

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0761-04

• 实验研究 •

晚期氧化蛋白产物通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶通路促进 ECV304 细胞基质细胞衍生因子 1 α 的表达

史春虹¹, 姜一农², 单路娟³, 魏明丽⁴, 路岩²

(大连医科大学附属第一医院 1. 内分泌科, 2 心内科, 3 中心实验室, 4 干部病房, 辽宁省大连市 116011)

[关键词] 晚期氧化蛋白产物; 基质细胞衍生因子 1 α ; ECV304 p38 丝裂原活化蛋白激酶

[摘要] 目的 观察晚期氧化蛋白产物对 ECV304 细胞基质细胞衍生因子 1 α 表达的影响, 并探讨其作用机制。方法 牛血清白蛋白与次氯酸钠等量混合体外制备晚期氧化蛋白产物, RT-PCR 法检测 ECV304 细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 的表达, Western Blotting 法测定基质细胞衍生因子 1 α 以及磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38MAPK) 蛋白水平, 以 p38MAPK 特异性阻断剂 SB203580 进行阻断实验, 酶联免疫吸附法测定上清液中基质细胞衍生因子 1 α 浓度。结果 与对照组比较, 200 μ mol/L 晚期氧化蛋白产物处理 ECV304 细胞 2 h 后基质细胞衍生因子 1 α mRNA 及蛋白表达量显著升高 (P 均 < 0.05); 基质细胞衍生因子 1 α mRNA 表达量 6 h 达高峰 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 24 h 时与对照组比较差异无显著性; 随着时间的推移基质细胞衍生因子 1 α 蛋白表达量逐渐升高, 24 h 表达量最高 ($P < 0.01$)。晚期氧化蛋白产物作用 15 min 后 p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化水平明显增强 ($P < 0.05$), 不同浓度 (0.1 μ mol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L) SB203580 降低了晚期氧化蛋白产物刺激下基质细胞衍生因子 1 α 蛋白的表达 (分别为 618.85 \pm 60.12, 500.98 \pm 69.47 和 359.97 \pm 59.81, $P < 0.05$ 或 0.01)。结论 晚期氧化蛋白产物可诱导 ECV304 细胞基质细胞衍生因子 1 α 表达, p38MAPK 通路是介导这一作用的重要途径之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Advanced Oxidation Protein Products Promote Expression of Stromal-Cell Derived Factor-1 α in ECV304 Cells Through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Pathway

SHI Chun-Hong¹, JIANG Yi-Nong², SHAN Lu-Juan³, WEI Ming-Li⁴, and LU Yan²

(1 Department of Endocrinology, 2 Department of Cardiology, 3 Central Laboratory, 4 Cadre Ward, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

[KEY WORDS] Advanced Oxidation Protein Products; Stromal Cell-Derived Factor-1 α ; ECV304 Cells; p38MAPK

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of advanced oxidation protein products (AOPP) on expressions of stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) in ECV304 cells and the signal pathway that mediated the effects. **Methods** AOPP-BSA was made from bovine serum albumin (BSA) and sodium hypochlorite. After different time treated with AOPP-BSA, the expressions of SDF-1 α mRNA in ECV304 cells were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the expressions of SDF-1 α protein and the levels of phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) were analyzed by Western Blotting. In inhibition test SB203580, the special inhibitor of p38MAPK of different concentrations were added into ECV304 culture media for 1 hour, then the cells were treated with AOPP-BSA for 12 hours, at last the protein levels in supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with control group, the expressions of SDF-1 α mRNA and protein in ECV304 cells increased significantly after incubated with 200 μ mol/L AOPP-BSA for 2 hours ($P < 0.05$). The expression of SDF-1 α mRNA peaked after 6 hours ($P < 0.01$) and decreased gradually until there was no differentiation at 24 hours. Expression of SDF-1 α protein increased in a time-dependent manner and peaked at 24 hours ($P < 0.01$). After 15 minutes the levels of phospho-p38MAPK increased significantly ($P < 0.05$). When the p38MAPK pathway was blocked by SB203580 (0.1 μ mol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L), the promoting effects of AOPP-BSA on expressions of SDF-1 α protein in ECV304 cells were significantly inhibited (618.85 \pm 60.12, 500.98 \pm 69.47, 359.97 \pm 59.81, $P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** AOPP induced the expression of SDF-1 α from ECV304 cells, p38MAPK signal pathway is an important pathway that mediated the effects.

[收稿日期] 2010-07-15 [修回日期] 2010-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金 (30271433)

[作者简介] 史春虹, 博士, 主治医师, 主要从事糖尿病大血管并发症以及胰岛素抵抗的研究, E-mail为 rexu@vip.sina.com。通讯作者姜一农, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事高血压病的脏器损伤和动脉粥样硬化的临床及基础研究, E-mail为 jiangyn64510@yahoo.com.cn。路岩, 博士, 副主任医师, 主要从事高血压病的脏器损伤和动脉粥样硬化的临床及基础研究, E-mail为 lyz20902@yahoo.com.cn。

氧化应激是多种疾病的共同发病机制,在糖尿病动脉粥样硬化性大血管并发症的发生发展中具有重要作用^[1]。晚期氧化蛋白产物(AOPP)既是敏感而精确的氧化应激标志物,又具有炎症介质的作用。实验表明^[2-4]AOPP与动脉粥样硬化密切相关,但是AOPP促进动脉粥样硬化的具体机制还不明确。基质细胞衍生因子1 α (SDF-1 α)是一种高效的淋巴细胞、单核细胞趋化因子,在动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞中均有SDF-1 α 高表达^[5,6],可趋化单核细胞进入血管壁^[7],说明SDF-1 α 参与了动脉粥样硬化的形成。本实验以体外制备的AOPP处理血管内皮细胞,观察AOPP对内皮SDF-1 α 表达的作用,并进一步探讨这一作用可能的信号转导通路。

1 材料和方法

1.1 材料

ECV304细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库。RPMI-1640培养基购自Gibco胎牛血清购自杭州四季青生物技术公司。SDF-1 α 抗体购自博士德公司,Takara RNA PCR Kit(AMV) Ver 3.0购自大连宝生物公司,p-p38抗体购自Santa Cruz SB203580购自Sigma SDF-1 α 定量酶联免疫试剂盒购自上海森雄公司。

1.2 细胞培养

ECV304细胞常规培养于37℃、5% CO₂湿润的恒温孵箱中。培养液为含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基。当细胞覆盖率达70%~90%时,以0.25%胰蛋白酶-0.03% EDTA溶液消化,按1:5传代。取第3~5代处于对数生长期的细胞用于实验。实验前细胞均经过12 h无血清培养,实验过程中设复孔,常规以台盼蓝染色法检测细胞死亡率,各组细胞死亡率均 $\leq 5\%$ 。

1.3 晚期氧化蛋白产物的制备及浓度测定

200 g/L BSA与0.2 mol/L NaCl各取等量混合,室温孵育30 min,4℃以0.01 mol/L PBS(pH 7.4)透析24 h,0.22 μ m硝酸纤维素膜过滤消毒,-70℃冻存。以经同样处理但未加NaCl的BSA作对照。AOPP的测定参照文献[8],应用分光光度法,酸性条件340 nm测AOPP-BSA浓度,以氯胺-T为标准品,实际测定的为AOPP对氯胺-T的相对浓度。

1.4 RT-PCR法检测SDF-1 α mRNA的表达

将ECV304细胞接种于6孔板,待长成单层后

移去普通RPMI1640培养液,加入含200 μ mol/L AOPP-BSA的RPMI1640培养液孵育0 h、2 h、6 h、12 h和24 h后收集细胞。加入Trizol试剂提取细胞总RNA。应用Takara RNA PCR Kit(AMV) Ver 3.0试剂盒,以GAPDH为内对照,SDF-1 α 扩增产物全长495 bp上游引物为5'-AAG CCC GTC AGC CTG AGC TAC-3',下游引物为5'-AGT TAT CTA CAT CTT GAA CCT CT-3'; GAPDH扩增产物全长697 bp上游引物为5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游引物为5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'。反应条件为94℃变性30 s,58℃退火45 s,72℃延伸1 min,共28个循环。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,以凝胶成像系统采集电泳结果,并应用附带软件分析目标条带与内参条带吸光度值之比,进行半定量PCR。

1.5 Western Blotting法检测ECV304细胞SDF-1 α 及磷酸化p38蛋白水平

将ECV304细胞接种于6孔板,待长成单层后移去普通RPMI1640培养液,加入含200 μ mol/L AOPP-BSA的RPMI1640培养液孵育0 h、2 h、6 h、12 h和24 h或者0、15、30、60和120 min后收集细胞,去除培养液,冰PBS漂洗细胞3次,加入100 μ L细胞裂解缓冲液,4℃ 12 000 r/min离心10 min,取上清。采用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。蛋白上样量为每孔32 μ g以10%分离胶100 V恒压电泳,4℃ 200 mA电转移1.5 h至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉封闭过夜,以1:1 000封闭液稀释一抗,内参一抗的稀释终浓度为1:800室温下孵育2 h,以1:5 000封闭液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育1.5 h,化学发光法显像,UV凝胶图象处理系统Labworks4.6软件分析目的条带的灰度值。

1.6 酶联免疫吸附试验检测p38MAPK阻断剂SB203580作用后ECV304细胞上清液中SDF-1 α 水平

将ECV304细胞接种于12孔板,待长成单层后移去普通RPMI1640培养液,分别与含0、1和10 μ mol/L SB203580的培养基孵育1 h之后吸出上述培养基,以无血清培养基洗涤细胞1次,再加入含200 μ mol/L AOPP-BSA的RPMI1640培养液孵育24 h收集上清液。按照试剂盒说明书操作,在492 nm处测吸光度值。以统计软件SPSS13.0拟合标准曲线,计算各样本浓度。

1.7 统计学处理

数据统计采用SPSS13.0软件包处理。计量资

料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AOPP对 ECV 304细胞 SDF-1 α mRNA 表达的影响

200 $\mu\text{mol/L}$ AOPP-BSA 处理 ECV 304细胞 2 h 后 SDF-1 α mRNA 表达量与对照组相比即显著升高 ($P < 0.05$), 6 h 达高峰 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 24 h SDF-1 α mRNA 表达量与对照组比较差异无显著性 (图 1 和表 1)。

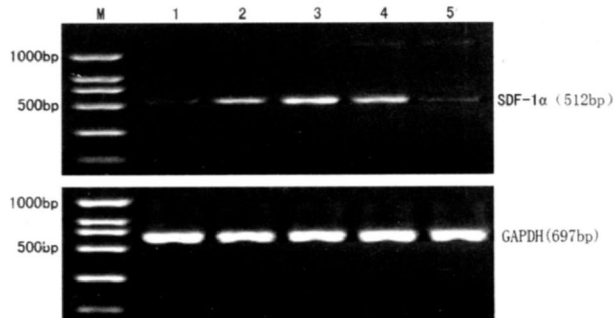


图 1 RT-PCR 检测 AOPP 作用不同时间对 ECV 304 细胞 SDF-1 α mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1~5 依次为 0 h, 2 h, 6 h, 12 h 和 24 h 组。

2.2 AOPP对 ECV 304细胞 SDF-1 α 以及磷酸化 p38 蛋白表达水平的影响

200 $\mu\text{mol/L}$ AOPP-BSA 处理 ECV 304细胞 2 h 后 SDF-1 α 蛋白表达量与对照组比较显著升高 ($P < 0.05$), 随着时间的推移 SDF-1 α 蛋白表达量逐渐升高, 24 h 表达量最高 ($P < 0.01$; 表 1 和图 2)。200 $\mu\text{mol/L}$ AOPP-BSA 刺激 15 min 后磷酸化 p38 蛋白量与对照组相比显著升高 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 60 min 时磷酸化 p38 蛋白量仍处于较高水平 ($P < 0.05$; 图 2 和表 2)。

2.3 p38MAPK 选择性抑制剂 SB203580 对 AOPP 刺激下 ECV 304细胞 SDF-1 α 表达的影响

加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 后降低了 AOPP-BSA 刺激下 SDF-1 α 蛋白的表达量, 但与 AOPP-BSA 组相比差异无统计学意义, 随着 SB203580 浓度的增加, 抑制作用越发明, 1 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 显著抑制 SDF-1 α 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 预孵育后 SDF-1 α 蛋白表达量进一步下降 ($P < 0.01$; 表 3)。

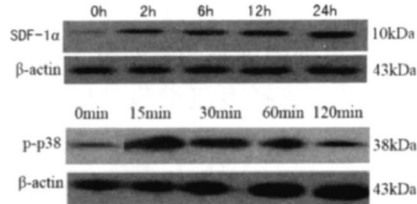


图 2 Western Blotting 检测 AOPP 作用不同时间对 ECV 304 细胞 SDF-1 α 以及磷酸化 p38 蛋白表达的影响

表 1 晚期氧化蛋白产物作用不同时间对 ECV 304 细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

作用时间	SDF-1 α mRNA	SDF-1 α 蛋白
0 h (对照组)	0.073 \pm 0.011	0.149 \pm 0.021
2 h	0.368 \pm 0.032 ^a	0.307 \pm 0.065 ^a
6 h	0.695 \pm 0.071 ^b	0.374 \pm 0.098 ^a
12 h	0.430 \pm 0.026 ^a	0.511 \pm 0.046 ^b
24 h	0.081 \pm 0.029	0.749 \pm 0.103 ^b

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2 AOPP 作用不同时间对 ECV 304 细胞 p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

作用时间	p-p38 蛋白
0 min (对照组)	0.136 \pm 0.046
15 min	1.007 \pm 0.028 ^b
30 min	0.612 \pm 0.085 ^b
60 min	0.320 \pm 0.069 ^a
120 min	0.197 \pm 0.031

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 3 不同浓度 SB203580 对 AOPP 刺激下 ECV 304 细胞 SDF-1 α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	SDF-1 α ($\mu\text{g/L}$)
空白对照组	317.14 \pm 56.82
AOPP-BSA 组	792.43 \pm 67.56
AOPP-BSA + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组	618.85 \pm 60.12
AOPP-BSA + 1 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组	500.98 \pm 69.47 ^a
AOPP-BSA + 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 组	359.97 \pm 59.81 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与 AOPP-BSA 组比较。

3 讨论

晚期氧化蛋白产物是活化的中性粒细胞髓过氧化物酶生成的次氯酸攻击蛋白质氨基酸残基形成的各种氧化蛋白产物的总称, 由 Witko-Sarsat 于 1996 年首次在尿毒症患者血浆中发现, 在体外用次氯酸或者次氯酸盐氧化人血清白蛋白可得到与体内类似的产物^[9]。AOPP 既是氧化应激标志物, 还作为促炎症因子在多种病理生理过程中起重要作用。体内研究发现, AOPP 与 C 反应蛋白、肿瘤坏死因子 α 存

在显著的相关性^[10]。在体外 AOPP 修饰蛋白可以促进人血管内皮细胞细胞间黏附分子 1 mRNA 和蛋白的表达,促进血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的表达。SDF-1 α 属于趋化因子 CXC 亚家族,是一种强趋化因子,其对 T 细胞的趋化活性比 MCP-1 和巨噬细胞炎症蛋白 1 (macrophage inflammatory protein-1, MIP-1) 高 10 倍。研究证实, SDF-1 α 在人类动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞中高表达^[5,6],并可趋化 T 淋巴细胞、单核细胞进入血管壁^[7]。本研究探讨了 AOPP-BSA 对 ECV 304 细胞 SDF-1 α mRNA 和蛋白表达的影响,结果表明 AOPP-BSA 可显著增加 ECV 304 细胞 SDF-1 α mRNA 及蛋白的表达,呈时间依赖性。已知 SDF-1 α 是一种高效的细胞趋化因子,而趋化因子在炎症反应中的免疫细胞迁移和定位过程中扮演重要角色,因此本研究结果再一次证实 AOPP 具有促炎症作用。

多个试验表明 AOPP 在动脉粥样硬化性心血管疾病中起重要作用^[2,4]。本实验结果显示 AOPP-BSA 呈时间依赖性地增强趋化因子 SDF-1 α mRNA 和蛋白在 ECV 304 细胞的表达,在刺激后 2 h ECV 304 细胞 SDF-1 α mRNA 和蛋白的表达与对照组比较即有显著升高,6 h mRNA 表达量达高峰,之后逐渐下降,而 SDF-1 α 蛋白浓度在 24 h 最高,说明 AOPP 与以慢性炎症为特征的动脉粥样硬化的发生机制有密切关系。本研究证实 AOPP 促进 ECV 304 细胞 SDF-1 α 的表达,可能是动脉粥样硬化发病机制中的重要途径之一。

多种致动脉粥样硬化因素均依赖 p38MAPK 通路的激活参与动脉粥样硬化的形成和发展^[11,12],本研究采用具有促进炎症和氧化应激作用的一种蛋白氧化应激产物 AOPP-BSA 作用于 ECV 304 细胞,结果证实 AOPP-BSA 可激活 p38MAPK 通路,刺激 ECV 304 细胞 p38 蛋白磷酸化活性增强, AOPP-BSA 作用 15 min 后 p38 蛋白磷酸化水平达高峰。p38MAPK 转导通路的激活可介导多种病理生理过程,主要参与应激条件下细胞炎症反应。氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 引起的内皮细胞趋化因子表达增强^[13]、血管平滑肌细胞增殖^[14]、单核细胞活化^[15] 均与 p38 途径激活有关。本研究观察到 AOPP-BSA 刺激后 ECV 304 细胞 p38MAPK 磷酸化活性增强,同时 SDF-1 α 表达增加,予 p38MAPK 特异性阻断剂 SB203580 预孵育 ECV 304 细胞后,细胞上清液中 SDF-1 α 水平减少,且具有剂量依赖性,1 μ mol/L SB203580 就可抑制 AOPP-BSA 刺激下

ECV 304 细胞 SDF-1 α 蛋白的表达,说明 AOPP-BSA 通过 p38MAPK 通路促进 ECV 304 细胞 SDF-1 α 的表达。

总之, AOPP 促进 ECV 304 细胞 SDF-1 α 的表达,具有促炎症作用,可能是氧化应激促进动脉粥样硬化发病机制的途径之一。这一作用通过 p38MAPK 通路介导,针对 p38MAPK 的阻断治疗将有可能减缓动脉粥样硬化的发生发展。

[参考文献]

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, **414** (6865): 813-820
- [2] 莫中成, 肖继, 刘协红, 等. 晚期氧化蛋白产物对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17** (7): 527.
- [3] Skvarilova M, Bklava A, Stejskal D, et al. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome [J]. *Bianal*, 2005, **149** (1): 83-87.
- [4] Woods AA, Linton SM, Davies MJ. Detection of HOC mediated protein oxidation products in the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques [J]. *Biochem J*, 2003, **370** (Pt 2): 729-735.
- [5] AbiYounes S, Sauty A, Mach F, et al. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 1999, **86**: 131-138.
- [6] Andreas Schober, Sandra Knarren, Michael Lietz, et al. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 2491-497.
- [7] Ute Zeffer, Andreas Schober, Michael Lietz, et al. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines [J]. *Circ Res*, 2004, **94**: 776-778.
- [8] Santangelo F, Wilko-Sarsat V, Druke T, et al. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, **19** (8): 1951-955.
- [9] Wilko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uraemia [J]. *Kidney Int*, 1996, **49** (5): 1304-313.
- [10] Wilko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients [J]. *Kidney Int*, 2003, **64** (1): 82-91.
- [11] Sung FL, Slow YL, Wang G, et al. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, **216** (1-2): 121-128.
- [12] Yoon YW, Kang TS, Lee BK, et al. Pathobiological role of advanced glycation endproducts via mitogen-activated protein kinase dependent pathway in the diabetic vasculopathy [J]. *Exp Mol Med*, 2008, **40** (4): 398-406.
- [13] 边云飞, 杨慧宇, 杨志明, 等. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞 Fractalkine 表达的影响及机制分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17** (10): 802-806.
- [14] Yang CM, Chien CS, Hsiao LD, et al. Mitogenic effect of oxidized low-density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, **132** (7): 1531-541.
- [15] Lei ZR, Zhang Z, Jing Q, et al. Ox-LDL upregulates CXCR2 expression in monocytes via scavenger receptors and activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **53** (2): 524-532.

(此文编辑 许雪梅)