

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0135-04

• 实验研究 •

糖基化终产物对人血管内皮细胞过氧化体增殖物 激活型受体 γ 基因表达的影响

刘 勇, 刘乃丰¹

(东南大学附属中大医院心血管内科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 细胞生物学; 糖尿病; 糖基化终产物; 人血管内皮细胞; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 基因表达

[摘要] 为探讨糖基化终产物对人血管内皮细胞表达过氧化体增殖物激活型受体 γ 基因的影响, 体外培养人血管内皮细胞株 (ECV304), 分别用不同浓度葡萄糖 (0、20、50 和 80 mmol/L) 孵育的糖基化终产物修饰牛血清白蛋白 (200 mg/L)、不同浓度的糖基化终产物修饰牛血清白蛋白 (50、100、200 和 400 mg/L) 干预 24 h 和葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的糖基化终产物修饰牛血清白蛋白干预细胞 0、12、24、36、48 和 72 h, 逆转录聚合酶链反应检测细胞中过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达水平。结果发现, 葡萄糖浓度为 20、50 和 80 mmol/L 孵育的糖基化终产物修饰牛血清白蛋白及浓度为 50、100、200 和 400 mg/L 的糖基化终产物修饰牛血清白蛋白都减少过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达 ($P < 0.001$), 干预 12、24、36、48 和 72 h 后过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达均较未干预组明显减少 ($P < 0.001$)。此结果提示, 糖基化终产物可抑制人血管内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 基因的表达。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Advanced Glycation End-products on Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ mRNA in Cultured Human Vascular Endothelial Cells

LIU Yong, and LIU Nai Feng

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

[KEY WORDS] Cellular Biology; Diabetes; Glycation End Products, Advanced; Human Vascular Endothelial Cells; Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ ; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To investigate mechanism for accelerated atherosclerosis in diabetic patients, effect of advanced glycosylation end-product (AGE) on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) mRNA was observed in cultured human vascular endothelial cells (ECV304). **Methods** The ECV304 cells were exposed to AGE-modified bovine serum albumin (AGE-BSA) of 200 mg/L (glycated with glucose of 0, 20, 50, 80 mmol/L) for 24 h, or incubated with AGE-BSA (50 mmol/L, 200 mg/L) for 0, 12, 24, 36, 48, 72 h, and were treated by AGE-BSA (50, 100, 200, 400 mg/L) for 24 h. Expression of PPAR γ mRNA in ECV304 cells was measured by RT-PCR with β -actin as internal standard. **Results** The expressions of PPAR γ mRNA were decreased by AGE-BSA incubated with glucose concentration of 20, 50, 80 mmol/L ($P < 0.001$) and depressed by AGE-BSA (50, 100, 200, 400 mg/L), respectively. After intervention of AGE-BSA for periods of 12, 24, 36, 48, 72 h, PPAR γ mRNA expression was decreased markedly ($P < 0.001$). **Conclusion** AGE-BSA could decrease the expression of PPAR γ mRNA in cultured human vascular endothelial cells, which might be partly involved in atherogenesis in diabetic patients.

糖尿病患者易患动脉粥样硬化, 持久的高血糖状态会导致体内许多结构和功能蛋白质、脂质等糖基化, 经过一系列非酶促反应, 最终形成具有高度活性的糖基化终产物 (advanced glycation end-product, AGE), 在动脉粥样硬化的发生与发展中起重要作用

用^[1,2]。近期研究表明, 过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 在内皮细胞、单核-巨噬细胞、血管平滑肌细胞、泡沫细胞以及动脉粥样硬化病灶均有表达^[3]。PPAR γ 受体激动剂可减轻糖尿病小鼠动脉粥样硬化病变^[4], 可显著降低糖尿病病人颈动脉内膜中膜厚度^[5], 对动脉粥样硬化危险因素具有保护效应, 影响动脉粥样硬化发生发展过程。然而, PPAR γ 基因的表达调控机制以及相关基因间的相互影响仍不清楚。本研究试图从糖基化终产物影响 PPAR γ 基因

[收稿日期] 2003-08-11 [修回日期] 2004-02-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30070300)资助

[作者简介] 刘勇, 医学硕士, 天津铁路中心医院心内科主治医师。刘乃丰, 医学博士, 内科学主任医师, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, 研究方向为动脉粥样硬化; 联系电话为 025-83272001, 传真为 025-83272010, E-mail 为 liunf@seu.edu.cn。

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 材料

人血管内皮细胞株 (ECV304, 上海细胞生物研究所), 牛血清白蛋白 (BSA, Amresco 公司), D-葡萄糖 (分析纯, 重庆北培化学试剂厂), M199 培养基 (低糖, GIBCO 公司), 新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所), HEPES (Amresco 公司), DEPC (Sigma 公司), Trizol (Sangon 公司), M-MLV 逆转录酶、5 倍浓缩 M-MLV 逆转录缓冲液 (Promega 公司), Taq DNA 聚合酶、Taq 聚合酶缓冲液、MgCl₂ 溶液 (上海 Promega 公司), dNTP、Oligo (DT) 18 (Sangon 公司), RNasin (SABC 公司), DNA ladder (华美公司), 细胞培养板 (六孔, NUNC 公司), CO₂ 恒温细胞培养箱 (NAPCO 公司), 基因扩增仪 (BIO-RAD 公司), SCR-300 电泳仪 (上海万达生物工程公司)。

1.2 糖基化终产物修饰牛血清白蛋白的制备

在 pH 7.4 的 PBS 溶液中加入牛血清白蛋白, 使终浓度为 5.0 g/L, 然后加入一定量葡萄糖使其终浓度分别为 0、20、50 和 80 mmol/L, 过滤除菌后 37 °C 无菌孵育。使用前以 pH 7.4 的 PBS 溶液透析除去未结合的葡萄糖, 对照组 BSA 不含葡萄糖, 其余步骤完全相同。

1.3 人血管内皮细胞的培养

细胞株在含 20% 小牛血清的 M199 培养基中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内静置培养, 细胞长满后以 0.125% 胰蛋白酶室温下消化传代, 将处于对数生长期的细胞移入 6 孔板中, 待细胞长到次融合状态 (约 2×10^6 个细胞) 后无血清培养 24 h, 然后分组干预, 第 1 组分别加入不同浓度葡萄糖孵育的 AGE-BSA (浓度为 200 mg/L) 干预 24 h, 第 2 组加入葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的不同浓度的 AGE-BSA (50、100、200 和 400 mg/L) 分别干预 24 h, 第 3 组加入葡萄糖浓度为 50 mmol/L 孵育的 AGE-BSA (浓度为 200 mg/L) 分别干预 0、12、24、36、48 和 72 h。

1.4 内皮细胞总 RNA 的提取

取干预好的细胞, 留取上清, 直接于 6 孔培养板 (直径 3.5 cm) 中提取内皮细胞总 RNA。用 4 °C PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每孔加入 1 mL Trizol, 然后分别以氯仿、异丙醇和无 RNA 酶 75% 乙醇提取内皮细胞总 RNA。紫外分光光度计测定 A260/280 nm 值均在 1.7 以上。

1.5 逆转录聚合酶链反应

1.5.1 引物序列 PPAR γ ^[6] 上下游引物分别为 5'-GGAAAGACAACAGACAAATCAC-3' 和 5'-TGCATT-GAACCTCACAGCAAAG-3', 由上海捷倍思基因技术有限公司合成, β -actin 引物^[7] 为 5'-GGTCAGAAG-GATTCCTATGTG-3' 和 5'-ATTGCCAATGGT-GATGACCTG-3', 由上海生物工程公司合成。扩增产物长度分别为 414 bp 和 615 bp。

1.5.2 逆转录聚合酶链反应步骤 以 2 μ g 总 RNA 为模板, 加入 Oligo (DT) 18、DEPC 水、M-MLV 5 \times Buffer、dNTP、RNasin 及 M-MLV 逆转录酶, 总反应体系 25 μ L, 进行逆转录。PCR 反应体系及反应条件: cDNA、10 \times Buffer、MgCl₂、dNTP、PPAR γ 引物、 β -actin 引物、Taq DNA 聚合酶, 总反应体系 50 μ L。先 94 °C 2 min, 然后 94 °C 1 min \rightarrow 62 °C 1 min \rightarrow 72 °C 1 min 进行 30 次循环扩增, 72 °C 延伸 8 min。

1.5.3 聚合酶链反应产物的检测与分析 取 6 μ L PCR 产物与 1 μ L 上样缓冲液混合后上样于 1.7% 琼脂糖凝胶, 同时以 5 μ L 100 bp DNA 分子质量标记点样, 以 0.5 \times TBE 为缓冲液电泳, 用 Image Master VDS 扫描分析仪扫描凝胶, 以 β -actin 为内参照, 用 Total Lab 分析软件对 RT-PCR 结果进行吸光度分析, 并对 PCR 产物进行测序, 与基因库查到的序列对照, 核对无误, 进一步证实了 PCR 产物的正确性。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-Way ANOVA, 组间比较采用 Newmann-Keuls 方法, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 葡萄糖修饰的糖基化终产物牛血清白蛋白对血管内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 基因表达的影响

以 BSA 及 20、50、80 mmol/L 葡萄糖修饰的 AGE-BSA (200 mg/L) 对血管内皮细胞干预 24 h, 发现随着孵育 AGE-BSA 葡萄糖浓度的升高, PPAR γ mRNA 的表达减少。与 BSA 组比较, 均有显著性差异 (图 1, Figure 1)。

2.2 不同浓度的糖基化终产物牛血清白蛋白对血管内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 基因表达的影响

基础状态下, 血管内皮细胞表达一定量的 PPAR γ mRNA, BSA 对 PPAR γ mRNA 表达无明显影

响。随着 AGE-BSA 的浓度 (50、100、200 和 400 mg/L) 不断升高, 干预 24 h 后 PPAR γ mRNA 的表达水平呈逐步降低趋势(图 2, Figure 2)。

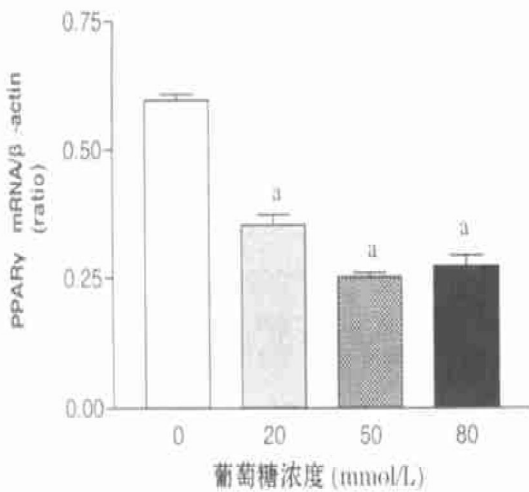


图 1. 不同浓度葡萄糖孵育的糖基化终产物牛血清白蛋白对内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响 $n=3, \bar{x} \pm s$; a: $P < 0.001$, 与对照组比较。

Figure 1. Effects of AGE-BSA incubated with different glucose concentrations on expression of PPAR γ mRNA in cultured ECV304

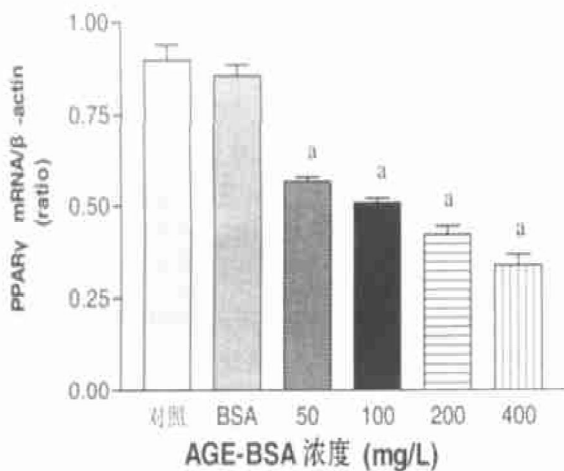


图 2. 不同浓度的糖基化终产物牛血清白蛋白对内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响 $n=3, \bar{x} \pm s$; a: $P < 0.001$, 与对照组比较。

Figure 2. Effects of AGE-BSA on expression of PPAR γ mRNA in cultured hVEC

2.3 同一葡萄糖浓度修饰的糖基化终产物牛血清白蛋白作用不同时间对内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 基因表达的影响

以 50 mmol/L 葡萄糖修饰的 AGE-BSA (200 mg/L) 对内皮细胞分别干预 0、12、24、36、48、72 h, 发现随干预时间延长, PPAR γ mRNA 的表达水平呈逐步

降低趋势, 与未干预组相比, 有显著性差异(图 3, Figure 3)。

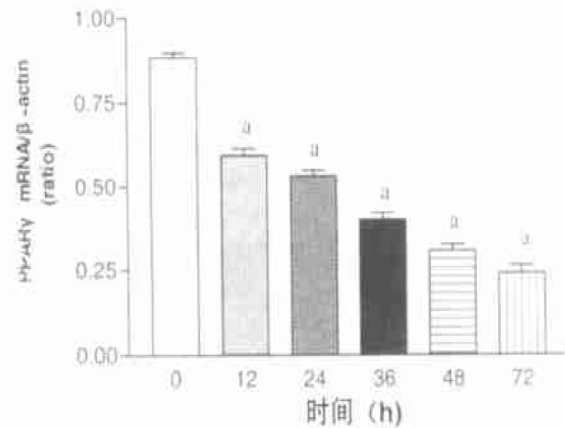


图 3. 相同浓度糖基化终产物牛血清白蛋白作用不同时间对内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响 $n=3, \bar{x} \pm s$; a: $P < 0.001$, 与对照组比较。

Figure 3. Decreased expression of PPAR γ mRNA in cultured HVEC exposed to AGE-BSA for various incubating periods

3 讨论

近年来, 各国糖尿病发病率不断上升。糖尿病血管并发症是糖尿病最常见也是最严重并发症之一。在诸多可能机制中, 蛋白质非酶糖化越来越受到重视。动脉粥样硬化病灶中可检出 AGE^[8,9]。我们也发现, 糖尿病小鼠血清 AGE 水平显著增高, 且随糖尿病病程延长而增高^[10]。糖尿病人血清中 AGE 浓度升高, 而且冠心病血清中 AGE 浓度也明显升高。AGE 增强大鼠主动脉血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因表达^[11]。PPAR γ 属于核受体超家族中 PPAR 家族的成员, 该家族是一类由配体激活的核转录因子, 属 ①型 核受体超家族^[12]。近期研究表明, PPAR γ 激动剂不仅抑制内皮细胞增殖^[13]和迁移^[14], 且从细胞粘附^[15]和血管形成^[16]方面影响内皮细胞功能。目前大部分研究都是针对相应配体激活 PPAR 核蛋白而进行间接研究, 本实验则直接观察 AGE 对内皮细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响。

Sartippour 等^[17]发现, 高糖抑制单核细胞源巨噬细胞 PPAR γ mRNA 表达, 糖尿病病人单核细胞源巨噬细胞 PPAR γ mRNA 表达也匹配照组减低。作为胰岛素增敏剂的噻唑烷二酮类化合物, 包括曲格列酮、罗格列酮、塞格列酮、英格列酮、吡格列酮等都是人工合成的 PPAR γ 激动剂。罗格列酮可以明显减轻糖尿病和非糖尿病载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉粥样硬化病变^[4]。临床上也已观察到, 糖尿病病人用曲

格列酮治疗 3 个月,可显著降低颈动脉内膜厚度^[5],进一步证实 PPAR γ 对动脉粥样硬化危险因素有保护效应。研究发现一些炎症因子可抑制 PPAR γ mRNA 的表达。本实验发现,AGE-BSA 减少内皮细胞 PPAR γ mRNA 表达,且这种效应具有时间和浓度依赖性。我们推测 AGE 减少 PPAR γ 表达可能一定程度上参与了糖尿病易患动脉粥样硬化过程。深入研究 AGE 与 PPAR γ 相互作用,将为深入了解糖尿病易患动脉粥样硬化机制及合理防治提供新思路。

[参考文献]

- [1] 余路,邱鸿鑫,陈文缘,戎健,陈婉蓉,祝继华,等. 糖尿病大鼠糖基化终产物与主动脉细胞外基质成份的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 311-314
- [2] 严金川,刘乃丰. 维生素 E 对糖基化终产物刺激大鼠主动脉平滑肌细胞信号转导物甘油二酯的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 54-56
- [3] Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 1998, **93** (2): 241-252
- [4] Levi Z, Shaish A, Yacov N, Levkovitz H, Trestman S, Gerber Y, et al. Rosiglitazone (PPAR γ agonist) attenuates atherogenesis with no effect on hyperglycaemia in a combined diabetes-atherosclerosis mouse model. *Diabetes Obes Metab*, 2003, **5** (1): 45-48
- [5] Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, **83**(5): 1 818-820
- [6] Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ does not inhibit IL-6 or TNF- α responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol*, 2000, **164** (2): 1 046-054
- [7] Izumi S, Hirai K, Miyamasu M, Takahashi Y, Misaki Y, Takaishi T, et al. Expression and regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by human eosinophils. *Eur J Immunol*, 1997, **27** (4): 816-824
- [8] Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, et al. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1998, **141** (1): 61-75
- [9] Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 1995, **147** (3): 654-667
- [10] 孙子林,刘乃丰,孙桂菊,童嘉毅,王伯荣,刘必成. 糖尿病小鼠血清糖基化终产物水平增高. *中国糖尿病杂志*, 2000, **8** (5): 315-320
- [11] 贾庆哲,刘乃丰. 糖基化终产物对大鼠主动脉血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 297-299
- [12] 叶平. 过氧化体增殖物激活型受体对心肌能量代谢调控的病理生理机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 81-84
- [13] de-Dios ST, Hannan KM, Dille RJ, Hill MA, Little PJ. Troglitazone, but not rosiglitazone, inhibits Na/H exchange activity and proliferation of macrovascular endothelial cells. *J Diab Comp*, 2001, **15** (3): 120-127
- [14] Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stavowy P, Blaschke F, et al. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293** (5): 1 431-437
- [15] Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman B M, et al. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ suppresses proinflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (37): 34 176-181
- [16] Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 1999, **274** (13): 9 116-121
- [17] Sartippour MR, Remier G. Differential regulation of macrophage peroxisome proliferator-activated receptor expression by glucose: role of peroxisome proliferator-activated receptors in lipoprotein lipase gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (1): 104-110

(此文编辑 曾学清,胡必利)