

晚期糖基化终末产物刺激下内皮细胞活性氧的变化及来源分析

于世勇, 黄 岚, 宋明宝, 赵晓辉, 陈剑飞, 崔 斌

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管内科研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期糖基化终末产物; 内皮细胞; 活性氧

[摘 要] 目的 探讨晚期糖基化终末产物刺激下内皮细胞活性氧的变化及来源。方法 培养人脐静脉内皮细胞, 观察不同浓度和不同作用时间晚期糖基化终末产物刺激下人脐静脉内皮细胞内活性氧的生成情况, 进而分别应用线粒体呼吸链酶复合体、黄嘌呤氧化酶、一氧化氮合酶及 NADPH 氧化酶抑制剂, 观察抑制相应氧化酶后细胞内活性氧的变化, 分析各种氧化酶作用大小。结果 晚期糖基化终末产物刺激后, 内皮细胞内活性氧明显增加, 并且随晚期糖基化终末产物浓度和孵育时间的增加而增加, NADPH 氧化酶抑制剂二亚苯基碘几乎完全抑制了晚期糖基化终末产物刺激下细胞内活性氧的生成, 线粒体呼吸链酶复合体 I 抑制剂鱼藤酮、线粒体呼吸链酶复合体 ①抑制剂噻吩甲酰三氟丙酮、线粒体呼吸链酶复合体 ②抑制剂抗霉素 A、黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇对活性氧生成无明显影响, 而一氧化氮合酶抑制剂 L-硝基精氨酸甲酯反而引起细胞内活性氧的轻度增加。结论 NADPH 氧化酶是晚期糖基化终末产物刺激下内皮细胞活性氧生成的主要来源, 可能是晚期糖基化终末产物启动和加重动脉粥样硬化病理生理过程中的重要防治靶点。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Increased Reactive Oxygen Species in Endothelial Cells Stimulated by Advanced Glycation End Products Mediated by NADPH Oxidase

YU ShiYong HUANG Lan SONG Ming-Bao ZHAO Xiao-Hui CHEN Jian-Fei and CUI Bin

(Institute of Cardiovascular, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products Endothelial Cells Reactive Oxygen Species

[ABSTRACT] **Aim** Advanced glycation end products (AGE) can induce the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) and cause the dysfunction of endothelial cells. This may accelerate development of vascular atherosclerosis. The source of intracellular ROS in endothelial cells stimulated by AGE was investigated. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured and incubated with different concentration of AGE for different time. Intracellular ROS was measured with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA). rotenone, thenoyl trifluoroacetone (TTF) and antimycin A as selective inhibitors of mitochondrial complex I ① and ② were used. allopurinol as an inhibitor of xanthine oxidase, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) as an inhibitor of nitric oxide synthase and diphenylene iodonium (DPI) as an inhibitor of NADPH oxidase were also used. The role of each oxidase in the generation of ROS was observed. **Results** Intracellular ROS was elevated by the stimulation of AGE. DPI almost completely inhibited the generation of ROS. No significant effect was observed in rotenone, TTF, antimycin A or allopurinol while L-NAME increased the level of ROS slightly. **Conclusions** The results demonstrate that NADPH oxidase is the major source of intracellular ROS in endothelial cells and the potential targets for the inhibition of the atherogenic signals triggered by AGE.

体内晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products AGE) 的形成和不断累积与动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 的发生和发展关系密切^[1]。

AGE 促动脉粥样硬化形成与其作用于内皮细胞表面特异的受体 RAGE 从而引起内皮细胞活化和功能失调密切相关, 在此过程中最主要的病理变化在于诱发细胞内活性氧 (reactive oxygen species ROS) 的生成增多^[2]。但 AGE 刺激后细胞内 ROS 增加这一过程中何种氧化酶起主要作用, 目前尚不清楚。本研究以人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells HUVEC) 为研究对象, 分别应用线粒体呼吸链酶复合体、黄嘌呤氧化酶、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase NOS) 及 NADPH 氧化酶的抑

[收稿日期] 2008-03-05 [修回日期] 2008-10-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (30470729); 全军医学科学技术研究“十一五”计划课题 (06J013)

[作者简介] 于世勇, 博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要研究方向为动脉粥样硬化防治, E-mail 为 doctor_yushiyong@126.com。通讯作者黄岚, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病防治、血管损伤与修复, E-mail 为 huanglan260@yahoo.com.cn。宋明宝, 博士, 主治医师, 讲师, 主要研究方向为血管损伤及修复。

制剂,观察 AGE 刺激下内皮细胞活性氧的变化,分析各种氧化酶作用大小,旨在探讨 AGE 引起内皮细胞氧化损伤时 ROS 的细胞内来源。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM 培养基、iv 型胶原酶和优质胎牛血清购自 Gibco 公司,内皮细胞生长添加剂 (endothelial cell growth supplements ECGS) 购自 BD Bioscience 公司,D-葡萄糖、BSA、鱼藤酮、噻吩甲酰三氟丙酮 (thenoyltrifluoroacetone TTFA)、抗霉素 A、别嘌呤、左旋硝基精氨酸甲酯 (N ω -N itro-L-arginine methyl ester L-NAME)、二亚苯基碘 (diphenylene iodonium, DPI) 及 2', 7' -二氯二氢荧光素二乙酯 (2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate DCF-DA) 购自 Sigma 公司。

1.2 晚期糖基化终末产物的制备

参照 Horiuchi 等^[3]方法将 1.6 g 牛血清白蛋白与 3.0 g D-葡萄糖溶于 10 mL 0.5 mmol/L (pH 7.4) PBS 中,0.22 μ m 微孔膜过滤除菌,37℃ 孵育 90 天,实验前用 0.5 mmol/L (pH 7.4) PBS 透析 48 h 去除未结合的葡萄糖。对照组中不含葡萄糖,其余条件一致。紫外荧光分光光度计检测其激发光波长峰值为 370 nm,发射光波长峰值为 440 nm,符合 AGE 特征性荧光光谱。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,以蛋白浓度代表 AGE 浓度。

1.3 人脐静脉内皮细胞的分离与培养

无菌条件下取健康新生儿脐带,长度不少于 20 cm。用温 PBS 液将脐带表面冲洗干净,剪除破损或有夹痕及血肿部分,用温 PBS 液反复将静脉内残血冲洗干净,再用血管钳夹闭脐带另一端,注入 0.1% iv 型胶原酶消化液,使管腔充盈,37℃ 作用 15 min,松开一端血管钳,收集脐静脉内的消化液,然后注入温 PBS 再次冲洗管腔,将消化液和冲洗液一并注入离心管,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 PBS 液,轻轻吹打,使其悬浮后再次离心,以洗去残留的胶原酶溶液,然后向沉淀中加入 DMEM 培养基 (含 20% 优质胎牛血清、50 mg/L ECGS、100 ku/L 青霉素、100 ku/L 链霉素),重悬细胞,接种于 50 mL 培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱中培养,24 h 后换液,以后每 2 天换液一次。待细胞融合 70% ~ 80% 后,按 1:2 比例传代培养。免疫荧光法检测 (1) 因子相关抗原进行内皮细胞鉴定。实验用第 3 代细胞。

1.4 实验分组与处理

将 HUVEC 接种至 24 孔培养板,待细胞生长至融合状态后,无血清培养基培养 24 h 随机分组: AGE 组分别加入 100、200、300、400、500、600、700 及 800 mg/L AGE,在 1、2、4、8、16 及 24 h 检测细胞内 ROS 水平;阻断剂组应用线粒体呼吸链酶复合体 iv 抑制剂鱼藤酮 (2 μ mol/L)、线粒体呼吸链酶复合体 ③ 抑制剂噻吩甲酰三氟丙酮 (10 μ mol/L)、线粒体呼吸链酶复合体 ④ 抑制剂抗霉素 A (2 μ mol/L)、黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤 (100 μ mol/L)、一氧化氮合酶 (NOS) 抑制剂 L-NAME (100 μ mol/L) 和 NADPH 氧化酶抑制剂二亚苯基碘 (10 μ mol/L),以上氧化酶抑制剂在加入 AGE 30 min 之前分别加入,并与 AGE 及 HUVEC 共同孵育;对照组加入与 AGE 组相同浓度的 BSA。所有实验均重复 3 次。

1.5 细胞内活性氧的测定

细胞内 ROS 水平参照 Jakubowski 等^[4]方法进行检测。DCF-DA 进入细胞后,经酯酶作用脱去二酯生成 2', 7' -二氯氢化荧光素 (DCFH),DCFH 被超氧阴离子和过氧化氢等 ROS 氧化,生成发荧光的 2', 7' -二氯荧光素 (DCF),通过 DCF 水平的变化即可反映 ROS 水平的变化。将 HUVEC 与 5 mmol/L DCF-DA 于 37℃ 孵育 30 min, PBS 清洗 3 次,荧光显微镜下照相,分析荧光强度,最终结果以各组荧光强度值与对照组荧光强度值的百分比表示。

1.6 统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖基化终末产物刺激下活性氧的生成

AGE 刺激后,细胞内 ROS 明显增加,并且随 AGE 浓度和孵育时间的增加而增加 (表 1 和 2),以 600 mg/L 孵育 16 h 最明显,在此基础上进一步增加浓度或孵育时间均不再有明显变化。因此,后续实验均采用此剂量和孵育时间。

2.2 细胞内活性氧水平的变化

与单纯应用 AGE 刺激 HUVEC 相比,NADPH 氧化酶抑制剂二亚苯基碘几乎完全抑制了 AGE 刺激下细胞内 ROS 的生成,线粒体呼吸链酶复合体 iv 抑制剂鱼藤酮、线粒体呼吸链酶复合体 ③ 抑制剂 TTFA、线粒体呼吸链酶复合体 ④ 抑制剂抗霉素 A、黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤对 ROS 生成无明显影响,而一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 反而引起细胞

内 ROS轻度增加 (图 1和表 3)。

表 1 不同浓度 AGE对细胞内 ROS生成的影响 ($\bar{x} \pm s$ 作用 16 h)

AGE浓度 (mg/L)	细胞内 ROS
对照组	100%
100	109.14% \pm 2.88% ^a
200	116.19% \pm 2.95% ^b
300	126.40% \pm 4.23% ^b
400	137.97% \pm 2.96% ^b
500	149.21% \pm 3.61% ^b
600	157.46% \pm 3.58% ^b
700	162.49% \pm 1.85% ^b
800	162.49% \pm 1.85% ^b

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与对照组相比。

表 2 AGE对细胞内 ROS生成的时间效应 ($\bar{x} \pm s$ AGE 600 mg/L)

AGE作用时间	细胞内 ROS
对照组	100%
1 h	103.81% \pm 1.43% ^a
2 h	108.31% \pm 1.59% ^b
4 h	127.01% \pm 2.49% ^b
8 h	142.54% \pm 3.32% ^b
16 h	160.40% \pm 3.15% ^b
24 h	163.36% \pm 3.14% ^b

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与对照组相比。

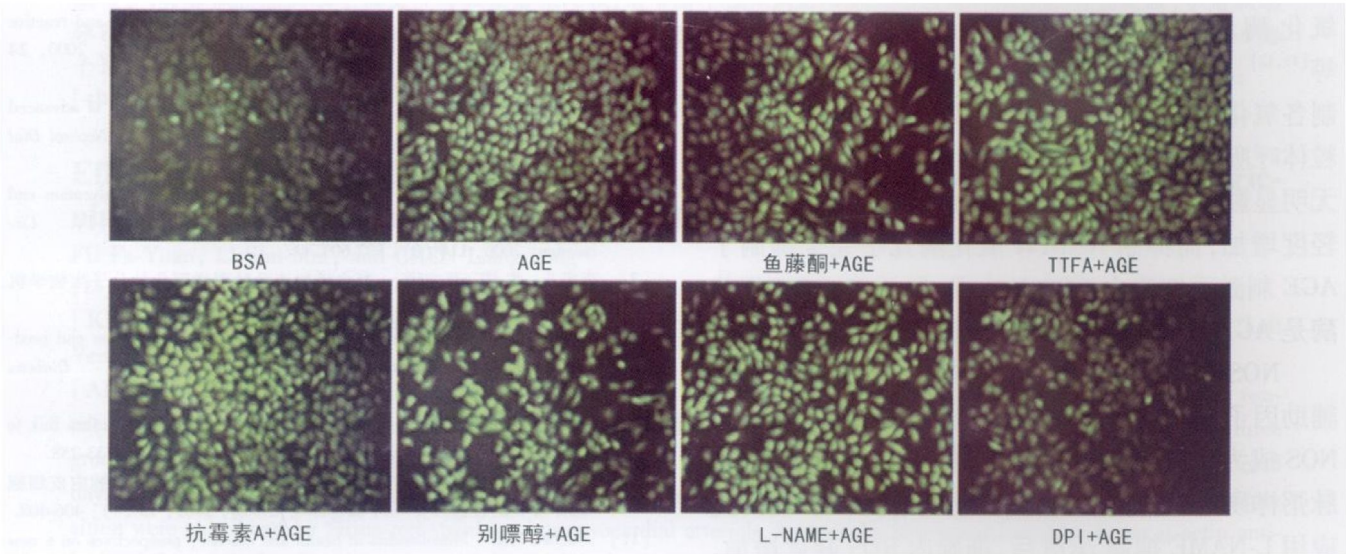


图 1 应用氧化酶抑制剂后内皮细胞 ROS生成情况 (×200)

表 3 应用氧化酶抑制剂后内皮细胞 ROS生成情况 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	细胞内 ROS
对照组	100%
AGE	157.50% \pm 2.47% ^b
AGE+ 鱼藤酮	153.13% \pm 2.54% ^b
AGE+ TTFA	153.42% \pm 0.41% ^b
AGE+ 抗霉素 A	155.16% \pm 1.48% ^b
AGE+ 别嘌呤醇	153.51% \pm 1.80% ^b
AGE+ L-NAME	165.33% \pm 2.52% ^{bc}
AGE+ 二亚苯基碘	106.21% \pm 1.84% ^{ac}

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$ 与对照组相比; c为 $P < 0.01$ 与 AGE 组相比。

3 讨论

AGE是指蛋白质、核酸或脂质等大分子物质的

氨基在不需酶参与条件下,自发地与葡萄糖或其它还原糖的醛基或酮基反应所生成的稳定的共价加成物,该反应过程称为非酶糖基化反应^[5]。糖基化反应在正常机体即可缓慢进行,AGE水平随着年龄的增长而缓慢增加,但在老化过程,特别是在糖尿病持续高血糖情况下,这一反应的速度显著加快,AGE形成量明显增多。体内 AGE慢性蓄积与动脉粥样硬化之间有明显因果关系。AGE是糖尿病血管病变的触发因素^[6-7]。而在非糖尿病患者,AGE同样是启动和加重动脉粥样硬化的重要因素。Kanauchi等^[8]检测了 133名冠心病的非糖尿病患者血中的 AGE浓度时发现,冠心病患者血中 AGE浓度较未患冠心病的对照组明显升高,而且非糖尿病冠心病患者血中 AGE含量与冠心病患者冠状动脉血管病变数目呈正相关,即多支冠状动脉病变患者血中 AGE含量明显高于单支病变和双支病变患者,而这

些患者血压、血糖、胰岛素、总胆固醇、甘油三酯和血肌酐水平与对照组无明显区别。

AGE主要通过诱发细胞内 ROS生成增多引起内皮细胞损伤,从而促进动脉粥样硬化的发生和发展^[9-10]。正常情况下,细胞所具有的抗氧化机制如过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH2PX)可清除 ROS,维持细胞氧化还原自稳态。而在 AGE作用下,这一稳态失调,导致 ROS在细胞内蓄积。本研究证实培养的內皮细胞在基础状态有少量的 ROS生成,AGE刺激后,细胞内 ROS含量明显增加。

在生理和病理情况下,体内有多种酶参与了 ROS的生成,包括线粒体呼吸链酶复合体、黄嘌呤氧化酶、解耦联的 NOS 以及 NADPH 氧化酶等^[11-12]。我们分别应用相应氧化酶抑制剂观察抑制各氧化酶后细胞内 ROS生成情况。结果发现线粒体呼吸链酶复合体和黄嘌呤氧化酶对 ROS生成无明显影响,抑制一氧化氮合酶 NOS后细胞内 ROS轻度增加,而抑制 NADPH 氧化酶几乎完全抑制了 AGE刺激下细胞内 ROS的生成,提示 NADPH 氧化酶是 AGE刺激下内皮细胞 ROS生成的主要来源。

NOS通常生成一氧化氮(NO),但是在其必需辅助因子四氢生物喋呤 H₄B 缺乏的情况下,此时 NOS成为重要的 ROS来源,与糖尿病血管病变、动脉粥样硬化、高血压和高脂血症均有关^[9]。本研究应用 L-NAME抑制 NOS后,细胞内 ROS轻度增加,推测在 L-NAME抑制解耦联的 NOS生成 ROS的同时,也降低了正常 NOS合成 NO的能力,细胞的自我保护机制减弱,增强了 AGE对细胞的损伤作用,导致 ROS增加。

氧化应激在内皮细胞活化和功能失调的发生中具有重要作用,对远期心血管疾病的发病率和死亡率有深远的意义。但是临床上多种抗氧化剂(维生素 C、E 和类胡萝卜素等)预防心血管终点事件的临床试验均以失败告终^[13-14],表明单纯清除自由基这

一治疗途径是有缺陷的,而抑制特异的 ROS生成酶可能更为恰当。研究表明 NADPH 氧化酶对 AGE刺激下内皮细胞 ROS的生成具有高度特异性,显示出其在动脉粥样硬化防治中的重要性,开发新的以 NADPH 氧化酶为靶点的治疗手段,抑制内皮细胞氧化损伤,具有重要的潜在意义。

[参考文献]

- [1] Peppas M, Urbarrí J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis [J]. *Curr Diab Rep*, 2004, 4 (1): 31-36
- [2] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (13): 9 889-897.
- [3] Horiuchi S, Araki N, Morino Y. Immunohistochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (12): 7 329-7332
- [4] Jakubowski W, Bartosz G. 2, 7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure [J]? *Cell Biol Int* 2000, 24 (10): 757-760
- [5] Monnier VM, Nagaraj RH, Portero-Otin M, et al. Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role [J]. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11 (Suppl 5): 20-26
- [6] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury [J]. *Circulation*, 2006, 114 (6): 597-605
- [7] 李震花, 张涛, 葛志明. 高血糖加速动脉粥样硬化的分子生物学机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(7): 633-635
- [8] Kanauchi M, Tsujimoto N, Hashimoto T. Advanced glycation end products in nondiabetic patients with coronary artery disease [J]. *Diabetes Care* 2001, 24 (9): 1 620-623
- [9] Jean-Luc Wautier, Ann Marie Schmidt. Protein glycation: A firm link to endothelial cell dysfunction [J]. *Circ Res* 2004, 95 (3): 233-238
- [10] 刘宏, 侯凡凡, 梁敏. 糖基化终产物促进培养的人脐静脉内皮细胞选择素 E 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (4): 406-408
- [11] Duchon MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25 (4): 365-451
- [12] Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction [J]. *Microcirculation*, 2002, 9 (3): 161-175
- [13] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial [J]. *Lancet* 2002, 360 (9326): 23-33
- [14] Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients: The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342 (3): 154-160

(此文编辑 文玉珊)