

维生素 E 对糖基化终产物刺激大鼠主动脉平滑肌细胞 信号转导物甘油二酯的影响

严金川^①

刘乃丰

(南京铁道医学院心血管病研究室, 南京21009)

主题词 维生素 E; 糖基化终产物; 甘油二酯; 肌, 平滑, 血管; 主动脉; 大鼠; 信号转导

摘要 为探讨抗氧化剂维生素 E 对糖基化终产物刺激大鼠主动脉平滑肌细胞信号转导的影响及其机制, 应用薄层层析、放射自显影和放射酶标记分离来检测平滑肌细胞中甘油二酯含量; 采用检测糖基化终产物的荧光值判断糖基化终产物的形成量。结果发现, 维生素 E 与葡萄糖、牛血清白蛋白共同孵育后糖基化终产物荧光值明显降低, 其刺激细胞产生甘油二酯的能力随之减弱。而维生素 E 预先处理平滑肌细胞后, 糖基化终产物刺激细胞产生甘油二酯的水平也显著降低。以上提示维生素 E 能明显抑制糖基化终产物刺激平滑肌细胞产生甘油二酯, 并且能抑制糖基化终产物的形成。

Effect of Vitamin E on Advanced Glycosylation End Products Stimulated the Diglyceride of Signal Transduction in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells

YAN Jin-Chuan and LIU Nai-Feng

(Laboratory of Cardiovascular Diseases, Nanjing Rail Medical College, Nanjing 210009, China)

MeSH Vitamin E; Glycosylation End Products, Advanced; Diglyceride; Muscle, Smooth, Vascular; Aorta; Rats; Signal Transduction

ABSTRACT **Aim** To study the mechanism and effect of antioxidant vitamin E on advanced glycosylation end products (AGEs)-stimulated signal transduction in cultured aortic smooth muscle cells (ASMC). **Methods** Separation and quantitative measurement of diglyceride (DG) were studied with thin-layer chromatography, autoradiography and radioenzymatic assay. **Results** The arbitrary fluorescence unit (AFU) of AGEs was significantly decreased when Vit E were incubated with glucose and BSA. The level of DG, which was stimulated by the AGEs, was decreased. While Vit E were preincubated with ASMC for 4 h. The level of DG induced by AGEs was also lower markedly. **Conclusion** Vit E can significantly inhibit the formation of AGEs. It can also markedly attenuate the accumulation of DG in ASMC.

糖尿病是临床常见病和多发病, 其血管病变则是该病主要的致残及致死原因。随着机体衰老非酶糖基化随之增加, 糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)可在组织中不断积聚, 这一过程在糖尿病病人体内明显加快。然而, 对于 AGEs 这一致病作用的机制, 目前尚不清楚。近年来, 有关细胞内信号转导与细胞功能调节的研究越来越引起人们的重视, 甘油二酯(diglyceride, DG)是细胞内重要的信号转导环节之一^[1]。本研究旨在观察抗氧化剂维生素 E 对 AGEs 刺激大鼠主动脉平滑肌细胞内 DG 水平的影响, 并探讨其发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料

^①现在镇江第四人民医院心内科, 镇江 212001

SD 大鼠由本院动物中心提供, 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, DMEM 培养基、氨基胍系美国 Sigma 公司产品, DG Kit 为英国 Amersham 公司产品, (r^{-32} pATP 为北京原子能公司产品, 液闪计数器为 Beckman LS 5000TD 美国产品, F-3000 型荧光分光光度计为 Hitachi 日本产品。

1.2 平滑肌细胞培养

参照 Ross 等^[2]方法, 应用组织贴块法进行 SD 大鼠主动脉平滑肌原代培养, 细胞传代至 3~4 代即可用于实验, 调节细胞数在 10^5 /L, 用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)接种 6 孔培养板, 12 h 细胞贴壁、换含 0.5% 胎牛血清 DMEM 液过夜, 即可加入 AGEs 干预。

1.3 实验分组

①维生素 E 组 实验前 4 h 预先在细胞培养液中加入不同浓度的维生素 E (50、100 mmol/L), 然

后加入相同浓度的 AGEs (200 mg/L) 干预平滑肌细胞 10 min, 测其 DG 的含量。②AGEs + 维生素 E 组 将维生素 E (100 mmol/L) 与葡萄糖、BSA 共同孵育 12 周, 测 AGEs 的荧光值。将与上述维生素 E 共同孵育的 AGEs (100 mg/L) 干预细胞 10 min, 测其 DG 的含量。

1.4 甘油二酯标准曲线的制备

将不同浓度的标准 DG (31.25、62.5、125、250、500 和 1000 pmol/L) 采用 DG 激酶法使 DG 降解为磷脂酸(PA), 然后用 r^{-32} pATP 标记, 测其液闪值, 制定标准曲线。

1.5 糖基化终产物制备

将葡萄糖用 pH7.4 PBS 液配制成 0.5 mol/L 溶液, 无菌过滤 4℃ 保存。AGEs 组取牛血清白蛋白 (BSA) 5.0 g/L 加入一定量葡萄糖使葡萄糖终浓度为 50 mmol/L。在 37℃ 无菌孵育 12 周, AGEs + 维生素 E 组加入 100 mmol/L 维生素 E 共同孵育。实验前用 pH 7.4 PBS 透析去除未结合的葡萄糖。对照组 BSA 中不含葡萄糖, 其余条件一致。AGEs 浓度用 BSA 浓度表示, 标准品采用 BSA 对照。

1.6 糖基化终产物自由荧光度的测定^[3]

取上述孵育液各 1.0 mL 于 F-3000 型荧光分光光度计上测其荧光值 (激发波长 390 nm, 发射波长 450 nm), 以 1.0 ml BSA 按同样操作作为对照。

1.7 细胞内甘油二酯的提取和测定^[4]

将细胞用 3 mL 氯仿: 甲醇 (1:2, v/v) 抽取细胞总脂, 采用 DG 激酶法使 DG 降解为磷脂酸(PA), 然后用 r^{-32} pATP 标记, 通过薄层层析、放射自显影法分离出由 DG 降解的 PA, 取下显影点, 测其液闪值, 根据 DG 标准曲线求出对应的 DG 含量。

1.8 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用小样本 t 检验进行统计处理。

2 结果

2.1 甘油二酯测定的标准曲线

从图 1 可见, 随 DG 浓度增加其转化为 PA 的放射性活性增强, 呈线型关系。

2.2 维生素 E 对糖基化终产物形成的影响

从表 1 (Table 1) 可见, 维生素 E 明显抑制 AGEs 形成的荧光值; 但仍然较对照组 BSA 为高, 具有显著性差异。

2.3 维生素 E 对糖基化终产物刺激平滑肌细胞产生甘油二酯的影响

从表 2 (Table 2) 可见, 维生素 E 明显抑制

AGEs 刺激平滑肌细胞产生 DG, 并随维生素 E 浓度升高, 其抑制效应增强, 具有浓度依赖效应。

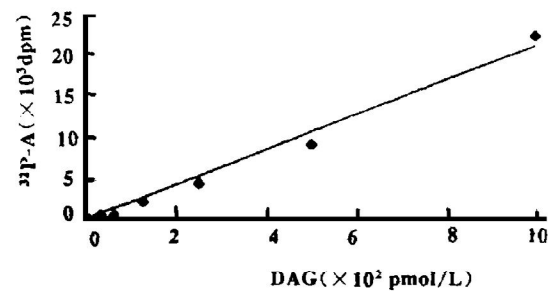


图 1. 甘油二酯标准曲线

Figure 1. Standard curve of DG

表 1. 维生素 E 对糖基化终产物形成的影响

Table 1. The effect of Vit E on the formation of AGEs ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Groups	Arbitrary fluorescence (u)
BSA (1.0 mL)	8.0 \pm 2.1
AGEs+Vit E (1.0 mL)	17.8 \pm 4.4 ^{ab}
AGEs (1.0 mL)	32.4 \pm 5.3

a: $P < 0.01$, compared with AGEs group, $P < 0.05$, compared with BSA group

表 2. 维生素 E 对糖基化终产物刺激平滑肌细胞产生甘油二酯的影响

Table 2. The effect of VitE on DG formation in AGEs-stimulated ASMC ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Groups	DG (pmol/L)
BSA (200 mg/L)	228.4 \pm 20.8
AGEs+Vit E (50 mmol/L)	673.8 \pm 42.3 ^b
AGEs+Vit E (100 mmol/L)	416.7 \pm 38.6 ^{ac}
AGEs (200 mg/L)	912.2 \pm 47.1

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with AGEs group, c: $P < 0.05$, compared with BSA group

表 3. 维生素 E 与葡萄糖、BSA 共同孵育后 AGEs 对平滑肌细胞产生 DG 的影响

Table 3. The effect of AGEs-induced by VitE incubation with glucose and BSA on DG level in ASMC ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Groups	DG (pmol/L)
AGEs (100 mg/L)	736.2 \pm 37.6
Vit E+GS+BSA→AGEs (100 mg/L)	544.7 \pm 40.5 ^{ab}
BSA (100 mg/L)	214.6 \pm 18.5

a: $P < 0.05$, compared with AGEs group, b: $P < 0.01$, compared with BSA group

2.4 孵育形成的糖基化终产物对平滑肌细胞产生甘油二酯的影响

与维生素 E 共同孵育后形成的 AGEs 刺激平滑

肌细胞产生 DG 水平明显降低,但仍较对照组 BSA 高(表3, Table 3)。

3 讨论

大量证据表明:在高糖状态下,人体内糖与蛋白质等大分子物质的氨基发生非酶糖基化反应,自发形成具有高度活性、不可逆的中晚期糖基化终产物(AGEs)。AGEs 的许多细胞生物学效应直接参与了糖尿病慢性并发症的发生,也是糖尿病易患动脉粥样硬化的关键因素。我们已证实血管平滑肌细胞表面具有特异性 AGEs 受体,并且亦已证实 AGEs 能引起胞内甘油二酯(DG)含量的明显升高,而 DG 产生的二个途经中,一个为从头合成途经,另一个为受体途径。因此,我们推测 AGEs 引起的 DG 变化的机制为通过受体介导的膜磷脂水解产生的。甘油二酯是细胞内重要的信使物质,它可将外界的刺激信号通过激活细胞内一种重要的蛋白激酶 C (PKC),并磷酸化各种底物蛋白,产生相应的生物学效应。

维生素 E 是体内重要的抗氧化剂,大量的实验治疗学证据进一步证实了抗氧化剂在(As)中的作用,具有保护内皮细胞及血管壁功能完整性。血管平滑肌细胞(VSMC)增殖是动脉粥样斑块形成的基础;而抗氧化剂是 VSMC 增殖的有效抑制因子。维生素 E 通过对白细胞介素-1(IL-1)基因激活的抑制作用抑制 IL-1 的产生,抑制血小板源性生长因子(PDGF)和内皮素(ET)引起的 VSMC 的增殖,也能明显抑制 ox-LDL 引起的 DG/PKC 信号转导途径的激活。

近年来的研究表明,抑制 AGEs 的形成对预防糖尿病慢性并发症有着重要意义。我们应用维生素 E 干预 AGEs 刺激平滑肌细胞产生信号转导物 DG,结果显示,维生素 E 与葡萄糖、BSA 共同孵育后,AGEs 刺激细胞产生 DG 的能力明显减弱,但仍较对照组(BSA)高。我们推测可能是由于维生素 E 阻断了 AGEs 的形成。通过对 AGEs 的荧光检测发现与维生素 E 共同孵育的 AGEs 组其 AGEs 形成明显减少,这就进一步证实我们的推断。然而,在应用维生素 E 预先加入培养液中4小时后,再加入 AGEs 干预,结果发现,平滑肌细胞产生 DG 的水平也明显较 AGEs 组降低。这就说明维生素 E 不仅能阻断 AGEs 的形成;而且还能抑制有 AGEs 引起的信号

转导的变化,这可能是维生素 E 作为抗氧化剂在 AS 中发挥作用的重要机制。新近研究发现,维生素 E 不仅能抑制高糖引起的 DG/PKC 途径的激活^[5,6],而且可以预防糖尿病导致的 DG/PKC 信号转导通路异常引起的血流障碍^[7]。Tran 等应用维生素 E 预处理人脐静脉内皮细胞后,发现内皮细胞产生 DG 的活性明显减弱,进一步研究证实,维生素 E 激活了 DG 激酶活性,加速了 DG 的降解^[8]。这与我们的结果相似,因此,我们推测上述效应也是由于维生素 E 激活 DG 激酶活性,导致 DG 的含量降低。然而,维生素 E 抑制平滑肌细胞 DG 的产生是否与抗氧化剂的保护作用密切相关有待进一步探讨。

综上所述,抗氧化剂维生素 E 能明显阻断 AGEs 的形成,并且使 AGEs 刺激平滑肌细胞产生 DG 水平显著降低。

参考文献

- 1 Nishizyuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and actiation of protein kinase C. *Science*, 1992, **258**(7): 607.
- 2 Campbell JC, Campbel GR, Ross R. The smooth muscle cell in cuture. *Physiol Rew*, 1979, **59**(12): 1-61
- 3 Makita Z, Rodoff S, Rayfield EJ, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 1991, **325**(6): 836-842
- 4 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J*, 1959, **37**(9): 911-917
- 5 Kunisaki M, Fumio U, Nawata H, et al. Vitamin E normalizes diacylglycerol protein kinase C activation induced by hyperglycemia in rat vascular tissue. *Diabetes*, 1996, **45**(suppl 3): S117-S119
- 6 Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, et al. Normalization of diacylglycerol protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and culture rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes*, 1994, **43**(3): 1 372-377
- 7 Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC, et al. Vitamin E prevents diabetes indused abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol protein kinase C pathway. *Am J Physiol*, 1995, **269**(2): E239-E246
- 8 Tran K, Proulx PR, Chan AC. Vitamin E suppresses diacylglycerol level in thrombin stimulated endothelial cells through an increase of DG kinase activity. *Bioch Biophy Acta*, 1994, **1212**(8): 193-202

(此文1998-07-22收到,1999-01-19修回)

(此文编辑 朱雯霞)