

· 论 著 ·

NADPH 氧化酶 4 在 AGEs 诱导内皮细胞活性氧生成中的作用研究*

刘洪彬¹, 于世勇^{2△}

(1. 重庆市九龙坡区第五人民医院内科 401329; 2. 第三军医大学新桥医院心内科, 重庆 400037)

摘要:目的 晚期糖基化终末产物(AGEs)能诱发细胞内活性氧(ROS)生成增多而引起内皮细胞损伤,从而促进动脉粥样硬化的发生和发展,本组探讨 AGEs 刺激下内皮细胞 ROS 的生成及 NADPH 氧化酶 4(Nox4)的作用。方法 培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),观察 AGEs 刺激下 HUVECs 细胞 Nox4 表达和 ROS 生成情况,应用 RNA 干扰技术沉默 Nox4 后,观察细胞内 ROS 的变化,分析 Nox4 的作用。结果 AGEs 刺激后 HUVECs 细胞内 ROS 增加,而 Nox4 siRNA 转染后能显著降低内皮细胞 ROS 水平;Nox4 siRNA 转染可以使基础水平的 ROS 减少 45.9%,并对 AGEs 刺激后的 ROS 增加有明显的抑制作用。结论 Nox4 是内皮细胞 ROS 生成过程中发挥调控作用的关键靶点,阻断 Nox4 能有效地抑制 AGEs 诱导的内皮细胞氧化损伤,进而可能阻遏动脉粥样硬化的发生和发展。

关键词:糖基化产物,高级;内皮细胞;活性氧;NADPH 氧化酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2401-03

Role of NADPH oxidase 4 in generation of intracellular ROS in endothelial cells stimulated by AGEs*

Liu Hongbin¹, Yu Shiyong^{2△}

(1. Department of Internal Medicine, the Fifth People's Hospital of Jiulongpo District, Chongqing 401329, China;

2. Department of Cardiology, Xinqiao Hospital Affiliated to Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective Advanced glycation end products (AGEs) can induce the intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) and cause the dysfunction of endothelial cells. This may accelerate development of vascular atherosclerosis. We investigated the role of NADPH oxidase 4 (Nox4) in the generation of intracellular ROS in endothelial cells stimulated by AGEs. **Methods**

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and incubated with AGEs and intracellular ROS was measured with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA). siRNA was used to silence Nox4. The role of Nox4 in the generation of ROS was observed. **Results** After AGEs stimulation, ROS in HUVECs was significantly elevated, while Nox4 siRNA transfection inhibited the generation of ROS significantly. Nox4 siRNA transfection reduced ROS at basal level by 45.9%, and significantly inhibited AGEs-induced ROS elevation. **Conclusion** Altogether, the results demonstrate that Nox4 is the major source of intracellular ROS in endothelial cells, and indicate potential targets for the inhibition of the atherogenic signals triggered by AGEs.

Key words: glycosylation end products, advanced; endothelial cells; reactive oxygen species; NADPH oxidase

动脉粥样硬化性心脏病是当前社会人群主要死因,尤其合并糖尿病时,动脉粥样硬化的发生率显著增加,致残、致死率高,严重危害人类健康。体内晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的形成和不断累积与动脉粥样硬化的发生和发展关系密切^[1]。AGEs 促动脉粥样硬化形成与其作用于内皮细胞表面特异性受体 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]。已经证实还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶是内皮细胞 ROS 生成的主要来源^[3],近来发现 NADPH 氧化酶存在多种亚型, NADPH 氧化酶 4(NADPH oxidase 4, Nox4)是内皮细胞 NADPH 氧化酶的主要表现形式,但其在 AGEs 刺激后细胞内 ROS 增加这一过程中是否起主要作用,目前尚不清楚。为此,本研究拟通过培养血管内皮细胞,探讨 Nox4 在 AGEs 诱导内皮细胞活性氧生成中的作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂 达尔伯克氏必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium, DMEM)培养基、I 型胶原酶、优质胎牛血清购自 Gibco 公司,内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)购自 BD Bioscience 公司, D-葡萄糖、牛血清

清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、二氯二氢荧光素二乙酯(dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)购自 Sigma 公司, Nox4 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)及阴性对照 siRNA 购自 Ambion 公司,脂质体 2000(Lipofectamine 2000)购自 Invitrogen 公司,兔抗人 Nox4 抗体购自 Abcam 公司,β-actin 兔多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术公司。

1.2 晚期 AGEs 的制备 参照 Horiuchi 等^[4]的方法将 1.6 g 牛血清清蛋白与 3.0 g D-葡萄糖溶于 10 mL 0.5 mmol/L (pH 7.4)磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中, 0.22 μm 微孔膜过滤除菌, 37 °C 孵育 90 d, 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 AGEs 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 AGEs 的浓度。

1.3 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的分离与培养 在无菌条件下,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% I 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,以获得更多的内皮细胞,将消化液和冲洗液一并注入离心管,离心半径10 cm,1 000 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 培养液(内含20%优质 BSA、50 μg/mL ECGS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素),重悬细胞,接种于50 mL 一次性塑料培养瓶中,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Ⅷ因子相关抗原进行内皮细胞鉴定。实验用第3代细胞。

1.4 RNA 干扰实验 转染前1 d,胰酶消化细胞并计数,调整细胞密度,接种至6孔细胞培养板,使其在转染日生长达到70%左右。细胞生长于不含抗生素的正常的内皮细胞培养基中(80%DMEM+20%优质 BSA+5 μg/mL ECGS)。采用 Lipofectamine 2000 进行 Nox4 siRNA 转染,阴性对照采用乱序的 siRNA 为错配对照组。实验设空白对照组、单纯 AGE 组、阴性对照 siRNA 组、AGEs+阴性对照 siRNA 组、单纯 Nox4 siRNA 转染组、AGEs+Nox4 siRNA 转染组,每组3例。蛋白印迹法(Western blot)法确定 RNA 干扰效率。

1.5 Western blot 检测蛋白水平 用4℃预冷的 PBS 轻轻漂洗培养瓶中细胞,然后加入适量 PBS,用细胞刮使细胞脱壁,转移到离心管中,加入放射免疫沉淀测定(radioimmune precipitation assay, RIPA)(含10 μL 苯甲基磺酰氟化物)细胞裂解液,提取蛋白。取50 μg 细胞蛋白行12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转印至硝酸纤维素膜上,用含5%封闭液封闭膜1 h,加入1:100稀释的兔抗人 Nox4 室温孵育2 h,三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗膜5 min×3,加1:1 000稀释的辣根酶标记的羊抗兔 IgG 二抗,37℃孵育1 h,洗膜5 min×3次,增强化学发光法压片显影。

1.6 ROS 的测定 将 HUVECs 与不同浓度 AGEs(100、200、300、400、500、600、700、800 μg/mL) 分别作用1、2、4、8、16、24 h后,与5 mmol/L DCF-DA 在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值表示。

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

2 结果

2.1 AGEs 刺激下 HUVECs 细胞内 ROS 的生成 AGEs 刺激后,内皮细胞内 ROS 明显增加,并且随 AGEs 浓度和孵育时间的增加而增加(图1),以600 μg/mL 孵育16 h 增加最明显,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,在后续 RNA 干扰实验中,本组均采用此剂量和孵育时间。

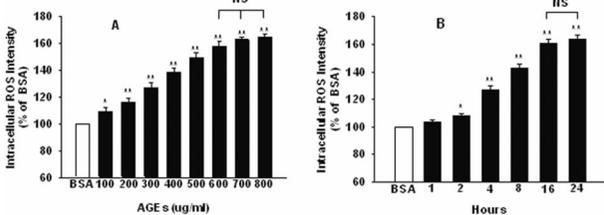


图1 AGEs 刺激下 HUVECs 细胞内 ROS 的生成情况 A:不同浓度 AGEs 对细胞内 ROS 生成的影响,细胞分别与不同浓度 AGEs(100~800 μg/mL)及 BSA 共同孵育16 h; B: AGEs 对细胞内 ROS 生成的时间效应,细胞与 AGEs(600 μg/mL) 分别孵育1~24 h。* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$,与 BSA 组相比, NS 表示差异无统计学意义。

图1 AGEs 刺激下 HUVECs 细胞内 ROS 的生成情况

2.2 Nox4 蛋白 Western blot 检测 为确定 Nox4 siRNA 的干扰效果并检测 AGEs 刺激对 Nox4 蛋白表达的影响, HUVECs 转染 siRNA 24h 后,采用 Western blot 法对 Nox4 蛋白进行了检测。结果如图1所示, AGEs 刺激后 HUVECs 中 Nox4 蛋白表达明显增加,而 Nox4 siRNA 转染后能显著降低内皮细胞 Nox4 蛋白水平(图2A),半定量分析结果(图2B)表明可以使基础 Nox4 蛋白表达降低77.9%,并可以使 AGEs 刺激后 HUVECs Nox4 蛋白表达降低84.9%。而阴性对照 siRNA 组细胞 Nox4 表达无相应变化($P > 0.05$),证实 NOX4 siRNA 针对 Nox4 产生了较好的沉默效果,且具有特异性。

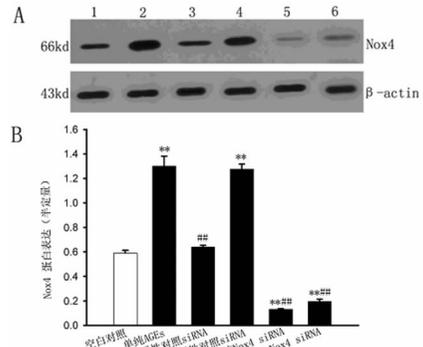


图2 Nox4 蛋白 Western blot 检测 A Western blot 结果,1:空白对照;2:单纯 AGEs;3:阴性对照 siRNA;4: AGEs+阴性对照 siRNA;5:单纯 Nox4 siRNA 转染;6: AGEs+Nox4 siRNA 转染。B 半定量分析结果比较($n=3$), * : $P < 0.01$,与空白对照组相比; # : $P < 0.01$,与单纯 AGEs 组相比。

图2 Nox4 蛋白 Western blot 检测

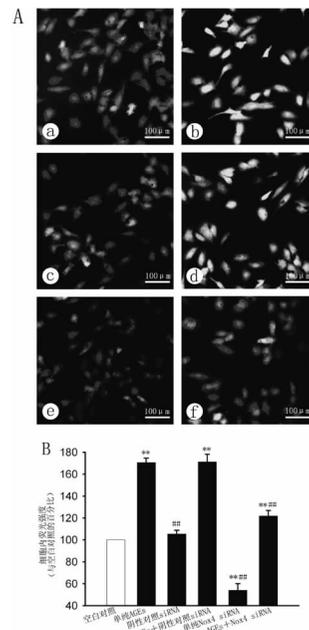


图3 Nox4 siRNA 转染后细胞内 ROS 生成情况 A 荧光显微镜下观察, a:空白对照; b:单纯 AGEs; c:阴性对照 siRNA 转染; d: AGEs+阴性对照 siRNA 转染; e:单纯 Nox4 siRNA 转染; f: AGEs+Nox4 siRNA 转染。B 细胞内荧光强度比较($n=3$), * : $P < 0.01$,与空白对照组相比; # : $P < 0.01$,与单纯 AGEs 组相比。

图3 Nox4 siRNA 转染后细胞内 ROS 生成情况

2.3 Nox4 siRNA 转染后细胞内 ROS 生成情况 AGEs 刺激后 HUVECs 细胞内 ROS 增加,而 Nox4 siRNA 转染后能显著降低内皮细胞 ROS 水平(图3A),定量分析结果(图3B)表明 Nox4 siRNA 转染可以使基础水平的 ROS 减少45.9%,并对 AGEs 刺激后的增加 ROS 有明显的抑制作用,可减少69.0%

左右,但是不能完全抑制,相对于基础水平 ROS 而言, Nox4 siRNA 转染后 AGEs 仍然能增加 21.8% 的细胞内 ROS 生成。

3 讨论

AGEs 是指蛋白质、核酸或脂质等大分子物质的氨基在无需酶参与条件下,自发地与葡萄糖或其他还原糖的醛基或酮基反应所生成的稳定的共价加合物,该反应过程称为非酶糖基化反应^[5]。体内 AGEs 慢性蓄积与动脉粥样硬化之间有明显因果关系,是糖尿病血管病变的触发因素^[6-8]。而在非糖尿病患者,AGEs 同样是启动和加重动脉粥样硬化的重要因素。Kanauchi 等^[9]检测 133 例患有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 AGEs 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 AGEs 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的患者血中 AGEs 含量明显高于单支冠状动脉病变和双支冠状动脉病变患者,而这些患者血压、血糖、胰岛素、总胆固醇、三酰甘油和血肌酐水平与对照组比较无明显区别^[10-11]。AGEs 主要通过诱导细胞内 ROS 生成而引起内皮细胞损伤,从而促进动脉粥样硬化的发生和发展。本研究结果表明 AGEs 呈剂量和时间依赖性刺激 HUVECs 细胞内 ROS 生成。

NADPH 氧化酶是内皮细胞 ROS 生成的主要来源^[3],近来发现 NADPH 氧化酶存在多种亚型,在血管内皮细胞, Nox4 的表达占绝对优势,同时也有表达量非常低的 Nox1 和 Nox2 表达^[12-14]。Park 等^[15]的研究证实 Nox4 来源的 ROS 在脂多糖诱发的内皮细胞炎症反应过程中至关重要,抑制 Nox4 后细胞内 ROS 明显减少,同时内皮细胞炎症分子-1、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 表达亦显著降低,内皮细胞与单核细胞的黏附降低。本组研究证实 AGEs 刺激能够上调内皮细胞 Nox4 的表达,进而引起内皮细胞 ROS 生成增多。通过 RNA 干扰技术沉默 Nox4 后,内皮细胞的基础 ROS 生成水平明显降低,提示 Nox4 可能参与了内皮细胞基础 ROS 生成的调控,这与 Yoon 等^[8]的研究结果一致。本组进一步发现阻断 Nox4 后,AGEs 诱导的内皮细胞 ROS 生成显著减少,结合 Nox4 在内皮细胞分布的高度组织特异性,提示 Nox4 是内皮细胞 ROS 生成过程中发挥调控作用的关键靶点,阻断 Nox4 能有效地抑制 AGEs 诱导的内皮细胞氧化损伤,进而可能阻遏动脉粥样硬化的发生和发展。

同时,在本研究中,阻断 Nox4 并不能完全抑制 AGEs 诱导的内皮细胞氧化损伤,在 Nox4 表达已经被显著抑制的情况下,AGEs 仍能引起小幅度的 ROS 生成增加,提示可能存在其他的途径参与了此过程,确切机制有待于进一步研究。

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,对降低远期心血管疾病的发病率和病死率有深远的意义。但是临床上多种抗氧化剂预防心血管终点事件的临床试验均以失败告终,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。本研究表明 Nox4 对 AGEs 刺激下内皮细胞 ROS 的生成具有高度特异性,显示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,具有重要意义。

参考文献:

[1] Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies[J]. *Lancet*, 2008, 371(9626): 1800-1809.
[2] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic com-

plications[J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.

- [3] Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(1): 21-28.
[4] Horiuchi S, Araki N, Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of maillard reaction[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(12): 7329-7332.
[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): S20-26.
[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] Turk Z, Sesto M, Skodlar J, et al. Products of advanced glycation in patients with type 2 diabetes and vascular disease[J]. *Ann Clin Biochem*, 2003, 40(Pt 5): 552-559.
[8] Yoon SJ, Park S, Shim CY, et al. Association of RAGE gene polymorphisms with coronary artery disease in the Korean population[J]. *Coron Artery Dis*, 2007, 18(1): 1-8.
[9] Kanauchi M, Tsujimoto N, Hashimoto T. Advanced glycation end products in nondiabetic patients with coronary artery disease [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(9): 1620-1623.
[10] Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(16): 7742-7746.
[11] Aronson D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure[J]. *Med Hypotheses*, 2002, 59(3): 297-301.
[12] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase [J]. *Circulation*, 2004, 109(2): 227-233.
[13] Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system[J]. *Circ Res*, 2003, 93(8): 767-775.
[14] Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, et al. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3/4): 308-317.
[15] Park HS, Chun JN, Jung HY, et al. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(3): 447-455.