维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)02-0127-04

Amadori 糖化白蛋白对牛视网膜血管二酯酰甘油——蛋白激酶 C 级联的影响

周 波[1], 汪恕萍[1], 蒋 涛[1], 汤为学[2], 曾昭淳[3]

(1. 重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆 400016;2. 重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016;
3. 重庆医科大学基础医学院生化教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Amadori 糖化血清白蛋白对牛视网膜血管二酯酰甘油(DAG)——蛋白激酶 C(PKC)信号级联的影响及 d-α-生育酚的干预作用。方法:体外制备的 Amadori 糖化的牛血清白蛋白(AGSA)分别在生理浓度葡萄糖(5.5mmol/L)和高浓度葡萄糖(20mmol/L)培养液中作用于新鲜牛视网膜血管。采用薄层层析和放射自显影法测定 DAG 含量和 PKC 活性;并检测 d-α-生育酚预处理后 DAG、PKC 改变。结果:在生理葡萄糖浓度下,牛视网膜血管暴露于 AGSA24h 或 72h 后细胞内 DAG 含量、PKC 活性均较对照组显著增加,当 AGSA 和高葡萄糖同时作用于牛视网膜血管时,DAG-PKC 级联显著激活,分别为正常葡萄糖组的 3.47 倍和 4.54 倍;在正常血清培养液中,与 5.5mmol/L 的葡萄糖相比,20mmol/L 高糖在 24h 时并不刺激 DAG 含量增加($P>0.05$),而 72h 时则较对照组增加 45%,PKC 活性较对照增加 56%,而 d-α-生育酚可逆转上述生化改变。结论:Amadori 糖化血清白蛋白可在生理葡萄糖浓度下刺激 DAG-PKC 途径活化,从而影响血管一系列生理功能,而 d-α-生育酚对血管生化改变有保护作用。

【关键词】糖化血清蛋白;二酯酰甘油;蛋白激酶 C;视网膜血管
【中国图书分类法分类号】R797.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-06-06

The effect of Amadori glycated serum albumin on diacylglycerol-protein kinase C cascade in retinal blood vessels of bovine

ZHOU Bo, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effect of Amadori glycated serum albumin (AGSA) on diacylglycerol-protein kinase C (PKC) cascade in cultured retinal blood vessels of bovine. *Methods*: Glycated serum albumin was prepared by incubating sterile-filtered normal serum albumin for five days at 37℃ with 25mmol/L glucose in phosphated buffered saline(PBS). Albumin incubated for the same period in PBS without glucose was used as control(normal albumin, NA). Diacylglycerol level and PKC activity were determined in blood vessels incubated in media containing 10% nonglycated serum albumin (NSA) or AGSA, ant 5.5mmol/L glucose versus 20mmol/L glucose for 24 or 72 hours with or without 50 mmol/L d-α-tocopherol. *Results*: In blood vessels cultured for 24 hours in 5.5 mmol/L glucose, the relative ratio for diacylglycerol level in vessels supplemented with AGSA compared with the level exposed to NSA was 1.76, and PKC activity in vessels supplemented with AGSA was also higher than the level exposed to NSA. The relative ratio for diacylglycerol level and PKC activity in vessels cultured in 20mmol/L glucose for 72 hours compared with that in vessels cultured in 5.5mmol/L glucose was 2.44, and 2.62 respectively. 20mmol/L glucose also augmented the AGSA induced increase in diacylglycerol level and PKC activity relative to that observed in 5.5mmol/L glucose concentration. (Relative ratio of diacylglycerol level and PKC activity in cell cultured for 72 hours in 20mmol/L glucose supplemented with AGSA versus 5.5mmol/L glucose was 3.47, 4.54 respectively). D-α-tocopherol can prevent activation of diacylglycerol-PKC cascade induced by high glucose and/or AGSA. *Conclusion*: AGSA activate diacylglycerol-PKC pathway by mechanisms that are operative under normoglycemic condition, which may contribute to the development of diabetic retinopathy.

【Key words】 Diacylglycerol; Glycated serum albumin; Protein kinase C; Vessels, Retina

作者介绍:周 波(1968-),男,主治医师,博士,
主要研究方向:糖尿病慢性并发症。

基金项目:重庆市卫生局科研基金(00-2026)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

持续高血糖所致的晚期糖化终产物(Advanced glycation end products ,AGE_s)是导致糖尿病微血管病变的关键介质之一,对 AGE_s 的致病机制已有较深入研究。基于部分细胞和血浆蛋白寿命较短,不能完成糖化产物的缩合、交联,故体内循环中的糖化产物主要是 Amadori 糖化蛋白,即早期糖化产物。晚近研究发现[1]糖尿病患者 Amadori 糖化蛋白水平升高,且与肾脏病变发生、发展密切相关。离体研究表明[2],高葡萄糖预处理视网膜血管细胞可诱导二酯酰甘油(DAG)-蛋白激酶 C (PKC)级联活化,然而糖化血清蛋白是否亦是通过 DAG-PKC 信号通路却不清楚。为此本研究就此进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 Amadori 糖化血清白蛋白的制备

正常胎牛血清白蛋白(BSA)50mg/mL 经过滤除菌与 25mmol/L D-葡萄糖,在磷酸盐缓冲液(PBS)体系中无菌、避光 37℃孵育 5d。以胎牛血清白蛋白与无糖 PBS 孵育为对照,经孵育的血清用 PBS 透析 24h,以去除未结合的葡萄糖,过滤除菌,以荧光分光光度仪(激发波长 363nm,发射波长 440nm),测定荧光强度。结果以任意荧光单位表示(AFU)。最后分装,置低温冰箱内保存备用。

1.2 牛视网膜血管分离、纯化

系参照 Meezan[3]法改良而成。摘除新鲜牛眼,去除眼前节,小心分离视网膜,置入 Earle's 平衡盐缓冲液,碾碎后用 Teflon 手动匀浆器处理 10 次,匀浆放在 90μm 筛网上,用缓冲液反复冲洗。收集筛网剩余物洗脱入离心管内,1000r/min 离心 2min。适量缓部液悬浮沉积物,相差显微镜观察无非血管组织沾染,此即为视网膜微血管。

1.3 实验分组

将牛视网膜血管接种于培养瓶中,培养液由 10%胎牛血清、RPMI1640 、0.05%内皮细胞生长因子(sigma 公司)、0.01%肝素构成。当培养至融合状态后,换成含 10%Amadori 糖化白蛋白/10%非糖化血清和生理浓度葡萄糖 5.5mmol/L 完全培养液,以及含 10%Amadori 糖化蛋白/10%非糖化血清的高糖(20mmol/L)完全培养液,继续培养 24h、72h,以 10%非糖化白蛋白/10%非糖化血清的正常糖浓度为对照。D-α-生育酚干预组于 Amadori 糖化血清白蛋白或高葡萄糖干预前 4h 加入 50mmol/L D-α-生育酚共同孵育。

1.4 细胞内 DAG 的提取和测定[2]

培养结束后,弃去培养液,立即加入预冷的甲醇。然后刮下血管移至试管中,加入等体积氯仿和水,抽提总脂,溶于 2 倍体积的缓冲液中。取 40μl 缓冲液,2μl 100mmol/L DTT,5μgDAG 激酶(Gibco 公司),加水至 90μl,然后加入 10μlr-[^{32}P]ATP(北京亚辉生物医学工程公司)25℃反应 30min,继续磷脂酸抽提:1ml 氯仿:2ml 甲醇于 -20℃ 2h,下层氯仿层用 2ml1%$HCLO_4$ 洗涤,取氯仿层 2ml 在液氮下干燥,再溶解在 100μl 含 5%甲醇(氯仿中)取 20μl 进行硅胶薄层层析,放在 X 线片上干燥显影 48h,再放于液闪仪中计数。单位 nmol/mg 蛋白。

1.5 原位 PKC 活性分析

系改良 Ishii 法[4]。刮下培养细胞与穿细胞缓冲液 37℃孵育 10min。此缓冲液由 50μg/ml 地高辛精(sigma 公司)、137mmol/L NaCl 、5.4mmol/L KCl_2 、10mmol/L $MgCl_2$ 、25mmol/Lβ-磷酸甘油、5.5mmol/L 葡萄糖、5.0mmol/L EGTA 、1mmol/L $CaCl_2$ 、20mmol/L HEPES 、100μmol/L r-[^{32}P]ATP 、100μmol/L 八肽底物(Amersham 公司)。4℃25%三氯乙酸终止反应。离心取上清点于磷酸纤维素滤纸上,直径约为 2.5cm,负压下 75mmol/L 磷酸冲洗 3 次。自然干燥后置入闪烁液中,2h 后于闪烁计数仪上测定由 r-[^{32}P]ATP 转移至八肽底物的^{32}P 放射活性,即单位为 pmolpi/min·mg 蛋白。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非参数 Kruskal-Wallis 检验、Mann-Whitney U 检验行多组间比较,Fisher 或 Tukey 法行方差分析。

2 结 果

2.1 Amadori 糖化白蛋白鉴定

激发波长 363nm,发射波长 440nm,Amadori 糖化血清白蛋白荧光强度为 380AFU,而无葡萄糖 BSA 对照荧光强度为 21AFU,Amadori 糖化血清白蛋白经 SDS-PAGE(3%浓缩胶,5%分离胶)电泳,未发现有降解条带,与 BSA 呈现相同电泳特征。

2.2 Amadori 糖化白蛋白及高糖对牛视网膜血管 DAG 水平的影响

培养 24h,在生理(5.5mmol/L)葡萄糖时,10%的 Amadori 糖化白蛋白可增加牛视网膜血管 DAG 含量,为对照组的 1.76 倍;而当培养 72h,10%糖化白蛋白可刺激牛视网膜血管 DAG 含量改变较对照进一步显著为高($P<0.05$),说明 Amadori 糖化白蛋白诱导的牛视网膜血管 DAG 含量呈迅速反应。当生长在正常血清的培养液中,与 5.5mmol/L 的葡萄糖相比,20mmol/L 高糖在 24h 时并不能刺激 DAG 增加($P>0.05$),而 72h 时而则较对照组增加 45%,说明高糖诱导的牛视网膜血管 DAG 含量

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 Amadori 糖化血清白蛋白和高糖对牛视网膜血管 DAG 含量的影响

葡萄糖(mmol/L)	n	补充物	DAG(nmol/mg 蛋白)	
			24h	72h
5.5	4	NSA	1.06±0.04	1.05±0.06
20	4	NSA	1.04±0.08	1.49±0.23*
5.5	4	AGSA	1.87±0.24*	2.75±0.36*
20	4	AGSA	1.92±0.34*	3.65±0.41*△

NSA:正常血清白蛋白;AGSA:Amadori 糖化血清白蛋白 *:与 NSA5.5mmol/L 培养组比较 $P<0.05$ △:与 NSA20mmol/L 培养组或 AGSA5.5mmol/L 培养组比较 $P<0.05$

表 2 Amadori 糖化血清白蛋白和高糖对牛视网膜血管 PKC 活性的影响

葡萄糖(mmol/L)	n	补充物	PKC[pmolpi/(min·mg 蛋白)]	
			24h	72h
5.5	4	NSA	5.68±0.93	5.72±0.89
20	4	NSA	5.59±1.06	8.77±1.12*
5.5	4	AGSA	8.48±0.96*	15.02±1.36*
20	4	AGSA	8.59±0.98*	25.90±1.17*△

NSA:正常血清白蛋白;AGSA:Amadori 糖化血清白蛋白 *:与 NSA5.5mmol/L 培养组比较 $P<0.05$ △:与 NSA20mmol/L 培养组或 AGBA5.5mmol/L 培养组比较 $P<0.05$

呈延迟反应,当在 20mmol/L 的高糖培养液中,加入 10% Amadori 糖化白蛋白培养 72h,可使高糖环境下 DAG 水平增加更明显,为对照组的 3.47 倍(见表 1)。

2.3 Amadori 糖化白蛋白及高糖对牛视网膜血管原位 PKC 活性的影响

培养 24h,在生理浓度葡萄糖时,10% 的 Amadori 糖化白蛋白可增加牛视网膜血管 PKC 活性,为对照组的 1.50 倍,而培养 72h 时 PKC 活性则显著较对照为高。当 20mmol/L 的高糖培养液中,加入 10% Amadori 糖化白蛋白培养 72h,可使高糖环境下 PKC 活性增加更显著,为对照组 4.54 倍,高糖负荷对牛视网膜血管 PKC 活性如表 2 所示。

2.4 D-α-生育酚对 Amadori 糖化白蛋白和高糖诱导的 DAG 含量、PKC 活性的影响

Amadori 糖化白蛋白、高糖干预前 4h,预先加入 50mmol/L d-α-生育酚孵育,然后用相同浓度的 Amadori 糖化白蛋白、高糖刺激牛视网膜血管,结果显示在生理浓度葡萄糖暴露于 10% Amadori 糖化白蛋白时,DAG 含量由 d-α-生育酚未处理组的 2.67±0.24mmol/mg 蛋白下降为 d-α-生育酚处理组的 1.23±0.15nmol/mg 蛋白($P<0.05$),而 PKC 活性则由未处理组的 25.90±1.17pmolpi/(min·mg 蛋白)降低为 6.20±0.78pmolpi/(min·mg 蛋白);而当给予高糖(20mmol/L)负荷时,结果如表 3 所示。以上结果提示 d-α-生育酚可阻断 Amadori 糖化白蛋白和/或高糖引起的 DAG、PKC 变化。

3 讨 论

国外学者[5]观察到在 db/db 2 型糖尿病小鼠中,采用 Amadori 糖化白蛋白中和抗体,可显著改善视网膜和肾脏血流动力学效应,故阻断早期糖化产物的形成及效应可能为糖尿病视网膜病变防治带来新希望。早期糖化产物是葡萄糖与蛋白质等大分子物质形成的不稳定化合物,称"schiff"碱,经 Amadori 重排形成的产物,后者是一种较稳定的化合物,又称 Amadori 糖化产物。本研究在体外经高葡萄糖与牛血清白蛋白孵育成功获取高浓度的糖化白蛋白,此支持 Cohen 等[5]认为糖尿病状态下,Amadori 糖化白蛋白明显升高的观点。

本文观察了 Amadori 糖化白蛋白对牛视网膜血管信号转导的影响。DAG 是细胞内重要的信息脂质,本文在充分透析除外葡萄糖因素下,发现 Amadori 糖化白蛋白处理的视网膜血管 DAG 含量显著增加,且随时间延长而进一步增高,此与国外学者在系膜细胞中的结果相一致[6]。目前已知 DAG 即可来源于磷酸肌醇酯(IP)的转化和磷脂酰胆碱(PC)的裂解,亦可从葡萄糖中间代谢产物从头合成。本文高葡萄糖引起的 DAG 升高是缓慢的,至少在 24h 以后,^{3}H 葡萄糖标记细胞研究[2]证实高糖能通过葡萄糖代谢中间产物增加,从头合成 DAG 增多,与之不同,Amadori 糖化白蛋白引起的 DAG 升高是迅速的,故推测 Amadori 引起的 DAG 升高系由 IP 或 PC 转化所致,但 DAG 含量持续升高的机

维普资讯 http://www.cqvip.com

制尚需进一步研究。

表 3 d－α－生育酚对 Amadori 糖化白蛋白和高糖诱导的 DAG 含量、PKC 活性的影响

葡萄糖(mmol/L)	n	预处理物	补充物	DAG	PKC
				nmol/mg 蛋白	pmol pi/min·mg 蛋白
5.5	4	/	AGSA	2.67±0.24	15.09±1.17
5.5	4	DT	AGSA	1.23±0.15*	6.20±0.78*
20	4	/	AGSA	3.56±0.47*	25.96±1.12
20	4	DT	AGSA	1.15±0.14*	6.11±0.96*

DT:d－α－生育酚;AGSA:Amadori 糖化血清白蛋白蛋白 *:与无 d－α－生育酚预处理组比较 $P<0.05$

PKC 是一组丝、苏氨酸激酶的总称,可与 DAG 结合而发生从胞浆至胞膜的移位激活,本文结果显示早期糖化产物可引起视网膜血管 PKC 活性显著增加,且可为 d－α－生育酚所阻断。本文同时发现用 d－α－生育酚预培养的视网膜血管,然后给予 Amadori 糖化白蛋白干预,结果发现其 DAG 含量明显减少,此与 Tran 等[7]在人脐静脉内皮细胞的发现相似,进一步研究表明[8]d－α－生育酚可激活 DAG 激酶,此酶可分解 DAG 为磷酯,进而降低 PKC 活性,至于此效应是否与 d－α－生育酚的抗氧化作用有关尚存争议。

值得注意的是,高糖本身可以促使 DAG－PKC 级联活化[2]。本实验结果与之一致。我们还发现在 Amadori 糖化白蛋白加入高葡萄糖时,细胞 DAG 含量、PKC 活性进一步显著升高。此不仅提示 Amadori 糖化白蛋白与高糖对 DAG－PKC 通路有协同刺激作用,也说明持续高血糖不仅通过高糖本身以及其延迟的机制一形成 Amadori 糖化白蛋白参与糖尿病视网膜病变的发生与发展。虽然高糖是 Amadori 糖化白蛋白形成的先决条件,但 Amadori 糖化白蛋白对视网膜血管 DAG－PKC 通路的活化并不依赖高糖环境,因此体内血糖即使恢复正常,循环中高浓度的糖化白蛋白仍可在其半寿期内持续作用于 DAG－PKC 通路发挥病理作用,这一发现或许部分解释了糖尿病控制与并发症试验报告即使血糖严格控制,糖尿病视网膜病变在一定时间内仍持续进展。

参 考 文 献

[1] Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN. Amadori－glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections [J]. Kidney Int, 2000; 58(77): S40－S44.

[2] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman IR, et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation [J]. Am J physiol, 1993; 86(63): 785－793.

[3] Meezan E, Brendel K, Clarlson EC. Isolation of a purified preparation of metabolically active retinal blood vessels [J]. Nature, 1974; 251: 65－67.

[4] Ishii H, Jirousek MR, Kaya D, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rat by an oral PKC β inhibitor [J]. Science, 1996; 272: 708－731.

[5] Cohen MP, Clements RS, Cohen JA. Prevention with glycated albumin antagonists a novel treatment strategy [J] J Clin Invest, 1995; 95: 2338－2345.

[6] Cohen MP, Ziyadeh FN, Lautenslager GT, et al. Glycated albumin stimulation of PKC β activity is linked to increased collagen IV in mesangial cell[J]. Am J Physiol, 1999; 276: F684－F690.

[7] Tran K, Proulx PR, Chan AC, et al. Vitamin E suppress diacylglycerol level in thrombin－stimulated endothelial cells through an increase of DAG kinase assay [J]. Biochem Biophys Acta, 1994; 1212: 193－202.

[8] Koya D, Lee IK, Ishil H, et al. Prevention of protein kinase C inhibition in diabetic rats by treatment with d－α－tocopherol [J]. J Am Soc Nephrol, 1997; 8: 426－435.