

## 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞黏附连接改变及其机制

王占华, 郭晓华, 刘湘兰, 李 强, 王吉萍, 王陵军, 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; 钙黏蛋白; 晚期糖基化终产物; 通透性; 丝裂原活化的蛋白激酶

[摘要] 目的 观察不同浓度和时间修饰的糖基化人血清白蛋白作用下, 人脐静脉内皮细胞内黏附连接蛋白钙黏着蛋白的形态结构变化, 并初步探讨其机制。方法 原代培养人脐静脉内皮细胞, 分别用不同浓度和时间修饰的糖基化人血清白蛋白处理, 用免疫荧光染色法、激光共聚焦显微镜观察钙黏着蛋白在内皮细胞的形态和分布变化。分别用可溶性的修饰的糖基化人血清白蛋白受体的抗体、丝裂原活化蛋白激酶抑制剂或转染重组腺病毒突变体转染预处理后再观察晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白对内皮细胞形态的影响。结果 修饰的糖基化人血清白蛋白以时间和剂量依赖方式引起内皮细胞黏附连接钙黏着蛋白形态结构的改变; 丝裂原活化蛋白激酶通路抑制剂(SB203580、PD98059、SP600125)和 Rho 激酶抑制剂 Y27632 均可减轻晚期糖基化终产物对钙黏蛋白的影响; 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 MKK6b 及 p38 显性失活的 p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  重组腺病毒突变体, 均可减轻晚期糖基化终产物对钙黏蛋白形态结构的影响, 而转染组成性激活的 MEK1 和 MKK6b 的重组腺病毒本身即可引起钙黏蛋白形态结构的变化。结论 晚期糖基化终产物刺激可以引起钙黏蛋白分布和形态的变化, 这一作用可能是丝裂原活化蛋白激酶通路细胞外信号调节激酶、p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/应激激活的蛋白激酶(SAPK)介导的。Rho 激酶可能参与此过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Morphological Changes of Vascular Endothelial Cadherin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Advanced Glycation End Products

WANG Zhan-Hua, GUO Xiao-Hua, LIU Xiang-Lan, LI Qiang, WANG Ji-Ping, WANG Ling-Jun, and HUANG Qiao-Bing

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

[KEY WORDS] Pathophysiology; Vascular Endothelial Cadherin; Advanced Glycation End Products; Permeability; Mitogen Activated Protein Kinases

[ABSTRACT] **Aim** To determine whether advanced glycation end products (AGE) altered the morphology and distribution of the adherens junction protein vascular endothelial (VE)-cadherin in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) and to understand the mechanism of this alteration. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were respectively incubated with AGE-HSA in different concentrations and timing. In some other cases, hUVECs were pretreated with mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway inhibitors (PD98059, SP600125, SB203580), or transfected with adenovirus. To visualize the morphological changes of VE-cadherin, cells were incubated with rabbit anti-VE-cadherin primary antibody and then FITC anti-rabbit IgG secondary antibody. The morphological changes of VE-cadherin were observed with confocal microscope.

**Results** The morphological of VE-cadherin was significantly changed in coincident with an increase of the dose and time of AGE-HSA. These changes could be inhibited with MAPK and Rho inhibitors.

**Conclusion** These observations suggested that AGE modified proteins can induce morphological changes of VE-cadherin in endothelial cell. Activations of MAP kinase and Rho kinase pathways play an important role in AGEs-induced hUVECs VE-cadherin distribution.

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 被认为在动脉硬化、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, 而内皮细胞活化所致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<sup>[1]</sup>。血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 是内皮细胞特异性的黏附蛋白, 是调节细胞间隙形成的内皮黏附连接的主要组成部分, 存在于细胞连接处, 主要作用为连接跨膜蛋白与肌动蛋白细胞骨架, 传送细胞内信号, 其结构和功能的改变可引起细

[收稿日期] 2008-05-08 [修回日期] 2008-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30771028)

[作者简介] 王占华, 硕士研究生, 研究方向为休克与微循环血管通透性变化机制, 联系电话为 15915729113, E-mail 为 Wangzhanhua@163.com。郭晓华, 医师, 博士研究生, 研究方向为休克与微循环血管通透性变化机制。通讯作者黄巧冰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为休克与微循环血管通透性变化机制, 联系电话为 020-61648186, E-mail 为 bing@fimmu.com。

胞连接破坏,细胞骨架结构改变,从而导致细胞间缝隙形成,血管通透性升高<sup>[2]</sup>。本室前期的研究结果显示 AGE 可以引起纤维状肌动蛋白和内皮细胞紧密连接结构的改变<sup>[3,4]</sup>,而 AGE 是否能引起黏附连接结构改变及通过何种途径实现,尚不清楚,本文对此进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

MI99 培养基、胰酶购自 Gibco 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)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,VE-cadherin 单抗购自 Santa Cruz 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司,AGE 受体的可溶性抗体(anti-RAGE IgG)由南方医科大学免疫教研室富宁教授赠送,SB203580, PD98059, SP600125, Y27632 购自美国 Calbiochem 公司,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-HAS<sup>[5]</sup>,由 HSA 与 D-葡萄糖在磷酸盐缓冲液中共孵育 8 周,透析,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 内皮细胞培养及鉴定

原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)由脐带内皮胰酶消化所得,接种于微孔小皿,分组处理。内皮细胞鉴定,用兔抗人第Ⅱ因子相关抗原抗体,采用荧光免疫法鉴定。

### 1.4 血管内皮钙黏蛋白形态学结构观察

根据实验设计各组细胞经处理后, PBS 漂洗 2 min × 3 次, 3.7% 多聚甲醛室温孵育 15 min, PBS 漂洗 2 min × 3 次,再用 0.5% Triton100 于室温孵育 15 min, PBS 漂洗 2 min × 3 次,以含 5% 牛血清白蛋白的封闭液室温孵育,以 1:50 稀释的兔抗 VE-cadherin 一抗室温孵育 1 h, PBS 漂洗 2 min × 3 次,然后以 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗室温避光孵育 1 h,以特异显示 VE-cadherin 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 TCS2SP2, 德国)观察并记录。

## 1.5 实验分组及测定

### 1.5.1 晚期糖基化终产物作用的时间和浓度效应

分别用 50 mg/L 的 AGE-HSA 和 HSA 分别刺激内皮细胞 2、4、8 h 和 12 h;或分别用 12.5、25、50 mg/L 和 100 mg/L 的 AGE-HSA 和 HSA 刺激内皮细胞 8 h,检测 VE-cadherin 形态和表达的改变。

### 1.5.2 抗体和抑制剂对晚期糖基化终产物介导内皮细胞形态变化的影响

Anti-RAGE IgG (50, 100 μg/mL) 与内皮细胞共同孵育 1 h; Rho 激酶抑制剂 Y27632 与内皮细胞共同孵育 30 min; 细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK) 通路抑制剂 PD98059 (50 μmol/L), p38 MAPK 抑制剂 SB203580 (25 μmol/L), 或 JNK 通路抑制剂 SP600125 (25 μmol/L) 分别与内皮细胞共同孵育 30 min; 用 MI99 洗 3 遍,再加入 50 mg/L 的 AGE-HSA 作用 8 h。以加 HSA 为正常对照,只给予 AGE 刺激,不加抗体和抑制剂的为阳性对照。

1.5.3 腺病毒转染实验 先将含目的基因,即 ERK 和 p38 通路的上游激酶失活或激活型重组腺病毒导入内皮细胞,转染 24 h 后,再换以加或不加 50 mg/L AGE-HSA 的无血清 MI99 作用 8 h,以加 HSA 的为正常对照。

### 1.6 统计学处理

本实验的形态学观察例数各组均超过 3 例,选用代表性的图片在结果中展示。

## 2 结果

### 2.1 原代培养的人脐静脉内皮细胞的鉴定

经Ⅱ因子相关抗原间接免疫荧光鉴定,所培养的细胞表达较高密度的Ⅱ因子相关抗原,证实其为内皮细胞。

### 2.2 晚期糖基化终产物影响内皮细胞黏附连接蛋白形态学结构的时间和剂量效应

正常 HSA 对照组的内皮细胞 VE-cadherin 存在于细胞周边呈环状,线条清晰连续,细胞间连接紧密,无明显缝隙; F-actin 主要存在于细胞周边,呈完整连续的致密束。随 AGE-HSA 作用浓度的加大和时间的延长, VE-cadherin 线条逐渐呈断裂锯齿状,甚至出现中断,边缘也变得十分粗糙;(图 1、图 2 的绿色荧光部分); F-actin 在胞浆内弥散分布,最终形成应力纤维(图 1、图 2 的红色荧光部分),细胞间出现明显裂隙。单纯 HSA 刺激对内皮细胞 VE-cadherin 和 F-actin 的形态和分布没有明显影响(结果未显示)。

### 2.3 晚期糖基化终产物的可溶性抗体 IgG 抑制晚期糖基化终产物人血清白蛋白对血管内皮钙黏蛋白和细胞骨架纤维状肌动蛋白的作用

在预处理了 Anti-RAGE 的细胞中, 由 AGE-HSA 介导的 VE-cadherin 的变化基本被抑制, 与 HSA 单独刺激的细胞形态趋于一致(图 3 anti-RAGE+ AGE)。提示 Anti-RAGE IgG 竞争性抑制了 AGE 与其受体的结合后, 可以阻断 AGE 介导的 VE-cadherin 的变化。

### 2.4 Rho GTP 酶影响内皮细胞黏附连接结构变化

在预处理了 Y27632 的细胞中, VE-cadherin 结构和分布变化与单纯 AGE(图 1 8 h)作用相比有所改善, 提示 RhoGTP 酶抑制剂可以部分阻断 AGE 介导的 VE-cadherin 的变化(图 3Y27632+ AGE)。

### 2.5 MAPK 通路在晚期糖基化终产物介导的内皮细胞紧密连接结构变化中的作用

在分别预处理了 PD98059, SP600125 或 SB203

580 的细胞中, 由 AGE-HSA 介导的 VE-cadherin 的锯齿状改变均可被显著抑制; F-actin 的膜周边分布也被保护(图 3)。提示 ERK、JNK 和 p38 通路均参与介导了 AGE 引起的内皮细胞黏附连接结构的变化。

### 2.6 ERK 和 p38 通路作用的进一步证明

在分别转染了含显性失活 MEK1[MEK1(A)]、显性失活 MKK6b[MKK6b(A)] 的重组腺病毒和含显性失活 p38 $\alpha$ [p38 $\alpha$ (A)]、 $\beta$ [p38 $\beta$ (A)] 的重组腺病毒的内皮细胞中, AGE 刺激后 VE-cadherin 以及 F-actin 的结构和分布与单纯 AGEs 作用组(图 1)相比已有较大改善, 几乎恢复到细胞正常未受刺激的状态; 而转染组成性激活的 MEK1[MEK1(E)] 或 MKK6b[MKK6b(E)] 重组腺病毒的细胞中, VE-cadherin 的形态发生了与 AGE 刺激类似的变化(图 4)。结果进一步证明 ERK 和 p38 信号通路参与介导了 AGE 引起内皮细胞黏附连接 VE-cadherin 分布的变化。

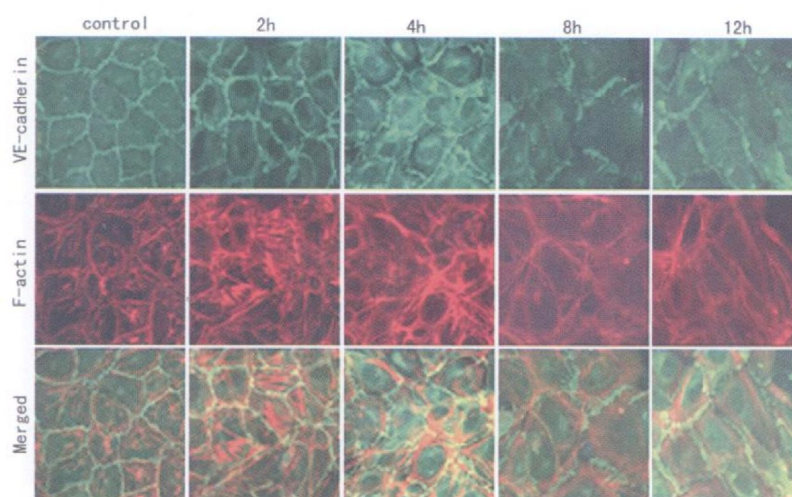


图 1. 晚期糖基化终产物以时间依赖的方式引起血管内皮钙黏蛋白形态变化 ( $\times 800$ )。 AGE-HSA 为 50 mg/L, 结果重复 3 次。

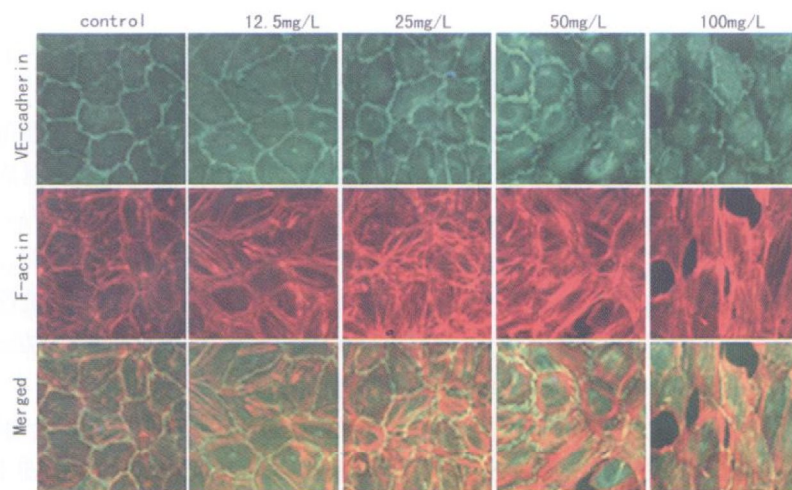


图 2. 晚期糖基化终产物以剂量依赖的方式引起血管内皮钙黏蛋白形态变化 ( $\times 800$ )。 AGE-HSA 作用 8 h, 结果重复 3 次。



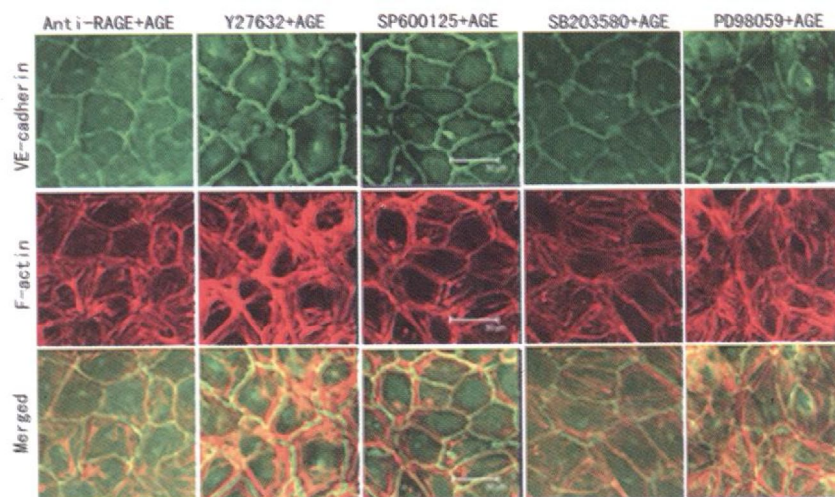


图3 相关抗体和抑制剂在晚期糖基化终产物介导的血管内皮钙黏着蛋白分布变化中的作用( $\times 800$ ) 结果重复3次。

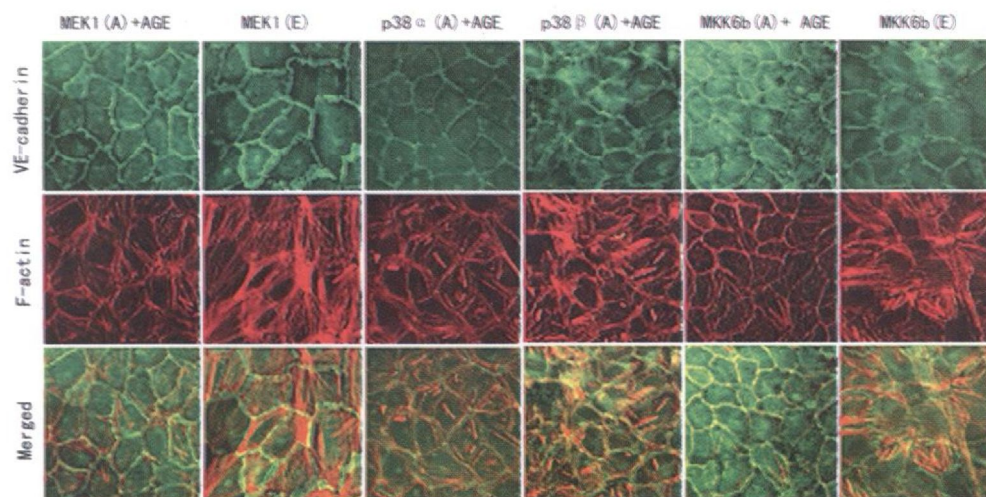


图4. 显性失活(A)和显性激活(E)的重组腺病毒转染在晚期糖基化终产物介导的钙黏着蛋白变化中的作用( $\times 800$ )

### 3 讨论

长期高血糖状态下的蛋白质非酶糖基化形成的晚期糖基化终末产物 AGE 在糖尿病晚期并发症的发生及细胞功能障碍的过程中发挥着至关重要的作用。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 As 发生、发展<sup>[6]</sup>, 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, 是其发生的最初表现和导致其他后续改变的病理基础。与血管通透性有密切关系的内皮细胞间连接包括紧密连接和黏附连接<sup>[7]</sup>。其中黏附连接以跨膜分子钙黏着蛋白(cadherin)为中心, 钙黏着蛋白与胞浆中的连环蛋白(catenin)连接。钙黏着蛋白只参与构成细胞与细胞间的黏附, 这种黏附成为黏附连接。内皮细

胞的钙黏着蛋白 VE-cadherin 通过其胞浆尾端与  $\beta$ -catenin 结合,  $\beta$ -catenin 再依次与  $\alpha$ -catenin 及黏附连接复合体连接肌动蛋白细胞骨架<sup>[8]</sup>。作者的前期工作已证明, 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 F-actin 环断裂, 细胞中出现大量平行束状应力纤维, 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, 血管通透性升高, 另外也证明了 AGE 以时间和剂量依赖的方式引起紧密连接蛋白 ZO-1 的形态结构改变<sup>[3,4]</sup>, 本研究发现, AGE-HSA 也呈时间和剂量性引起内皮细胞黏附连接蛋白 VE-cadherin 形态的改变, 同样条件下 HSA 并无此作用, 提示了 AGE 可引起黏附连接结构和细胞骨架 F-actin 形态同时发生改变, 从而使通透性升高。免疫

蛋白印迹结果还显示随着 AGE 作用时间和剂量的变化,细胞内 VE-cadherin 的表达并未发生明显改变(结果没有显示),这说明 AGE 并不引起细胞内总的 VE-cadherin 表达量变化,然而有文献报道,流体静压改变可引起细胞表面 VE-cadherin 表达减少<sup>[9]</sup>,这说明可能 AGE 介导的通透性升高与 VE-cadherin 形态和分布改变有关而与其表达无关。

已经研究证实 AGE 发挥其生物学效应主要由于其受体介导,与之结合后可引起细胞内一系列信号物质改变,导致活性氧产生,诱导产生多种损伤因子,引起后续病理生理学的改变<sup>[10]</sup>。本实验结果显示预处理了 RAGE 可溶性抗体的细胞在 AGE 刺激后 VE-cadherin 形态结构发生改变被逆转,这可以说明 AGE 通过与 RAGE 结合引起 VE-cadherin 改变。

小 G 蛋白 Rho 家族与细胞通透性的变化有着密切的关系。Rho 蛋白可引起细胞内肌动-肌球蛋白微丝功能变化,同时介导以整合蛋白为主导的细胞与基底膜之间的附着斑复合物的形成,并参与调节细胞间紧密连接功能的调节,有研究也提示细胞间钙黏蛋白介导的黏附连接的组成也需要 Rho 蛋白参与<sup>[11,12]</sup>,在本研究发现 Rho 激酶抑制剂 Y27632 可以减弱 AGE 对 VE-cadherin 的影响作用,说明 Rho 激酶在此过程中起着重要作用,但其具体机制还需进一步研究。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)是细胞应激和损伤反应的主要信号通路,在 AGE 介导的细胞损伤反应中 MAPK 的作用有大量的研究,研究表明 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,另外 AGE 与其特异性受体结合 10 min 时就有 GTP2 连接 p21ras 水平的升高, ERK1/2 的活性在 15~20 min 即达高峰<sup>[13,14]</sup>;在 TNF 等因素刺激下 JNK 活性增加,并引起 VE-cadherin 结构、分布和磷酸化状态的改变,导致血管通透性增高<sup>[15-17]</sup>,本实验结果发现, p38 通路抑制剂 SB203580 和 ERK 通路抑制剂 PD98059 及 JNK 抑制剂 SP600125 分别抑制 ERK 和 p38 及 JNK 通路的激活后可明显阻断 AGE 的作用,证明 ERK 和 p38MAPK 及 JNK/SAPK 通路参与介导了 AGE 对黏附连接蛋白 VE-cadherin 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 p38MAPK 上游激酶 MKK6b 的重组腺病毒 MKK6b(A)转染细胞, AGE 对内皮细胞黏附连接蛋白 VE-cadherin 的作用被明显减弱;而组

成性激活的 MEK1 和 MKK6b 的重组腺病毒转染细胞,直接激活 ERK 和 p38 通路后,可诱导出 VE-cadherin 的形态改变,进一步证明 ERK 和 p38MAPK 及 ERK 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。本实验证明了 AGE 可通过与内皮细胞上 AGE 受体结合引起内皮细胞黏附连接蛋白 VE-cadherin 结构形态发生改变, MAPK 信号转导通路及 Rho 激酶在此过程中发挥了重要的作用。

#### [参考文献]

- [1] 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8(3): 270-272.
- [2] 赵克森, 金丽娟. 《休克的细胞和分子基础》[M]. 第1版, 北京: 科学出版社; 38-82.
- [3] Guo XH, Huang QB, Chen B, et al. Advanced glycation end products induce actin rearrangement and subsequent hyperpermeability of endothelial cells [J]. *APMIS*, 2006, 114(12): 874-883.
- [4] 李强, 郭晓华, 朱艳军, 等. 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞紧密连接改变及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(6): 499-502.
- [5] Hou FF, Boyce J, Chertow GM, et al. Aminoguanidine inhibits advanced glycation end products formation on beta2-microglobulin [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(2): 277-283.
- [6] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.
- [7] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 869-890.
- [8] Nawroth R, Poell G, Ranft A, et al. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts [J]. *EMBO J*, 2002, 21(18): 4885-895.
- [9] Ohashi T, Sugaya Y, Sakamoto N, et al. Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells [J]. *J Bio-mech*, 2007, 40(11): 2399-405.
- [10] Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site [J]. *FEBS Lett*, 2003, 550(1-3): 107-113.
- [11] Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, et al. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(4): 1175-189.
- [12] Seebach J, Moller HJ, Wojciak-Stothard B, et al. Tyrosine phosphorylation and the small GTPase Rac cross-talk in regulation of endothelial barrier function [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 94(3): 620-629.
- [13] 郭晓华, 陈波, 王述昀, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 282-286.
- [14] Nwariaku FE, Chang J, Zhu X, et al. The role of p38 MAP kinase in tumor necrosis factor-induced redistribution of vascular endothelial cadherin and increased endothelial permeability [J]. *Shock*, 2002, 18(1): 82-85.
- [15] Usatyuk PV, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 35554-566.
- [16] Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, et al. TNF-α increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(6): L1232-245.
- [17] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 13): 2115-122.

(此文编辑 李小玲)