

糖基化低密度脂蛋白增强人 外周血单核巨噬细胞的 *Sis* 基因表达

刘乃丰 黄晓明 胡向阳 沈成兴 张丽容

(南京铁道医学院附属第一医院心血管内科, 南京 210009)

Enhancement of *sis* Gene Expression in Human Monocyte-macrophages by Glycosylated Low Density Lipoprotein

LIU Nai-Feng, HUANG Xiao-Ming, HU Xiang-Yang, SHEN Cheng-Xing and ZHANG Li-Rong

(Department of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of glycosylated low density lipoproteins (gLDL) on expression of *sis* oncogene in human monocyte-macrophages and its significance in accelerated atherosclerosis associated with diabetes. **Methods** Total RNA were isolated from monocyte-macrophages which were prepared by density gradient centrifugation from healthy subjects blood. The dot blot hybridizations were performed with digoxin labelling *V-sis* probes and detected by chemical luminescence and densitometry scanning.

Results The gLDL significantly enhanced the expression of *V-sis* in cultured human monocyte-macrophages. **Conclusions** The stimulating effects on *sis* oncogene expression of gLDL contribute to its atherogenic properties, which may be an important mechanism for high incidence of atherosclerosis in diabetic patients.

KEY WORDS Receptor, low density lipoprotein; Monocyte-macrophages; Glycosylation; Oncogene; Atherosclerosis; Diabetes

摘要 **目的** 探讨体外糖基化低密度脂蛋白对人单核巨噬细胞中 *sis* 基因表达的影响及其在糖尿病易患动脉粥样硬化中的意义。 **方法** 密度梯度离心分离并培养人外周血单核巨噬细胞,提取总 RNA,地高辛标记 *sis* 基因探针和斑点杂交后化学发光检测及光密度扫描。 **结果** 糖基化低密度脂蛋白显著增强人外周血单核细胞 *sis* 基因表达。 **结论** 糖基化低密度脂蛋白对人外周血单核细胞 *sis* 基因表达的作用是糖尿病易患动脉粥样硬化的重要机制。

关键词 受体,低密度脂蛋白; 癌基因; 人单核巨噬细胞; 糖基化; 动脉粥样硬化; 糖尿病

摘要 **目的** 探讨体外糖基化低密度脂蛋白对人单核巨噬细胞中 *sis* 基因表达的影响及其在 As 发生中的意义。

国家自然科学基金资助项目, NO 39100050

核巨噬细胞中 *sis* 基因表达的影响及其在糖尿病易患动脉粥样硬化中的意义。 **方法** 密度梯度离心分离并培养人外周血单核巨噬细胞,提取总 RNA,地高辛标记 *sis* 基因探针和斑点杂交后化学发光检测及光密度扫描。 **结果** 糖基化低密度脂蛋白显著增强人外周血单核细胞 *sis* 基因表达。 **结论** 糖基化低密度脂蛋白对人外周血单核细胞 *sis* 基因表达的作用是糖尿病易患动脉粥样硬化的重要机制。

关键词 受体,低密度脂蛋白; 癌基因; 人单核巨噬细胞; 糖基化; 动脉粥样硬化; 糖尿病

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)已成为糖尿病患者的常见并发症和重要死亡原因^[1]。持续的高血糖可使糖尿病患者体内的很多蛋白质被葡萄糖非酶促修饰,形成糖基化产物。低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)经糖基化后通过 LDL 受体代谢受阻,体内清除减慢,引起多种致 As 细胞生物学效应,在 As 发生中起重要作用^[2]。已有证据表明,As 及再狭窄的病理过程中 *sis* 表达异常,而核苷酸序列分析发现,人的 *sis* 基因是血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)的同源基因,表达的 PDGF 对调控血管平滑肌细胞增殖起重要作用。本文探讨了体外糖基化 LDL 对人单核巨噬细胞中 *sis* 基因表达的影响及其在 As 发生中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640 培养基, Gibco 产品; Percoll, Pharmacia 产品; *V-sis* 探针(1.4 kb), 华美生物工程公司; Total RNA Isolation Kit, Promega 产品; digoxin (DIG) DNA Labeling and Detection Kit, 尼龙膜和发光试剂

CDP-astar, 均为 Boehringer Mannheim 产品, 新鲜健康成人外周血由南京中心血站提供。

1.2 低密度脂蛋白分离^[8]

取健康人血清, 调密度至 1.300, 用单个不连续密度梯度垂直转头超速离心, $168\,000\times g$, $10^\circ C$, 150 min 。分离出 LDL, 用 PBS 液充分透析后, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度, 浓缩过硫酸钾。Lowry 法测蛋白浓度。

1.3 糖基化低密度脂蛋白的制备^[12]

取所需 LDL 加入一定量葡萄糖使终浓度为 50 mmol/L , 在 $37^\circ C$ 无氧条件下孵育 7 天。对照组 LDL 不含葡萄糖, 余条件一致。

1.4 人单核巨噬细胞的分离和培养

取新鲜外周血 100 ml , 肝素抗凝, 在 50 ml 离心管中加入密度为 1.076 的 Percoll 应用液 15 ml , 上铺抗凝全血 25 ml , 离心 $800\times g$, 30 min , 吸取单个核细胞层, Wright 染色示单核细胞纯度 $>15\%$, 台盼蓝染色示细胞活力 $>98\%$ 。用 1640 培养液调细胞密度为 $(3\sim4)\times 10^4/\text{L}$, 种植于培养板中, 培养 $3\sim4\text{ h}$, 见单核细胞贴壁较紧。用培养液冲掉悬浮细胞, 加入含 30% 自体血清的 1640 培养液继续培养 7 天后细胞变形明显, 胞体增大 $1.5\sim3$ 倍, 成熟为巨噬细胞, 纯度 $>95\%$ 。实验组与对照组分别加糖基化 LDL (glycosylated LDL, gLDL) 和 LDL 至终浓度 100 mg/L , 培养 24 h 后进行实验。

1.5 RNA 抽提

采用酸性胍-酚-氯仿 (AGPC) 法抽提细胞总 RNA。约 10^7 个细胞在含 4 mol/L 硫氰酸胍、 25 mmol/L 柠檬酸钠、 0.5% 十二烷基肌氨酸钠和 0.11 mol/L 硫基乙醇的变性液中裂解, 然后加入约 0.1 体积 2 mol/L NaAc, 一体积水和酚混匀, 再加 0.2 体积氯仿/异戊醇 ($49:1$), 混匀, $0^\circ C$ 放 15 min 后, 离心, 水相加入等体积异丙醇, 在 $-20^\circ C$ 沉淀。RNA 沉淀加 0.3 ml 变性液悬起, 再加一体积异丙醇 $-20^\circ C$ 重沉淀, RNA 沉淀加 70% 冷乙醇洗后, 干燥, 溶于 DEPC 水中。

1.6 探针标记

V-sis 癌基因探针 (1.4 kb) 用地高辛 DNA 随机引物法标记试剂盒进行标记, 操作步骤按说明书, 标记探针浓度用直接显色法估计。

1.7 斑点杂交

RNA 样品在含 6.6% 甲醛的 $4\times\text{SSC}$ 溶液中性化后, 取 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 点于带正电荷的尼龙膜上, 紫外光联使 RNA 固定。杂交前尼龙膜用不含探针的杂交液 ($5\times\text{SSC}$ 、 2% 封闭试剂、 0.1% 十二烷基肌氨酸钠、 7% 十二

烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液和 $\text{pH } 7.0$ 、 50% 甲酰胺) 在 $68^\circ C$ 预杂交 1 h , 然后加入 DIG-V-sis 至终浓度约 $20\text{ }\mu\text{g/L}$, $68^\circ C$ 杂交过夜, 杂交后洗膜条件为 $2\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 $5\text{ min}\times 2$ (室温)、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 $15\text{ min}\times 2$ ($68^\circ C$)。

1.8 化学发光检测

杂交后尼龙膜用 1% 封闭试剂处理后, 与碱性磷酸酶偶联的抗地高辛抗体复合物 (75 u/L) 保温 30 min , 然后用含 0.3% Tween-20 的马尿酸洗膜液洗去未结合的抗体复合物, 加入化学发光物 CDP-star $500\text{ }\mu\text{l}$ ($1:100$ 稀释), 封于塑料袋中对 X 光片自显影。压片 30 min 后取出冲片。

2 结果

Figure 1 为地高辛标记的 sis 探针与人单核巨噬细胞总 RNA 的斑点杂交的化学发光自显影图谱。X 光片经岛津双波长光密度扫描仪扫描, 条件 $S=515\text{ nm}$, $R=600\text{ nm}$ 。实验重复 3 次, 数据均表示为峰面积的均值和标准差, 发现糖基化 LDL 作用的人单核巨噬细胞基因的表达 ($18\,767\pm 1\,804$) 显著高于对照 LDL 作用的人单核巨噬细胞 ($7\,239\pm 721$)。

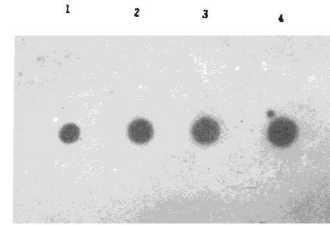


Figure 1. The result of the dot blot hybridizations with digoxin labelling V-sis probes and total RNA of human monocyte-macrophages. 1. The human monocyte-macrophages by non-glycosylated low density lipoprotein (as control). 2~4. The human monocyte macrophage by glycosylated low density lipoprotein.

3 讨论

用 Ficoll 液密度法分离人外周血单个核细

胞时粒细胞和红细胞混杂较多,单核细胞丢失多,纯度低。Percoll 分离法可克服这一缺点。一次分离 100 ml 新鲜血可获约 2×10^7 单核细胞,能满足一次实验分组的需要。

本文采用地高辛试剂盒标记探针,免去了使用同位素可能带来的污染和半衰期短的不便,标记探针可长期保存,反复使用,在最后检测时,本文改用了新型发光试剂 CDP-star,灵敏度高,用 X 光片曝光时间大大缩短,半小时之内就能显示结果,如条件掌握得好,特别是探针浓度和洗膜,结果可与同位素相媲美。

低密度脂蛋白(LDL)在高血糖作用下,载脂蛋白 B 多肽链上具有正电性的赖氨酸残基易与葡萄糖发生非酶促共价结合形成 Amadori 等糖基化产物,这些产物如经进一步脱水,缩合、环化、氧化和断裂成为糖基化终产物(advanced glycosylated end products, AGEP)^[1],由于配体中与 LDL 受体识别结合起关键作用的赖氨酸残基可被糖基化或 AGEP 修饰,可引起 LDL 代谢异常^[3]。在巨噬细胞上某些修饰后的 LDL 能通过一种高亲和力受体途径即清道夫受体被 MP 大量摄取,引起细胞内脂质堆积和泡沫细胞形成。研究表明 gLDL 不能被 MP 上清道夫受体识别。Lopes-Viralla 等认为 MP 通过受抑制的 LDL 受体和可能存在的 gLDL 受体两种途径代谢 gLDL。已发现许多组织细胞有特异的糖基化终产物(AGEP)受体,在糖尿病血管并发症中起重要作用^[4]。我们的初步结果表明,糖基化 LDL 通过一种低亲和力,高容量的受体入胞代谢,不能与 AGEP 竞争结合 AGEP 受体,但糖基化 LDL 与 AGEP 增强 *sis* 基因表达的作用却是一致的^[5,6],免疫学实验证明该类产物生物化学结构相似。

早已发现人动脉粥样硬化病灶中 PDGF-BB 的高表达,其中血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞都能表达 PDGF,通过自分泌及旁分泌的方法促进 G_0 - G_1 期的转换,刺激血管平滑肌细胞增殖,PDGF 的拮抗剂或抗体可阻断

此效应^[7]。血管紧张素和内皮素对 SMC 的促增殖作用也需要 PDGF 来介导。许多细胞因子如白细胞介素-1、肿瘤坏死因子可增强 *sis* 基因表达,而干扰素则可抑制其表达。生长因子如何对细胞增殖相关基因的表达进行调控是近年研究的热点之一,PDGF 能调节细胞内早期反应基因如 *c-myc*、*c-fos*,并激活转录因子 NF- κ B,跨膜信号转导可能通过 MAPK 激酶途径。由于 PDGF 及其受体在 As 发生中的重要作用,可以认为糖基化 LDL 对人单核巨噬细胞中 *sis* 基因表达的影响是糖尿病患者易患 As 的重要机制之一。

参考文献

- 1 Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*, 1995, **46**: 223~234.
- 2 刘乃丰,黄元伟,楼定安,等.糖基化低密度脂蛋白代谢与动脉粥样硬化关系的实验研究. *中华心血管病杂志*, 1990, **18**(6): 353~356.
- 3 Bucala R, Mitchell R, Arnold K, et al. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1995, **270**(18): 828~832.
- 4 Schmidt AM, Hasu M, Popo D, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vascular wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8 807~811.
- 5 Kirshtein M, Brett J, Radoff S, et al. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor, role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 9 010~014.
- 6 Yang CW, Vlassara H, Peten EP, et al. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 9 436~440.
- 7 Barrett TB, Benditt EP. *Sis* (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 1 099~103.

(1996-09-09 收到, 1996-12-10 修回)