论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1630-04

糖基化终产物对 THP-1 巨噬细胞酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶-1 表达的影响

杨启红[1],徐 强[1],张 红[2],司良毅[1] ([1]第三军医大学西南医院老年病科,重庆 400038;[2]解放军第 113 医院老年病科,浙江宁波 315021)

摘 要:目的 观察糖基化终产物(advanced glycosylation end-products, AGEs)对 THP-1 巨噬细胞酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶-1(acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1, ACAT-1)表达的影响。方法 将糖基化-牛血清白蛋白(AGE-modified bovine serum albumin, AGE-BSA)与佛波酯(PMA)诱导分化 72h 的 THP-1 巨噬细胞共同孵育,运用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 PMA 诱导 72 h 后,THP-1 细胞停止增殖,由单核细胞分化成为巨噬细胞。用 50、100、200 和 400 mg/L AGE-BSA 处理巨噬细胞后,细胞 ACAT-1 mRNA 相对表达量逐渐增加;ACAT-1 蛋白表达的平均积分光密度值也逐渐增加,二者较对照牛血清白蛋白组明显增加($P<0.05$)。用 200 mg/L AGE-BSA 作用巨噬细胞 0、12、24、36 h 和 48 h 后,细胞 ACAT-1 mRNA 相对表达量逐渐升高;ACAT-1 蛋白表达的平均积分光密度值也逐渐升高,较 0 h 明显增加($P<0.05$)。结论 AGEs 可上调 THP-1 巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 和蛋白的表达,呈浓度和时间依赖性,这可能与糖尿病动脉粥样硬化有关。

关键词:糖尿病;糖基化终产物;酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶-1;基因表达
中图法分类号:R392.12;R392.6;R587.102 文献标识码:A

Effects of advanced glycation end-products on expression of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 in THP-1 macrophages

YANG Qi-hong[1], XU Qiang[1], ZHANG Hong[2], SI Liang-yi[1] ([1]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Geriatrics, No. 113 Hospital of PLA, Ningbo Zhejiang 315021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of advanced glycosylation end-products (AGEs) on the expression of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in cultured THP-1 macrophages. Methods THP-1 cells were differentiated into macrophages after cultured in RPMI1640 media containing 0.1 μmol/L PMA for 72 h. THP-1 macrophages were then exposed to AGE-modified bovine serum albumin (AGE-BSA, at concentration of 50, 100, 200 mg/L) for 24 h or to 200 mg/L AGE-BSA for 0, 12, 24, 36 h. Expression of ACAT-1 mRNA and protein in THP-1 macrophages was measured by RT-PCR and Western blot, respectively. Results After induced by 0.1 μmol/L PMA, THP-1 cells stopped proliferation and differentiated into macrophages. Treatment of THP-1 macrophages with AGE-BSA resulted in an increase in the mRNA and protein levels for ACAT-1 in a dose- and time-dependent manner. Conclusion AGEs upregulate the expression levels of mRNA and protein for ACAT-1 in cultured THP-1 macrophages, which might be partly involved in the atherogenesis in diabetic patients.

Key words: diabetes; advanced glycation end products; acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1; gene expression

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化发生的早期事件和关键环节,胆固醇酯在巨噬细胞中沉积则是泡沫细胞形成的重要原因。酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶-1(acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1, ACAT-1)是调节体内胆固醇代谢平衡的关键蛋白之一,在胆固醇的吸收、运输和储存过程中起重要作用[1]。糖尿病患者易并发动脉粥样硬化,后者是糖尿病致死、致残的重要原因。研究表明,持久的高血糖状态可导致体内蛋白质、脂质甚至核酸糖基化,经过一系列非酶促反应,最终形成具有高度活性、结构多样的糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs),在糖尿病动

基金项目:第三军医大学中青年科研基金(XG200524)
Supported by the Scientific Research Funds for Young Scholars by Third Military Medical University (XG200524)
作者简介:杨启红,女,云南省昆明市人,博士研究生,医师,主要从事老年心血管病方面的研究。电话:(023)68765233, E-mail:yangqh121@163.com
通信作者:司良毅,电话:(023)68754150,E-mail:siliangyi@163.com
收稿日期:2007-11-27 修回日期:2008-06-19

脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用。本研究试图从 AGEs 影响巨噬细胞 ACAT-1 基因表达这一角度阐明 AGEs 致动脉粥样硬化可能的细胞生物学效应。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

THP-1 细胞（本院中心实验室馈赠）；佛波酯（PMA，Sigma 公司）；RPMI1640 培养液、胎牛血清和 Trizol（Gibco 公司）；RT-PCR 试剂盒（Promega 公司）；PCR 引物（上海生工公司）；RIPA 细胞裂解液（上海申能博彩公司）；兔抗人 ACAT-1 和 β-actin 一抗（Santa Cruz 公司）；DAB 显色试剂盒（北京中杉公司）；其余试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　糖基化-牛血清白蛋白（AGE-BSA）的制备　　按照文献[2]的方法，在 PBS（0.01 mol/L，pH = 7.4）溶液中加入牛血清白蛋白（BSA）和 D-葡萄糖，使其终浓度分别为 5.0 g/L 和 50 mmol/L，其中含 100 U/ml 青霉素，100 mg/ml 链霉素，充分溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，37 ℃孵育 12 周。孵育结束后用 PBS（pH = 7.4）溶液透析 48 h 去除未结合的 D-葡萄糖。对照组 BSA 中不含 D-葡萄糖，其余条件一致。荧光光谱扫描（激发波长 390 nm，发射波长 450 nm，峰狭 5 nm）鉴定结合 AGE 含量，两组分别为 180.5 荧光单位/mg 蛋白和 2.98 荧光单位/mg 蛋白。分装后置 -80℃保存备用。

1.2.2　人单核/巨噬细胞培养及实验分组　　用终浓度为 0.1 μmol/L 的 PMA 诱导生长良好的 THP-1 细胞 72 h，使之分化成巨噬细胞[3]。更换无血清培养液继续培养 6 h 后，分别加入浓度为 50、100、200 mg/L 和 400 mg/L 的 AGE-BSA 干预细胞 24 h，以 100 mg/L BSA 为对照组。此外，用 200 mg/L AGE-BSA 分别处理细胞 0、12、24、36h 和 48 h。

1.2.3　RT-PCR　　按照 Trizol 说明书提取各组细胞总 RNA 后，微量分光光度计检测 RNA 样品纯度[$D(260)/D(280) > 1.8$]，并经凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。RT-PCR 反应按 Promega 试剂盒说明书进行。ACAT-1 上游引物为 5′- GCCTCAGACAATACAATGG -3′，下游引物为 5′- AAACACGTAACGACAAGTCC -3′（727 bp）。β-actin 上游引物为 5′-CACGGTGCCCATCTACGAG-3′，下游引物为 5′- CGTGGTGGTGAAGCTGTAGCC -3′（390 bp）。PCR 反应条件：94 ℃ 3 min，1 个循环；变性 94 ℃ 30 s，退火 56 ℃ ×30 s，延伸 72 ℃ ×1 min，35 个循环；末次循环 72 ℃延伸 5 min。2% TAE 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统扫描并分析，计算 ACAT-1 与 β-actin 电泳条带的平均光密度值之比，代表 ACAT-1 mRNA 水平，每组重复 3 次。

1.2.4　Western blot　　RIPA 裂解细胞提取总蛋白，考马斯亮蓝 G250 测定总蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳完毕后，将凝胶依次进行转膜（100 mV，80 min）、封闭 2 h、TBST 洗涤、ACAT-1/β-actin 一抗（1∶500）孵育（4℃，过夜）、二抗（1∶2 000）孵育（37 ℃，1 h）、DAB 显色。扫描 PVDF 膜并对电泳条带进行光密度分析。以 β-actin 作为上样对照，计算靶蛋白条带与内参条带光密度之比作为各组蛋白表达水平，每组重复 3 次。

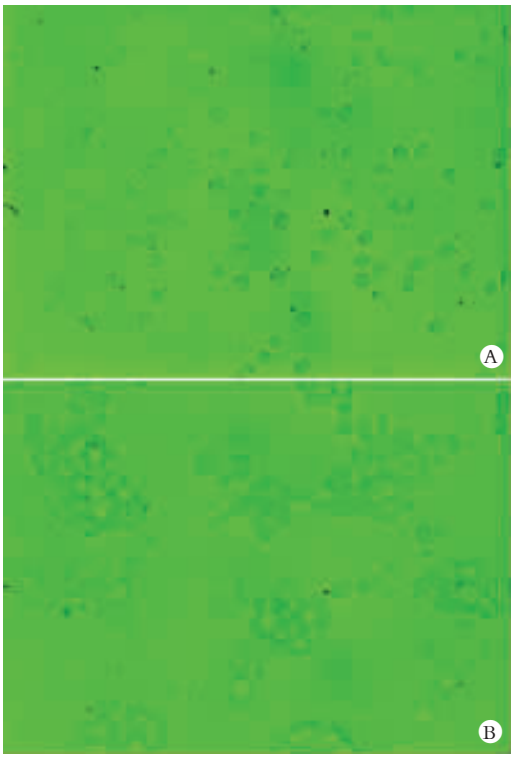
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.5 统计软件对组间数据差异进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　THP-1 细胞的转化

与 0.1 μmol/L PMA 孵育 72 h 后，THP-1 细胞由悬浮细胞向贴壁细胞转化，呈阿米巴样贴壁生长，伸出伪足，富含颗粒，具有巨噬细胞的特点，转化率超过 85%（图 1）。



A：诱导前；B：诱导后

图 1　PMA 诱导前后 THP-1 细胞的变化　（倒置相差显微镜 ×200）

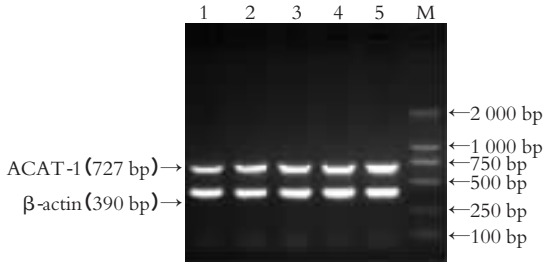
2.2　不同浓度 AGE-BSA 对巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 及蛋白表达的影响

用 50、100、200 mg/L 和 400 mg/L AGE-BSA 处理巨噬细胞 24 h 后，细胞 ACAT-1 mRNA 的表达水平依次增加，与 BSA 组比较，有显著性差异（$P < 0.05$）（表 1，图 2）。与之一致的是，与 BSA 组比较，细胞 ACAT-1 蛋白的表达水平也依次增加（$P < 0.05$）（表 1，图 3）。

表 1　不同浓度 AGE-BSA 对巨噬细胞 ACAT-1 表达的影响（$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

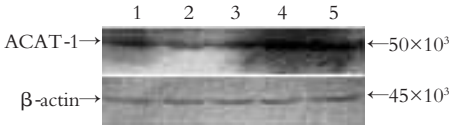
组别	ACAT-1 mRNA	ACAT-1 蛋白
BSA	0.319 ± 0.186	1.017 ± 0.172
50 mg/L AGE-BSA	0.384 ± 0.117[a]	1.302 ± 0.281[a]
100 mg/L AGE-BSA	0.447 ± 0.119[ab]	2.049 ± 0.212[ab]
200 mg/L AGE-BSA	0.539 ± 0.067[abc]	3.170 ± 0.151[abc]
400 mg/L AGE-BSA	0.676 ± 0.136[abcd]	3.497 ± 0.216[abcd]

a：$P < 0.05$，与 BSA 组比较；b：$P < 0.05$，与 50 mg/L AGE-BSA 组比较；c：$P < 0.05$，与 100 mg/L AGE-BSA 组比较；d：$P < 0.05$，与 200 mg/L AGE-BSA 组比较



1:BAS 组;2~5:分别为 AGE-BSA 50、100、200、400 mg/L 组;M:DNA 标准(DL 2000)

图2 不同浓度 AGE-BSA 处理组巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 的表达



1:BAS 组;2~5:分别为 AGE-BSA 50、100、200、400 mg/L 组

图3 不同浓度 AGE-BSA 处理组巨噬细胞 ACAT-1 蛋白的表达

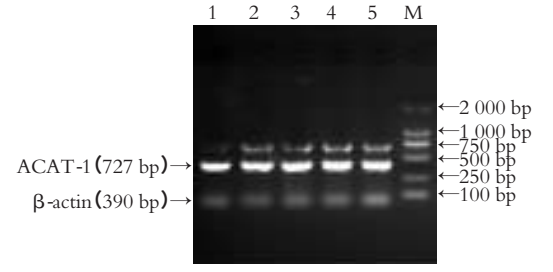
2.3 同一浓度 AGE-BSA 作用不同时间对巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 及蛋白表达的影响

用 200 mg/L AGE-BSA 分别处理巨噬细胞 0、12、24、36 h 和 48 h,结果显示,随着处理时间的延长,巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 及蛋白的表达水平逐渐增加。与 0 h 比较,其余各时相点蛋白表达水平均显著性增加($P<0.05$)(表2,图4、5)。

表2 AGE-BSA 作用不同时间对巨噬细胞 ACAT-1 表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

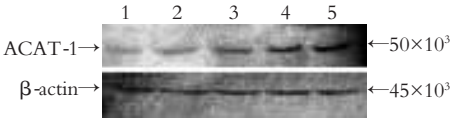
时相点	ACAT-1 mRNA	ACAT-1 蛋白
0 h	0.183±0.090	1.234±0.365
12 h	0.374±0.120[a]	1.790±0.113[a]
24 h	0.417±0.194[ab]	2.564±0.632[ab]
36 h	0.546±0.230[abc]	3.032±0.237[abc]
48 h	0.637±0.326[abcd]	4.598±0.239[abcd]

a:$P<0.05$,与0 h 比较;b:$P<0.05$,与12 h 比较;c:$P<0.05$,与24 h 比较;d:$P<0.05$,与36 h 比较



1:0 h;2:12 h;3:24 h;4:36 h;5:48 h;M:DNA 标准(DL 2000)

图4 200 mg/L AGE-BSA 作用不同时间巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 的表达



1:0 h;2:12 h;3:24 h;4:36 h;5:48 h

图5 200 mg/L AGE-BSA 处理不同时间巨噬细胞 ACAT-1 蛋白的表达

3 讨论

AGEs 在糖尿病患者体内大量蓄积,可诱发并加剧机体氧化应激、促发炎症反应和内皮细胞功能紊乱,是导致糖尿病慢性血管并发症,包括动脉粥样硬化及微血管病的重要原因[4,5]。然而,目前有关 AGEs 加速糖尿病动脉粥样硬化发生发展的分子机制尚未完全阐明。研究表明,AGEs 可诱导巨噬细胞表面清道夫受体和脂蛋白脂酶的基因表达,从而增强巨噬细胞脂质摄取的能力[6,7],促进泡沫细胞形成。此外,糖尿病患者体内脂质可被 AGEs 修饰,导致机体对糖基化 LDL 清除率下降,促使巨噬细胞对糖基化 LDL 的摄取增加,糖基化 HDL 增加还可减弱其逆向转运胆固醇的能力,增强单核巨噬细胞摄取 ox-LDL,加速泡沫细胞的形成[8,9]。

ACAT 是位于细胞内质网上的一种膜蛋白,是细胞内唯一催化游离胆固醇和长链脂肪酸连接形成胆固醇酯的酶[10]。目前发现 ACAT 有2种亚型,即 ACAT-1 和 ACAT-2,在单核巨噬细胞中主要以 ACAT-1 形式存在,是泡沫细胞形成过程的主要介导者[11,12]。研究证实,在单核细胞分化成巨噬细胞及泡沫细胞形成过程中,ACAT-1 表达及其酶活性明显增加[13]。

本实验采用细胞培养及分子生物学方法,直接观察致动脉粥样硬化性 AGEs 对巨噬细胞 ACAT-1 表达变化的影响,初步探讨 AGEs 加速糖尿病动脉粥样硬化可能的机制。实验结果显示,不同浓度 AGE-BSA 处理 PMA 诱导分化的 THP-1 巨噬细胞 24 h 后,随着 AGEs 浓度的增加,巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 和蛋白的表达水平逐渐增加;而 200 mg/L AGE-BSA 处理巨噬细胞不同时间后,随着处理时间的延长,细胞 ACAT-1 mRNA 和蛋白的表达水平均较 0 h 组明显增加。因此,我们推测,AGEs 可能通过明显上调巨噬细胞胆固醇代谢的关键因素 ACAT-1 mRNA 和蛋白的表达水平,进而增强巨噬细胞摄取脂质的能力,促进泡沫细胞形成,因而在一定程度上参与了糖尿病易患动脉粥样硬化的过程。深入研究 AGEs 与巨噬细胞 ACAT-1 基因表达及酶活性之间的相互作用,将为进一步了解糖尿病易患动脉粥样硬化的分子机制及合理防治提供新的思路。

参考文献:

[1] Chang T Y, Chang C C, Lin S, *et al*. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2[J]. Curr Opin Lipidol, 2001, 12(3):289-296.

[2] Iwashima Y, Eto M, Horiuchi S, *et al*. Advanced glycation end product-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression in the cultured mesangial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264(2):441-448.

[3] Iwashima Y, Eto M, Hata A, *et al*. Advanced glycation end products-

induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(2):368 - 380.

[4] Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications[J]. Physiol Res, 2004, 53(2):131 - 142.

[5] Vasdev S, Gill V, Singal P. Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications[J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 49(1):48 - 63.

[6] Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins[J]. Amino Acids, 2003, 25(3 - 4):283 - 292.

[7] Beauchamp M C, Michaud S E, Li L, *et al*. Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression[J]. J Lipid Res, 2004, 45(9):1749 - 1757.

[8] Thomas M C, Baynes J W, Thorpe S R, *et al*. The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease[J]. Curr Drug Targets, 2005, 6(4):453 - 474.

[9] Machado A P, Pinto R S, Moyses Z P, *et al*. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(3):392 - 403.

[10] Brown M S, Goldstein J L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor[J]. Cell, 1997, 89(3):331 - 340.

[11] Kruth H S, Huang W, Ishii I, *et al*. Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37):34573 - 34580.

[12] Cathcart M K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(1):23 - 28.

[13] Chang T Y, Chang C Y, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase[J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66:613 - 638.

（编辑　王小寒）

（上接 1625 页）

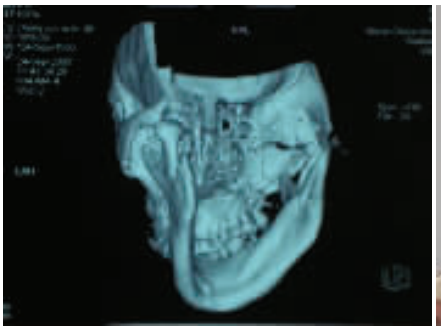


图 1　双侧髁突下骨折 CT 三维重建



图 2　术后咬合关系



图 3　术后张口度

3.2　手术要点

3.2.1　选择合适的手术时机　在骨折后 6 h 内最好，如超过该时间，则可考虑在肿胀完全消退后进行。

3.2.2　手术入路及手术方式　常用的手术入路有耳屏前入路和颌后入路两种：耳屏前入路适用于骨折位置较高的髁状突骨折；颌后入路适用于骨折位置较低的髁状突骨折。在临床上应根据术前检查，尤其是 CT 及三维重建，精确判断骨折部位，根据其高低选择耳屏前入路或颌后入路，必要时可联合采用两种入路施行手术。

3.2.3　术后功能训练　髁状突骨折治疗的目标为：恢复良好的咬合关系；减轻疼痛；达到下颌骨对称性外形以及下颌骨在三维空间平面的良好运动功能。欲实现这一目标，就必须对髁状突患者进行严格的早期功能训练。Burlini[3] 的研究也表明，无论手术治疗或非手术治疗，早期功能锻炼以恢复咀嚼功能是非常重要的。关节功能障碍。本组患者在手术 1 周后开始进行功能训练，经随访观察，全部病例在术后 3 个月即可达到 3 cm 以上的张口度，无偏颌等并发症发生，颞颌关节功能基本恢复正常。

3.2.4　术后并发症及处理　常见的并发症有：术后感染、术中术后出血、涎瘘、面神经损伤等，也有学者报道可发生 Frey 's 综合征[4]。应当注意，对于粉碎性髁状突骨折，摘除碎骨以后，遗留髁状突边缘锐利，如果修整则进一步降低升支高度；如果不予处理则可能出现损伤血管及周围组织，甚至出现假性动脉瘤或者动静脉瘘[5]，导致大出血影响生命的可能，在处理时要慎重。

关键词：髁状突骨折；手术治疗

中图法分类号：R782.405　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Kamitani K, Murakami K, Chen W H, *et al*. Clinical study on mandibular condylar fracture. 2. Long-term follow-up study in 48 patients with 66 joints[J]. Nihon Ago Kansetsu Gakkai Zasshi, 1989, 1(2):63 - 72.

[2] Stiesch-Scholz M, Schmidt S, Eckardt A. Condylar motion after open and closed treatment of mandibular condylar fractures[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2005, 63(9):1304 - 1309.

[3] Burlini D. Therapeutic objectives and surgical treatment of mandibular condyle fractures. Personal experience[J]. Minerva Stomatol, 2004, 53(10):581 - 590.

[4] Sverzut C E, Trivellato A E, Serra E C, *et al*. Frey 's syndrome after condylar fracture: case report[J]. Braz Dent J, 2004, 15(2):159 - 162.

[5] Long X, Cheng Y, Li X, *et al*. Arteriovenous fistula after mandibular condylar fracture[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62(12):1557 - 1558.

（编辑　张　维）