

[文章编号] 1007-3949(2011)19-06-0489-04

· 实验研究 ·

## 糖基化终末产物对视网膜微血管 内皮细胞核因子 $\kappa$ B活化的影响及辛伐他汀的保护作用

崔丹<sup>1</sup>, 王哲<sup>2</sup>, 李辉<sup>1</sup>

(1 辽宁医学院病理学教研室, 辽宁省锦州市 121001; 2 中国医科大学附属盛京医院输血科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 糖基化终末产物; 微血管内皮细胞; 核因子  $\kappa$ B; 辛伐他汀

[摘要] 目的 探讨糖基化终末产物对大鼠视网膜微血管内皮细胞核因子  $\kappa$ B活化的影响及辛伐他汀的保护作用。方法 体外培养大鼠视网膜微血管内皮细胞, 制备糖基化终末产物—糖基化白蛋白。应用荧光显微镜观察核因子  $\kappa$ B的活化。并观察给予辛伐他汀后视网膜微血管内皮细胞 Matrigel上管腔形成的变化及单核细胞趋化蛋白 1的表达。结果 视网膜微血管内皮细胞无糖基化白蛋白刺激时, 核因子  $\kappa$ B主要表达在细胞浆; 糖基化白蛋白刺激后核因子  $\kappa$ B主要表达在核内, 作用 30 min 时达高峰。糖基化白蛋白作用下管腔形成明显增多, 单核细胞趋化蛋白 1的表达明显增加, 加入辛伐他汀后管腔形成明显减少, 单核细胞趋化蛋白 1的表达明显下降。结论 糖尿病视网膜病变中糖基化终末产物发挥重要作用, 核因子  $\kappa$ B的活化是其关键环节; 辛伐他汀可以减少糖基化白蛋白诱导的管腔形成及单核细胞趋化蛋白 1的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Advanced Glycation End Products Induce the Activation of NF- $\kappa$ B in Retinal Microvascular Endothelial Cells and the Protection of Simvastatin

CUI Dan<sup>1</sup>, WANG Zhe<sup>2</sup>, and LI Hui<sup>1</sup>

(1 Department of Pathology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2 Department of Transfusion, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Microvascular Endothelial Cells; Nuclear Factor- $\kappa$ B; Simvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of advanced glycation end products (AGE) on the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in rat retinal microvascular endothelial cells (RMEC) of diabetic retinopathy and the protection of simvastatin. **Methods** Culturing RMEC in vitro and preparing advanced glycation end products-AGE-BSA. Cells were incubated with AGE-BSA, then NF- $\kappa$ B activation was detected by fluorescence microscope. Tube formation and the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in microvascular endothelial cells in the presence of simvastatin were studied. **Results** NF- $\kappa$ B was mainly in cytoplasm without AGE-BSA. After RMEC stimulated by AGE-BSA, NF- $\kappa$ B translocated into nucleus and reached to the peak in 30 min. AGE-BSA could induce the expression of MCP-1 and tube formation. But obvious inhibitory effects were obtained after treatment with the use of simvastatin. **Conclusions** AGE is crucial in diabetic retinopathy in which the activation NF- $\kappa$ B is important. Simvastatin significantly reduced the AGE-BSA-induced MCP-1 expression and tube formation.

糖尿病视网膜病变是糖尿病严重的微血管并发症, 是糖尿病代谢紊乱和内分泌系统与血液系统损害在视网膜上的反映, 其发生、发展机制复杂, 可能与糖基化终末产物 (AGE) 诱导的视网膜微血管内皮细胞损伤有关<sup>[1]</sup>。糖尿病视网膜病变时 AGE 积聚, 与其受体 (RAGE) 结合, 影响细胞内的信号传导, 导致内皮细胞功能失调和炎症反应的发生<sup>[2]</sup>。

辛伐他汀具有降低血脂、抑制胆固醇合成的作用, 而且也可以改善内皮细胞功能紊乱、提高内皮源性一氧化氮合酶的活性、抗炎、抗氧化、逆转血管重构。本研究旨在探讨糖尿病视网膜病变中 AGE 对大鼠视网膜微血管内皮细胞 (RMEC) 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活化及单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 表达的影响, 并试图探讨辛伐他汀对血管内皮的保护作用。

[收稿日期] 2011-04-17

[作者简介] 崔丹, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为心血管疾病的发病机制, E-mail为 cnlh2006@126.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

SD大鼠,体重 100~150 g 胶原酶<sup>①</sup>(Sigma公司); DMEM 培养基(Gibco公司); 兔 NF- $\kappa$ B p65、 $\kappa$ B 因子相关抗原多克隆抗体(Santa Cruz公司); Matrigel 基质胶(BD公司)。

### 1.2 糖基化白蛋白的制备

参照文献[3]制备糖基化白蛋白(AGE-BSA)。将牛血清白蛋白 20 g/L 与 500 mmol/L 葡萄糖溶于磷酸盐缓冲液中,混匀、室温过夜放置。对照组为 BSA,不含葡萄糖及 EDTA,余条件与 AGE-BSA 制备一致。过滤除菌后,避光孵育 3 个月。孵育结束后,置于透析膜中,广泛透析。最后将 AGE-BSA 及其对照物用培养基平衡,调整葡萄糖浓度至 5.5 mmol/L,滤过除菌,4℃冰箱储备备用。经荧光光谱扫描(激发波长 370 nm,发射波长 440 nm)对 AGE-BSA 进行检测。

### 1.3 细胞培养

SD大鼠过量乙醚处死,完整摘除眼球,70%乙醇浸泡 30 s 沿角膜缘剪开,去除晶状体和角膜,分离出视网膜组织,除去可见的主枝大血管,于 PBS 中简单漂洗、剪碎。将剪碎的视网膜组织首先经过 80 目尼龙筛网滤过,收集网下液;再经过 200 目筛网,收集网上液 2500 r/min 离心 12 min,弃上清,得到视网膜微血管段。加入 5~10 倍体积的 0.1% 胶原酶<sup>①</sup>消化,37℃振荡水浴 30~50 min,吹打 10 min 离心,沉淀物用 DMEM 清洗两次,将视网膜微血管段置于事先用 0.5% 明胶铺过的培养瓶内,加入适量 DMEM 培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱培养。每日倒置相差显微镜下行形态学观察。细胞鉴定采用免疫荧光法检测第 $\kappa$ B 因子相关抗原。第 3~6 代细胞用于实验。

### 1.4 荧光显微镜检测 NF- $\kappa$ B 活化

将培养的细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔板中,待细胞爬片至 60%~70% 时,用无血清培养基同步化 24 h。给予 AGE-BSA (100 mg/L) 作用不同时间 (0 min, 5 min, 20 min, 60 min) 后,细胞用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 5 min  $\times$  3 次,滴加 0.1% Triton-100“打孔”,室温 10 min, PBS 洗, 5% BSA 封闭 10 min, 弃去未洗,滴一抗 (1:300), 4℃孵育过夜, PBS 洗,滴加 FITC 标记羊抗兔二抗 (1:100), 室温 1 h, PBS 洗,中性甘油封片。荧光显微镜观察。

### 1.5 Matrigel 上细胞培养

Matrigel 冻存于 -20℃,使用前置于 4℃过夜,

使其融化成胶状液体备用。将 Matrigel 以每孔 100  $\mu$ L 滴在 24 孔培养板内,轻轻摇晃培养板,使其铺平。把培养板置入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱内,待 Matrigel 聚合,30 min 后即可使用。细胞消化成单细胞悬液后接种于 Matrigel 上,观察管腔形成情况,待形成血管结构后施加实验因素。给予或不给予 AGE-BSA 及药物,即分为对照组、100 mg/L AGE-BSA 组、100 mg/L AGE-BSA + 50 mg/L 辛伐他汀组、100 mg/L AGE-BSA + 100 mg/L 辛伐他汀组。24 h 后观察细胞生长状态。随机选择 5 个视野进行拍照,并测量管腔数进行分析。

### 1.6 RT-PCR 检测 MCP-1 的表达

应用 Trizol 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值,琼脂糖凝胶电泳证实所提 RNA 的完整性。MCP-1 引物序列:上游 5'-ACT CGT CCT CTG AGA TCC AC-3', 下游 5'-CTC CAA GAT GGC ACA AAC A-3', 扩增条件:94℃ 3 min, 94℃ 50 s, 56℃ 50 s, 72℃ 50 s, 35 个循环。RT 和 PCR 反应按照说明书进行操作,5  $\mu$ L PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用凝胶成像分析系统进行半定量分析,紫外灯下观察结果并拍照。

### 1.7 统计学方法

实验结果采用方差分析及 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 视网膜微血管内皮细胞形态变化

倒置相差显微镜下,早期 RMEC 呈短梭形,逐渐长成单层、片状的细胞集落,此后细胞汇合呈“铺路石样”排列生长(图 1)。经第 $\kappa$ B 因子间接免疫荧光法鉴定, RMEC 胞质和胞膜处呈红色荧光(图 2),其阳性率为 94.3%,即表达高密度的 $\kappa$ B 因子相关抗原,证实为内皮细胞。

### 2.2 AGE-BSA 的鉴定

AGE-BSA 呈棕黄色,而对照组 BSA 仍为淡黄色。经荧光分光光度法鉴定 AGE-BSA 在激发波长 370 nm,发射波长 440 nm 下产生荧光,对照组 BSA 未测得荧光。

### 2.3 荧光显微镜检测 NF- $\kappa$ B 活化

无 AGE-BSA 刺激时, NF- $\kappa$ B 主要表达在细胞浆,呈绿色荧光,细胞核无表达; AGE-BSA 刺激后 5 min, NF- $\kappa$ B 即已活化,迅速核转移, 30 min 时达高峰,激光共聚焦显微镜显示 NF- $\kappa$ B 主要在核内表达, 60 min 时细胞核仍然有微弱的荧光,与 30 min

时相比,强度明显减弱(图 3)。

### 2.4 Matrigel上管腔形成的变化

对 RMEC 施加作用因素后, Matrigel上形成典

型管腔。100 mg/L AGE-BSA 组管腔形成数目与对照组相比增加 ( $P < 0.05$ ), 给予辛伐他汀时管腔形成数目明显减少 ( $P < 0.05$  图 4和表 1)。

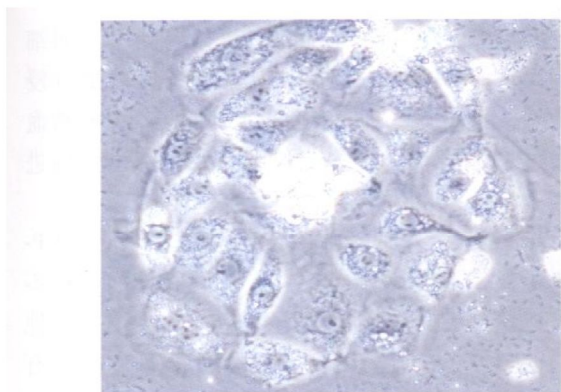


图 1 视网膜微血管内皮细胞的镜下形态 (×200)  
Figure 1 Retinal microvascular endothelial cells in light microscope

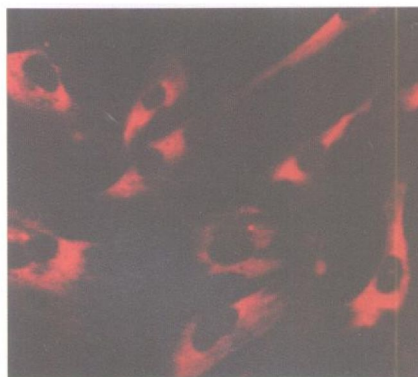


图 2 第(I)因子免疫荧光鉴定 (×200)  
Figure 2 The result of immunofluorescence of factor (I)

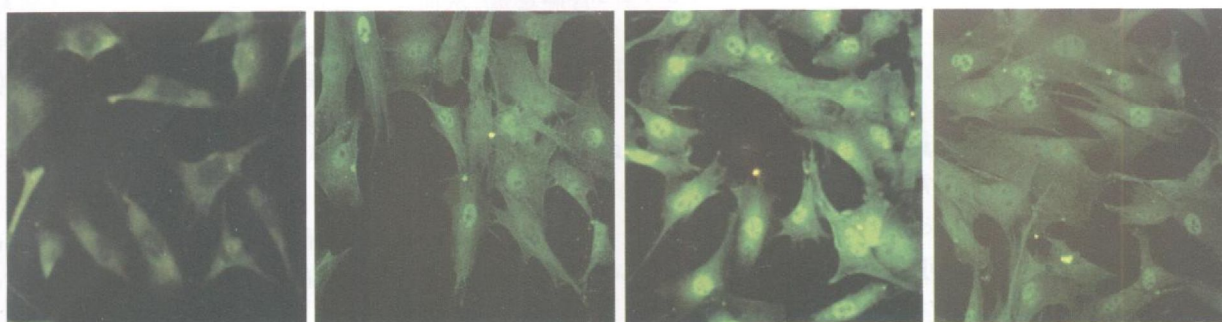


图 3. 荧光显微镜观察 NF-κB 活化 (×200) 从左至右分别为 0 min、5 min、30 min 及 60 min。  
Figure 3. The activation of NF-κB observed by immunofluorescence



图 4. Matrigel 上管腔形成的变化 (×200) 从左至右分别为对照组、100 mg/L AGE-BSA 组、100 mg/L AGE-BSA + 50 mg/L 辛伐他汀组、100 mg/L AGE-BSA + 100 mg/L 辛伐他汀组。  
Figure 4. The variation of tube formation on Matrigel

表 1. Matrigel上管腔形成的变化

Table 1 The variation of tube formation on Matrigel

作用因素	管腔数
对照组	6.67 ± 0.33
100 mg/L AGE-BSA 组	13.56 ± 0.56 <sup>a</sup>
100 mg/L AGE-BSA + 50 mg/L 辛伐他汀组	7.88 ± 0.67 <sup>ab</sup>
100 mg/L AGE-BSA + 100 mg/L 辛伐他汀组	7.06 ± 0.54 <sup>ab</sup>

a为  $P < 0.05$  与对照组比较; b为  $P < 0.05$  与其上组比较。

### 2.5 视网膜微血管内皮细胞 MCP-1 mRNA 的表达

100 mg/L AGE-BSA 作用于 RMEC, MCP-1 mRNA 的表达显著升高, 组间比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。给予 50 mg/L 辛伐他汀时 MCP-1 mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.05$  图 5)。

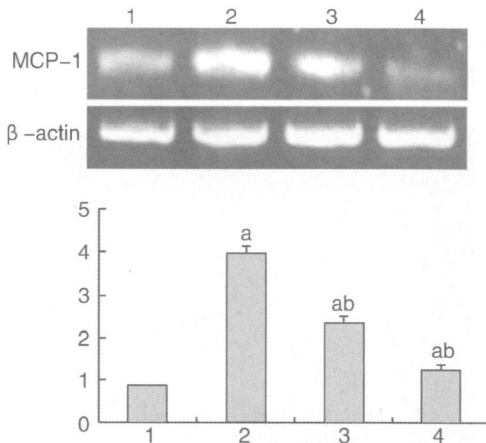


图 5. RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为 100 mg/L AGE-BSA 组, 3 为 100 mg/L AGE-BSA + 50 mg/L 辛伐他汀组, 4 为 100 mg/L AGE-BSA + 100 mg/L 辛伐他汀组。a 为  $P < 0.05$  b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 5. The expression of MCP-1 mRNA by RT-PCR

### 3 讨论

微血管病变是糖尿病的重要并发症之一, 糖尿病视网膜病变作为糖尿病的最常见、最严重的一种慢性并发症, 其发病机制至今尚未完全阐明<sup>[4]</sup>。糖尿病微血管病时 AGE 增高。AGE 可以引起微血管内皮细胞损伤, 包括非受体途径 (直接损伤) 和受体途径。RAGE 是其受体之一, 属于细胞表面分子免疫球蛋白超家族成员, 作为信号传导受体广泛存在于多种细胞表面。因此当它与 AGE 发生特异性结合后, 通过一系列分子机制导致视网膜周细胞缺失, 诱发炎症反应以及新生血管的形成<sup>[5]</sup>。

NF- $\kappa$ B 是参与基因转录的蛋白质分子, 广泛存在于机体各种组织细胞中。NF- $\kappa$ B 是调控转录多种炎症因子的中心环节和共同通路, 它在细胞中的定位与活力受到严格的调控。许多炎症因子、致癌剂、促癌剂和肿瘤微环境都可以激活 NF- $\kappa$ B<sup>[6]</sup>。通常情况下, NF- $\kappa$ B 转录因子通常以非活性形式存在于细胞质中, 特定的刺激可诱导其从细胞浆转移到细胞核内。当细胞受外界刺激的作用后, 抑制型 I $\kappa$ B $\alpha$  发生磷酸化并降解, 使 NF- $\kappa$ B 的亚基进入细胞核, 与相应的基因启动子结合, 启动基因转录和表达。本研究应用荧光显微镜检测 NF- $\kappa$ B 活化, 发现 AGE-BSA 作用于细胞后 NF- $\kappa$ B 开始活化, 20 min 达到高峰, 激活的 NF- $\kappa$ B 从细胞浆内转移至细胞核内 DNA 特定部位, NF- $\kappa$ B 激活是诱导许多细胞因子产生的关键环节。

MCP-1 是 C-C 亚族 ( $\beta$  亚族) 成员, 属于趋化因

子超家族。目前已知, 单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等在 PDGF、脂多糖、IL-1 等因子或某些病毒刺激下均可被诱导分泌 MCP-1。研究表明, 高胆固醇血症时, 动脉内侧平滑肌细胞产生高水平 MCP-1, 单核细胞黏附于血管壁并浸润动脉壁。袁征等<sup>[7]</sup>研究表明, 高同型半胱氨酸血症能通过增强冠状动脉内皮细胞 MCP-1 表达, 促进实验大鼠冠心病的发生和发展。

AGE 可诱导人脐静脉内皮细胞过量表达 MCP-1、VCAM-1 等促炎因子<sup>[8]</sup>。本研究中观察到 AGE-BSA 可以诱导 RMEC 过表达 MCP-1, 当给予辛伐他汀后 MCP-1 表达下降。糖尿病视网膜病变时可有新血管形成。已有研究表明, AGE-BSA 可以促进 RMEC 的管腔形成—血管新生的关键步骤。不同浓度的辛伐他汀可以减少 AGE-BSA 诱导的 RMEC 的管腔形成, 从而减少血管新生, 当辛伐他汀的浓度略升高时抑制作用更明显。他汀作用的具体机制有待进一步研究。辛伐他汀可能成为糖尿病视网膜病变治疗的一个潜在的治疗策略。

#### [参考文献]

- [1] Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation A firm link to endothelial cell dysfunction [J]. Circulation Research 2004, 95: 233-236
- [2] Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation end products are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes [J]. J Diabetes Complications 2003, 17(1): 16-21.
- [3] 孙子林, 刘乃丰, 弓玉祥, 等. 糖基化终产物—牛血清白蛋白的制备和纯化 [J]. 铁道医学, 1999, 27(6): 361-363
- [4] 魏明, 刘培杰, 陈灵, 等. 糖尿病患者血小板膜糖蛋白和 vWF 表达与微血管病变的关系研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(1): 57-60
- [5] 金惠铭, 胡仁明. 糖尿病性微血管病的临床病理生理 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 399-402
- [6] 李志清, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤血清对内皮细胞 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和 NF- $\kappa$ B 活化的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(2): 181-183
- [7] 袁征, 王晓燕, 曾玉梅, 等. 高同型半胱氨酸血症大鼠冠状动脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(3): 177-180
- [8] Basta G, Schmidt AM, Caterina R, et al. Advanced glycation end product and vascular inflammation implications for accelerated atherosclerosis in diabetes [J]. Cardiovasc Res 2004, 63: 582-592

(此文编辑 文玉珊)