

葡萄糖和厄贝沙坦对单核巨噬细胞系凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体表达的影响

林令君¹, 王晓俐¹, 吕晓霞², 张东善³, 张绪洪¹

(山东大学附属省立医院 1. 心血管科, 2. 中心实验室, 3. 内科, 山东省济南市 250021)

[关键词] 葡萄糖; 厄贝沙坦; 巨噬细胞; 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体

[摘要] **目的** 研究不同浓度葡萄糖和厄贝沙坦对人单核巨噬细胞系(THP-1)凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 及蛋白表达的影响,并探讨其可能的机制。**方法** THP-1 细胞经 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 佛波酯诱导分化 72 h 后,将细胞分为对照组、不同浓度葡萄糖组(5、8、12 和 15 mmol/L)和厄贝沙坦干预组,葡萄糖组将不同浓度葡萄糖与诱导分化的巨噬细胞孵育 24 h,厄贝沙坦干预组用厄贝沙坦预先孵育 2 h 后,再加入 15 mmol/L 葡萄糖共同孵育 24 h。用荧光定量 PCR 和细胞酶联免疫法检测凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,5 mmol/L 葡萄糖组凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 及蛋白表达差异无显著性($P > 0.05$),其余高糖组该受体 mRNA 和蛋白表达明显增加($P < 0.05$),并且其表达呈浓度依赖性;厄贝沙坦可显著抑制此作用,使该受体表达明显降低。**结论** 高糖以浓度依赖方式上调凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白的表达,这可能是导致动脉粥样硬化发生的机制之一;厄贝沙坦可显著抑制这一作用,可能在抗动脉粥样硬化中起作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Glucose and Irbesartan on Expression of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 in Cultured THP-1 Cells

LIN Ling-Jun¹, WANG Xiao-Li¹, LV Xiao-Xia², ZHANG Dong-Shan³, and ZHANG Xu-Hong¹

(1. Department of Cardiology, 2. Central Laboratory, 3. Department of Internal Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

[KEY WORDS] Glucose; Irbesartan; Macrophages; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of glucose and irbesartan on expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) mRNA and protein in cultured THP-1 cells. **Methods** THP-1 cells were differentiated by incubation with 160 nmol/L PMA for 72 hours. The cells were divided into three groups: control group, glucose group (5 mmol/L, 8 mmol/L, 12 mmol/L, 15 mmol/L), irbesartan intervention group. Then the cells in glucose group were incubated with several concentrations glucose for 24 hours. The intervention group was first treated with irbesartan for 2 h, then co-incubated with 15 mmol/L glucose for 24 h. Real time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay technology were used to detect LOX-1 mRNA and protein expression. **Results** Compared with control group, the expression of LOX-1 mRNA and protein showed no significance in 5 mmol/L glucose group ($P > 0.05$), but the expression in high glucose groups increased significantly ($P < 0.05$), and the increase was dependent on high glucose concentration. Irbesartan group markedly decreased high glucose-induced LOX-1 mRNA and protein expression. **Conclusion** High glucose can upregulate LOX-1 mRNA and protein expression in a concentration-dependent manner and may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. Irbesartan can block the effect of high glucose and may produce anti-atherosclerosis.

[收稿日期] 2011-07-01

[基金项目] 山东省自然科学基金(Y2006C129)

[作者简介] 林令君, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化的研究, E-mail 为 linlingjunyun@163.com。王晓俐, 主任医师, 主要从事心血管病临床诊断与治疗。通讯作者张绪洪, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的诊断与治疗, E-mail 为 zhangxuhong@medmail.com.cn。

高血糖是致动脉粥样硬化的危险因素之一,据统计,约80%的糖尿病患者死于动脉粥样硬化导致的并发症^[1]。巨噬细胞通过其表面的清道夫受体(scavenger receptors, SR)摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)参与泡沫细胞的形成,进而在动脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用。凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是一种在内皮细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞上均有表达的SR,近年来研究提示巨噬细胞上LOX-1可能在动脉粥样硬化形成中起重要作用^[2]。厄贝沙坦是一种血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(angiotensin Ⅱ receptor blocker, ARB),有研究发现高血糖状态下人主动脉内皮细胞血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)合成增加,厄贝沙坦能保护内皮细胞免受高糖所致的损伤,早期应用ARB药物治疗可能对预防糖尿病引起的微血管病变有重要作用^[3]。厄贝沙坦能否抑制高糖诱导的LOX-1表达国内外尚未见相关报道。本研究通过观察不同浓度葡萄糖在基因和蛋白两个水平诱导THP-1细胞LOX-1表达的情况,以探讨葡萄糖和LOX-1在动脉粥样硬化形成和发展中的作用;并观察厄贝沙坦对其干预作用,以探讨其可能的抗动脉粥样硬化机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人单核巨噬细胞株(THP-1细胞)购自中国科学院上海细胞库,佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)购自Sigma公司,D-葡萄糖由省立医院中心实验室提供,厄贝沙坦由江苏恒瑞制药厂提供,RPMI-1640培养基购自美国Hyclone公司,胎牛血清购自TBD公司,Trizol RNA提取试剂、PCR引物、逆转录试剂盒及PCR试剂盒均购自大连宝生物公司,兔抗人LOX-1多克隆抗体购自Abcam公司,山羊抗兔二抗及酶联物购自北京中杉金桥生物有限公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养及实验分组

THP-1细胞置于含10%胎牛血清RPMI-1640培养基中,37℃、5%CO₂孵箱内培养。2~3代后THP-1细胞用于实验。诱导转化时加0.16 μmol/L PMA作用72 h以促使单核细胞分化成巨噬细胞,之后用PBS洗涤两遍,置于无PMA及血清的RPMI-1640培养液中24 h,开始进行实验。实验分为:①对照组:培养基;②不同浓度葡萄糖组:分别加入5、

8、12和15 mmol/L的葡萄糖作用24 h;③厄贝沙坦干预组:加入1 μmol/L的厄贝沙坦预先孵育2 h后,再加入15 mmol/L葡萄糖孵育24 h。

1.3 荧光定量PCR检测凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体mRNA表达

各组培养皿中分别加入1 mL Trizol RNA提取试剂,按照说明书操作,依次经过氯仿处理,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤后,略干燥,溶于DEPC处理水。经核酸紫外分析仪检测,确定样品中RNA纯度(A_{260}/A_{280} 为1.80~2.0)和浓度。按照反转录试剂盒说明书操作进行逆转录反应,反应体系为5×Prime Script Buffer 4 μL, Prime Script RT Enzyme Mix 1 μL, Oligo dT Primer 1 μL, Random 6 mers 1 μL, Total RNA 1 μg, 加RNase Free dH₂O至总体积20 μL。反应条件为37℃反应15 min, 85℃灭活5 s, 反应结束后,将cDNA溶液存放于-20℃保存。LOX-1引物序列为上游5'-TTACTCTCCATGGTGGTGCC-3', 下游5'-AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC-3', 产物193 bp; GAPDH序列为上游5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 下游5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3', 产物138 bp。应用ABI PRISM 7500 Real-time PCR System的操作方法,建立20 μL反应体系,含SYBR Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物各0.4 μL, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 逆转录产物2 μL, 灭菌蒸馏水6.8 μL。扩增条件为95℃30 s, 95℃5 s, 60℃34 s, 循环40次后, 95℃15 s, 60℃1 min。扩增结束后进行融解曲线分析。通过观察融解曲线是否为单一峰评价PCR反应产物的特异性,每个反应设置3个复孔。

1.4 细胞酶联免疫法检查凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体蛋白的表达

参考Yang等^[4]方法并加以改动。THP-1细胞在96孔板上经PMA诱导、加药作用达预定时间后,弃掉培养液,用PBS清洗,4%多聚甲醛固定20 min,脱脂奶粉封闭30 min,加兔抗人LOX-1多克隆抗体37℃孵育2 h,洗板5次,拍干后加入生物素化山羊抗兔IgG,37℃孵育1 h,洗板5次,拍干后加入酶联物37℃孵育1 h,加入TMB显色15 min,加终止液终止反应,用450 nm酶标仪测吸光度(A)。结果以A₄₅₀表示细胞蛋白表达水平,每个观察值设3个复孔,试验重复2次。

1.5 数据处理及统计学分析

荧光定量PCR分析的数据应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行处理,计算各样本 ΔCt 值(ΔCt 值=Ct_{目的基因}-Ct_{内参})

和 $\Delta\Delta Ct$ 值 ($\Delta\Delta Ct$ 值 = $\Delta Ct_{\text{各药物组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$), 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数值用于表示目的值相对于参照值的相对倍数。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 统计软件中的 One-way ANOVA 统计方法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

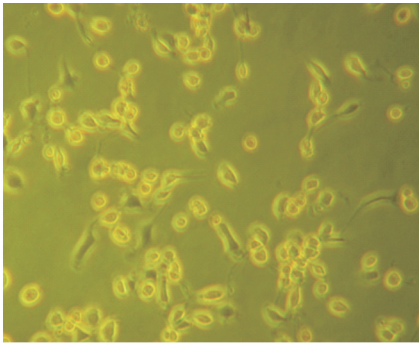
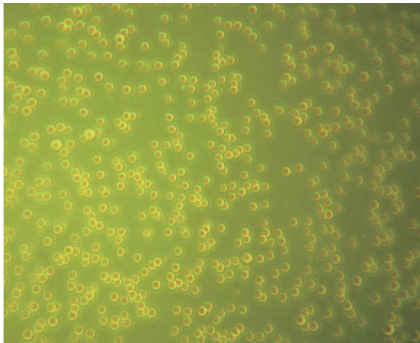


图 1. THP-1 细胞经 PMA 诱导分化前后形态学变化 (×200) 左为诱导前, 右为诱导后。

Figure 1. Morphology of THP-1 cells before and after PMA treatment

2.2 葡萄糖和厄贝沙坦对 THP-1 巨噬细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 表达的影响

用荧光定量 PCR 检测 LOX-1 mRNA 表达, 扩增曲线呈现典型的 S 型曲线, 融解曲线分析可见只有单峰值, 排除了非特异性扩增。结果发现 5 mmol/L 葡萄糖组 LOX-1 mRNA 表达量是对照组的 1.0747 ± 0.0976 倍 ($P > 0.05$), 与对照组相比差异无显著性; 8 mmol/L、12 mmol/L 和 15 mmol/L 葡萄糖组 LOX-1 mRNA 表达量分别是对照组的 1.2967 ± 0.0480 、 1.6507 ± 0.0817 和 2.1843 ± 0.0794 倍 ($P < 0.01$)。厄贝沙坦干预组 LOX-1 mRNA 表达量 (1.3110 ± 0.0677) 与 15 mmol/L 葡萄糖组相比明显降低 ($P < 0.01$)。结果提示, 高浓度的葡萄糖可上调 LOX-1 mRNA 表达, 并且随着葡萄糖浓度升高, LOX-1 mRNA 表达量增加, 呈浓度依赖性, 厄贝沙坦能显著抑制葡萄糖诱导的 LOX-1 mRNA 表达 (表 1)。

2.3 葡萄糖和厄贝沙坦对 THP-1 巨噬细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体蛋白表达的影响

5 mmol/L、8 mmol/L、12 mmol/L 和 15 mmol/L 葡萄糖组 LOX-1 蛋白表达分别是对照组的 1.09 ($P > 0.05$)、1.43、1.71 和 2.27 倍, 厄贝沙坦干预组与 15 mmol/L 葡萄糖组相比明显降低 ($P < 0.01$)。结果提示, 高浓度的葡萄糖可上调 LOX-1 蛋白表达, 并且随着葡萄糖浓度升高, LOX-1 蛋白表达量增加, 并呈浓度依赖性; 厄贝沙坦能显著抑制葡萄糖诱导的 LOX-1 蛋白表达 (表 1)。

2 结 果

2.1 THP-1 细胞分化成巨噬细胞

THP-1 细胞呈圆形、悬浮生长, 经 0.16 $\mu\text{mol/L}$ PMA 诱导分化 72 h 后, 由悬浮生长变为贴壁生长, 形状不规则, 且伸展伪足, 呈现巨噬细胞外形 (图 1)。

表 1. 葡萄糖和厄贝沙坦对 THP-1 巨噬细胞凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响

Table 1. Effects of glucose and irbesartan on mRNA and protein expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in THP-1 macrophages

分 组	LOX-1 mRNA	LOX-1 蛋白
对照组	1	0.2603 ± 0.0248
5 mmol/L 葡萄糖组	1.0747 ± 0.0976	0.2843 ± 0.0238
8 mmol/L 葡萄糖组	1.2967 ± 0.0480^{ab}	0.3728 ± 0.0234^{ab}
12 mmol/L 葡萄糖组	1.6507 ± 0.0817^{abc}	0.4443 ± 0.0278^{abc}
15 mmol/L 葡萄糖组	2.1843 ± 0.0794^{abcd}	0.591 ± 0.0074^{abcd}
厄贝沙坦干预组	1.3110 ± 0.0677^e	0.3467 ± 0.0302^e

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 5 mmol/L 葡萄糖组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 8 mmol/L 葡萄糖组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 12 mmol/L 葡萄糖组比较; e 为 $P < 0.01$, 与 15 mmol/L 葡萄糖组比较。

3 讨 论

LOX-1 是 1997 年 Sawamura 等^[5]首次在牛内皮细胞上发现的 ox-LDL 受体, 与其他 ox-LDL 受体无任何同源性, 为 II 型膜蛋白, 结构上属于 C 型血凝集素家族, 能够特异地结合、吞噬和降解 ox-LDL。研究表明, LOX-1 在巨噬细胞、平滑肌细胞^[6]及血小板上均有表达。目前大多数研究集中于此受体在内皮细胞上的作用, 而 LOX-1 在巨噬细胞上的作用研究较少。Kataoka 等^[7]研究发现, LOX-1 在人动脉粥样硬化病变组织的巨噬细胞中高度表达, 因此被认为参与泡沫细胞的形成。

高血糖是致动脉粥样硬化的危险因素之一,

Fukuhara-Takaki 等^[8]报道高糖或糖尿病状态下诱导 SRA 上调可能是糖尿病患者动脉粥样硬化发病率增高的一个机制。本研究采用人单核巨噬细胞系经 PMA 诱导分化的巨噬细胞与不同浓度葡萄糖作用 24 h, 用荧光定量 PCR 和细胞酶联免疫法分别检测 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达, 较以往的普通 PCR 准确性更高, 结果显示 5 mmol/L 葡萄糖组 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达与对照组相比差异无显著性, 其余高糖组均可诱导 THP-1 巨噬细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达, 且随着葡萄糖浓度的升高, LOX-1 mRNA 和蛋白表达量亦增加, 呈浓度依赖性。由此我们推断葡萄糖上调 LOX-1 表达可能参与了巨噬细胞摄取 ox-LDL 的过程, 进而加速了泡沫细胞的形成。葡萄糖此作用可能是致动脉粥样硬化发生的机制之一。葡萄糖上调 LOX-1 mRNA 和蛋白表达的机制还不十分清楚, 目前认为, 高浓度葡萄糖可促进低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 氧化为 ox-LDL, ox-LDL 可通过正反馈调节 LOX-1 表达; 此外, Li 等^[9]研究发现高血糖通过激活巨噬细胞 PKC-MAPK 途径增强核因子 κ B 及转录因子激活蛋白 1 (AP-1) 活性, 从而上调 LOX-1 的基因表达。

厄贝沙坦是非肽类口服活性 Ang II 受体拮抗剂, 它对 Ang II 受体 1 (angiotensin II type 1 receptor, AT1) 具有高度的选择性, 完全阻断 Ang II 经 AT1 受体而发挥的作用。厄贝沙坦目前除用于降血压外, 还用于逆转左心室肥大、糖尿病肾病、心衰等治疗。研究发现, ARB 类药物可通过多种途径减缓或逆转动脉粥样硬化的发生、发展^[10,11]。本实验首次研究了厄贝沙坦对葡萄糖诱导的 THP-1 巨噬细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白表达的影响, 结果发现厄贝沙坦显著抑制葡萄糖诱导的 THP-1 巨噬细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白表达, 使 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达显著降低。LOX-1 表达下降可能导致巨噬细胞摄取 ox-LDL 减少, 进而抑制泡沫细胞的形成, 从而发挥抗动脉粥样硬化作用。厄贝沙坦抑制葡萄糖诱导的 THP-1 巨噬细胞 LOX-1 表达的机制目前还不明确, 厄贝沙坦的这一作用可能是通过 AT1 受体来实现的, 其确切机制有待于进一步研究证实。此外, 有临床研究发现, 厄贝沙坦能减少稳定型心绞痛患者体内炎性标志物可溶性 TNF- α 受体 II、血管细胞黏附分子水平, 提示厄贝沙坦对早期粥样硬化有明显改善作用^[12]。动物实验研究结果表明厄贝沙坦可明显减小载脂蛋白 E 基因缺失小鼠动脉粥样硬化斑块面积, 降低炎性因子的表达, 从而抑制动脉粥样硬化的

发生、发展^[13]。我们体外实验研究的结论与临床研究、动物实验结论一致, 进一步证实了厄贝沙坦具有抗动脉粥样硬化的作用。

本实验结果表明, 葡萄糖能够以浓度依赖方式上调巨噬细胞 LOX-1 基因和蛋白的表达, 而厄贝沙坦能够抑制这一作用, 提示厄贝沙坦除降压作用外, 还具有抗动脉粥样硬化的作用, 这为临床科学、合理地选用抗动脉粥样硬化药物提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications [J]. *Adv Cardiol*, 2008, 45(1): 1-16.
- [2] Mehta JL, Li D. Identification, regulation and function of a novel lectin-like ox-idized low-density lipoprotein receptor [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(9): 1 429.
- [3] Tang RN, Li Q, Lv LL, et al. Angiotensin II mediates the high-glucose-induced endothelial-to-mesenchymal transition in human aortic endothelial cells [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2010, 9: 31.
- [4] Yang XY, Jiang HG, Hartmann WK. Development of a quantitative antigen specific cell based ELISA for the 7G7/ B6 monoclonal antibody directed toward IL-2Ra [J]. *Immun Meth*, 2003, 277 (1): 87-100.
- [5] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. A endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, 386(6620): 73- 77.
- [6] Novelli G, Mango R, Vecchione L, et al. New insights in atherosclerosis research: LOX-1, leading actor of cardiovascular diseases [J]. *Clin Ter*, 2007, 158: 239-248.
- [7] 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: 3 110-117.
- [8] Fukuhara-Takaki K, Sakai M, Sakai M, 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.
- [9] 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.
- [10] Sana-Rosa D, Qubina MP, Cedi E, et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR; role of NF-kappaB/IkappaB system [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(1): H111-H115.
- [11] Fukuda D, Enomoto S, Nagai R, et al. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates periaortic inflammation and reduces atherosclerotic lesion formation [J]. *Biomed & Pharmacother*, 2009, 63(10): 754-761.
- [12] Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, et al. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37: 440-444.
- [13] 姚瑞, 程翔, 廖玉华, 等. 厄贝沙坦抑制高胆固醇诱导载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的炎症机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8): 593-596.

(此文编辑 许雪梅)