

晚期糖基化终产物诱导血管内皮细胞环氧合酶 2 表达

张桂林¹, 刘尚喜², 邓鹤秋¹, 张训²

(1. 中国人民解放军第 458 医院心血管内科, 广东省广州市 510602;

2. 南方医科大学附属南方医院肾内科, 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; ECV304 细胞株; 环氧合酶 2

[摘要] 目的 探讨晚期糖基化终产物对人血管内皮细胞环氧合酶 2 表达的影响。方法 取人脐静脉内皮细胞 ECV304 与人血清白蛋白修饰的晚期糖基化终产物体外共同培养, 然后用 Western blot 检测环氧合酶 2 的表达水平。结果 内皮细胞环氧合酶 2 基础表达水平极低, 人血清白蛋白修饰的晚期糖基化终产物可诱导环氧合酶 2 的表达, 呈时间与剂量依赖关系; 抑制核因子 κ B 的活性可抑制环氧合酶 2 的表达。结论 人血清白蛋白修饰的晚期糖基化终产物可通过激活核因子 κ B, 而引起环氧合酶 2 的表达。这一作用机制可能参与血管损伤反应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Protein Expression of Activation of Nuclear Transcription Factor- κ B by Advanced Glycation End Products in Cultured Human Vascular Endothelial Cells

ZHANG Gui-Lin¹, LIU Shang-Xi², DENG He-Qiu¹, and ZHANG Xun²

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

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; ECV304; Cyclooxygenase-2

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate how advanced glycation end products (AGE) effected cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in cultured human umbilical vascular endothelial cells (ECV304). **Methods** ECV304 were cultured in vitro with AGE-human serum albumin (AGE-HSA). The levels of protein COX-2 were measured by Western blot. **Results** COX-2 expressed little in ECV304, AGE-HSA could induce COX-2 expression, and the expression could be blocked by inhibiting the activation of NF- κ B. **Conclusion** AGE-HSA could induce COX-2 expression by activating NF- κ B. This pathobiological effect of AGEs might contribute to vascular lesion.

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 参与多种疾病如糖尿病、动脉粥样硬化、阿尔海默茨病、衰老等进程^[1-3]。文献[4]报道, AGE 能激活内皮细胞核转录因子 κ B。本文进一步研究 AGE 修饰白蛋白 (AGE-HSA) 对人血管内皮细胞重要的炎性蛋白环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

无内毒素人血清白蛋白 (HSA) 购自 Sigma 公司; SN50 购自 BIOMOL 公司; TdT 购自大连宝生物工程有限公司; α -³²P-ATP 购自北京福瑞生物医学工程有限公司; COX-2 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^[5]。

1.2 内皮细胞的培养

参照文献[4], 细胞株 ECV304 在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37℃、95% 空气和 5% CO₂ 孵育箱中培养。生长至融合期用 0.25% 胰酶-0.016% EDTA 消化, 按 1:3 传代, 实验用第 7~12 代。

1.3 免疫印迹法检测环氧合酶 2

细胞处理同前, 制备胞浆蛋白并测定蛋白浓度。取 20 μ g 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素膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 将硝酸纤维素膜与兔抗人 COX-2 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, 用医学图象分析系统测定其灰度值。

1.4 统计学处理

实验重复 3 次, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 ANOVA 分析结果。

2 结果

2.1 人内皮细胞表达环氧合酶 2 蛋白

与对照细胞比较, 50 mg/L AGE-HSA 刺激 2 h,

[收稿日期] 2004-12-07 [修回日期] 2006-01-16

[作者简介] 张桂林, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病临床研究, 联系电话 020-61639801, E-mail 为 soundzhang@yahoo.com.cn。刘尚喜, 博士, 教授, 主要从事细胞生物学研究, 联系电话 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, 联系电话 020-61639784, E-mail 为 dengheqiu@21cn.com。

COX-2 蛋白水平升高, 6~24 h 升高达正常的 29.7~32.6 倍, 有明显的时间效应(表 1)。不同浓度 AGE-HSA 刺激 6 h, COX-2 蛋白质水平随 AGE-HSA 刺激浓度增加而增加, 50 mg/L 已接近高峰, 继续增加 AGE-HSA 浓度, COX-2 仍缓慢升高, 呈现剂量效应(表 2)。

表 1. 晚期糖基化终产物影响内皮细胞环氧合酶 2 表达的时效关系($\bar{x} \pm s$)

处理时间	环氧合酶 2
对照(0 h)	1.0 ± 0.32
0.5 h	1.6 ± 0.24
2 h	10.2 ± 0.65 ^a
6 h	32.6 ± 2.67 ^b
24 h	29.7 ± 2.71 ^b

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.001$, 与对照细胞比较

表 2. 晚期糖基化终产物影响内皮细胞环氧合酶 2 表达的剂量关系($\bar{x} \pm s$)

处理剂量(mg/L)	环氧合酶 2
对照(0)	1.0 ± 0.12
12.5	9.3 ± 0.68 ^a
50	32.6 ± 2.67 ^b
200	34.8 ± 2.46 ^b

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.001$, 与对照细胞比较

2.2 SN50 可抑制环氧合酶 2 的表达

与单纯 AGE-HAS 刺激组比较, 50 mg/L SN50 可抑制 AGE 诱导的 COX-2 表达, 抑制程度为 85.4 % (图 1)。

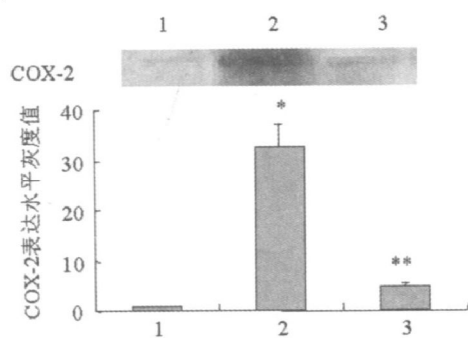


图 1. 核因子 κB 抑制剂 SN50 对环氧合酶 2 表达的抑制作用

上为电泳图, 下为定量(灰度)直方图。1 为对照细胞; 2 为用 50 mg/L AGE-HAS 处理 6 h 的细胞; 3 为先用 50 μ g/L SN50 处理 0.5 h, 再用 50 mg/L AGE-HAS 处理 6 h 的细胞。

3 讨论

晚期糖基化终产物(AGE)在体内缓慢生成不断蓄积, 作为致病因子引起血管系统的功能及结构损

伤。AGE 可刺激多种细胞产生多种炎性介质, 其中就有核因子 κB ^[6]。我们前期的研究证实, AGE 是通过诱导 κB 降解而引起核因子 κB 激活的^[4]。

环氧合酶(COX)是前列腺素合成的限速酶, 在前列腺素族(PGI₂、PGE₂、PGF₂)和血栓素 A(TAX₂)合成中起着重要的作用^[7]。其同工酶 COX-2, 是一种可诱导表达的促炎性蛋白, 生理情况下表达极低, 在某些刺激的作用下, 表达明显增加^[4]。本研究发现 AGE 可诱导血管内皮细胞表达 COX-2, 与时间、剂量有关, AGE 作用 2h 即见 COX-2 表达增加, 24h 明显, 可达正常的 33 倍, 可见 AGE 可显著地促进血管内皮细胞 COX-2 的表达。而 COX-2 的表达增强可使内皮细胞合成前列腺素、血栓素 A 等增加, 导致内皮细胞的炎性损伤性反应。

SN50 可抑制核因子 κB 的转位而特异性地抑制其活性^[8]。血管内皮细胞用 SN50 预处理后, AGE 诱导的 COX-2 表达亦明显降低, 提示核因子 κB 在 COX-2 表达中起着特异性的调控作用。

以上研究证实, AGE 作用于血管内皮细胞, 通过引起核因子 κB 激活, 上调 COX-2 的表达, 进而催化花生四烯酸的代谢, 调节前列腺素族及血栓素 A 的合成, 导致炎症损伤反应, 参与疾病的进程。抑制核因子 κB 的激活, 从而阻断 COX-2 的表达, 可能有效地阻断 AGE 蓄积后引起的血管内皮细胞炎症反应, 以期减轻或控制血管相关性疾病的发生发展。

[参考文献]

- [1] Aronson D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure[J]. *Med Hypotheses*, 2002, **59** (3): 297-301
- [2] 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[J]. *Atherosclerosis*, 1998, **141** (1): 61-75
- [3] 侯凡凡, 张桂林, 周展眉, 王国宝. 透析相关性淀粉样变关节滑膜组织中核因子的活化. *中华内科杂志*, 2002, **41** (4): 267
- [4] 张桂林, 刘尚喜, 邓鹤秋, 张训. 晚期糖基化终产物激活内皮细胞核因子 κB [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 329-331
- [5] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Trichler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE[J]. *Circulation*, 1997, **96** (7): 2 262-271
- [6] Caamano J, Hunter CA. NF- κB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15** (3): 414-429
- [7] Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2 [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, **38**: 97-120
- [8] Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, Van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Arth Rheum*, 2000, **43** (1): 4-13

(此文编辑 胡必利)