

功能蛋白的O-糖基化和p38磷酸化共同参与调控单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭

杨火梅¹ 于超² 杨竹^{1*}

(¹重庆医科大学第二附属医院妇产科, 重庆 400010; ²重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 探讨单核细胞在炎症因子刺激下通过功能蛋白O-糖基化和p38 MAPK磷酸化、调控其对血管内皮的粘附和侵袭的分子机制。将IFN- γ 与LPS体外共刺激后的THP-1细胞加至单层血管内皮细胞EA.hy926共培养, 观察单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭; 并通过测量电阻变化来反应血管内皮通透性的改变。采用Western blot方法检测单核细胞THP-1中p38 MAPK磷酸化的变化, O-GlcNAc糖基转移酶(OGT)和O-GlcNAc糖基化蛋白表达量的变化。分析验证p38 MAPK抑制剂对IFN- γ 与LPS诱导的单核细胞对血管内皮粘附和迁移的影响, 同时检测OGT、O-GlcNAc糖基化蛋白差异表达的影响。结果显示, IFN- γ 与LPS可以共作用促进THP-1对血管内皮的粘附和侵袭, 降低血管内皮通透性。同时激活p38 MAPK, 此过程与OGT及O-GlcNAc糖基化蛋白表达降低相关。采用p38抑制剂预处理, 可逆转上述IFN- γ 与LPS诱导的生物学变化。综上, 在炎症反应中, 单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭力的变化受功能蛋白糖基化和磷酸化的双向调控。

关键词 O-GlcNAc糖基转移酶; O-GlcNAc糖基化; p38; THP-1; EA.hy926; 磷酸化

单核细胞是一种具有吞噬和释放多种细胞因子功能的免疫细胞和炎症细胞, 广泛参与各种免疫性和炎症性疾病的发生发展^[1]。其中, 在炎症反应发生时, 单核细胞向血管边缘游离, 在血管内皮上滚动, 随后启动一系列单核-血管内皮相互作用的生物学行为, 包括粘附, 穿透血管内皮, 并向炎症损伤局部趋化性聚集, 从而开始发挥单核细胞的抗炎和加重炎症损伤的生物学功能^[2]。

目前, 对单核细胞-血管内皮相互作用的机制已有比较深入的认识, 但是其发生发展的具体分子机制还有待进一步深入研究。研究表明, O-GlcNAc糖基化修饰广泛参与心血管系统损伤和功能失调的调控^[3-6], 但在不同类型的疾病和损伤中, O-GlcNAc糖基化修饰发生水平和功能各不相同, 具体作用机制各异^[7]。已有研究表明, 在血管炎症发生时, 增加O-GlcNAc糖基化水平可以减少血管内皮表达VCAM-1、ICAM-1及各种炎性趋化因子^[8-9, 21], 从而减少白细胞渗出。那么, 在炎症趋化性因子所诱导的炎症反应发生时, 单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭能力明显增强, 是否也与单核细胞内功能蛋白O-GlcNAc糖基化水平改变有关呢?

O-GlcNAc糖基化由O-GlcNAc糖基转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)特异性催化合成^[3], 将GlcNAc通过O-糖苷键连接到蛋白质的丝氨酸/苏氨酸羟基上, 正好与磷酸化修饰位点相同^[10-12]。以往研究显示, 在细胞内蛋白翻译后修饰方式中, O-GlcNAc糖基化与磷酸化之间并不是简单的相互竞争关系, 即所谓简单的“阴-阳学说”。在不同的情况下, O-GlcNAc糖基化和磷酸化既可能相互协同亦可能相互抑制^[12-14]。血管炎症反应发生时, p38 MAPK信号通路广泛参与调控^[15-17]。那么, 在炎症趋化因子诱导的单核细胞炎症反应中, 细胞内功能蛋白O-GlcNAc糖基化与p38 MAPK磷酸化之间如何参与调控其生物学功能成为了我们关注的焦点。本课题主要针对上述两个问题探讨了炎症反应中, O-糖基化与磷酸化共同参与单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭的这一生物学功能发挥的可能分子机制, 为临床上相关疾病抗炎治疗新靶点的发现提供实验依据。

收稿日期: 2011-10-01 接受日期: 2011-12-20

国家自然科学基金(No.81070222)和重庆市自然科学基金(No.CSTC2009BA5083)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485589, E-mail: cqyangz@vip.163.com

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司, 内皮细胞生长因子HAT购自Sigma公司, 重组人源干扰素 γ (IFN- γ)购自PeproTech公司, p38 MAPK抑制剂(SB203580)购自Invitrogen公司, 蛋白提取裂解液和兔源抗 β -actin抗体购自CST公司, 鼠源抗-OGT、鼠源抗-O-GlcNAc(CTD110.6克隆)、兔源抗总p38(T-p38)、兔源抗磷酸化p38(p-p38)等抗体购自Santa Cruz公司, 二抗辣根酶标记山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgM购自北京中衫金桥生物有限公司, ECL化学发光液和ERS-2电阻仪购买自Millipore公司, BCECF-AM染液购自碧云天生物有限公司, 96孔板、24孔板及8 μ m孔径(直径6 mm)不带基质胶的transwell小室均购自Costar公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人源单核细胞株THP-1购自美国模式培养物集存库(ATCC), 用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基(含 10^5 U/L青霉素, 10^5 U/L链霉素)于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度培养箱内培养。血管内皮细胞株EA.hy926为华西医科大学附属第一医院内科研究所惠赠, 培养于含10%胎牛血清的1640培养基(含 10^5 U/L青霉素, 10^5 U/L链霉素, 30 mg/L HAT生长因子添加物)中。

1.2.2 细胞药物处理 收集生长至对数期的单核细胞THP-1离心去上清, 加入p38抑制剂(SB203580, 10 μ mol/L)进行预处理1 h, 离心去上清, 再加入含有LPS(1 μ g/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)的1%胎牛血清的1640培养基重悬, 或者直接进行LPS(1 μ g/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)药物处理。根据具体实验设计作用3, 6, 12, 24 h。药物作用后收集细胞离心、去上清, 提取蛋白采用Western blot方法检测各项指标, 或者收集细胞离心后用无血清1640培养基重悬, 细胞计数, 进行后续的粘附和迁移实验。

1.2.3 细胞三维立体培养模型建立 将EA.hy926细胞按不同细胞浓度接种于96孔板或transwell小室上室, 24 h后待EA.hy926细胞生长至紧密单层时, 将药物处理后的THP-1细胞以一定的细胞量接种于已生长至单层的内皮细胞上, 动态观察两种细胞三维立体共培养时的相互作用。

1.2.4 单核细胞-血管内皮粘附实验 血管内皮细胞EA.hy926以 5×10^4 /孔接种于96孔板内, 24 h后

细胞生长至单层铺满。将药物处理后的单核细胞THP-1收集进行BCECF-AM(10 μ mol/L终浓度)染色1 h, 离心去上清, PBS洗2次后用无血清1640培养基重悬, 1×10^5 /孔加至生长已达单层铺满的EA.hy926上进行三维立体共培养, 观察单核细胞THP-1对血管内皮细胞EA.hy926的粘附能力。1 h后去除未粘附的THP-1细胞, PBS漂洗2次。随后将96孔至于倒置荧光显微镜下观察并采图以计数已粘附于血管内皮细胞的单核细胞THP-1, 激发波长为480 nm, 发射波长为530 nm。

1.2.5 单核细胞-血管内皮迁移实验 EA.hy926细胞以 10×10^4 /孔, 定容至200 μ L, 接种于transwell小室上室, 下室加入600 μ L含10%胎牛血清的正常培养基培养, 24 h后细胞生长至单层铺满。将药物处理后的THP-1细胞收集, 离心去上清, 无血清1640培养基重悬, 以 10×10^4 /孔, 定容到200 μ L。移液管移去transwell小室上室陈旧培养基, 加入上述的200 μ L THP-1细胞悬浮液至生长至单层的EA.hy926上进行三维立体共培养, 下室换成含20%胎牛血清的THP-1正常培养基作为趋化因子。24 h后收集下室培养基, 离心去上清, 用含10 μ mol/L BCECF-AM染液的无血清1640培养基重悬, 进行染色。1 h后离心去上清, PBS漂洗2次, 最后加入100 μ L无血清1640培养基重悬, 转移至96孔。待细胞沉积于孔底, 将96孔板至于倒置荧光显微镜下观察并采图, 计数已穿透血管内皮单层细胞至transwell小室下室的单核细胞THP-1。

1.2.6 血管内皮通透性测量 采用Millipore ERS-2电阻仪测定transwell小室上下室之间的电阻, 以未接种内皮细胞时测得的小室上下室之间的电阻为基数, 以接种不同细胞密度和不同时间时测得的电阻为实际测量值。当细胞生长至单层时, 实际测量值达最大, 表示细胞通透性达最低值; 加入单核细胞后, 单核细胞穿透血管内皮, 改变内皮细胞通透性, 此时小室上下室电阻实际测量值的变化, 即反应通透性变化大小。

1.2.7 Western blot分析 药物处理后收集细胞, 加入200 μ L CST裂解液(含10% Tyr抑制剂、10% Thr/Ser抑制剂、10% PMSF)裂解细胞提取蛋白, 用BCA法测定蛋白浓度, 按4:1的比例加入5 \times 上样buffer混匀, 沸水煮10 min, -80 $^{\circ}$ C保存。根据目的蛋白相对分子质量大小, 配置不同浓度的SDS-PAGE凝胶, 每孔上样蛋白量为50 μ g, 电泳后电转移至PVDF膜, 5%

脱脂奶粉37 °C封闭1 h或5% BSA 37 °C封闭2 h, 再分别与抗T-p38, p-p38, OGT, O-GlcNAc(CTD110.6)和 β -actin等抗体孵育, 4 °C缓慢摇动过夜。一抗孵育后, 用TBST漂洗3次, 每次5 min。再与辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育1 h。漂洗后, 用ECL化学发光法, 在Chem GelDoc成像仪(Bio-Rad, USA)分析结果。

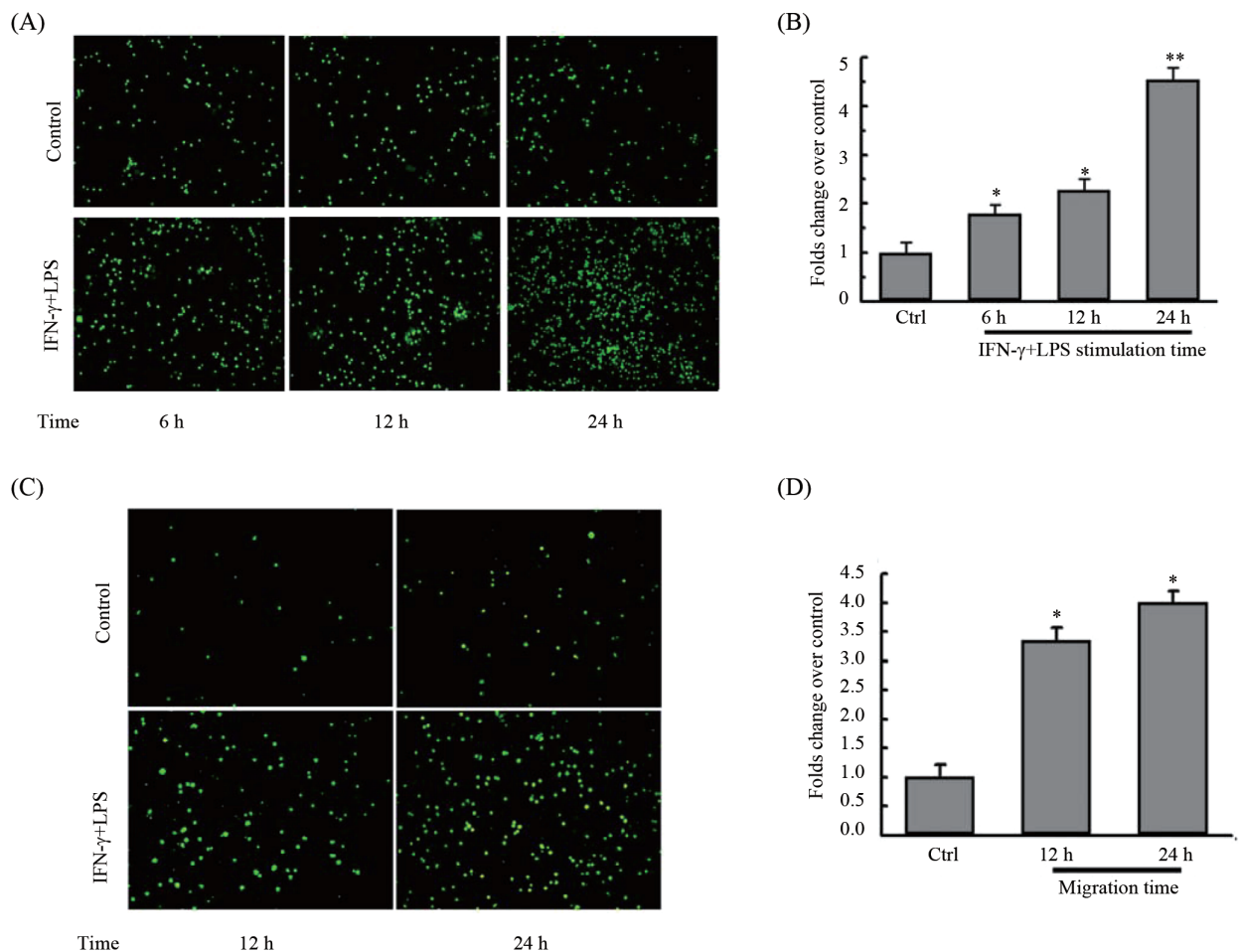
1.2.8 细胞计数和统计学分析 采用Image-proplus 6.0软件对倒置荧光显微镜采集到的图片进行细胞计数, 以计算粘附细胞和迁移细胞数量, 并计算实验组对空白组相对比值。每个实验至少重复3次, 应用SPSS 12.0软件进行统计学分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验分析, 多组间比较采用方差分

析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 LPS和IFN- γ 共刺激对单核细胞-血管内皮的粘附和侵袭能力的影响

以LPS(1 μ g/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)共处理THP-1细胞, 通过三维培养模型粘附实验显示, 与未处理的单核细胞组比较, LPS和IFN- γ 共处理组单核细胞与血管内皮的粘附能力明显增强, 且有时间依耐性, 在共处理24 h时单核细胞粘附能力增强最明显(图1A和图1B)。同时, 采用三维立体模型transwell细胞迁移实验方法, 观察到: 与对照组比较, LPS和IFN- γ 共处理组的



A: 3D-细胞粘附: LPS和IFN- γ 共处理单核细胞THP-1细胞6, 12, 24 h; B: 粘附细胞数量相对定量结果; C: 3D-transwell细胞迁移: LPS和IFN- γ 共处理单核细胞THP-1 24 h后进行迁移12, 24 h; D: 穿透血管内皮的单核细胞数量相对定量结果。* $P < 0.05$, 与正常对照组相比。

A: 3D-cell adhesion: THP-1 cells were co-stimulated by LPS and IFN- γ for 6, 12, 24 h; B: the amount of adherent THP-1 cells relatively quantitative analysis; C: 3D-transwell migration: THP-1 cells were co-stimulated by LPS and IFN- γ for 24 h, and then transmigrated to monolayer EA.hy926 cells for 12, 24 h; D: the amount of transendothelium THP-1 cells relatively quantitative analysis. * $P < 0.05$ vs control group.

图1 LPS与IFN- γ 共处理单核细胞增强单核细胞-血管内皮粘附和迁移能力

Fig.1 LPS and IFN- γ co-stimulation enhanced monocytes-vascular endothelium adhesion and transmigration in THP-1 cells

单核细胞穿透至下室的细胞数明显增多, 即单核细胞对血管内皮的侵袭能力明显增强且呈时间依耐性, 在24 h时侵袭能力最强(图1C和图1D)。

2.2 LPS和IFN- γ 共刺激对单核细胞-血管内皮通透性的影响

通过三维立体培养的方法, 采用方法1.2.6所述方法, 测定transwell小室上下室之间的电阻来反应血管通透性的大小。结果表明以 1×10^5 /孔接种于24孔中的transwell小室上室24 h后电阻达最大, 说明细胞生长至单层, 细胞间紧密连接, 通透性最低(表1)。此时, 将炎症因子处理24 h后的单核细胞THP-1接种于此单层细胞上, 观察单核细胞侵袭12, 24, 36 h时血管通透性的变化。结果如表2所示, 上下室之间电

阻明显下降, 即细胞通透性增加, 并有时间依耐性, 接种后24 h时下降更加明显。

2.3 LPS和IFN- γ 诱导单核细胞内蛋白O-GLcNAc糖基化和p38磷酸化的相关性

根据以往相关研究报道^[26-27], 机体感染和应激致O-糖基化发生(6~24 h)同时存在磷酸化水平改变, 故本课题选择3, 6, 12, 24 h作为观察时间点。Western blot结果显示, 与对照组相比, LPS和IFN- γ 共处理组中的单核细胞内的OGT表达于12 h和24 h组明显下降, 同时其特异性催化产物O-GLcNAc修饰的蛋白表达量亦明显下降(图2A和图2B)。同时单核细胞内的p38磷酸化水平却明显上调, 这与蛋白O-GLcNAc糖基化修饰和OGT表达量趋势正好相反(图2A)。

表1 EA.hy926接种不同时间后transwell上下小室之间的电阻值大小

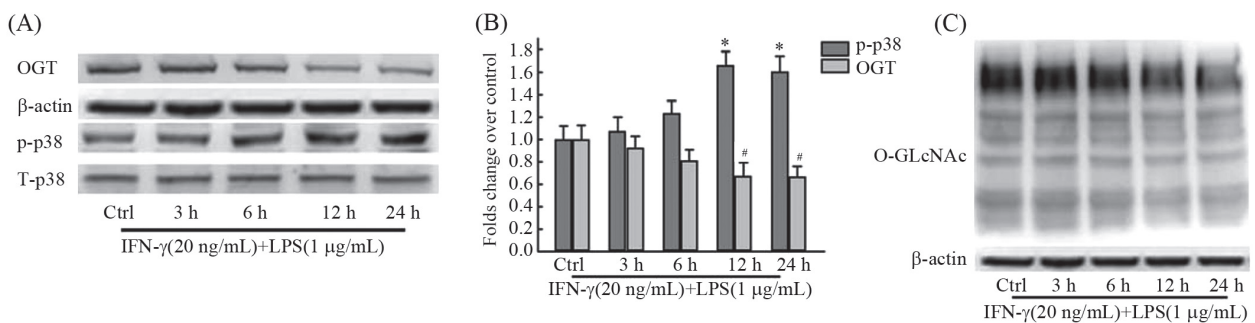
Table 1 Electric resistance between upper and bottom transwell at different growth phases of EA.hy926

细胞接种量 Cell amounts	生长时间 Growth time		
	12 h(欧姆) 12 h(Ω)	24 h(欧姆) 24 h(Ω)	36 h(欧姆) 36 h(Ω)
Blank group	114	114	115
5×10^4 /well	159	196	220
10^5 /well	218	270	268

表2 THP-1穿透单层血管内皮EA.hy926不同时间后transwell上下小室间的电阻值大小

Table 2 Electric resistance between upper and bottom transwell at different transendothelium phases of THP-1 to monolayer EA.hy926

细胞接种量 Cell amounts	穿透时间 Migration time	
	穿透12 h(欧姆) Migration 12 h(Ω)	穿透24 h(欧姆) Migration 24 h(Ω)
Control group	270	270
10^5 /well	240	217



A: LPS(1 μ g/mL)和IFN- γ (20 ng/mL)共处理THP-1细胞3, 6, 12, 24 h后, Western blot方法检测单核细胞中OGT表达量和p38磷酸化; B: p-p38、OGT蛋白的灰度分析; C: O-GLcNAc糖基化蛋白的蛋白表达量。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$, IFN- γ +LPS模型组与正常对照组相比。

A: THP-1 cells were co-stimulated by LPS (1 μ g/mL) and IFN- γ (20 ng/mL) for 3 h, 6 h, 12 h and 24 h. The expression of OGT, the level of p38 phosphorylation were observed by Western blot; B: the relative quantitative analysis of protein p-p38 and OGT; C: O-GLcNAc acylation modified protein in THP-1 were assayed by Western blot. * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, IFN- γ +LPS model group vs control group.

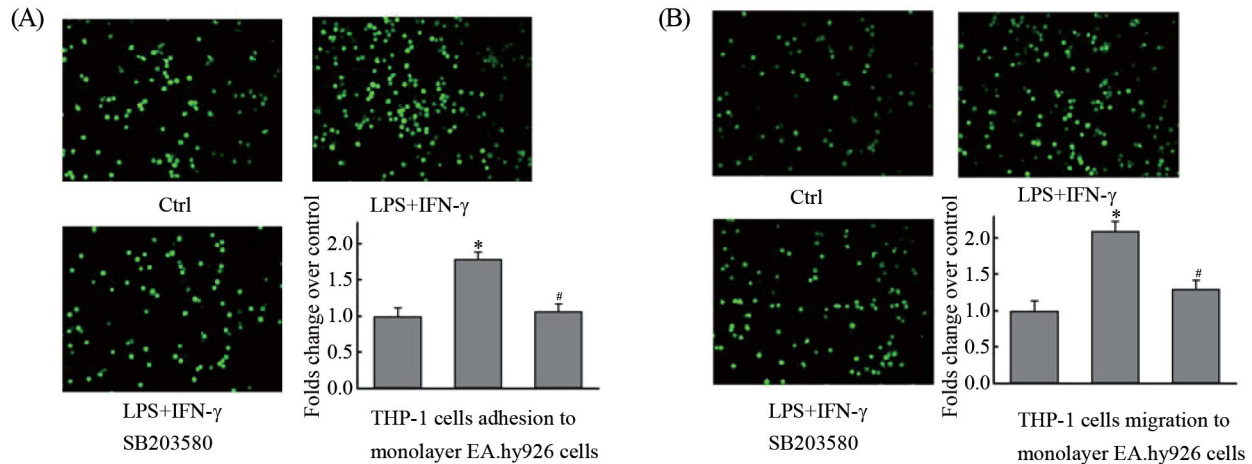
图2 LPS与IFN- γ 共作用对单核细胞内OGT、O-GLcNAc糖基化及p38磷酸化表达的影响

Fig.2 The effect of LPS and IFN- γ co-stimulation on the expression of OGT, O-GLcNAc and the level of p38 phosphorylation in THP-1 cells

2.4 蛋白O-糖基化和磷酸化共同参与调控单核细胞与血管内皮的相互作用

如图3A所示,与LPS和IFN- γ 共刺激24 h组相比,p38抑制剂处理组中,单核细胞THP-1对单层血管内皮细胞EA.hy926的粘附能力明显减弱;且迁移能力也相应减弱,即对血管内皮的穿透能力明显降低(图

3B)。Western blot检测表明,p38抑制剂预处理在降低p38磷酸化水平的同时,明显逆转LPS和IFN- γ 共诱导的OGT及其催化产物O-GLcNAc糖基化蛋白表达下降(图4)。综上,p38磷酸化和O-GLcNAc糖基化之间存在一种相互抑制的关系;表明p38磷酸化和功能蛋白O-GLcNAc糖基化共同参与调控炎症反应中单

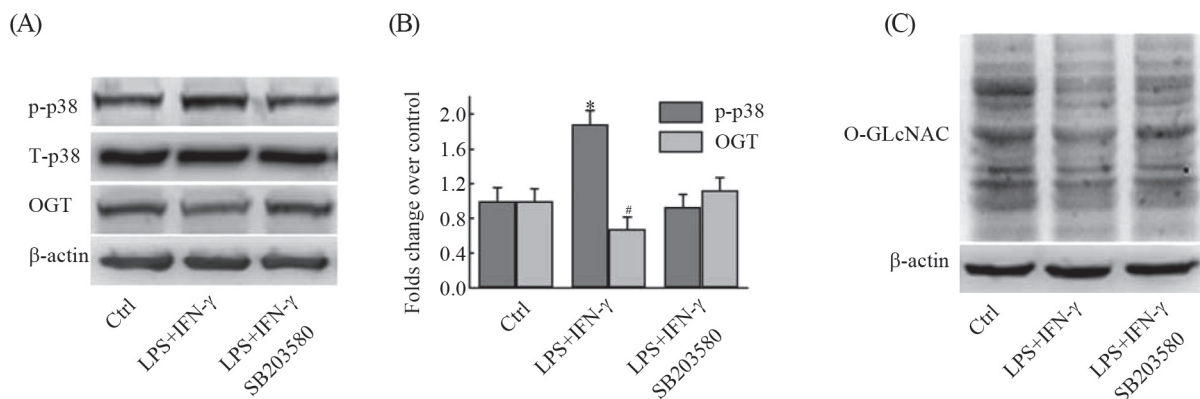


A: 单核细胞THP-1对单层血管内皮细胞EA.hy926的粘附及发生粘附的THP-1细胞数量相对定量结果; B: 单核细胞THP-1对单层血管内皮细胞EA.hy926的迁移及穿透血管内皮的THP-1细胞数量相对定量结果。 $^{\#}P<0.05$, p38抑制剂预处理组与IFN- γ +LPS模型组相比; $^*P<0.05$, IFN- γ +LPS模型组与正常对照组相比。

A: the adhesion of monocyte THP-1 cells to monolayer vascular endothelium EA.hy926 cells and the of adherent THP-1 cells relatively quantitative analysis; B: the transendothelium of monocyte THP-1 cells to monolayer vascular endothelium EA.hy926 cells and transmigrated THP-1 relatively quantitative analysis. $^{\#}P<0.05$, p38 inhibitor pretreatment group vs IFN- γ +LPS model group; $^*P<0.05$, IFN- γ +LPS model group vs control group.

图3 p38抑制剂预处理抑制单核细胞-血管内皮的粘附和迁移

Fig.3 p38 inhibitor had a negative effect on monocytes-vascular endothelium adhesion and transmigration



A: Western blot检测p38磷酸化水平及OGT表达水平; B: (A)图蛋白相对定量分析; C: Western blot检测THP-1总蛋白中发生O-GLcNAc糖基化蛋白表达水平。 $^*P<0.05$, $^{\#}P<0.05$, IFN- γ +LPS模型组与正常对照组相比。

A: the level of p38 phosphorylation and OGT expression were measured by Western blot; B: fig(A) proteins relatively quantitative analysis; C: the level of O-GLcNAcylation protein in THP-1 total lysis were observed by Western blot, too. $^*P<0.05$, $^{\#}P<0.05$, IFN- γ +LPS model group vs control group.

图4 p38抑制剂预处理增强单核细胞内OGT及其催化的O-GLcNAc糖基化表达水平

Fig.4 p38 inhibitor pretreatment increased the protein expression of OGT and O-GLcNAcylation in THP-1

核细胞对血管内皮的粘附和侵袭。

3 讨论

炎症反应发生时, 机体调动体内的抗炎机制, 趋化大量的抗炎物质向炎症损伤局部聚集, 包括大量具有吞噬和杀伤病原体的白细胞, 如中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞, 并产生大量的炎症趋化因子^[18-19], 为各种抗炎物质向炎症损伤局部聚集提供趋化动力; 同时各种炎性细胞与血管内皮的粘附能力和对血管内皮的侵袭能力均明显增强, 为炎性细胞与血管内皮细胞相互作用和后续的向炎症损伤局部聚集提供了必备条件^[20]。本课题重点就单核细胞-血管内皮相互作用的具体分子机制进行了进一步的深入研究。结果表明, 功能蛋白转录后O-糖基化和p38磷酸化修饰共同参与调控单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭, 同时O-糖基化和p38磷酸化两种蛋白转录后修饰方式之间存在相互抑制的生物学效应。

以往研究证明, OGT催化功能蛋白发生O-GlcNAc糖基化修饰, 该糖基化修饰广泛参与心血管系统损伤和功能失调的调控^[3-6]。但在不同类型的疾病或损伤中, O-GlcNAc糖基化修饰发生水平和功能各不相同。心肌损伤时, 增加O-GlcNAc糖基化水平有利于减少心肌细胞凋亡和促进心肌细胞功能恢复^[5]; 动脉高血压血症中, O-GlcNAc糖基化水平明显升高, 调控血管收缩和舒张功能^[4]; 血管缺血再灌注中, 己糖胺所诱导的高水平的O-GlcNAc糖基化有利于再灌注后损伤修复和抑制各种炎症因子释放^[8-9,21]。由于功能蛋白O-GlcNAc糖基化和磷酸化有着共同的修饰位点, 即丝氨酸/苏氨酸位点。两种修饰之间可能存在竞争性的“阴-阳学说”^[28]或者相互协调关系^[10-12]。炎症反应发生时, MAPK信号通路被激活, 参与调控各种炎症因子的产生和功能发挥^[15-17,22]。但在炎症反应发生时, O-GlcNAc糖基化和MAPK通路中重要激酶磷酸化之间的相互关系能否影响细胞的生物学功能, 目前还不完全确定。

大量研究结果表明, 功能蛋白的功能发挥不仅与蛋白总体表达水平有关, 蛋白翻译后特异性的修饰对蛋白功能发挥同样起着重要的调控作用^[23-24]。本课题首先通过LPS和IFN- γ 共刺激单核细胞以建立炎症模型, 观察到炎症反应发生时, 单核细胞对血管内皮细胞的粘附和侵袭能力均明显增强, 单核细胞穿透血管内皮细胞时其通透性明显增强。为了深

入研究单核细胞与血管内皮细胞相互作用的可能调控机制, 我们探讨了蛋白翻译后特异性修饰对功能蛋白的功能发挥的调控。观察蛋白O-糖基化和磷酸化在炎症反应发生时表达水平的变化, 两者之间的相互关系以及两者在单核细胞与血管内皮相互作用中所起的调控作用。通过检测LPS和IFN- γ 共刺激的单核细胞中O-GlcNAc糖基化水平, 发现其表达水平与单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭能力呈负相关, 这与高水平O-GlcNAc糖基化具有抑制白细胞渗出的结论是一致的。基于以往文献报道, 蛋白O-GlcNAc糖基化与磷酸化存在共同修饰位点即丝氨酸/苏氨酸位点^[12-14], 那么OGT催化介导的O-GlcNAc糖基化能否通过该位点影响MAPK通路中p38的磷酸化成为我们关注的焦点。结果发现LPS和IFN- γ 共刺激的单核细胞中p38磷酸化水平与单核细胞对血管内皮的粘附和侵袭能力呈正相关, 而与OGT的表达呈负相关, 经胞内蛋白O-糖基化凝集素抗体检测发现, 多数蛋白的O-糖基化(分子量范围包括p38激酶)也呈负相关, 推测p38的磷酸化程度可能与OGT表达相关。为了进一步验证O-GlcNAc糖基化和p38磷酸化之间的相互关系, 我们采用p38抑制剂预处理单核细胞, 特异性阻断p38磷酸化, 观察到LPS和IFN- γ 共处理组的单核细胞对血管内皮的粘附和迁移能力均明显下降; 单核细胞内p38磷酸化水平下降, 同时OGT及其特异性催化产物O-GlcNAc糖基化蛋白表达量明显升高, 提示p38磷酸化与O-GlcNAc糖基化之间存在相互抑制的生物学效应, 与以往的“阴-阳学说”相符合。综上可知, 炎症反应中单核细胞对血管内皮的侵袭受功能蛋白O-GlcNAc糖基化和p38磷酸化双向调控。在本课题研究中观察到IFN- γ 与LPS共刺激单核细胞3 h时其磷酸化水平出现升高趋势, 随时间进展于12 h达高峰; 同时, OGT表达变化及其糖基化修饰于6 h时开始出现下降趋势, 12~24 h明显下降。那么, 在炎症反应发生时, p38磷酸化和OGT糖基化对机体内丝/苏氨酸羟基位点的修饰, 既可能存在时空竞争性, 亦可能存在p38磷酸酶活性对OGT糖基转移酶活性的影响, 此问题还有待进一步深入研究。以往研究显示, 炎症反应中, MAPK-NF- κ B信号通路被激活^[17,25], 增强各种炎症因子的表达和功能, 从而加强白细胞对血管内皮的侵袭, 这与我们所观察到的趋势是一致的。但是, 炎症反应中功能蛋白O-GlcNAc糖基化对单核细胞

粘附和穿透血管内皮生物学效应的调控作用及OGT表达量变化是否通过p38 MAPK-NF- κ B信号通路进行调节或存在其他机制参与调控还有待进一步深入研究。本课题从全新的角度考察了功能蛋白磷酸化和糖基化可能共同参与白细胞渗出血管内皮这一生物学效应的调控机制, 研究结果为相关疾病抗炎治疗的新靶点发现提供了重要的实验依据。

参考文献 (References)

- Jedynak M, Siemiatkowski A. The role of monocytes/macrophages and their cytokines in the development of immunosuppression after severe injury. *Pol Merkur Lekarski* 2002; 13(75): 238-41.
- Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 1999; 66(5): 698-704.
- Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 73(2): 288-97.
- Lima VV, Rigsby CS, Hardy DM, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation: A novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: Focus on hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2009; 3(6): 374-87.
- Chatham JC, Marchase RB. The role of protein O-linked beta-N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(2): 57-66.
- Ngoh GA, Facundo HT, Zafir A, Jones SP. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circ Res* 2010; 107(2): 171-85.
- 杨新颖, 李 静, 耿美玉. 蛋白质O-GlcNAc糖基化及其细胞生物学功能. *细胞生物学杂志* 2007; 29(5): 682-6.
- Rajapakse AG, Ming XF, Carvas JM, Yang Z. O-linked beta-N-acetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and pro-oxidative properties in the endothelial system. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(3): 172-5.
- Xing D, Feng W, Not LG, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, *et al.* Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(1): H335-42.
- Chou TY, Hart GW, Dang CV. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 1995; 270(32): 18961-5.
- Cheng X, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: Post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* 2001; 276(13): 10570-5.
- Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(2): 96-106.
- Zeidan Q, Hart GW. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt1): 13-22.
- Fulop N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(5): H2227-36.
- Sarov-Blat L, Morgan JM, Fernandez P, James R, Fang Z, Hurler MR, *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces inflammation after coronary vascular injury in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(11): 2256-63.
- Yamawaki H, Saito K, Okada M, Hara Y. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via JNK and p38 in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(6): C1510-7.
- Liu HT, He JL, Li WM, Yang Z, Wang YX, Yin J, *et al.* Geniposide inhibits interleukin-6 and interleukin-8 production in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells by blocking p38 and ERK1/2 signaling pathways. *Inflamm Res* 2010; 59(6): 451-61.
- Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: Special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41(3 Pt 2): 834-41.
- Mitchell K, Yang HY, Berk JD, Tran JH, Iadarola MJ. Monocyte chemoattractant protein-1 in the choroid plexus: A potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation. *Neuroscience* 2009; 158(2): 885-95.
- Lee DK, Nathan Grantham R, Trachte AL, Mannion JD, Wilson CL. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway enhances monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(1): 109-16.
- 杨同宁, 江跃全, 杨火梅, 于 超. 壳寡糖通过p38MAPK糖基化修饰抑制TNF- α 诱导的EA.hy926细胞IL-6, IL-8的表达. *中国药理学通报* 2007; 27(2): 252-7.
- 赵善刚, 费洪强, 赵 斌, 王 沁. 白细胞介素-1 β 信号与 β 细胞功能. *细胞生物学杂志* 2008; 30(2): 166-70.
- van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Van Damme J, Opendaker G. Cytokine and protease glycosylation as a regulatory mechanism in inflammation and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* 1998; 435: 133-43.
- Zhao Y, Li J, Xing Y, Wang J, Lu C, Xin X, *et al.* N-acetylglucosaminyltransferase V mediates cell migration and invasion of mouse mammary tumor cells 4T07 via RhoA and Rac1 signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 2008; 309(1/2): 199-208.
- Li XY, He JL, Liu HT, Li WM, Yu C. Tetramethylpyrazine suppresses interleukin-8 expression in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cell by blocking ERK, p38 and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *J Ethnopharmacol* 2009; 125(1): 83-9.
- Cheung, WD, Hart GW. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during

- glucose deprivation. *J Biol Chem* 2008; 283(19): 13009-20.
- 27 Marsh SA, Dell' Italia LJ, Chatham JC. Activation of the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation modulate hypertrophic and cell signaling pathways in cardiomyocytes from diabetic mice. *Amino Acids* 2011; 40(3): 819-28.
- 28 Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: Alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 19229-35.

Adhesion and Emigration of Monocyte to Vascular Endothelium were Associated with Functional Protein O-GLcNAcylation and Phosphorylation during Vascular Inflammation

Yang Huomei¹, Yu Chao², Yang Zhu^{1*}

¹The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

²Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract In present study, the altered levels of functional protein O-glycosylation and p38 MAPK phosphorylation in monocytes were observed during inflammation. The effects of functional protein O-glycosylation and p38 MAPK phosphorylation on monocyte adhesion through vascular endothelium and transmigration were investigated. During IFN- γ and LPS co-induced inflammation, the changes of THP-1 adhesion and migration to monolayer vascular endothelium were observed by 3D-culture, and the alteration of vascular permeability was measured by resistance measurement as well. Furthermore, to explore the possible molecular mechanisms, p38 MAPK phosphorylation, the level of Ser(Thr)-O-linked N-acetylglucosaminylation(O-GLcNAc) and its special O-GlcNAc transferase (OGT) were observed by Western blot. As a result, IFN- γ and LPS co-treatment obviously enhanced monocytes adhesion and migration to vascular endothelium, and the permeability of vascular endothelium was also enhanced during THP-1 transmigration as well. Meanwhile, the augmented level of p38 MAPK phosphorylation was observed by western blot, and accompanied with the decreased level of OGT and O-GLcNAcylation protein in IFN- γ and LPS co-treated monocyte THP-1. To further confirm the regulation of p38 MAPK phosphorylation and O-glycosylation to THP-1 adhesion and migration to vascular endothelium, THP-1 cells were pretreated by p38 inhibitor before exposed to IFN- γ and LPS co-stimulation. Fortunately, the changes induced by IFN- γ and LPS co-treatment were mostly reversed by p38 inhibitor pretreatment. Together all, our results suggested during inflammatory reaction, monocytes adhesion and transmigration to vascular endothelium associated both with phosphorylation and glycosylation.

Key words OGT; O-GLcNAcylation; p38; THP-1; EA.hy926; phosphorylation

Received: October 1, 2011 Accepted: December 20, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81070222) and the Natural Science Foundation of Chongqing (No. CSTC2009BA50839)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485589, E-mail: cqyangz@vip.163.com