

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0341-04

• 实验研究 •

晚期糖基化终产物引起的 RhoA 和 ROCK 在人皮肤微血管内皮细胞的分布变化

王吉萍^{1,2}, 陈波¹, 李强¹, 郭晓华¹, 王陵军¹, 黄巧冰¹

(1. 南方医科大学基础医学院病理生理教研室 广东省医学休克微循环重点实验室, 广东省广州市 510515;

2. 广东湛江农垦医院肾内科)

[关键词] 晚期糖基化终产物; 人微血管内皮细胞; RhoA; ROCK

[摘要] 目的 观察在晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白作用下, 小 G 蛋白 RhoA 及其激活的激酶 ROCK 在人微血管内皮细胞中分布的变化。方法 培养人皮肤微血管内皮细胞株, 分别以糖基化修饰的人血清白蛋白 (AGE-HSA) 处理不同的浓度和时间, 用免疫荧光染色法、激光共聚焦显微镜观察 RhoA 和磷酸化 ROCK 在细胞中的分布变化; 并用活性型 RhoA L63 或失活型的 RhoA N19 转染细胞后再给予 AGE-HSA 刺激, 观察磷酸化 ROCK 细胞内分布的变化。结果 AGE-HSA 刺激可以导致 RhoA 在胞浆中分布增多, 其变化随着 AGE-HSA 作用时间的延长和剂量的增加更加明显。RhoA 的下游激酶被活化的磷酸化 ROCK 在人微血管内皮细胞中的分布与 RhoA 类似; 用失活型 RhoA N19 先处理细胞后, AGE-HSA 介导的 ROCK 分布变化被抑制。结论 晚期糖基化终产物刺激引起小 G 蛋白 RhoA 在细胞内分布变化, 并导致其下游激酶 ROCK 磷酸化和定位变化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Advanced Glycation End Products Induced the Redistribution of RhoA and Phosphorylated ROCK in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells

WANG JiPing CHEN Ba LI Qiang GUO XiaoHua WANG Ling-Jun 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 RhoA; ROCK

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of distribution of RhoA and phosphorylated RhoA kinase (ROCK) induced by advanced glycation end products (AGE) in human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-1).

Methods Cultured HMVEC-1 were treated with AGE-modified human serum albumin (AGE-HSA). The distribution of RhoA and phospho-ROCK were detected by immunohistochemistry using anti-RhoA and anti-phospho-ROCK antibodies and observed under confocal microscope.

Results The data revealed that RhoA located around the nucleus in quiescent HMVEC-1. The stimulation of AGE-HSA evoked an increased distribution of RhoA in cytoplasm, even an accumulation at the cellular edge. The administration of AGE-HSA also triggered a significant increase of phospho-ROCK localization in HMVEC-1 cytoplasm. The transfection of dominant negative RhoA N19 attenuated this AGE-induced phospho-ROCK spreading while constitutive active RhoA L63 mimicked the AGE-induced response in phospho-ROCK distribution.

Conclusion AGE stimulation causes the redistribution of RhoA and results in the phosphorylation of ROCK in human microvascular endothelial cells.

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 通过改变被修饰蛋白的结构和功能或与特异的 AGE 受体结合影响胞内信号转导、刺激细胞因子释放、引起细胞氧化应激等, 在糖尿病血管并发症中发挥致病效应^[1]。本实验室前期研究证

明了 AGE 刺激对内皮细胞形态和功能的影响及机制^[2-3]。RhoA 和 ROCK 作为调节肌球蛋白轻链磷酸化的重要激酶系统, 参与细胞收缩运动和黏附迁移等功能调节, 在内皮细胞中的分布调整与细胞功能有密切关系^[4-6]。本实验室前期研究也证明了小 G 蛋白 RhoA 及其下游激酶 Rho 激酶 (ROCK) 在 AGE 引起的人皮肤微血管内皮细胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HMVEC-1) 骨架重组和单层通透性的改变中发挥了重要的作用^[7]。本研究旨在了解 AGE 引起 RhoA 和 ROCK 活性变化

[收稿日期] 2010-03-10 [修回日期] 2010-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (30771028 和 30971201)

[作者简介] 王吉萍, 硕士, 研究方向为晚期糖基化终产物引起血管通透性改变的机制, Email 为 yulinlingpp@sohu.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, Email 为 bing@fimmu.com。

的基础上,探讨 RhoA 和被其活化的磷酸化 ROCK 在内皮细胞中的分布变化,以进一步阐明 AGE 介导内皮细胞功能变化的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HMVEC-1 购自美国 Cell Applications (San Diego, CA); MCDB131 培养基、胰酶、胎牛血清 (FBS) 等购自美国 Gibco 公司; 内皮生长因子购自美国 Biosciences 公司; DAPI 购自美国 Invitrogen; 抗 RhoA 抗体购自美国 Abcam 公司; 抗磷酸化 ROCK 抗体购自美国 Upstate 公司; FITC 标记羊抗兔 IgG 和人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 购自美国 Sigma 公司; TCL 检测试剂盒购自德国 Endos 公司。腺病毒突变体活性型 RhoA L63 和失活型 RhoA N19 来自美国 cell biology 公司。

1.2 晚期糖基化终产物修饰的人血清白蛋白的制备及细胞培养

糖孵育法制备 AGE 修饰的人血清白蛋白 (AGE-HSA)^[8-9]。荧光分光光度法鉴定 AGE-HSA 中 AGE 含量为 74.80 kU/g 蛋白质。对照样本 AGE 含量不超过 0.9 kU/g 蛋白质。制备的所有样品均经 TCL 试剂盒检测, 内毒素含量低于 500 EU/L。HMVEC-1 用含 20% 胎牛血清的 MCDB131 培养基常规培养, 3~4 天后在相差显微镜下可见 HMVEC-1 不断生长、分化, 呈不规则多边形铺满瓶底。按 $(1 \sim 2) \times 10^5$ /L 接种至微孔小皿, 待细胞汇合或接近汇合后分组处理备用。

1.3 细胞内 RhoA 和磷酸化 ROCK 的免疫荧光染色和观察

待接种于微孔小皿的 HMVEC-1 长至汇合后, 改用无血清培养基继续培养 2 h, 使细胞获得同步生长并处于静止期。各组细胞按实验分组处理后, PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 4% 多聚甲醛 4℃ 孵育 10 min, 冷 PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 再用 0.5% Triton X-100 于 4℃ 孵育 15 min, 冷的 PBS 漂洗 2 min \times 3 次。含有 5% 牛血清白蛋白的封闭液室温封闭 1 h, PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 加入 1:100 稀释的兔抗 RhoA 抗体或磷酸化 ROCK 抗体, 4℃ 孵育过夜, PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 室温闭光孵育 1 h, PBS 漂洗 2 min \times 3 次。激光共聚焦显微镜观察并采图。

1.4 细胞核的荧光染色及观察

F-actin 染色结束后, 按说明书溶解 DAPI 以

1:100 与细胞避光孵育 5 min, PBS 漂洗 2 min \times 3 次, 特异显示细胞核, 在激光共聚焦显微镜下, 用紫外光激发观察并采图。

1.5 实验分组

(1) AGE-HSA 作用于内皮细胞不同时间组: 用 50 mg/L 的 AGE-HSA 分别刺激内皮细胞 0、2、4、8 h, 免疫荧光染色法检测 RhoA 在内皮细胞的分布。未被葡萄糖修饰的天然 HSA 处理为对照组。(2) AGE-HSA 作用于内皮细胞不同浓度组: 分别用 0、25、50 和 100 mg/L 的 AGE-HSA 作用内皮细胞 8 h, 免疫荧光染色法检测 RhoA 在内皮细胞的分布。未被葡萄糖修饰的天然 HSA 处理为对照组。(3) RhoA 活性变化对 AGE 介导的磷酸化 ROCK 分布的影响: 用 50 mg/L AGE-HSA 的无血清 MCDB131 培养基作用内皮细胞 8 h, 免疫荧光染色观察磷酸化 ROCK 分布的变化。将含目的基因的活性 RhoA L63 或无活性 RhoA N19 的重组腺病毒导入内皮细胞, 病毒感染 24 h 后, 再换以加或不加 50 mg/L AGE-HSA 的无血清 MCDB131 培养基作用 8 h 以加 HSA 培养为阴性对照组。用免疫荧光染色法检测磷酸化 ROCK 分布的变化, 用普通图像灰度软件检测磷酸化 ROCK 的光密度变化。

2 结果

2.1 AGE-HSA 对 RhoA 在内皮细胞分布的影响

在静息细胞, RhoA 较集中地分布在核周, 胞浆含量较少; 给予 AGE-HSA 刺激以后, 随着 AGE-HSA 作用剂量的增加 (图 1) 和时间的延长 (图 2), 胞浆中 RhoA 的含量明显增加, 不再集中在核周, 有的更集中分布在细胞边缘。特别在 AGE-HSA 作用剂量为 25~100 mg/L 时变化最明显, 在刺激的 2~4 h 内变化也最明显; HSA 组与单纯培养基组相比, RhoA 的分布没有明显改变。

2.2 AGE-HSA 刺激对磷酸化 ROCK 分布的影响

静息状态的微血管内皮细胞磷酸化 ROCK 在细胞周边的分布分界清晰, 线条光滑, 胞浆中 ROCK 着色不多。给予 50 mg/L AGE-HSA 作用 8 h 后, 磷酸化 ROCK 在细胞核周边的分布明显减少, 而在胞浆中的着色明显增加, 分布增多而分散 (图 3), 提示 AGE-HSA 引起了 ROCK 的磷酸化激活。

2.3 影响 RhoA 的活性对 AGE-HSA 介导的磷酸化 ROCK 在内皮细胞分布的影响

单纯转染失活型的 RhoA N19 后, 由于 RhoA 活性降低, 可见加强了磷酸化 ROCK 在核周的分布,

其着色线条更加光滑和清晰; 转染活性型腺病毒 RhoA L63则引起了类似 AGE-HSA 刺激导致的磷酸化 ROCK在细胞分布的变化, 磷酸化 ROCK在胞浆中的分布增多, 提示 RhoA 的激活确实可以引起磷酸化 ROCK 的增加和在细胞分布中的变化; 先转染

失活型的 RhoA N19再给予 AGE-HSA 刺激, 可见磷酸化 ROCK在细胞周边的集中分布有部分恢复, 提示抑制 RhoA 的活性减轻了 AGE-HSA 刺激引起的磷酸化 ROCK 分布的变化 (图 3)。

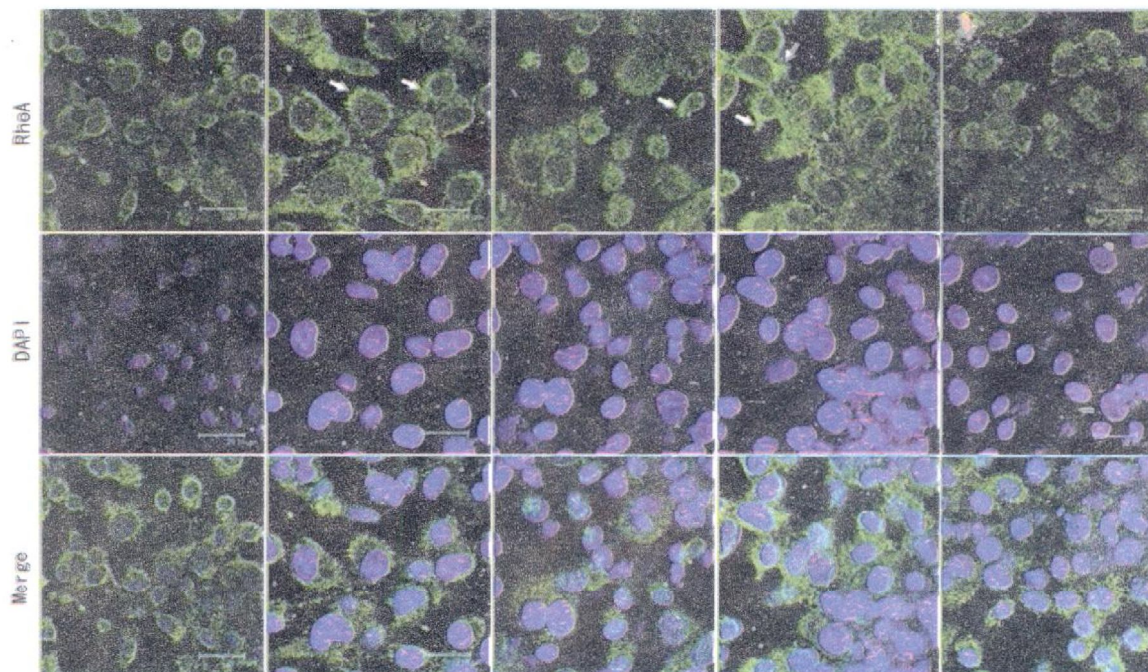


图 1. AGE-HSA 以剂量依赖的方式引起 RhoA 在内皮细胞分布的变化

从左到右依次为 0、25、50、100 mg/L AGE-HSA 组和 100

mg/L HSA 组; 绿色标记为 RhoA, 蓝色为细胞核。

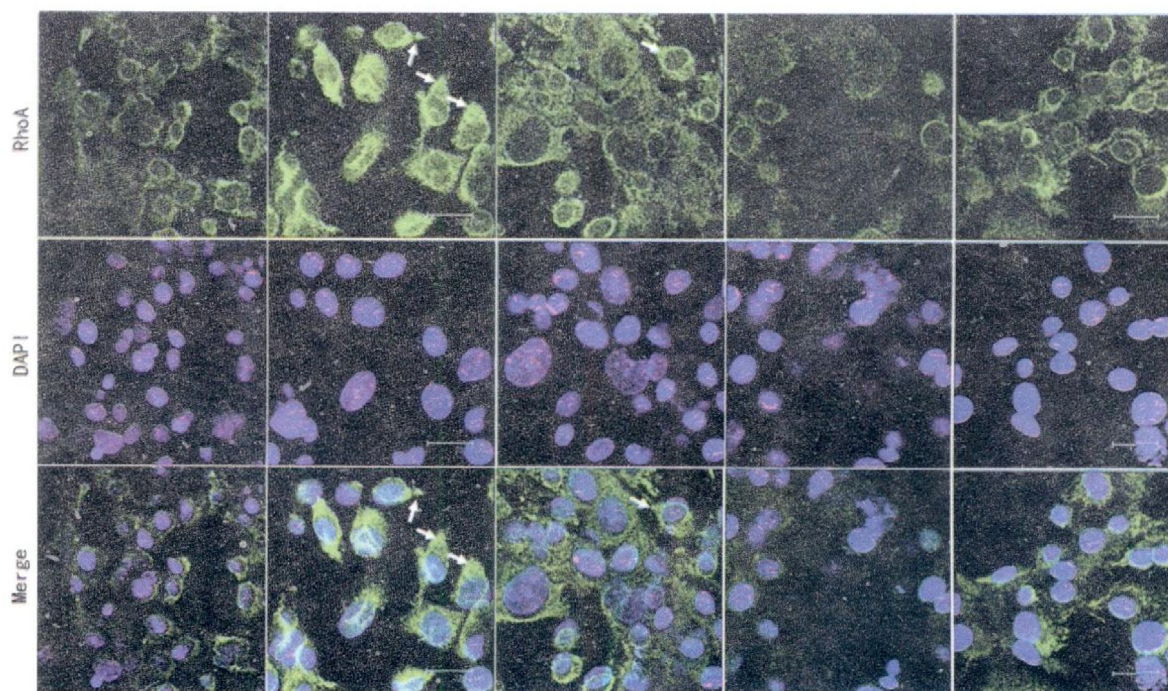


图 2. AGE-HSA 以时间依赖的方式引起 RhoA 在内皮细胞分布的变化

从左到右依次为 AGE-HSA 作用 0、2、4、8 h 组和 HSA 作用

4 h 组; 绿色标记为 RhoA, 蓝色为细胞核。

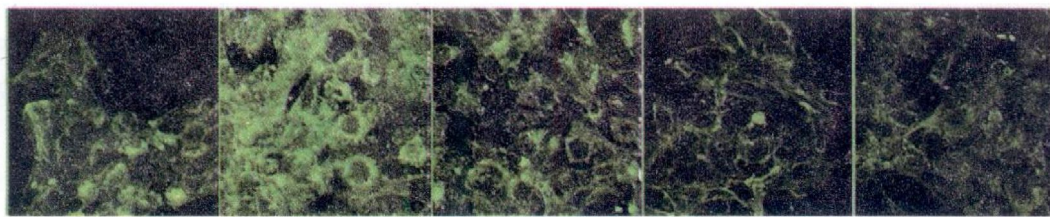


图 3 影响 RhoA 活性对 AGE-HSA 刺激引起的磷酸化 ROCK 在内皮细胞分布的影响 从左至右依次为阴性对照组、AGE-HSA 组、RhoA L63 组、RhoA N19 组和 RhoA N19+ AGE-HSA 组;绿色标记为磷酸化 ROCK。

3 讨论

AGE 在糖尿病晚期并发症的发生及细胞功能障碍的变化过程中发挥至关重要的作用,它可能通过引起血管内皮功能障碍和损伤、增加黏附分子表达、促进血栓形成及诱导内皮细胞表达组织因子等作用促使动脉粥样硬化发生、发展^[1]。本实验室的系列工作证明 AGE 通过活化丝裂原激活的蛋白激酶 p38 (p38 MAPK) 和小 G 蛋白 RhoA 激活的激酶 (RhoA kinase ROCK), 介导膜连接蛋白膜突蛋白 (moesin) 558 位苏氨酸的磷酸化, 从而引起骨架蛋白 F-actin 的重组、内皮细胞收缩、细胞间紧密连接和黏附连接开放, 导致内皮屏障功能障碍和血管通透性升高^[2,3,9]。本文在已证明 AGE 可引起内皮细胞 RhoA 活化和 ROCK 磷酸化激活的前提下^[7], 进一步从形态学角度检测了 RhoA 和磷酸化 ROCK 在内皮细胞分布的变化。

Rho 家族的小 GTP 酶在细胞骨架的分布组成中有非常重要的调节作用, 因此其在细胞中的分布对细胞形态的变化意义重大, 而且在不同的细胞类型, 由于细胞表型特点和收缩功能的差异, Rho 家族的分布可以各不相同^[4]。人们更多地关注其活性的变化, 而对其激活前后在细胞内分布的变化研究较少。本实验室和其他研究者的工作都分别证明了 Rho 家族特别是 RhoA /ROCK 通路在 AGE 和其他刺激条件下内皮细胞形态和功能调节中的作用^[7,10,11], 但对其在内皮细胞的分布变化探究不多。本研究结果显示了 RhoA 在静息 HMVEC 中分布的特点, 与 Michaelson 等^[12]报道的 RhoA 均匀分布在大血管内皮细胞胞浆的结果不同, 静息状态下人的微血管内皮细胞中 RhoA 在胞浆中含量不多, 并在核周形成明显的分布线。这种差异可能反应了大、小血管内皮细胞的异质性和功能特点。给予 AGE 后 RhoA 分布特点的变化, 特别是较集中定位于细胞边缘部位的特点, 符合 RhoA 被刺激激活后介导细胞骨架重组、细胞收缩和运动的功能。

从形态学的角度, 本研究进一步证明了 AGE 刺激通过活化的 RhoA 导致 ROCK 的磷酸化水平增加, 与前期用免疫印迹证明的 AGE 处理后 HMVEC 磷酸化 ROCK 含量明显增加的结果相吻合^[7]。转染活性型或失活型 RhoA 腺病毒后对 ROCK 分布的影响证明此时的 ROCK 磷酸化受 RhoA 活化的影响, 结果进一步验证了 RhoA /ROCK 通路在 AGE 介导的微血管内皮细胞形态和功能变化中的关键作用。

[参考文献]

- [1] Yamagishi S. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications [J]. *Thromb Haemostasis* 2009; **13** (6): 534-539
- [2] 郭晓华, 黄巧冰, 陈波, 等. 晚期糖基化终产物诱导细胞骨架形态学改变机制的研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; **13** (3): 287-289
- [3] 李强, 郭晓华, 朱艳军, 等. 晚期糖基化终产物诱导内皮细胞紧密连接形态学改变机制的研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (6): 499-502
- [4] Yonemura S, Hirao M, Nakuchi K, Nishimura Y. Rho localization in cells and tissues [J]. *Exp Cell Res* 2004; **295** (2): 300-314
- [5] Kurokawa K, Nakamura T, Aoki K, et al. Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells [J]. *Biochem Soc Trans* 2005; **33** (Pt 4): 631-634
- [6] 杨本艳, 王红兵, 杨力, 等. MLCK 和 ROCK 对细胞骨架和细胞行为的影响 [J]. *细胞生物学杂志*, 2009; **31** (4): 469-475
- [7] 王吉萍, 郭晓华, 王陵军, 等. Rho/ROCK 信号通路参与晚期糖基化终产物诱导的人皮肤微血管内皮细胞骨架结构改变 [J]. *生理学报*, 2009; **61** (2): 132-138
- [8] Hou FF, Boyce J, Chertow GM, et al. Aminoguanidine inhibits advanced glycation end products formation on beta2-microglobulin [J]. *J Am Soc Nephrol* 1998; **9** (2): 277-283
- [9] Guo X, Wang L, Chen R, et al. ERM protein moesin is phosphorylated by advanced glycation end products and modulates endothelial permeability [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **297** (1): H238-246
- [10] van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achenar ID, et al. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27** (11): 2332-2339
- [11] Arita R, Hata Y, Nakao S, et al. Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage [J]. *Diabetes* 2009; **58** (1): 215-226
- [12] Michaelson D, Silletti J, Murphy G, et al. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoG-DI binding [J]. *J Cell Biol* 2001; **152** (1): 111-126

(此文编辑 许雪梅)