

高糖对血管平滑肌细胞 CD36 表达的诱导作用

薛嘉虹, 袁祖贻, 赵 艳, 万招飞

(西安交通大学医学院附属第一医院心内科, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高糖; 血管平滑肌细胞; CD36; 泡沫细胞

[摘要] 目的 探讨高糖对人血管平滑肌细胞清道夫受体 CD36 表达的影响及对肌源性泡沫细胞产生的作用。方法 体外用不同浓度的葡萄糖(5、11、20 及 30 mmol/L)干预人脐血管平滑肌细胞 1~7 天, 实时定量聚合酶链反应及 Western blot 检测血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达, 油红 O 染色测定血管平滑肌细胞内脂质含量。结果 正常状态下血管平滑肌细胞存在微弱的 CD36 表达。与 5 mmol/L 葡萄糖组比较, 血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白水平的表达随着葡萄糖浓度的增加和干预时间的延长而增加($P < 0.05$)。同时, 细胞内脂质含量随着 CD36 表达增加而逐渐增加。结论 高糖能促进血管平滑肌细胞 CD36 的表达, 并促进血管平滑肌细胞内脂质聚集, 有助于肌源性泡沫细胞形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

High Glucose Induces the Expression of CD36 in Vascular Smooth Muscular Cells

XUE JiaHong, YUAN ZuYi, ZHAO Yan, and WAN ZhaoFei

(Department of Cardiology, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Vascular Smooth Muscle Cells; CD36; Foam Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of high glucose on CD36 expression in human vascular smooth muscle cells (VSMC) and on VSMC-derived foam cell formation. **Methods** VSMC was incubated with different dose of glucose (5, 11, 20 and 30 mmol/L) for one to seven days. Real time PCR and Western blot were used to measure the expression of CD36 in glucose treated VSMC; Oil red O staining was used to measure the intracellular lipid accumulation. **Results** CD36 was expressed in human VSMC. The expression of CD36 mRNA and protein was induced by glucose in a dose- and time-dependent manner. Correspondingly, lipid droplets in the cytoplasm of VSMC were detectable and were gradually increased. **Conclusion** High glucose enhances the expression of CD36 and intracellular lipid droplets accumulation in VSMC, then inducing VSMC-derived foam cell formation.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是2型糖尿病患者致死致残的重要原因,其发生的确切机制尚不完全清楚。其中血糖增高介导的多种病理过程在糖尿病血管并发症的发病中起重要作用。研究发现,高糖能诱导单核巨噬细胞表面清道夫受体(scavenger receptor, SR)如CD36、SR-A和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)的表达,进而促进大量脂质在细胞内堆积,促进泡沫细胞形成^[1-3]。在这些清道夫受体中,CD36是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的主要配体,可以调节大约50%的ox-LDL进入细胞^[4]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)作为泡沫细

胞的另一个来源,已有的研究表明,高糖能通过多种机制刺激VSMC增殖^[5,6]。本研究以人脐动脉VSMC为研究对象,探讨高糖作用下血管平滑肌细胞清道夫受体CD36表达的变化以及肌源性泡沫细胞形成的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐动脉VSMC来自美国ScienCell公司;DMEM培养基购自Gibico公司;胎牛血清购自Hyclon公司;D-葡萄糖和油红O购自Sigma公司;Trizol购自Invitrogen公司;逆转录试剂盒购自Fermentas公司;SYBR预混的实时定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司;RIPA裂解液购自碧云天生物有限公司;大鼠抗人CD36单克隆抗体购自R&D公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗购自北京中杉生物技术有限公司;胆固醇分析试剂盒购自Cayman公司;引物由北京三博远志公司合成;其它试剂均为国产分析纯。

[收稿日期] 2007-10-19 [修回日期] 2008-03-02

[作者简介] 薛嘉虹, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发生与发展机制, E-mail 为 xjh1224@163.com。通讯作者袁祖贻, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发生与发展机制, E-mail 为 zuyiyuan@mail.xjtu.edu.cn。

1.2 细胞培养

将 VSMC 培养在含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基(含有 D-葡萄糖 5 mmol/L)中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,取 6~10 代细胞进入实验。随机分组: 30 mmol/L D-葡萄糖干预 VSMC 1、3、5 及 7 d,在低糖 DMEM 培养基中培养 7 d 的 VSMC 作为对照组;④不同浓度的 D-葡萄糖(分别为 5、11、20 及 30 mmol/L)干预 VSMC 7 d, 5 mmol/L D-葡萄糖联合 25 mmol/L D-甘露醇作为 30 mmol/L 渗透压对照组。干预期间使用罗氏血糖仪监测培养基中葡萄糖的浓度,以上所有实验均重复 4 次。

1.3 RNA 提取及逆转录

收集葡萄糖干预后的 VSMC, Trizol 一步法提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 纯度 (A_{260}/A_{280} 值)均大于 1.8。根据逆转录试剂盒说明书,取 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA。

1.4 实时定量聚合酶链反应

采用 SYBR Green I 嵌合荧光法,以 GAPDH 为内参照,测量 VSMC 的 CD36 mRNA 的表达。扩增 CD36 基因的引物序列上游为 5'-GCA CTG AGG AAG ATG CTG AAA-3',下游为 5'-AGT TCC TGG AAG GTC TTG TTC AC-3',扩增片段大小为 197 bp,基因编号为 NM-001001548,引物浓度为 50 nmol/L;扩增 GAPDH 基因的引物序列上游为 5'-TCA TCC CTG CCT CTA CTG-3',下游为 5'-TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3',扩增片段大小为 175 bp,基因编号为 NM-002046。反应条件为 95℃温育 10 s, 95℃变性 5 s, 54℃退火 20 s, 72℃延伸 12 s,共 40 个循环,每个反应做 3 个复孔。扩增完毕后行溶解曲线分析,溶解曲线在产物 T_m 处表现为单峰,表明扩增特异性良好。因目的基因与内参基因的扩增效率一致,实时定量 PCR 统计分析采用 2 ^{$\Delta\Delta Ct$} 法, $\Delta\Delta Ct$ = 对照组 ΔCt (目的基因 Ct-管家基因 Ct)-各组 ΔCt (目的基因 Ct-管家基因 Ct)。

1.5 Western blot 检测

RIBA 裂解液裂解 VSMC 后提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,取等量蛋白(50 μ g)进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移至硝酸纤维素膜上。非特异性阻断 2 h 后,加入大鼠抗人 CD36 抗体(1:2000)和抗 β -actin 抗体(1:10000),4℃培育过夜,辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠二抗(1:2000)室温培育 2 h。ECL 显色发光试剂盒显色,冷 CCD 相机直接拍摄化学发光膜,结果用 Quality One 软件进行分析,以对照组面积的灰度值为 1 与实验组进行半定量分析。

1.6 低密度脂蛋白的制备及氧化修饰

来自健康人的 200 mL 新鲜血浆在离心机上作序列超速离心。提纯的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在 4℃、含 10% EDTA 的 PBS 中透析 72 h, BCA 法定量蛋白质,调节蛋白质浓度至 1 g/L。将 LDL 置入 37℃含有 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液中(pH7.2)透析 20 h,再放入 4℃含有 0.2 mmol/L EDTA 的 PBS 溶液中透析 24 h 终止氧化。LDL 氧化程度通过测定过氧化脂质丙二醛的含量来鉴定。

1.7 油红 O 染色脂质半定量测量

将 VSMC 培养在有消毒盖玻片的 6 孔培养板内,细胞被葡萄糖干预处理后,加入 ox-LDL 30 mg/L 孵育 8 h^[7], PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,油红 O 工作液染色 15 min,苏木素染色 30 s,甘油明胶封片后,光学显微镜下观察细胞内脂滴含量。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高浓度葡萄糖干预不同时间对血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响

血管平滑肌细胞(VSMC)被 30 mmol/L D-葡萄糖干预后,CD36 mRNA 的表达随着干预时间的延长而增加,干预第 1 d 较对照组增加了 3 倍($P < 0.05$),7 d 增加了 8 倍($P < 0.01$)。CD36 蛋白的表达也是随着葡萄糖干预时间的延长而增加($P < 0.01$;图 1 和表 1)。

表 1. 高浓度葡萄糖干预不同时间对血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 4$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	1.06 \pm 0.37	1.00 \pm 0.02
1 d	3.10 \pm 1.43 ^a	1.41 \pm 0.11 ^b
3 d	6.79 \pm 1.03 ^b	2.02 \pm 0.14 ^b
5 d	8.05 \pm 1.38 ^b	
7 d	8.19 \pm 1.05 ^b	2.20 \pm 0.03 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 不同浓度葡萄糖对血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白的影响

血管平滑肌细胞(VSMC)被不同浓度的 D-葡萄

糖干预 7 d 后, CD36 mRNA 的表达随着葡萄糖浓度增加而增加, 以 20 mmol/L 和 30 mmol/L 葡萄糖作用最明显 ($P < 0.05$), 而渗透压对照组 CD36 mRNA 的表达无明显变化。CD36 蛋白的表达随着葡萄糖浓度的增加而增加 ($P < 0.01$), 渗透压对照组 CD36 蛋白表达的无明显变化 (图 1 和表 2)。

表 2. 不同浓度葡萄糖对血管平滑肌细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 4$)

分 组	CD36 mRNA	CD36 蛋白
5 mmol/L 葡萄糖对照组	1.10 ± 0.53	1.00 ± 0.06
11 mmol/L 葡萄糖组	2.49 ± 0.63	
20 mmol/L 葡萄糖组	5.17 ± 1.03 ^a	3.61 ± 0.12 ^b
30 mmol/L 葡萄糖组	5.67 ± 1.38 ^a	3.73 ± 0.06 ^b
甘露醇组	0.91 ± 0.28	0.98 ± 0.06

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 5 mmol/L 葡萄糖对照组比较。

2.3 高糖对血管平滑肌细胞内脂质含量的影响

光镜下, 培养在低糖 DMEM 培养基中的 VSMC

内几乎看不到脂滴聚集, 随着葡萄糖干预浓度的增加, VSMC 内聚集的脂滴逐渐增多, 而且细胞内聚集的脂滴随着高浓度葡萄糖干预时间的延长而增加 (图 2)。

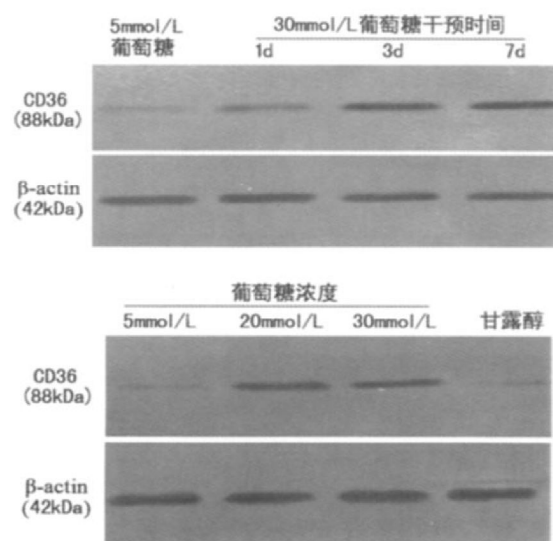


图 1. 葡萄糖对血管平滑肌细胞 CD36 蛋白表达的影响

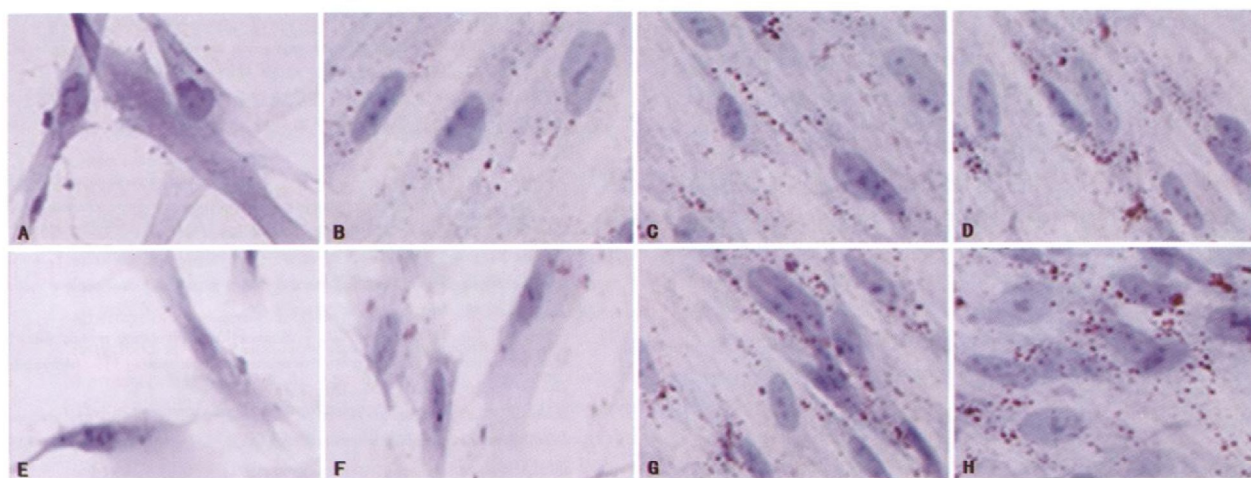


图 2. 油红 O 染色光学显微镜下检测葡萄糖干预后的血管平滑肌细胞内脂质含量 ($\times 400$) A 为在低糖 DMEM 培养基中培养的血管平滑肌细胞, B、C、D 和 H 分别为 30 mmol/L 葡萄糖干预 1、3、5 及 7 d 的血管平滑肌细胞, E 为 5 mmol/L 葡萄糖干预 7 d, F 为 11 mmol/L 葡萄糖干预 7 d, G 为 20 mmol/L 葡萄糖干预 7 d, H 为 30 mmol/L 葡萄糖干预 7 d。

3 讨论

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化的标志特征。除了单核巨噬细胞来源的泡沫细胞外, 泡沫化的 VSMC 在 As 发生发展过程中的作用同样受到关注, 因而成为 As 防治过程中另一重要靶点。

CD36 是一个 88 kDa 的细胞膜糖蛋白, 属于清道夫受体 B 家族, 在单核/巨噬细胞、微血管内皮细胞、血小板和脂肪细胞等多种细胞上均有表达。研

究发现 CD36 也表达在 VSMC, 不过生理状态下表达较为微弱, 但是在进展的动脉粥样硬化斑块处, VSMC CD36 表达增多^[7-10], 提示 VSMC CD36 表达与平滑肌细胞泡沫化及 As 发生发展具有密切的关系。CD36 能与多种配体结合, 如修饰的脂蛋白、长链脂肪酸、多聚阴离子磷脂、iv型和 Ⅲ型胶原以及寄生有疟原虫的红细胞等, 因而其生物学作用涉及 As、炎症和脂代谢的调节等多个方面^[11]。

CD36 是 ox-LDL 的主要配体, 与泡沫细胞形成

和As发生密切相关。目前,这方面研究多以巨噬细胞源性泡沫细胞为对象。Nozaki等^[4]发现,在单核巨噬细胞,>50%的ox-LDL是由CD36介导摄取。载脂蛋白E基因敲除的As模型鼠采用致死照射和干细胞移植术,使其单核巨噬细胞表达或不表达CD36,结果发现不表达CD36的巨噬细胞能显著地抗As,而导入表达CD36的巨噬细胞则使载脂蛋白E基因敲除的As模型鼠病变面积增加^[12]。另外,在高糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞形成中,CD36也具有重要作用。研究表明,高糖能明显诱导人外周血单核细胞来源的巨噬细胞表面CD36蛋白的表达^[1],糖尿病模型小鼠的腹腔巨噬细胞表面CD36表达也增加,继而促进了ox-LDL的吸收和泡沫细胞的形成^[13]。除了巨噬细胞,糖尿病患者或糖尿病模型小鼠的血管斑块和心肌细胞表面,CD36表达也被诱导^[1,14]。本研究发现,高糖同样能诱导泡沫细胞的另一个来源——VSMC表面CD36表达。但是与巨噬细胞对高糖反应有所不同^[1,13],高糖诱导下VSMC CD36在蛋白水平和mRNA水平表达均增加,表明高糖诱导清道夫受体CD36表达在巨噬细胞与VSMC间存在差异。此外,除了长期高糖作用能促进VSMC内脂质堆积外,高糖短期干预也能诱导VSMC CD36的表达和细胞内脂质含量的增加,其机制可能与CD36介导修饰脂蛋白摄入有关。由此提示,糖尿病患者积极控制血糖稳定,包括控制餐后血糖的突然增加^[15],对于预防其血管并发症的恶化具有重要的临床意义。

然而,泡沫细胞形成并不是单方面取决于清道夫受体过多地摄入修饰的脂蛋白,细胞内脂质流出减少也是泡沫细胞形成的重要原因。因此高糖诱导VSMC泡沫化的过程除了与诱导表达的CD36密切相关外,可能同时存在的脂质流出障碍也在其中起重要的作用。

本研究的亮点在于以泡沫细胞的另一来源——VSMC为对象,探讨高糖对肌源性泡沫细胞形成的影响。结果发现随着葡萄糖浓度的增加和干预时间的延长,VSMC的清道夫受体CD36表达增加,同时细胞内脂质的聚集也相应增加。然而,体外细胞培

养的结果是否能解释体内的情况,有待活体的实验进一步验证。

[参考文献]

- [1] Griffin E, Re A, Hamel N, et al. A link between diabetes and atherosclerosis: glucose regulates expression of CD36 at the level of translation [J]. *Nat Med*, 2001, **7**: 840-846.
- [2] Fukuhashi Takaki K, Sakai M, Sakamoto Y, et al. Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo: one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (5): 3 355-364.
- [3] Li L, Sawamura T, Renier G. Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (7): 892-901.
- [4] Nozaki S, Kashivagi H, Yamashita S, et al. Reduced uptake of oxidized low-density lipoprotein in monocyte derived macrophages from CD36 deficient subjects [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 1 859-865.
- [5] Yamamoto M, Acevedo-Duncan M, Chalfant CE, et al. Acute glucose-induced downregulation of PKC- β II accelerates cultured VSMC proliferation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, **279**: C587-C595.
- [6] 张学亮, 舒昌达, 何军. 高糖加高胰岛素对人血管平滑肌细胞增殖及细胞内游离钙水平的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (3): 237-239.
- [7] Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, et al. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro and its implication in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 027-032.
- [8] Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2000, **102**: 82-87.
- [9] 朱莹, 张文高, 郑广娟, 等. 脂欣康胶囊对血管平滑肌细胞源性泡沫细胞CD36表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 481-483.
- [10] Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1 712-719.
- [11] Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, et al. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, **54**: 628-640.
- [12] Febbraio M, Guy E, Silverstein RL. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (12): 2 333-338.
- [13] Liang CP, Han S, Okamoto H, et al. Increased CD36 protein as a response defective insulin signaling in macrophages [J]. *J Clin Invest*, 2004, **113**: 764-773.
- [14] Greenwalt DE, Scheck SH, Rhinehart-Jones T. Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 1 382-388.
- [15] Bonora E, Muggeo M. Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in type II diabetes: the epidemiological evidence [J]. *Diabetologia*, 2001, **44**: 2 107-114.

(此文编辑 文玉珊)