

高糖对 THP-1 巨噬细胞 CD36 表达及脂质蓄积的影响

谭玉林^{1,2}, 曾颖¹, 莫中成¹, 易光辉¹

(1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室
湖南省衡阳市 421001; 2. 湘南学院病理研究所, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] 高糖; CD36; 脂质蓄积; THP-1 巨噬细胞
[摘要] 目的 观察高糖对 THP-1 巨噬细胞清道夫受体 CD36 表达和脂质蓄积的影响。方法 用不同浓度的 D-葡萄糖(分别为 5.6、11、20、30 及 35 mmol/L)、50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h, 油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况, 高效液相色谱分析法检测细胞内总胆固醇水平, 定量 PCR 与免疫印迹分析法分别检测 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达。结果 随着 D-葡萄糖处理 THP-1 巨噬细胞浓度的增加, CD36 mRNA 和蛋白的表达逐渐增加($P < 0.05$); 高糖可协同 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达上调($P < 0.05$), 并增加细胞内总胆固醇水平($P < 0.05$)。结论 高糖可诱导 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达上调, 并促进细胞内脂质蓄积。
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effect of High Glucose on the Expression of CD36 and Lipid Accumulation in THP-1 Macrophages

TAN Yu-Lin^{1,2}, ZENG Ying¹, MO Zhong-Cheng¹, and YI Guang-Hui¹
(1. Institute of Cardiovascular Research & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Pathology Research, XiangNan University, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[KEY WORDS] High Glucose; CD36; Lipid Accumulation; THP-1 Macrophages
[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of high glucose on regulating the expression of CD36 and lipid accumulation in THP-1 macrophages. Methods THP-1 macrophages were incubated with different concentrations of D-glucose (5.6, 11, 20, 30 and 35 mmol/L), 50 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), 50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-glucose for 24 h. Total cholesterol content in THP-1 macrophages was determined by high performance liquid chromatography, the lipid accumulation was detected by oil red O stain. CD36 mRNA and protein levels were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Results With the increase of D-glucose concentration treating THP-1 macrophages, the expression of CD36 mRNA and protein were up-regulated gradually ($P < 0.05$), high glucose in concert with ox-LDL induced the expression of CD36 mRNA and protein in THP-1 macrophages ($P < 0.05$), and enhanced the level of total cholesterol ($P < 0.05$). Conclusion High glucose can up-regulate the expression of CD36 and increase the lipid accumulation in THP-1 macrophages.

巨噬细胞来源的泡沫细胞在内皮下间隙大量聚集是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变早期的一个重要特征^[1]。清道夫受体 CD36 属于 B 族清道夫受体^[2], 在单核/巨噬细胞上有丰富的表达^[3], 它作为氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的主要受体而参与了脂质代谢, 在脂质代谢

[收稿日期] 2014-03-03
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81270360); 湖南省科技厅科技计划重点项目(2014FJ2012); 湖南省卫生厅医药卫生科研计划课题(B2014-070)
[作者简介] 谭玉林, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 yltan1510@126.com。唐朝克, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制。通讯作者易光辉, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 ghyi@163.com。

紊乱中起着重要的作用^[4],并且在 ox-LDL 诱导的 As 形成过程中 CD36 起主要调节作用^[5,6]。

糖尿病患者的 As 性疾病发生比非糖尿病患者高 2~3 倍,成为糖尿病患者的主要死亡原因^[7,8]。高血糖是心血管病的一个危险因素^[9,10]。然而,CD36 在糖尿病增加 As 发病中的作用机制不明。本研究旨在观察高糖对 THP-1 巨噬细胞 CD36 表达及脂质蓄积的影响。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

Trizol 试剂购自美国 Gibco 公司;AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司;Taq 酶购自北京天为时代;所有引物由上海生工公司合成;羊抗人 CD36 和辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗购自美国 Santa Cruz 公司;Blue Ranger 预染蛋白分子量标准、BCA 蛋白含量测定试剂和 Western blot 荧光检测试剂盒购自 Hyclone Pierce 公司;佛波酯、油红 O 和丽春红染色试剂购自 Sigma 公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)采用超速离心法分离,经琼脂糖电泳显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 溶液(pH7.2)中,37℃温育 24 h。氧化后的 LDL 置含 200 μmol EDTA 的 PBS 中透析 24 h,PBS 再透析 24 h,过滤除菌后 4℃保存。LDL 中的脂过氧化物在氧化过程中增加,颜色也由淡黄色变为乳白色。琼脂糖电泳显示 ox-LDL 的电泳迁移速率快于未氧化的 LDL。

1.3 细胞株的培养及实验分组

THP-1 细胞株购于中科院上海细胞生物所细胞中心。细胞生长于含 10% 灭活新生小牛血清、 1×10^8 U/L 青霉素的 RPMI 1640 完全培养基中,置 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化为巨噬细胞,换无血清培养基培养后分组:不同浓度的 D-葡萄糖(分别为 5.6、11、20、30 及 35 mmol/L)、50 mg/L ox-LDL、50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h,对照组为 RPMI 1640 培养基 + 5 μL DMSO 孵育 24 h。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 表达

收集细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,溶于无

RNase 水中,紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值在 1.8~2.0 之间。CD36 (GeneBank 序列号 NM005506) 扩增片段长度为 246 bp,PCR 条件为 94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,72℃ 继续延伸 10 min。内参照 GAPDH 引物扩增片段长度为 697 bp,PCR 条件为 94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,72℃ 继续延伸 10 min。反应结束后,取 RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统测定和分析。

1.5 免疫印迹法检测 CD36 蛋白表达

收集细胞,经 PBS 洗涤 3 次,加入悬浮裂解液裂解细胞,于 4℃、10000 g 离心 10 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白质点样量为 50 mg,取 50 μg 蛋白质 P 泳道加入等体积 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白变性。60 V 积层胶,120 V 分离胶,电泳分离细胞蛋白质,100 mAh 将蛋白质转移至 PDVF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜 15 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 15 min。然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,用 X 胶片片压片曝光,显影、定影后进行图像分析。以对照组作为内参照,用各处理组的面积灰度值与对照组相比所得的相对值作统计分析。

1.6 油红 O 染色观察 THP-1 细胞内脂质

将 THP-1 细胞培养于放有盖玻片的 6 孔培养板内,待细胞被诱导分化为巨噬细胞后,换无血清培养基,加入 20 mmol/L D-葡萄糖、50 mg/L ox-LDL 及 50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖处理 24 h。细胞贴壁生长于培养板,用 PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min;50% 异丙醇固定 1 min,油红 O 染色液染色 10 min,苏木素染色 5 min,盐酸酒精分色;水性封片剂封片,显微镜观察;细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,图像分析系统收集图像并于显微镜下摄像保存。

1.7 高效液相色谱分析细胞内总胆固醇含量

待细胞处理结束后,弃培养基,PBS 洗 3 遍,加入细胞裂解液 200 mL,反复冻融 3 次裂解细胞,BCA 法定量蛋白后,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,800 \times g 离心 10 min,取上清进行胆固醇检测,以豆甾醇为内标。取 100 mL 上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 mL,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L 三氧化铬进行氧化衍

生并真空干燥,100 μ L 乙腈—异丙醇(80:20)溶解样品,上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱,柱温 4℃,流速 1 mL/min,250 nm 紫外光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,计算值以细胞蛋白含量校正。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

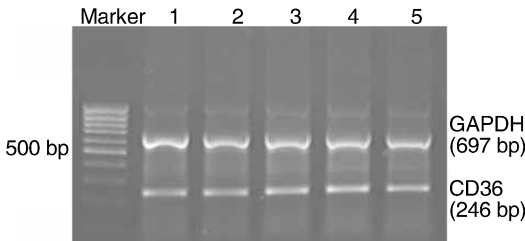


图 1. 不同浓度 D-葡萄糖对 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 表达的影响($n = 3$) 1-5 分别为 5.6、11、20、30 及 35 mmol/L D-葡萄糖组;a 为 $P < 0.05$,与 5.6 mmol/L D-葡萄糖组比较。

Figure 1. Effect of different concentration of D-glucose on the expression of CD36 mRNA in THP-1 macrophages

2 结果

2.1 高糖对 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响

11 mmol/L D-葡萄糖处理后 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达有所增加,20、30 及 35 mmol/L D-葡萄糖组 CD36 mRNA 和蛋白表达逐渐上调,以 30 mmol/L D-葡萄糖组最为明显 ($P < 0.05$;图 1 和 2)。

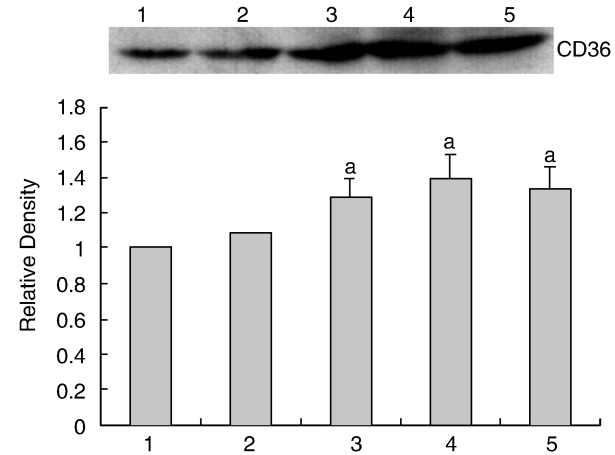
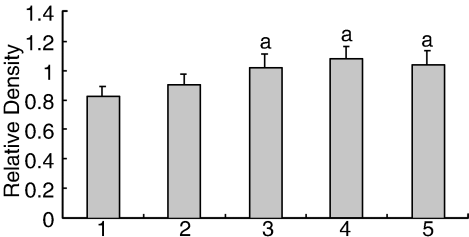


图 2. 不同浓度 D-葡萄糖对 THP-1 巨噬细胞 CD36 蛋白表达的影响($n = 3$) 1-5 分别为 5.6、11、20、30 及 35 mmol/L D-葡萄糖组;a 为 $P < 0.05$,与 5.6 mmol/L D-葡萄糖组比较。

Figure 2. Effect of different concentration of D-glucose on the expression of CD36 protein in THP-1 macrophages

2.2 细胞内脂质改变

50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖组细胞内脂质明显增多,而 20 mmol/L D-葡萄糖组与空白对照组比较细胞内脂质无明显增多(图 3)。

2.3 细胞内总胆固醇含量

ox-LDL 组、ox-LDL + 高糖组细胞内总胆固醇含量均增加,且 ox-LDL + 高糖组细胞内总胆固醇含量增加了 51.97% ($P < 0.05$;图 4)。

2.4 高糖与 ox-LDL 或 LDL 共孵育对 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响

分别用 50 mg/L ox-LDL、50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖、50 mg/L LDL、50 mg/L LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h,结果显示,各处理组 CD36 mRNA 和蛋白的表达均明显增加,高糖可促进 ox-LDL 和 LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达上调($P < 0.05$;图 5 和 6)。

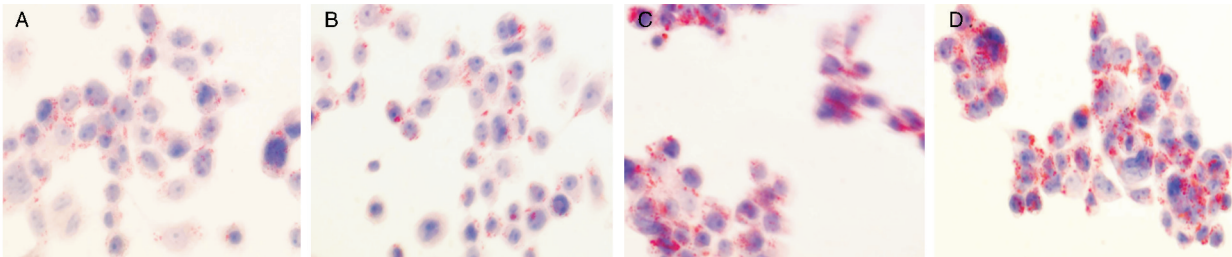


图 3. 油红 O 染色观察高糖对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响($\times 40, n = 3$) A 为空白对照组,B 为 20 mmol/L D-葡萄糖组,C 为 50 mg/L ox-LDL 组,D 为 50 mg/L ox-LDL + 20 mmol/L D-葡萄糖组。

Figure 3. Effect of high glucose on the lipid accumulation in THP-1 macrophages detected by oil red O stain

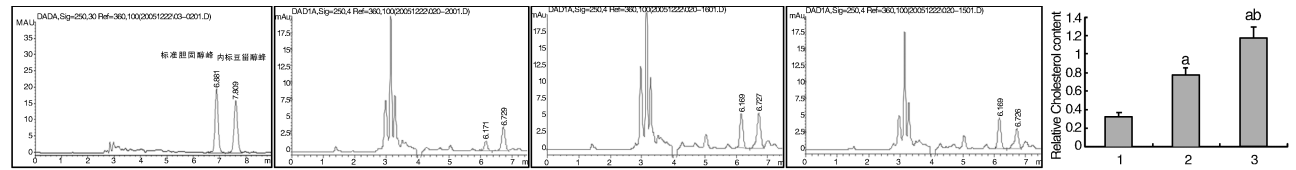


图 4. HPLC 检测 THP-1 巨噬细胞细胞内总胆固醇含量($n=3$) 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为 ox-LDL + 高糖组;a 为 $P<0.05$, 与对照组比较;b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. Total cholesterol content in THP-1 macrophages determined by HPLC

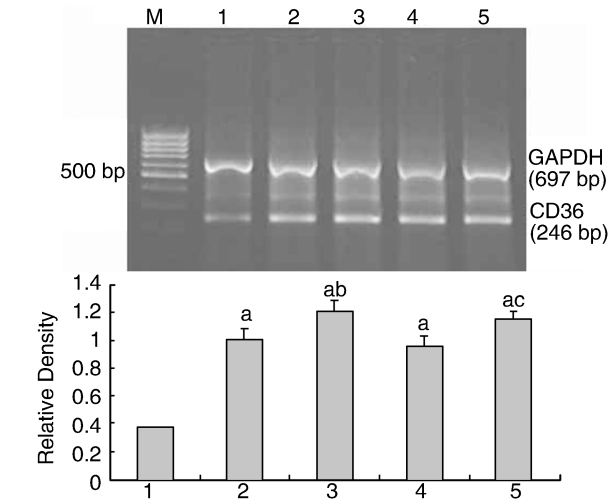


图 5. 高糖与 ox-LDL 或 LDL 共孵育对 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 表达的影响($n=3$) 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为 ox-LDL + 高糖组,4 为 LDL 组,5 为 LDL + 高糖组;a 为 $P<0.05$, 与对照组比较;b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较;c 为 $P<0.05$, 与 LDL 组比较。

Figure 5. The expression of CD36 mRNA in THP-1 macrophages incubated by high glucose and ox-LDL or LDL

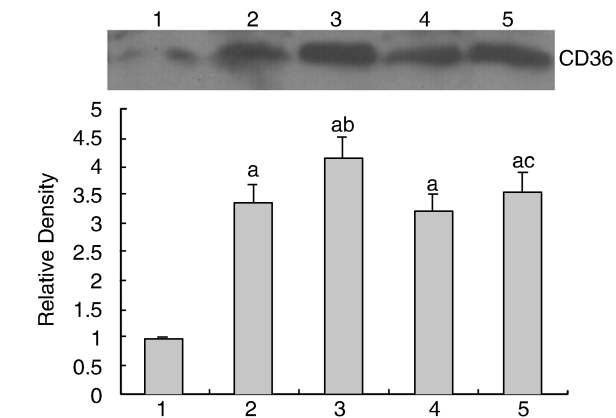


图 6. 高糖与 ox-LDL 或 LDL 共孵育对 THP-1 巨噬细胞 CD36 蛋白表达的影响($n=3$) 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为 ox-LDL + 高糖组,4 为 LDL 组,5 为 LDL + 高糖组;a 为 $P<0.05$, 与对照组比较;b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较;c 为 $P<0.05$, 与 LDL 组比较。

Figure 6. The expression of CD36 protein in THP-1 macrophages incubated by high glucose and ox-LDL or LDL

3 讨论

据估计,2010 年全球有 2.85 亿人被诊断为糖尿病,发病率为 6.4%,并有上升趋势^[11]。糖尿病是各种并发症的发生、发展和死亡的独立危险因素,包括冠状动脉疾病^[12-14],与 As 关联的代谢紊乱是糖尿病患者严重的血管病变和致死的主要原因。巨噬细胞内胆固醇平衡失调是 As 发病机制中的关键事件,CD36 参与了脂质代谢,在脂质代谢紊乱中起着重要的作用^[15,16]。在 ox-LDL 诱导的 As 形成过程中,CD36 起主要调节作用^[3,5,17]。研究发现,CD36 具有结合和修饰动脉壁内 LDL 的能力,促进荷脂的巨噬细胞泡沫细胞形成并引发 As 病变^[1,18,19],也许 CD36 在循环的巨噬细胞的激活是 As 病变的一个早期临床标志。新近发现,巨噬细胞源性泡沫细胞形成在糖尿病引起的 As 形成中起重要作用^[20]。CD36 与 2 型糖尿病患者 As 的危险因素密切相关,并提出 CD36 可能是代谢综合征 As 的一个潜在标记物^[19]。

本研究中,高糖可诱导 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达上调,并呈浓度依赖性,并且高糖可促进 ox-LDL 和 LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达上调,并增加细胞总胆固醇水平,提示高糖作为促进糖尿病性 As 病变的危险因素,CD36 也许在其中起了很重要的作用。已有研究证实,糖尿病患者中的脂质氧化加速,尤其是在有血管病变的患者中。当体内的葡萄糖耐受力下降时,循环中的 LDL 氧化加速,几个因素被认为促进了糖尿病患者的脂质氧化:高葡萄糖浓度下自氧化糖基化增强;高糖血症情况下自由基和脂质促氧化产物增加;还有糖尿病时表现抗氧化途径的作用减弱,并且晚期糖基化终末产物可能通过与血小板 CD36 相互作用而诱发血栓形成^[21]。

降血脂可使 As 病变的脂肪降低及斑块面积减小,而高血糖可削弱这一作用^[22],高糖血症也许协同高脂血症而促进糖尿病 As 的发生^[23,24]。CD36

在高糖增强巨噬细胞内吞摄取脂质功能中的作用成了倍受关注的问题,因此,需要进一步实验来检测 CD36 对糖尿病诱导体内巨噬细胞功能上调的作用大小。

综上所述,高血糖是心血管病的一个危险因素,因此,有效地控制糖尿病患者血糖浓度可能是防止糖尿病性 As 的有力途径。高糖的危害性可能主要是促进 ox-LDL 和 LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达上调,并增加其细胞内脂质蓄积,从而促进 As 病变的发生。CD36 表达增高可能是糖尿病患者 As 发生率增高的机制之一,提示 CD36 可能是糖尿病性 As 病变的防治靶点。CD36 可能是 2 型糖尿病患者 As 的发病机制新的生物标志物,可作为糖尿病患者的心血管事件的预测。

[参考文献]

[1] Silverstein RL, Li W, Park YM, et al. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis [J]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2010, 121: 206-220.

[2] Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, et al. Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36 [J]. Nature, 2013, 504 (7478): 172-176.

[3] Afonso Mda S, Castilho G, Lavrador MS, et al. The impact of dietary fatty acids on macrophage cholesterol homeostasis [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25 (2): 95-103.

[4] Bao Y, Wang L, Xu Y, et al. Salvianolic acid B inhibits macrophage uptake of modified low density lipoprotein (mLDL) in a scavenger receptor CD36-dependent manner [J]. Atherosclerosis, 2012, 223 (1): 152-159.

[5] Chavez-Sanchez L, Garza-Reyes MG, Espinosa-Luna JE, et al. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to ox-LDL in humans [J]. Hum Immunol, 2014, 75 (4): 322-329.

[6] 曾颖, 孙玉慧, 黄延锦, 等. 过氧化体增殖物激活型受体对巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (2): 121-124.

[7] Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87 (1): 15-19.

[8] Cioffi G, Rossi A, Targher G, et al. Usefulness of subclinical left ventricular midwall dysfunction to predict cardiovascular mortality in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Cardiol, 2014, 113 (8): 1409-414.

[9] Heine RJ, Dekker JM. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease [J]. Diabetologia, 2002, 45 (4): 461-475.

[10] 陈灿, 刘江华, 祖旭宇, 等. 胰岛素信号通路与动脉粥样硬化 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (1): 62-66.

[11] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87 (1): 4-14.

[12] Isla Pera P. Chronic complications of diabetes mellitus. Recommendations from the American Diabetes Association 2011. Prevention and management [J]. Rev Enferm, 2012, 35 (9): 46-52.

[13] Ezenwaka C, Eckel J. Prevention of diabetes complications in developing countries: time to intensify self-management education [J]. Arch Physiol Biochem, 2011, 117 (5): 251-253.

[14] Sone H. Prevention and management of atherosclerotic complications of diabetes [J]. Nihon Ronen Igakkai Zasshi, 2011, 48 (3): 253-256.

[15] Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species [J]. J Clin Invest, 2000, 105 (8): 1095-108.

[16] Seizer P, Schiemann S, Merz T, et al. CD36 and macrophage scavenger receptor a modulate foam cell formation via inhibition of lipid-laden platelet phagocytosis [J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36 (2): 157-162.

[17] Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (51): 49982-988.

[18] Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75 (3): 468-477.

[19] Handberg A, Levin K, Hojlund K, et al. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance [J]. Circulation, 2006, 114 (11): 1169-176.

[20] Kaplan M, Aviram M, Hayek T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: role of insulin therapy [J]. Pharmacol Ther, 2012, 136 (2): 175-185.

[21] Zhu W, Li W, Silverstein RL. Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36 [J]. Blood, 2012, 119 (25): 6136-144.

[22] Gaudreault N, Kumar N, Olivas VR, et al. Hyperglycemia impairs atherosclerosis regression in mice [J]. Am J Pathol, 2013, 183 (6): 1981-992.

[23] Horiuchi S, Unno Y, Usui H, et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1043: 671-675.

[24] Kuliczowska-Plaksej J, Bednarek-Tupikowska G, Plaksej R, et al. The influence of diabetes mellitus and insulin resistance on receptor CD36 expression. Part II. The role of receptor CD36 in the pathomechanism of diabetes complications [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006, 60: 152-162.

(此文编辑 文玉珊)