

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0889-04

• 实验研究 •

雌激素减弱晚期糖基化终末产物对内皮型一氧化氮合酶的抑制作用

韩艺¹, 谢利平², 刘振², 季勇², 刘乃丰¹

(1 东南大学临床医学院心内科, 江苏省南京市 210009, 2 南京医科大学动脉粥样硬化中心, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 雌激素; 晚期糖基化终末产物; 内皮型一氧化氮合酶

[摘要] 目的 研究晚期糖基化终末产物对内皮型一氧化氮合酶的作用, 以及雌激素对该作用的影响和具体机制。方法 培养人脐静脉内皮细胞, 用不同浓度的晚期糖基化终末产物和雌激素进行干预, 用 Western blotting 方法检测细胞中内皮型一氧化氮合酶与 Akt 蛋白质水平的变化。结果 晚期糖基化终末产物以不同浓度 (50、100 和 200 mg/L) 单独作用于内皮细胞 4 h 后, 内皮型一氧化氮合酶与 Akt 蛋白质水平明显降低。雌激素以不同浓度 (10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L) 单独作用于内皮细胞 24 h 后, 内皮型一氧化氮合酶与 Akt 蛋白质水平均明显增加, 而雌激素在 10^{-8} mol/L 的条件下, 晚期糖基化终末产物 100 mg/L 对内皮型一氧化氮合酶抑制作用明显减弱, 且 Akt 蛋白质水平受到抑制的程度也明显减弱。结论 晚期糖基化终末产物对内皮型一氧化氮合酶有显著的抑制作用, 雌激素能有效减弱晚期糖基化终末产物的这种作用, 这种对内皮型一氧化氮合酶的保护作用可能是通过调节其上游信号分子 Akt 的蛋白水平而实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Estrogen Attenuates the Inhibition of Nitric Oxide Synthase Type 3 Induced by Advanced Glycation End-Products

HAN Yi¹, XIE Liping², LIU Zhen², JI Yong², and LIU Naifeng¹

(1 Department of Cardiology, School of Clinical Medicine, Southeast University, Jiangsu 210009 Nanjing, China; 2 Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Jiangsu 210009 Nanjing, China)

[KEY WORDS] Estrogen; Advanced Glycation End-Products; Endothelial Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of advanced glycation end-products (AGE) on endothelial nitric oxide synthase type 3 (NOS-3) and whether estrogen may influence such effects then to discover the underlying mechanisms

Methods Cultured human umbilical endothelial cells were administered with different concentrations of AGE and/or estrogen then western blotting was applied to detect the variation of NOS-3 and Akt protein expression. **Results** After the administration of AGE (50, 100 and 200 mg/L) for 4 h, endothelial cells exhibited lower protein expression of NOS-3 and Akt after administration of estrogen (10^{-9} , 10^{-8} and 10^{-7} mol/L), endothelial cells presented higher protein expression of NOS-3 and Akt. Furthermore, with the pretreatment of estrogen (10^{-8} mol/L), the inhibition on NOS-3 protein expression by AGE (100 mg/L) was remarkably ameliorated. As for protein kinase Akt, it demonstrated similar changes.

Conclusions AGE could notably suppress the protein expression of NOS-3 in endothelial cells, while estrogen could effectively ameliorate this suppression. The protective effects of estrogen might relate to its positive regulation on the upstream signaling protein kinase Akt.

动脉粥样硬化病变部位的炎症反应与晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end-products

AGE) 的累积有密切关系。AGE 是蛋白质、脂质或核酸等大分子自发地与葡萄糖或其他还原性单糖发生非酶糖基化反应 (也叫做 Maillard 反应) 后生成的稳定的共价加合物^[1]。糖基化反应在正常机体即可缓慢进行, 与动脉粥样硬化、糖尿病并发症的发生发展以及机体老化都有着密不可分的联系。研究表明, 它通过干预血管内皮细胞内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS, NOS-3) 的生物活性从而影响一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的合成与释放^[1], 在糖尿病血管病变以及动脉粥样硬化过程中起到十分重要的作用。大量研究资料显示,

[收稿日期] 2009-09-16 [修回日期] 2009-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金 (30770891)

[作者简介] 韩艺, 博士研究生, 研究方向为糖尿病心血管并发症的发病机制, E-mail 为 hanyi0205@hotmail.com。谢利平, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的机制, E-mail 为 xieliping5104015@hotmail.com。刘振, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的机制, E-mail 为 cxxz007@163.com。季勇, 教授, 博士生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的机制研究, E-mail 为 yongji@njnu.edu.cn。通讯作者刘乃丰, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子细胞心脏病学和心血管影像学, 联系电话为 025-83272001, E-mail 为 liunf@seu.edu.cn。

雌激素可直接或间接作用于心血管系统,具有改善血脂或脂蛋白代谢,增加内源性一氧化氮,抑制血小板粘附、聚集、减小血管张力、改善血流动力学、抗氧化、保护内皮、抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移和细胞外基质合成,调节纤溶系统等作用,这些效应与雌激素能够通过 PI3K/Akt途径调控血管内皮 NOS-3/NO有着密切关系^[2,3]。但是 AGE通过何种途径如何参与 NOS-3调节,以及雌激素对 AGE的调节作用有何影响并确切机制目前仍不十分清楚。因此本研究致力于探索 AGE对 NOS-3的作用,以及雌激素对该作用的影响和具体机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926购自 ATCC公司;活性炭处理胎牛血清购自 Biological Industries公司;无酚红 RPMI-1640购自 Hyclone公司;AGE和 17 β -estradiol(E2)购自 Sigma公司;BCA蛋白定量试剂盒和 ECL显影剂购自 Thermo公司;NOS-3一抗购自 Santa Cruz公司;Akt一抗购自 Cell Signaling公司;Western blotting蛋白质印迹成像和定量分析系统购自 Alpha Innotech公司。

1.2 细胞培养

采用 EA.hy926人脐静脉内皮细胞系,在含有 10%活性炭处理胎牛血清的无酚红 RPMI-1640培养基中培养,以消除可能的激素成分以及酚红的激素样活性成分的影响。

1.3 实验方案

细胞汇合达 80%时,以不同浓度的 AGE(50、100和 200 mg/L)分别作用 4 h 不同浓度的雌激素 E2(10^{-9} 、 10^{-8} 和 10^{-7} mol/L)分别作用 24 h 分别研究不同浓度的 AGE与 E2对 NOS-3和 Akt蛋白质水平的影响。然后选取用合适浓度的 E2(10^{-8} mol/L)作用 24 h 以及合适浓度 AGE(100 mg/L)进一步作用 4 h 研究 E2是否能够影响 AGE对 NOS-3和 Akt的作用。

1.4 Western blotting检测

细胞处理完毕后,用冷 TBS洗 3次,用裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 40 mmol/L NaF, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 钒酸钠, 1% Triton- \times 100, 0.1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 1 mg/L aprotinin, 0.5 mg/L Leupeptin)于冰上裂解 15 min,刮取细胞,进一步于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12 kr/m 离心 15 min,取上清,用 BCA蛋白

定量试剂盒进行蛋白定量,以适当比例与上样缓冲液混合均匀,于 95 $^{\circ}$ C加热 5 min,取 60 μ g蛋白上样,7.5% SDS-PAGE电泳,半干转移至 PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭,与适当比例稀释的 NOS-3一抗(1:1000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,用 TBS-TWEEN 20洗,5 min \times 3次,再与相应的二抗于室温孵育 2 h 用 TBS-TWEEN 20洗,15 min \times 3次,加 ECL显影剂,于 Western blotting蛋白质印迹成像和定量分析系统中成像,获得相应条带。然后 TBS-TWEEN 20洗,10 min \times 2次,与适当比例稀释的 Akt一抗(1:1000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,重复上述过程。用 IMAGE J软件进行条带灰度分析。

1.5 统计分析

应用 Prism 软件进行统计分析,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt蛋白质水平的影响

与对照组相比,不同 AGE浓度作用于内皮细胞后,能明显降低细胞中 NOS-3蛋白质水平,且随着浓度增加,作用更加明显;本研究中这种抑制作用在 ≥ 100 mg/L时与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$);AGE ≥ 50 mg/L浓度时均能显著抑制 Akt的表达,且随着浓度增加,该抑制作用有更加显著的趋势(图 1和表 1)。

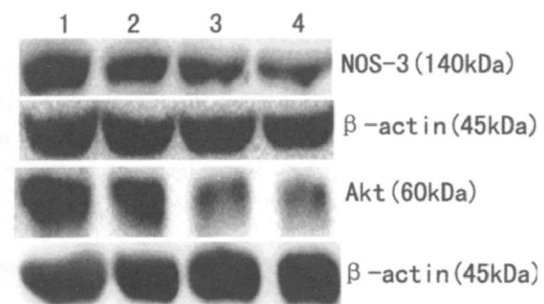


图 1 晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的影响 1 为对照组, 2~4 分别为 AGE 浓度 50、100 和 200 mg/L 组。

2.2 雌激素对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt蛋白质水平的影响

与对照组相比, E2作用于内皮细胞 24 h 后能明显增加细胞中 NOS-3的蛋白质水平,且该作用在接近生理浓度的 10^{-8} mol/L 时比较显著,进一步增

加雌激素水平并不能明显促进该作用; E2在相同浓度作用于内皮细胞 24 h后也能够显著增加 Akt的表达, 且该作用在浓度更高时无显著增加趋势, 说明雌激素对 NOS-3 蛋白质表达的影响可能是通过调节上游的 Akt 蛋白质水平实现的 (图 2 和表 2)。

表 1 晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的影响

分 组	NOS-3	Akt
对照组	1.22 ± 0.23	2.58 ± 0.78
AGE 浓度		
50 mg/L 组	1.00 ± 0.38	1.41 ± 0.48 ^a
100 mg/L 组	0.78 ± 0.25 ^a	0.84 ± 0.25 ^a
200 mg/L 组	0.73 ± 0.22 ^a	0.69 ± 0.24 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

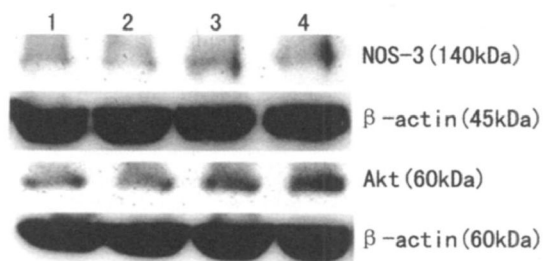


图 2 雌激素对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的作用 1 为对照组, 2~4 分别为 E2 浓度 10^{-9} 、 10^{-8} mol/L 和 10^{-7} mol/L。

表 2 雌激素对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的影响

分 组	NOS-3	Akt
对照组	0.45 ± 0.13	1.21 ± 0.21
E2 浓度		
10^{-9} mol/L 组	0.44 ± 0.38	1.08 ± 0.38
10^{-8} mol/L 组	1.08 ± 0.25 ^a	1.51 ± 0.25 ^a
10^{-7} mol/L 组	0.89 ± 0.22 ^a	1.54 ± 0.22 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 雌激素减弱晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的抑制作用

与对照组相比, E2 在 10^{-8} mol/L 浓度时作用 24 h 能明显增加内皮细胞中 NOS-3 和 Akt 蛋白质水平, AGE 在 100 mg/L 浓度时作用 4 h 能明显降低内皮细胞中 NOS-3 和 Akt 蛋白质水平, 进一步的研究表明, 10^{-8} mol/L 的 E2 作用于内皮细胞 24 h 再加入 100 mg/L 的 AGE 干预 4h 后, E2 在 10^{-8} mol/L 浓

度能有效改善 AGE 在 100 mg/L 浓度时对内皮细胞中 NOS-3 和 Akt 蛋白质水平的抑制作用, 尽管该作用并不能使 NOS-3 恢复到对照组的蛋白质水平 (图 3 和表 3)。

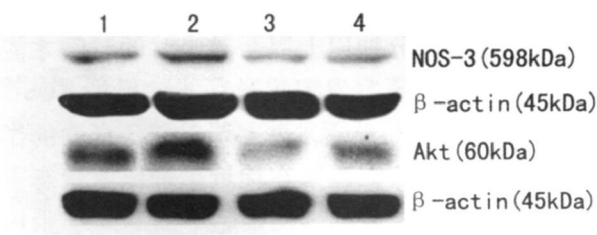


图 3 雌激素减弱晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平的抑制作用 1 为对照组, 2 为 10^{-8} mol/L E2 组, 3 为 100 mg/L AGE 组, 4 为 10^{-8} mol/L E2 + 100 mg/L AGE 组。

表 3 雌激素减弱晚期糖基化终末产物对内皮细胞一氧化氮合酶和 Akt 蛋白质水平抑制作用

分 组	NOS-3	Akt
对照组	0.84 ± 0.23	0.99 ± 0.13
E2 (10^{-8} mol/L) 组	1.13 ± 0.26 ^a	1.23 ± 0.14 ^a
AGE (100 mg/L) 组	0.37 ± 0.25 ^a	0.74 ± 0.15 ^a
E2 (10^{-8} mol/L) + AGE (100 mg/L) 组	0.52 ± 0.14 ^b	1.02 ± 0.14 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与对 AGE 组比较。

3 讨论

近年来的研究发现动脉粥样硬化和糖尿病血管并发症发展过程中的重要因素之一是晚期糖基化终末产物的持续累积^[4,5], AGE 是一组由蛋白质或其它大分子通过与还原性糖类进行非酶糖基化反应生成的棕褐色具有荧光特性的在细胞内和细胞间交联的物质, AGE 可能对血管内皮型一氧化氮合酶的活性和 NO 的生物合成产生重要影响, 糖尿病状态下血管源性 NO 活性下降, 引起内皮依赖性血管舒张功能障碍^[6,7]。本研究也发现, AGE 作用 4 h 就能明显抑制 NOS-3 在内皮细胞中的蛋白质水平, 且该作用在 100 mg/L 时就已十分显著, 表明晚期糖基化终末产物可能通过抑制 NOS-3 在内皮细胞中的蛋白质水平从而减少 NO 的生物合成, 从而使血管内皮的正常功能受到损伤。

在延缓动脉粥样硬化进程方面, 大量的研究发现雌激素能够起到保护血管内皮细胞功能的作用^[8,9], 因此曾一度用于绝经后女性预防心血管疾病的替代治疗^[10]。雌激素能通过增加 NOS-3 的磷酸化水平以及 NOS-3 活性, 从而使内皮细胞合成释

放 NO 增加, 这种迅速的调控机制通常在数秒或数分钟内即可实现^[11]; 雌激素也能通过基因调控机制上调 NOS-3 的 mRNA 表达和蛋白质水平, 从而引起 NO 合成释放增加, 该机制称为慢性的或迟后的调控机制, 该机制需要雌激素通过结合于 NOS-3 启动子上的雌激素反应元件^[12]以及 Sp1 结合组件^[13]来完成, 通常需要数分钟以上以至数小时的时间才能实现。另外, 也有研究发现雌激素能够保护 NOS-3 mRNA 的稳定性^[14], 从而发挥上调 NOS-3 活性的作用。本研究也发现, 雌激素在接近生理浓度状态下作用 24 h 能有效的上调内皮细胞中的 NOS-3 蛋白质水平, 该作用在大于 10^{-8} mol/L 时比较显著, 且该剂量比较接近生理水平。因此本研究以及其它研究组^[15]在实验中均选择了该浓度作为研究对象, 研究其对晚期糖基化终末产物抑制内皮细胞中 NOS-3 蛋白质水平可能有的影响和作用机制。

蛋白激酶 PKB 也称为 Akt 近年来的研究表明, 它是 PI3K/Akt/NOS-3 信号通路是 NOS-3 重要的调节机制之一, 且雌激素与雌激素受体 (ER) 结合, 通过基因与非基因的调控机制使 PI3K 激活, 上调下行的信号分子 Akt 的磷酸化水平和蛋白质水平, 之后引起 NOS-3 的磷酸化水平和蛋白质水平上调, 从而增加 NOS-3 的生物活性, 促进 NO 基础水平的合成与释放^[2, 16]。本研究发现雌激素在 10^{-8} mol/L 浓度时能有效减弱晚期糖基化终末产物对内皮细胞中 NOS-3 蛋白质水平的抑制作用, 但并不能使 NOS-3 的蛋白质水平恢复到与对照组相同的状态。为了研究雌激素减弱晚期糖基化终末产物对内皮细胞 NOS-3 蛋白质水平抑制作用的机制, 本实验分别研究了 NOS-3 上游的信号分子 Akt 在内皮细胞中的受到雌激素和晚期糖基化终末产物作用后发生的改变, 研究发现 E2 作用于内皮细胞 24 h 后 Akt 的蛋白质水平明显增加, 晚期糖基化终末产物在 50、100 和 200 mg/L 浓度均能明显抑制 Akt 的蛋白质水平, 且 E2 在 10^{-8} mol/L 时能有效减弱 AGE 对 Akt 蛋白质水平的抑制作用, 提示雌激素减弱晚期糖基化终末产物对 NOS-3 抑制作用的机制与上调 Akt 的蛋白质水平有关。这一发现在雌激素可能用于阻断晚期糖基化终末产物对糖尿病血管病变进程, 以及对动脉粥样硬化发生发展可能产生保护性干预作用的探索具有重要意义。

本研究结果表明, 晚期糖基化终末产物对内皮细胞中 NOS-3 的蛋白质水平有显著的抑制作用, 雌

激素能有效减弱 AGE 的抑制作用, 这种对 NOS-3 的保护机制可能是通过上调其上游信号分子 Akt 的蛋白质水平而实现的。另外, 雌激素的这种保护作用机制是否是首先作用于上游的 PI3K, 以及雌激素是否还通过其它途径发挥保护 NOS-3 的作用, 如抑制 MAPK 信号通路等, 仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Xu B, Chhber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products [J]. *FASEB J*, 2003, **17** (10): 1289-291.
- [2] Haynes MP, Li L, Sinha D, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (4): 2118-123.
- [3] Hisanoto K, Ohmichi M, Kurachi H, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (5): 3459-467.
- [4] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, **414** (6865): 813-820.
- [5] Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, **77**: S26-30.
- [6] Jun Tanaka, Li Qiang, Alexander SB, et al. Foxo1 links hyperglycemia to LDL oxidation and endothelial nitric oxide synthase dysfunction in vascular endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2009, **58** (10): 2344-354.
- [7] Thomas Thum, Daniela Fraccarollo, Maximilian Schultheiss, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes [J]. *Diabetes*, 2007, **56** (3): 666-674.
- [8] Kathleen MG, Douglas RS, Annemarie ES, et al. Vascular endothelial estrogen receptor is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, **94**: 3513-520.
- [9] Danesh Javeshghani, Ernesto LS, Sairam MR, et al. Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenism [J]. *J Am Soc Hypert*, 2009, **3** (5): 295-305.
- [10] 刘应才, 李其勇, 李明星, 等. 雌激素替代治疗对绝经后妇女血管内皮舒张功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 65-67.
- [11] Simoncini T, Hafezi Moghadam A, Brazil DP, et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-OH kinase [J]. *Nature*, 2000, **407** (6803): 538-541.
- [12] MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium [J]. *Circ Res*, 1997, **81** (3): 355-362.
- [13] Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, et al. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved [J]. *Hypertension*, 1998, **31** (2): 582-588.
- [14] Sun D, Hayashi T, Jayachandran M, et al. Estrogen prevents destabilization of endothelial nitric oxide synthase mRNA induced by tumor necrosis factor alpha through estrogen receptor-mediated system [J]. *Life Sci*, 2001, **69** (14): 1651-660.
- [15] 温宇, 王宏伟, 胡秀芬, 等. 17 β 雌二醇对脂肪细胞促酰化蛋白受体和下游信号蛋白表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (4): 9-13.
- [16] Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, et al. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, **67** (1): 105-113.

(此文编辑 李小玲)