

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2013)21-03-0198-05

形态学观察晚期糖基化终末产物诱导微血管内皮细胞核因子 κ B 入核及其机制

吴丽丽, 王立群, 王 达, 黄巧冰

(南方医科大学基础医学院病理生理学教研室 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] 晚期糖基化终末产物; 人皮肤微血管内皮细胞; 核因子 κ B; 氧化应激; 内质网应激

[摘要] **目的** 观察晚期糖基化终末产物(AGE)诱导的微血管内皮细胞核因子 κ B 核转位,探讨氧化应激和内质网应激在核因子 κ B 核转位中可能发挥的作用。**方法** 用 AGE 修饰的牛血清白蛋白(AGE-BSA)与人皮肤微血管内皮细胞(HDMEC)在体外共同培养 1 h,设立对照组进行比较,用免疫荧光化学染色示核因子 κ B 的核转位情况;应用活性氧的抑制剂谷胱甘肽(GSH)、NADPH 氧化酶(NOX)抑制剂 Apocynin、内皮细胞高表达的 NOX 亚型 NOX4 的 siRNA 和内质网应激的标志蛋白内质网转膜蛋白激酶 1 α (IRE1 α)的 siRNA 分别预处理细胞后再给予 AGE-BSA 刺激,观察核因子 κ B 的核转位情况。**结果** 与对照组相比,AGE-BSA 可诱导人皮肤微血管内皮细胞核因子 κ B 入核;应用 GSH、Apocynin、NOX4 siRNA 和 IRE1 α siRNA 预处理细胞均可抑制核因子 κ B 的入核。**结论** AGE 对核因子 κ B 的移位激活可能通过细胞内的氧化应激和内质网应激途径所介导。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A Morphological Approach to Investigate NF- κ B Nuclear Translocation Induced by Advanced Glycation End Products in Microvascular Endothelial Cells

WU Li-Li, WANG Li-Qun, WANG Da, and HUANG Qiao-Bing

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

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; Human Dermal Microvascular Endothelial Cells; Nuclear Factor- κ B; Oxidative Stress; Endoplasmic Reticulum Stress

[ABSTRACT] **Aim** To demonstrate the activation and nuclear translocation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) induced by advanced glycation end products (AGEs) in human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs), and to elucidate the roles of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in this pathological procedure. **Methods** HDMECs were incubated with AGEs-modified bovine serum albumin (AGE-BSA) at concentration of 100 mg/L for 1 h. As control, BSA of the same concentration was administered to HDMECs. NF- κ B nuclear translocation was observed by immunofluorescent staining. Subsequently, HDMECs were pretreated with reduced glutathione (GSH), apocynin, a pharmacological inhibitor of NADPH oxidase (NOX), NOX4 siRNA or inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) siRNA, and then administrated with AGE-BSA for 1 h. Changes of NF- κ B nuclear translocation was observed. **Results** The results demonstrated the translocation of NF- κ B from the cytoplasm to the nucleus upon the stimulation of AGE-BSA. Inhibition of reactive oxygen species generation with GSH or apocynin greatly attenuated these responses. Transfection of NOX4-small interfering RNA or IRE1 α -small interfering RNA in HDMECs also significantly attenuated the AGE-induced translocation of NF- κ B. **Conclusion** Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress are possibly involved in the mediation of AGE-induced activation of NF- κ B in endothelial cells.

[收稿日期] 2012-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30771028)

[作者简介] 吴丽丽,硕士研究生,研究方向为晚期糖基化终末产物介导微血管内皮细胞内质网应激及机制,E-mail 为 lili-wubaihe@126.com。通讯作者黄巧冰,博士,教授,博士研究生导师,主要从事休克微循环血管通透性变化方面的研究,E-mail 为 bing@fimmu.com。

蛋白质赖氨酸的氨基和还原糖的醛基之间发生非酶性糖基化反应,形成 Schiff 碱,经 Amadori 反应重排后形成相对稳定的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)^[1]。研究表明,AGE 在糖尿病慢性并发症的发生发展中起着十分重要的作用^[2]。体外研究显示,AGE 能够激活血管外膜成纤维细胞核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 而介导其炎症反应^[3]。因此,进一步研究微血管内皮细胞中 AGE 对 NF- κ B 的激活及机制,将有利于阐明 AGE 在糖尿病慢性并发症中的作用,也为 2 型糖尿病的靶向治疗提供重要的理论依据。本研究旨在探讨 AGE 对微血管内皮细胞内 NF- κ B 的激活作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人皮肤微血管内皮细胞株(human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC)、ECM 培养基购于美国 ScienCell 公司;纤维黏连蛋白购自 Millipore 公司;新生胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国罗氏公司;毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、还原型谷胱甘肽(GSH)、NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 抑制剂 Apocynin、FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体、罗丹明-鬼笔环肽、DAPI 购自美国 Sigma 公司;NOX4 siRNA、内质网转膜蛋白激酶 1 α (inositol requiring enzyme 1 α , IRE1 α) siRNA、对照 siRNA、转染试剂、转染培养基和 IRE1 α 抗体购自 Santa Cruz 公司;Petri 培养皿购自美国康宁公司;NF- κ B p65 抗体购自 Cell Signaling 公司; β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体和羊抗兔 IgG 抗体购自中杉金桥公司。

1.2 体外制备 AGE 修饰的牛血清白蛋白

糖孵育法制备 AGE 修饰的牛血清白蛋白(AGE-BSA)。荧光分光光度法鉴定,AGE-BSA 中 AGE 含量为 75.20 U/mg 蛋白质。对照样本 AGE 含量不超过 0.9 U/mg 蛋白质。

1.3 细胞培养

HDMEC 种在含 10% 胎牛血清的 ECM 培养基中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养。用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化,以 1:2 分瓶传代。

1.4 实验分组

将 HDMEC 均匀接种于 9 个 Petri 皿中,随机分组为对照组、BSA 组、TG 组、AGE 组、GSH 组、Apocynin 组、NOX4 siRNA 组、IRE1 α siRNA 组、对照 siRNA 组。

对照组为不加任何刺激物的 ECM 培养下的空白对照,BSA 组为与 AGE 相同浓度和刺激时间的平行阴性对照,TG (100 nmol/L) 组作为内质网应激的阳性对照^[4],与 AGE 组刺激时间相同。GSH 组、Apocynin 组、NOX4 siRNA 组作为氧化应激的抑制剂组,IRE1 α siRNA 组作为内质网应激的抑制剂组。GSH (5 mmol/L)、Apocynin (300 μ mol/L) 分别预处理 HDMEC 30 min 后,添加 100 mg/L AGE-BSA 再孵育 1 h。

1.5 siRNA 转染

Petri 皿接种 HDMEC,添加 2 mL 含 10% 胎牛血清不含抗生素的 ECM 培养基。37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养至细胞密度为 60% ~ 80%。NOX4 siRNA、IRE1 α siRNA、对照 siRNA 分别与转染试剂混匀,室温放置 30 min,将上述混合物加入已用转染培养基漂洗过的 HDMEC 中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度下孵育 5 ~ 7 h,再添加 1 mL 含双倍血清和抗生素的 ECM 培养基,孵育 18 ~ 24 h。弃去原培养液,加入新的 ECM 培养基。24 h 后更换新的培养基,与 100 mg/L AGE-BSA 共孵育 1 h。

1.6 蛋白印迹法

收集细胞,按常规方法裂解细胞,BCA 法蛋白质定量检测试剂盒测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 分离 50 μ g 蛋白,电转移至硝酸纤维素膜。膜用含 5% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h,分别加入 1:1000 稀释的 IRE1 α 抗体和 1:5000 稀释的抗人 β -actin 抗体,4℃ 过夜。TBST 漂洗 3 次后加二抗(辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体)室温作用 1 h, TBST 漂洗 3 次。加发光液 ECL,用 Image Station 2000R 图像工作站取像。

1.7 免疫荧光染色

AGE-BSA 处理 HDMEC 结束后,用 PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次,4% 多聚甲醛室温孵育 10 min,冷 PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次,再用 0.5% Triton-100 于 4℃ 孵育 20 min,冷 PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次。用 5% BSA 封闭 30 min, NF- κ B p65 抗体于 4℃ 过夜, FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体与罗丹明-鬼笔环肽(红色荧光)室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次。DAPI (蓝色荧光)室温避光孵育 15 min, PBS 漂洗 2 min $\times$ 3 次。染色结束后在激光共聚焦显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 AGE-BSA 激活微血管内皮细胞 NF- κ B p65 蛋白的核转位

在微血管内皮细胞中加入 AGE-BSA 作用后,用免疫荧光技术检测血管内皮细胞 NF- κ B p65 蛋白在胞质和胞核中的分布。结果表明,在对照组的细

胞,NF-κB 活性处于较低的水平,细胞核内蛋白染色较弱。在 AGE-BSA 刺激后的微血管内皮细胞中,NF-κB 被激活,NF-κB p65 蛋白从细胞质转移入细

胞核内,细胞核内蛋白含量增加,染色强度较对照组明显增加;AGE-BSA 的刺激同时也导致细胞收缩,出现束状应力纤维(图1)。

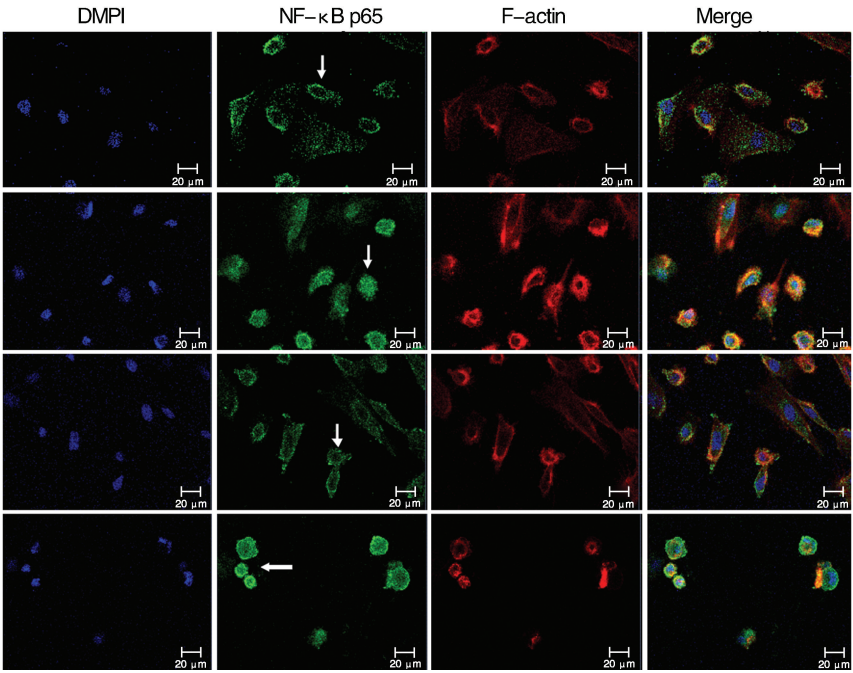


图 1. AGE-BSA 引起 NF-κB p65 在微血管内皮细胞分布的变化 从上至下依次为对照组、AGE 组、BSA 组和 TG 组。DAPI 染细胞核呈蓝色荧光,NF-κB 聚集在细胞内呈绿色荧光,F-actin 染细胞骨架呈红色荧光,Merge 为重叠图。

Figure 1. Nuclear translocation of NF-κB p65 induced by AGE-BSA in HDMECs

2.2 GSH、Apocynin、NOX4 siRNA 抑制 AGE-BSA 对 NF-κB 的激活

使用氧化应激抑制物 GSH、Apocynin 分别预处理细胞以及用 NOX4 siRNA 下调 NOX4 的表达后,免疫荧光观察了对 AGE-BSA 诱导 NF-κB 激活的影响,结果显示,在 AGE-BSA 刺激的微血管内皮细胞中,NF-κB 被激活,大量的 NF-κB p65 蛋白从细胞质转移入细胞核内,NF-κB p65 蛋白在细胞核内含量明显增加;而应用 GSH、Apocynin、NOX4 siRNA 从不同途径分别抑制氧化应激后发现,只有少量 NF-κB p65 蛋白从胞质转移入胞核,蛋白多分布在胞质中,细胞核内分布较少。对照 siRNA 预处理细胞后再给予 AGE-BSA 刺激则显示细胞核内 NF-κB p65 蛋白含量明显增加(图2)。

2.3 IRE1α siRNA 抑制 AGE-BSA 对 NF-κB 的激活

HDMEC 瞬时转染 IRE1α siRNA 后蛋白印迹法结果显示,siRNA 转染可有效抑制 IRE1α 蛋白表达(图3)。IRE1α siRNA 预处理细胞,免疫荧光观察对 AGE-BSA 诱导 NF-κB 激活的影响,结果显示,下调内质网应激标志性蛋白 IRE1α 的表达,可抑制 AGE-BSA 对 NF-κB 的激活,只有少量 NF-κB p65 蛋白从细胞质转移入细胞核,细胞质蛋白含量较多,

而细胞核内含量较少。对照 siRNA 组则显示细胞核内 NF-κB p65 蛋白含量明显增加(图4)。

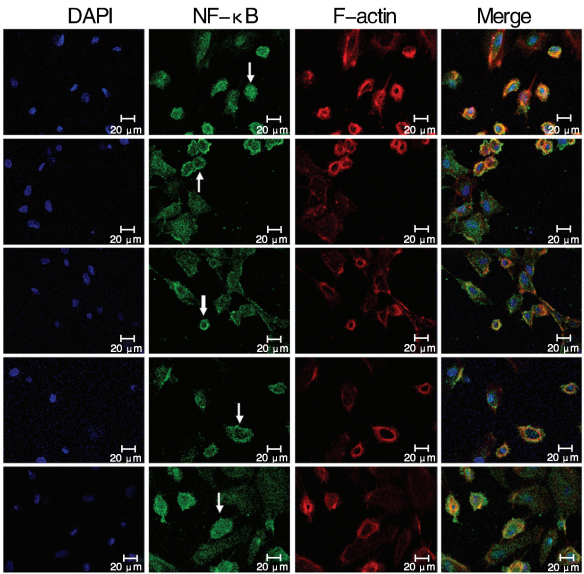


图 2. 氧化应激对 AGE-BSA 引起的 NF-κB p65 在微血管内皮细胞分布变化的影响 从上至下依次为 AGE 组、Apocynin 组、GSH 组、NOX4 siRNA 组和对照 siRNA 组。

Figure 2. Effects of oxidative stress on the AGE-induced NF-κB p65 translocation in HDMECs

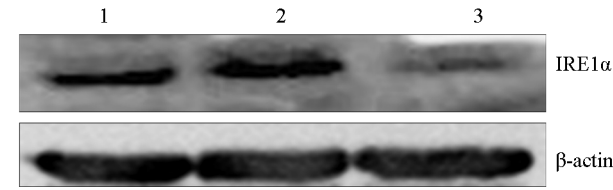


图 3. 蛋白印迹法分析 IRE1 α siRNA 转染后 IRE1 α 蛋白的表达 1 为对照组,2 为对照 siRNA 组,3 为 IRE1 α siRNA 组。

Figure 3. The IRE1 α expression after IRE1 α siRNA transfection by Western blot

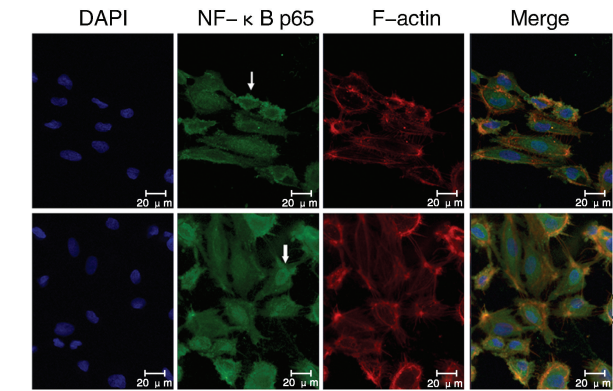


图 4. 抑制内质网应激对 AGE-BSA 引起的 NF- κ B p65 在微血管内皮细胞分布变化的影响 上图为 IRE1 α siRNA 组,下图为对照 siRNA 组。

Figure 4. Effects of inhibition of endoplasmic reticulum stress on the AGE-induced NF- κ B p65 translocation in HD-MECs

3 讨论

微血管是直接参与血液与组织间物质交换的结构,内皮细胞是其血管壁的主要组成部分。糖尿病的特征性并发症即为微血管病变,它是多器官损害的病理生理基础。业已证实,AGE 通过与特异的 AGE 受体结合影响胞内信号转导、刺激细胞因子释放、引起细胞的氧化应激等,在糖尿病血管并发症中发挥致病效应^[5,6]。另外,AGE 参与糖尿病病理过程是由 NF- κ B 的激活机制介导的^[7], Hofmann 等^[8]首次在糖尿病患者中证实了 NF- κ B 的激活。我们的实验也获得相同的结果,BSA 对 NF- κ B 并无作用,而 AGE-BSA 则可促使 NF- κ B 蛋白从胞质转移入核,这从形态学进一步证实了 AGE 激活 NF- κ B 的作用。

机体在遭受各种有害刺激时,氧化系统和抗氧化系统失衡,这种状态即为氧化应激。机体存在两类抗氧化系统,一类是酶抗氧化系统,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等;另一类是非酶抗氧化系

统,包括维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽(GSH)等^[9]。有许多参与细胞正常代谢的酶能产生活性氧自由基,例如细胞色素 P450 一氧化物酶、黄嘌呤氧化酶及磷酸烟酰胺腺嘌呤核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶(NOX)^[10]。NOX 含胞浆成分和胞膜成分,只有当胞浆成分 p47phox 转位到细胞膜上,与胞膜成分结合才能促进活性氧的产生^[11]。而 Apocynin 能抑制 p47phox 膜转位,从而抑制 NOX 的氧化活性,发挥抗氧化作用^[12]。内皮细胞主要表达 NADPH 氧化酶家族中的 NOX4,内皮细胞中的活性氧的重要来源之一是 NOX4^[13]。因此应用 NOX4 siRNA 下调 NOX4 的表达能有效抑制微血管内皮细胞的氧化应激。我们的研究通过使用抗氧化剂 GSH、NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin 和 NOX4 siRNA,从形态学证明,这三种不同途径分别抑制氧化应激后,可有效降低 AGE 所致的 NF- κ B 从细胞质向细胞核的转移。

当内质网稳态被打乱,出现诸如未折叠或错误折叠蛋白质聚集、Ca²⁺耗竭和脂质合成紊乱等时,将引发细胞内一系列反应,即内质网应激。许多疾病的发生发展机制都被发现与内质网应激有关,特别是肥胖和 2 型糖尿病等^[6,14]。内质网处于非应激状态时,其分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein78, GRP78)与内质网应激的三种主要的感应分子即蛋白激酶 R 样内质网激酶、IRE1 α 、转录激活因子 6 结合,使其均处于非激活状态^[15]。内质网应激时,GRP78 与这些感应分子解离以处理堆积的非折叠蛋白^[16]。故这些蛋白的上调已成为内质网应激的标志性变化。本研究从形态学证明通过 IRE1 α siRNA 下调内质网应激的标志性蛋白 IRE1 α 的表达从而抑制内质网应激后,可有效减弱 AGE 所致的 NF- κ B 从胞质向胞核的转移。

氧化应激和内质网应激在 AGE 诱导的 NF- κ B 的激活机制中都起着极为重要的作用,而抑制氧化应激或内质网应激都能从形态学角度观察到 NF- κ B 激活的减轻,这为糖尿病及其并发症的防治提供一条新的策略。

[参考文献]

- [1] Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes [J]. Exp Gerontol, 2011, 46(4): 217-224.
- [2] Yamagishi S. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complica-

- tions [J]. *Ther Apher Dial*, 2009, 13(6): 534-539.
- [3] Liu Y, Liang C. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 34-42.
- [4] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1137-140.
- [5] Bansal S, Siddarth M, Chawla D, et al. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 361(1-2): 289-296.
- [6] Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, et al. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4): 742-752.
- [7] 洪梅, 魏文宁, 宋善俊. 可溶性 AGE 受体对 AGE 诱导牛主动脉内皮细胞 NF- κ B 激活的抑制作用[J]. *微循环学杂志*, 2002, 12(3): 8-10.
- [8] Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B [J]. *Diabetologia*, 1999, 42(2): 222-232.
- [9] Victor VM, Rocha M, Herance R. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(36): 947-958.
- [10] Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2007, 99(4): 223-230.
- [11] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313.
- [12] Li JM, Mullen AM, Yun S, et al. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47phox in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α [J]. *Circ Res*, 2002, 90(2): 143-150.
- [13] Ago T, Kitazono T. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase [J]. *Circulation*, 2004, 109(2): 227-233.
- [14] Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes [J]. *Intern J Obesity*, 2008, 32(Suppl 7): S52-S54.
- [15] 王辉, 叶燕, 禹志领. 冬凌草甲素对 HepG2 细胞内质网应激蛋白 IRE-1、PERK 和 CHOP 的作用研究[J]. *中药新药与临床药理杂志*, 2012, 23(3): 263-266.
- [16] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 455-462.
- (此文编辑 许雪梅)