

## 晚期糖基化终产物激活内皮细胞核因子 $\kappa$ B

张桂林<sup>1</sup>, 刘尚喜<sup>2</sup>, 邓鹤秋<sup>1</sup>, 张 训<sup>2</sup>

(1. 解放军第 458 医院心血管内科, 广东省广州市 510602; 2. 广州南方医院肾内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 病理学与病理生理学; 激活内皮细胞核因子  $\kappa$ B; 凝胶滞留法; 晚期糖基化终产物; ECV304 细胞株; 核因子  $\kappa$ B; 核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白

[摘要] 目的 探讨晚期糖基化终产物对人血管内皮细胞核因子  $\kappa$ B 的激活及作用机制。方法 用晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白与人脐静脉内皮细胞株 ECV304 体外共同培养。用 Western blot 检测核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白水平, 凝胶滞留法检测核因子  $\kappa$ B 的活性。结果 晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白可致 ECV304 核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白降解及核因子  $\kappa$ B 激活, 并且呈时间、剂量依赖关系, 抑制核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白的降解, 可抑制核因子  $\kappa$ B 的激活。结论 晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白通过引起核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白降解, 导致核因子  $\kappa$ B 的激活, 这一作用机制可能参与动脉粥样硬化的进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Activation of Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B by Advanced Glycation End Products in Cultured Endothelial Cell

ZHANG Gu-Lin<sup>1</sup>, LIU Shang-Xi<sup>2</sup>, DENG He-Qiu<sup>1</sup>, and ZHANG Xun<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, 458 th Hospital of PLA, Guangzhou 510602; 2. Department of Nephrology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; ECV304; Nuclear Factor- $\kappa$ B; I $\kappa$ B $\alpha$ ; Western Blot; Electrophoretic Mobility Shift Assay

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) by advanced glycation end products (AGE) in endothelial cell. **Methods** Human umbilical vein endothelial cell (ECV304) were stimulated with AGE-human serum albumin (AGE-HSA), the level of I $\kappa$ B $\alpha$  was measured by Western blot, and the activation of NF- $\kappa$ B was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** The degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and the activation of NF- $\kappa$ B could be induced by AGE-HSA in time and dose dependent way in ECV304. The activation of NF- $\kappa$ B could be blocked by inhibiting the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . **Conclusions** AGE-HSA might activate NF- $\kappa$ B in I $\kappa$ B $\alpha$  degradation dependent in ECV304. This pathobiological effect of advanced glycation end products might contribute to the development of atherosclerosis.

研究证实晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 参与动脉粥样硬化的形成和进展<sup>[1]</sup>。核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 在 AGE 引起的病理生理改变中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。我们用内皮细胞 ECV304 为靶细胞, 观察了 AGE 修饰的人血清白蛋白 (AGE-human serum albumin, AGE-HSA) 对核因子  $\kappa$ B 的激活作用及其可能机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

无内毒素人血清白蛋白购自 Sigma 公司; 丝氨

酸蛋白酶抑制剂 [N (alpha)-L-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, TPCK] 购自 BIOMOL 公司; TdT 购自大连宝生物工程有限公司;  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP 购自北京福瑞生物医学工程公司; 核因子  $\kappa$ B 同序寡核苷酸序列购自上海生物工程有限公司; 核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (inhibitor kappa B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ) 抗体、HRP-羊抗兔 IgG 及 ECL 反应液购自 Sant Cruz; 无内毒素 AGE-HSA 用糖化孵育法制备<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 内皮细胞的培养

脐静脉内皮细胞株 ECV304 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。生长至汇合期的细胞用 0.2% 胰酶-0.016% EDTA 消化, 细胞按 1:3 传代。第 7~12 代细胞用于实验。

#### 1.3 凝胶滞留法检测核因子 $\kappa$ B 的活化

培养至汇合期的细胞, 换用无血清培养基培养 12 h 后, 分别以 50 mg/L AGE-HSA 刺激不同的时间

[收稿日期] 2004-07-26

[修回日期] 2005-01-20

[作者简介] 张桂林, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病临床与治疗研究, 电话为 020-61639801, E-mail 为 zhangxinlin\_xg@yahoo.com。刘尚喜, 博士, 教授, 主要从事细胞生物学研究, 电话为 020-61642403, E-mail 为 liusx@fimmu.com。邓鹤秋, 硕士, 主任医师, 主要从事冠心病临床及介入治疗研究, 电话为 020-61639784, E-mail 为 dengheqiu@21cn.com。

(0、0.5、2、6 和 24 h), 或以不同浓度的 AGE-HSA (0、25、50、200 mg/L) 刺激 2 h, 或以 40 μmol/L TPCK 预处理 0.5 h, 再以 50 mg/L AGE-HSA 刺激, 收集细胞。按文献[4]方法制备胞核蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。核因子 κB 同序寡核苷酸序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'。采用末端转移法将 α-[<sup>32</sup>P]-ATP 标记核因子 κB 寡核苷酸序列。将核提取物(10 μg)、6× 结合缓冲液及 DNA 探针孵育 30 min, 经 6% PAGE 电泳后, 干胶, -80℃放射自显影 24 h, 用医学图像分析系统测定其灰度值。

1.4 免疫印迹法检测核因子 κB 抑制蛋白水平

细胞处理同前, 制备胞浆蛋白并测定蛋白浓度。取 20 μg 样品进行 SDS-PAGE(10%) 电泳。将蛋白用半干转移法转移至硝酸纤维膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 将硝酸纤维膜与兔抗人 IκBα 抗体孵育 2 h, 用含

0.1%TWEEN 的 TBS 洗涤 3 次, HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育 2 h, 经洗涤后, 加入化学发光底物, 用 X 光胶片显影, 用医学图像分析系统测定其灰度值。

1.5 统计学处理

计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ANOVA 对实验结果进行统计学分析。

2 结果

2.1 晚期糖基化终产物诱导核因子 κB 的激活

50 mg/L AGE-HSA 刺激 0.5 h 时可见核因子 κB 活性增强, 2 h 明显增强, 6 h 达高峰, 24 h 有所下降但仍显著高于正常对照组。12.5 mg/L AGE-HSA 刺激可引起核因子 κB 明显激活, 50~200 mg/L AGE-HAS 时达到高峰, 并呈现明显的量效关系(图 1, Figure 1)(表 1, Table 1)。

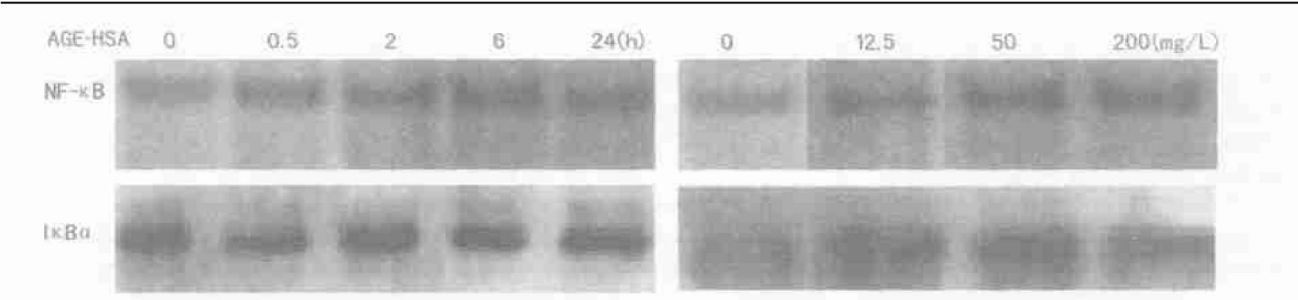


图 1. 晚期糖基化终产物刺激内皮细胞核因子 κB 激活和核因子 κB 抑制蛋白降解  
Figure 1. AGE-HSA treatments resulted in increased NF-κB DNA-binding activity and IκBα degradation in ECV304

表 1. 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞核因子 κB 的激活和核因子 κB 抑制蛋白的降解( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Optial density of NF-κB activation and IκBα level in ECV304 treated by AGE-HSA

AGE-HSA 处理条件		核因子 κB	IκBα
时间	0 h	1.0 ± 0.12	1.0 ± 0.11
	0.5 h	1.76 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.04 <sup>a</sup>
	2 h	2.2 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.11
	6 h	3.2 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.13
	24 h	2.13 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.13
剂量	0 mg/L	1.0 ± 0.12	1.0 ± 0.13
	12.5 mg/L	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.08 <sup>a</sup>
	50 mg/L	3.2 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>a</sup>
	200 mg/L	3 ± 0.38 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.07 <sup>a</sup>

a: P < 0.05, 与正常对照组比较。

2.2 晚期糖基化终产物诱导核因子 κB 抑制蛋白的降解

50 mg/L AGE-HSA 刺激 0.5 h 后 IκBα 明显减少, 仅为正常的 50%, 2 h 后恢复正常。不同浓度 AGE-HSA 刺激 0.5 h, IκBα 水平随 AGE-HSA 刺激浓度的增加而降低, 12.5 mg/L AGE-HSA 刺激时降低 27%, 200 mg/L AGE-HSA 刺激时降低 50% (图 1, Figure 1)(表 1, Table 1)。

2.3 丝氨酸蛋白酶抑制剂对核因子 κB 抑制蛋白降解及核因子 κB 激活的影响

与单纯 AGE-HSA 组比较, TPCK + AGE-HAS 组诱导 IκBα 降解的作用被抑制, 其蛋白质水平达正常细胞水平, 核因子 κB 激活亦被抑制 84.2% (图 2, Figure 2)(表 2, Table 2)。

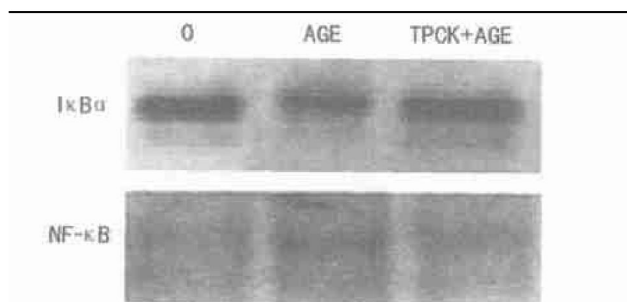


图 2. 丝氨酸蛋白酶抑制剂对核因子  $\kappa\text{B}$  抑制蛋白降解及核因子  $\kappa\text{B}$  激活的影响

Figure 2. TPCK inhibited AGE-HSA induced NF- $\kappa\text{B}$  activation and I $\kappa\text{B}\alpha$  degradation in ECV304

表 2. 丝氨酸蛋白酶抑制剂对核因子  $\kappa\text{B}$  抑制蛋白降解及核因子  $\kappa\text{B}$  激活的影响

Table 2. Optical density of NF- $\kappa\text{B}$  activation and I $\kappa\text{B}\alpha$  degradation in ECV304 in different condition

分 组	核因子 $\kappa\text{B}$	I $\kappa\text{B}\alpha$
对照组	1.0 $\pm$ 0.09	1.0 $\pm$ 0.11
AGE 组	2.9 $\pm$ 0.31	0.5 $\pm$ 0.04
TPCK+ AGE 组	1.4 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 AGE 组比较。

### 3 讨论

晚期糖基化终产物在心血管系统结构及生理功能改变中起重要作用, 它可诱导多种细胞表达多种蛋白, 这些物质可增加内皮通透性, 增强炎症细胞吸附, 引起血管内皮炎症反应, 导致内皮功能失调、血管损伤反应, 最终导致动脉粥样斑块形成<sup>[2,3,5-7]</sup>。AGE 诱导细胞表达介质是通过激活转录因子而实现的, 其中最重要的转录因子是核因子  $\kappa\text{B}$ 。正常情况下, 核因子  $\kappa\text{B}$  与其抑制蛋白 I $\kappa\text{B}$  (其中起主要作用的是 I $\kappa\text{B}\alpha$ ) 结合以无活性形式存在于细胞浆中。当细胞受到刺激时 I $\kappa\text{B}$  氨基端上的丝氨酸发生特异的磷酸化, 导致 I $\kappa\text{B}$  空间构象发生变化, 而被蛋白酶降解。I $\kappa\text{B}$  的降解导致核因子  $\kappa\text{B}$  活化转位入细胞核而与靶基因的调节序列结合, 激活相应基因的表达<sup>[3]</sup>。某些情况下 I $\kappa\text{B}$  也可通过酪氨酸磷酸化而激活核因子  $\kappa\text{B}$ , 此时不伴随 I $\kappa\text{B}$  的降解<sup>[8]</sup>。

本实验观察到 AGE 可诱导内皮细胞核因子  $\kappa\text{B}$  激活及 I $\kappa\text{B}\alpha$  的降解, 均有一定的时间、剂量效应。内皮细胞受到刺激后 I $\kappa\text{B}$  可很快 (0.5 h) 发生降解, 持续较短时间, 2 h 内恢复正常水平。而核因子  $\kappa\text{B}$  的激活发生较晚 (2~6 h), 且在细胞核内活性可维持较长的时间 (24 h)。在 I $\kappa\text{B}$  的降解及核因子  $\kappa\text{B}$  激活的敏感时间点, 用不同剂量 AGE 刺激后, AGE 引

起内皮细胞 I $\kappa\text{B}$  的降解及核因子  $\kappa\text{B}$  激活效应都随剂量的增大而增强。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 TPCK 可抑制 AGE-HSA 诱导的内皮细胞 I $\kappa\text{B}\alpha$  降解及核因子  $\kappa\text{B}$  的激活。40  $\mu\text{mol/L}$  TPCK 可完全抑制 AGE-HSA 的 I $\kappa\text{B}\alpha$  降解, Western blot 结果发现 I $\kappa\text{B}\alpha$  蛋白质水平达正常细胞水平, 核因子  $\kappa\text{B}$  激活亦被抑制 84.2%。说明抑制 I $\kappa\text{B}\alpha$  的降解可抑制核因子  $\kappa\text{B}$  的激活。核因子  $\kappa\text{B}$  未被完全抑制, 可能在 AGE 的作用过程中还存在不依赖 I $\kappa\text{B}\alpha$  降解的核因子  $\kappa\text{B}$  激活途径。

本研究表明, AGE 可作用于人血管内皮细胞, 通过诱导 I $\kappa\text{B}\alpha$  的降解, 使其丧失对核因子  $\kappa\text{B}$  的抑制作用, 而致核因子  $\kappa\text{B}$  转至细胞核内, 调控炎症基因的表达, 参与血管内皮炎症损伤反应, 促进动脉粥样硬化发生。AGE 通过何种机制引起 I $\kappa\text{B}\alpha$  降解, 以及是否存在 I $\kappa\text{B}\alpha$  降解外的核因子  $\kappa\text{B}$  激活机制, 尚须进一步研究。揭示 AGE 引起核因子  $\kappa\text{B}$  激活的机制, 寻找有效的途径阻断 AGE 引起的病理生理反应, 有望控制由 AGE 蓄积后引起的血管内皮细胞炎症反应, 以期达到减轻或控制动脉粥样硬化的发生发展<sup>[9,10]</sup>。

### [参考文献]

- [1] Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, et al. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1998, **141** (1): 61-75
- [2] Cipollone F, Iezzi A, Fazia M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, et al. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glyemic control. *Circulation*, 2003, **108** (9): 1070-1077
- [3] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cell is dependent on RAGE. *Circulation*, 1997, **96** (7): 2262-2271
- [4] Todd B, Galina S, Peter L. The nuclear factor  $\kappa\text{B}$  signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cell in vitro and in human atherosclerosis. *J Bio Chem*, 1997, **272** (25): 15817-15824
- [5] Ziemann S, Kass D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail*, 2004, **10** (3): 144-151
- [6] Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 2002, **105** (7): 816-822
- [7] Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1498** (2-3): 99-111
- [8] Kang JL, Pack IS, Hong SM, Lee HS, Castranova V. Silica induces nuclear factor- $\kappa\text{B}$  activation through tyrosine phosphorylation of I $\kappa\text{B}$ - $\alpha$  in RAW264.7 macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **169** (1): 59-65
- [9] 徐红新, 李建军, 李庚山. 核因子- $\kappa\text{B}$  与动脉粥样硬化. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 179-181
- [10] Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end products: a review. *Diabetologia*, 2001, **44** (2): 129-146

(此文编辑 朱雯霞)