

## 糖基化终产物对人单核细胞源树突状细胞 VCAM-1 表达的影响

贾庆哲,朱铁兵\*,王连生,李春坚,陶正贤,杨志健

(南京医科大学第一附属医院心脏科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨糖基化终产物(AGEs)对人单核细胞源树突状细胞(DCs)血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)表达的影响。方法:用免疫磁珠分离人外周血 CD14<sup>+</sup>单核细胞,经含重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF) 100 μg/L 和重组人白细胞介素-4(rhIL-4) 20 μg/L 的 RPMI1640 培养,使其分化为 DCs,加入糖基化人血清白蛋白(AGE-HSA) 200 μg/ml,采用 RT-PCR 和 Western blot 法,观察 AGE-HSA 对 DCs VCAM-1 mRNA 和蛋白表达的影响,同时检测培养液上清中 IL-12 和 IL-18 的浓度。结果:与空白对照相比,AGE-HSA 可上调 DCs VCAM-1 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.05$ ),并且明显促进了 DCs IL-12 和 IL-18 的分泌( $P < 0.05$ )。AGE-HSA 干预组与空白对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:AGEs 能够上调 DCs VCAM-1 的表达,并且促进 DCs IL-12 和 IL-18 的分泌,这可能是糖尿病通过 DCs 促进动脉粥样硬化发生的重要机制之一。

**[关键词]** 树突状细胞;动脉粥样硬化;糖基化-人血清白蛋白;血管细胞黏附分子-1

**[中图分类号]** R543.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)09-1211-04

## Effect of advanced glycosylation end products on the expression of VCAM-1 in human monocyte-derived dendritic cells

JIA Qing-zhe, ZHU Tie-bing\*, WANG Lian-sheng, LI Chun-jian, TAO Zheng-xian, YANG Zhi-jian

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of advanced glycosylation end products (AGEs) on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human monocyte-derived dendritic cells (DCs). **Methods:** Monocytes were purified (over 98%) using anti-CD14 microbeads. After cultured with DC Cellgro medium containing recombinated human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF, 100 μg/L) and recombinated human interleukin-4 (rhIL-4, 20 μg/L) for 8 days, monocytes were derived into immature DCs. Then they were exposed to AGE-HSA (0, 200 μg/ml) for 24 h. Expression of VCAM-1 was semi-quantified by RT-PCR and Western-blot. At the same time, supernatants were collected and IL-12, IL-18 were analyzed by ELISA. **Results:** mRNA and protein of VCAM-1 incubated by 200 μg/ml AGE-HSA was higher than those of control at 24 h. Treatment of DCs with AGE-HSA resulted in nearly two times of the expression of VCAM-1 ( $P < 0.05$ ). The concentration of IL-12 and IL-18 was significantly higher than that of control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** AGEs can up-regulate the expression of VCAM-1 and induce the secretion of IL-12 and IL-18 in DCs. These findings may provide insight into the effect of DCs in processes of atherosclerosis.

**[Key words]** dendritic cells; atherosclerosis; AGE-HSA; VCAM-1

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1211-1214]

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生机制的研究一直是心血管疾病研究领域的热点,目前许多研究提出 AS 是一种慢性炎症和自身免疫性疾病这一观点,认为炎症和免疫反应导致了发病<sup>[1-2]</sup>。在动脉粥样硬化动物模型中发现,炎症标志物常随着脂质侵入动脉壁而出现,血管细胞黏附分子(vascular

cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在动脉粥样硬化的发生过程中常过度分泌,能在人类或实验动物动脉壁脂肪浸润早期就选择性黏附单核细胞和 T 淋巴细胞<sup>[3]</sup>。最近许多研究证实,在炎症免疫过程中起重要调控作用的树突状细胞(dendritic cells, DCs),无论在 AS 早期病变还是晚期的复合斑块中的聚集都明显增加,而在正常血管组织中分布却很少<sup>[4]</sup>,提示 DCs 可能参与了 AS 的发生和发展,但具体的机制尚不完全清楚。糖基化终产物(advanced glyco-

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学基金(06KJB320006)

\*通讯作者, E-mail: JYFZ15117@sina.com

sylation end products, AGEs) 在糖尿病患者致慢性血管并发症的发生发展中起着重要作用<sup>[5]</sup>, 本研究以其作为干预因素, 观察其对 DCs VCAM-1 表达的影响, 以期探讨糖尿病通过 DCs 促进 AS 发生的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

CD14<sup>+</sup>免疫磁珠及相关产品(Milteny Biotech 公司, 德国), 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白细胞介素-4(rhIL-4)(R & D 公司, 美国), ELISA 检测试剂盒(Biosource 公司, 美国), 培养液 RPMI1640 和胎牛血清(Gibco 公司, 美国)。总 RNA 提取盒购自美国 Viogen 公司, PCR 相关试剂购自美国 Promega 公司, VCAM-1 羊抗人多克隆抗体购自美国 Chemicon 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 糖基化白蛋白的制备

纯化的人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 置于含 D-葡萄糖的磷酸盐缓冲液中, 过滤除菌, 37℃ 下孵育 12 周后制备成糖基化白蛋白(AGE-HSA), 用磷酸盐缓冲液透析除去葡萄糖。AGE-HSA 经荧光分光光度法鉴定。

#### 1.2.2 DC 的培养和分组

取正常人外周血, 经淋巴细胞分离液 (Histopaque-1077, Sigma 公司, 美国) 密度梯度离心分离出单个核细胞, 采用无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 洗 3 次后重悬, 加入 Fc 拮抗剂和 CD14<sup>+</sup>磁珠, 4℃ 孵育 20 min, 经分离柱流洗, 分选出纯度 > 96% 的 CD14<sup>+</sup>单核细胞。经含 rhGM-CSF (100 μg/L) 和 rhIL-4 (20 μg/L) 的 RPMI1640 培养, 调节细胞浓度为 2 × 10<sup>6</sup> 个/L, 隔天换液。第 8 天单核细胞即分化成 DCs<sup>[6]</sup>, 在进行干预前, 先用不含血清的 RPMI1640 培养 24 h, 把细胞分成 3 组, 一组加入浓度为 200 μg/ml 的 HSA 干预 24 h, 另一组加入浓度为 200 μg/ml 的 AGE-HSA 干预 24 h, 最后一组未干预作为空白对照组。每日观察细胞生长情况, 采用台盼蓝染色测定, 各干预组细胞活性均在 90% 以上。

#### 1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

分别收集不同干预的 DCs, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, cDNA 第一链采用 Oligo (dT)<sub>18</sub> 合成, 设计特异性引物 VCAM-1 与 GAPDH 进行扩增, VCAM-1 上游引物: 5'-ATGACATGCTTGAGCCAGG-3', 下游引物: 5'-AGTGTCAAAGAAGGAGACAC-3', GAPDH 上下游引物分别是: 5'-TTCACCACCATG-

GAGAAGG-3' 和 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3', 扩增片段分别为 260 和 835 bp, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 30 个循环。上述反应结束后, 取 5 μl 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 用 TotalLab 软件分析 VCAM-1 基因及 GAPDH 基因的灰度值, 以两者的比值代表各基因的表达量。

#### 1.2.4 蛋白印迹杂交(Western blot)

收集细胞, 抽提细胞中可溶性蛋白, 测定蛋白浓度后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭后用 1:100 的多克隆羊抗人 VCAM-1 抗体杂交, 洗膜, 然后用 1:1 500 辣根过氧化物酶标记的抗羊 IgG 抗体室温孵育膜 1 h, X 线片曝光显影, 以 TotalLab 软件测定蛋白样品条带的总灰度值。

#### 1.2.5 细胞因子检测

干预 24 h 后收集细胞培养上清, -70℃ 储存, ELISA 检测试剂盒测定 IL-12 和 IL-18 浓度。在每一个预先用人 IL-12(IL-18) 抗体包被的酶标孔里加入 50 μl Biotinylated Antibody Reagent, 然后在酶标板各孔中分别加入 50 μl 稀释的 IL-12(IL-18) 标准品和待测血清, 室温下孵育 2 h 后, 再分别加入 100 μl 预先准备好的 Streptavidin-HRP Solution, 室温下孵育 30 min。洗板 3 次, 每孔中加入 100 μl Premixed TMB Substrate Solution, 在室温下显色 30 min, 在每孔中加入 100 μl Stop Solution 停止反应。在 ELISA 检测仪上, 以空白对照孔调零后测各孔吸光度值。

### 1.3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 ANOVA 检验, 两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AGE-HSA 荧光值

取孵育 12 周的 AGE-HAS 1.0 ml 于 F-3000 型荧光分光光度计上测其荧光值 (激发波长 390 nm, 发射波长 450 nm, 峰狭 5 nm), 以 1.0 ml HSA 按同样操作作为对照。AGE-HSA 的荧光强度大约比 HSA 高 50 倍。

### 2.2 树突状细胞的检测

形态学观察: CD14<sup>+</sup>免疫磁珠阳性分选的单核细胞均匀一致, 纯度大于 98%, 最初呈贴壁样生长, 加入细胞因子 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养 1 d 后可见细胞呈集落样生长, 后集落逐渐增大, 呈半悬浮样生长, 第 8 天在相差显微镜下即可见细胞有大量毛刺生成(图1)。

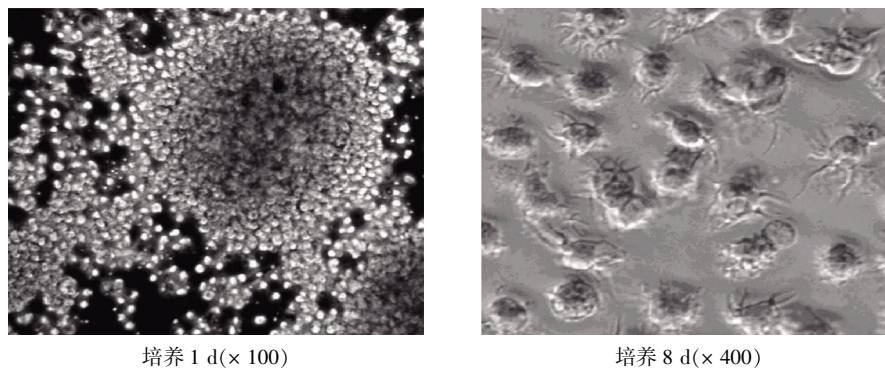


图 1 树突状细胞的形态观察

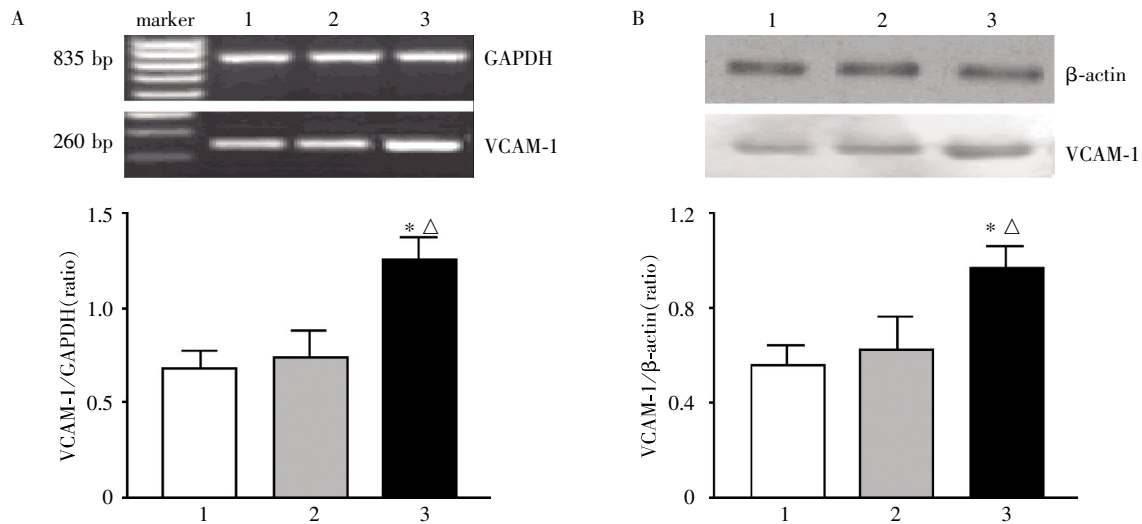
Figure 1 The morphological observation of dendritic cells

### 2.3 AGE-HSA 对 DCs VCAM-1 表达的影响

未经干预的 DCs 可表达少量的 VCAM-1,用 HSA 干预后 VCAM-1 mRNA 表达与空白对照组无明显差异,200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 AGE-HSA 可分别上调 VCAM-1 mRNA 和蛋白的表达且差异显著 ( $P < 0.05$ ,图2)。

### 2.4 AGE-HSA 对 IL-12、IL-18 分泌的影响

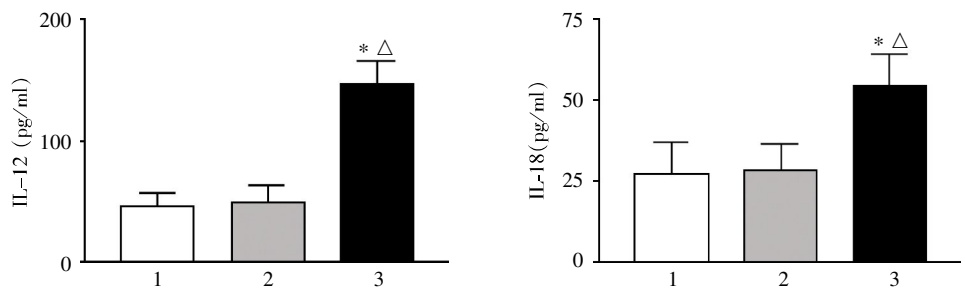
未经干预的 DCs 可分泌一定量的 IL-12 和 IL-18,用 HSA 干预后其分泌量与空白对照组相比无明显差异,用 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 AGE-HSA 干预后,IL-18 的分泌量比空白对照组增加约 1 倍,IL-12 的分泌量增加约 2 倍,差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ,图 3)。



1: control; 2: HSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 3: AGE-HSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). \* $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs HSA,  $n = 3$ 。

图 2 AGE-HSA 对人单核细胞源树突状细胞 VCAM-1 基因(A)和蛋白(B)表达的影响

Figure 2 Effect of AGE-HSA on gene (A) and protein (B) expression of VCAM-1 in human monocyte-derived dendritic cells



1: control; 2: HSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); 3: AGE-HSA (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). \* $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs HSA,  $n = 3$ 。

图 3 AGE-HSA 对人单核细胞源树突状细胞 IL-12 和 IL-18 分泌的影响

Figure 3 IL-12 and IL-18 secretion by AGE-HSA treated DCs

### 3 讨论

在 AS 病理发生的各个阶段, 都有不同程度的炎症免疫细胞(如 T、B 淋巴细胞和单核巨噬细胞)的参与<sup>[7]</sup>, 现今 AS 的炎症免疫发生机制已经得到共识。研究显示, 尼古丁和氧化性低密度脂蛋白可通过激活 DCs 介导的获得性免疫反应, 促进 AS 病变的进展<sup>[8-9]</sup>, 同时我们前期的工作发现, DCs 也是泡沫细胞的一个重要来源<sup>[10]</sup>, 这些为 DCs 参与 AS 的病理发生提供了重要的佐证。

AGEs 是由体内许多结构和功能蛋白质、脂质甚至核酸在体内高血糖状态下发生非酶糖基化而形成的。近年来的研究发现, AGEs 与糖尿病慢性并发症有密切关系。AGEs 主要通过直接和间接途径作用于人体: 直接作用主要包括引起细胞外基质的分子结构、功能改变和胞内 AGEs 的形成; 间接作用是通过受体发挥生物学作用, 也是其最主要的作用。DCs 是体内重要的抗原递呈细胞, 极少量的未成熟 DCs 在抗原的刺激下可以变为成熟的 DCs, 即可强烈激活 T 淋巴细胞启动特异性细胞免疫反应。在 AS 病变处 AGEs 表达和 DCs 聚集俱增加, 但二者相互间关系的研究尚不完善, 有理由相信 AGEs 可能会通过 DCs 参与 AS 的病理发生。本研究结果发现, AGE-HSA 促进了 DCs 分泌 IL-12, IL-12 分泌的增加促进初始 T 细胞产生 Th1 型应答, Th1 细胞偏向于分泌 IL-18, IL-18 又可上调 DCs 表面 MHC II 的表达, 这样就形成了一种正反馈, 放大了炎症反应<sup>[11]</sup>。

炎症标志物常随着脂质侵入动脉壁一起出现在动脉粥样硬化的病变初期, 正常的内皮通常不会引起白细胞的黏附聚集, 随着致动脉粥样硬化因素的作用, 部分动脉内皮细胞即在其表面分泌能够黏附多种白细胞的选择性黏附分子, 如选择素、VCAM-1 以及细胞间黏附分子(ICAM-1)。特别是 VCAM-1, 能在人类或实验动物动脉壁脂肪浸润早期就选择性黏附单核细胞和 T 淋巴细胞, VCAM-1 在动脉粥样硬化的发生过程中常过度分泌, 本研究发现用 AGE-HSA 干预后, VCAM-1 在 DCs 中的表达随之明显增高, 由此可引起多种炎性细胞如单核细胞和 T 淋巴细胞浸润至血管内膜下<sup>[12]</sup>, 同样促进了炎症反应, 这些都会促进 AS 的发生和进展。

总之, AGEs 能够促进 DCs 结合引起免疫反应, 促进细胞因子的分泌, 启动和放大炎症反应, 这些虽然不能完全解释 DCs 参与动脉粥样硬化的发生机制, 但是对揭示 AS 的病理发生具有重要的意义, 也

将会为 AS 的研究及防治提供一个新靶点。

#### [参考文献]

- [1] Madjid M, Willerson JT. Inflammatory markers in coronary heart disease[J]. *Br Med Bull*, 2011, 100:23-38
- [2] Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, et al. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2012, 110(6):889-900
- [3] Nahrendorf M, McCarthy JR, Libby P. Over a hump for imaging atherosclerosis: nanobodies visualize vascular cell adhesion molecule-1 in inflamed plaque [J]. *Circ Res*, 2012, 110(7):902-903
- [4] 梁春, 罗育坤, 黄东, 等. 血管树突状细胞在人主动脉粥样硬化早期病变中的分布 [J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(3):222-224
- [5] Sun M, Yokoyama M, Ishiwata T, et al. Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat [J]. *Int J Exp Pathol*, 1998, 79(4):207-222
- [6] Simone R, Barbarat B, Rabellino A, et al. Ligations of the BT3 molecules, members of the B7 family, enhance the proinflammatory responses of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells [J]. *Mol Immunol*, 2010, 48(1-3):109-118
- [7] Keaney JF Jr. Immune modulation of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2011, 124(22):e559-560
- [8] Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 2003, 107(4):604-611
- [9] Chen T, Li Z, Tu J, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(4):657-663
- [10] Luo YK, Liang C, Huang D, et al. Foam cell can be induced oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived dendritic cells: A new source of foam cell in atherogenesis [J]. *Circulation (supplement IV)*, 2003, 108(17):202
- [11] Benwell RK, Hruska JE, Fritsche KL, et al. Double stranded RNA-related to other TLR ligand-activated dendritic cells induce extremely polarized human Th1 responses [J]. *Cell Immunol*, 2010, 264(2):119-126
- [12] Cicha I, Urschel K, Daniel WG, et al. Telmisartan prevents VCAM-1 induction and monocytic cell adhesion to endothelium exposed to non-uniform shear stress and TNF- $\alpha$  [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011, 48(1):65-73

[收稿日期] 2012-04-20