

· 基础研究 ·

晚期糖基化终产物刺激下人脐静脉内皮细胞中 F-actin 的形态和分布变化

张策 黄巧冰 赵克森 王士雯

【摘要】 目的 观察晚期糖基化终产物(AGE)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖活力和细胞内纤维状肌动蛋白(F-actin)形态学的影响,探讨 AGE 导致毛细血管通透性升高的病理生理学基础。方法 采用四唑盐(MTT)比色法,分别检测并绘制正常组和 AGE 处理组的 HUVEC 活力曲线;并分别于培养第 1~12 天进行 F-actin 的荧光染色。结果 AGE 组 HUVEC 的活力曲线与正常组相比显著下移。荧光染色发现:正常组 HUVEC 的 F-actin 纤维主要富集于毗邻细胞膜的周边,形成典型的鹅卵石样形态,细胞质中未见密集的 F-actin 纤维;AGE 组细胞内的 F-actin 纤维形态和分布发生明显的改变,出现应力纤维、丝状伪足和板状伪足三种异常形态,至刺激后期,大部分细胞周边的 F-actin 纤维消失,胞质中出现密集的应力纤维。结论 AGE 对内皮细胞的活力有明显的抑制作用。同时,AGE 促使内皮细胞 F-actin 从位于细胞膜周边的状态转为弥散于整个细胞质的状态,内皮细胞收缩,胞间裂隙形成,可能引起毛细血管通透性升高。

【关键词】 糖基化终产物,高级;内皮,血管;肌动蛋白;毛细血管通透性

Morphological and distributional changes of filamentous actin in human umbilical vein endothelial cells under stimulation of advanced glycosylation end products

ZHANG Ce, HUANG Qiaobing, ZHAO Kesen, et al

Department of General Surgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 Objective To investigate the pathophysiological facts underlying the increase in capillary permeability by observing the impact of advanced glycosylation end products (AGE) on proliferation activity of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and on filamentous actin (F-actin) in it morphologically. Methods Cell viability curves of normal and AGE-albumin treated HUVEC were drawn using MTT cell proliferation assay (MTT-CPA). F-actin was examined with fluorescence staining of rhodamine-phalloidin every day from the 1st day to the 12th day of culture. Results The viability curve of the AGE-treated group declined significantly as compared with that of the normal group. Observation by fluorescence microscopy showed that the fibers of F-actin in the cells of the normal group concentrated along the cell membrane and no dense fibers were observed in the cytoplasm. Three forms of abnormal F-actin fibers, i. e. stress fibers, filopodia, and lamellipodia, appeared in AGE-treated HUVEC, while most of the peripheral fibers disappeared and dense stress fibers were observed in the cytoplasm during the late stage. Conclusion AGE inhibited significantly the viability of the endothelium and induced the reorganization of actin in it, i. e. the F-actin transformed from concentrated distribution along the membrane to a diffused one in the cytoplasm, which might mediate the cell shrinkage and the subsequent formation of intercellular gaps, followed by increase in capillary permeability.

【Key words】 glycosylation end products, advanced (AGE); endothelium, vascular; actins; capillary permeability

收稿日期:2003-07-07

基金项目:本课题受国家重点基础研究规划项目(973, G2000057004)和广东省团队计划项目(10717)资助

作者单位:510515 广州市,第一军医大学南方医院普通外科(张策), 510515 广州市,第一军医大学全军休克微循环重点实验室(黄巧冰、赵克森), 100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所(王士雯)

作者简介:张策,男,1974 年 9 月生,湖北省天门市人,医学硕士,主治医师

通讯作者:黄巧冰, Tel: 020-61648465

糖化修饰(glycosylation)是蛋白质的氨基和糖的醛基之间的非酶性反应,最终形成晚期糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGE)^[1]。既往的研究发现 AGE 对毛细血管通透性有明显的影响,比如:AGE 随着年龄的增长逐渐沉积于血管壁,导致血管壁硬度增加,促使内皮细胞减少释放一氧化氮而引起动脉粥样硬化^[2];AGE 在血管壁的长期沉积能够促进血栓形成,改变血管壁的弹性^[3],诱导血管的高通透性^[4],因而与衰老、糖尿病、高血压的相关血管并发症有比较密切的关系。本研究试图通过观察 AGE 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增殖活力和细胞骨架的主要构件纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)的形态学影响,从内皮细胞的功能和形态学变化的角度探讨在部分疾病血管并发症的病理情况下,AGE 诱导血管通透性升高的分子基础,为进一步研究其机制提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HUVEC 株 ECV-304,购自中国科学院上海细胞所。AGE 修饰的白蛋白(AGE-albumin),由第一军医大学南方医院肾内科实验室供应。DMEM 培养基为 Gibco 产品;新生牛血清由杭州四季青生物工程材料有限公司生产;四唑盐(溴化 3, [4,5-二甲基噻唑-2 基]-2,5-联苯四唑,MTT),为 Sino-American Biotec 生产;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为国产分析纯;Triton-X 100 和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为 Sigma 生产;荧光染料罗丹明-鬼笔环肽(rhodamine phalloidin)购自美国 Molecular Probes。用于荧光观察的是日本 Nikon TE300 荧光相差倒置显微镜。

1.2 细胞分组 HUVEC 用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。正常组按上述条件连续培养;AGE 组在培养基中加入 AGE-albumin 50 μg/ml 连续培养。

1.3 细胞活力曲线的描绘 两组细胞源于同一细胞株(同一培养瓶的 HUVEC),其单细胞悬液分别接种于 96 孔培养板,每孔培养基总量 200 μl,含细胞 2×10^3 个;每组细胞接种 15 孔。分别于培龄第 1~12 天,采用 MTT 比色法(波长 570 nm)测细胞活力,绘制细胞活力曲线。

1.4 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法为两样本均数 *t* 检验,采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。

1.5 内皮细胞 F-actin 的荧光染色 用普通培养瓶分别培养两组细胞,于培龄第 1~12 天每日定时分别对细胞进行处理。在每次预定染色时间前 24 h,取两组细胞分别接种于微孔培养皿,接种浓度为 1×10^5 /ml,培养 24 h 后内皮细胞基本融合形成单层细胞,再进行 F-actin 的荧光染色:2% 多聚甲醛 20℃ 固定 10 min;0.5% Triton X-100 4℃ 孵育 30 min;0.5% BSA 于 4℃ 孵育 45 min,最后用 2 μl/ml 罗丹明-鬼笔环肽于 4℃ 孵育 40 min。每步处理之间均用 4℃ PBS 充分漂洗。最后微孔培养皿直接置于相差荧光倒置显微镜上镜检并摄片,激发光波长为 565 nm。

2 结果

2.1 AGE 对 HUVEC 增殖活力的影响 AGE 组 HUVEC 活力曲线与正常组比较显著下移。自第 1 天起,该组细胞的 *D* 值就明显低于正常组;在生长后期,即第 7 天以后由于接触性抑制作用,两组细胞的增殖趋于缓和。但 AGE 组细胞的 *D* 值仍明显较低(图 1)。对每天的 *D* 值进行两样本均数的 *t* 检验 *P* 值均 < 0.01,提示这种差异具有显著性,说明 AGE 对内皮细胞的活力和增殖具有明显的抑制作用。

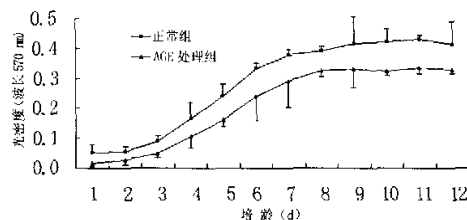


图 1 AGE 对内皮细胞增殖活力的影响(MTT 比色法, 波长 570 nm)

AGE 组终浓度 50 μg/ml,细胞初始接种浓度为 1×10^4 /ml

2.2 AGE 刺激下 F-actin 在 HUVEC 中的形态学改变 正常组内皮细胞的 F-actin 主要分布在细胞的周边,分布均匀,排列整齐,形成典型的鹅卵石样形态,胞质中未见密集的 F-actin 纤维。细胞间连接紧密,没有明显间隙形成(图 2 A, B)。在 AGE 的刺激下,细胞内的 F-actin 纤维形态和分布发生明显的改变,出现应力纤维(图 2 C, D)、丝状伪足(图 2 C)和板状伪足(图 2 E);至后期大部分细胞周边的 F-actin 纤维基本消失,细胞内部出现密集的应力纤维,细胞间裂隙形成和增大(图 2 F)。标志 F-actin 纤维从富集于细胞膜周边向扩散于细胞质的状态转变。

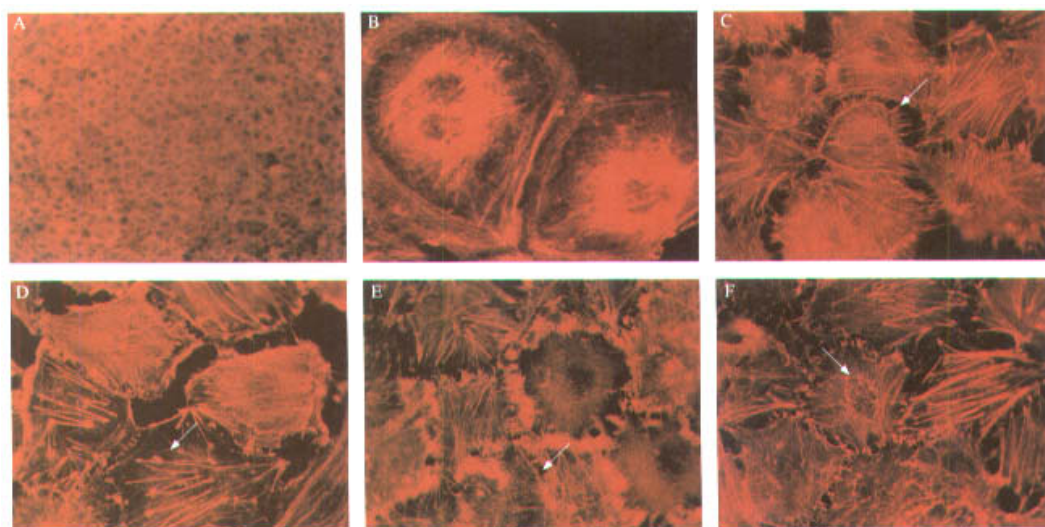


图 2 F-actin 的荧光染色

A: 正常培养第 9 天的 HUVEC, 典型的鹅卵石样形态 ($\times 100$); B: 正常 HUVEC 第 6 天, F-actin 仍主要分布于细胞周边, 胞质中未见明显的应力纤维 ($\times 1000$); C: AGE 刺激 (终浓度 $50 \mu\text{g/ml}$) 第 1 天, 细胞质内应力纤维的出现, 丝状伪足的形成 ($\times 1000$); D: AGE 刺激 ($50 \mu\text{g/ml}$) 第 4 天, 细胞质内应力纤维明显而清晰, 细胞间裂隙形成 ($\times 1000$); E: AGE 刺激 ($50 \mu\text{g/ml}$) 第 5 天, 板状伪足的形成 ($\times 1000$); F: AGE 刺激 ($50 \mu\text{g/ml}$) 第 6 天, 致密外周带 (DPB) 基本消失, 细胞质中应力纤维密集, 胞间裂隙扩大 ($\times 1000$)

3 讨论

在衰老及糖尿病和高血压等疾病中, 由血管并发症所引起的重要脏器病变严重威胁着人类的健康。这些并发症的主要病理学基础是动脉硬化和血管通透性改变, 尤其是微静脉和毛细血管通透性的增加。研究上述变化的起因, 是血管病理生理学研究的一个主要方向。

1912 年, 法国化学家 Maillard^[5] 报道了加热氨基酸和糖的混合物后所形成的一种黄褐色的产物, 这就是晚期糖基化终产物 (AGE)。它产生于还原糖和蛋白质赖氨酸残基之间的非酶性缩合作用, 再经过进一步脱水、环化、氧化和重组, 最终形成稳定的共价化合物^[6]。

研究表明, AGE 是人体内一种随年龄增加而不断沉积的结构复杂的毒性化合物。它们在血管壁的长期沉积能够促进血栓形成, 降低血管壁的弹性^[3], 诱导血管的高通透性^[7]; 用氨基胍 (aminoguanidine, AGN) 抑制 AGE 能拮抗后者引起的小鼠活动能力、有丝分裂、IL-2 水平、SOD 活力下降的现象^[8]; Friedman 等^[9] 在临床使用 AGN 抑制 AGE, 能明显改善糖尿病所致的各种血管并发症。总之, 在 AGE 的慢性沉积和以血管通透性升高为特征的血管并发症之

间, 可能存在某种内在的联系。但是, 在 AGE 沉积的诱因和血管通透性升高的结果之间, 还存在诸多未知领域有待进一步探索。

细胞是人体结构和功能的基本单位, 机体的病变首先是以细胞结构和功能的变化为基础的。这就不能不涉及到作为细胞结构和功能物质实现者之一的细胞骨架。细胞骨架是位于细胞质和细胞核内由丝状蛋白质聚合物形成的三维网状结构^[10], 其基本结构单位是纤维状肌动蛋白 (F-actin), 它由可溶性的球状肌动蛋白单体 (G-actin) 聚合而成, 后者不断地加入或脱落, 前者保持着聚合和解聚的动态平衡, 维持细胞骨架的形态和功能。显微镜下的 F-actin 呈现出多种可变的形态, 包括应力纤维 (stress fiber)、细胞周边的致密外周带 (dense peripheral band, DPB) 和中央短纤维等^[11], 它们之间可以互相转化。由应力纤维所介导的中心张力和由 DPB 所介导的栓缚力是一对方向相反的作用力, 这两种力量相互平衡时, 内皮细胞间隙和内皮通透性维持正常; 当内皮受到各种因素的刺激时, F-actin 骨架发生重组, 中心张力增加使细胞间连接发生改变, 结果细胞收缩变圆, 细胞间裂隙产生, 进而引起内皮屏障功能损害, 血管通透性升高。

鉴于细胞病变主要表现在细胞功能和结构两个方面,因此我们也从细胞增殖活力(功能)和 F-actin 形态(结构)两个方面来研究 AGE 对内皮细胞的潜在影响。从功能上看,AGE 处理组的内皮细胞活力明显受到抑制,曲线明显低于正常组细胞,提示 AGE 对内皮细胞的增殖有明显的抑制作用。从结构上看,正常组内皮细胞的 F-actin 主要分布在细胞的周边,分布均匀,排列整齐,形成典型的鹅卵石样形态,胞质中未见密集的 F-actin 纤维。细胞间连接紧密,没有明显间隙形成。AGE 刺激后,上述形态和分布发生明显的变化,表现为:(1)细胞内由 F-actin 组成的 DPB 逐渐消散,至细胞生长后期完全消失,同时,细胞质中出现密集的应力纤维;(2)部分细胞的荧光显像可以看到板状伪足和丝状伪足,内含丰富的 F-actin 纤维;(3)细胞总体上失去典型的鹅卵石样形态,细胞间裂隙形成和扩大。

从上述现象,我们不难作出如下推测:(1)由于细胞膜周边的 DPB 主要形成拴缚力维持细胞正常形态,而细胞中间的应力纤维形成中心张力介导细胞收缩,因此前者的消失和后者的出现说明:AGE 的刺激引起了内皮细胞内 F-actin 的重组,后者由细胞周边扩散进入细胞质,导致前述两种力量平衡的失调,细胞由稳定状态向收缩状态转变。(2)板状伪足和丝状伪足是细胞极化、发生定向运动的表现,它们的出现暗示:在 AGE 刺激数日后,细胞内部分 F-actin 发生定向运动,最终引起细胞游走和移动^[12]。(3)内皮细胞单层失去正常鹅卵石形态可能就是前述单个细胞收缩、移动和游走的结果,引起细胞间连接断开,出现细胞间裂隙,从而最终导致内皮屏障功能受损,血管通透性增高。我们认为,上述发现可能部分模拟或再现了病理情况下血管内皮通透性升高的过程。

本文初步探讨了 AGE 导致血管并发症的病理生理学基础,希望为进一步研究各种伴随血管通透性升高的疾病如衰老、糖尿病和高血压的发生机制提供理论和实验基础。目前我们的实验还不完善,比如尚未对单层内皮细胞中 F-actin 的变化进行定

量分析,也未采用“体视学”分析方法等,这些均待深入研究。

参考文献

- 1 Brownlee M, Lilly L. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, 1994, 43: 836-841.
- 2 Valassara H, Fuh H, Makita Z, et al. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 12043-12047.
- 3 Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*, 1996, 97: 238-243.
- 4 King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1996, 25: 255-270.
- 5 Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres; Formation des melanoidines par voie methodique. *C R Acad Sci*, 1912, 154:66-68.
- 6 Brownlee M, Lilly L. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, 1994,43:836-841.
- 7 King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1996, 25: 255-270.
- 8 Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev*, 1999,108: 239-251.
- 9 Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*,1999,22(Suppl2): B65-B71.
- 10 Janney PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 1998, 78: 763-781.
- 11 Thurston C, Baldwin AL. Changes in endothelial actin cytoskeleton in venules with time after histamine treatment. *Am J Physiol*, 1995, 269: H1528-H1537.
- 12 王海杰,谭玉珍.激活巨噬细胞的肌动蛋白分布和钙离子水平.解剖学报,2001, 32: 251-254.