

糖基化终末产物诱导心肌细胞老化的机制

李世玲¹, 郭聪娴¹, 王俊宏¹, 郭妍^{1,2*}

(¹南京医科大学第一附属医院老年心血管科, 江苏 南京 210029; ²江苏盛泽医院心血管科, 江苏 苏州 215228)

[摘要] 目的:研究糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)诱导心肌细胞老化的机制。方法:AGEs、抗 AGE 受体(RAGE)抗体干预乳鼠心肌细胞 48 h。通过 Western blot 和 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色分别检测老化相关蛋白 p53、p16 的表达及 SA- β -Gal 活性; 采用 JC-1、DCFH-DA 分别测定线粒体膜电位、细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS); 通过 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin1。结果:AGEs 干预细胞 48 h 后与对照组相比,AGEs 组 SA- β -Gal 活性明显增高, p53、p16 的表达量明显增加($P < 0.01$), 同时伴随线粒体膜电位的降低($P < 0.01$)及细胞内 ROS 水平增加($P < 0.01$), LC3 与 Beclin1 表达量明显增加(P 均 < 0.01); 给予抗 RAGE 抗体干预后与 AGEs 组相比, SA- β -Gal 活性降低, p53、p16 的表达量明显降低($P < 0.01$), 线粒体膜电位增高($P < 0.01$), 细胞内 ROS 减少($P < 0.01$), LC3 与 Beclin1 表达量降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论:AGEs 与其受体 RAGE 作用可能通过氧化应激及线粒体损伤与自噬诱导心肌细胞老化。

[关键词] 糖基化终末产物; 糖基化终末产物受体; 心肌细胞老化; 线粒体; 氧化应激; 自噬

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1066-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20150804

Mechanisms of advanced glycation end products induced cardiomyocytes aging

Li Shiling¹, Guo Congxian¹, Wang Junhong¹, Guo Yan^{1,2*}

(¹Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Cardiology, Shengze Hospital of Jiangsu Province, Suzhou 215228, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanisms of cardiomyocytes aging induced by advanced glycation end products. **Methods:** Neonatal rat cardiac myocytes were cultured with AGEs, anti-RAGE antibody for 48 h. Senescence-associated beta galactosidase (SA- β -Gal) activity was observed via SA- β -Gal assay in neonatal rat cardiomyocytes. p53, p16, LC3 and Beclin1 were measured by Western blot. We observed mitochondrial membrane potential and the generation of reactive oxygen species (ROS) by JC-1 and DCFH-DA methods. **Results:** After intervention for 48 h with AGEs, SA- β -Gal activity and the expression of p53 ($P < 0.01$), p16 ($P < 0.01$), LC3 ($P < 0.01$) and Beclin1 ($P < 0.01$) were significantly increased in the AGEs group compared to that of the control group, accompanied by the significantly decrease of mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$) and remarkably increase of ROS ($P < 0.01$). After treated with anti-RAGE antibody, SA- β -Gal activity and the level of p53 ($P < 0.01$), p16 ($P < 0.01$), LC3 ($P < 0.05$) and Beclin1 ($P < 0.01$) were remarkably decreased compared with the AGEs group. However, inhibition of RAGE with anti-RAGE antibody remarkably increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$) and significantly decreased ROS compared with AGEs group ($P < 0.01$). **Conclusion:** AGEs-RAGE may induce aging of cardiomyocytes by mitochondrial damage, the generation of ROS and autophagy.

[Key words] AGEs; RAGE; cardiomyocytes aging; mitochondrial; oxidation stress; autophagy

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1066-1071]

[基金项目] 江苏省科技厅自然科学基金 (BK2011382); 江苏省“六大人才高峰”(2011WSN-029); 江苏省卫生厅科技项目 (Z201301)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: guoyan51@hotmail.com

非酶促条件下,还原糖与蛋白质、核酸及脂类等大分子物质的氨基发生反应生成早期不稳定的 Amadori 产物,后经过复杂反应如重排、脱水和浓缩,变为不可逆衍生物,即糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)^[1]。在正常老化的过程中有 AGEs 形成和积累,而与老化相关的慢性疾病(如心血管疾病、肾脏疾病等)也随之增加。研究表明,ROS 可能是 AGEs 与其受体 RAGE 相互作用引起老化与自噬的重要物质。本课题组前期动物实验也证明,无论自然衰老还是 D-半乳糖衰老模型,心肌内都会出现 AGEs 含量增加、粒体超微结构的改变(如线粒体肿胀、线粒体嵴减少等)及自噬泡形成^[2]。但目前 AGEs 对线粒体损伤的机制尚不明确,本实验的目的是研究 AGEs 诱导心肌细胞老化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

出生 1~3 d SD 乳大鼠(南京医科大学实验动物中心);II 型胶原酶(Biosharp 公司,美国);DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国);AGEs (121800,Calbiochem 公司,美国);抗 RAGE 抗体(AF1616,R&D 公司,美国);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒(DCFH-DA)、 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色试剂盒(上海碧云天公司);p16、p53 (Santa Cruz 公司,美国);LC3、Beclin1(CST 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞的分离及培养

无菌条件下,开胸取出 SD 乳大鼠的心脏,立即放入预冷的 PBS 中剪取心室肌,PBS 冲洗 3 遍,剪碎,加入 0.1% II 型胶原酶于恒温摇床上消化(37℃ 200 r/min),每 5~7 min 收集消化悬液,直至组织块消化完全,加入 1~2 mL 胎牛血清终止消化。过滤消化悬液,离心 10 min (4℃ 1 000 r/min)所得的细胞加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,制成细胞悬液,接种于 10 cm 的培养皿,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱 2 h。利用差速贴壁的方法,即成纤维细胞贴壁速度快于心肌细胞,成纤维细胞贴壁后收集未贴壁的悬浮液,均匀接种于 6 孔培养皿,培养 48 h,获得原代心肌细胞。

1.2.2 实验分组和干预

将培养 48 h 后的原代心肌细胞分为 3 组:未给予任何处理的对照组;AGEs 组 (100 μ g/mL)^[3];抗 RAGE 抗体组 (1 μ g/mL 抗 RAGE 抗体处理细

胞 2 h 后,再加入 100 μ g/mL AGEs),每个组均处理 48 h。不同浓度的 AGEs(0、50、100、200 μ g/mL)处理细胞 48 h,检测不同浓度 AGEs 对自噬相关蛋白表达的影响。每个实验指标重复 3 次。

1.2.3 线粒体膜电位的测定

JC-1 是广泛用于检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的一种理想的荧光探针。线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物(最大激发波长为 585 nm,最大发射波长为 590 nm),产生红色荧光;线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,JC-1 为单体(最大激发波长为 514 nm,最大发射波长为 529 nm),产生绿色荧光。通过荧光颜色的转变检测线粒体膜电位的变化。6 孔板的每个孔加入 1 mL 的 JC-1 染色工作液,充分混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min 后,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液冲洗 2 次。加入 2 mL 细胞培养液,在荧光显微镜下观察,Image J 测定荧光强度。

1.2.4 ROS 的测定

细胞内的 ROS 可以利用荧光探针 DCFH-DA 进行检测。DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能透过细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。去除细胞培养液,加入 1 mL DCFH-DA 稀释液(10 μ mol/mL),于细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 min 后,用无血清的培养基洗 3 遍,于荧光显微镜下观察,Image J 测定荧光强度。

1.2.5 Western blot 检测心肌细胞老化与自噬相关蛋白

30 μ g/孔蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,转移至 PVDF 膜,用 5%的脱脂奶粉封闭 2 h,一抗封闭,于 4℃ 过夜,二抗封闭 2 h。加入 ECL 化学发光试剂,显示目的蛋白。

1.2.6 SA- β -Gal 活性的测定

SA- β -Gal 染色检测细胞衰老时 SA- β -Gal 活性。AGEs 干预 6 孔板中的心肌细胞 48 h,吸除细胞培养液后,每孔加入 1 mL SA- β -Gal 染色固定液,室温 15 min。吸除细胞固定液,PBS 洗 3 遍。吸除 PBS,每孔加入 1 mL 染色工作液,37℃ 孵育过夜,普通显微镜观察。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 软件分析处理数据,组间比较采用单因素方差分析

(one-way ANOVA),两两比较采用LSD法。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AGEs对心肌细胞老化的影响

Western blot 分别检测各组老化相关蛋白 p53、p16 表达,对照组为 0.386 ± 0.047 (p53)、 0.293 ± 0.027 (p16),AGEs 组为 0.577 ± 0.063 (p53)、 0.479 ± 0.054 (p16),抗 RAGE 抗体组为 0.361 ± 0.100 (p53)、 0.246 ± 0.049 (p16)。与对照组比较,AGEs 组 p53、p16 蛋白表达量明显增加 (P 均 $< 0.01, n=3$; 图 1A),SA-β-Gal 活性明显升高 (图 1B); 与 AGEs 组比较,抗 RAGE 抗体组 p53、p16 蛋白表达量降低(P 均 $< 0.01, n=3$;图 1A),SA-β-Gal 活性明显降低(图 1B)。

2.2 AGEs对心肌细胞线粒体膜电位变化的影响

JC-1 法检测线粒体膜电位,荧光图见图 2。聚合物与单体比值代表线粒体膜电位的变化,对照组聚合物与单体比值为 3.913 ± 0.785 ,AGE 组为 1.266 ± 0.593 ,抗 RAGE 抗体组为 3.659 ± 0.387 。与对照组比较,AGEs 组线粒体膜电位降低($P < 0.01, n=3$); 与 AGEs 组比较,抗 RAGE 抗体组线粒体膜电位升高($P < 0.01, n=3$)。

2.3 AGEs对ROS变化的影响

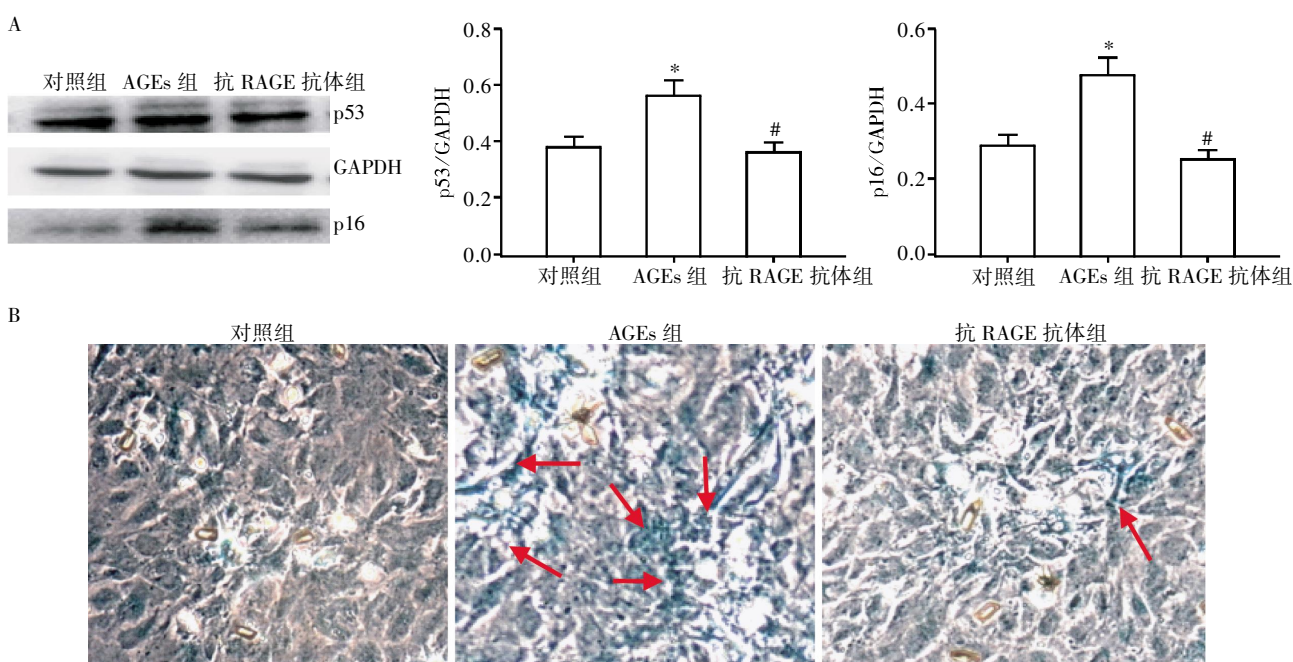
DCFH-DA 检测 ROS,对照组荧光值为 $0.226 \pm$

0.085 ,AGEs 组荧光值为 0.550 ± 0.047 , 抗 RAGE 抗体组荧光值为 0.212 ± 0.092 。与对照组比较,AGEs 组 ROS 明显增加 ($P < 0.01, n=3$, 图 3); 与 AGEs 组比较,抗 RAGE 抗体组 ROS 明显减少($P < 0.01, n=3$,图 3)。

2.4 AGEs对心肌细胞自噬的影响

Western blot 检测自噬相关蛋白表达,LC3 是自噬标志物,自噬形成时,胞浆型 LC3(即 LC3 I)转变为膜型(即 LC3 II),LC3 II/LC3 I 比值的大小可估计自噬水平的高低。随着 AGEs 浓度递增,自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 表达分别为 1.151 ± 0.056 ($0 \mu\text{g/mL}$)、 1.164 ± 0.240 ($50 \mu\text{g/mL}$)、 1.913 ± 0.202 ($100 \mu\text{g/mL}$)、 3.613 ± 0.776 ($200 \mu\text{g/mL}$),与 $0 \mu\text{g/mL}$ AGEs 组比较, $100 \mu\text{g/mL}$ AGEs 组和 $200 \mu\text{g/mL}$ AGEs 组 LC3 II/LC3 I 表达明显增加 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01, n=3$,图 4A)。AGEs 对心肌细胞 LC3 II/LC3 I 表达表现为浓度依赖效应。

对照组 LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达量分别为 0.734 ± 0.102 、 0.736 ± 0.233 ,AGEs 组 ($100 \mu\text{g/mL}$) LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达量分别为 1.762 ± 0.322 、 1.286 ± 0.898 ,抗 RAGE 抗体组 LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达量分别为 1.266 ± 0.201 、 0.743 ± 0.267 。与对照组比较,AGEs 组 LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达量明显增加(P 均 $< 0.01, n=3$,图 4B); 与 AGEs



A:p16、p53 蛋白表达量,与对照组比较,* $P < 0.01$; 与 AGEs 组比较,* $P < 0.01$ ($n=3$)。B:SA-β-Gal 染色($\times 100$),SA-β-Gal 阳性细胞呈蓝色,如红色箭头所示。

图 1 AGEs 对心肌细胞老化的影响
Figure 1 The influence of AGEs on myocardial cell aging

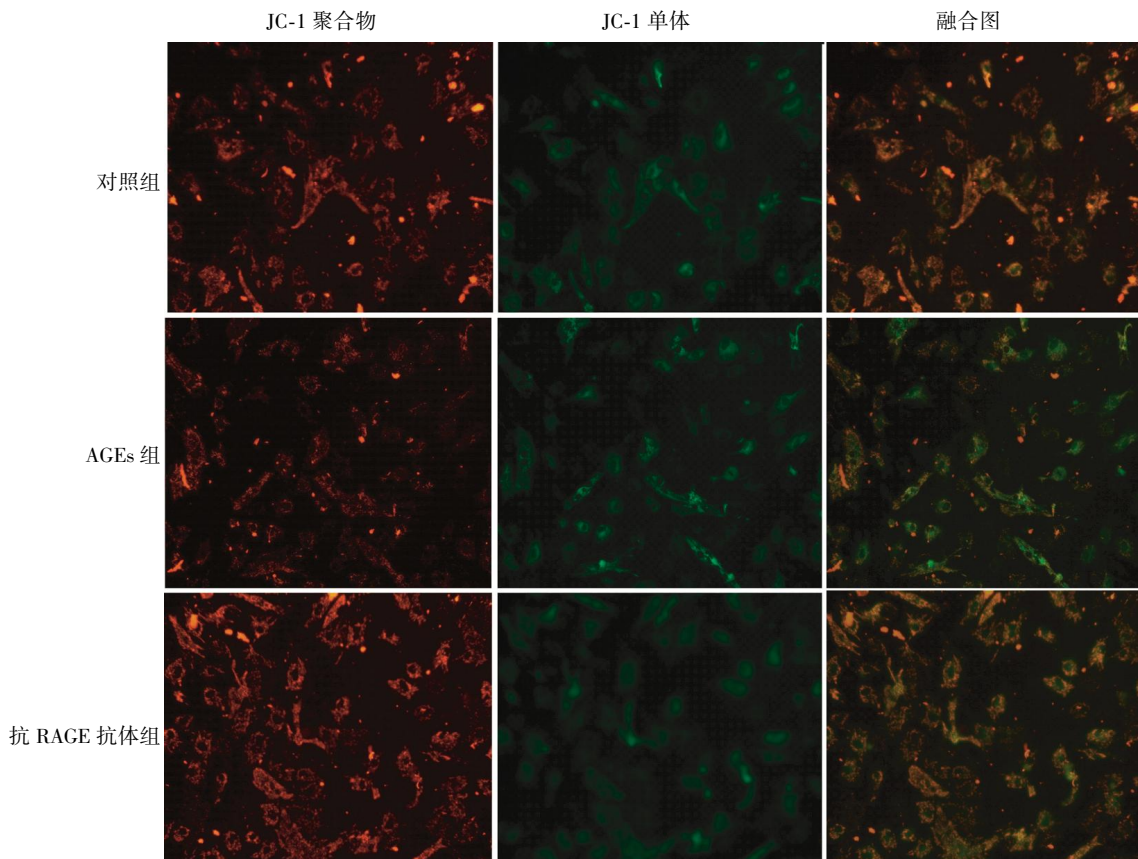
组比较, 抗 RAGE 抗体组 LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达量显著降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$, $n=3$, 图 4B)。

3 讨论

非酶促条件下, 还原糖如葡萄糖的羧基与蛋白质或脂质等的氨基形成可逆 Amadori 产物, 后经重排、脱水及浓缩等反应生成不可逆的 AGEs。衰老、高血糖、氧化应激等因素刺激可促进 AGEs 形成^[4]。AGEs 既可以通过直接作用, 又可以通过受体依赖

途径(AGEs-RAGE)促进疾病的发生与发展。大量研究表明, 老化与 AGEs 增加密切相关^[5]。

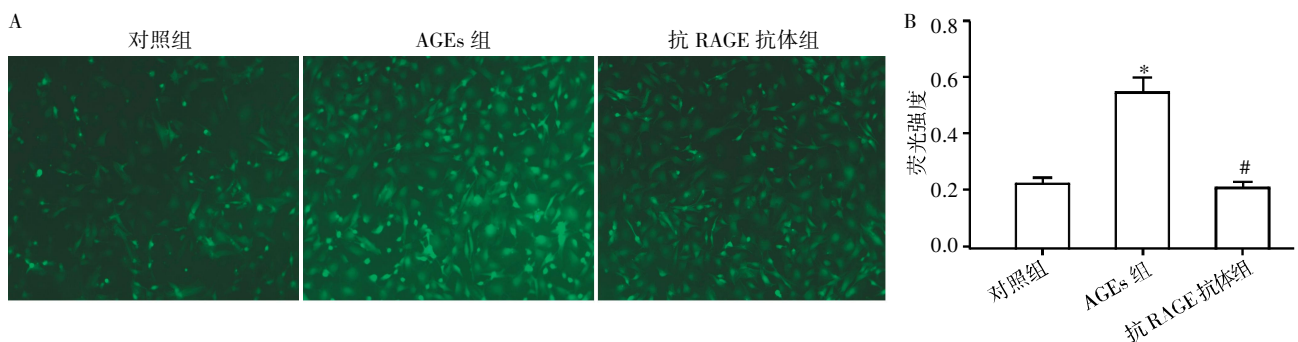
p16 被认为是老化的标志, 其通过抑制细胞周期激酶(Cdk4)活性使 G_1 细胞周期停滞^[6]。研究表明 p53 增加与细胞增殖抑制密切相关, 因此 p53 也是老化的标志^[7]。SA- β -Gal 是细胞老化过程中最常用的生物标志物。老化与心室、血管硬化, 舒张期功能障碍及心力衰竭密切相关。组织中 AGEs 增加与舒张期功能障碍及心力衰竭密切相关^[8]。ALT-711



JC-1 荧光图, 红色荧光代表线粒体聚合物, 绿色荧光代表线粒体单体。

图 2 JC-1 测定线粒体膜电位($\times 100$)

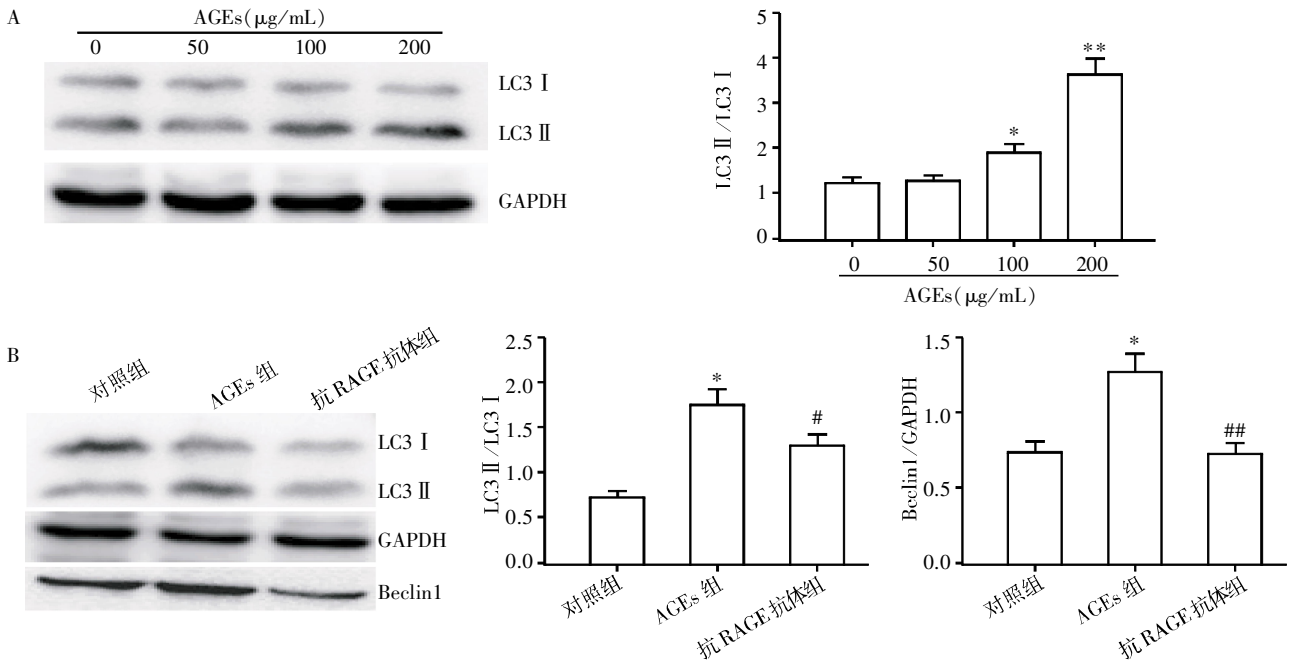
Figure 2 The measurement of mitochondrial membrane potential by JC-1($\times 100$)



A: 心肌细胞内 ROS 的荧光图($\times 100$); B: 绿色荧光强度代表心肌细胞内 ROS 变化。与对照组比较, $*P < 0.01$; 与 AGEs 组比较, $\#P < 0.01$ ($n=3$)。

图 3 DCFH-DA 测定心肌细胞内 ROS

Figure 3 The measurement of ROS in cardiomyocytes by DCFH-DA



A: AGEs(0, 50, 100, 200 µg/mL) 处理细胞 48 h, AGEs 增加心肌细胞 LC3 II/I 表达量表现为浓度依赖效应。与 AGEs 0 µg/mL 比较, *P < 0.05, **P < 0.01(n=3)。B: LC3、Beclin1 表达量。与对照组比较, *P < 0.01; 与 AGEs 组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01(n=3)。

图 4 Western blot 测定心肌细胞自噬相关蛋白 LC3、beclin1

Figure 4 The expression of LC3 and beclin1 by western blot in cardiomyocytes

(AGEs 裂解剂) 可以改善左心室舒张期功能障碍^[2]。AGEs-RAGE 通路 与肾小管上皮细胞的老化密切相关^[9]。研究表明,自然老化心肌组织出现 AGEs 含量增加。D-半乳糖诱导心肌细胞老化的过程中伴随 AGEs 形成^[10]。因此,本研究想证实 AGEs 能否引起心肌细胞老化。而实验结果表明 AGEs 增加乳鼠心肌细胞老化相关蛋白的表达(p16、p53)和 SA-β-Gal 活性。加入抗 RAGE 抗体改善 AGEs 引起的心肌细胞老化。由此可知,AGEs 通过 RAGE 引起心肌细胞的老化,但确切作用机制尚不明确。

近年来,自由基学说与老化的关系引起人们的关注。研究表明 AGEs 与 RAGE 相互作用激活核因子(NF)-κB 诱导氧化应激^[11]。氧化应激是氧化系统与抗氧化系统失衡,它通过对不同大分子物质(脂质、蛋白质、DNA 等)氧化修饰促进老化^[12]。本实验也证实 AGEs 能增加 ROS, 抗 RAGE 抗体减少 AGEs 引起的 ROS 增加, 表明 AGEs-RAGE 相互作用可能通过产生 ROS 促进细胞老化。

线粒体作为 ROS 的主要来源, 当线粒体暴露于高浓度 ROS 时, ROS 引起的氧化应激又损伤线粒体, 产生更多 ROS, 形成恶性循环。本课题组前期动物实验表明, 老化过程中线粒体结构改变(如线粒体肿胀、线粒体嵴减少等)^[2]。本实验通过 JC-1 测定心肌细胞老化过程中线粒体膜电位发生改变。

与对照组比较, AGEs 组线粒体膜电位降低; 与 AGEs 组比较, 抗 RAGE 抗体组线粒体膜电位升高。研究表明线粒体膜电位改变与细胞老化密切相关^[13]。AGEs 引起人脐静脉内皮细胞线粒体膜电位降低^[14]。本结果表明 AGEs-RAGE 可能通过改变线粒体膜电位引起心肌细胞老化。

自噬是将细胞内需要降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解囊泡中的内容物, 以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新^[15]。但是, 自噬的过度激活将导致细胞死亡。大多数组织中, 自噬处于基础水平; 在缺氧、氧化应激等条件下, 自噬上调^[16]。自噬发生时, LC3 I 型经泛素化与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3 II 型。LC3 II 型被认为是自噬的标志分子, LC3 II/LC3 I 的比值与自噬强度呈正比。Beclin1 是调节自噬现象的关键蛋白质, 是启动自噬过程的标志。抑制自噬可以缩短果蝇寿命, 因此自噬被看作长寿的决定因素。但是, 自噬与老化的关系是复杂的。研究表明自噬在 ROS 引起的细胞损伤过程中起着重要的防御作用。ROS 积累可以引起线粒体功能障碍, 而线粒体功能障碍诱导自噬, 可以延迟老化^[17]。而本实验结果表明, AGEs 引起细胞老化时自噬增强; 加入抗 RAGE 抗体后, 老化改善同时自噬减弱, 因此推测 AGEs-RAGE 可能引起自噬过度导致心肌细胞

老化。

综上所述,AEGs 与 RAGE 相互作用可能引起 ROS 增多,导致氧化应激并损伤线粒体及增强自噬以致心肌细胞老化。因此,可以通过 AGEs-RAGE 轴对抗老化以治疗与其相关的疾病如心血管、肾脏疾病等。

[参考文献]

- [1] Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(9):963-975
- [2] Guo Y, Lu M, Qian J, et al. Alagebrium chloride protects the heart against oxidative stress in aging rats [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64(6):629-635
- [3] Park CH, Kim JW. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular mesh work cells [J]. *Korean J Ophthalmol*, 2012, 26(2):123-131
- [4] Takahashi HK, Mori S, Wake H, et al. Advanced glycation end products subspecies selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(1):89-98
- [5] Glenn JV, Stitt AW. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(10):1109-1116
- [6] Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. Basic science review: statin therapy-Part I: the pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2010, 44(1):241-251
- [7] Coppe JP, Rodier F, Patil CK, et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16 (INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42):36396-36403
- [8] Willemsen S, Hartog JW, Hummel YM, et al. Tissue advanced glycation end products are associated with diastolic function and aerobic exercise capacity in diabetic heart failure patients [J]. *Eur J Heart Fail*, 2011, 13(1):76-82
- [9] Liu J, Huang K, Cai GY, et al. Receptor for advanced glycation endproducts promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1):110-121
- [10] Liu J, Wang JH, Chen XJ, et al. Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012:418748
- [11] Choi KM, Yoo HJ, Kim HY, et al. Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 132(1):96-101
- [12] Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Mol Cell*, 2012, 48(2):158-167
- [13] Zhu SY, Dong Y, Tu J, et al. Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(Suppl1):S92-S99
- [14] Zhou YJ, Yang HW, Wang XG, et al. Hepatocyte growth factor prevents advanced glycation end products-induced injury and oxidative stress through a PI3K/Akt-dependent pathway in human endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2009, 85(19-20):670-677
- [15] Hamasaki M, Yoshimori T. Where do they come from? Insights into autophagosome formation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(7):1296-1301
- [16] Kongara S, Karantza V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis [J]. *Front Oncol*, 2012, 2:171
- [17] Jia K, Levine B. Autophagy and longevity: lessons from *C. elegans* [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 694:47-60

[收稿日期] 2014-09-13