

· 难愈创面的研究 ·

# 晚期糖基化终末产物对中性粒细胞生物学行为的影响



董炜 谢挺 董叫云 金曙雯 花兰女 宋菲 青春 陆树良

**【摘要】** 目的 观察晚期糖基化终末产物(AGE)对中性粒细胞生物学行为的影响,了解皮肤组织中 AGE 蓄积与糖尿病愈合中异常炎症反应的关系。方法 体外分离培养 SD 大鼠中性粒细胞。在细胞悬液中加入不同的刺激物,根据所加物质分为:对照组,加入 RPMI 1640 培养液;A 组,加入 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640;B 组,加入 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640;C 组,加入 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640。噻唑蓝法检测中性粒细胞活力;反转录-PCR 法检测 L-选择素 mRNA 表达;酶联免疫吸附测定法检测中性粒细胞弹性蛋白酶释放量;二氢二氯荧光黄二醋酸盐法检测中性粒细胞内活性氧水平。结果 A、B、C 组中性粒细胞活力( $0.320 \pm 0.030$ 、 $0.380 \pm 0.020$ 、 $0.290 \pm 0.010$ )均高于对照组( $0.170 \pm 0.040$ ,  $P < 0.05$ )。各实验组 L-选择素 mRNA 表达水平(A 组  $0.95 \pm 0.08$ 、B 组  $1.36 \pm 0.27$ 、C 组  $0.50 \pm 0.26$ )、弹性蛋白酶释放量(A 组  $1.98 \pm 0.43$ 、B 组  $2.50 \pm 0.43$ 、C 组  $2.01 \pm 0.18$ )、活性氧水平(A 组  $1.64 \pm 0.20$ 、B 组  $2.16 \pm 0.26$ 、C 组  $3.26 \pm 0.75$ )也均高于对照组(此 3 项指标分别为  $0.36 \pm 0.26$ 、 $0.91 \pm 0.21$ 、 $0.72 \pm 0.15$ ,  $P < 0.05$ )。结论 AGE 能增强中性粒细胞活力,使细胞的多种生物学行为发生改变,这可能是糖尿病异常炎症反应的主要原因之一。

**【关键词】** 中性粒细胞; 糖尿病; 糖基化终产物,高级

Effects of advanced glycosylation end products on the biological behavior of neutrophils DONG Wei, XIE Ting, DONG Jiao-yun, JIN Shu-wen, HUA Lan-nv, SONG Fei, QING Chun, LU Shu-liang. Department of Burns, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, P. R. China Corresponding author: LU Shu-liang, Email: sllu@sh163.net, Tel: 021-64675394

**【Abstract】** Objective To investigate the effects of advanced glycation end products (AGE) on the biological behavior of neutrophils in vitro, to look for the relationship between accumulation of AGE and abnormal inflammation in wound healing in diabetic mellitus patients. Methods Neutrophils were isolated from SD rats and incubated in vitro. The cells were divided into four groups according to different concentrations of AGE in cell suspension: control group (C, with treatment of RPMI-1640), A group (with treatment of 0.315 mg/mL AGE + RPMI-1640), B group (with treatment of 0.625 mg/mL AGE + RPMI-1640), D group (with treatment of 1.250 mg/mL AGE + RPMI-1640). Activity of neutrophils were determined by MTT colorimetric assay. Selectin-L mRNA expressions were analyzed by reversible transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The levels of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils were measured with DCFH-DA method. The protein concentration of neutrophil elastase (NE) was assayed by ELISA. Results The activity of neutrophils were obviously increased in A, B, and D groups when compared with that in C group [ $(0.170 \pm 0.040)$  in C group,  $(0.320 \pm 0.030)$  in A group,  $(0.380 \pm 0.020)$  in B group,  $(0.290 \pm 0.010)$  in D group,  $P < 0.05$ ]. The expression of Selectin-L mRNA in A, B, D groups were significantly higher than that in C group ( $0.95 \pm 0.08$ ,  $1.36 \pm 0.27$ ,  $0.50 \pm 0.26$ . vs.  $0.36 \pm 0.26$ ,  $P < 0.05$ , respectively). The ROS levels in A, B, D groups was markedly higher than that in C group ( $1.64 \pm 0.20$ ,  $2.16 \pm 0.26$ ,  $3.26 \pm 0.75$ . vs.  $0.72 \pm 0.15$ ,  $P < 0.05$ , respectively). The levels of NE in A, B, D groups were significantly increased when compared with that in C group ( $1.98 \pm 0.43$ ,  $2.50 \pm 0.43$ ,  $2.01 \pm 0.18$  vs.  $0.91 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ , respectively). Conclusion AGE can enhance the activity of neutrophil, with change in cellular biological behaviors, which may be one of main reasons for abnormal inflammation in wounds of diabetes mellitus patients.

**【Key words】** Neutrophils; Diabetes mellitus; Glycosylation end products, advanced

基金项目:国家自然科学基金(30471784、30570705、30600645)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科(董炜、董叫云、金曙雯、花兰女、宋菲、青春、陆树良);武汉市第三医院烧伤科(谢挺)

通讯作者:陆树良,Email:sllu@sh163.net,电话:021-64675394

研究表明,在无创伤的糖尿病皮肤中可见局灶性的慢性炎性细胞浸润,创伤后皮肤组织中的炎性细胞呈急性弥散分布,而非正常创伤后所见的炎性反应带<sup>[1]</sup>。这提示,糖尿病皮肤组织中存在着异常的炎性反应应答。糖尿病是以持续高血糖为基本生化特征的代谢性疾病,长期高血糖引发的非酶促糖基化反应是主要的代谢活动之一,其生化结局是局部高糖及晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)蓄积<sup>[2]</sup>。AGE 具有广泛的生物学活性,通过与膜受体结合引起组织、细胞功能紊乱,已证实其参与了糖尿病并发症,包括难愈创面发生、发展的诸多环节<sup>[2-3]</sup>。本研究通过观察 AGE 对中性粒细胞生物学行为的影响,拟探讨皮肤组织中糖基化产物蓄积与糖尿病创面愈合之间的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 体外制备 AGE 修饰的蛋白质

将 1.75 g 纯化的人血白蛋白加入到每升含 200 mmol D-葡萄糖、100 mg 青霉素、50 mg 庆大霉素和 1.5 mmol 苯甲基磺酰氟的磷酸盐缓冲液(PBS)中,于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 中孵育 60 d。用不含 D-葡萄糖的人血白蛋白作对照。孵育结束后,透析除去未结合的葡萄糖<sup>[4]</sup>。

### 1.2 细胞来源及处理

清洁级雄性 SD 大鼠(中国医学科学院上海实验动物中心),体质量 200 ~ 220 g,8 ~ 10 只。经腹主动脉采血约 10 mL,肝素抗凝,200 × g 离心 20 min。收集富白细胞层(LRP),用 PBS 稀释。在另一玻璃管中依次加入 Percoll、Lymphoprep 分离液各 3 mL、LRP 5 mL,800 × g 离心 60 min。取第 2 层细胞沉淀,经 PBS 反复洗涤后,用 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司)重新悬浮。锥虫蓝计数,调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL。根据在细胞悬液中所加干预物质的不同分为:对照组,加入 RPMI 1640 培养液;A 组,加入 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640;B 组,加入 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640;C 组,加入 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640。各组均置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 30 min。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力** 将干预后的中性粒细胞悬液离心后,接种于 96 孔板。每孔加入 100 μL MTT 液(美国 Sigma 公司),37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 后,离心半径 18 cm,1500 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 300 μL 二甲亚

砷(美国 Sigma 公司),37 ℃ 孵育 15 min,充分振荡至颗粒溶解,用酶标仪(美国 Beckman 公司)在波长 570 nm 处测定吸光度值。

**1.3.2 L-选择素 mRNA 水平的检测** 参照 Trizol 试剂盒(美国 Gibco 公司)说明书,提取中性粒细胞总 RNA,测吸光度值,定量至 25 nmol/L。反转录-PCR 法检测 L-选择素 mRNA 表达。引物为 5'-CAC-CCAGAGGGACTTATGGA-3',5'-GTTCCATTTGCCTGCATCTT-3',终产物 403 bp。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min、变性 40 s,60 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 30 个循环。PCR 产物用凝胶扫描分析仪(美国 Bio-Rad 公司)行半定量分析。

**1.3.3 弹性蛋白酶释放量** 收集各组中性粒细胞培养上清液,参照酶联免疫吸附测定试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)说明书,测定中性粒细胞弹性蛋白酶的释放量。

**1.3.4 中性粒细胞内活性氧水平的检测** 二氢二氯荧光黄二醋酸盐检测中性粒细胞内活性氧水平,操作按试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书进行。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SAS 6.02 统计软件行数据处理。均数间的两两比较采用双样本等方差假设 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 中性粒细胞活力

经不同浓度 AGE 干预 30 min 后,各实验组中性粒细胞活力均明显增强 ( $P < 0.05$ ),当 AGE 浓度为 0.625 mg/mL 时细胞活力达峰值。见图 1。

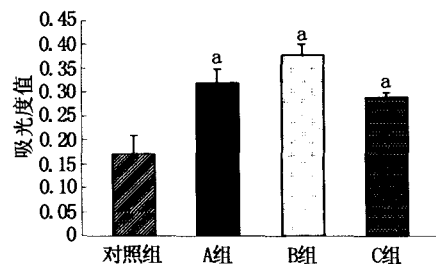


图 1 晚期糖基化终末产物(AGE)对各组中性粒细胞活力的影响。A 组 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激,B 组 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激,C 组 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激;与对照组比较,\* $P < 0.05$

### 2.2 L-选择素 mRNA 的表达

与对照组相比,各实验组中性粒细胞 L-选择素 mRNA 的表达均上调 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

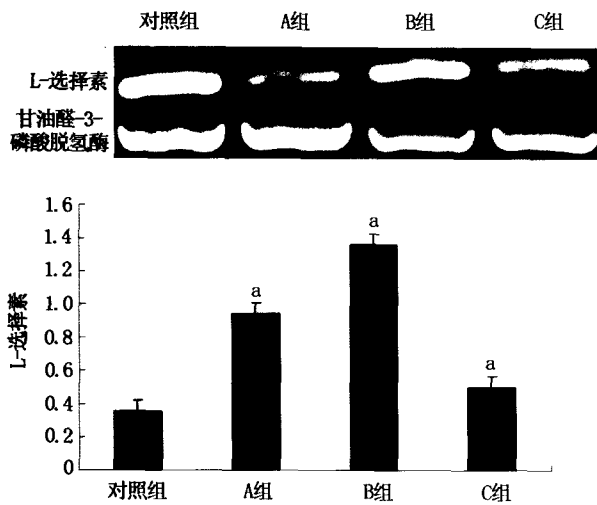


图 2 晚期糖基化终末产物 (AGE) 对各组中性粒细胞 L-选择素 mRNA 表达的影响。A 组 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, B 组 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, C 组 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激; 与对照组比较, \* $P < 0.05$

### 2.3 中性粒细胞弹性蛋白酶释放量

AGE 干预后各实验组中性粒细胞弹性蛋白酶释放量均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

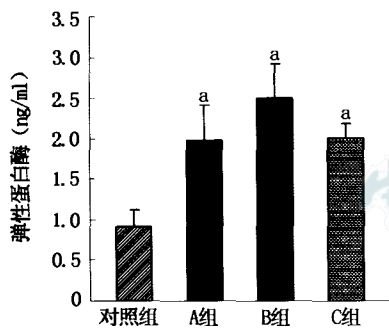


图 3 晚期糖基化终末产物 (AGE) 对各组中性粒细胞弹性蛋白酶释放量的影响。A 组 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, B 组 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, C 组 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激; 与对照组比较, \* $P < 0.05$

### 2.4 中性粒细胞内活性氧水平

对照组中性粒细胞活性氧含量水平较低; 加入 AGE 后, 其活性氧释放量逐渐增加, 其中 C 组最高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

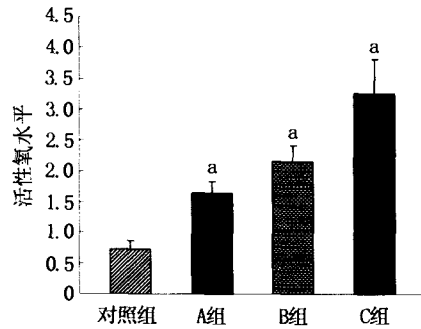


图 4 晚期糖基化终末产物 (AGE) 对各组中性粒细胞细胞内活性氧水平的影响。数据以二氢二氯荧光黄二醋酸盐荧光值表示; A 组 0.315 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, B 组 0.625 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激, C 组 1.250 mg/mL AGE + RPMI 1640 刺激; 与对照组比较, \* $P < 0.05$

介导修复过程的序贯发生, 适度的炎症反应在创面修复中具有积极的意义。但炎症反应过程中激活和释放的炎症介质也可造成组织损伤。因此, 炎症反应被称为一把“双刃剑”<sup>[5]</sup>。

L-选择素作为黏附分子家族中的重要成员, 有助于中性粒细胞在损伤部位的募集<sup>[6]</sup>。本实验结果表明, AGE 可以显著促进中性粒细胞 L-选择素 mRNA 的表达。我们前期的实验也观察到, 正常皮肤创伤后在坏死组织和正常组织之间可见清晰的以中性粒细胞浸润为主的炎症反应带, 而糖尿病皮肤伤后表现为中性粒细胞弥散分布的组织学改变<sup>[1]</sup>。我们认为, 这可能与 AGE 通过上调中性粒细胞膜表面黏附分子的表达, 使得中性粒细胞的迁移趋化功能亢进有关。中性粒细胞迁移趋化功能亢进使其不仅对创伤局部的坏死组织和细胞因子等趋化因素产生应答, 而且可能对于皮肤组织中存在的经糖基化修饰的蛋白质等也表现出过度的反应, 从而呈现弥散分布的组织学特征。

正常机体中, 适度的氧化应激反应和适量的蛋白水解酶的释放, 是中性粒细胞发挥其正常功能的体现, 但过度的氧化应激反应和蛋白水解酶的释放则会引起组织损伤。一些活性氧成分能通过脂质过氧化作用破坏细胞 DNA 结构, 氧化蛋白质中的巯基基团即降解细胞外基质成分, 破坏细菌关键蛋白质、脂质、血红蛋白及核酸成分, 最终导致细胞死亡<sup>[7]</sup>。中性粒细胞所含的中性蛋白水解酶可消化多种生物活性物质, 降解细胞壁和细胞膜, 增加细胞毒性作用。本实验结果显示, 与正常状态比较, AGE 提高了中性粒细胞的氧化应激水平, 同时诱导细胞释放过量的弹性蛋白酶, 这些异常改变不仅不利于组织修复的顺利进行, 而且将加重组织损伤。中性粒细

### 3 讨论

炎症反应是机体消除有害因素的防御反应, 是组织修复的基础。炎症细胞通过活性氧及酶类的释放等机制, 产生抗菌和清除坏死组织等一系列效应, 同时通过自分泌、旁分泌等方式分泌多种细胞因子

胞介导的炎性反应强度不仅决定于细胞的趋化、黏附、分泌等功能,也与细胞本身的活力密切相关。本实验显示,AGE 干预后中性粒细胞的活力显著增强,提示 AGE 可以导致中性粒细胞在数量和功能上过度活化,共同参与组织损伤。研究表明,糖尿病患者存在所谓的“亚临床炎性反应”,患者并没有明显的炎性反应表现,但是其血液中的炎性因子含量超过正常人<sup>[8]</sup>。本研究证实,经糖基化产物导致的中性粒细胞生物学行为的改变,可能是介导糖尿病异常炎性反应的主要因素之一,而这一系列异常炎性反应,也是糖尿病皮肤“隐性损害”的发生机制之一,将导致创伤后创面难以愈合。

值得注意的是,本实验条件下,AGE 对中性粒细胞功能的影响并非均一地呈现剂量依赖性。这种现象提示,AGE 对中性粒细胞的影响可能存在某个阈值,即当体内糖基化产物蓄积达到一定程度时,即可导致中性粒细胞的功能异常。

参考文献

- [1] 陆树良,青春,谢挺,等. 糖尿病皮肤“隐性损害”的机制研究. 中华创伤杂志,2004,20(8):468-473.
- [2] 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血管内皮细胞的生长抑制作用. 中华医学杂志,2003,83(7):572-576.
- [3] 田鸣,青春,牛轶雯,等. 晚期糖基化终末产物对表皮角质形成细胞功能的影响及其机制. 中华创伤杂志,2006,22(10):779-782.
- [4] Hou FF, Owen WF. Beta 2 - microglobulin amyloidosis : role of monocytes/macrophAGE. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002, 11(4):417-421.
- [5] 陆树良,史济湘. 烧伤创面愈合机制与新技术. 北京:人民军医出版社,2003:12-18.
- [6] Maekawa K, Futami S, Nishida M, et al. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. J Trauma,1998,44(3):460-468.
- [7] Barbul A, Regan MC. Immune involvement in wound healing. Otolaryngol Clin North Am,1995,28(5):955-968.
- [8] Nishimura F, Soga Y, Iwamoto Y, et al. Periodontal disease as part of the insulin resistance syndrome in diabetic patients. J Int Acad Periodontol,2005,7(1):16-20.

(收稿日期:2007-08-28)

(本文编辑:张红)

读者·作者·编者

关于在杂志上刊载照片的说明

为保证印刷质量,凡需要发表在本刊的所有照片(包括黑白及彩色照片),请尽量提供分辨率在 300 像素/英寸以上的数码照片;如果是传统照片,请用信函形式邮寄至编辑部,切不可自行扫描处理,否则编辑部不予刊载。

本刊编辑部

· 消息 ·

第六届全国创伤修复(愈合)与组织再生学术交流会征文通知

由中华医学会创伤学分会组织修复学组主办、苏州市医学会和苏州大学附属第一医院承办的第六届全国创伤修复(愈合)与组织再生学术交流会定于 2008 年 10 月 24 ~ 27 日在江苏苏州举行。

征文内容:创(烧)伤修复与组织再生的基础研究与临床治疗,创(烧)伤修复失控的基础研究与临床治疗,高新技术与创伤修复和组织再生,传统医学与创伤修复与组织再生,内脏损伤发生机制与修复,机体其他部位的损伤与修复,与修复有关的护理问题,与修复相关的其他医药产业化等,与修复及再生有关的伦理遗传与法规,与组织修复及再生有关的管理与教育等。

征文要求:未曾发表过论文或摘要 1 份,摘要 500 字以内,摘要内容按文题、目的、方法、结果、结论顺序排列。来稿注明作者单位及邮编、城市、作者姓名。请邮寄打印稿并盖公章,信封上注明会议征文同时附寄该文的软盘,或发送电子邮件。拟参加优秀论文评选者,另附第一作者年龄、职务与职称。符合发表要求的论文将优先发表在国家级统计源期刊。截稿日期:2008 年 7 月 31 日。证书颁发:参加会议者授予国家级 I 类继续教育学分 10 分。

收稿地址:江苏省苏州市苏州大学附属第一医院烧伤整形外科李永林主任,邮编:215006,电子邮件:yonglinl@hotmail.com 或 sdfyyqq@163.com。联系电话:0512-67780113,67780120

中华医学会创伤学分会组织修复学组

更正启事

发表于本刊 2007 年第 23 卷第 6 期《肠内营养添加谷氨酰胺对烧伤患者的免疫调理作用》一文中,营养方案的补给量应为“直至 2 ~ 3 L/d”,特此更正。

本刊编辑部