

晚期糖基化终产物诱导 ECV304 细胞株氧化增强的可能机制

张桂林^{1,2}, 刘尚喜³, 张训³

(1. 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东省广州市 510089; 2. 广州市药品检验所, 广东省广州市 510160; 南方医科大学南方医院肾内科, 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; 细胞株 ECV304; 活性氧; 谷胱甘肽

[摘要] **目的** 探讨晚期糖基化终产物诱导细胞株 ECV304 氧化增强的机制。**方法** 取 ECV304 细胞培养, 与不同浓度的晚期糖基化终产物-人血清白蛋白共孵育, 或分别经 NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin 或蛋白激酶 C 抑制剂 GF109203 或酪氨酸蛋白激酶抑制剂 Genistein 预孵育 0.5 h 后, 再与晚期糖基化终产物-人血清白蛋白共孵育, 1 h 后收集细胞, 用细胞色素 C 法检测 $O^{2-}\cdot$, ThioGlo-1 试剂检测还原型谷胱甘肽。**结果** 12.5 mg/L、50 mg/L 和 200 mg/L 晚期糖基化终产物-人血清白蛋白可导致 ECV304 细胞内 $O^{2-}\cdot$ 从 $1.37 \pm 0.67 \text{ nmol}/(10^7 \cdot \text{h})$ 增加到 3.44 ± 0.40 、 10.67 ± 0.67 和 $10.93 \pm 0.67 \text{ nmol}/(10^7 \cdot \text{h})$, 使还原型谷胱甘肽从 $9.54 \pm 0.41 \text{ nmol}/10^6$ 降低到 9.02 ± 0.21 、 8.41 ± 0.34 和 $8.02 \pm 0.18 \text{ nmol}/10^6$, 两者均呈剂量依赖性。Apocynin、GF109203 及 Genistein 均可抑制 $O^{2-}\cdot$ 的增加及还原型谷胱甘肽的降低。**结论** 晚期糖基化终产物-人血清白蛋白可通过蛋白激酶 C 和酪氨酸蛋白激酶途径激活 NADPH 氧化酶, 引起 ECV304 细胞内 $O^{2-}\cdot$ 产生及还原型谷胱甘肽降低, 导致细胞内氧化增强。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Mechanism of Advanced Glycation End Products Induced Oxidative Effects in Cultured ECV304 Cells

ZHANG Gui-Lin^{1,2}, LIU Shang-Xi³, and ZHANG Xun³

(1. Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China; 2. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China; 3. Department of Nephrology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] Glycation End Products; ECV304; Reactive Oxygen Species; Glutathione

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the mechanism of advanced glycation end products (AGE) inducing oxidative effects in cultured ECV304 cells. **Methods** ECV304 cells were cultured in vitro with AGE-human serum albumin (HSA), or pretreated with Apocynin or GF109203 or Genistein for 0.5 h, then cultured with AGE-HSA. After 1 h, the level of $O^{2-}\cdot$ was measured with cytochrome C, the level of reduced glutathione was measured with ThioGlo-1. **Results** $O^{2-}\cdot$ increased from $1.37 \pm 0.67 \text{ nmol}/(10^7 \cdot \text{h})$ to 3.44 ± 0.40 , 10.67 ± 0.67 and $10.93 \pm 0.67 \text{ nmol}/(10^7 \cdot \text{h})$, and reduced glutathione decreased from $9.54 \pm 0.41 \text{ nmol}/10^6$ to 9.02 ± 0.21 , 8.41 ± 0.34 , and $8.02 \pm 0.18 \text{ nmol}/10^6$ after 12.5 mg/L, 50 mg/L, 200 mg/L AGE-HSA stimulating; Apocynin, GF109203 and Genistein could inhibit these effects. **Conclusion** AGE-HSA could activate NADPH oxidase enzyme via protein kinase (PKC) and tyrosine protein kinase (TPK) to induce $O^{2-}\cdot$ increasing and reduced glutathione decreasing and enhance intracellular oxidative effects.

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)是蛋白质结构中的氨基和糖结构中的醛基经非酶性糖化-氧化反应后形成的终产物。AGE可引起细胞核因子 κB 的激活, 调节细胞介质表达^[1]。氧化产物如活性氧增多或抗氧化产物降低导致的氧化增强, 在 AGE 诱导的核因子 κB 激活中起着重要作用^[2,3]。活性氧生成过程中 NADPH 氧化酶起着重要作用^[4], 而在 NADPH 氧化酶的激活中, 存

在蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 或酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, PTK) 这两种激酶参与。我们分别用 NADPH 氧化酶、PKC 和 PTK 的抑制剂作用于细胞后, 观察 AGE 诱导的活性氧及还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平的变化, 研究 AGE 刺激 ECV304 细胞氧化增强的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株 ECV304 由中国科学院上海细胞研究所提供; 无内毒素人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA), 细胞色素 C 购自 Sigma 公司; NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin、PKC 抑制剂 GF109203、PTK 抑制剂

[收稿日期] 2007-06-29

[修回日期] 2008-07-29

[作者简介] 张桂林, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病的基础研究和临床治疗, 联系电话 020-26282368-653, 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。张训, 教授, 主要从事肾病的基础研究和临床治疗。

Genistein 和 ThioGlo-1 购自 BIOMOL 公司。

1.2 晚期糖基化终产物-人血清白蛋白的制备

按文献[5]体外制备 AGE 修饰蛋白。将 1.7 g/L HSA 与 0.1 mol/L D-葡萄糖在 0.4 mol/L 磷酸盐缓冲液中 37℃ 孵育 8 周。以相同条件但不含葡萄糖的缓冲液中孵育 8 周的 HSA 作为对照。制备的样本经抗 AGE 抗体 ELISA 法和荧光分光光度计分析鉴定,经鲎试验法检测无内毒素。以 pH 7.4 的 PBS 透析除去未结合的葡萄糖,用 0.22 μm 的微孔膜过滤除菌。

1.3 细胞株 ECV304 的培养

细胞株 ECV304 在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 37℃、5% CO_2 孵育箱中培养。生长至融合期的细胞用 0.25% 胰酶-0.016% EDTA 消化,按 1:3 传代。第 7~12 代细胞用于实验。

1.4 高铁细胞色素 C 还原法测定 $\text{O}^{2-}\cdot$

细胞经 500 $\mu\text{mol/L}$ Apocynin 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GF109203 或 75 $\mu\text{mol/L}$ Genistein 预孵育 0.5 h 后,加入 AGE-HSA (50 mg/L) 孵育 1 h, 分离细胞。用 PBS 制备细胞悬液,调整细胞浓度至 $5 \times 10^{10}/\text{L}$ 。取细胞悬液 10 μL , 加入 1 mmol/L 高铁细胞色素 C 至终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 37℃ 恒温水浴 1 h, 3 kr/min 离心, 取上清, 测定 550 nm 处的光吸收值。1 h 内 $\text{O}^{2-}\cdot$ 生成量=测得的光吸收值 $\div$ 吸收系数(2.99×104)。

1.5 谷胱甘肽的检测

细胞内的 GSH 可与巯基反应试剂 ThioGlo-1 迅速反应,产生具有荧光的产物,测定荧光物质的含量,可反映细胞内的 GSH 含量。细胞经 500 $\mu\text{mol/L}$ Apocynin 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GF109203 或 75 $\mu\text{mol/L}$ Genistein 孵育 0.5 h 后,加入 AGE-HSA (50 mg/L) 孵育 1 h, 分离细胞。取 1×10^6 经不同处理的细胞,加入 100 μL PBS, 用反复冻融法制备细胞裂解液。取 50 μL 细胞裂解液加入到 3 mL PBS 缓冲液中,加 10 mmol/L 的 ThioGlo 试剂至终浓度为 10 mmol/L, 混匀后,用荧光分光光度计测定荧光值。以 GSH 为标准作标准曲线,计算样本的 GSH 含量,单位以 nmol/ 10^6 细胞计。

1.6 统计学处理

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

2 结果

2.1 不同浓度的晚期糖基化终产物对产生活性氧和谷胱甘肽的影响

细胞株 ECV304 经不同浓度的 AGE-HSA 刺激

后, $\text{O}^{2-}\cdot$ 生成量明显增加,同时,细胞内 GSH 含量降低, $\text{O}^{2-}\cdot$ 生成量及 GSH 降低程度均随 AGE-HSA 浓度增加而增加(表 1)。

表 1. 晚期糖基化终产物诱导 ECV304 细胞株 $\text{O}^{2-}\cdot$ 和谷胱甘肽的产生

AGE-HSA (mg/L)	$\text{O}^{2-}\cdot$ [nmol/($10^7 \cdot \text{h}$)]	GSH (nmol/ 10^6)
0 (对照)	1.37 $\pm$ 0.67	9.54 $\pm$ 0.41
12.5	3.44 $\pm$ 0.40 ^a	9.02 $\pm$ 0.21 ^a
50	10.67 $\pm$ 0.67 ^a	8.41 $\pm$ 0.34 ^a
200	10.93 $\pm$ 0.67 ^a	8.02 $\pm$ 0.18 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较。

2.2 NADPH 氧化酶参与晚期糖基化终产物诱导的 $\text{O}^{2-}\cdot$ 和谷胱甘肽的产生

用 NADPH 氧化酶特异性抑制剂 Apocynin 预孵育 0.5 h, 可以抑制 $\text{O}^{2-}\cdot$ 的产生和 GSH 的降低。500 $\mu\text{mol/L}$ Apocynin 可使 AGE-HSA 诱导产生的 $\text{O}^{2-}\cdot$ 下降 61.2%, GSH 降低则被完全抑制(表 2)。

表 2. 抑制不同酶的活性对晚期糖基化终产物诱导 $\text{O}^{2-}\cdot$ 和谷胱甘肽产生的影响

分组条件	$\text{O}^{2-}\cdot$ [nmol/($10^7 \cdot \text{h}$)]	GSH (nmol/ 10^6)
对照	1.37 $\pm$ 0.67 ^a	9.54 $\pm$ 0.41 ^a
AGE-HSA	10.90 $\pm$ 0.67	8.41 $\pm$ 0.34
AGE+ A	4.45 $\pm$ 0.26 ^a	9.65 $\pm$ 0.56 ^a
AGE+ GF	7.00 $\pm$ 0.67 ^a	9.43 $\pm$ 0.34 ^a
AGE+ G	5.79 $\pm$ 0.13 ^a	9.52 $\pm$ 0.29 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 AGE-HSA 组比较; A 为 Apocynin 的缩写, GF 为 GF109203 的缩写, G 为 Genistein 的缩写。

2.3 蛋白激酶 C 和酪氨酸蛋白激酶参与晚期糖基化终产物诱导的 $\text{O}^{2-}\cdot$ 和谷胱甘肽的产生

用 GF109203 (5 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 PKC 的活性,再用 Genistein (75 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 PTK 的活性后,AGE 诱导产生的 $\text{O}^{2-}\cdot$ 分别被抑制 32.3% 和 46.5%; 而可使 AGE 引起的 GSH 降低分别上升至接近正常(表 2)。

3 讨论

核因子 KB 激活在心血管系统的结构及生理功能改变中起重要的作用^[6]。AGE 可在体内缓慢生成不断蓄积,它可作为激活核因子 KB 的致病因子之一,其机制与 AGE 引起氧化增强有关。活性氧是重要的氧化产物,主要是 $\text{O}^{2-}\cdot$ 和 $\text{O}^-\cdot$ 。生理情况下,活性氧能被体内的抗氧化机制消除,包括谷胱甘肽

氧化还原系统、维生素 C- 维生素 E 循环以及 α 硫辛酸-二氢硫辛酸氧化还原系统。活性氧的生成增加或清除能力降低, 导致体氧化增强, 引起细胞和组织的损伤^[3,7]。

我们用 AGE-HSA 与 ECV304 细胞共孵育后, 检测到细胞内 $O^{2-} \cdot$ 增加及 GSH 降低, 提示细胞内氧化增强, 与文献[3]报道一致。

NADPH 氧化酶在活性氧产生中起着重要的作用, NADPH 氧化酶是由位于细胞膜和细胞浆的多种亚基构成的复合体。正常情况下, 各亚基分别独立存在于胞膜或胞浆, 当细胞受到刺激时, 胞浆中的亚基向细胞膜移位, 与胞膜上的亚基构成复合体组装成全酶而具有催化活性, 通过氧化 NADPH 将单电子传递给 O_2 而产生 $O^{2-} \cdot$, Apocynin 可抑制 NADPH 氧化酶的组装而抑制其催化活性^[8,9]。我们用 Apocynin 抑制 NADPH 氧化酶的活性后, 检测到 AGE 诱导的 $O^{2-} \cdot$ 降低 61.2%, 而 GSH 水平恢复正常。说明 AGE 诱导 ECV304 细胞内氧化增强主要是由 NADPH 氧化酶介导的。对不同刺激剂激活 NADPH 氧化酶机制的研究发现, PKC 和 PTK 均可介导 NADPH 氧化酶的激活。我们用 PKC 抑制剂 GF109203 和 PTK 抑制剂 Genistein 预孵育后, 检测 AGE 刺激后 $O^{2-} \cdot$ 及 GSH 的水平, 发现 $O^{2-} \cdot$ 分别被抑制 32.3% 和 46.5%, 而 GSH 接近正常, 提示 PKC 和 PTK 均可参与 NADPH 氧化酶激活后介导的氧化增强, 可能以 PTK 的作用较为明显。

我们的研究结果表明, AGE 作用于 ECV304, 可通过 PKC 和 PTK 两种途径激活 NADPH 氧化酶, 引

起细胞内活性氧增加及还原型谷胱甘肽的降低, 导致细胞内氧化增强, 进而可导致核因子 κB 激活, 调控多种基因的表达, 参与细胞损伤反应。应用 NADPH 氧化酶抑制剂及抗氧化剂可有效地阻断 AGE 引起的病理生理反应, 从而减轻 AGE 蓄积后引起的细胞损伤反应, 以期减轻或控制发生发展^[10]。

[参考文献]

- [1] 张桂林, 刘尚喜, 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.
 - [2] Basta G, Lazzarini G, Massaro M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses [J]. *Circulation*, 2002, **105** (7): 816-822.
 - [3] Schmidt AM, Hori O, Brett J, et al. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (10): 1521-528.
 - [4] Wong RK, Pettit AI, Davies JE, et al. Augmentation of the neutrophil respiratory burst through the action of advanced glycation end products: a potential contributor to vascular oxidant stress [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (9): 2846-853.
 - [5] Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, 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): 2262-271.
 - [6] 胡榕, 吴可贵. 核因子 κB 在心血管疾病中的作用的研究现状 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **12** (5): 604-606.
 - [7] Hagen TM, Vinarsky V, Wehr CM, et al. (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both in vitro and in vivo [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2000, **2** (3): 473-483.
 - [8] Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59** (9): 1428-459.
 - [9] Biberstine-Kinkade KJ, Yu L, et al. Mutagenesis of p22(phox) histidine 94. A histidine in this position is not required for flavocytochrome b558 function [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (33): 30368-374.
 - [10] Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S. Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **902**: 241-248.
- (此文编辑 胡必利)