

[文章编号] 1007-3949(2002)10-04-0297-03

•实验研究•

糖基化终产物对大鼠主动脉平滑肌细胞 单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响

贾庆哲, 刘乃丰

(东南大学附属中大医院心血管内科, 江苏省南京市 210009)

[主题词] 糖基化终产物; 单核细胞趋化蛋白 1; 肌, 平滑, 血管; 大鼠

[摘要] 为探讨糖基化终产物对大鼠主动脉平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 基因的影响, 体外分离培养大鼠主动脉平滑肌细胞, 然后用不同浓度葡萄糖(0、5、20、50 和 80 mmol/L) 制备的糖基化终产物-BSA(200 mg/L) 干预 24 h 和用葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的糖基化终产物-BSA 干预 0、12、24 和 36 h, 逆转录聚合酶链反应检测细胞中单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达水平。结果发现, 葡萄糖浓度 20 mmol/L、50 mmol/L 和 80 mmol/L 孵育的糖基化终产物都增加单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达, 其中 50 mmol/L 组作用最明显($P < 0.005$), 干预 12 h、24 h、36 h 后单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达均较未干预组明显增加($P < 0.001$)。结果提示, 糖基化终产物促进大鼠主动脉平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因的表达。

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

Effect of Advanced Glycosylation End Products on the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Rat Aortic Smooth Muscle Cells

JIA Qing-Zhe, and LIU Nai-Feng

(Division of Cardiology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China)

[MeSH] Glycosylation End Products, Advanced; Monocyte Chemoattractant Protein 1; Muscle, Smooth, Vascular; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate mechanism for accelerated atherosclerosis in diabetic patients, advanced glycosylation end products (AGE) on the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) mRNA in cultured aortic smooth muscle cells (SMC) of rat was observed. **Methods** SMC were isolated and cultured from the thoracic aorta of rat, then were exposed to AGE-BSA of 200 mg/L (glycated with glucose of 0, 5, 20, 50, and 80 mmol/L) for 24 h, exposed to AGE-BSA of 200 mg/L (glycated with glucose of 50 mmol/L) for 0, 12, 24, and 36 h. Expression of MCP-1 was quantified by RT-PCR with α -actin as internal standard. **Results** The expression of MCP-1 mRNA were increased by AGE-BSA incubated with glucose concentration of 20, 50, 80 mmol/L ($P < 0.005$), respectively. After intervention of AGE-BSA for periods of 12, 24 and 36 h, MCP-1 expression was increased markedly ($P < 0.001$). **Conclusion** AGEs increased the expression of MCP-1 mRNA in aortic smooth muscle cells of rats.

持久高血糖状态会导致体内蛋白质、脂质甚至核酸糖基化, 经过一系列非酶促反应, 最后形成一系列有高度活性的、结构多样的糖基化终产物^[1] (advanced glycosylation end products, AGE), 在糖尿病慢性并发症中占有重要地位。动脉粥样硬化性血管病变是糖尿病血管并发症中常见而重要的类型。外周血单核细胞与血管内皮细胞的粘附、趋化并迁移到内皮下, 是动脉粥样硬化发生过程中的最早期事件。在这个过程中, 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte che-

moattractant protein 1, MCP-1) 起了关键作用。本研究试图从糖基化终产物对 MCP-1 基因表达这一角度阐明糖基化终产物致动脉粥样硬化的细胞生物学效应。

1 材料和方法

1.1 试剂

牛血清白蛋白(BSA, BM), D-葡萄糖(分析纯, 重庆北培化学试剂厂), DMEM 培养基(低糖)(GIBCO), 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), Hepes (BM), DEPC (SIGMA), RNA 提取试剂盒(QIAGEN), 逆转录酶, 5×逆转录酶 Buffer, 10×PCR Buffer, Taq DNA 聚合酶, dNTPs, Oligo (dT), MgCl₂ 溶液 (Spromega), RNasin (SABC), DNA ladder (Sangon)。

[收稿日期] 2001-09-04 [修回日期] 2002-07-30

[基金项目] 教育部骨干教师资助计划(3124001050) 资助。

[作者简介] 贾庆哲, 男, 1975 年出生, 硕士研究生, 研究方向为糖基化终产物在糖尿病血管并发症中的作用, 现在复旦大学医学院攻读心血管内科博士学位。刘乃丰, 男, 1960 年出生, 东南大学内科学教授, 主任医师, 医学博士, 博士研究生导师, 本文通讯作者。

1.2 仪器和器材

CO₂ 恒温培养箱 (NAPCO), 基因扩增仪 (BIORAD), SCR-300 电泳仪 (上海万达生物工程公司)。

1.3 动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 100~150 g, 由本校动物实验中心提供。

1.4 糖基化终产物-BSA 的制备

将葡萄糖用 0.2 PBS (pH7.4) 溶液配成 0.5 溶液, 加入牛血清白蛋白, 使其浓度为 5.0 g/L, 分别加入一定量的葡萄糖, 使其终浓度分别为 5、20、50 及 80 mmol/L, 过滤除菌, 37℃ 孵育 12 周。使用前以 pH7.4 的 PBS 溶液透析除去未结合的葡萄糖, 对照组 BSA 不含葡萄糖。

1.5 平滑肌细胞的培养

平滑肌细胞取自大鼠的胸主动脉, 用组织贴块法进行培养^[2], 待细胞长满后进行传代, 本实验用第五代平滑肌细胞。在进行干预前, 先用不含血清的 DMEM 培养 24 h, 然后分成两组, 一组分别加入不同浓度葡萄糖孵育的 AGE-BSA 干预 24 h, 另一组加入葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的 AGE-BSA 分别干预 0 h、12 h、24 h 及 36 h。

1.6 总 RNA 的提取

用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

1.7 逆转录聚合酶链反应

以 2 μg 总 RNA 为模板, 加入 Oligo (dT)、DEPC 水、5×RT Buffer、dNTP、RNasin 及逆转录酶, 总反应体系 20 μL, 进行逆转录合成 cDNA 第一链, 然后用特异性引物对逆转录产物进行半定量 PCR。MCP-1 引物^[3] sense: 5'-CTGGAGAACTACAAGAGAAT-3', antisense: 5'-TCTAGTATTCATGGAAGGA-3', β-actin 引物 sense: 5'-GGTATGGGTCAGAAGGACTCC-3', antisense: 5'-TGATCTTCATGGTGCTAGGAGCC-3', 扩增片段分别为 392 bp 和 844 bp。PCR 反应体系和条件: cDNA 0.5 μg, β-actin 引物, MCP-1 引物, dNTP, 10×Buffer, MgCl₂ 溶液, Taq DNA 聚合酶, 总反应体系 25 μL。95℃ 加热 5 min, 冷却到 80℃ 10 s, 然后以 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min 进行 30 个循环扩增, 再以 72℃ 延伸 8 min, 扩增产物上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 扩增片段由 DNA ladder 进行确定, 以大鼠 β-actin 为内标, 进行光密度扫描读数。并对 PCR 产物进行测序, 与 Gene Bank 序列对照, 核对无误, 进一步证实了 PCR 产物的正确。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用非配对资料两样本均

数 *t* 检验。

2 结果

用 BSA 干预的平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达与对照组无明显差异, 但用葡萄糖浓度 20、50 和 80 mmol/L 孵育的 AGE-BSA 显著增高单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达, 其中以 50 mmol/L 时作用最明显, 80 mmol/L 时略有降低。同时, 葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的 AGE-BSA 分别干预平滑肌细胞 12、24 和 36 h, 单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达量也明显增加 (图 1 和 2, Figure 1 and 2)。

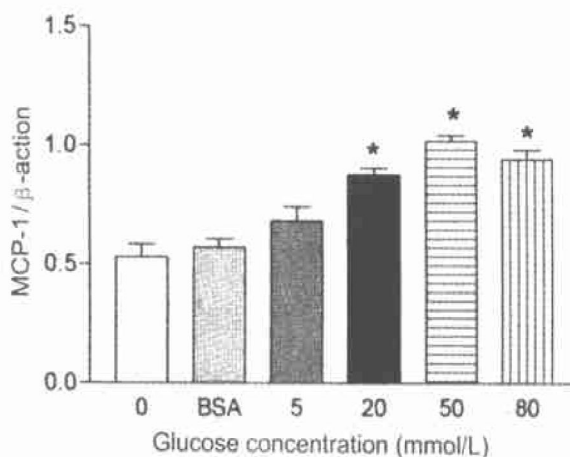


图 1. 不同浓度葡萄糖孵育的 AGE-BSA 对单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响。

Figure 1. Effects of AGE-BSA incubated with different glucose concentrations on expression of MCP-1 mRNA ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, *: $P < 0.005$).

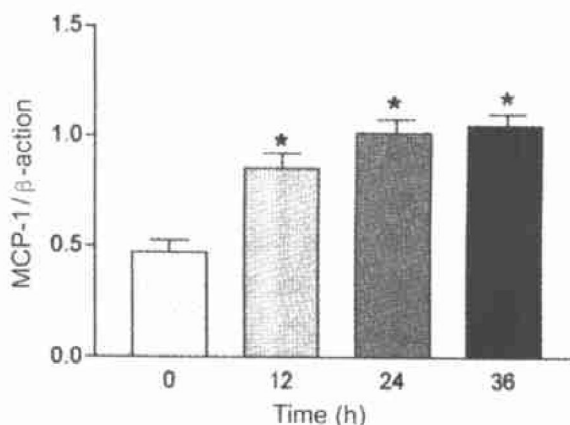


图 2. AGE-BSA 作用不同时间对单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响。

Figure 2. Increased expression of MCP-1 in cultured SMC exposed to AGE-BSA for various incubating periods ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, *: $P < 0.001$).

3 讨论

糖尿病患者并发动脉粥样硬化及其它血管并发症的发病率明显升高。近年来不少研究显示, 长期高血糖引起蛋白质非酶糖基化形成的糖基化终产物起重要作用。在动脉粥样硬化斑块中也已检测到许多种糖基化终产物^[4,5]。单核细胞趋化蛋白 1 是由 76 个氨基酸构成的蛋白单链, 属于趋化因子超家族, 在趋化单核细胞, 使其粘附并迁移到内皮下的过程中, 起关键性作用。已发现氧化型低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白均能诱导培养的兔主动脉平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 mRNA^[6], 但糖基化终产物对平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的影响尚未见报道。

本研究发现, AGE-BSA 明显增强大鼠主动脉平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达, 这在一定程度上可以解释糖尿病患者易患动脉粥样硬化的机制。糖基化终产物与靶细胞上受体结合后, 影响信号传导, 升高蛋白激酶 C 活性, 并激活转录因子 NF- κ B, 进而影响单核细胞趋化蛋白 1 表达。随后单核细胞趋化蛋白 1 与单核细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等的单核细胞趋化蛋白 1 受体结合后, 产生物学效应。Porreca 等^[7]发现, 单核细胞趋化蛋白 1 不仅是趋化激活剂, 而且是鼠血管平滑肌细胞的有丝分裂原, 促进平滑肌细胞生长。另外, Schecter 等^[8]也发现单核细胞趋化蛋白 1 可以诱导组织因子 mRNA 的表达。而组织因子所激发的凝血级联反

应则是动脉粥样硬化进展中一个重要事件。已知多种物质和细胞因子都可诱导单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达, 深入研究糖基化终产物与单核细胞趋化蛋白 1 的相互作用, 可进一步了解糖尿病患者易患动脉粥样硬化机制。如能找到有效减少单核细胞趋化蛋白 1 形成或干预单核细胞趋化蛋白 1 与单核细胞趋化蛋白 1 受体结合的药物, 防止其后续生物学效应, 有可能为防治动脉粥样硬化提供新的途径。

[参考文献]

- [1] Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, et al. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int*, 1999, **55** (2): 389-399
- [2] Campbell JC, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cells in culture. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 1-61
- [3] Wumin Dong, Petia P simeonova, Randle Gallucci, et al. Cytokine expression in hepatocytes: Role of oxidant stress. *J Intef Cytok Res*, 1998, **18**: 629-638
- [4] Sakata N, Imanaga Y, Meng J, et al. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycosylation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1998, **144** (1): 61-75
- [5] Helen V. Recent progress in advanced glycosylation end products and diabetic complications. *Diabetes*, 1997, **46** (suppl): s19-s25
- [6] Ruan Q, Deng Z, Song J. Very low-density lipoprotein and oxidized very low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein 1 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Chin Med J Engl*, 1996, **109** (3): 206-209
- [7] Porreca E, Di Febbo C, Reale M, et al. Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 1997, **34** (1): 58-65
- [8] Schecter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, et al. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem*, 1997, **272** (45): 28 568-573

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

编辑部更正

本刊第 10 卷第 3 期 221~224 页“结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 在动脉粥样硬化血管壁中的表达”一文中, 由于疏忽, 错将“PDGF-A”替换成“血小板源生长因子”, 漏掉了字母“A”, 导致该文概念模糊, 特此更正。并在此向作者及广大读者致歉。

中国动脉硬化杂志编辑部