

晚期糖基化终产物通过肾素-血管紧张素系统上调内皮细胞血管生成样蛋白-4的表达

成彩联¹, 郑振达², 刘迅¹, 汤颖³, 叶增纯¹, 娄探奇^{1*}

(中山大学附属第三医院 1.肾内科 2.心内科, 广州 510630; 3.中山大学附属第二医院肾内科, 广州 510120)

摘要:【目的】观察晚期糖基化终产物对内皮细胞血管生成样蛋白-4表达的影响及作用机制。【方法】不同浓度晚期糖基化终产物(AGE)干预内皮细胞 24 h, 实时荧光定量 PCR 和免疫印迹检测血管生成样蛋白-4 mRNA 和蛋白的表达, 酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测细胞上清和裂解液中血管紧张素 II 的浓度, 异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖漏出率和跨内皮电阻检测内皮细胞的通透性。预氯沙坦(10^{-5} mol/L)预处理内皮细胞后, 观察 Angptl-4 和内皮细胞通透性的变化。【结果】AGE 上调内皮细胞血管生成样蛋白-4 的 mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$), 升高细胞上清及裂解液中血管紧张素 II 的水平, 增加内皮细胞的通透性($P<0.05$), 氯沙坦预处理后能减轻 AGE 介导的这些改变($P<0.05$)。【结论】AGE 可能通过激活内皮细胞内的肾素-血管紧张素系统, 上调血管生成样蛋白-4 表达的机制, 增加内皮细胞的通透性。

关键词:晚期糖基化终产物; 内皮细胞; 肾素-血管紧张素系统; 血管生成样蛋白-4

中图分类号: R587 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)02-0188-05

Advanced Glycation End Products Upregulate the Expression of Angiopoietin-like Protein 4 Via Activation the Renin-angiotensin System in Endothelials

CHENG Cai-lian¹, ZHENG Zhen-da², LIU Xun¹, TANG Ying³, YE Zeng-chun¹, LOU Tan-qi¹

(1. Department of Nephrology, 2. Department of Cardiovascular, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of advanced glycation end products (AGE) on the expression of angiopoietin-like protein 4 and its mechanisms. 【Methods】 Endothelial cells were incubated with various concentrations of AGE for 24 hours, the expression of angiopoietin-like protein 4 were detected by real-time PCR and Western blot analysis, the concentration of angiotensin II in conditioned media and cell lysates were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, FITC-labeled dextran filtration assay and transendothelial electrical resistance were performed to evaluate endothelial permeability. 【Results】 AGE increased the expression of angiopoietin-like protein 4 parallel with an increase in the levels of angiotensin II ($P < 0.05$). Incubation with AGE also resulted in a significant increase in endothelial permeability ($P < 0.05$). However, pretreatment with angiotensin II receptor blocker Losartan (10^{-5} mol/L) blunted these effects induced by AGE ($P < 0.05$). 【Conclusions】 AGE upregulated the expression of angiopoietin-like protein 4 via activation local renin-angiotensin system in endothelial cells, which may be a new mechanism for AGEs increasing endothelial permeability.

Key Words: advanced glycation end products; endothelial cells; renin-angiotensin system; angiopoietin-like protein 4

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 188-192]

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-products, AGE) 和肾素-血管紧张素系统 (renin-

angiotensin system, RAS) 在糖尿病微血管并发症的发生发展中起着重要的作用。血管生成样蛋白

收稿日期: 2012-12-03

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI10B05), 广东省科技计划项目 (2011B080701005, 2010B031600202); 广东省医学科研基金 (A2010164)

作者简介: 成彩联, 博士生, 主治医师, E-mail: chengcailian3@163.com; * 通信作者, 娄探奇, 教授, 博士生导师, E-mail: Lou.ta@163.com.

4(angiotensin-like protein 4, Angptl-4)是血管生成样蛋白家族的主要成员,内皮细胞缺氧时表达明显上调,可达正常的8倍,参与调节脂质代谢、血管生成、细胞功能等^[1]。近年研究发现,Angptl-4表达增加是代谢综合征患者早期动脉粥样硬化病变的重要参与因素^[2],而Angptl-4基因敲除能明显阻止动脉粥样硬化的发生,但Angptl-4致动脉粥样硬化的机制是其调脂作用还是具有其他作用机制尚不清楚^[3]。本研究旨在观察AGEs对Angptl-4表达的影响及RAS在其中的作用,并探讨Angptl-4导致内皮细胞损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验对象

Eahy926内皮细胞株是由人肺腺癌细胞株A549与原代培养的人脐静脉血管内皮细胞融合构建而成的永生化细胞株,具有血管内皮细胞的特性,常用于内皮细胞的研究^[2]。内皮细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基、体积分数5% CO₂,37℃培养箱中生长至70%左右时,换为10 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基同步化过夜,然后加入不同的处理因素。

1.2 主要试剂

DMEM高糖培养基购于广州威佳试剂公司,胎牛血清购于Gibico公司,AGE购于德国Merck公司,细胞培养级牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购于美国MP Biomedicals公司,血管紧张素II检测试剂盒购于美国Ray Biotech公司,氯沙坦购于美国Sigma公司,兔抗人Angptl-4购于美国Invitrogen公司,Trizol及SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real time) 购于日本TaKaRa公司,细胞裂解液购于Cell Signaling Technology公司,蛋白浓度BCA试剂盒购于南京凯基生物公司,异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-dextran)购于美国Sigma公司,Millicell-ERS电阻仪购于美国Millipore公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购于武汉博士德生物公司,Transwell trammers (0.4 μmol/L, 8 μmol/L)购于美国Corning公司。

1.3 RNA的提取及real-time PCR

总RNA的提取按TRIzol Reagent说明书进行,取500ng RNA按试剂盒的说明合成cDNA,荧光定量PCR引物由TaKaRa公司设计和合成,

ANGPTL-4:上游引物5'-TCCTGGGACGAGATG AATGT-3',下游引物5'-GGTCTAGGTGCTTGTG GTC-3';GAPDH:上游引物5'-GAGTCCACTG GCGTCTTCA-3',下游引物5'-GGGGTGCTAAGCA GTTGGT-3'。重复3次细胞实验,每个样品设置3个复孔,阴性对照无扩增,反应孔可见单峰溶解曲线,数据处理采用2^{-ΔΔCT}方法进行。

1.4 蛋白的提取及免疫印迹检测血管生成样蛋白-4

细胞蛋白的提取按说明书进行,采用BCA法测定蛋白浓度,等量的蛋白与上样缓冲液按1:4混合后100℃水浴变性5min,8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 mA转膜120 min,50 g/L脱脂牛奶室温封闭1 h,兔抗人Angptl-4 (1:2000)4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG (1:60 000)室温孵育1 h, TBST洗3次,显影、定影。用BIORAD扫描仪扫描胶片,Quantity one图像分析软件分析目标条带和内参光密度值,目的条带/内参比值为该目的蛋白相对含量。

1.5 血管紧张素II的检测

从-80℃冰箱取出待测细胞上清及裂解液,按ELISA试剂盒说明进行操作,每孔中加入现配不同浓度Ang II的标准品溶液或待测样品,然后依次加入抗Ang II的抗体、HRP-Streptavidin、TMB One-Step Substrate Reagent,最后每孔加入终止反应液,用酶标仪在450 nm测定OD值,SigmaPlot软件包拟合标准曲线,并计算各标本浓度。

1.6 内皮细胞通透性的检测

1.6.1 FITC-葡聚糖漏出率 内皮细胞生长于Transwell上室,至融合细胞单层,用PBS洗两次,分别在内室和外室中加入无血清培养基,2 h后,外室换为含0.5 mg/mL未标记的葡聚糖的无血清培养基800 μL,内室换为含0.5 mg/mL FITC-葡聚糖的无血清培养基200 μL,在培养基内分别加入不同浓度的AGEs培养24 h,收集内室液体100 μL,外室液体200 μL,放于黑色96孔板中,采用Spectra Max M5多功能酶标仪测定收集液体在492nm波长处荧光吸光度值(optical density, OD);根据标准曲线计算收集液FITC-葡聚糖浓度,得到内外室的FITC-葡聚糖的浓度,通过以下公式计算滤过率:滤过率=C外室×V外室/(C内室×V内室)。

1.6.2 跨内皮细胞电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)检测 Millicell-ERS电阻仪购

于美国 Millipore 公司,使用前在超净工作台中将电极浸泡于 750 mL/L 酒精 15 min,并用紫外灯照射 30min。用无菌 PBS 冲洗电极,风干,校正电阻仪,将电极插入待测量的 Transwell filter,长电极在外部,短电极在内部,按 MEASURE 键测量,待数值稳定即可读数,直至 3 次读数相近则记录数值。每单位面积 (1cm²) 实际电阻 = 3 次所测电阻均值×Transwell 内孔有效膜面积(0.33 cm²)

1.7 统计学处理

所有数据均代表 3 次重复实验结果,以均数±标准差表示。采用 SPSS16.0 统计软件进行处理,根据方差齐性检验结果,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AGE 上调 Angptl-4 mRNA 和蛋白的表达

不同浓度的 AGE(0, 20, 40, 80, 160 μg/mL) 干预内皮细胞 24 h 后,实时荧光定量 PCR 和免疫印迹检测结果发现,AGE (80 μg/mL) 明显上调 Angptl-4 mRNA 和蛋白的表达 [2.60 ± 0.18 vs.1.0, (250 ± 32)% vs.100%, 均为 $P < 0.05$],而 BSA 对 Angptl-4 的表达没有明显影响($P > 0.05$,图 1)。

2.2 AGEs 升高内皮细胞上清和裂解液中血管紧张素 II 的水平

不同浓度的 AGE(0, 20, 40, 80, 160 μg/mL) 干预内皮细胞 24 h 后,ELISA 试验分别检测细胞上清和蛋白裂解液中血管紧张素 II 的浓度,结果发现,AGE 呈浓度依赖升高细胞上清和蛋白裂解液血管紧张素 II 的浓度,尤其在 AGE 浓度为 80 μg/mL 时最明显 ($P < 0.05$),将 AGE 浓度增大为 160 μg/mL 时血管紧张素 II 的浓度有所下降,但仍具有统计学意义($P < 0.05$),而 BSA 对血管紧张素 II 的浓度没有明显影响($P > 0.05$,表 1)。

2.3 氯沙坦减轻 AGE 介导的 Angptl-4 的上调和通透性的升高程度

AGE 明显上调 Angptl-4 mRNA 和蛋白的表达,而氯沙坦预处理能明显减轻 AGEs 介导的 Angptl-4 mRNA 和蛋白的上调程度 [1.52 ± 0.21 vs. 2.60 ± 0.18, (145 ± 19)% vs. (250 ± 32)%, 均为 $P < 0.05$,图 2]。AGE(80 μg/mL) 明显增加内皮细胞的通透性,而氯沙坦预处理能明显减轻

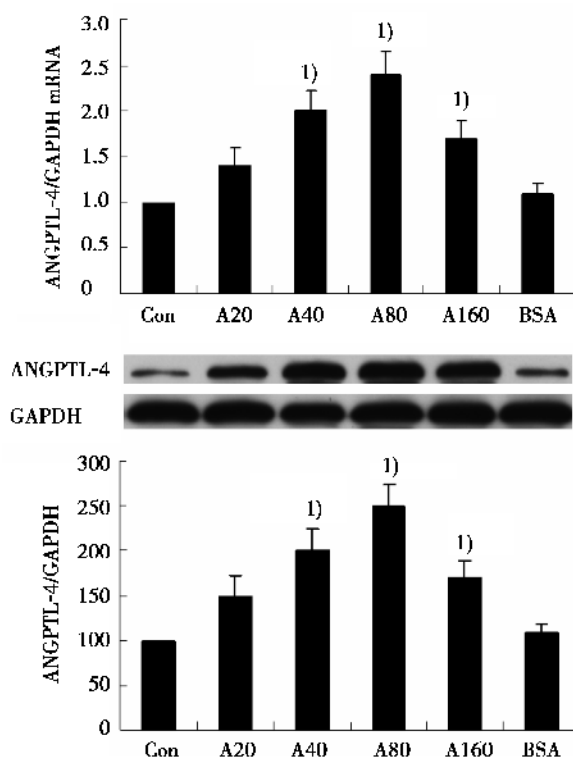


图 1 AGE 上调内皮细胞 Angptl-4 mRNA 和蛋白的表达

Fig.1 AGE upregulated the levels of Angptl-4 mRNA and protein

Con: control; A20: AGE 20 μg/mL; A40: AGE 40 μg/mL; A80: AGE 80 μg/mL; A160: AGE 160 μg/mL; BSA: 80 μg/mL. 1) $P < 0.05$ compared with control group

表 1 AGE 升高内皮细胞上清和裂解液中血管紧张素 II 的水平

Table 1 AGE increased the levels of angiotensin II in conditioned media and cell lysates (n=3, x ± s)

Groups	Media (pg/μL)	Lysates (pg/μg protein)
Con	1.3 ± 0.19	0.19 ± 0.04
A20	1.6 ± 0.22	0.21 ± 0.05
A40	2.1 ± 0.23 ¹⁾	0.24 ± 0.03 ¹⁾
A80	2.8 ± 0.21 ¹⁾	0.35 ± 0.04 ¹⁾
A160	2.5 ± 0.20 ¹⁾	0.28 ± 0.04 ¹⁾
BSA	1.4 ± 0.19	0.20 ± 0.03
F	5.83	5.12
P	0.008	0.01

Con: control; A20: AGE 20 μg/mL; A40: AGE 40 μg/mL; A80: AGE 80 μg/mL; A160: AGE 160 μg/mL; BSA: 80 μg/mL. 1) $P < 0.05$ Compared with control group

AGE 介导的内皮细胞通透性增高的程度 ($P < 0.05$,表 2)。

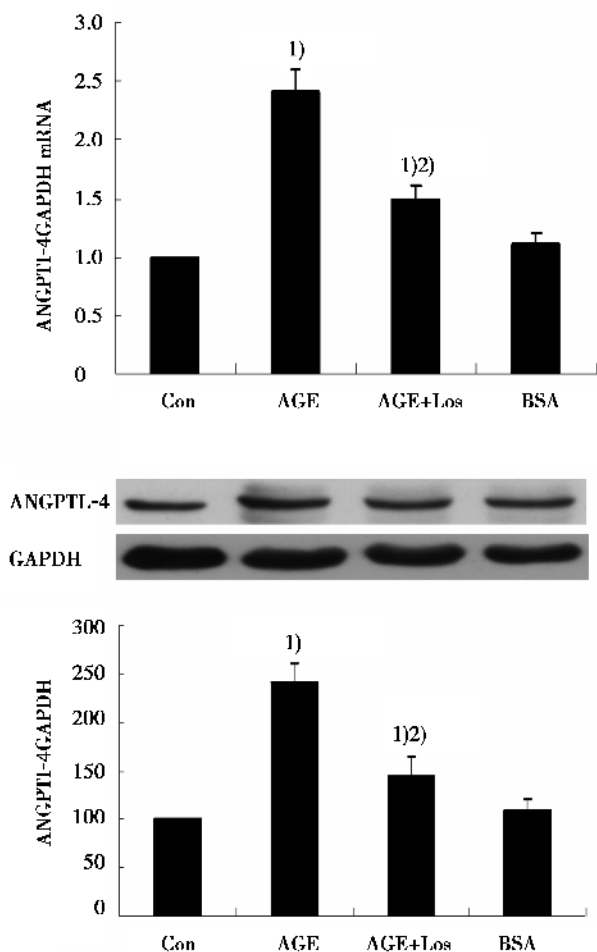


图 2 氯沙坦减轻 AGE 介导的 Angptl-4 的上调
Fig.2 Losartan inhibited the upregulation of Angptl-4 induced by AGE

Con; control; A20; AGE 20 μg/mL; A40; AGE 40 μg/mL; A80; AGE 80 μg/mL; A160; AGE 160 μg/mL; BSA; 80 μg/mL; AGE+Los; A80+Losartan (10⁻⁵ mol/L) 1) *P* < 0.05 compared with control group; 2) *P* < 0.05 compared with A80 group

3 讨论

动脉粥样硬化是冠心病、脑卒中和周围动脉疾病等心脑血管疾病的病理基础。AGE 是糖尿病患者体内高糖环境下的重要产物，参与多种心脑血管疾病的进程。有研究^[4]发现动脉粥样硬化内皮细胞中 AGE 的沉积明显增加，AGE 与内皮细胞相互作用，释放多种细胞因子和生长因子，损伤内皮细胞的功能。内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的始动因素，而内皮细胞通透性升高是微血管功能障碍的主要表现，是脂质进入动脉壁内皮下的最

表 2 异硫氰酸荧光素标记葡聚糖漏出率和跨上皮电阻
Table 2 FITC-labeled dextran filtration assay and transendothelial electrical resistance (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Groups	OD	TEER($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
Con	0.15 ± 0.09	73.28 ± 2.64
A20	0.21 ± 0.08	68.24 ± 3.12
A40	0.39 ± 0.1 ¹⁾	53.65 ± 2.98 ¹⁾
A80	0.46 ± 0.09 ¹⁾	43.39 ± 2.82 ¹⁾
A160	0.37 ± 0.07 ¹⁾	52.85 ± 3.42 ¹⁾
BSA	0.2 ± 0.06	70.77 ± 2.83
AGE+Los	0.28 ± 0.08 ^{1) 2)}	62.43 ± 3.18 ^{1) 2)}
<i>F</i>	5.13	4.11
<i>P</i>	0.007	0.01

Con; control; A20; AGE 20 μg/mL; A40; AGE 40 μg/mL; A80; AGE 80 μg/mL; A160; AGE 160 μg/mL; BSA; 80 μg/mL; AGE+Los; A80+Losartan (10⁻⁵ M); OD; optical density; TEER; transendothelial electrical resistance; 1) *P* < 0.05 compared with control group; 2) *P* < 0.05 compared with A80 group

早病理变化。Angptl-4 是内皮细胞合成分泌的因子，参与新生血管的形成、细胞迁移、粘附等^[1]。但 AGE 对 Angptl-4 表达的影响及作用机制尚不清楚。

我们的研究结果发现，AGE 能上调 Angptl-4 mRNA 和蛋白表达，并且在浓度为 80 μg/mL 时作用最明显 (*P* < 0.05)，在 AGE 浓度为 160 μg/mL 时，AGE 对 Angptl-4 的作用有所下降，但仍具有统计学意义。Le 等^[1]发现缺血缺氧可诱导内皮细胞表达 Angptl-4 明显增加，参与新生血管的形成。Angptl-4 是内皮细胞合成分泌的因子，Adachi 等^[3]研究发现 Angptl-4 基因敲除小鼠可改善脂质代谢与抑制泡沫细胞形成，阻止动脉粥样硬化；Xu 等^[5]发现小鼠过度表达 Angptl-4 后可出现脂蛋白酶活性下降、高脂血症和脂肪肝。细胞通透性增高是动脉粥样硬化发生的首要因素，关于 Angptl-4 对细胞通透性影响的研究结果存在争议，有学者^[6]认为 Angptl-4 可抑制血管的通透性，从而抑制肿瘤细胞的运动性和侵袭性。但最近的研究^[7]认为 Angptl-4 可破坏内皮细胞之间的连接，增加通透性，促进肿瘤细胞的侵袭和转移。我们通过葡聚糖漏出率和跨内皮电阻检测内皮细胞的通透性，结果发现，AGE 不但能上调 Angptl-4 的表达，而且也能明显增加内皮细胞对 FITC-葡聚糖的通透性 (*P* < 0.05)，降低跨内皮电阻 (*P* < 0.05)。Huang 等^[8]

研究发现 Angptl-4 通过整合素信号通路和阻止紧密连接蛋白 VE-cadherin 和 claudin-5 形成复合物,从而破坏血管的紧密连接。Cazes 等^[9]研究发现 Angptl-4 通过抑制张力纤维丝的形成,改变内皮细胞的骨架,从而导致内皮细胞的通透性升高。这些结果提示上调表达的 Angptl-4 可通过多种机制损伤内皮细胞,增加内皮细胞的通透性。

近年的研究认为局部 RAS 激活在细胞损伤、器官功能障碍中比循环 RAS 激活起着更为重要的作用,并且器官局部的血管紧张素 II 的浓度远远高于循环的浓度。Yu 等^[10]研究发现内皮细胞内存在局部的 RAS,激活后可造成细胞损伤。我们通过 ELISA 方法观察了 AGE 对内皮细胞内 RAS 的影响,结果发现,AGE 可升高细胞上清和裂解液中血管紧张素 II 的浓度,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Ang II 是 RAS 的主要效应者,通过与细胞膜上的受体结合产生损伤作用。Villa 等^[11]研究发现血管紧张素 II 受体阻滞剂替米沙坦可抑制肾组织 Angptl-4 的表达,减少内皮细胞增生,从而保护肾脏。内皮细胞局部产生的 Ang II 是否参与 Angptl-4 的调节尚不清楚。我们通过加入氯沙坦阻断 Ang II 的作用观察 RAS 在 AGE 上调 Angptl-4 表达及增加内皮细胞通透性的作用。结果发现,氯沙坦预处理后,AGE 介导的 Angptl-4 的上调有明显的下降,内皮细胞的通透性有明显的改善($P < 0.05$),与 Villa 报道的结果相似。综上所述,AGE 激活内皮细胞的 RAS,上调 Angptl-4 的表达,可能是 AGE 增加内皮细胞通透性的另一作用途径。

Angptl-4 是近年发现的血管内皮生长因子家族的新成员,在调节脂肪代谢、介导胰岛素抵抗、动脉粥样硬化、代谢综合征中均具有重要的作用,研究其调节机制及信号通路对于动脉粥样硬化的防治具有深远的意义。

参考文献:

- [1] Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiotensin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol* 2003, 162(5):1521-1528.
- [2] 李颖, 郑毅涛, 齐一鸣, 等. 登革病毒 2 型诱导人血管内皮细胞株 EAhy926 自噬的研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2011, 32(4):433-436.
Li Y, Zheng YT, Qi YM, et al. DV2-induced
- Autophagy in Human Endothelial Cell Line EAhy926 [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2011, 32(4):433-436.
- [3] Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, et al. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4):806-811.
- [4] Miyata T, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 76: S120-125.
- [5] Xu A, Lam MC, Chan KW, et al. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(17): 6086-6091.
- [6] Galaup A, Cazes A, Le Jan S, et al. Angiotensin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(49): 18721-18726.
- [7] Ma T, Jham BC, Hu J, et al. Viral G protein-coupled receptor up-regulates Angiotensin-like 4 promoting angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32):14363-14368.
- [8] Huang RL, Teo Z, Chong HC, et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters [J]. *Blood*, 2011, 118(14): 3990-4002.
- [9] Cazes A, Galaup A, Chomel C, et al. Extracellular Matrix-Bound Angiotensin-Like 4 Inhibits Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Sprouting and Alters Actin Cytoskeleton [J]. *Circ Res*, 2006, 99(11):1207-1215.
- [10] Yu MA, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(6): 1234-1242.
- [11] Villa L, Boor P, Konieczny A, et al. Effects and mechanisms of angiotensin II receptor blockade with telmisartan in a normotensive model of mesangioproliferative nephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*. 2011, 26(10):3131-3143.

(编辑 孙慧兰)