg/mL 组与信号阻断剂 SB203580 组比较, 迁移能力差异无统计学意义, 黏附能力及小管形成能力均优于信号阻断剂组, 表明番茄红素除了通过抑制 p38 MAPK 磷酸化发挥对 EPCs 的保护效应, 还存在其他机制。高糖对 EPCs 数量与功能的影响是多环节、多通路相互联系的复杂调控过程, 番茄红素对 EPCs 作用的确切分子机制仍有待进一步研究。

参考文献

- Caplice NM, Wang S, Tracz M, et al. Neoangiogenesis and the presence of progenitor cells in the venous limb of an arteriovenous fistula in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293:F470-475.
- Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M, et al. Multifactorial treatment increases endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2010, 53:2129-2133.
- Zeng YC(曾瑶池), Mu GP(穆桂萍), Huang SF(黄淑芬), et al. Effect of lycopene on the apoptosis of human peripheral endothelial progenitor cells cultivated in high concentration of glucose. *J Hygiene Res*(卫生研究), 2012, 41: 623-626.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, 348:593-600.
- Albiero M, Menegazzo L, Avogaro A, et al. Pharmacologic tar-
- geting of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010, 10:16-32.
- Schattman GC, Hanlon HD, Jiao C, et al. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*, 2000, 106:571-578.
- Tousoulis D, Andreou I, Tsiatas M, et al. Effects of rosuvastatin and allopurinol on circulating endothelial progenitor cells in patients with congestive heart failure: the impact of inflammatory process and oxidative stress. *Atherosclerosis*, 2011, 214:151-157.
- 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 Diabetes Invest*, 2011, 2:262-270.
- Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2005, 111:1184-1191.
- Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, et al. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of P38 mitogen-activated protein kinase. *Circ J*, 2006, 70:1076-1081.
- Liu X, Qu D, He F, et al. Effect of lycopene on the vascular endothelial function and expression of inflammatory agents in hyperhomocysteinemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, Suppl 1:244-248.
- Balestrieri ML, De Prisco R, Nicolaus B, et al. Lycopene in association with alpha-tocopherol or tomato lipophilic extracts enhances acyl-platelet-activating factor biosynthesis in endothelial cells during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36:1058-1067.
- Feng D, Ling WH, Duan RD. Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-κappaB in macrophages. *Inflamm Res*, 2010, 59:115-121.

(上接第 10 页)

- Deng HY(邓慧颖), Xing JG(邢建广), Luo DQ(罗都强). Metabolites of endophytic fungus *Pestalotiopsis clavigpora* isolated from the stem of *Bruguiera sexangula*. *Mycosistema*(菌物学报), 2011, 30:263-267.
- Shi Y(石瑛), Tian L(田黎), Wang J(王婧), et al. Studies on the chemical constituents of the fermentation liquid from marine actinomycetes *Micromonospora* sp. and bacteria *Oceanospirillum* sp. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2006, 25:6-10.
- Liu C(刘超), Wang HQ(王洪庆), Li BM(李保明), et al. Studies on chemical constituents from the fruiting bodies of

- Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32:235-237.
- Lin CN, Kuo SH, Won SJ. Steroids of formosan *Ganoderma amboinense*. *Phytochemistry*, 1993, 32:1549-1551.
- Zhang CF, Hu Y, Lin Y, et al. Anti-inflammatory activities of ethyl acetate of *Polygonum jucundum* and its phytochemical study. *J Med Plant Res*, 2012, 6:1505-1511.
- Xu M, Marc L, Sabrina K, et al. Ugandenial A, a new drimane-type sesquiterpenoid from *Warburgia ugandensis*. *Molecules*, 2009, 14:3844-3850.
- Gao JM, Hu L, Liu JK. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*, 2006, 66:771-775.