

晚期糖基化终产物诱导内皮细胞紧密连接改变及其机制

李 强, 郭晓华, 朱艳军, 陈 波, 邓建新, 黄绪亮, 黄巧冰

(南方医科大学病理生理学教研室 广东省医学休克微循环重点实验室, 广东省广州市 510515)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期糖基化终产物致细胞紧密连接结构改变; 免疫荧光染色; 带状闭合蛋白 1; 血管通透性; 细胞外信号调节激酶; 丝裂原活化蛋白激酶

[摘 要] 目的 探讨晚期糖基化终产物修饰蛋白对内皮细胞紧密连接带状闭合蛋白 1 的形态学影响, 并对其机制作初步研究。方法 培养人脐静脉内皮细胞, 用免疫荧光染色方法显示带状闭合蛋白 1 在内皮细胞分布的形态和部位。观察不同浓度和不同时间晚期糖基化终产物修饰蛋白作用下内皮细胞带状闭合蛋白 1 的形态学变化。研究了细胞外信号调节激酶、p38 丝裂原活化蛋白激酶通路抑制剂及相关特异蛋白突变体重组腺病毒转染对晚期糖基化终产物介导的内皮细胞闭合蛋白 1 形态学变化的影响。结果 正常对照组的内皮细胞闭合蛋白 1 存在于细胞周边呈环状, 线条清晰连续, 边缘光滑流畅, 晚期糖基化终产物以时间和剂量依赖的方式引起内皮细胞紧密连接带状闭合蛋白 1 结构形态的改变; 细胞外信号调节激酶通路抑制剂或 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路抑制剂均可减轻晚期糖基化终产物对闭合蛋白 1 的影响; 转染显性失活的细胞外信号调节激酶上游激酶 MEK1 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶上游激酶 MEK6b 的重组腺病毒, 均可减轻晚期糖基化终产物对带状闭合蛋白 1 形态的影响, 而转染组成性激活的 MEK1 和 MEK6b 的重组腺病毒本身即可引起内皮细胞带状闭合蛋白 1 形态的变化。结论 晚期糖基化终产物刺激可以引起内皮细胞紧密连接蛋白带状闭合蛋白 1 分布和形态的变化, 这一作用可能是由细胞外信号调节激酶及 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路介导的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Mechanism of Advanced Glycation End Products-Induced Morphological Changes of Tight Junction in Endothelial Cell

LI Qiang, GUO Xiao-Hua, ZHU Yan-Jun, CHEN Bo, DENG Jian-Xin, HUANG Xu-Liang, and HUANG Qiao-Bing

(Department of Pathophysiology, Southern Medical University, the Key Laboratory of Shock and Microcirculation of Guangdong Province, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Tight Junction; ZO-1; Permeability; ERK; MAPK

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of advanced glycation end products modified human serum albumin (AGE-HSA) on morphological changes of tight junction associated protein ZO-1 in endothelial cell and the mechanism in this pathological procedure.

Methods Human umbilical vein endothelial cell (hUVEC)-derived cell line (ECV304) were incubated with AGE-HSA in different concentrations and timing. To visualize the morphological changes of tight junction protein ZO-1, the treated cell were incubated with mouse anti-ZO-1 primary antibody and then FITC-anti-mouse IgG secondary antibody. The morphological changes of ZO-1 were observed with confocal microscope. The cell were pre-administrated with PD98059, a specific inhibitor of MEK1 (ERK upstream kinase) or SB203580, a specific inhibitor of p38 MAP kinase, respectively, before exposed to AGE-HSA, then the cell were rinsed with DMEM for three times and exposed to AGE-HSA. The cell were transfected with dominant negative MEK1 or MEK6b (p38 upstream kinase) mutant adenovirus, then exposed to AGE-HSA. And the cell were transfected with constitutively active MEK1 or MEK6b mutant adenovirus.

Results In normal control group, ZO-1 staining appeared as a continuous and smooth line along the regions of cell cell contact. Under the stimulation of AGE HSA, morphology of ZO-1 in endothelial cell were changed greatly in a concentration and time-dependent manner. The changes were partially blocked by PD98059 and SB203580. The transfection of dominant negative MEK1 and MEK6b mutant adenovirus had the similar effects. The transfection of constitutively active MEK1 and MEK6b disrupted the structure of ZO-1.

Conclusion AGE modified proteins can induce morphological changes of ZO-1 in endothelial cell. Activations of ERK and p38 MAP kinase pathways play an important role in this procedure.

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)在糖尿病血管并发症、动脉硬化、肾病、

[收稿日期] 2005-08-29

[修回日期] 2006-04-04

[作者简介] 李强, 硕士研究生, 研究方向为晚期糖基化终产物引起血管通透性改变的机制, 联系电话为 020-62789102, E-mail 为 liqiang_gz@126.com。陈波, 博士研究生, 助教, 研究方向为烧伤致内皮细胞通透性改变的机制, 联系电话为 020-62789102, E-mail 为 cbin2001@fimmul.com。通讯作者黄巧冰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事休克微循环血管通透性变化方面的研究, 联系电话为 020-62789102 或 020-61648186, E-mail 为 bing@fimmu.com。

老年性痴呆症以及衰老的发生发展中起重要作用^[1-3],而血管通透性升高则是 AGE 所致血管病变的早期和主要的病理生理基础。带状闭合蛋白(zonula occludens, ZO)是紧密连接的膜周边蛋白,主要作用为连接跨膜蛋白与肌动蛋白细胞骨架,其功能和结构的改变可引起紧密连接解离,细胞间缝隙加大,从而导致血管通透性升高。而 AGE 是否能引起紧密连接结构改变及通过何种途径实现,尚不清楚,我们对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株(ECV304)购于中国科学院上海细胞所;DMEM 培养基、胰酶和新生牛血清(natal bovine serum, NBS)购自 Invitrogen 公司;人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)购自 Sigma 公司;罗丹明-鬼笔环肽(Rhodamine-phalloidin)购自 Molecular Probes 公司;ZO-1 单抗及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗鼠-IgG 购自 Zymed 公司;AGE 修饰的人血清白蛋白(AGE-HSA)由南方医院肾内科实验室制作;特异蛋白突变体重组腺病毒由韩家淮教授馈赠,赵明博士转赠。

1.2 糖基化终产物的制备

糖孵育法制备 AGE-HSA^[4]。荧光分光光度法鉴定,AGE-HSA 中 AGE 含量为 71.0 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检测,内毒素含量低于 0.5 kEU/L。

1.3 细胞培养

脐静脉内皮细胞接种于微孔小皿,2~3 天待细胞长满汇合,换无血清培养 24 h,使细胞处于相对静止期以保持同步。

1.4 晚期糖基化终产物介导带状闭合蛋白 1 形态改变的剂量和时间效应

分别以 12.5、25.0、50.0 和 100.0 mg/L 的 AGE-HSA 作用于内皮细胞 8 h;另以 50.0 mg/L AGE-HSA 分别作用于内皮细胞 2、4、8 和 24 h。以不加任何刺激物的 DMEM 培养为正常对照组,分别以相应浓度及作用时间的 HSA 作平行阴性对照。各组细胞经处理后, PBS 漂洗 2 min × 3 次, 3.7% 多聚甲醛室温孵育 10 min, PBS 漂洗 2 min × 3 次,再用 0.5% Triton-100 于室温孵育 15 min, PBS 漂洗 2 min × 3 次,以 5 mg/L 的鼠抗 ZO-1 一抗室温孵育 1 h, PBS 漂洗 2 min × 3 次,然后以 15 mg/L FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗室温避光孵育 1 h,以特异显示 ZO-1 的结构和

分布;加二抗同时用 2 kU/L 的罗丹明-鬼笔环肽室温避光孵育 1 h 以特异显示内皮细胞纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)的形态和分布。漂洗干净后用激光共聚焦显微镜(莱卡 TCS-SP2, 德国)观察并记录。

1.5 细胞外信号调节激酶通路和 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路对内皮细胞紧密连接结构变化的影响

用细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated kinase, ERK)上游激酶 MEK1 抑制剂 PD98059 (25 μmol/L)预处理细胞 30 min,再以 50 mg/L AGE 作用 8 h,观察 ZO-1 和 F-actin 的形态学变化。为进一步证明 ERK 信号通路在 AGE 介导的内皮细胞紧密连接形态功能变化中的作用,用含显性失活 MEK1 的重组腺病毒 MEK1(A)转染内皮细胞 12 h,再以 50 mg/L AGE 作用 8 h;用组成性激活的 MEK1 重组腺病毒 MEK1(E)单独作用细胞 12 h。

用 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路抑制剂 SB203580 (25 μmol/L)预处理细胞 30 min,再以 50 mg/L AGE 作用 8 h。另用显性失活 p38 MAPK 上游激酶 MEK6b 的重组腺病毒 MEK6b(A)转染内皮细胞 12 h,再以 50 mg/L AGE 作用 8 h;用组成性激活 MEK6b 重组腺病毒 MEK6b(E)单独作用细胞 12 h。

均以不加任何刺激物的 DMEM 培养为正常对照组,只加 AGE 的为阳性对照组。各组细胞处理后,免疫荧光染色和观察方法同上。

2 结果

2.1 晚期糖基化终产物对带状闭合蛋白 1 形态学的影响

正常对照组内皮细胞 ZO-1 存在于细胞周边呈环状,线条清晰连续,边缘光滑流畅,勾勒出内皮细胞典型的铺路石形状,细胞间连接紧密,无明显间隙。随 AGE-HSA 作用浓度逐渐加大, ZO-1 环线条逐渐变得模糊,呈断裂状,边缘粗糙有毛刺状突起,在高浓度时(50 mg/L 和 100 mg/L)细胞间出现了明显的裂隙。50 mg/L AGE-HSA 作用 8 h, ZO-1 环出现明显中断,边缘也变得十分粗糙,24 h 时几呈崩解状。正常对照组的内皮细胞 F-actin 也存在于细胞周边,线条完整连续,成为完整致密束,且随着 AGE-HSA 作用浓度增大和作用时间延长,其变化与 ZO-1 相似。合并的图像可以看出二者的位置重叠(呈橙黄色)(图 1)。单纯 HSA 刺激对内皮细胞 ZO-1 和 F-actin 的形态和分布没有明显影响。低浓度(12.5

mg/L 和 25 mg/L) 及单纯 HSA 作用时细胞照片因论文篇幅所限未显示。

2.2 细胞外信号调节激酶通路在内皮细胞紧密连接结构变化中的作用

分别加入 MEK1 (ERK 上游激酶) 抑制剂 PD98059 和转染显性失活的 MEK1 的重组腺病毒抑

制了 ERK 通路后,再用 AGE 刺激,ZO-1 环的形态和分布虽未完全恢复到正常情况时的表现(图 1A),但与单纯 AGE 组(图 1D)相比已有较大改善。而转染组成性激活的 MEK1 的重组腺病毒单独作用细胞可引起 ZO-1 形态的改变,提示 ERK 通路参与介导了 AGE 引起的内皮细胞形态功能的变化(图 2)。

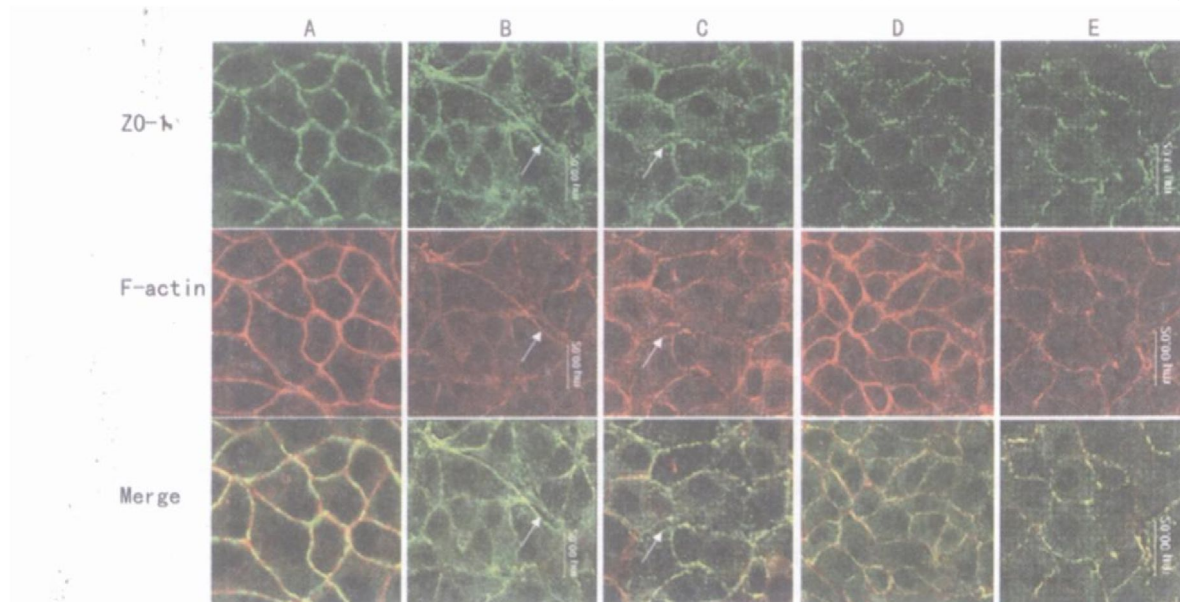


图 1. 晚期糖基化终产物对带状闭合蛋白 1 形态学的影响 ($\times 600$) A 为正常对照组; 剂量依赖性实验组 B 为 50 mg/L AGE-HAS 作用 8 h, C 为 100 mg/L AGE-HAS 作用 8 h; 时间依赖性实验组 D 为 50 mg/L AGE-HAS 作用 8 h, E 为 50 mg/L AGE-HAS 作用 24 h。结果至少重复 3 次, 箭头所指为细胞间出现了明显的裂隙。

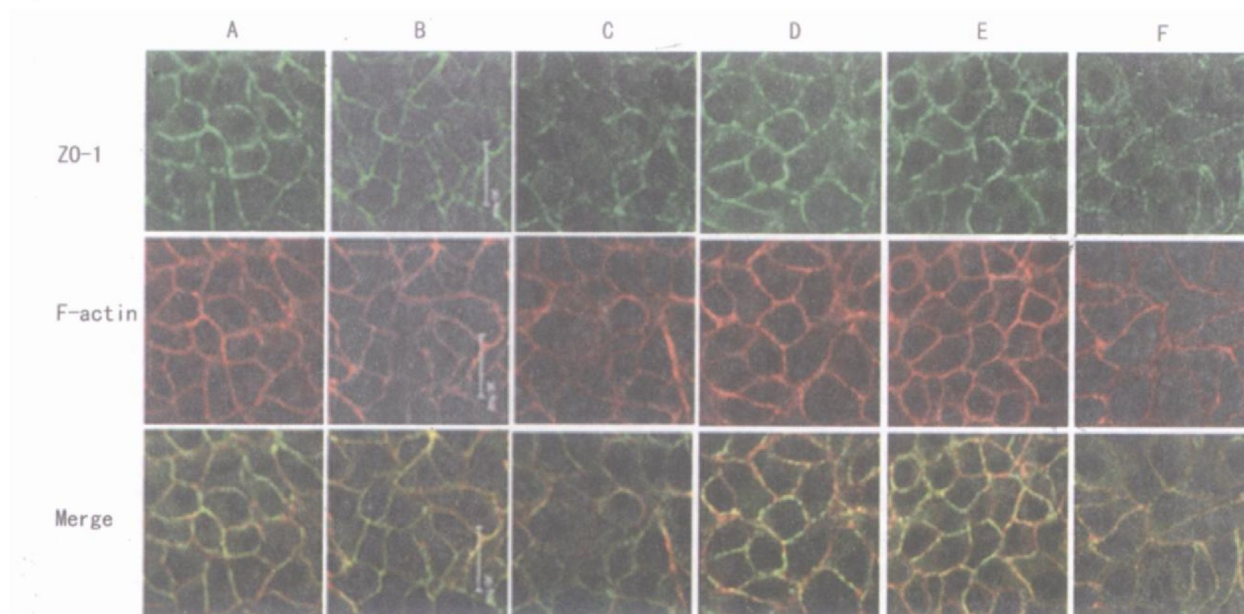


图 2. 细胞外信号调节激酶通路和 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路在晚期糖基化终产物引起内皮细胞紧密连接结构变化中的作用 ($\times 600$) A 为 PD98059+ AGE 组, B 为 MEK1(A)+ AGE 组, C 为 MEK1(E) 组, D 为 SB203580+ AGE 组, E 为 MEK6b(A)+ AGE 组, F 为 MEK6b(E) 组。结果至少重复 3 次。

2.3 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路内皮细胞紧密连接结构变化中的作用

分别加入 p38 通路抑制剂 SB203580 和转染显

性失活的 p38 MAPK 上游激酶 MEK6b 的重组腺病毒后,再用 AGE 刺激,发现其可部分阻断 AGE 对 ZO-1 形态的影响,其 ZO-1 环线条较 AGE 组(图 1D)光滑

连续;而转染组成性激活的 MEK6b 的重组腺病毒组, ZO-1 环线条模糊,破碎呈断点状,边缘粗糙有毛刺样突出。提示 p38 MAPK 通路参与介导了 AGE 引起的内皮细胞形态功能的变化(图 2)。

3 讨论

研究表明,糖尿病引起动脉粥样硬化较非糖尿病高 2~3 倍,长期高血糖状态下的蛋白质非酶糖基化形成的 AGE 可能通过引起血管内皮损伤、增加粘附分子表达、促进血栓形成及诱导内皮细胞表达组织因子等作用促使动脉粥样硬化发生、发展^[5,6],而血管通透性的增高是糖尿病血管并发症的一个标志性事件^[7],是其发生的最初表现和导致其他后续改变的病理基础。内皮细胞紧密连接主要由整合膜蛋白(occludin、claudin 等)、膜周边蛋白以及胞内和核蛋白组成。ZO-1 是最重要的膜周边蛋白,ZO-1 功能状态的改变将使血管通透性升高。

我们的前期工作已证明,AGE 以时间和剂量依赖的方式引起 F-actin 骨架发生重组和再分布,细胞周边 actin 环断裂,细胞中出现大量平行束状应力纤维^[8]。中心张力增加使收缩力超过粘附力,细胞收缩,最终导致细胞变圆、细胞间隙增大、增多,细胞旁通路增加,血管通透性升高。本研究进一步发现,AGE-HSA 也呈时间和剂量性引起内皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 结构形态的改变,同样条件下 HSA 并无此作用,证实了 AGE 可引起紧密连接结构发生改变,从而介导血管通透性的升高。

但是,AGE 究竟是如何引起 ZO-1 变化,其中的机制尚不清楚。有研究发现,AGE-HSA 作用于内皮细胞 10 min 时,p38 激酶磷酸化活性就明显升高,30 min 即达高峰^[9],另外 AGE 与其特异性受体结合 10 min 时就有 GTP-连接 p21ras 水平的升高,ERK1/2 的活性在 15~20 min 即达高峰^[10];亦有报道在 H₂O₂、TGFβ₃ 和 HIV-1 Tat 蛋白等因素刺激下 p38 MAPK 和 ERK1/2 激活,并引起 ZO-1 分布和表达改变,导致血管通透性增高^[11-14]。本实验结果也发现,p38 通路抑制剂 SB203580 和 ERK 通路抑制剂 PD98059 可明显阻断 AGE 的作用,证明 ERK 和 p38 MAPK 通路参与介导了 AGE 对紧密连接蛋白 ZO-1 形态和分布的影响;用显性失活的 ERK 上游激酶 MEK1 重组腺病毒 MEK1(A) 和 p38 MAPK 上游激酶 MEK6b 的重组腺病毒 MEK6b(A) 转染细胞,分别抑制 ERK 和 p38

通路的激活后,AGE 对内皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 的作用被明显减弱;而组成性激活的 MEK1 和 MEK6b 的重组腺病毒转染细胞,直接激活 ERK 和 p38 通路后,可诱导出 ZO-1 的形态改变,进一步证明 ERK 和 p38 MAPK 通路在 AGE 诱导内皮细胞紧密连接形态改变从而导致血管通透性升高中发挥重要作用。

本实验证明 AGE 可引起内皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 结构形态发生改变,ERK 和 MAPK 信号转导通路在此过程中发挥了重要的作用。

[参考文献]

- [1] Sakata N, Meng J, Takebayashi S. Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cell[J]. *J Arterioscler Thromb*, 2000, 7 (3): 169-176
- [2] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. AGE and carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15 (Suppl 2): 7-11
- [3] Reddy VP, Obrenovich ME, Atwood CS, Perry G, Smith MA. Involvement of maillard reactions in alzheimer disease[J]. *Neurotox Res*, 2002, 4 (3): 191-209
- [4] Hou FF, Boyce J, Chertow GM, Kay J, Owen WF Jr. Aminoguanidine inhibits advanced glycation end products formation on beta2-microglobulin[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9 (2): 277-283
- [5] 肖戎君,李春霖,刘冰熔,黄爱龙,邓华聪. 重组腺病毒 D38M 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] 郑超,文格波. 晚期糖基化终产物在糖尿病血管并发症中的致病机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8 (3): 270-272
- [7] Leto G, Prioci 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 nonenzymatic glycation and polyol pathway activation[J]. *Diabetes Metab Res*, 2001, 17: 448-458
- [8] 郭晓华,陈波,王述均,黄巧冰,侯凡凡. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (3): 287-291
- [9] 郭志坚,侯凡凡,张训,刘志强,王力. 晚期糖基化终产物通过 p38 信号通路抑制内皮细胞合成一氧化氮. *中华医学杂志*, 2002, 82 (19): 1328-1331
- [10] Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 1999, 84 (5): 489-497
- [11] Lai WY, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor beta3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68 (5): 1597-612
- [12] Kevil CG, Oshima T, Alexander JS. The role of p38 MAP kinase in hydrogen peroxide mediated endothelial solute permeability[J]. *Endothelium*, 2001, 8 (2): 107-116
- [13] Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cell[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78 (1): 125-136
- [14] Pu H, Tian J, Andras IE, Hayashi K, Flora G, Hennig B, et al. HIV-1 Tat protein induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK1/2 activation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25 (10): 1325-1335

(此文编辑 朱雯霞)