

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0559-04

• 临床研究 •

糖基化终产物对凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

彭 扬, 潘作东, 李 慧, 王佳贺, 张 毅, 杨艳敏, 何 平

(中国医科大学附属盛京医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 糖基化终产物; 巨噬细胞; 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究长期高血糖所致糖基化终产物对巨噬细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响。方法 U937 细胞经佛波酯诱导分化, 并将不同浓度或同一浓度糖基化终产物与诱导分化 48 h 后的 U937 细胞共同孵育, 用 Western Blotting 法检测凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白的表达。同时应用 ELISA 法测定 24 例 2 型糖尿病患者及 22 例正常对照者血清可溶性氧化型低密度脂蛋白受体 1 的含量。结果 100、200 和 400 mg/L 糖基化终产物刺激后细胞表面凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达量分别是对照组的 1.85、3.22 和 4.65 倍 ($P < 0.05$); 400 mg/L 的糖基化终产物作用 12、24、48 h 后, U937 巨噬细胞该受体蛋白表达量分别为 0 h 的 2.85、3.89 和 4.3 倍 ($P < 0.05$)。糖尿病患者血清氧化型低密度脂蛋白受体 1 及糖基化终产物含量较正常对照者显著升高 ($P < 0.01$), 两者呈正相关 ($P < 0.001$)。结论 糖基化终产物可增加 U937 巨噬细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达且呈浓度和时间依赖性。这可能与糖尿病患者加速泡沫细胞形成而易致动脉粥样硬化有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Advanced Glycation End Products on Expression of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1

PENG Yang PAN Zuo-Dong LI Hu-j WANG Jia-He ZHANG Yi YANG Yan-M in and HE Ping

(Department of Geriatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[KEY WORDS] Advanced Glycation End Products Macrophages Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To learn the effects of advanced glycation end products (AGE) on expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein (LOX-1) protein in U937 macrophages and serum soluble LOX-1 (sLOX-1). **Methods** U937 macrophages differentiating for 48 h were incubated with AGE in various concentrations and time. The expression of LOX-1 protein were detected by Western Blotting analysis. Serum sLOX-1 and AGE levels were detected by ELISA in 24 diabetes and 22 normal controls. **Results** After exposure of U937 macrophages to 100, 200 or 400 mg/L AGE, the expression of LOX-1 protein was 1.85-, 3.22- and 4.65-fold as compared with that of control group ($P < 0.05$), LOX-1 protein expression following 400 mg/L AGE for 12, 24, 48 h was 2.85-, 3.89- and 4.3-fold compared with 0 h group ($P < 0.05$). Serum sLOX-1 and AGE levels were significantly increased in diabetes group compared with that of control ($P < 0.01$). They were positively correlated ($P < 0.001$). **Conclusion** AGE could enhance the expression of LOX-1 protein in a time- and dose-dependent manner, which may play an important role in diabetic macroangiopathy through accelerating foam cell formation.

众所周知, 葡萄糖代谢异常或糖尿病患者心血管疾病发生的危险性较非糖尿病人群明显升高^[1,2], 而且预后不良, 这可能与糖尿病的代谢状态有关。然而与糖尿病相关的心血管疾病的发病机制仍然不很清楚。其中糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGE) 在糖尿病血管病变包括动脉

粥样硬化和微血管病变中起重要作用。近年来发现动脉壁细胞存在多种脂蛋白受体, 其中凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1, LOX-1) 就是内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞等血管壁细胞上主要的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 受体之一^[3,4], 多种致动脉粥样硬化因子都可以上调 LOX-1 的表达, 从而促进血管内皮细胞及单核巨噬细胞吞噬大量的 ox-LDL, 加速泡沫细胞的形成^[5-9]。本研究旨在观察 AGE 对巨噬细胞及血清

[收稿日期] 2010-05-19

[修回日期] 2010-07-10

[作者简介] 彭扬, 博士, 副教授, 主要从事糖尿病大血管并发症与血脂异常方面的研究, E-mail 为 pengy@sjhospital.org; 潘作东, 博士, 副教授, 主要从事 2 型糖尿病胰岛素抵抗的基础及临床研究。李慧, 博士, 讲师, 主要从事糖尿病血管并发症的基础及临床研究。

LOX-1蛋白表达的影响,从而进一步探讨 AGE 和 LOX-1在糖尿病动脉粥样硬化中的作用。

1 资料和方法

1.1 体外实验

1.1.1 材料 人单核细胞株 U937细胞(中科院上海细胞所), RPMI 1640培养基(GIBCO),胎牛血清(天津),小鼠抗人 LOX-1单克隆抗体(日本学者 Sawamura T 馈赠),山羊抗小鼠二抗(北京中山),兔抗人 CD14 抗体(武汉博士德), FITC 标记鼠抗兔 IgG(Santa Cruz),佛波酯(PMA, Sigma), D-葡萄糖(GIBCO)。

1.1.2 糖基化终产物的制备 按照文献[8]的方法,将 2.0 g 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶于 10 mL 磷酸缓冲液(phosphate buffered saline PBS, 0.5 mol/L, pH 7.4)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。经过荧光分光光度计鉴定结合蛋白量。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。本实验制备的 AGE-BSA 经荧光分光光度计鉴定, AGE 含量为 87.2 kU/g 对照组为 2.1 kU/g。

1.1.3 细胞培养 U937 细胞在 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 RPMI 1640 培养液中悬浮生长,每 2~3 天传代一次。加入 0.1 μ mol/L 佛波酯培养,分别诱导 24、48 和 72 h。应用流式细胞仪检测间接标记的 CD14 阳性细胞百分比来判断 U937 细胞诱导分化率。分化 48 h 的 U937 巨噬细胞用无血清培养基充分洗涤,置于无佛波酯的培养液中 24 h 开始后续实验。实验中对对照组加入含有 400 mg/L BSA 的培养基; AGE 组分别加入含有 100、200、400 mg/L AGE 的培养基作用 24 h 以及 400 mg/L 的 AGE 作用不同时间(0、12、24、48 h)。每组实验重复 3 次。台盼蓝测定细胞活力大于 95% 的细胞用于实验。

1.1.4 Western Blotting 检测凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白的表达 将培养后细胞用 PBS 洗 2 次,加入细胞膜裂解液,冰浴超声粉碎细胞,离心 15 min(4℃, 12 000 $\times$ g),取上清液测定细胞溶解物中蛋白含量,取相同量蛋白(50 μ g)进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉 PBS-T 液室温封闭 1 h, LOX-1 单克隆抗体(1:1 000 稀释)4℃ 孕育过夜,将膜洗涤 3 次后再置于 1:500 稀释的山羊抗小鼠二抗中

室温作用 2 h,相同方式洗涤后用 ECL 方法显色, X-片感光,洗片。蛋白条带经扫描后进行灰度值分析。

1.2 体内试验

1.2.1 研究对象 按 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准,选择 2008 年 9 月至 2009 年 3 月中国医科大学附属盛京医院住院的 2 型糖尿病患者(糖尿病组)24 例,男 12 例、女 12 例;以及我院健康体检者(对照组)22 例,男 12 例、女 10 例,与糖尿病组人员年龄、性别相匹配。

1.2.2 检测指标 受试对象正常饮食 3 天后采集空腹及餐后 2 h 静脉血,常规方法测定空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、餐后 2 h 血糖(postprandial plasma glucose, PPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)及总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC); ELISA 法测定血清可溶性 LOX-1(soluble LOX-1, sLOX-1)及 AGE(R&D 试剂盒)。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 SPSS 13.0 统计软件中的 One-way ANOVA 及 SNK 检验方法,多因素分析采用多元逐步回归, $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 U937 细胞佛波酯诱导前后形态学变化

U937 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,由悬浮生长变为贴壁生长,且伸展伪足,成巨噬细胞外形。U937 细胞 CD14 阳性比率较低,诱导分化 24 h 之后,大部分细胞 CD14 抗原阳性,分化后各组差异无显著性(图 1 和表 1),说明加入佛波酯 24 h 时大部分 U937 细胞已经成功分化。

2.2 糖基化终产物对 U937 细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的影响

应用诱导分化 48 h 的 U937 巨噬细胞,将 BSA(对照组)或 100、200 和 400 mg/L 的 AGE 分别加入到诱导分化后的 U937 巨噬细胞培养液中作用 24 h 结果发现, AGE 以浓度依赖的方式促进 U937 巨噬细胞 LOX-1 蛋白表达, 100、200 和 400 mg/L AGE 刺激后细胞表面 LOX-1 蛋白表达量分别是 BSA 组的 1.85、3.22 和 4.65 倍($P < 0.01$; 图 2 和表 2)。将 400 mg/L 的 AGE 加入到诱导分化 48 h 后的

U937巨噬细胞培养液中,分别作用 0、12、24、48 h后, U937巨噬细胞 LOX-1蛋白表达量分别为 0 h的 2.85、3.89和 4.3倍,除 24 h组与 48 h组间外,其他组间差异有显著性 ($P < 0.01$,图 2和表 3),说明 400 mg/L的 AGE促进 U937巨噬细胞 LOX-1蛋白表达具有时间依赖性。

表 1 佛波酯诱导分化前后 U937细胞 CD14阳性百分率

分 组	CD14 阳性
未分化细胞	9.9% $\pm$ 4.3%
分化 24 h细胞	76.9% $\pm$ 10.4% ^a
分化 48 h细胞	80.6% $\pm$ 9.8% ^a
分化 72 h细胞	78.1% $\pm$ 13.5% ^a

a为 $P < 0.01$,与未分化细胞比较。

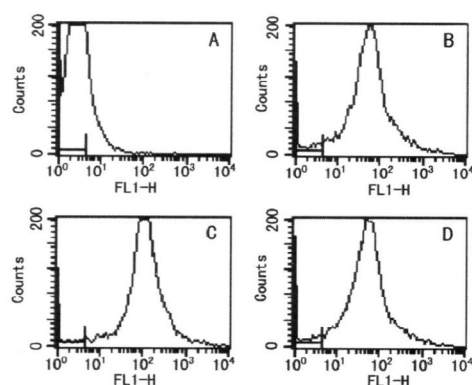


图 1 流式细胞仪检测佛波酯诱导分化前后 U937细胞 CD14 表达情况 A 为未分化的 U937细胞, B、C、D 依次为分化 24、48 和 72 h 的细胞。

表 2 不同浓度糖基化终产物对巨噬细胞氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的影响

AGE 浓度 (mg/L)	LOX-1 蛋白
0 (对照组)	100
100	185.36 $\pm$ 31.67 ^a
200	321.97 $\pm$ 34.75 ^{ab}
400	464.89 $\pm$ 72.52 ^{ac}

a为 $P < 0.01$,与对照组比较; b为 $P < 0.01$,与 100 mg/L 组比较; c 为 $P < 0.01$,与 200 mg/L 组比较。

表 3 400 mg/L 糖基化终产物作用不同时间对巨噬细胞氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的影响

作用时间	LOX-1 蛋白
0 h(对照组)	100
12 h	284.72 $\pm$ 53.27 ^a
24 h	389.42 $\pm$ 69.73 ^{ab}
48 h	430.36 $\pm$ 76.90 ^a

a为 $P < 0.01$,与对照组比较; b为 $P < 0.01$,与 12 h 组比较。

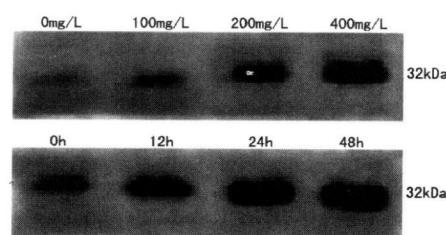


图 2 Western Blotting 检测不同浓度糖基化终产物 (上图) 以及 400 mg/L 糖基化终产物作用不同时间 (下图) 对巨噬细胞氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的影响

2.3 糖尿病患者及正常对照者临床特点及血清糖基化终产物和可溶性氧化型低密度脂蛋白受体 1 的水平

与正常对照者相比,糖尿病患者 FPG、PPG、HbA1c、TG、LDLC、AGE 及 sLOX-1 水平显著升高, HDLC 水平显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,表 4)。

表 4 糖尿病患者及正常对照者临床特点及血清 AGE 和 sLOX-1 水平

指 标	对照组 (n = 22)	糖尿病组 (n = 24)
男/女(例)	12/10	12/12
年龄(岁)	58.27 $\pm$ 10.23	59.20 $\pm$ 9.27
FPG (mmol/L)	5.10 $\pm$ 0.46	9.90 $\pm$ 2.51 ^b
PPG (mmol/L)	6.54 $\pm$ 0.67	12.80 $\pm$ 2.58 ^b
HbA1c	5.49% $\pm$ 0.33%	8.48% $\pm$ 1.32% ^b
TC (mmol/L)	5.15 $\pm$ 0.64	5.53 $\pm$ 0.71
TG (mmol/L)	1.62 $\pm$ 0.33	1.84 $\pm$ 0.28 ^a
LDLC (mmol/L)	3.57 $\pm$ 0.57	4.24 $\pm$ 0.71 ^b
HDLC (mmol/L)	1.11 $\pm$ 0.17	0.99 $\pm$ 0.12 ^b
AGE (ng/L)	45.47 $\pm$ 6.83	54.31 $\pm$ 11.73 ^b
sLOX-1 (μ g/L)	99.20 $\pm$ 13.67	117.00 $\pm$ 16.77 ^b

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$,与对照组比较。

2.4 影响血清可溶性氧化型低密度脂蛋白受体 1 水平的多因素分析

以血清 sLOX-1 为因变量,以组别及上述各项指标为自变量进行多元逐步回归分析,发现 AGE 和 HDLC 是影响 sLOX-1 水平的独立危险因素,前者与 sLOX-1 正相关,而后者与之负相关。AGE 首先进入方程,至少可以解释 sLOX-1 变异的 42.9%,而 HDLC 与 AGE 同时进入方程后,二者共同解释 sLOX-1 变异的 53% (表 5)。

表 5 影响可溶性氧化型低密度脂蛋白受体 1 的多元逐步回归分析结果

变量	偏回归系数	标准误	标准偏回归系数	t 值	P 值
AGE	0.911	0.181	0.546	5.025	0.000
HDLC	-0.40195	12.469	-0.350	-3.224	0.002

3 讨论

研究表明,长期高血糖状态导致蛋白质非酶糖基化所形成的 AGE 能够调控多种细胞功能,包括动脉粥样硬化早期增加血管通透性;增加内皮细胞黏附分子表达而使单核细胞易于穿过内皮细胞移行至血管内皮下;促进细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 (IL-1) 的释放,通过炎症反应致动脉壁损伤。另一方面,AGE 还能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。因此,AGE 已经被公认为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作用^[10-11]。除内皮细胞外,LOX-1 在人动脉粥样硬化病变组织的巨噬细胞中高度表达^[12],可促使巨噬细胞向泡沫细胞的转化。本研究中 U937 巨噬细胞通过 AGE 刺激后,细胞膜 LOX-1 蛋白的表达量增加,且具有浓度和时间依赖性,说明在体外 AGE 无论浓度增加还是作用时间增加都可以增加 LOX-1 表达。临床实验中应用 sLOX-1 这一指标,它是 LOX-1 的胞外部位被蛋白酶剪切后释放到血液中的成分,检测 sLOX-1 可以反映体内 LOX-1 的表达。临床研究结果显示,糖尿病患者血清 sLOX-1 明显较对照组升高,而且糖尿病组 sLOX-1 与 AGE 呈正相关,AGE 至少可以解释 sLOX-1 42.9% 的变化。这与体外实验结果是一致的。由于 LOX-1 主要介导细胞摄取 ox-LDL,从以上结果不难看出 LOX-1 表达量增加会进一步加强细胞摄取 ox-LDL,

从而参与 AGE 诱导的泡沫细胞形成。临床研究发现血糖控制较差及患病时间长的患者脂代谢紊乱明显可能与此有关。

总之,体外研究发现 AGE 能够刺激巨噬细胞表面 LOX-1 表达增加并呈浓度和时间依赖性,临床研究也发现糖尿病患者 sLOX-1 与 AGE 呈正相关,这可能与糖尿病患者加速泡沫细胞形成而易致动脉粥样硬化有关。

[参考文献]

- [1] Liu J, Grundy SM, Wang W, et al. Ten-year risk of cardiovascular incidence related to diabetes, prediabetes, and the metabolic syndrome [J]. *Am Heart J*, 2007, **153** (4): 552-558.
- [2] Hanna-Moussa A, Gardner MJ, Kunukuluriya LR, et al. Dysglycemia/prediabetes and cardiovascular risk factors [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2009, **10** (4): 202-208.
- [3] Murase T, Kume N, Korenaga R, et al. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells [J]. *Circ Res*, 1998, **83** (3): 328-333.
- [4] Kume N, Moriwaki H, Kataoka H, et al. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **902** (5): 323-327.
- [5] Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, et al. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages upregulated expression by TNF- α [J]. *FEBS Lett*, 1998, **440** (1-2): 29-32.
- [6] Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, et al. C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction [J]. *Circ Res*, 2004, **95** (9): 877-883.
- [7] Li D, Liu L, Chen H, et al. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2003, **107** (4): 612-617.
- [8] 尹凯,涂玉林,桂庆军. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 与动脉粥样硬化易损斑块 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (7): 572-574.
- [9] 陈锋,张振东,唐新华. 氧化型低密度脂蛋白对平滑肌祖细胞增殖和表型的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17** (9): 723-726.
- [10] Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, et al. CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (5): 3195-202.
- [11] Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108** (5): 649-654.
- [12] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 1999, **99** (24): 3110-117.

(此文编辑 许雪梅)