

糖基化终产物促进 U937 巨噬细胞高密度脂蛋白受体的表达

彭 扬, 张 锦, 李 莉, 孟 馨, 王涤非, 周一军, 侯 率

(中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 糖基化终产物促进高密度脂蛋白受体表达; 半定量逆转录聚合酶链反应; 糖基化终产物; 高密度脂蛋白受体; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究糖基化终产物对 U937 巨噬细胞高密度脂蛋白受体表达的影响。方法 将糖基化终产物与诱导分化 48 h 后的 U937 细胞共同孵育, 用免疫细胞化学法和半定量逆转录聚合酶链反应检测细胞清道夫受体 BI 蛋白及 mRNA 的表达。结果 免疫细胞化学法检测 100、200 和 400 mg/L 糖基化终产物刺激后 U937 巨噬细胞清道夫受体 BI 蛋白表达的平均积分光密度值分别为 18.94 ± 3.56 、 27.86 ± 4.39 及 35.08 ± 2.37 , 较牛血清白蛋白组明显升高 (13.76 ± 3.74 , $P < 0.05$); 400 mg/L 糖基化终产物作用 6、12、24 及 48 h 后, 细胞清道夫受体 BI 表达的平均积分光密度值分别为 16.87 ± 5.65 、 25.68 ± 6.97 、 35.08 ± 8.37 及 39.68 ± 9.37 , 较 0 h 组明显升高 (12.02 ± 3.47 , $P < 0.05$)。半定量逆转录聚合酶链反应结果显示, 400 mg/L 牛血清白蛋白及 100、200 和 400 mg/L 糖基化终产物刺激后细胞清道夫受体 BI mRNA 相对表达量分别是 0.32 ± 0.03 、 0.53 ± 0.05 、 0.64 ± 0.04 和 0.89 ± 0.05 ; 400 mg/L 糖基化终产物作用 0、6、12、24 及 48 h 后, U937 巨噬细胞清道夫受体 BI mRNA 相对表达量分别为 0.41 ± 0.01 、 0.62 ± 0.05 、 0.80 ± 0.08 、 0.87 ± 0.05 、 1.24 ± 0.13 。结论 糖基化终产物可增加 U937 巨噬细胞高密度脂蛋白受体蛋白和 mRNA 的表达, 且呈浓度和时间依赖性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Advanced Glycation End Products Increases U937 Macrophages Expression of Scavenger Receptor Class B Type I

PENG Yang, ZHANG Jin, LI Li, MENG-Xin, WANG Di-Fei, ZHOU Yi-Jun, and HOU Shuai

(Department of Endocrine, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products; High Density Lipoprotein Receptor; Macrophages; Atherosclerosis; Immunocytochemical Method; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To learn the effects of advanced glycation end products (AGE) on expression of scavenger receptor BI (SR-BI) in U937 macrophages. **Methods** U937 macrophages differentiated for 48 h were incubated with AGE. Immunocytochemical method and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect SR-BI protein and mRNA levels. **Results** Immunocytochemistry showed that after exposure of U937 macrophages to 100, 200 and 400 mg/L AGE, the average integrated optical density values of SR-BI protein expression were 18.94 ± 3.56 , 27.86 ± 4.39 and 35.08 ± 2.37 respectively, significantly higher than that in BSA group (13.76 ± 3.74 , $P < 0.05$), the average integrated optical density values of SR-BI protein expression in U937 macrophages following 400 mg/L AGE for 6, 12, 24, 48 h were 16.87 ± 5.65 , 25.68 ± 6.97 , 35.08 ± 8.37 and 39.68 ± 9.37 , higher than that in 0 h group (12.02 ± 3.47 , $P < 0.05$). RT-PCR showed that expression of SR-BI mRNA was 0.32 ± 0.03 , 0.53 ± 0.05 , 0.64 ± 0.04 and 0.89 ± 0.05 in 400 mg/L BSA, 100, 200 and 400 mg/L AGE groups. SR-BI mRNA expression in U937 macrophages following 400 mg/L AGE for 0, 6, 12, 24, 48 h was 0.41 ± 0.01 , 0.62 ± 0.05 , 0.80 ± 0.08 , 0.87 ± 0.05 , 1.24 ± 0.13 , respectively. **Conclusions** U937 macrophages that were incubated in medium containing AGE showed an increase in the expression of SR-BI protein and mRNA in a time- and dose-dependent manner.

动脉粥样硬化是动脉壁的一种退行性变, 与动脉壁细胞内外过多的脂质积聚有关。其中单核细胞通过内皮细胞间的间隙移入内膜下并分化成巨噬细

胞, 巨噬细胞将体内过剩的脂质吞噬并变成泡沫细胞, 泡沫细胞聚集, 形成斑块是动脉粥样硬化发生、发展的主要病理过程。近年来发现清道夫受体 BI (scavenger receptor BI, SR-BI), 即高密度脂蛋白受体 (high density lipoprotein receptor, HDLR) 可以介导胆固醇的跨膜双向流动, 在清除血管壁细胞及血循环中多余的胆固醇过程中起到重要作用, 被誉为是一种抗动脉粥样硬化因子^[1]。但对 SR-BI 的调控机制的研究目前尚存在争论。糖尿病是动脉粥样硬化的易

[收稿日期] 2004-08-15 [修回日期] 2005-01-08

[资助项目] 辽宁省自然科学基金(9910500302)资助

[作者简介] 彭扬, 博士研究生, 讲师, 主要从事糖尿病大血管并发症与脂蛋白受体关系方面的研究 E-mail 为 pengyangsy@yahoo.com.cn。通讯作者张锦, 教授, 博士研究生导师, 长期从事糖尿病大血管并发症方面的研究。李莉, 医学博士, 讲师, 主要从事糖尿病大血管并发症与脂代谢紊乱关系方面的研究。

患因素之一,研究表明长期高血糖状态下蛋白质非酶糖基化形成的糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)可能通过多种途径促进动脉粥样硬化的发生、发展^[2,3]。本研究旨在观察 AGE 对 U937 巨噬细胞 SR-BI 蛋白及 mRNA 表达的影响,从而进一步探讨 AGE 及 SR-BI 在糖尿病性动脉粥样硬化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞株 U937 细胞购自中科院上海细胞所, 1640 培养基、Trizol(Gibco), 胎牛血清(天津), 兔抗 SR-BI 多克隆抗体(美国 Novus)、免疫组织化学 SP 试剂盒(福建迈新), 佛波酯(PMA, Sigma), 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(上海生工), SR-BI 引物(上海博亚)。

1.2 糖基化终产物的制备及分组

按照文献[4]的方法,将 2.0 g 牛血清白蛋白(BSA)溶于 10 mL 磷酸钠缓冲液(0.5 mol/L, pH7.4)并加入 3.0 g D-葡萄糖, 0.22 μ m 微孔滤膜除菌后于 37℃ 闭光孵育 90 天, PBS 透析除去未结合的葡萄糖。非糖基化终产物 BSA 作为对照同时制备, 样品中不含 D-葡萄糖, 其余条件一致。测定 AGE 及 BSA 组蛋白含量, 并经过荧光分光光度计鉴定结合 AGE 含量, 两组分别为 87.2 ku/g 蛋白和 2.1 ku/g 蛋白。

1.3 细胞培养

U937 细胞在 10% FBS-RPMI1640 培养基中悬浮生长, 每 2~3 天传代一次。加入 0.1 μ mol/L 佛波酯诱导分化 48 h。实验中对照组加入含有 400 mg/L BSA 的培养基; AGE 组分别加入含有 100、200 及 400 mg/L 的培养基作用 24 h; 以及 400 mg/L 的 AGE 作用 0、6、12、24 及 48 h。每组实验重复三次。

1.4 免疫细胞化学法 处理细胞用 PBS 洗 2 次, 涂于干净的被有 1% 多聚赖氨酸的玻璃片上, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 按照试剂盒说明书步骤操作, 一抗以 1:800 稀释, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张图片任意选择 30 个细胞, 经 Meta Morph Imaging System 软件测细胞平均积分光密度值。

1.5 半定量逆转录聚合酶链反应

根据文献[5]设计引物, 人 SR-BI 上游引物为 5'-TGACCGGTGGATGTCCAGGAAC-3', 下游引物为 5'-TGATGATGGAGAATAAGCCCAT-3' (696 bp, 基因库序列号 Z22555)。人 β -actin 上游引物为 5'-ACACT-

GTGCCCATCTACGAGGGG-3', 下游引物为 5'-ATGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3' (366 bp)。用 Trizol 试剂提取各处理组细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量, 取 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系 25 μ L; 扩增条件为 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 60 s 条件下循环 28 次, 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 长波紫外灯下观测照相, 电泳结果以 Quantity One(美国 Bio-Rad 公司)图像分析系统进行电泳条带光密度分析, 计算 SR-BI 产物与 β -actin 蛋白产物的光密度积分比例作为相对 SR-BI mRNA 表达水平。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据处理采用 SPSS10.0 统计软件中的 One-way ANOVA 统计方法进行 *F* 检验及 Student *t* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 分化细胞的形态及其蛋白表达变化

U937 单核细胞呈圆形、悬浮生长; 经 0.1 μ mol/L 佛波酯诱导分化后, 细胞停止增殖, 变为贴壁生长, 且伸展伪足, 成巨噬细胞外形(图 1, Figure 1)。诱导分化 48 h 细胞表面 SR-BI 蛋白表达明显增多(数据略), 因此采用分化 48 h 细胞进行实验。

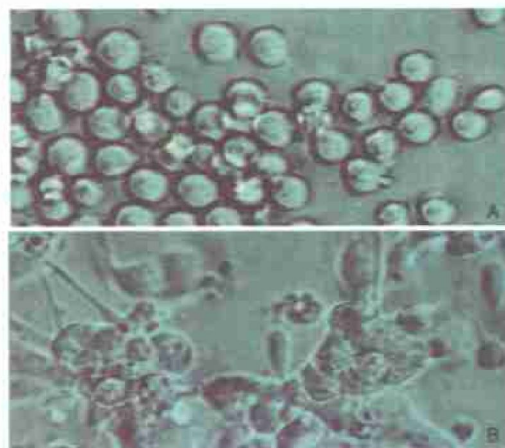


图 1. 佛波酯诱导前(A)及诱导 48 h(B)的 U937 细胞 ($\times 400$)
Figure 1. U937 monocytes and U937 macrophages differentiating for 48 h

2.2 糖基化终产物对 U937 细胞清道夫受体 BI 蛋白表达的影响

不同浓度 AGE 组与 BSA 组之间 SR-BI 蛋白表

达具有显著的统计学差异($P < 0.05$; 表 1, Table 1), 而且随着 AGE 浓度升高 SR-BI 蛋白表达也逐渐增加。同一浓度 AGE 随着刺激时间延长 U937 巨噬细胞 SR-BI 蛋白表达也逐渐增加(表 2, Table 2)。

2.3 糖基化终产物对 U937 细胞清道夫受体 BI mRNA 表达的影响

100、200 和 400 mg/L AGE 刺激 24 h 后细胞 SR-BI mRNA 相对表达量较 BSA 组明显增多, 而且不同浓度间 SR-BI mRNA 相对表达量的差异也具有显著性($P < 0.05$; 表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2); 400 mg/L AGE 作用 6、12、24 及 48 h 后, U937 细胞 SR-BI mRNA 相对表达量较 0 h 组明显升高($P < 0.05$)。而且随着时间的延长 SR-BI mRNA 相对表达量逐渐增多(表 2 和图 3, Table 2 and Figure 3)。

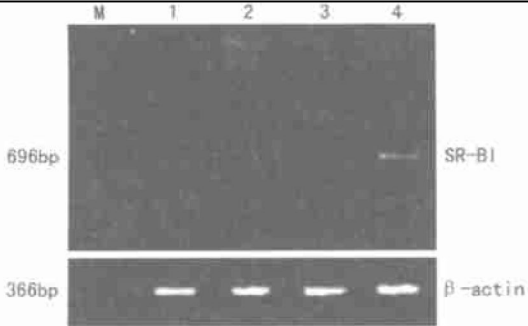


图 2. 不同浓度糖基化终产物对 U937 巨噬细胞清道夫受体 BI mRNA 表达的影响 1~4 分别为 BSA 组和 100、200 及 400 mg/L 糖基化终产物组。

Figure 2. SR-BI mRNA expression in U937 macrophages after incubating with different concentrated AGE for 24 h

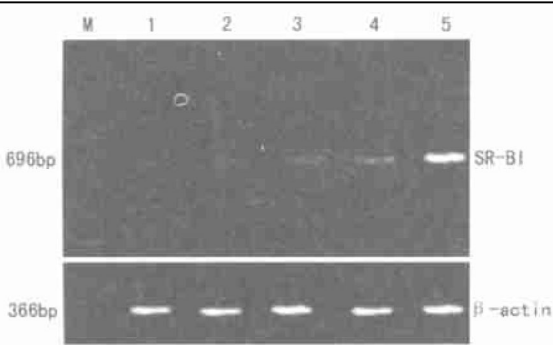


图 3. 400 mg/L 糖基化终产物孵育不同时间对 U937 巨噬细胞清道夫受体 BI mRNA 表达的影响 1~5 分别 0、6、12、24 及 48 h。

Figure 3. SR-BI mRNA expression in U937 macrophages after incubating with 400 mg/L AGE at different times

3 讨论

糖尿病患者发生动脉粥样硬化的危险性较正常人增加 3~4 倍。研究表明, 长期高血糖状态下蛋白

表 1. 不同浓度糖基化终产物对 U937 巨噬细胞清道夫受体 BI 蛋白及 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1. Effect of different concentrating AGE on SR-BI protein and mRNA expression in U937 macrophages

分组	蛋白	mRNA
牛血清白蛋白	13.76 \pm 3.74	0.32 \pm 0.03
100 mg/L 糖基化终产物	18.94 \pm 3.56 ^a	0.53 \pm 0.05 ^a
200 mg/L 糖基化终产物	27.86 \pm 4.39 ^{ab}	0.64 \pm 0.04 ^{ab}
400 mg/L 糖基化终产物	35.08 \pm 2.37 ^{abc}	0.89 \pm 0.05 ^{abc}

a: $P < 0.05$, 与牛血清白蛋白组相比; b: $P < 0.05$, 与 100 mg/L 糖基化终产物组相比; c: $P < 0.05$, 与 200 mg/L 糖基化终产物组相比。

表 2. 糖基化终产物处理不同时间对 U937 巨噬细胞清道夫受体 BI 蛋白及 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2. Effect of AGE with different incubating time on SR-BI protein and mRNA expression in U937 macrophages

时间	蛋白	mRNA
0 h	12.02 \pm 3.47	0.41 \pm 0.01
6 h	16.87 \pm 5.65 ^a	0.62 \pm 0.05 ^a
12 h	25.68 \pm 6.97 ^{ab}	0.80 \pm 0.08 ^a
24 h	35.08 \pm 8.37 ^{abc}	0.87 \pm 0.05 ^{ab}
48 h	39.68 \pm 9.37 ^{abc}	1.24 \pm 0.13 ^{abc}

a: $P < 0.05$, 与 0 h 组相比; b: $P < 0.05$, 与 6 h 组相比; c: $P < 0.05$, 与 12 h 组相比。

质非酶糖基化形成的 AGE 可能通过增加粘附分子的表达、促进血栓形成及诱导单核/巨噬细胞和内皮细胞表达组织因子等作用促使动脉粥样硬化发生、发展^[2,3]。因此, AGE 已经被公认为是致糖尿病血管病变的主要因素而且可能是糖尿病患者动脉粥样硬化发展迅速的重要原因。因为多数清道夫受体作为 AGE 的受体, 在介导胆固醇酯在巨噬细胞内积聚而加速动脉粥样硬化斑块的发展中起到重要的作用^[6], 而近来发现 SR-BI, 一种 HDLR, 是抗动脉粥样硬化因子之一, 它也和其它清道夫受体一样是多配体的受体, 其中 AGE 也是 SR-BI 的配体之一。以前的研究发现, U937 单核细胞表达少量 SR-BI, 经过氟波酯诱导分化 48 h 的巨噬细胞 SR-BI 表达量明显增多。因此本研究应用诱导分化 48 h 的 U937 巨噬细胞进行实验。结果发现, 加入 AGE 刺激后, U937 巨噬细胞 SR-BI 蛋白的表达量进一步增加, 细胞 SR-BI mRNA 也相应增加, 且具有浓度和时间依赖性。这种促进作用在转录及转录后水平同时出现。已有研究表明, SR-BI 属于 CD36 超家族中的一员, 与 CD36 不同的是它与高密度脂蛋白具有较高的亲

和性而且介导选择性脂质摄取的机制也不同于传统的低密度脂蛋白受体。然而在对 AGE 刺激后 SR-BI 的表达模式上与其它的清道夫受体相似。另外,在人和大鼠动脉粥样硬化斑块内充满脂质的巨噬细胞中也发现 SR-BI 表达增加^[7]。AGE 促进巨噬细胞 SR-BI 表达的原因目前尚不清楚,可能与以下因素有关。单核细胞经氟波酯处理后部分细胞可以转化为泡沫细胞,而且加入 AGE 后形成的泡沫细胞数量较单纯加入氟波酯进一步增加^[5],因此,AGE 促进 U937 巨噬细胞表面 SR-BI 表达可能与氟波酯诱导分化后 SR-BI 表达增加属于同一种调控机制。U937 巨噬细胞在受到 AGE 刺激后泡沫细胞增多,细胞内外胆固醇梯度进一步增加,故细胞 SR-BI 表达增加可能加强非酯化胆固醇通过 HDL 从泡沫细胞中移出,因为对于其他类型细胞的研究也证实 SR-BI 的表达水平与 HDL 胆固醇的外流率直接相关^[8]。正是通过这种调控机制来平衡巨噬细胞内脂质含量,从而延缓甚至逆转动脉粥样硬化的发展、演变。另一种可能是 SR-BI 也和其他清道夫受体一样,可以与多种配体结合^[9],如 AGE、ox-LDL、ac-LDL、LDL 等,增加动脉壁巨噬细胞内胆固醇聚集,对泡沫细胞形成起到促进作用。

总之,AGE 能够促进 U937 巨噬细胞 SR-BI 蛋白及 mRNA 表达增加并呈浓度和时间依赖性,这很可

能与泡沫细胞形成有关。与其他配体相比 HDL 与 SR-BI 具有较高的亲和力,然而在 AGE 浓度较高的情况下是否与 HDL 竞争而削弱其胆固醇外流的作用还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*, 1997, **272** (34): 20 982-985
- [2] 刘勇,刘乃丰. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 135-138.
- [3] 郑超,文格波. 晚期糖基化终产物在糖尿病血管并发症中的作用机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 270-272
- [4] Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 2001, **276** (5): 3 195-202
- [5] Iwashima Y, Eto M, Hata A, Kaku K, Horiuchi S, Ushikubi F, et al. Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **277** (2): 368-380
- [6] Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 1983, **52** (2): 223-261
- [7] Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, Ohya T, Matsuura F, Tsukamoto K, et al. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 1999, **85** (1): 108-116
- [8] Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Qughenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (28): 17 551-557
- [9] Krieger M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest*, 2001, **108** (6): 793-797 (此文编辑 文玉珊)

•会议信息•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0154-01

第三届心房颤动新进展国际研讨会暨第七届导管消融治疗演示会

时间:2005 年 7 月 22 日~ 25 日

地点:大连星海国际会展中心

主办单位:中华医学会心电生理和起搏分会和中国生物医学工程学会心脏起搏与电生理分会

征文内容:心房颤动机制的基础和临床研究;心房颤动的流行病学;心房颤动的心内电生理研究;心房颤动的药物治疗、导管消融治疗、起搏治疗和外科治疗;心房颤动的病理和病因学;有关心房颤动的学术观点和争鸣。

截稿日期:2005 年 6 月 30 日

会议费用:会务费 500 元,住宿费每天 140 元/人。

继续教育学分:参加者将授予国家一类继教学分 12 分。

注册和回函地址:辽宁省大连市中山路 222 号,大连医科大学附属第一医院心脏中心

联系人:杨延宗;电话:0411-83632383;传真:0411-83622844

电子信箱:dayiep@vip.sina.com

网址: <http://www.dlheart.com>