

[文章编号] 1007-3949(2006)14-07-0581-04

• 实验研究 •

## 晚期糖基化终末产物对内皮细胞前列腺素合成的影响及可能机制

游捷<sup>1,2</sup>, 黄清玲<sup>1</sup>, 林旭<sup>1</sup>, 刘礼斌<sup>2</sup>, 林建银<sup>1</sup>

(1. 福建医科大学分子医学研究中心, 福建省福州市 350004; 2. 福建医科大学附属协和医院, 福建省福州市 350001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期糖基化终末产物; 环氧合酶 2; 前列腺素合成; 内皮细胞; 反义 RNA; 基因转染

[摘要] 目的 探讨晚期糖基化终末产物对内皮细胞前列环素、前列腺素 E<sub>2</sub> 合成的影响及可能机制。方法 不同浓度的晚期糖基化终末产物作用内皮细胞, 酶联免疫吸附法测定前列环素的稳定代谢产物 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub> 和前列腺素 E<sub>2</sub> 的表达。逆转录聚合酶链反应、免疫细胞化学测定环氧合酶 2 mRNA 和蛋白表达的改变。晚期糖基化终末产物受体、核因子 κB 单/双基因反义 RNA 对晚期糖基化终末产物刺激内皮细胞分泌 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>、前列腺素 E<sub>2</sub> 的影响。结果 晚期糖基化终末产物引起内皮细胞分泌 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>、前列腺素 E<sub>2</sub> 增加 ( $P < 0.01$ ), 具有剂量依赖关系。晚期糖基化终末产物引起内皮细胞环氧合酶 2 的 mRNA 和蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )。晚期糖基化终末产物受体、核因子 κB 单/双基因反义 RNA 可减轻晚期糖基化终末产物刺激的内皮细胞分泌 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>、前列腺素 E<sub>2</sub> ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 双基因的抑制效果更明显 ( $P < 0.05$ )。结论 晚期糖基化终末产物可能通过晚期糖基化终末产物受体、核因子 κB 途径使内皮细胞的环氧合酶 2 表达增加, 从而引起前列环素、前列腺素 E<sub>2</sub> 合成增加, 这个机制可能参与了晚期糖基化终末产物所致的血管炎症损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Advanced Glycation End Products on Prostacyclin and Prostaglandin E<sub>2</sub> Expression in Culture Endothelial Cell and Its Mechanism

YOU Jie<sup>1,2</sup>, HUANG Qing-Ling<sup>1</sup>, LIN Xu<sup>1</sup>, LIU Li-Bin<sup>2</sup>, and LIN Jian-Yin<sup>1</sup>

(1. Molecular Medical Centre, Fujian Medical University, Fuzhou 350004; 2. Department of Endocrinology, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Cyclooxygenase 2; Prostanoids Synthesis; Endothelial Cell; Antisense RNA; Gene Transfection

[ABSTRACT] **Aim** To detect the effects of advanced glycation end products (AGE) on prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub> expressions in culture endothelial cell and its possible mechanism. **Methods** ECV304 cell were exposed to 50, 100, 200, 400 mg/L AGE or human serum albumin for 24 hours. The levels of 6-keto prostaglandin F<sub>1α</sub> (PGF<sub>1α</sub>) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in the supernatants were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA and protein were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical assay. The effects of receptor for AGE, nuclear factor-kappaB (NF-κB) single/double gene antisense RNA on the productions of 6-keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> induced by AGE were measured by ELISA. **Results** The productions of 6-keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> in the supernatants were higher in the cell treated by AGE, with a dose dependent manner ( $P < 0.01$ ). The levels of COX-2 mRNA and protein were significantly higher in the cell treated by AGE ( $P < 0.01$ ). Receptor for AGE, NF-κB single/double gene antisense RNA could inhibit the productions of 6-keto PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> treated by AGE ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The inhibition of double gene antisense RNA were more effective than single gene antisense RNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** AGE, via receptor for AGE, NF-κB signaling, induced upregulation of COX-2, resulting in induced prostacyclin and PGE<sub>2</sub> synthesis. This chain of events might contribute to the pathogenesis of inflammatory vascular injury.

近年研究发现血管内皮细胞通过分泌炎症介质

或调整白细胞在其表面的粘附作用, 在引发和扩大血管炎症反应中起重要作用。由花生四烯酸代谢产生的前列腺素不仅与血管内皮细胞生理功能密切相关, 并可能介导部分炎症反应。许多因素如高血糖、氧化型低密度脂蛋白等均可引起内皮细胞花生四烯酸代谢改变, 在血管炎症反应中起重要作用<sup>[1,2]</sup>。研

[收稿日期] 2005-09-26 [修回日期] 2006-07-03

[基金项目] 福建省科技开发计划项目(2003D09), 福建省卫生厅青年科研基金(2004-1-1)

[作者简介] 游捷, 博士研究生, 研究方向为血管炎症损伤相关的分子机制, E-mail 为 youjie987@sina.com。黄清玲, 助理研究员, 研究方向为分子生物学基础。通讯作者林建银, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血液免疫学。

究表明晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)是血管炎症损伤重要致病因素之一。AGE对 endothelial cell花生四烯酸代谢的影响研究较少。本研究观察体外制备的AGE对 endothelial cell花生四烯酸代谢产物前列环素(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)、前列腺素 E<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)表达的影响,并分析环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)在此过程的可能作用;利用已构建成功的晚期糖基化终末产物受体(receptor for AGE, RAGE)、核因子 κB(nuclear factor-κB)双基因反义 RNA 观察其对 AGE 诱导的 endothelial cell PGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> 表达的影响。以期进一步了解 AGE 在血管内皮细胞炎症损伤中的作用,为研究保护血管内皮细胞、调节内皮细胞的炎症反应提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

一步法逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、Trizol、Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。ECV304 细胞购自中科院上海细胞生物研究所。胰蛋白酶、人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)购自 Sigma 公司。胎牛血清购自杭州四季青公司;鼠抗人 COX-2 抗体、羊抗鼠辣根过氧化物酶抗体购自 Santa Cruz 公司;SP 组化试剂购自福州迈新公司。PGI<sub>2</sub> 的稳定代谢产物 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>)、PGE<sub>2</sub> ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司。上海博亚生物技术有限公司合成引物。

### 1.2 晚期糖基化终末产物的制备

按文献[3]方法进行,制备的 AGE 样本中,AGE 的荧光含量为 70.56 ku/g 蛋白,HSA 的对照样本为 2.21 ku/g 蛋白,符合 AGE 的自发荧光特性。鲎试剂法测定 AGE 样本中内毒素为 0.85 ZU/L,HSA 的对照样本中内毒素为 0.71 ZU/L。

### 1.3 晚期糖基化终末产物处理及前列腺素的测定

ECV304 常规培养,以  $5 \times 10^4$  接种于 6 孔细胞培养板,实验前用含 0.2% 胎牛血清的培养基培养 24 h。不同浓度 AGE(0、50、100、200 和 400 mg/L)作用 24 h 后收集培养液上清, -20℃ 保存,对照组为不同浓度 HSA (0、50、100、200、400 mg/L)。同时裂解细胞测总蛋白,平衡各组细胞数。ELISA 法测 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的浓度。操作严格按照试剂盒说明书进行,每种样品设复孔,结果以 ng/g 表示。

### 1.4 半定量逆转录聚合酶链反应

同 1.3 步处理细胞,Trizol 试剂提取总 RNA,一

步法 RT-PCR 扩增 COX-2 基因片段,根据 GeneBank 上人 COX-2 基因(X14322)设计引物,COX-2 上游引物为 5'-TGC ATT CTT TGC CCA GCA G-3',下游为 5'-GGC ACC AGA CCA AAG ACC TG-3';GAPDH 上游引物为 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3',下游为 5'-AGC TCA GGG ATG ACC TTG CC-3'。反应体系总体积 50 μL,由上下游引物各 10 pmol/L, RNA 3 μg、dNTP 1 μL、5× 缓冲液 10 μL、RT/Taq 酶 1 μL、焦碳酸二乙酯处理过的的水 26.5 μL 构成。反应条件为 55℃ 逆转录反应 60 min → 94℃ 预变性 2 min 后,94℃ 30 s → 55℃ 30 s → 72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃ 再延伸 7 min。根据 COX-2 和 GAPDH 基因扩增的线性范围选择 30 个循环,保证两个基因在线性范围内比较。扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,于凝胶成像系统中观察,采用图像分析系统,以 GAPDH 为内参照,分别测定 COX-2、GAPDH 的光密度,用 COX-2/GAPDH 的比值表示 COX-2 表达的相对水平。

### 1.5 免疫组织化学分析

ECV304 常规培养,  $3 \times 10^3$  接种于 96 孔板,实验前用含 0.2% 胎牛血清的培养基培养 24 h。加入 100 mg/L 的 AGE 和 HSA 作用 24 h,按照 SP 组化试剂盒操作,一抗为鼠抗人单抗 COX-2,工作浓度为 1:200。DAB 显色,阳性细胞为胞质呈棕黄色,可见棕黄色颗粒沉积。采用麦克奥迪数码医学图象分析结果,每孔取 6 个视野,分别计算阳性细胞的百分率,取其均值。

### 1.6 稳定转染及晚期糖基化终末产物处理不同克隆细胞后前列腺素的测定

构建 RAGE 和核因子 κB 反义 RNA 单/双基因共表达载体 pBudCE 4.1-as RAGE、pBudCE 4.1-as p65 和 pBudCE 4.1-as RAGE-as p65。Lipofectamine2000 介导稳定转染 ECV304 细胞。Zeocin 筛选出低表达 RAGE 核因子 κB 的细胞株,转染单基因 RAGE 反义 RNA 的细胞克隆中 RAGE 平均抑制率为 58.2% ± 7.1%,转染单基因核因子 κB 反义 RNA 的细胞克隆中核因子 κB 平均抑制率为 32.8 ± 5.8%,双基因转染细胞克隆中 RAGE、核因子 κB 表达抑制率分别为 62.2% ± 8.7% 及 39.2% ± 7.1%<sup>[4]</sup>。选择 RAGE、核因子 κB 低表达的克隆细胞经 100 mg/L AGE 和 HSA 处理 24 h 后收集培养液上清,裂解细胞测总蛋白,平衡各组细胞数。ELISA 法分别测定培养液上清 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的浓度。

### 1.7 统计学处理

每组实验重复 3 次,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS(10.0) 软件进行处理。样本均数的比较采

用方差分析和 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 晚期糖基化终末产物对内皮细胞分泌前列腺素的影响

正常 ECV304 细胞  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$  表达为  $1.87 \pm 0.81 \text{ ng/g}$ , 50 mg/L AGE 刺激 24 h 后  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$  表达( $3.45 \pm 0.98 \text{ ng/g}$ ) 明显增加 ( $P < 0.01$ )。正常 ECV304 细胞  $\text{PGE}_2$  表达为  $0.98 \pm 0.58 \text{ ng/g}$ , 50 mg/L AGE 刺激 24 h 后  $\text{PGE}_2$  表达( $5.67 \pm 1.02 \text{ ng/g}$ ) 与未刺激时比较明显增加 ( $P < 0.01$ )。50 mg/L HSA 刺激 24 h 后  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGE}_2$  表达分别为  $1.45 \pm 0.34 \text{ ng/g}$ 、 $0.76 \pm 0.33 \text{ ng/g}$ , 与未刺激时比较无明显改变。随着 AGE 作用浓度增加,  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$  和  $\text{PGE}_2$  的表达逐渐增加, 呈剂量依赖关系(图 1)。

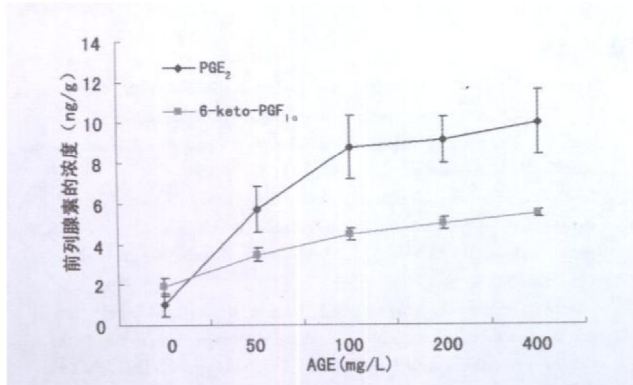


图 1. 晚期糖基化终末产物对内皮细胞前列腺素表达的影响

### 2.2 晚期糖基化终末产物对内皮细胞环氧合酶 2 mRNA 表达的影响

静息状态的 ECV304 表达极微量的 COX-2 mRNA, COX-2/GAPDH 为  $0.11 \pm 0.06$ 。50、100、200 和 400 mg/L AGE 刺激后, COX-2 mRNA 表达增加, COX-2/GAPDH 分别为  $0.29 \pm 0.07$ 、 $0.35 \pm 0.11$ 、 $0.51 \pm 0.09$  和  $0.50 \pm 0.12$ , 与未处理组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。不同浓度 HSA 处理 24 h 后 COX-2 mRNA 与未处理组比较未见明显增加。

表 1. 双基因反义 RNA 对晚期糖基化终末产物刺激内皮细胞前列腺素表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 细胞             | $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$ (ng/g) |                 | $\text{PGE}_2$ (ng/g) |                 |
|----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
|                | AGE                                  | HSA             | AGE                   | HSA             |
| 空载体转染细胞        | $3.49 \pm 0.98$                      | $1.53 \pm 0.56$ | $5.63 \pm 1.39$       | $1.23 \pm 0.56$ |
| RAGE 低表达细胞     | $2.12 \pm 0.69^a$                    | $1.79 \pm 0.78$ | $3.24 \pm 1.26^a$     | $1.14 \pm 0.38$ |
| p65 低表达细胞      | $2.21 \pm 0.59^a$                    | $1.98 \pm 1.03$ | $3.43 \pm 1.02^a$     | $1.30 \pm 1.09$ |
| RAGE/p65 低表达细胞 | $1.87 \pm 0.65^{bc}$                 | $1.73 \pm 0.87$ | $2.55 \pm 0.98^{bc}$  | $1.04 \pm 0.69$ |

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与空载体转染细胞比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 RAGE 低表达细胞和 p65 低表达细胞比较。

### 2.3 晚期糖基化终末产物对内皮细胞环氧合酶 2 蛋白表达的影响

未处理细胞和经 100 mg/L HSA 处理细胞 COX-2 阳性百分率分别为  $6.3\% \pm 1.4\%$  和  $9.4\% \pm 3.5\%$ , 100 mg/L AGE 处理 24 h 后, COX-2 阳性百分率 ( $46.7\% \pm 11.0\%$ ) 明显增加 ( $P < 0.01$ , 图 3)。

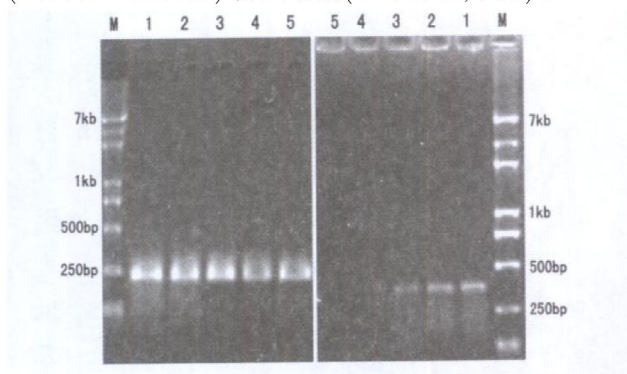


图 2. 逆转录聚合酶链反应检测环氧合酶 2 mRNA 的表达

左为 GAPDH, 右为 COX-2; 1 为未处理组, 2~5 分别为 50、100、200、400 mg/L 晚期糖基化终末产物处理组, M 为相对分子质量。

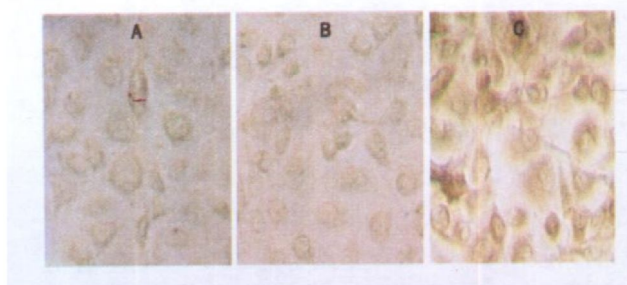


图 3. 免疫组织化学法检测环氧合酶 2 蛋白的表达 (DAB 显色,  $\times 200$ ) A 为未处理组, B 为 100 mg/L 人血清白蛋白处理组, C 为 100 mg/L 晚期糖基化终末产物处理组。

### 2.4 双基因反义 RNA 对晚期糖基化终末产物刺激内皮细胞前列腺素表达的影响

RAGE 低表达细胞和 p65 低表达细胞分泌  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$  和  $\text{PGE}_2$  较正常细胞和空载体转染细胞减少 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ); 双基因转染细胞分泌  $\text{6-keto-PGF}_{1\alpha}$  和  $\text{PGE}_2$  较正常细胞、空载体转染细胞、单基因转染细胞减少更明显 ( $P < 0.05$ , 表 1)。



### 3 讨论

环氧合酶(COX)分为COX-1和COX-2,正常内皮细胞仅表达COX-1,但受到细胞因子和生长因子等刺激后COX-2可迅速合成,表达增加。COX-2主要诱导花生四烯酸代谢生成PGI<sub>2</sub>和PGE<sub>2</sub>,对血栓素A<sub>2</sub>的影响较少。Cipollone等<sup>[5]</sup>报道在人颈动脉粥样硬化斑块中同时存在AGE及其受体RAGE和COX-2、前列腺素E合成酶1、基质金属蛋白酶2和9等。Shanmugam等<sup>[6]</sup>发现AGE可引起单核细胞COX-2和PGE<sub>2</sub>表达增加,与糖尿病慢性并发症发病机制有关。本文结果发现AGE可引起内皮细胞PGI<sub>2</sub>的稳定代谢产物6-keto-PGF<sub>1α</sub>和PGE<sub>2</sub>生成增加,而同样浓度的HSA对内皮细胞6-keto-PGF<sub>1α</sub>和PGE<sub>2</sub>生成无影响。PGI<sub>2</sub>是花生四烯酸代谢的重要产物,内皮细胞是其合成场所,主要起扩张血管的作用,而且是最强的抗血小板凝集因子,起保护血管的作用。PGI<sub>2</sub>生成增加可能对机体有好处,但目前研究表明内皮细胞维持血管舒缩最重要的因子是一氧化氮(nitric oxide, NO)和内皮素,已有资料表明AGE可引起内皮细胞NO减少和内皮素合成增加,在整体上对血管起收缩作用,推测AGE引起内皮细胞6-keto-PGF<sub>1α</sub>增加在体内不及NO和内皮素的改变显著,这一推测尚待进一步研究证实。

前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)能诱导单核巨噬细胞合成白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等炎症因子,同时IL-6和TNF-α等炎症因子又可诱导COX-2的表达,加重炎症反应。本研究结果发现AGE可引起内皮细胞PGE<sub>2</sub>的生成明显增加。推测PGE<sub>2</sub>生成增加可能作为一种炎症因子参与AGE所导致的炎症反应。本研究还观察了AGE对内皮细胞COX-2基因和蛋白表达的影响,结果发现正常内皮细胞很少表达COX-2基因和蛋白,在AGE作用下COX-2基因和蛋白表达增加,与张桂林等研究结果相一致<sup>[7]</sup>。COX-2介导产生的PGE<sub>2</sub>能增加血管通透性、促进单核细胞粘附、诱导巨噬细胞趋化性、促进巨噬细胞迁

移、刺激炎症性细胞因子的产生等,而这些效应均被认为与血管的炎症损伤密切相关。

本研究利用已构建RAGE和核因子κB反义RNA单/双基因共表达载体转染ECV304细胞,观察其对AGE刺激ECV304细胞PGI<sub>2</sub>和PGE<sub>2</sub>表达的影响。结果发现不论单/双基因转染细胞,AGE均较少引起克隆细胞PGI<sub>2</sub>和PGE<sub>2</sub>分泌,其中双基因转染细胞抑制效果更好,说明AGE刺激内皮细胞PGI<sub>2</sub>和PGE<sub>2</sub>释放是通过RAGE和核因子κB介导的。研究表明高浓度葡萄糖可引起肾系膜细胞COX-2表达增加,主要通过线粒体的活性氧生成和蛋白激酶C途径<sup>[8]</sup>,而AGE对细胞的影响主要通过RAGE介导,胞内信号与活性氧和蛋白激酶C有关。推测AGE可能通过经典的RAGE-核因子κB信号通路引起内皮细胞COX-2和前列腺素合成增加,在血管炎症损伤中起重要作用。

#### [参考文献]

- [1] Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species [J]. *Circulation*, 2003, **107** (7): 1 017-023
- [2] Smith IH, Boutaud O, Breyer M, Morrow JD, Oates JA, Vaughan DE. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (6): 983-988
- [3] Hou FF, Chertow GM, Kay J, Boyce J, Lazarus JM, Braatz JA, et al. Interaction between beta 2-microglobulin and advanced glycation end products in the development of dialysis related amyloidosis [J]. *Kidney Int*, 1997, **51** (5): 1 514-519
- [4] 游捷, 黄清玲, 林旭, 刘礼斌, 林建银. RAGE、NF-κB反义RNA单/双基因共表达载体的构建及序列测定[J]. *福建医科大学学报*, 2005, **39** (2): 117-120
- [5] 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 glycemic control [J]. *Circulation*, 2003, **108** (9): 1 070-077
- [6] Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (37): 34 834-844
- [7] 张桂林, 刘尚喜, 邓鹤秋, 张训. 晚期糖基化终产物诱导血管内皮细胞环氧合酶2表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (1): 53-54
- [8] Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, et al. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2003, **52** (10): 2 570-577

(此文编辑 许雪梅)