

## •实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-03-0282-05

## 晚期糖基化终产物诱导血管内皮细胞骨架形态改变的机制

郭晓华<sup>1</sup>, 陈波<sup>1</sup>, 王述昀<sup>1</sup>, 黄巧冰<sup>1</sup>, 侯凡凡<sup>2</sup>

(第一军医大学 1. 病理生理学教研室, 全军休克微循环重点实验室, 2. 南方医院肾内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期糖基化终产物; 细胞骨架; 受体, 晚期糖基化终产物; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究晚期糖基化终产物修饰蛋白对内皮细胞细胞骨架肌动蛋白的形态学影响及特异的糖基化终产物受体和氧化应激在此病理过程中的作用。方法 用不同浓度的糖基化终产物修饰人血清白蛋白与人脐静脉内皮细胞株 ECV304 在体外共同培养不同时间, 并设立对照组进行比较, 采用免疫荧光染色法显示细胞骨架的形态学改变。结果 与对照组相比, 糖基化终产物修饰人血清白蛋白以时间和剂量依赖的方式影响内皮细胞骨架肌动蛋白聚合丝状和可溶性单体(或球状)形态的改变。随着糖基化终产物修饰人血清白蛋白作用浓度和时间的增加, 丝状肌动蛋白所形成的外周致密带边缘出现锯齿样断裂, 趋于变细崩解消散, 最终形成由非极性单行排列的肌动蛋白丝组成的应力纤维。可溶性单体表现为向细胞浆和胞膜移位, 胞浆区出现点状和丝状染色, 细胞间距离明显增大。可溶性糖基化终产物受体的抗体和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶抑制剂均可阻断糖基化终产物对细胞骨架的影响。结论 糖基化终产物修饰蛋白对细胞骨架的影响是通过与内皮细胞上的糖基化终产物受体结合并引起细胞内的氧化应激所介导的, 这一作用可能与糖基化终产物所致血管通透性升高有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Mechanism of Advanced Glycation End Products-Induced Morphological Changes of Actin Cytoskeleton in Endothelial Cells

GUO Xiao-Hua<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>1</sup>, WANG Shu-Yun<sup>1</sup>, HUANG Qiao-Bing<sup>1</sup>, and HOU Fan-Fan<sup>2</sup>

(1. The Key Laboratory of Shock and Microcirculation of PLA, Department of Pathophysiology; 2. Department of Nephrology, Nanfang Hospital; the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Cytoskeleton; Receptor of Advanced Glycation End Products; NADPH Oxidase; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of advanced glycation end products (AGE) modified protein on morphological changes of actin cytoskeleton in endothelial cell and the role of receptor for AGE (RAGE) and oxidant stress in this pathological procedure. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC)-derived cell line (ECV304) were incubated with AGE modified human serum albumin (AGE-HSA) of concentrations of 12.5, 25, 50, and 100 mg/L respectively, for 2, 4, 8, 12 and 24 h. As control, HSA of the same concentration was administrated to ECV304 cells. To visualize the morphological changes of actin cytoskeleton, the treated cells were incubated with rhodamine phalloidin or Oregon Green-Dnase I to stain F-actin or G-actin. ECV304 were treated with anti-RAGE IgG before AGE-HSA applications or both together. Apocynin, a specific inhibitor of NADPH oxidase, was pre-administrated to the endothelial cells in concentrations of 10, 100, 250, and 500  $\mu$ mol/L respectively, for 30 min, then the cells were rinsed with DMEM for three times and exposed to 50 mg/L AGE-HSA for 8 h. The morphological changes of actin cytoskeleton were observed after the above-mentioned procedure. **Results** Morphology of F-actin and G-actin in endothelial cells were changed greatly under the stimulation of AGE-HSA in a concentration and time-dependent manner. Exposure of ECs to AGE-HSA caused a shift in F-actin distribution from web-like structure to polymerized stress fiber. Cells subjected to higher-concentration and longer-time AGE-HSA exposure showed more and more stress fiber accumulation. Also the edge of G-actin became coarse and illegible and merged with each other, even formed tufts of flock extending all around nuclear area. And the changes can be inhibited by not only pretreatment with anti-RAGE IgG or NADPH oxidase inhibitor Apocynin, but also co-administrated with anti-RAGE IgG and AGE-HSA. The unmodified HSA, anti-RAGE IgG and Apocynin did not affect morphology of actin cytoskeleton. **Conclusion** AGE induced morphological changes of actin cytoskeleton in endothelial cells and it required receptor occupancy on cells surface and intracellular activation of NADPH oxidase.

[收稿日期] 2004-07-11 [修回日期] 2005-05-13

[基金项目] 广东省自然科学基金(10717); 国家自然科学基金(30028008); 国家重点基础研究发展规划 973 项目(G2000057004)

[作者简介] 郭晓华, 硕士研究生, 研究方向为晚期糖基化终产物引起内皮细胞通透性改变的机制, 联系电话 020-61640114-89102 或 13763327463, E-mail 为 lanblue@fimmu.com。陈波, 博士研究生, 研究方向为烧伤所致内皮细胞通透性改变的机制。通讯作者黄巧冰, 教授, 博士研究生导师, 主要从事休克微循环血管通透性方面的研究, 联系电话 020-61648465 或 020-61648186, E-mail 为 bing@fimmu.com。

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)是一组在体内蛋白质的氨基与糖的醛基之间发生的非酶性糖基化反应的终产物的总称,可影响机体内多种蛋白质的结构和生物化学特性。AGE 被认为在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、糖尿病血管并发症及衰老的发生发展中起着十分重要的作用。目前已证实,氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)在 As 斑块形成中具有重要作用<sup>[1]</sup>,而 ox-LDL 的形成部分来源于 LDL 的糖化氧化。此外 AGE 可诱导血管通透性血管通透性增加<sup>[2]</sup>。内皮细胞(endothelial cell, EC)细胞骨架(cytoskeleton),特别是肌动蛋白(actin)的重组和再分布是导致 EC 收缩、血管通透性升高的主要病理基础<sup>[3]</sup>。AGE 能否引起 actin 的改变,如果有又是通过何种途径实现,尚无定论。我们用免疫荧光染色的方法观察了 AGE 对 actin 形态学的影响,并对 AGE 受体和细胞内的氧化应激在这一过程中的作用,进行了深入的研究和探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐静脉 EC 株 ECV304 购于中国科学院上海细胞所;DMEM 培养基、胰酶购自美国 Gibco 公司;新生小牛血清(natal bovine serum, NBS)购自杭州四季青生物制品所;人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶抑制剂(Apocynin)购自美国 Sigma 公司;TCL 检测试剂盒购自美国 Endos 公司;罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-phalloidin)、俄勒冈绿标记的 G-actin 特异性结合物 DNA 酶 I(Oregon Green-DNase I)购自 Molecular Probes 公司。可溶性 AGE 受体(receptor of AGE, RAGE)抗体(RAGE 抗体)由第一军医大学富宁教授惠赠。

### 1.2 体外制备晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白

糖孵育法制备 AGE 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA)<sup>[4]</sup>。荧光分光光度法鉴定 AGE-HSA 中 AGE 含量为 74.80 kU/g 蛋白质。对照样本 AGE 含量不超过 0.9 kU/g 蛋白质。制备的所有样本均经 TCL 试剂盒检测,内毒素含量低于 0.5 kEU/L。

### 1.3 晚期糖基化终产物介导细胞骨架变化的剂量和时间效应

内皮细胞 V304 接种于微孔小皿里,待细胞长至融合后,改用无血清培养基继续培养 24 h,使细胞获

得同步生长并处于静止期。分别以 12.5、25、50 和 100 mg/L 的 AGE-HSA 作用 8 h。另以 50 mg/L 分别作用 2、4、8、12 和 24 h。以不加任何刺激物的 DMEM 培养基为正常对照,分别以相应浓度及作用时间的 HSA 作阴性对照。各组细胞经处理后,用 PBS 漂洗 2 min × 3 次,3.7% 多聚甲醛 4℃ 孵育 10 min,冷 PBS 漂洗 2 min × 3 次,再用 0.5% Triton-100 于 4℃ 孵育 15 min,冷 PBS 漂洗 2 min × 3 次,最后用 2 kU/L 罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-Phalloidin)室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗 2 min × 3 次。G-actin 的染色步骤与 F-actin 相似, G-actin 特异性结合物为俄勒冈绿标记的 DNA 酶 I(Oregon Green-DNase I, 0.6 μmol/L)。染色结束后用荧光倒置相差显微镜进行荧光镜检, Kodak 200 照相。

### 1.4 抗晚期糖基化终产物抗体的作用

内皮细胞(EC)与浓度分别为 50、100 mg/L 的晚期糖基化终产物受体的抗体(RAGE 抗体)共同于 37℃ 孵育 1 h,然后将含有 RAGE 抗体的培养基吸出,再加入 50 mg/L 的 AGE-HSA 作用 8 h,以不加任何刺激物的为正常对照,不加 RAGE 抗体的为阳性对照,不加 AGE-HSA 为阴性对照。另以 100 mg/L 的 RAGE 抗体与 100 和 200 mg/L AGE-HSA 和 EC 于 37℃ 共孵育 2 h。孵育结束后,细胞骨架染色观察,步骤同上。

### 1.5 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶抑制剂的作用

内皮细胞(EC)与浓度分别为 10、100、250 和 500 μmol/L 的特异性 NADPH 抑制剂 Apocynin 于 37℃ 共同孵育 30 min。然后将含有 Apocynin 的培养基吸出,用 DMEM 洗三遍,再加入 50 mg/L 的 AGE-HSA 作用 8 h。以不加任何刺激物的为正常对照,不加 Apocynin 为阳性对照,不加 AGE-HSA 为阴性对照。孵育结束后,细胞骨架染色观察,步骤同上。

## 2 结果

### 2.1 晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白对细胞骨架肌动蛋白形态学的影响

对照组的 EC F-actin(红色荧光染色)主要分布在细胞周边,线条完整连续,显示出典型的鹅卵石样轮廓,称为外周致密束。细胞间连接紧密,未见明显缝隙形成。核的周围也有少量分布形成核骨架。随着 AGE-HSA 作用浓度的增加,外周致密带边缘变得毛糙不规整,逐渐出现锯齿样断裂,趋于变细崩解消散,100 mg/L 时细胞边界已不可辨;F-actin 在胞浆内弥散分布,最终形成由非极性单行排列的 actin 丝组

成的应力纤维;而核区的染色更致密明显(图1, Figure 1)。当50 mg/L AGE-HSA作用8 h, F-actin外周致密带粗糙断裂,作用12 h时荧光染色减弱, EC外周轮廓已模糊难辨,至24 h时即呈崩解状,束状应力纤维明显(图2, Figure 2)。对照组G-actin(绿色荧光染色)主要分布在胞核区域,呈致密椭圆或带一细长尾部,边界较为圆润清晰。随AGE-HSA作用浓度增加或时间延长, G-actin的变化表现为向细胞浆和胞膜移位,胞浆区出现点状和丝状染色。边缘变模糊呈絮状向外延伸,而核周区域染色变弱,至100 mg/L作用8 h或50 mg/L作用24 h时, G-actin染色强度虽有所恢复,但细胞间距离明显增大。各组人血清白蛋白HSA组,均无明显上述改变(图1和图2, Figure 1 and Figure 2)。

## 2.2 可溶性抗体的阻断作用

可溶性RAGE抗体(RAGE抗体)可阻断AGE-HSA对细胞骨架蛋白的作用,使应力纤维明显减少,细胞周边骨架轮廓清晰。50 mg/L RAGE抗体可抑制AGE-HSA的作用(图3, Figure 3);抗体与AGE-HSA共孵育也可阻滞其作用(图4, Figure 4)。RAGE抗体本身对F-actin和G-actin无影响。

## 2.3 Apocynin的阻断作用

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐(NADPH)氧化酶抑制剂可阻断AGE-HSA对细胞骨架的作用,其抑制作用与剂量相关。Apocynin 100  $\mu$ mol/L即可大部分抑制AGE-HSA的作用,而Apocynin本身对F-actin和G-actin无影响(图5, Figure 5)。

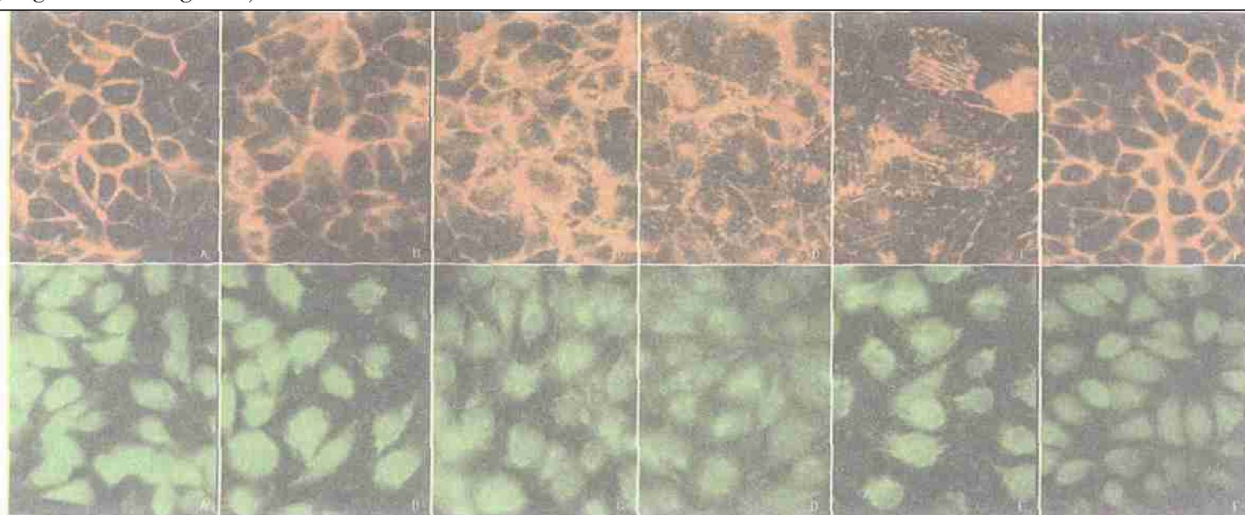


图1. 晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白以剂量依赖方式引起肌动蛋白形态学改变( $\times 1\,000$ ) AGE-HSA以不同浓度作用于内皮细胞8 h。A为对照组, B为12.5 mg/L AGE-HSA组, C为25 mg/L AGE-HSA组, D为50 mg/L AGE-HSA组, E为100 mg/L AGE-HSA组, F为100 mg/L HSA组。红色为F-actin, 绿色为G-actin。

Figure 1. AGE-HSA-induced concentration-dependent morphological changes of actin ( $\times 1\,000$ )

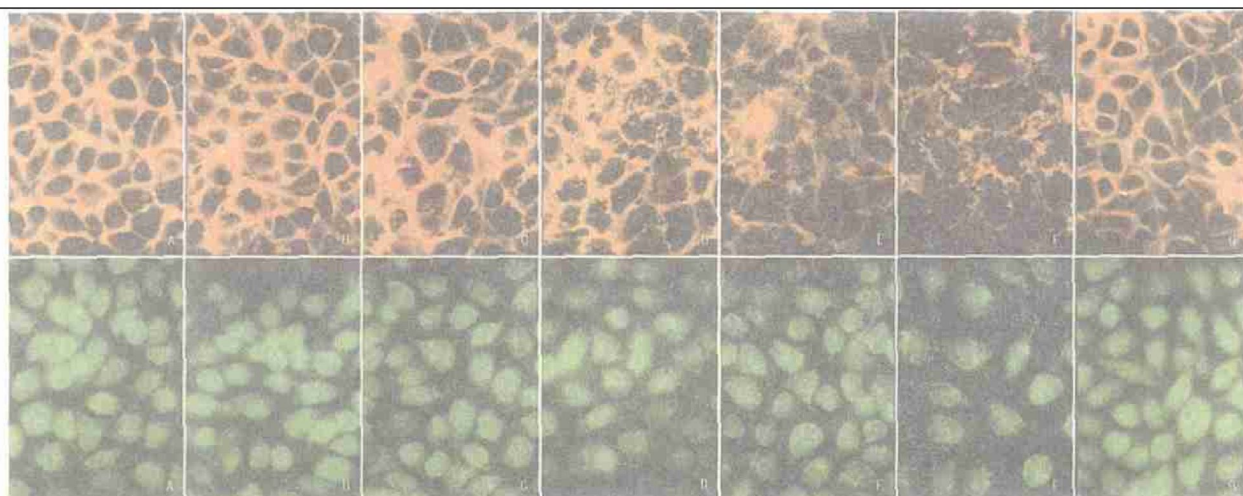


图2. 修饰人血清白蛋白以时间依赖方式引起肌动蛋白形态学改变( $\times 1\,000$ ) 50 mg/L AGE-HSA以不同时间作用于内皮细胞。A为对照组, B为2 h组, C为4 h组, D为8 h组, E为12 h组, F为24 h组, G为24 h HSA组。红色为F-actin, 绿色为G-actin。

Figure 2. AGE-HSA-induced time-dependent morphological changes of actin ( $\times 1\,000$ )



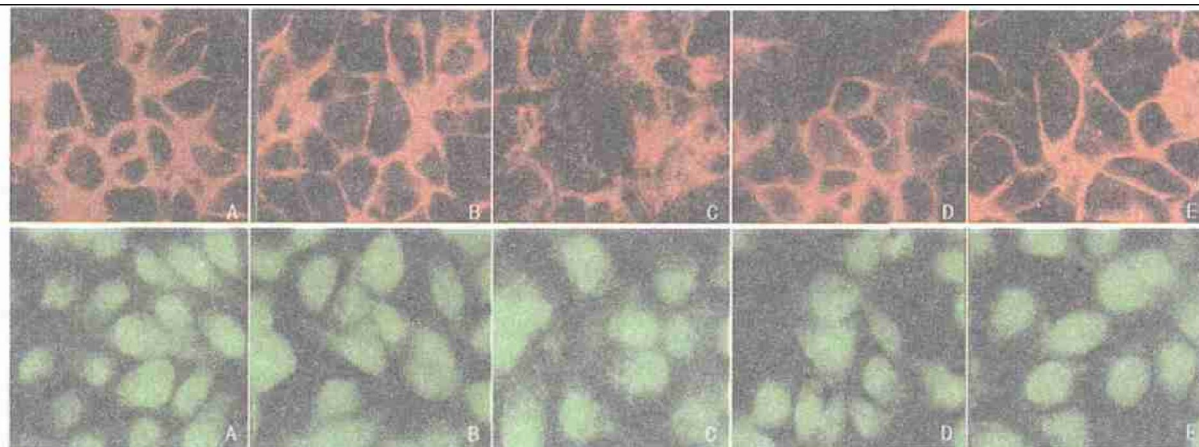


图 3. 可溶性抗体预孵育后修饰人血清白蛋白对肌动蛋白形态学的影响(  $\times 1\,000$ ) A 为对照组, B 为 100 mg/L RAGE 抗体作用 1 h, C 为 50 mg/L AGE-HSA 作用 8 h, D 和 E 分别为先用 50 mg/L 和 100 mg/L RAGE 抗体孵育 1 h 后再用 50 mg/L AGE-HSA 孵育 8 h。红色为 F-actin, 绿色为 G-actin。

Figure 3. The role of pre-administrated anti-RAGE IgG in AGE-HSA-induced actin changes (  $\times 1\,000$ )

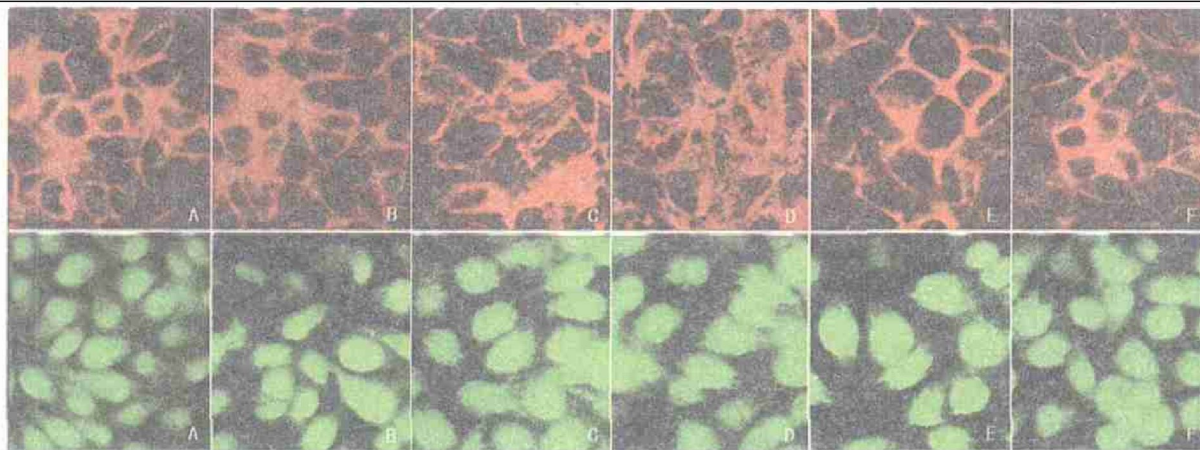


图 4. 可溶性抗体与修饰人血清白蛋白共孵育对肌动蛋白的影响(  $\times 1\,000$ ) A 为对照组, B 为 100 mg/L 抗 RAGE 抗体作用 2 h, C 为 100 mg/L AGE-HSA 作用 2 h, D 为 200 mg/L AGE-HSA 作用 2 h, E 为 100 mg/L 抗 RAGE 抗体+ 100 mg/L AGE-HSA 共同作用 2 h, F 为 100 mg/L 抗 RAGE 抗体+ 200 mg/L AGE-HSA 共同作用 2 h。红色为 F-actin, 绿色为 G-actin。

Figure 4. The role of Co-administrated anti-RAGE IgG and AGE-HSA in actin changes (  $\times 1\,000$ )

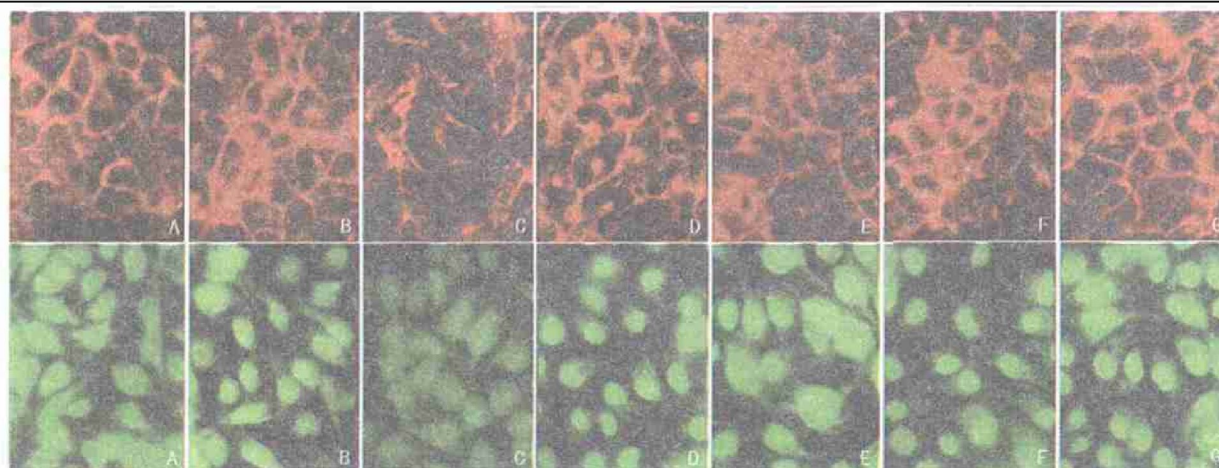


图 5. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸盐氧化酶抑制剂 Apocynin 对晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白介导的肌动蛋白的影响(  $\times 1\,000$ ) A 为对照组, B 为 500 μmol/L Apocynin 作用 30 min, C 为 50 mg/L AGE-HSA 作用 8 h, D、E、F 和 G 依次为 10、100、250 和 500 μmol/L Apocynin 预孵育 30 min 后再用 50 mg/L AGE-HSA 孵育 8 h。红色为 F-actin, 绿色为 G-actin。

Figure 5. Effect of inhibitor of NADPH oxidase(Apocynin) in AGE-HSA-induced actin changes (  $\times 1\,000$ )

### 3 讨论

动脉硬化是衰老的主要表现之一,其引起的重要脏器病变是威胁人类生命与健康的主要原因。血管内皮细胞的损伤与动脉硬化的发生、发展密切相关<sup>[5]</sup>。蛋白质的糖化氧化修饰可引起内皮细胞屏障功能的下降,可诱发动脉硬化等血管相关性病变。血管通透性改变主要取决于内皮细胞骨架肌动蛋白(actin)形态学改变引发的细胞收缩性的变化。在细胞内,肌动蛋白以聚合丝状(F-actin)和可溶性单体形式或球状(G-actin)两种形式存在。二者根据细胞状态相互转化,维持着一种动态平衡。F-actin可以致密外周带和应力纤维<sup>[6]</sup>等形式存在。当内皮细胞受到各种刺激时,F-actin发生重组和再分布,细胞周边actin环断裂,细胞中央出现大量平行束状应力纤维,使收缩力超过黏附力,细胞收缩,细胞间隙增大、增多,导致血管通透性升高<sup>[7]</sup>。本实验证实,AGE-HSA以剂量和时间依赖的方式引起细胞骨架肌动蛋白形态学的改变,而HSA对内皮细胞无上述作用。以往虽然有不少在各种刺激因素作用下F-actin变化的研究,但鲜有G-actin的报道,而G-actin是F-actin的来源,二者关系密切,相互作用。因此我们平行观察了F-actin和G-actin的改变,发现AGE低浓度和短时间作用于内皮细胞时,F-actin有增多的趋势,可能是因为G-actin向F-actin形成区输送可溶性单体以形成应力纤维。应力纤维的形成,一方面促进细胞收缩,另一方面也可认为是机体的一种应激反应。高浓度长时间暴露于AGE,则使F-actin解聚、耗竭,内皮细胞张力减退,细胞间失去连接,丧失屏障功能。G-actin的浓度决定了向单体向聚合体的转化,当G-actin的浓度降低时,会促使F-actin解聚重新成为单体。我们的结果中G-actin的变化不如F-actin明显,可能是由于这种调节机制的作用使F-actin解聚G-actin得以部分恢复和代偿。

对于AGE作用于细胞的具体信号转导机制目前尚无定论,但都倾向于认同RAGE和其介导的氧化应激在其中发挥了重要作用<sup>[8-11]</sup>。可溶性RAGE的抗体可特异性阻滞RAGE。我们的实验显示,抗RAGE抗体可阻断AGE的作用,证明了AGE的受体依赖性,且二者共同作用于细胞时抑制作用也很明显,提示抗RAGE抗体对AGE有竞争性拮抗作用。

AGE与RAGE结合,可诱导内皮细胞发生氧化应激。研究显示,NADPH氧化酶的活化在RAGE介导的氧化应激中起了重要作用<sup>[9]</sup>。本实验用NADPH氧化酶抑制剂可剂量依赖地阻断AGE作用,证实了氧化应激参与了这一病理过程。氧化还原失衡状态又可引发丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路<sup>[12]</sup>等多种信号传导途径的活化,最终都作用于细胞骨架,引起肌动蛋白的重组和再分布。

本实验证明AGE可通过与内皮细胞RAGE结合引发氧化应激,引起细胞内信号转导,影响肌动蛋白的组构,导致内皮细胞通透性增高,此作用可能参与了AGE所致血管性病变的发生、发展过程。

#### [参考文献]

- [1] 吴兴利,王士雯,杨中苏,徐雅琴,杨丁友,刘秀云. 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞磷酸酶PTEN活性的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(6): 505-508
- [2] Leto G, Price F, Amadio L, Iacobini C, Cordone S, Diaz-Horta O, et al. Increased retinal endothelial cell monolayer permeability induced by the diabetic milieu: role of advanced non-enzymatic glycation and polyol pathway activation. *Diabetes Metab Res*, 2001, 17(6): 448-458
- [3] Dudek SM, Garcia JN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 2001, 91(4): 1487-500
- [4] Hou FF, Boyce J, Chertow GM, Kay J, Owen WF Jr. Aminoguanidine inhibits advanced glycation end products formation on beta2-microglobulin. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(2): 277-283
- [5] 肖式君,李春霖,刘冰熔,黄爱龙,邓华聪. 重组腺病毒143nm抑制高糖诱导的血管内皮细胞炎症因子的异常分泌. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 259-262
- [6] Emert L, Bruckner H, Walmrath D, Grimminger F, Aktories K, Suttrop N, et al. Role of endothelial cytoskeleton in high permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol*, 1995, 268(5pt1): L753-761
- [7] Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(1): 75-84
- [8] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern DM. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 1999, 84(5): 489-497
- [9] Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280(5): E685-694
- [10] Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, et al. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*, 2003, 108(4): 472-478
- [11] 刘勇,刘乃丰. 糖基化终产物对人血管内皮细胞过氧化氢增殖物激活型受体 $\gamma$ 基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(2): 135-138
- [12] Kayali US, Pennella CM, Trujillo C, Villa O, Gaestel M, Hassoun PM. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2. *J Biol Chem*, 2002, 277(45): 42596-602

(此文编辑 胡必利,文玉珊)