维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0147-05

糖基化终产物抑制 THP-1 巨噬细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的表达

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科,重庆 400038;2. 中国人民解放军第 113 医院老年科,宁波 315021)

【摘 要】目的:观察糖基化终产物(AGEs)对 THP-1 巨噬细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARγ)表达的影响,探讨 AGEs 在糖尿病动脉粥样硬化中可能的作用。方法:用佛波酯(PMA)诱导 THP-1 单核细胞 72h 使其分化为巨噬细胞,并将糖基化-牛血清白蛋白(AGE-BSA)与巨噬细胞共同孵育,运用 RT-PCR 和免疫细胞化学法分别检测巨噬细胞 PPARγ mRNA 和蛋白的表达水平。结果:PMA 诱导 72h 后,THP-1 细胞停止增殖,由单核细胞分化成为巨噬细胞。50、100、200 和 400μg/ml AGE-BSA 处理 24h 后,巨噬细胞 PPARγ mRNA 相对表达量分别是 1.235±0.044、0.752±0.055、0.494±0.026、0.277±0.025;PPARγ 蛋白的平均积分光密度值分别为 36.460±0.625、24.561±0.636、19.326±0.803、12.715±0.752,二者较 100μg/ml 牛血清白蛋白(BSA)组均明显降低($P<0.05$)。200μg/ml AGE-BSA 作用 12、24、36 和 48h 后,巨噬细胞 PPARγ mRNA 相对表达量分别是 1.564±0.060、1.260±0.043、0.467±0.033、0.360±0.012;PPARγ 蛋白的平均积分光密度值分别为 32.502±0.739、22.234±0.835、16.568±0.683、11.537±0.547,二者较 0h 组也明显降低($P<0.05$)。结论:AGEs 可下调 THP-1 巨噬细胞 PPARγ mRNA 和蛋白的表达水平,且呈浓度和时间依赖性。

【关键词】糖基化终产物;巨噬细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ;基因表达;动脉粥样硬化

【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Advanced glycation end-products decreases THP-1 macrophages expression of peroxisome proliferator activated receptor-γ

YANG Qi-hong, et al

(*Department of Geriatrics, Southwest Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of advanced glycosylation end-products (AGEs) on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) in THP-1 macrophages and explore the function of AGEs in atherosclerosis. *Methods*: Differentiation of THP-1 cell was induced by PMA. The THP-1 macrophages were exposed to AGE-modified bovine serum albumin(AGE-BSA) in different concentration or the same concentration for different time. Expression of PPARγ mRNA and protein in THP-1 macrophages was measured by RT-PCR and immunocytochemical method. *Results*: RT-PCR showed that expression of PPARγ mRNA was 1.235±0.044, 0.752±0.055, 0.494±0.026, 0.277±0.025 in 50, 100, 200 and 400μg/ml AGE-BSA groups. PPARγ mRNA expression in THP-1 macrophages following 200μg/ml AGE-BSA for 12, 24, 36, 48h was 1.260±0.043, 0.467±0.033, 0.360±0.012. Western-Blot showed that after exposure of THP-1 macrophages to 50, 100, 200and 400mg/L AGE-BSA, the average integrated optical density values of PPARγ protein expression were 36.460±0.625, 24.561±0.636, 19.326±0.803, 12.715±0.752 respetively, significantly lower than that in BSA group($P<0.05$), the average integrated optical density values of PPARγ protein expression in THP-1macrophages following 200mg/L AGE-BSA for 12, 24, 36, 48h were 32.502±0.739, 22.234±0.835, 16.568±0.683, 11.537±0.547, lower than that in 0h group($P<0.05$). *Conclusion*: AGE-BSA could decrease the expression levels of mRNA and proteins for PPARγ in THP-1 macrophages in a dose- and time-dependent manner, which might be partly involved in atherogenesis in diabetic patients.

【Key words】 Advanced Glycation End Products; Macrophages; Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ; Gene Expression; Atherosclerosis

作者介绍:杨启红(1974-),女,助教,博士,
研究方向:老年心血管疾病的发病机制。

通讯作者:司良毅,男,教授,E-mail:siliangyi@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

糖尿病患者发生动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)的危险性可高于正常人 3~4 倍。持久的高血糖状态可导致体内蛋白质发生非酶促糖基化反应,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),参与糖尿病血管并发症及动脉粥样硬化的发生、发展。过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator activated receptor,PPAR)属于核内受体转录因子超家族成员,目前已发现 3 种 PPAR,即 PPARα、PPARβ 和 PPARγ,其中 PPARγ 在脂肪生成、胰岛素敏感性、细胞周期调节及细胞分化中起重要作用。研究发现,PPARγ 在血管内皮细胞、单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞、泡沫细胞以及动脉粥样硬化病灶中均有不同程度的表达,且 PPARγ 受体激动剂可使高脂喂饲载脂蛋白 $E^{-/-}$ 和(或)低密度脂蛋白 $^{-/-}$ 鼠主动脉斑块面积[1,2]减少、显著降低糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度[3],对动脉粥样硬化危险因素具有明显的保护效应。然而,AGEs 参与动脉粥样硬化的发生、发展是否与 PPARγ 基因表达有关,目前尚不明确。本研究通过观察 AGEs 对 THP-1 巨噬细胞 PPARγ 表达的影响,探讨 AGEs 在糖尿病动脉粥样硬化中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

THP-1 细胞(第三军医大学西南医院中心实验室馈赠);佛波酯(PMA,Sigma);RPMI1640 培养液(GIBCO);胎牛血清(PAA);Trizol(上海华舜生物制品有限公司);RT-PCR 试剂盒(Promega);PCR 引物(上海生工生物技术有限公司);免疫组织化学 SP 试剂盒(北京中杉生物制品有限公司);小鼠抗人 PPARγ 单克隆抗体(Santa Cruz);DAB 显色试剂盒(北京中杉);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 糖基化-牛血清白蛋白(AGE-BSA)的制备

在 PBS(0.01mol/L,pH7.4)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 5.0g/L 和 50mmol/L,充分溶解后用 0.22μm 滤膜过滤除菌,37℃孵育 12 周。孵育结束后用 PBS(pH7.4)溶液透析 48h 去除未结合的葡萄糖。以同一浓度 BSA 中不含葡萄糖为对照,其余条件一致。荧光分光光度计(激发波长 390nm,发射波长 450nm,峰狭 5nm)测定二者 AGEs 含量,分别为 180.5ku/g 蛋白和 2.98ku/g 蛋白,分装后置 -80℃保存备用。

1.3 细胞培养及实验分组

THP-1 细胞在 10% FBS-RPMI1640 培养液中悬浮生长,每 2~3d 传代 1 次。加入 0.1μmol/L PMA 诱导细胞 72h,使之分化成巨噬细胞,更换无血清培养液继续培养 12h 后按下列分组进行干预:剂量组分别加入终浓度 50、100、200 和 400μg/ml AGE-BSA 的培养液作用细胞 24h,以 100μg/ml BSA 为对照组。时间组用 200μg/ml AGE-BSA 分别处理细胞 0、12、24、36 和 48h。每组实验重复 3 次。

1.4 RT-PCR 检测

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(A260/A280>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。PPARγ 上游引物为 5'-GCAAAGACAACAGACAAATCAC-3',下游引物为 5'-TGCATTGAACTTCACAGCAAAC-3'(414bp)。β-actin 上游引物为 5'-CACGGTGCCCATCTACGAG-3',下游引物为 5'-CGTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'(390bp)。PCR 反应条件:94℃ 3min,1 个循环;变性 94℃ 30s,退火 56℃×30s,延伸 72℃×1min,35 个循环;末次循环 72℃延伸 5min。2% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统扫描并分析,计算 PPARγ 与 β-actin 电泳带的平均光密度值之比,代表 PPARγ mRNA 表达水平。

1.5 免疫细胞化学法

收集各组细胞,用 PBS 洗 2 次,涂于干净的被有 1%多聚赖氨酸的玻片上,4%多聚甲醛 4℃固定 15min,按照试剂盒说明书步骤操作,DAB 镜下显色,一抗以 1∶400 稀释,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定:阳性细胞为细胞核内有由浅至深棕黄色颗粒着色。每张图片任意选择 30 个细胞,经 Meta Morph Imaging System 软件测细胞平均积分光密度值代表 PPARγ 蛋白表达水平。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件分析,各组数据之间两两比较采用单因素方差分析(ANOVA),$P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 THP-1 细胞的转化

与 0.1μmol/L PMA 孵育 72h 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)。

2.2 AGE-BSA 对巨噬细胞 PPARγ mRNA 表达的影响

50、100、200 和 400μg/ml AGE-BSA 处理 24h 后,巨噬细胞 PPARγ mRNA 相对表达量较对照 BSA 组明显减少,且各组间差异具有显著性($P<0.05$;表 1 和图 2)。200μg/ml AGE-BSA 作用 0、12、24、36 和 48h 后,巨噬细胞 PPARγ mRNA 相对表达量较 0h 明显下降($P<0.05$),而且随着时间延长

维普资讯 http://www.cqvip.com

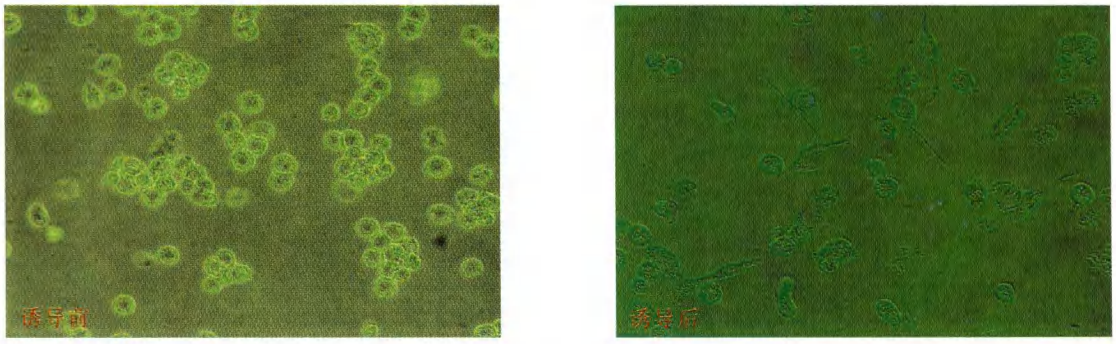
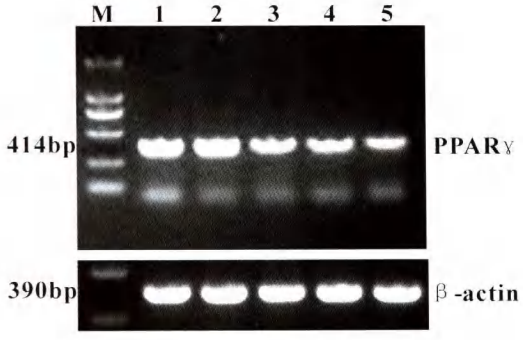
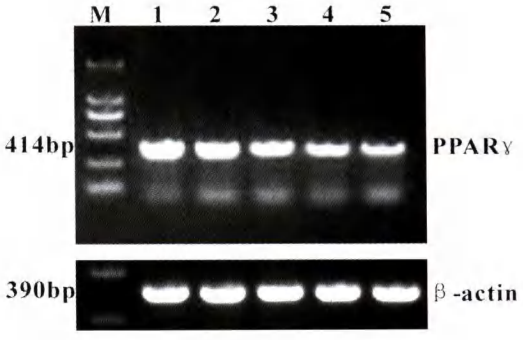


图 1 PMA 诱导前后 THP-1 细胞的变化(×200)



M. DNA 标准;1. 100μg/ml BSA;2. 50μg/ml AGE-BSA;3. 100μg/ml AGE-BSA;4. 200μg/ml AGE-BSA;5. 400μg/ml AGE-BSA

图 2 不同浓度 AGE-BSA 处理细胞 PPARγmRNA 的表达



M. DNA 标准;1. 0h;2. 12h;3. 24h;4. 36h;5. 48h

图 3 200μg/ml AGE-BSA 处理细胞不同时间 PPARγmRNA 的表达

表 1 不同浓度 AGE-BSA 处理组巨噬细胞 PPARγ 的表达($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	PPARγ mRNA	PPARγ 蛋白
100μg/ml BSA 组	1.481 ± 0.018	38.541 ± 0.023
50μg/ml AGE-BSA 组	1.235 ± 0.044[a]	36.460 ± 0.625[a]
100μg/ml AGE- BSA 组	0.752 ± 0.055[ab]	24.561 ± 0.636[ab]
200μg/ml AGE- BSA 组	0.494 ± 0.026[abc]	19.326 ± 0.803[abc]
400μg/ml AGE-BSA 组	0.277 ± 0.025[abcd]	12.715 ± 0.752[abcd]

a. P< 0.05,与 BSA 组相比;b. P<0.05,与 50μg/ml AGE-BSA 组相比;c.与 100μg/ml AGE-BSA 组相比;d.与 200μg/ml AGE-BSA 组相比

PPARγ mRNA 相对表达量逐渐减少(表 2 和图 3)。

2.3 AGE-BSA 对巨噬细胞 PPARγ 蛋白表达的影响

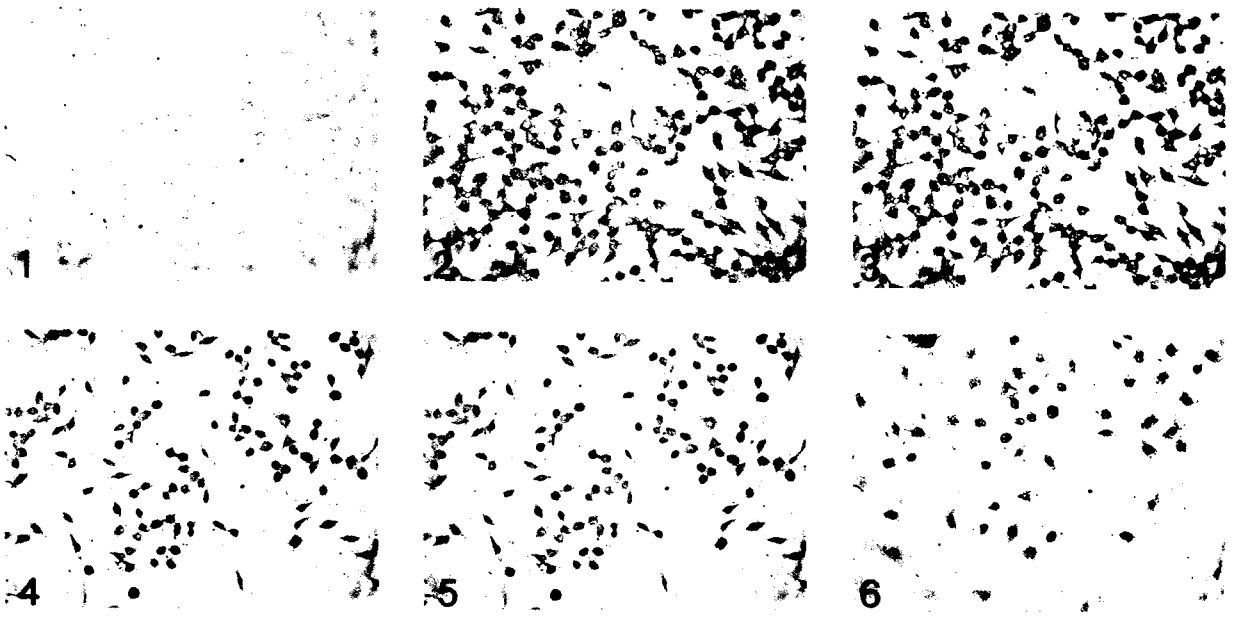
不同浓度 AGE-BSA 组与对照 BSA 组之间 PPARγ 蛋白表达具有显著的统计学差异(P< 0.05;表 1 和图 4),且随着 AGE-BSA 浓度升高 PPARγ 蛋白表达水平逐渐下降。同一浓度 AGE-BSA 处理不同时间后,随着时间延长,巨噬细胞 PPARγ 蛋白的表达水平也逐步降低,与 0h 组比,有显著性差异(P<0.05;表 2)。

表 2 不同处理时间组巨噬细胞 PPARγ mRNA 及蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, n=3)

时间(h)	PPARγ mRNA	PPARγ 蛋白
0	1.743 ± 0.061	41.792 ± 0.785
12	1.564 ± 0.060[a]	32.502 ± 0.739[a]
24	1.260 ± 0.043[ab]	22.234 ± 0.835[ab]
36	0.467 ± 0.033[abc]	16.568 ± 0.683[abc]
48	0.360 ± 0.012[abcd]	11.537 ± 0.547[abcd]

a. P<0.05,与 0h 相比;b. P<0.05,与 12h 相比;c. P<0.05,与 24h 相比;d. P<0.05,与 36h 相比

维普资讯 http://www.cqvip.com



1. PBS 阴性对照;2. 100μg/ml BSA;3. 50μg/ml AGE-BSA;4. 100μg/ml AGE-BSA;5. 200μg/ml AGE-BSA;
6. 400μg/ml AGE-BSA

图 4 不同浓度 AGE-BSA 处理细胞 PPARγ 蛋白表达的免疫细胞化学染色 (SP ×200)

3 讨 论

糖尿病是一种常见的代谢病,AS 是糖尿病致死、致残的重要原因。正常人体内非酶促糖基化反应非常缓慢,而糖尿病患者因为生化代谢异常,特别是持久的高血糖状态可导致体内非酶促糖基化反应明显加速,从而引起 AGEs 大量蓄积[4]。AGEs 可通过改变被修饰蛋白的结构和功能或与特异的 AGEs 受体(RAGE)结合影响细胞内信号转导、促进细胞因子释放等在糖尿病 AS 中发挥致病效应[5]。普遍认为,AGEs 是糖尿病 AS 及血管并发症的关键调节因素[6],体内给予外源性 AGEs 能促进 AS,而动物模型中 AGEs 的化学降解或生成降低均可减轻 AS 病变[7]。此外,糖基化低密度脂蛋白(AGE-low density lipoprotein,AGE-LDL)能促进 LDL 氧化形成氧化型低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein,ox-LDL),后者可被巨噬细胞清道夫受体识别,进而导致细胞内大量脂质聚集促进泡沫细胞形成[8,9]。PPARγ 是一类由配体活化的核转录因子,属于核受体超家族成员。在细胞内,PPARγ 与 9-顺式维甲酸受体(9-cis retinoid X receptor,RXR)形成异二聚体,然后被配体激活,通过与目的基因调控区内的 PPAR 反应元件(PPARr responsive element,PPRE)作用,激活或抑制目的基因的转录,从而发挥其生物学效应。PPARγ 活化一方面可使巨噬细胞清道夫 A 型受体(Scavenger receptor-A,SR-A)的表达下降 40%[10],另一方面可明显上调巨噬细胞中参与胆固醇逆向运输的基因,如脂蛋白脂酶、清道夫受体 BI、肝 X 受体 α(Liver X receptorα,LxRα)、(ATP-binding cassette transporter 1,ABCA1)、载脂蛋白的 AI(Apolipoprotein AI,apoAI)等的表达[11],从而促进胆固醇逆向运输,具有明显的抗动脉粥样硬化作用。目前研究大多都是针对相应配体活化 PPARγ 核蛋白而进行的间接研究,本实验则以 THP-1 细胞为研究对象,直接观察 AGEs 刺激 PMA 诱导分化的 THP-1 巨噬细胞后其 PPARγ mRNA 和蛋白表达水平的变化情况,结果发现,不同浓度 AGE-BSA 处理巨噬细胞 24h 后,随着 AGEs 浓度的增加,巨噬细胞 PPARγ mRNA 和蛋白的表达水平呈浓度依赖性地减少;而同一浓度 AGE-BSA 处理巨噬细胞不同时间后,随着处理时间的延长,巨噬细胞 PPARγ mRNA 和蛋白的表达水平均较对照组明显减少,呈时间依赖性。因此,我们推测 AGEs 下调巨噬细胞 PPARγ 的表达可能在一定程度上参与了糖尿病易患动脉粥样硬化的过程。进一步研究 AGEs 与 PPARγ 之间的相互作用,将为深入了解糖尿病易患动脉粥样硬化的机制及合理防治提供新的思路。

参 考 文 献

维普资讯 http://www.cqvip.com

[1] Li AC,Brown KK,Silvestre MJ,et al. Peroxisome proliferators activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. J Clin Invest,2000;106 (4):523-531.

[2] Chen Z,Tshibashi S,Perry S,et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice:pleiotropic effects on CD36 expression and HDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2001;21(3):327-372.

[3] Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N,et al. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab,2001;86 (7):3452-3456.

[4] Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications[J]. Expert Opin Investig Drugs,2002;11(9):1205-1223.

[5] Garay-Sevila ME,Regalado JC,Malacara JM,et al. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Endocrinol Invest,2005;28(3):223-230.

[6] Yamagishi S,Matsui T,Nakamura K. Kinetics, role and therapeutic implications of endogenous soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetes [J]. Curr Drug Targets,2007;8(10):1138-1143.

[7] Forbes JM,Yee LT,Thallas V,et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes accelerated atherosclerosis [J]. Diabetes,2004;53(7):1813-1823.

[8] Nomura S,Shouzu A,Omoto S,et al. Activated platelet and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculatin:clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes[J]. Clin Appl Thromb Hemost,2004;10(3):205-215.

[9] Shimada K,Mokuno H,Miyazaki T,et al. Predictive value of circulating oxidized IDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease [J]. Diabetes Care, 2004;27 (3):843-844.

[10] Argmann CA,Sawyez CG,McNeil CJ,et al. Activation of peroxisome proliferator 2 activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cho lesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003;23(3):475-482.

[11] Malerod L,Sporstol M,J uvet LK,et al. Hepatic scavenger receptor class B,type I is stimulated by peroxisome proliferators-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor-alpha [J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;305(3):557-565.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 146 页)

生保护作用。器官移植也存在缺血再灌注现象,RPM 除了抗排斥反应外,还起到了预防和减轻缺血再灌注损伤的作用。RPM 已广泛应用于临床:器官移植中抗急、慢性排斥反应,预防心血管内再狭窄,抗肿瘤,抗病毒等。实验结果表明,RPM 还对缺血再灌注造成的肾组织损伤有明确的保护作用,是预防和减轻肾缺血再灌注损伤的有效方法之一。但其确切分子机制还不清楚,尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sehgal SN,Baker H,Vezina,et al. Rapamycin (AY-22,989),a new antifungal antibiotic.1I. Fermentation,isolation and characterization[J].J Antibiot,1975;28(10):727-732.

[2] Kuypers DR. Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation[J]. Drug Saf,2005;28(2):153-181.

[3] 陈聪聪,周 燕,柳子明,等.乌司他丁对肾缺血再灌注大鼠肾组织超微结构的影响[J]. 中华外科杂志,2004;42(14):877-880.

[4] 张世卿,苟 欣,李云祥,等.FK506 对缺血再灌注肾 TNF-α,p38MAPK 蛋白表达的影响[J]. 医学临床研究,2006;23(4):465-467.

[5] 吴其夏,余应年,卢 建,主编.病理生理学[M].第 2 版.北京:中国协和医科大学出版社,2003.271-296.

[6] 苏泽轩,主编.现代移植学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.266-277.

[7] Lehmkuhl H,Ross H,Eisen H,et al. Everolimus (certican)in heart transplantation:optimizing renal function through minimizing cyclosporine exposure[J]. Transplant Proc,2005;37(10):4145.

[8] Hackstein H,Taner T,Logar AJL,et al. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells[J]. Blood,2002;100(3):1084-1087.

[9] Monti P,Mercalli A,Leone BE,et al. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells[J]. Transplantation,2003;75(1):137-145.

[10] 周 同,孙桂芝,张玉梅,等.黏附分子与树突状细胞在大鼠肝和肾缺血-再灌注损伤中作用及抗黏附干预的影响[J].中国微循环,2004;8(5):315-318.

[11] Pham SM,Shears LL,Kawaharada N,et al. High local production of nitric oxide as a possible mechanism by which rapamycin prevents transplant arteriosclerosis[J]. Transplant Proc,1998;30(4):953-954.

[12] 黄赤兵,张银甫.雷帕霉素作用机制研究及在肾移植中的应用进展[J]. 中国药房,2006;17(7):547-549.

[13] Groth CG,Backman L,Morles JM,et al. Sirolimus(rapamycin)-based therapy in human renal transplantation:similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group[J]. Transplant,1999;67(7):1036-1042.

[13] 何小玲,逯 宁,刘 彤,等.雷帕霉素和中药百令胶囊对大鼠小肠移植后细胞凋亡和 FasL mRNA 表达作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001;7(2):102-105.

(责任编辑:冉明会)