

· 创面修复探索 ·

晚期糖基化终末产物与其受体对糖尿病创面氧化应激反应的影响

牛轶雯 缪明远 董炜 董叫云 曹晓赞 陆树良



【摘要】 目的 观察糖尿病患者皮肤和创面中晚期糖基化终末产物(AGE)的蓄积和炎症反应,并结合体外干预实验推测两者之间可能存在的关系。 **方法** 采集 10 例 2 型糖尿病患者(糖尿病组)和 12 例非糖尿病患者(非糖对照组)的皮肤和创面组织标本,部分于光学显微镜下观察胶原排列、细胞分布(HE 染色),AGE 及其受体(RAGE)表达(免疫组织化学染色);部分匀浆后采用 ELISA 法检测丙二醛含量。体外采集、分离健康人外周血中性粒细胞,并分为正常对照组(添加 RPMI-1640 培养液培养)、低浓度干预组、中浓度干预组和高浓度干预组,3 个干预组分别在 RPMI-1640 培养液中添加 AGE 修饰的人血清白蛋白,其中 AGE 的浓度依次为 0.315、0.625、1.250 mg/mL;噻唑蓝法检测细胞存活率,荧光探针二氢二氯荧光黄双乙酸钠测定细胞内活性氧水平。对数据进行 *t* 检验。 **结果** 与非糖对照组比较,糖尿病组皮肤组织中胶原萎缩,排列紊乱;创面组织中炎性细胞弥散分布,胶原排列稀疏紊乱。糖尿病组皮肤组织中 AGE 和 RAGE 表达均多于非糖对照组;2 组创面组织中 RAGE 呈阳性表达的细胞数量均多于所在组皮肤组织,以糖尿病组更显著,其创面内可见大量 RAGE 呈阳性表达的炎性细胞。糖尿病组患者皮肤和创面组织中每毫克蛋白丙二醛含量分别为 (6.3 ± 1.0) 、 (7.1 ± 2.4) nmol,均明显高于非糖对照组相应组织 [(2.9 ± 1.0) 、 (3.6 ± 1.4) nmol, *t* 值分别为 8.017、4.349, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。与正常对照组 [$(34 \pm 5)\%$]比较,低浓度干预组、中浓度干预组、高浓度干预组中性粒细胞存活率均明显上升 [$(59 \pm 8)\%$ 、 $(77 \pm 5)\%$ 、 $(67 \pm 6)\%$, *t* 值分别为 7.195、14.890、11.130, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。与正常对照组 (0.58 ± 0.06) 比较,低浓度干预组、中浓度干预组、高浓度干预组中性粒细胞内活性氧水平均升高 (1.67 ± 0.14) 、 (2.13 ± 0.17) 、 (3.48 ± 0.48) , *t* 值分别为 20.195、24.905、16.864, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。 **结论** 异常的氧化应激水平导致糖尿病皮肤具有异常的创伤修复起点,创面愈合过程中 AGE-RAGE 效应是影响糖尿病创面氧化应激水平的重要因素。

【关键词】 糖尿病; 氧化性应激; 糖基化终产物,高级; 皮肤; 创面愈合

Effects of advanced glycation end products and its receptor on oxidative stress in diabetic wounds

NIU Yi-wen, MIAO Ming-yuan, DONG Wei, DONG Jiao-yun, CAO Xiao-zan, LU Shu-liang. Shanghai Institute of Burns, Shanghai Research Center of Wound Repair, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding author: LU Shu-liang, Email: 13901738685@139.com, Tel: 021-64370045

【Abstract】 Objective To investigate the accumulation of advanced glycation end products (AGE) and the inflammatory response of skin and wound in diabetic patients, and to analyze their relationship in vitro. **Methods** Histological staining and immunohistochemical staining was respectively performed on skin and wound tissue specimens collected from 10 patients with Type II diabetes mellitus (diabetes group) and 12 non-diabetic patients with skin injury (control group) to observe the arrangement of collagen and the distribution of inflammatory cells, and to determine the expression levels of AGE and its receptor (RAGE). Malondialdehyde (MDA) levels in skin and wound tissue homogenates were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay. In vitro, human neutrophils were isolated and treated with RPMI-1640 culture medium or that containing AGE-human serum albumin in the concentration of 0.315, 0.625, 1.250 mg/mL, and they were identified as normal control (NC) group, low concentration (L) group, moderate concentration (M) group, and high concentration (H) group. Cell viability in each group was determined by MTT color-

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.01.008

基金项目:国家自然科学基金(30600645,30700871,81071568)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海市烧伤研究所,上海市创面修复研究中心

通信作者:陆树良,Email:13901738685@139.com,电话:021-64370045

metric assay, and the reactive oxygen species (ROS) in cell was measured with 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. Data were processed with *t* test. **Results** Compared with those of skin in control group, collagens of skin tissues in diabetes group atrophied and disorderly arranged. Inflammatory cells in wounds in diabetes group were dispersed, in which collagens arranged loosely and irregularly, as compared with those of wounds in control group. Expression levels of AGE and RAGE of skin in diabetes group were higher than those in control group. In diabetes and control groups, especially in diabetes group, the numbers of RAGE-positive cells in wound tissue were more than those in skin tissue. Large amount of inflammatory cells with positive expression of RAGE were observed in diabetes group. MDA level of skin and wound tissue in diabetes group was respectively (6.3 ± 1.0) , (7.1 ± 2.4) nmol per milligram protein, which were obviously higher than those in control group [(2.9 ± 1.0) , (3.6 ± 1.4) nmol per milligram protein, with *t* value respectively 8.017, 4.349, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. Cell viability and ROS levels in neutrophils were increased in L, M, and H groups [$(59 \pm 8)\%$, $(77 \pm 5)\%$, $(67 \pm 6)\%$ and 1.67 ± 0.14 , 2.13 ± 0.17 , 3.48 ± 0.48] as compared with those in NC group [$(34 \pm 5)\%$ and 0.58 ± 0.06 , with *t* value respectively 7.195, 14.890, 11.130 and 20.195, 24.905, 16.864, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. **Conclusions** Abnormal oxidative stress in diabetic skin leads to an atypical origin of wound repair. AGE-RAGE effect is a critical mediator for oxidative stress in diabetic wound tissue during wound healing.

【Key words】 Diabetes Mellitus; Oxidative stress; Glycosylation end products, advanced; Skin; Wound healing

糖尿病患者自发溃疡和创面难愈是常见的临床现象,创面呈现异常炎症反应伴修复迟滞的病理特征。糖尿病状态下源于糖代谢紊乱的晚期糖基化终末产物(AGE)蓄积于皮肤和(或)创面,是糖尿病创面愈合环境变化的重要生化特征^[1-2],对糖尿病创面的炎症反应究竟会产生何种影响尚不明确。本研究拟观察糖尿病患者皮肤组织和溃疡创面组织中 AGE 的蓄积和炎症反应,并结合体外干预实验推测两者之间可能存在的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本采集与处理

所采集的溃疡创面组织或皮肤组织标本来源于 2004 年 5 月—2005 年 11 月广西医科大学第一附属医院烧伤整形康复中心收治的 10 例糖尿病患者(糖尿病组)、12 例非糖尿病患者(非糖对照组,均无各类慢性疾病),患者均知情同意。糖尿病组患者中女 3 例、男 7 例,年龄 (57 ± 11) 岁;参照 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准确诊符合 2 型糖尿病,糖尿病病程 2~15 年(中位数为 6.5 年),糖化血红蛋白水平 $(8.0 \pm 0.3)\%$ 。非糖对照组患者中女 4 例、男 8 例,年龄 (54 ± 9) 岁。溃疡创面形成时间为 2~11 个月,面积为 20~60 cm²,深达皮肤全层,无骨髓炎,致伤原因为外伤或下肢静脉溃疡。皮肤组织标本来源于自体全厚皮移植术后弃用皮片。采集的创面组织和皮肤组织标本,部分行石蜡包埋切片,用于组织学观察;部分进行匀浆处理,用于丙二醛含量的检测。

1.2 组织学观察

1.2.1 HE 染色 采用光学显微镜(日本 Olym-

pus 公司)观察组织胶原排列和细胞分布。

1.2.2 免疫组织化学法观察 AGE 及其受体(RAGE)的表达 参照生物素-链霉亲和素-过氧化物酶染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明书操作,采用 KS400 型图像分析仪(德国 Carl Zeiss 公司)检测皮肤组织中 AGE(日本 Trans Genic 公司,抗体稀释度为 1:100)的阳性表达和皮肤组织、创面组织中 RAGE(加拿大 Chemicon Temecula 公司,抗体稀释度为 1:200)的阳性表达。

1.3 丙二醛含量测定

采用双抗体两步夹心 ELISA 法,参照试剂盒(美国 R&D 公司)说明书测定丙二醛含量。

1.4 体外制备 AGE 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA)

按照文献[3-4]方法,将 1.75 mg/mL 纯化 HSA 加入含 200 mmol/L D-葡萄糖、100 μg/mL 青霉素、50 μg/mL 庆大霉素、1.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟的 PBS,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中 60 d。采用不含 D-葡萄糖的 HSA 作对照。孵育结束后透析去除未结合葡萄糖,荧光分光光度法鉴定后用于体外干预实验。

1.5 体外干预实验

1.5.1 标本采集与分组 健康男性志愿者,年龄 25~36 岁,体质量 60~80 kg,均无各类慢性疾病如糖尿病、肿瘤等且签署知情同意书。采集每名志愿者 5 mL 外周抗凝血,缓慢滴入 5 mL 中性粒细胞分离液(瑞典 Axis-Shield 公司),470 × *g* 离心 35 min,收集白细胞层,采用无菌 RPMI-1640 培养液(美国 Sigma 公司)洗涤细胞(体积比大约为 2:1),400 × *g*

离心 20 min, RPMI-1640 培养液清洗 2 遍并重新悬浮细胞。经锥虫蓝染色计数, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

将中性粒细胞分为正常对照组(培养液中不添加 AGE-HSA)、低浓度干预组、中浓度干预组、高浓度干预组, 干预组细胞培养液中均添加 AGE-HSA, AGE 浓度依次为 0.315、0.625、1.250 mg/mL。各组细胞均置于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 孵育箱中培养 30 min。

1.5.2 中性粒细胞存活率和其内活性氧水平的检测 收集 4 组细胞悬液于 $400 \times g$ 离心 20 min, 噻唑蓝法检测细胞存活率; 荧光探针二氢二氯荧光黄双乙酸钠测定细胞内活性氧水平, 均按照试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书操作。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行组间两两比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 皮肤组织和创面组织的组织学观察

2.1.1 HE 染色 200 倍视野下, 非糖对照组患者真皮浅层胶原纤细、排列疏松, 深层胶原束纵横分布; 糖尿病组患者真皮深、浅层胶原萎缩且呈杂乱松散排列, 浅层胶原纤细且分布广泛。400 倍视野下, 非糖对照组患者溃疡创面炎性细胞局灶浸

润, 修复细胞分布较集中, 并可见交错排列的束状胶原纤维和散在分布的血管结构; 糖尿病组患者溃疡创面炎性细胞弥散分布, 胶原纤细且排列稀疏紊乱, 血管样结构及修复细胞分布较少。见图 1。

2.1.2 AGE 和 RAGE 的分布 糖尿病组患者皮肤组织中 AGE 阳性表达明显多于非糖对照组, 主要分布在细胞质、真皮基质和血管基底膜周围; RAGE 主要分布于细胞表面, 糖尿病组患者真皮层细胞表面 RAGE 的阳性表达明显多于非糖对照组。2 组患者溃疡创面组织中 RAGE 呈阳性表达的细胞均多于所在组皮肤组织, 以糖尿病组更甚, 其创面内可见大量炎性细胞表达 RAGE。见图 2, 3。

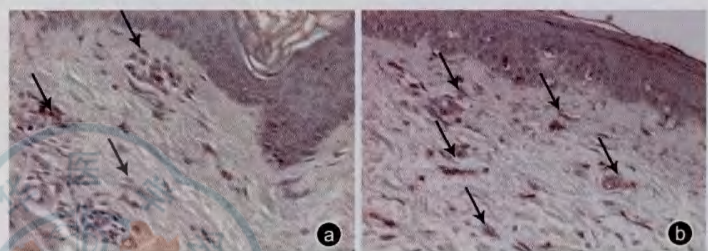


图 2 2 组患者皮肤组织中晚期糖基化终末产物(AGE)的分布(棕黄色, ↓) 生物素-链霉亲和素-过氧化物酶 $\times 200$ 。a. 非糖对照组皮肤组织中 AGE 表达于细胞质和真皮基质; b. 糖尿病组皮肤组织中 AGE 表达明显增多, 主要分布在细胞质、真皮基质和血管基底膜周围

2.2 皮肤组织和创面组织中丙二醛含量

糖尿病组患者皮肤和创面组织中每毫克蛋白丙二醛含量分别为 (6.3 ± 1.0) 、 (7.1 ± 2.4) nmol, 均明显高于非糖对照组患者相应组织 $[(2.9 \pm 1.0)$ 、

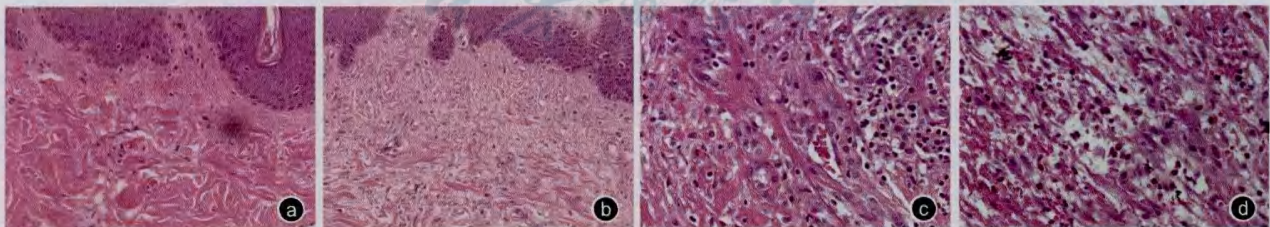


图 1 2 组患者皮肤组织和溃疡创面组织的组织学观察。a. 非糖对照组真皮浅层的胶原纤细、排列疏松, 深层的胶原束纵横分布 HE $\times 200$; b. 糖尿病组真皮胶原萎缩且呈杂乱松散排列 HE $\times 200$; c. 非糖对照组溃疡创面炎性细胞局灶浸润, 束状胶原纤维交错分布, 伴散在血管结构 HE $\times 400$; d. 糖尿病组溃疡创面炎性细胞散在分布, 纤细胶原排列稀疏, 血管样结构及修复细胞分布较少 HE $\times 400$



图 3 2 组患者皮肤组织和溃疡创面组织中晚期糖基化终末产物受体(RAGE)的分布(棕黄色, ↓)。a. 非糖对照组皮肤组织中有少量 RAGE 阳性表达细胞 生物素-链霉亲和素-过氧化物酶(SP) $\times 400$; b. 糖尿病组皮肤组织中 RAGE 阳性表达细胞明显增多 SP $\times 400$; c. 非糖对照组创面组织中可见 RAGE 阳性表达细胞 SP $\times 200$; d. 糖尿病组创面组织中 RAGE 阳性表达细胞明显增多, 并可见大量炎性细胞表达 RAGE SP $\times 200$

(3.6 ± 1.4) nmol, t 值分别为 8.017、4.349, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

2.3 AGE 干预对中性粒细胞存活率的影响

正常对照组细胞存活率为 (34 ± 5)% ; 低浓度干预组、中浓度干预组、高浓度干预组的细胞存活率分别为 (59 ± 8)%、(77 ± 5)%、(67 ± 6)% , 均明显高于正常对照组 (t 值分别为 7.195、14.890、11.130, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 AGE 干预对中性粒细胞内活性氧水平的影响

正常对照组细胞内活性氧水平为 0.58 ± 0.06 ; 低浓度干预组、中浓度干预组、高浓度干预组细胞内活性氧水平分别为 1.67 ± 0.14 、 2.13 ± 0.17 、 3.48 ± 0.48 , 均明显高于正常对照组 (t 值分别为 20.195、24.905、16.864, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

糖代谢紊乱的高糖环境促进了碳水化合物和蛋白质之间非酶促糖基化反应产物——AGE 的形成, 是导致修复细胞、ECM 和调控因子等愈合环节变化的上游事件^[1,5]。RAGE 是介导糖基化产物病理效应的关键途径之一, 引起的细胞效应与表达 RAGE 的细胞类型密切相关, 涉及细胞因子分泌、氧化应激、细胞分化增殖等, 炎性细胞表面 RAGE 通路的激活介导了炎症反应的启动、放大和维持, 可引起过强的氧化应激从而造成组织损害^[2,6-8]。本研究关于 AGE 和 RAGE 的分布结果提示, 在 AGE 蓄积的糖尿病创面环境中, RAGE 的表达增高, 为糖基化产物病理效应的发挥提供了结构基础。

丙二醛作为细胞脂质成分多价不饱和脂肪酸的氧化产物, 其在组织中的浓度间接反映细胞膜氧化受损程度^[9]。组织中的氧化应激产生与炎症反应密切相关, 炎性细胞激活产生大量活性氧, 调节炎症反应进程, 但持续过度的活性氧将导致组织损伤从而进一步放大炎症反应的级联效应^[10]。本研究 HE 染色和丙二醛检测结果提示, 糖尿病皮肤在未受到外源性损伤时已经存在过强的氧化应激反应, 并且持续存在于整个创面愈合过程, 一方面可引起组织受损, 另一方面该预激反应可导致创伤后氧化应激无法满足修复需要从而使创面迁延难愈。外源性创伤前糖尿病皮肤组织是否已存在内源性刺激? 糖尿病皮肤和创面过强的氧化应激反应与局部 AGE 蓄积的生化环境是否有直接关系? 在创伤修复过程中, 与炎症反应密切相关的大部分活性氧来源于中性粒细胞和巨噬细胞, 也有一部分源自 Fb 和内皮细

胞^[10-11]。有证据表明, 慢性溃疡创面活性氧的产生与中性粒细胞相关^[12]。中性粒细胞的适度活化是创面愈合的基础, 但其过度活化会加重组织损伤, 延迟创面愈合。体外实验证实 AGE 在一定浓度范围内可促使中性粒细胞存活, 提高该细胞内活性氧的水平, 提示中性粒细胞在 AGE 蓄积的环境中数量增多、氧化应激水平增高, 可导致组织中氧代谢产物含量增加。糖尿病创面中大量 RAGE 阳性表达的炎性细胞, 已在 AGE 蓄积的生化环境和糖尿病创面过强的氧化应激反应之间建立了联系。

由此可见, 糖尿病皮肤组织呈现异常的氧化应激水平导致其具有异常的创伤和(或)修复起点, 势必影响后续创面的炎症反应进程, 局部愈合环境中的 AGE-RAGE 效应是影响糖尿病创面氧化应激水平的重要因素。

参考文献

- [1] 杨宗城. 中华烧伤医学. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 449-460.
- [2] Niu Y, Xie T, Ge K, et al. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products. *Am J Dermatopathol*, 2008, 30(4):344-351.
- [3] Hou FF, Owen WF Jr. Beta 2-microglobulin amyloidosis: role of monocytes/macrophages. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002, 11(4):417-421.
- [4] 林炜栋, 陆树良, 青春, 等. 晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白对入血管内皮细胞的生长抑制作用. *中华医学杂志*, 2003, 83(7):572-576.
- [5] 陆树良, 谢挺, 牛轶雯. 创面难愈机制研究——糖尿病皮肤的“微环境污染”. *中华烧伤杂志*, 2008, 24(1):3-5.
- [6] Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, et al. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*, 2010, 17(21):2232-2252.
- [7] Ding Y, Kantarci A, Hasturk H, et al. Activation of RAGE induces elevated O_2^- generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(2):520-527.
- [8] Lindsey JB, Cipollone F, Abdullah SM, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diab Vasc Dis Res*, 2009, 6(1):7-14.
- [9] Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in Phalaenopsis. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(3):213-223.
- [10] Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(5):452-461.
- [11] 董炜, 谢挺, 董叫云, 等. 晚期糖基化终末产物对中性粒细胞生物学行为的影响. *中华烧伤杂志*, 2008, 24(1):9-12.
- [12] James TJ, Hughes MA, Cherry GW, et al. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen*, 2003, 11(3):172-176.

(收稿日期:2011-09-08)

(本文编辑:莫愚)