

晚期糖基化终产物对人肝细胞株 LO2 增殖和凋亡的影响

李海成, 何金花, 王 明, 刘 誉

(暨南大学医学院 生物化学教研室, 广东 广州 510632)

[摘 要] 目的: 研究晚期糖基化终产物(AGEs)对人正常肝细胞株 LO2 的作用。方法: 以体外培养的 LO2 细胞株为研究对象, 采用 MTT 法测定不同质量浓度(0、3.75、7.5、15、30、60 g/L) AGEs 对 LO2 生长的抑制作用, 应用流式细胞仪分析细胞的凋亡情况, RT-PCR 分析不同质量浓度 AGEs 处理 LO2 后其 IL-1 β , TNF- α , HMGB1 的基因转录水平变化。结果: 当 LO2 细胞在 AGEs 质量浓度分别为 3.75、7.5、15、30、60 g/L 保温 48 h 后, 细胞的增殖均受到显著性抑制, 且抑制作用具有剂量依赖性。流式细胞仪分析发现 AGEs 促使 LO2 发生凋亡, 凋亡率亦随 AGEs 浓度增高而增加。RT-PCR 方法检测显示, AGEs 使 LO2 细胞中 IL-1 β , TNF- α , HMGB1 的基因 mRNA 的表达水平增高。结论: AGEs 可抑制人正常肝细胞株 LO2 的增殖和诱导其凋亡, 并能上调 IL-1 β , TNF- α 和 HMGB1 基因的表达。

[关键词] 人肝细胞株; 晚期糖基化终产物; 小牛血清白蛋白; 细胞凋亡; 毒性

[中图分类号] R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0143-06

Effects of advanced glycation end products on proliferation and apoptosis of human hepatic cell line LO2

LI Hai-cheng, HE Jin-hua, WANG Ming, LIU Yu

(Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the biological effects of advanced glycation end products (AGEs) on human normal hepatic cell line LO2. **Methods:** Proliferative inhibition of LO2 by AGEs at different concentrations (0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60 g/L) was accessed by using MTT assay. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The mRNA levels of IL-1 β , TNF- α and HMGB1 were determined by RT-PCR. **Results:** AGEs at 3.75, 7.5, 15, 30, 60 g/L significantly inhibited proliferation of LO2 after incubation with AGEs for 48 h, and the inhibition showed dose-dependent fashions as well. AGEs were also found to be able to cause apoptosis in LO2 cells. Flow cytometry analysis showed that AGEs increased the proportion of apoptotic cells, while RT-PCR demonstrated that the mRNA levels of IL-1 β , TNF- α and HMGB1 in LO2 cells were up-regulated by AGEs. **Conclusion:** AGEs inhibit proliferation, induce apoptosis and up-regulate the gene expression of IL-1 β , TNF- α and HMGB1 in LO2 cells.

[Key words] human hepatic cell line; advanced glycation end products; bovine serum albumin; apoptosis; toxicity

[收稿日期] 2008-11-06

[基金项目] 广州市科技计划项目(2002J1-C0361); 暨南大学引进人才启动基金资助项目(51204004)

[作者简介] 李海成(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 多基因疾病的分子生物学研究

通讯作者: 刘 誉, 男, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220256; E-mail: xyuliu07@126.com

生物大分子如蛋白质、脂质与核酸可在没有酶参与的情况下自发地与葡萄糖及其它还原糖反应产生稳定的共价加成产物—晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)^[1]。AGEs 是许多不同物质结构的总称,现已知羧甲赖氨酸、氢化戊糖苷、吡咯琳、咪哩琳酮等。目前已知,除糖尿病高血糖状态外,急性应激反应、衰老等均可引起 AGEs 合成增加^[2]。AGEs 不仅可以直接影响细胞和组织功能,导致疾病的产生,也可以通过与细胞上的特异受体结合,引发细胞的一系列炎症反应,导致机体的病理变化^[3]。通过染色技术,可观察到糖尿病人肝细胞和肾小管中 AGEs 的含量明显增高,说明 AGEs 对肝肾组织细胞的影响及 AGEs 与肝肾组织细胞间的相互作用明显,但其病理作用机制尚不完全清楚。本研究以体外培养的人正常肝细胞株 LO2 为研究对象,应用 MTT 法、流式细胞分析和 RT-PCR 技术观察不同浓度 AGEs 对 LO2 细胞生长的影响、致凋亡作用,以及对早期炎症因子 IL-1 β , TNF- α 和晚期炎症因子“高迁移率族蛋白 B1”(high-mobility group box1, HMGB1)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 主要试剂 DMEM 培养基购自 Gibico 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,胰酶购自 Sigma 公司,6 孔和 96 孔培养板购自美国 Corning 公司,MTT、Trizol 和 Taq DNA 聚合酶购自上海申能博彩, dNTP、Rnasin 和 Oligod T 购自 TaKaRa 公司, M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司。所用引物均由上海生工合成。

(2) 细胞株 所用细胞为人正常肝细胞株 LO2,由中山大学医学院生化教研室张轩同学提供,代次不详。

1.2 方法

(1) 细胞培养 LO2 细胞在含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,体积分数为 5% CO₂、湿度 95%、37 °C 条件下培养。细胞达面积分数 80% 融合后用 D-Hanks 液洗涤 1 次,加入质量分数 0.25% 的胰酶适度消化,再加入含体积分数为 10% 胎牛血清培养液终止消化,吹打成细胞悬液。1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,按 1:4 比例传代。

(2) AGEs 的体外制备 按参考文献[4]报道方法体外制备晚期糖基化牛血清白蛋白(BSA-AGEs)。反应液含体积分数为 60% 小牛血清白蛋白(BSA)、1.6 mol/L D-葡萄糖、0.1 mol/L 赖氨酸和 0.5 mol/L PBS,经 0.2 μ m 滤膜超滤除菌,于 50 °C 保温 4 d。反应混合物经葡聚糖凝胶 G-25 柱脱盐纯化,制备得 BSA-AGEs 冻干备用。取少量 BSA-AGEs 样品溶解于 PBS,在 440 nm/350 nm(发射波长/激发波长)测定荧光值作为随机单位(AU),得 AGEs 含量为 46.6 AU/mg 蛋白质。

(3) MTT 检测细胞生长抑制率 取对数生长长期的 LO2 细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 5 000 个,保温 24 h 贴壁良好后加入终质量浓度为 0、3.75、7.5、15、30、60 g/L 的 BSA-AGEs,同时另一组细胞加入终质量浓度为 0、3.75、7.5、15、30、60 g/L 的 BSA 作为平行对照以消除因 BSA 对细胞增殖的影响。每质量浓度设 3 个复孔,分别培养 48 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,于 37 °C 继续孵育 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 490nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(A)值。以 BSA-AGEs、BSA 质量浓度 0 g/L 时细胞活力为 100%,BSA-AGEs、BSA 质量浓度 0 g/L 组分别作为 BSA-AGEs 组与 BSA 组的空白对照,按下式计算各组细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{药物组均值}} / A_{\text{空白对照组均值}}) \times 100\%$$

(4) 流式细胞仪检测 取对数生长长期的 LO2 细胞以 2.5×10^5 /mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,培养 24 h 贴壁良好后加入不同终质量浓度(0、15、30 g/L)的 BSA-AGEs 同时另一组细胞加入不同终质量浓度(15、30 g/L)的 BSA,48 h 后收集细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,送中山大学第一附属医院检验科作流式细胞分析,测定细胞凋亡率。以 BSA-AGEs 质量浓度为 0 g/L 做为对照进行统计分析。

(5) RT-PCR 检测 IL-1 β , TNF- α , HMGB1 mRNA 表达水平 取对数生长长期的 LO2 细胞,培养 12 h 贴壁良好后分别加入终质量浓度为 0、3.75、7.5、15、30、60 g/L 的 BSA-AGEs,同时另一组细胞加入终质量浓度为 3.75、7.5、15、30、60 g/L 的 BSA,作用 48 h 后收集细胞。用 Trizol 法抽提总 RNA,再进行逆转录(RT)及多聚酶链式反应(PCR)。PCR 反

应体系:10 × PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTP 1 μ L, 上下游引物各 0.75 μ L, Taq 酶 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 双蒸水 17.6 μ L。3 对引物及内参扩增条件均为:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 (IL-1 55 $^{\circ}$ C, HMGB1 57 $^{\circ}$ C, TNF- α 58 $^{\circ}$ C) 40 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 β -actin 为内参照, 检测基因及内参照的引物序列见表 1。

取 6 μ L PCR 产物于体积分数为 2% 的琼脂糖

凝胶中电泳 30 min, 紫外灯下观察并拍照, 用全自动图像处理系统对 PCR 电泳结果进行灰度值扫描, 以目的基因的 PCR 条带与 β -actin 条带的灰度值比值作为各基因 mRNA 的相对表达量。

(6) 统计学分析 各实验数据以 (均数 \pm 标准差) ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析; $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

表 1 检测基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	产物长度/bp
IL-1 β	5'-CTGTCCTCGCTGTGAAAGAT-3'	5'-CAGTTGGGCATTGGTCTAGAC-3'	389
TNF- α	5'-CACAGTGAAGTGCTGCCAAC-3'	5'-GGCGATTACAGACACAACCTCC-3'	567
HMGB1	5'-CTAGCCCTGCTCCTGCTGGTA-3'	5'-AAATGGGCAAAAGCAAAAGA-3'	415
β -actin	5'-TGGCTCAGAAGCATTCTATGT-3'	5'-CAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	276

2 结果

2.1 BSA-AGEs 对 LO2 细胞的生长抑制作用

MTT 结果显示, 当 BSA-AGEs 终质量浓度分别为 3.75、7.5、15、30、60 g/L、保温 48 h 后, 各质量浓度组的吸光值与空白对照组比较均降低, 差异有统计学意

义 ($P < 0.05$); 而当 BSA 终质量浓度分别为 7.5、15、30、60 g/L 时, 各质量浓度组的吸光值与空白对照组比较均增加 ($P < 0.05$), 提示 BSA-AGEs 显著抑制 LO2 细胞生长, 但 BSA 则有促进 LO2 细胞生长的作用见表 2。

表 2 不同质量浓度 AGEs 和 BSA 对 LO2 细胞生长 ($\bar{x} \pm s$) 的抑制作用

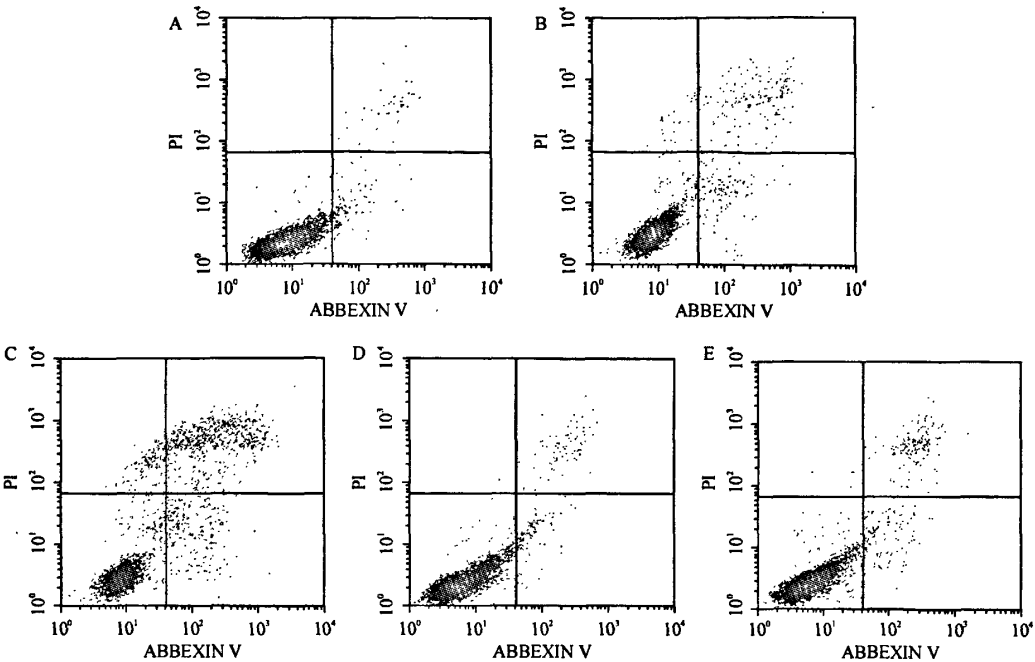
$\rho/(g \cdot L^{-1})$	n	BSA-AGEs		BSA	
		A 值	抑制率/%	A 值	抑制率/%
空白对照	3	1.09 \pm 0.05		1.10 \pm 0.01	
3.75	3	0.93 \pm 0.04 ¹⁾	14.79 \pm 0.24	1.16 \pm 0.01 ³⁾	-5.55 \pm 0.61
7.5	3	0.85 \pm 0.01 ¹⁾	22.12 \pm 1.01	1.25 \pm 0.09 ²⁾	-13.37 \pm 0.38
15	3	0.69 \pm 0.03 ¹⁾	36.61 \pm 0.53	1.29 \pm 0.01 ¹⁾	-17.31 \pm 0.21
30	3	0.55 \pm 0.05 ¹⁾	49.76 \pm 1.25	1.34 \pm 0.08 ¹⁾	-21.95 \pm 1.07
60	3	0.50 \pm 0.04 ¹⁾	54.37 \pm 2.04	1.29 \pm 0.07 ¹⁾	-16.82 \pm 0.76

与对照组比较, 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$; 3) $P > 0.05$

2.2 流式细胞仪检测

Annexin V 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。细胞坏死时, 虽然也会发生磷脂酰丝氨酸外翻, 但此时细胞膜的通透性明显增加, PI 等核酸染料进入细胞与细胞核中的核酸结

合, 发出红色荧光, 所以 Annexin V-FITC (绿色荧光) 与碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 合并使用, 来区分凋亡细胞与死亡细胞。统计结果显示, BSA-AGEs 组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), 且随着 BSA-AGEs 浓度的增高, LO2 细胞凋亡比例也增高。而 BSA 组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 流式结果见图 1 和表 3。



A:对照;B:BSA-AGEs=15 g/L;C:BSA-AGEs=30 g/L;D:BSA=15 g/L; E:BSA=30 g/L

图1 不同质量浓度BSA-AGEs和BSA处理LO2细胞流式结果图

表3 不同质量浓度BSA-AGEs和BSA处理LO2细胞后细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)

$\rho/(g \cdot L^{-1})$	n	细胞凋亡率/%	
		BSA	BSA-AGEs
对照	3	2.8 ± 0.08	
15	3	$2.5 \pm 0.01^{1)}$	$6.1 \pm 0.03^{2)}$
30	3	$2.6 \pm 0.04^{1)}$	$9.7 \pm 0.04^{2)}$

与对照组比较,1) $P > 0.05$; 2) $P < 0.01$

2.3 RT-PCR检测IL-1 β ,TNF- α ,HMGB1的mRNA表达水平

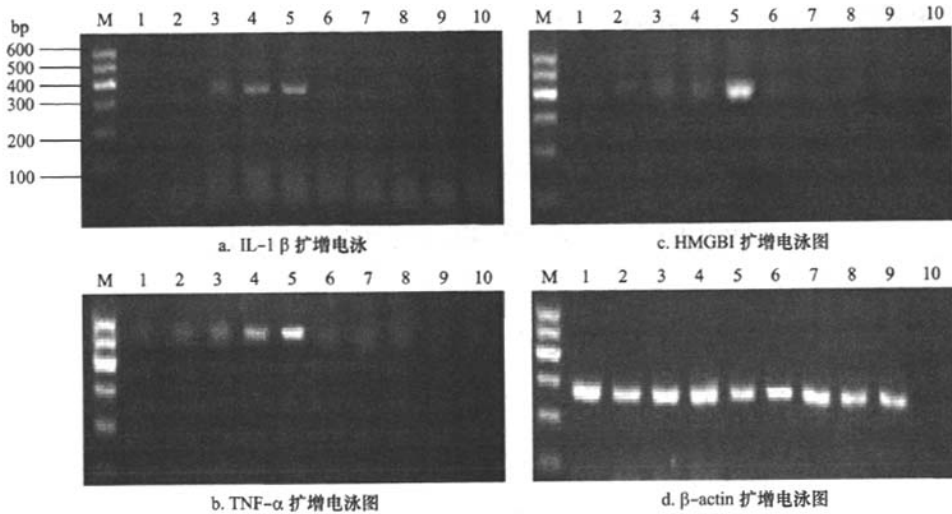
不同质量浓度BSA-AGEs(3.75、7.5、15、30 g/

L)作用LO2细胞48 h后均上调IL-1 β ,TNF- α 和HMGB1基因的mRNA表达,与对照组的灰度比值差异均有显著性($P < 0.01$)。BSA-AGEs诱导LO2细胞表达上述3种基因的mRNA具有剂量依赖性,随着BSA-AGEs浓度增高,IL-1 β ,TNF- α ,HMGB1基因的mRNA相对表达水平也明显提高。BSA对IL-1 β 基因的mRNA表达水平无刺激作用或作用很小;对TNF- α 基因的mRNA表达水平有刺激作用,但相对于BSA-AGEs的影响作用很少并且刺激作用无剂量依赖性;BSA不刺激HMGB1基因的mRNA表达见表4和图2。

表4 不同质量浓度BSA-AGEs、BSA对IL-1 β ,TNF- α 和HMGB1基因mRNA表达($\bar{x} \pm s$)的影响

$\rho/(g \cdot L^{-1})$	n	BSA-AGEs			BSA		
		IL-1 β	TNF- α	HMGB1	IL-1 β	TNF- α	HMGB1
对照	3	0	0.22 ± 0.01	0	0	0.22 ± 0.01	0
3.75	3	0 ³⁾	$0.39 \pm 0.02^{1)}$	$0.12 \pm 0.01^{1)}$	0 ³⁾	$0.24 \pm 0.04^{3)}$	0
7.5	3	$0.19 \pm 0.02^{1)}$	$0.51 \pm 0.04^{1)}$	$0.24 \pm 0.03^{1)}$	$0.04 \pm 0.21^{2)}$	$0.24 \pm 0.02^{3)}$	0
15	3	$0.26 \pm 0.01^{1)}$	$0.53 \pm 0.02^{1)}$	$0.26 \pm 0.01^{1)}$	$0.05 \pm 0.01^{2)}$	$0.24 \pm 0.01^{3)}$	0
30	3	$0.40 \pm 0.05^{1)}$	$0.86 \pm 0.06^{1)}$	$0.72 \pm 0.02^{1)}$	0 ³⁾	0 ¹⁾	0

mRNA表达量以目的基因条带与各自 β -actin条带的灰度比值表示,与各自对照组比较,1) $P < 0.01$;2) $P < 0.05$;3) $P > 0.05$



M:Marker;1:对照(药物质量浓度为0);2~5:BSA-AGEs 质量浓度分别为 3.75、7.5、15 和 30 g/L;

6~9:BSA 质量浓度分别为 3.75、7.5、15 和 30 g/L;10:阴性对照

图2 BSA-AGEs 对 LO2 细胞 IL-1, TNF- α , HMGB1 的 mRNA 表达水平的影响

3 讨论

糖尿病是糖代谢紊乱疾病,患者长期高血糖可导致体内 AGEs 的大量堆积,继而影响蛋白质等大分子的功能,导致糖尿病并发症的发生和发展。血液和肝组织内 AGEs 增加可通过促进肝脏的氧化应激、脂质过氧化损伤、炎症反应以及肝纤维化等途径,诱发或加重肝脏损伤,致使 AGEs 形成增多。因此,AGEs 与肝病是相互促进的关系。

IL-1 β 和 TNF- α 是与体内炎症反应密切相关的早期炎症因子,介导细胞的炎症反应而引起组织的病理变化,可通过自分泌和旁路分泌的作用方式使炎症效应不断扩大^[5]。近期研究表明,高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是一种重要的晚期炎症因子,与持续性炎症反应关系密切,也是导致细胞受损、细胞死亡过程中诱导免疫应答的关键信号^[6]。核 HMGB-1 作为 DNA 结合蛋白参与维持核小体结构和调节基因转录,膜相关 HMGB-1 则参与神经轴突的生长、萌芽和分枝、平滑肌细胞及成纤维细胞移位、细胞增殖以及组织坏死后的再生修复,并增强体内的免疫反应及杀菌活性等多种生物学效应。胞内 HMGB1 可通过活化细胞的主动分泌,坏死或受损细胞的被动释放而进入胞外,与细胞表面晚期糖基化终产物受体等结合后引发信号转导,诱导其他炎症介质的产生^[7-8]。HMGB1 与早期炎症因子相比具

有出现晚、持续时间长的特点,因此与 TNF- α 等重要炎症介质有着同等重要的促炎作用^[9-11],尤其是对慢性炎症反应和慢性组织损伤的影响。

本研究发现,当 BSA-AGEs 刺激体外培养的人正常肝细胞株 LO2 48 h 后,随着 BSA-AGEs 质量浓度的升高,LO2 细胞的增殖受到的抑制也增加;同时 LO2 细胞的凋亡率亦相应增加,提示 BSA-AGEs 对人正常肝细胞具有毒性作用;本研究结果显示早期炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 以及晚期炎症因子 HMGB1 的 mRNA 表达量因 BSA-AGEs 的作用而明显增加,说明 BSA-AGEs 可通过上调 IL-1 β 、TNF- α 和 HMGB1 的表达而进一步促进和加强机体的炎症反应,甚至引起肝细胞的损伤。

综上所述,BSA-AGEs 可抑制人正常肝细胞株 LO2 的生长增殖,促进肝细胞的凋亡。IL-1 β 、TNF- α 和 HMGB1 等早、晚期炎症因子的释放可能是 AGEs 造成人体病理变化的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] BIERNAUS A, HOFMANN M A, ZIEGLER R, et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus [J]. Cardiovasc Res, 1998, 37(3): 586-600.

(下转第 156 页)

- duced Ras/MAPK signaling in human endothelial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 310: 218 - 228.
- [5] CRAWFORD T, ROELINK H. The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling[J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(3): 886 - 892.
- [6] DAUDET N, ARIZA-MCNAUGHTON L, LEWIS J. Notch signaling is needed to maintain, but not to initiate, the formation of prosensory patches in the chick inner ear [J]. *Development*, 2007, 134: 2369 - 2378.
- [7] MINTER L, TURLEY D, DAS P, et al. Inhibitors of γ -secretase lock in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol*, 2005, 6(7): 680 - 688.
- [8] 王贵英,王士杰,李 勇. 细胞周期调控因子与癌发生的关系[J]. *国外医学:肿瘤学分册*, 2005, 15(6): 332.
- [9] ARIMA Y, HIROTA T, BRONNER C, et al. Down-regulation of nuclear protein by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to arrest at G1/S transition[J]. *Genes Cells*, 2004, 9(2): 131 - 142.
- [10] UNOKI M, NISHIDATE T, NAKAMURA Y. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7601 - 7610.
- [11] 叶春玲,吕艳青,罗英儒,等. 双氯芬酸对 Jurkat 细胞的抑制作用,暨南大学学报:医学版,2002,23(6): 17 - 20.
- [12] 王 涛,徐 军,钟南山. 肺癌多药耐药生物逆转策略,国外医学:肿瘤学分册,2002,29(5): 378 - 381.

[责任编辑:朱颖娜]

(上接第 147 页)

- [2] RAMASAMY R, VANNUCCI S J, YAN S S D, et al. Advanced glycation endproducts and RAGE: a common thread in aging, diabetes neurodegeneration and inflammation [J]. *Glycobiology*, 2005, 15(7): 16 - 18.
- [3] NIWA T. Dialysis-related amyloidosis: pathogenesis focusing on AGE modification [J]. *Semin Dial*, 2001, 14(2): 123 - 126.
- [4] BHATWADEKAR A D, GHOLE V S. Rapid method for the p reparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation [J]. *Clin Lab Anal*, 2005, 19(1): 11 - 15.
- [5] 王海燕,刘 平,张鸣和. 肾脏病学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1996: 468 - 473.
- [6] SCAFFIDI P, MISTELI T, BIANCHI M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191 - 195.
- [7] YAMADA S, MARUYAMA I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 375(1): 36 - 42.
- [8] 吴林青. 高迁移率族蛋白 B1:从核蛋白到新的细胞因子[J]. *国际免疫学杂志*, 2007, 30(2): 96 - 101.
- [9] PARK J S, ARCAROLI J, YUM H K, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box1 protein [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(4): C870 - 879.
- [10] FIUZA C, BUSTIN M, TALWAR S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2652 - 2660.
- [11] ROUHIAINEN A, KUJA-PANULA J, WILKMAN E, et al. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1) [J]. *Blood*, 2004, 104(4): 1174 - 1182.

[责任编辑:朱颖娜]