

白藜芦醇联合间充质干细胞改善损伤内皮细胞的代谢记忆效应

丁慧, 王鹏, 王颜刚(青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东省青岛市 266003)

文章亮点:

通过建立体外高血糖“代谢记忆”模型, 观察不同浓度的白藜芦醇联合间充质干细胞对脐静脉内皮细胞核因子 κB 通路以及血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和纤溶酶原激活剂抑制剂 1 分泌的影响, 为糖尿病血管代谢记忆损伤的防治用药提供理论依据。

关键词:

干细胞; 脐带脐血干细胞; 间充质干细胞; 白藜芦醇; 人脐静脉内皮细胞; 代谢记忆; 核因子 κB

主题词:

干细胞; 间充质干细胞; 内皮细胞; 脐静脉

摘要

背景: 白藜芦醇联合间充质干细胞是否能够进一步改善高糖诱导内皮细胞产生的不良记忆目前鲜有报道。
目的: 验证不同浓度的白藜芦醇联合间充质干细胞对高糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤代谢记忆效应的保护作用。

方法: 将人脐静脉内皮细胞分为 10 组: 正常对照组、甘露醇对照组、高糖组、白藜芦醇低剂量组(0.1 $\mu\text{mol/L}$)、白藜芦醇中剂量组(1 $\mu\text{mol/L}$)、白藜芦醇高剂量组(10 $\mu\text{mol/L}$)、干细胞组、白藜芦醇低剂量+干细胞组、白藜芦醇中剂量+干细胞组及白藜芦醇高剂量+干细胞组。分别于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养第 1, 4, 6 天收集细胞培养上清液、提取细胞核蛋白, 应用 ELISA 法检测细胞培养上清中血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 的表达水平, 以 Western blot 法检测细胞内核因子 κB 的蛋白水平。

结果与结论: 与正常对照组相比, 高糖可诱导内皮细胞核因子 κB 表达上调, 同时血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平升高, 且在糖浓度恢复正常后仍持续上升。与高糖组相比, 白藜芦醇及其联合干细胞干预后可以使内皮细胞核因子 κB 表达及血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平呈白藜芦醇剂量依赖性降低。干细胞组上述指标与高糖组比差异无显著性意义, 甘露醇组与正常对照组相比差异无显著性意义。结果提示白藜芦醇可能通过核因子 κB 通路降低血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平, 改善高糖代谢记忆效应介导的内皮细胞损伤。而间充质干细胞发挥内皮细胞保护作用可能不仅有赖于核因子 κB 通路。

丁慧, 王鹏, 王颜刚. 白藜芦醇联合间充质干细胞改善损伤内皮细胞的代谢记忆效应[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2232-2237.

Resveratrol combined with mesenchymal stem cells improves the metabolic memory effects on endothelial cell injury

Ding Hui, Wang Peng, Wang Yan-gang (Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: There are rare reports concerning whether resveratrol combined with mesenchymal stem cells is able to further improve the bad memory caused by high glucose-induced endothelial cell injury.

OBJECTIVE: To explore the effects of resveratrol combined with mesenchymal stem cells on high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell injury.

METHODS: The human umbilical vein endothelial cells were divided into 10 groups: normal control glucose; mannitol control group; high glucose group; low-dose resveratrol group (0.1 $\mu\text{mol/L}$); middle-dose resveratrol group (1 $\mu\text{mol/L}$); high-dose resveratrol group (10 $\mu\text{mol/L}$); stem cells group; low-dose resveratrol+stem cells group; middle-dose resveratrol+stem cells group; high-dose resveratrol+stem cells group. Cell supernatants were collected to extract nuclear proteins on days 1, 4, 6 after culture in 5.5 mmol/L glucose. Western blot was used to investigate the expression of nuclear factor κB of human umbilical vein endothelial cells. Enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the secretion of vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normal control group, hyperglycemia memory up-regulated the expression of nuclear factor κB and increased the levels of vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1, which could still continue to rise after culturing in normal glucose. Resveratrol alone or combined with mesenchymal stem cells down-regulated the expression of nuclear factor κB and decreased the levels of vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant

丁慧, 女, 1987 年生, 山东省青岛市人, 汉族, 2014 年青岛大学毕业, 硕士, 主要从事内分泌与代谢病研究。

通讯作者: 王颜刚, 博士, 主任医师, 青岛大学医学院附属医院内分泌科, 山东省青岛市 266003

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.14.016
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)14-02232-06
稿件接受: 2014-01-24

Ding Hui, Master, Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Yan-gang, M.D., Chief physician, Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Accepted: 2014-01-24

protein-1, plasminogen activator inhibitor-1 in a dose-dependent manner, which were lower than those in the high glucose group. There were no significant differences in nuclear factor κ B, vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1 levels between stem cells group and high glucose group. Resveratrol can attenuate high glucose-induced injury to endothelial cells. The metabolic memory induced by high glucose may be mediated by nuclear factor κ B pathway, which may be independent in the efficacy of mesenchymal stem cells in protecting endothelial cells.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; endothelial cells; umbilical veins

Ding H, Wang P, Wang YG. Resveratrol combined with mesenchymal stem cells improves the metabolic memory effects on endothelial cell injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(14):2232-2237.

0 引言 Introduction

糖尿病患者由于早期血糖控制不佳, 即使后期血糖降至理想水平, 血管并发症仍持续进展, 这一现象称为高血糖的“代谢记忆效应”。长期高血糖所致的血管并发症, 尤其是动脉粥样硬化, 是糖尿病患者病死率高的主要原因之一^[1]。因此, 早期干预“代谢记忆”的形成无疑是改善糖尿病患者生活质量, 降低糖尿病患者病死率的重要手段。

研究表明, 白藜芦醇预处理能使血液中血管生成因子增加, 使核因子 κ B、特异性蛋白1的基因表达增加, 起到抗凋亡作用和抗心肌损伤的作用, 其主要机制是硫氧还蛋白1和血红素加氧酶1在体内外的促进血管生成的作用。冠状小动脉经白藜芦醇预处理后, 其内皮细胞能使HO-1和血管内皮细胞生长因子的表达显著增加, Trx-1表现出显著的加速管样结构形成的作用。锡原卟啉 IX是HO-1抑制剂, 能抑制血管内皮细胞生长因子的表达以及下调血管生成反应, 然而, 经过白藜芦醇预处理后, 大鼠心肌细胞中Trx-1的表达并没有受到锡原卟啉作用的影响, 血管内皮生长因子、Trx-1和HO-1均有显著的表达。研究发现, 白藜芦醇预处理的实验组心肌梗死面积显著降低, 在梗死的心肌周围有新生毛细血管形成^[2]。

近来研究发现, 白藜芦醇具有改善糖尿病血管内皮细胞功能的作用^[3-6], 间充质干细胞可通过多种方式促进受损血管再生修复, 但两者联合是否能够进一步改善高糖诱导内皮细胞产生的不良记忆目前鲜有报道。内皮细胞分泌血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1和纤溶酶原激活剂抑制剂1是造成内皮细胞损伤的重要因素。而核因子 κ B参与了上述相关基因表达的调控。

有研究证实, 高糖状态可使体内活性氧自由基增多^[7], 进而上调核因子 κ B表达并进入细胞核, 与血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1、纤溶酶原激活剂抑制剂1等靶基因启动子区特异的 κ B序列结合, 编码多种炎症相关基因, 诱发血管内皮损伤。同时, 高血糖环境可以促进蛋白质非酶糖基化形成的糖基化终产物含量增加^[8], 糖基化终产物能够与糖基化终产物受体结合, 参与细胞内活性氧簇的生成, 进而活化核因子 κ B^[9]。El-Osta等^[10]发现高糖通过表观遗传修饰途径亦可激活核因子 κ B通路。

因此, 实验以高糖诱导的人脐静脉内皮细胞为研究对

象, 研究不同浓度的白藜芦醇联合间充质干细胞对核因子 κ B通路以及血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1、纤溶酶原激活剂抑制剂1分泌的影响, 为糖尿病血管代谢记忆损伤的防治用药提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照观察, 细胞学实验。

时间及地点: 实验于2012年10月至2013年8月在青岛大学医学院附属医院痛风实验室完成。

材料: 白藜芦醇以二甲基亚砜溶解, 配制成浓度为100 mmol/L的母液备用, 使二甲基亚砜在终培养液中的终浓度小于0.1%, 该浓度对细胞生长无影响^[11]。

白藜芦醇联合间充质干细胞改善损伤内皮细胞的代谢记忆效应实验用细胞及试剂:

| 细胞及试剂 | 来源 |
|---------------------------------------|------------------|
| 原代人脐静脉内皮细胞(ATCC) | 美国菌种保藏中心 |
| 人脐带间充质干细胞 | 青岛大学医学院附属医院干细胞中心 |
| 白藜芦醇、二甲基亚砜、D-葡萄糖 | Sigma公司 |
| 胎牛血清、DMEM培养基、胰酶、Transwell小室 | HyClone公司 |
| 青霉素-链霉素溶液 | 杭州吉诺生物医药技术有限公司 |
| Nc-细胞核/浆蛋白抽提试剂盒 | 康为世纪 |
| 小鼠抗人核因子 κ Bp65 抗体 | CST公司 |
| 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG、北京中杉金桥生物技术有限公司 | |
| β -Actin抗体 | |
| 人血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1、纤溶酶原激活剂抑制剂1检测试剂盒 | BD公司 |

实验方法:

实验分组: 将人脐静脉内皮细胞置于DMEM完全培养基(体积分数10%胎牛血清, 1%霉素-链霉素溶液)中, 于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中培养。取生长良好的第3-5代细胞用于实验。待细胞达80%左右融合时开始实验, 实验开始前无血清同步化过夜。

干细胞与内皮细胞共培养: 将人脐静脉内皮细胞悬液以 $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度1.5 mL接种于Transwell下室, 待细胞达80%左右融合时, 换无血清培养液孵育24 h, 使细胞生长同步化, 然后给予上述干预16 h后, 将人脐带间充质干细胞以 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 0.5 mL接种于Transwell上室, 置于

37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱中培养。

将人脐静脉内皮细胞分为 10 组:

| 组别 | 干预方法 |
|----------------------|---|
| (1)正常对照组(NG) | 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (2)甘露醇对照组(MA) | 5.5 mmol/L 葡萄糖+24.5 mmol/L 甘露醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (3)高糖组(HG) | 30 mmol/L 葡萄糖×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (4)白藜芦醇低剂量组(LR) | 30 mmol/L 葡萄糖+低剂量(0.1 μmol/L)白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (5)白藜芦醇中剂量组(MR) | 30 mmol/L 葡萄糖+中剂量(1 μmol/L)白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (6)白藜芦醇高剂量组(HR) | 30 mmol/L 葡萄糖+高剂量(10 μmol/L)白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖×6 d |
| (7)干细胞组(M) | 30 mmol/L 葡萄糖×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖+干细胞×6 d |
| (8)白藜芦醇低剂量+干细胞组(ML) | 30 mmol/L 葡萄糖+低剂量白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖+干细胞×6 d |
| (9)白藜芦醇中剂量+干细胞组(MM) | 30 mmol/L 葡萄糖+中剂量白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖+干细胞×6 d |
| (10)白藜芦醇高剂量+干细胞组(MH) | 30 mmol/L 葡萄糖+高剂量白藜芦醇×16 h 后转为 5.5 mmol/L 葡萄糖+干细胞×6 d |

表注: 各组分别于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养第 1, 4, 6 天收集细胞培养上清液, 提取细胞核蛋白进行以下指标检测。

Western blot 法检测细胞内核因子κBp65 表达: 于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养第 6 天将各组人脐静脉内皮细胞使用预冷 PBS 洗涤后, 使用细胞刮快速收集细胞于 EP 管中, 按照 Nc-细胞核/浆蛋白抽提试剂盒步骤提取细胞核蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。各组取 50 μg 蛋白行 12%SDS-PAGE 电泳及转膜。以核因子κBp65 抗体 (1 : 1 000)或β-Actin 抗体(1 : 1 000)4 °C 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(1 : 6 000)室温孵育 1 h, ECL 化学显影, 应用 Image Pro Plus 软件进行灰度分析。

ELISA 法检测细胞培养上清中血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平: 各组分别于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养第 1, 4, 6 天收集细胞培养上清液, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书步骤进行, 于 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值(A), 根据 A 值计算血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 的含量。

主要观察指标: ①细胞形态观察。②内皮细胞核因子κBp65 表达情况。③内皮细胞培养上清中血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 及纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若方差齐性, 各组均数比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞形态观察 人脐静脉内皮细胞融合后呈多角形

或短梭形, 排列紧密, 边界清晰, 在倒置显微镜下呈单层铺路石样。选择生长良好的第 3-5 代人脐静脉内皮细胞用于实验。30 mmol/L 葡萄糖刺激 16 h 后, 细胞边界略肿胀, 圆缩。经白藜芦醇预处理或联合间充质干细胞干预后, 随着前者浓度增加, 细胞形态得以改善。随着干预天数延长, 可见细胞皱缩, 并有死亡细胞及细胞碎片。

2.2 内皮细胞核因子κBp65 表达情况 正常组细胞核内核因子κBp65 表达不明显, 高糖组与正常组相比核因子κBp65 表达明显增多(P < 0.05), 高剂量白藜芦醇及其联合干细胞组、甘露醇组与正常组相比差异无显著性意义。与高糖组相比, 白藜芦醇及联合干细胞干预后内皮细胞核因子κBp65 表达呈剂量依赖性降低(P < 0.05), 而干细胞组与高糖组相比核因子κBp65 水平差异无显著性意义(图 1)。

2.3 内皮细胞培养上清中血管细胞黏附分子 1 水平 人脐静脉内皮细胞于高糖环境培养 16 h 后, 血管细胞黏附分子 1 水平高于正常组(P < 0.05), 甘露醇组血管细胞黏附分子 1 水平与正常对照组相比差异无显著性意义。恢复正常糖浓度培养后, 高糖组血管细胞黏附分子 1 水平持续上升, 高于正常组(P < 0.05), 甘露醇组与正常对照组相比血管细胞黏附分子 1 水平差异无显著性意义。干细胞组与高糖组相比血管细胞黏附分子 1 水平差异无显著性意义, 而用白藜芦醇或白藜芦醇联合干细胞干预后, 与高糖组相比血管细胞黏附分子 1 水平大致呈白藜芦醇剂量依赖性降低(P < 0.05), 但低剂量白藜芦醇组及低剂量白藜芦醇+干细胞组与高糖组比较差异无显著性意义(表 1)。

2.4 内皮细胞培养上清中单核细胞趋化蛋白 1 水平 人脐静脉内皮细胞于高糖环境培养 16 h 后, 单核细胞趋化蛋白 1 水平高于正常组(P < 0.05), 甘露醇组单核细胞趋化蛋白 1 水平与正常对照组相比差异无显著性意义。恢复正常糖浓度培养后, 高糖组单核细胞趋化蛋白 1 水平持续上升, 高于正常组(P < 0.05), 甘露醇组与正常组相比单核细胞趋化蛋白 1 水平差异无显著性意义。低剂量白藜芦醇组在第 4 天以及中、高剂量白藜芦醇单用或联合干细胞组单核细胞趋化蛋白 1 水平低于高糖组(P < 0.05), 低剂量白藜芦醇组、干细胞组及两者联合组在第 6 天单核细胞趋化蛋白 1 水平低于高糖组, 但差异无显著性意义(表 1)。

2.5 内皮细胞培养上清中纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平 与正常对照组相比, 高糖培养 16 h 后, 内皮细胞上清液中纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平升高(P < 0.05), 而甘露醇组纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平与正常对照组相比差异无显著性意义。恢复正常糖浓度培养后, 高糖组纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平持续上升, 且高于正常组(P < 0.05), 干细胞组与正常组相比纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平差异有显著性意义(P < 0.05), 甘露醇组与正常组相比纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平差异无显著性意义。低、中剂量白藜芦醇组及低剂量白藜芦醇+干细胞组在第 4 天纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平低于高糖组, 但差异无显著性意义, 低、中剂量白藜芦醇组

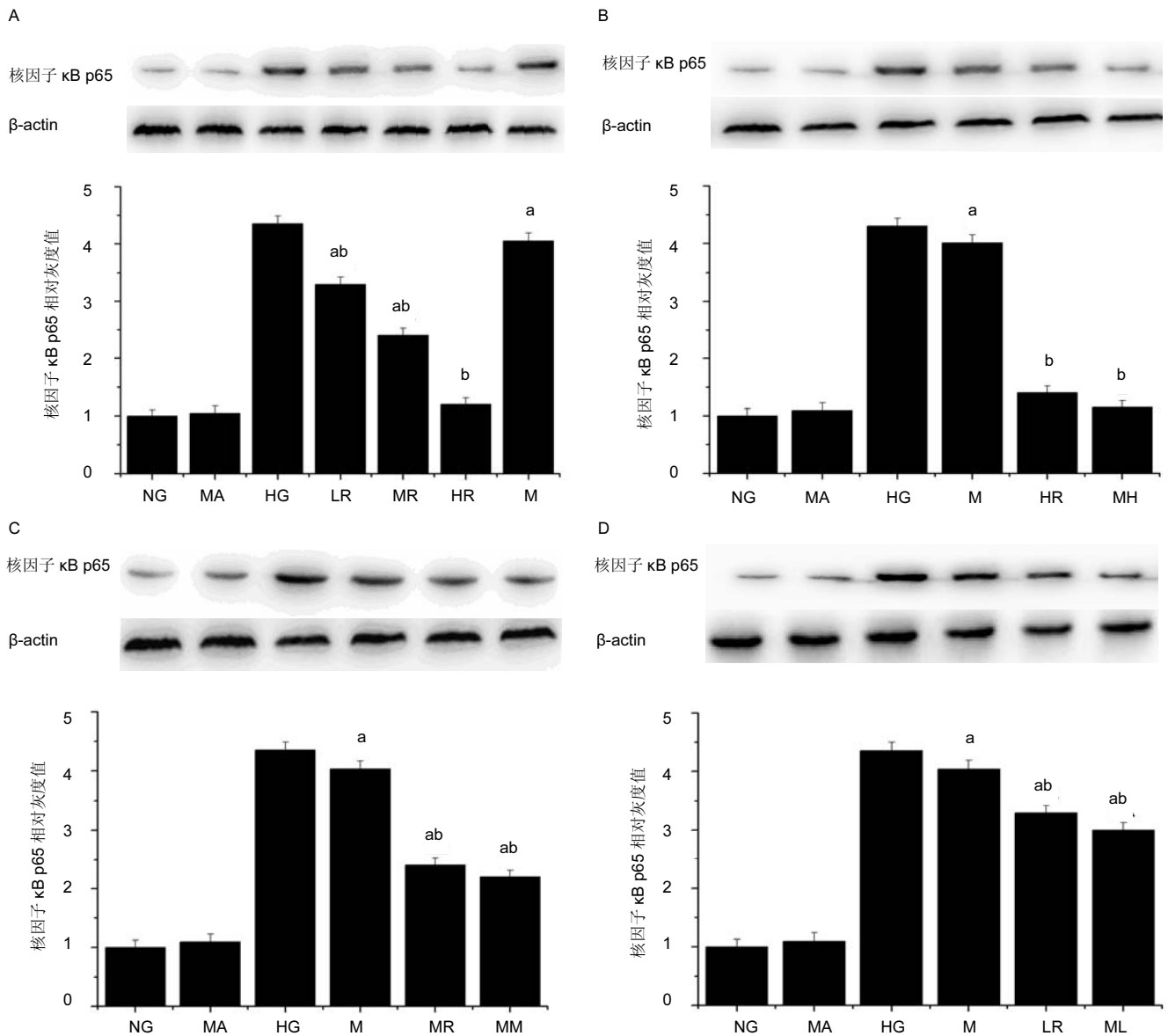


图 1 人脐静脉内皮细胞核因子 κBp65 表达情况

Figure 1 Expression of nuclear factor κBp65 of human umbilical vein endothelial cells

图注: ①NG: 正常对照组; MA: 甘露醇对照组; HG: 高糖组; LR: 白藜芦醇低剂量组; MR: 白藜芦醇中剂量组; HR: 白藜芦醇高剂量组; M: 干细胞组; ML: 白藜芦醇低剂量+干细胞组; MM: 白藜芦醇中剂量+干细胞组; MH: 白藜芦醇高剂量+干细胞组。②高糖组与正常组相比核因子 κB p65 表达明显增多 ($P < 0.05$), 与高糖组相比, 白藜芦醇或联合干细胞干预后内皮细胞核因子 κB p65 表达呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)。与正常糖组相比, ^a $P < 0.05$; 与高糖组相比, ^b $P < 0.05$ 。

第6天和高剂量白藜芦醇组及其联合干细胞组纤溶酶原激活剂抑制剂1水平平均低于高糖组 ($P < 0.05$), 见表1。

3 讨论 Discussion

实验参考El-Osta等^[9]的方法建立高血糖“代谢记忆”模型, 发现高糖诱导人脐静脉内皮细胞中核因子κB表达上调, 其上清液中血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1和纤溶酶原激活剂抑制剂1产生增多, 且在糖浓度恢复正常后仍持续上升, 这与Piga等^[12]的研究结果一致。

高糖诱发血管内皮细胞受损, 继而趋化单核细胞黏附并迁移至内皮下间隙是动脉粥样硬化形成早期的关键事件^[13], 这在内皮细胞代谢记忆损伤机制中扮演着重要角

色。而内皮细胞分泌的趋化因子如血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1等在上述过程中起重要作用。同时, 血管细胞黏附分子1、单核细胞趋化蛋白1等也可刺激内皮细胞和单核细胞等炎性细胞分泌更多的炎性细胞因子^[14], 从而加剧内皮细胞损伤的发生和发展。此外, 内皮细胞分泌的纤溶酶原激活剂抑制剂1是调节纤溶系统活性的重要因素, 其增加可以加剧糖尿病患者动脉粥样硬化血栓形成的风险^[15]。

白藜芦醇又名3, 5, 4三羟基反二苯代乙烯, 是一类存在于葡萄皮、百合科、蓼科等多种药用植物中的多酚类化合物, 以虎杖中的含量较高。近来研究发现^[3], 白藜芦醇具有改善糖尿病血管内皮细胞功能的作用, 那么其联合

表 1 各组人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 及纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平

Table 1 Levels of vascular cell adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 项目 | 正常对照组 | 甘露醇对照组 | 高糖组 | 白藜芦醇低剂量组 | 白藜芦醇中剂量组 |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 血管细胞黏附分子 1($\mu\text{g/L}$) | | | | | |
| 第 1 天 | 368.43±26.31 | 370.16±23.21 ^b | 546.02±29.53 ^a | 524.29±35.86 ^a | 459.71±31.54 ^{ab} |
| 第 4 天 | 358.47±11.78 | 369.67±11.94 ^b | 559.13±15.96 ^a | 511.30±27.19 ^{ab} | 448.16±15.29 ^{ab} |
| 第 6 天 | 366.48±10.85 | 368.67±9.76 ^b | 549.81±16.05 ^a | 516.13±27.73 ^a | 440.52±11.59 ^{ab} |
| 单核细胞趋化蛋白 1(ng/L) | | | | | |
| 第 1 天 | 227.90±11.05 | 228.21±16.79 ^b | 357.88±15.87 ^a | 343.63±23.42 ^a | 324.10±18.53 ^{ab} |
| 第 4 天 | 229.89±11.23 | 230.50±11.86 ^b | 363.20±14.50 ^a | 330.68±12.38 ^{ab} | 320.42±9.25 ^{ab} |
| 第 6 天 | 230.90±16.52 | 231.25±15.81 ^b | 360.09±16.61 ^a | 335.76±14.42 ^a | 305.28±18.85 ^{ab} |
| 纤溶酶原激活剂抑制剂 1($\mu\text{g/L}$) | | | | | |
| 第 1 天 | 38.13±6.99 | 38.30±7.48 ^b | 71.84±5.33 ^a | 64.35±5.03 ^a | 57.49±5.35 ^{ab} |
| 第 4 天 | 40.43±3.22 | 41.30±3.07 ^b | 72.85±6.42 ^a | 62.97±4.29 ^a | 60.93±6.84 ^a |
| 第 6 天 | 41.74±5.63 | 42.05±5.29 ^b | 75.16±4.06 ^a | 60.83±4.62 ^{ab} | 59.42±5.54 ^{ab} |
| 项目 | 白藜芦醇高剂量组 | 干细胞组 | 白藜芦醇低剂量+干细胞组 | 白藜芦醇中剂量+干细胞组 | 白藜芦醇高剂量+干细胞组 |
| 血管细胞黏附分子 1($\mu\text{g/L}$) | | | | | |
| 第 1 天 | 446.37±38.34 ^{ab} | 534.5±13.83 ^a | 493.00±28.72 ^a | 441.19±24.92 ^{ab} | 429.38±14.91 ^b |
| 第 4 天 | 456.67±16.79 ^{ab} | 536.63±13.24 ^a | 479.55±20.34 ^{ab} | 424.36±18.52 ^{ab} | 419.02±13.07 ^{ab} |
| 第 6 天 | 434.38±19.69 ^{ab} | 526.21±19.82 ^a | 481.46±12.03 ^{ab} | 420.41±11.87 ^{ab} | 412.34±12.67 ^{ab} |
| 单核细胞趋化蛋白 1(ng/L) | | | | | |
| 第 1 天 | 281.72±19.96 ^{ab} | 341.42±10.57 ^a | 337.14±21.45 ^a | 319.10±13.17 ^{ab} | 276.73±20.62 ^{ab} |
| 第 4 天 | 274.48±18.17 ^{ab} | 337.64±11.82 ^{ab} | 326.70±11.60 ^{ab} | 310.55±14.26 ^{ab} | 265.19±14.95 ^b |
| 第 6 天 | 275.40±18.40 ^{ab} | 332.17±14.63 ^a | 328.62±8.33 ^a | 304.55±14.51 ^{ab} | 261.51±10.31 ^{ab} |
| 纤溶酶原激活剂抑制剂 1($\mu\text{g/L}$) | | | | | |
| 第 1 天 | 48.81±3.99 ^b | 66.59±2.68 ^a | 59.47±5.63 ^a | 54.53±3.50 ^{ab} | 47.63±5.12 ^b |
| 第 4 天 | 50.45±4.51 ^b | 67.87±5.44 ^a | 60.36±6.07 ^a | 53.84±6.92 ^b | 46.49±5.16 ^b |
| 第 6 天 | 52.00±5.53 ^{ab} | 65.83±6.27 ^a | 58.91±4.52 ^{ab} | 55.23±6.05 ^b | 43.81±6.18 ^b |

表注: 高糖组各时间点血管细胞黏附分子 1 水平平均高于正常组($P < 0.05$); 与高糖组相比, 白藜芦醇组或白藜芦醇联合干细胞组血管细胞黏附分子 1 水平呈白藜芦醇剂量依赖性降低($P < 0.05$)。高糖组各时间点单核细胞趋化蛋白 1 水平高于正常组($P < 0.05$), 低剂量白藜芦醇组在第 4 天以及中、高剂量白藜芦醇单用或联合干细胞组单核细胞趋化蛋白 1 水平低于高糖组。高糖组和干细胞组各时间点纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平高于正常对照组($P < 0.05$), 低、中剂量白藜芦醇组第 6 天、高剂量白藜芦醇组及其联合干细胞组纤溶酶原激活剂抑制剂 1 水平平均低于高糖组。与正常组相比, ^a $P < 0.05$; 与高糖组相比, ^b $P < 0.05$ 。

具有自我更新能力的间充质干细胞是否能够进一步改善高糖诱导产生的不良记忆呢?

实验结果显示, 应用白藜芦醇预处理人脐静脉内皮细胞可以降低高糖诱导的内皮细胞的核因子 κB 水平, 减少炎症因子血管细胞黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1、纤溶酶原激活剂抑制剂 1 的产生, 且该作用在糖浓度恢复正常后仍持续存在, 这可使单核细胞向内皮细胞黏附降低, 进一步减轻血管炎症反应, 这一结果提示白藜芦醇逆转高糖诱导的内皮细胞损伤记忆可能与核因子 κB 通路有关。

κB 抑制蛋白(I κB)激酶(IKK)是核因子 κB 的激活物。IKK 可使 I κB 磷酸化而激活核因子 κB 。研究发现, 白藜芦醇可以通过上述途径, 抑制核因子 κB 通路, 发挥抗炎作用^[16]。另外, 白藜芦醇也可能通过抑制 β 干扰素 tolI /白细胞介素 1 受体结构域衔接蛋白(TRIF)和 TANK 结合激酶 1(TBK1)的表达, 调节核因子 κB 的激活程度^[17], 进而抑制炎症因子产生。Schober 等^[18]发现, 白藜芦醇还可以通过对 microRNA 的调节来发挥抗内皮细胞损伤的作用, 为治疗糖尿病血管病变提供了新的思考方向。

此外, 本研究结果显示干细胞组中上述蛋白及因子水

平变化与高糖组相比有所降低, 但差异无统计学意义, 白藜芦醇联合间充质干细胞干预人脐静脉内皮细胞较白藜芦醇预处理组差异无统计学意义, 提示间充质干细胞发挥内皮细胞保护作用可能不仅有赖于核因子 κB 通路。在短期内, 间充质干细胞缺乏足够时间生长、分化形成新组织, 其修复损伤内皮细胞的机制可能与细胞旁分泌有关^[4-5, 19]。尽管促进干细胞旁分泌的机制尚未完全阐明, 但近来研究多表明其受 JAK/STAT、p38MAPK 等多种细胞通路、表观遗传学及细胞代谢特点改变的影响。

综上所述, 白藜芦醇可能通过抑制核因子 κB 通路改善高糖诱导的内皮细胞代谢记忆损伤, 间充质干细胞发挥内皮细胞保护作用可能不仅有赖于核因子 κB 通路。由于白藜芦醇作用机制复杂, 且具有一定的剂量和组织特异性, 其血管保护作用有待进一步研究, 同时干细胞旁分泌的机制也有待进一步阐明, 但其仍为防治糖尿病血管并发症的发生、发展提供了新思路。

作者贡献: 第三作者负责实验设计, 第一作者负责实验实施, 第二作者评估, 采用盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 白藜芦醇-是多酚类化合物, 主要来源于葡萄(红葡萄酒)、虎杖、花生、桑椹等植物。白藜芦醇是一种生物性很强的天然多酚类物质, 又称为芪三酚, 是肿瘤的化学预防剂, 也是对降低血小板聚集, 预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病的化学预防剂。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem*. 2009;16(1):94-112.
- [2] 曹焯, 关新强, 徐志懿, 等. 白藜芦醇对心血管保护作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(23):4231-4237.
- [3] Xu Q, Hao X, Yang Q, et al. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(2):389-394.
- [4] Crisostomo PR, Abarbanell AM, Wang M, et al. Embryonic stem cells attenuate myocardial dysfunction and inflammation after surgical global ischemia via paracrine actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295: H1726-H1735.
- [5] Crisostomo PR, Wang M, Markel TA, et al. Stem cell mechanisms and paracrine effects: potential in cardiac surgery. *Shock*. 2007;28: 375-383.
- [6] Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, et al. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296(6):R1735-1743.
- [7] 林雪波, 周波, 孙芳, 等. 蛋白激酶C β 2-活性氧交互环介导高糖致内皮细胞损伤记忆效应[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(3):239-244.
- [8] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865):813-820.
- [9] Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, et al. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275(33):25781-25790.
- [10] El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008;205(10):2409-2417.
- [11] Migita H, Morser J. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) signals through retinoic acid receptor-related orphan receptor-alpha but not peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human vascular endothelial cells: the effect of 15d-PGJ2 on tumor necrosis factor-alpha-induced gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 ;25(4):710-716.
- [12] Piga R, Naito Y, Kokura S, et al. Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007; 193(2): 328-334.
- [13] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009;120(13): 1266-1286.
- [14] Seneviratne AN, Sivagurunathan B, Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2012 ;413(1-2):3-14.
- [15] Hoekstra T, Geleijnse JM, Schouten EG, et al. Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb Haemost*. 2004;91(5): 861-872.
- [16] Denk A, Goebeler M, Sybille S, et al. Activation of NF-kB via the I κ B Kinase Complex Is Both Essential and Sufficient for Proinflammatory Gene Expression in Primary Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2001;276(30):28451-28458.
- [17] Kim MH, Yoo DS, Lee SY, et al. The TRIF/TBK1/IRF-3 activation pathway is the primary inhibitory target of resveratrol, contributing to its broad-spectrum anti-inflammatory effects. *Pharmazie*. 2011;66(4):293-300.
- [18] Schober A, Thum T, Zernecke A. MicroRNAs in vascular biology-metabolism and atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2012;107(4):603-604.
- [19] Schächinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(8): 1690-1699.