

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.008

RAGE/NF- κ B 信号通路调控溶血卵磷脂诱导的人视网膜内皮细胞 TGF- β_1 表达*喻日成, 罗建华 Δ , 范元硕, 刘波

(贵州省人民医院内分泌科, 贵州贵阳 55000)

[摘要] 目的 探讨糖基化终产物受体(RAGE)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路在调控溶血卵磷脂(LPC)诱导的人视网膜内皮细胞(HERCs)转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)表达中的作用。方法 利用 RAGE siRNA 及 NF- κ B 抑制剂作用 RAGE/NF- κ B 信号通路,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)及 Western blot 检测 RAGE 及 TGF- β_1 基因表达。结果 LPC 能增加 HERCs 的 RAGE、TGF- β_1 基因表达,RAGE 基因沉默后能抑制 LPC 诱导的 RAGE、TGF- β_1 的表达。加入 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)能显著减少 LPC 诱导的 RAGE、TGF- β_1 基因表达。结论 RAGE/NF- κ B 信号通路在调控 LPC 诱导的 HERCs 表达 TGF- β_1 中起重要作用。

[关键词] 溶血磷脂酰胆碱类;糖基化终产物受体;人视网膜内皮细胞;转化生长因子 β_1

[中图分类号] R589.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1319-03

RAGE/NF- κ B signal pathway in mediating lysophosphatidylcholine-induced TGF- β_1 expression in human retinal endothelial cells*Yu Richeng, Luo Jianhua Δ , Fan Yuanshuo, Liu Bo

(Department of Endocrinology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 55000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of receptor for advanced glycation end products (RAGE)/NF- κ B signaling pathway in mediating lysophosphatidylcholine (LPC)-induced TGF- β_1 expression in human retinal endothelial progenitor cells (HERCs). **Methods** Human retinal endothelial cells (HERCs) were transfected with siRNA for RAGE siRNA or added NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in the presence or absence of LPC, the expressions of TGF- β_1 and RAGE genes were analyzed by qPCR and Western blot. **Results** LPC could increase the expression of RAGE and TGF- β_1 gene in HERCs. The RAGE gene after silence could significantly decrease the expression of LPC-induced RAGE and TGF- β_1 . Adding NF- κ B inhibitor PDTC significantly reduced LPC-induced RAGE and TGF- β_1 expression in HERCs. **Conclusion** RAGE/NF- κ B signaling pathway plays an important role in mediating LPC induced TGF- β_1 gene expression in HERCs.

[Key words] lysophosphatidylcholines; receptor for advanced glycation end products; human retinal endothelial cells; transforming growth factor beta1

糖尿病视网膜病变是视网膜微血管的一种进行性病变,主要表现为毛细血管通透性增加、管腔闭塞、新生血管形成^[1]。晚期糖基化终产物(advanced glycation endproducts, AGEs)及 AGE 受体(receptor for AGE, RAGE)的相互作用在糖尿病血管并发症中发挥重要作用^[2]。AGEs 通过 RAGE 激活核因子 κ B(NF- κ B)及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,而 NF- κ B 的激活能增加视网膜微血管氧化应激及多种细胞因子[如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta1, TGF- β_1)]的释放,参与糖尿病视网膜病变的发生、发展^[3]。溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC)是氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)的主要成分,与人类多种疾病如动脉粥样硬化、糖尿病及恶性肿瘤密切相关^[4]。目前 LPC 在糖尿病视网膜微血管病变中的作用机制还不清楚,本研究通过 RNA 干扰及 NF- κ B 抑制剂,探讨 RAGE/NF- κ B 信号通路在调控人视网膜内皮细胞(human retinal endothelial cells, HERCs)分泌 TGF- β_1 中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料 主要试剂:LPC 购自 Sigma 公司;低糖改良 Eagle 培养基(DMEM)培养基及胎牛血清购自 Gibco 公司;HERCs 购自 ScienCell 公司;逆转录试剂盒购自 Biosystems 公司;RAGE 抗体购自 BD Biosciences 公司;TGF- β_1 、 β -actin 抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自 Santa Cruz 公司;HiPerFect

转染试剂盒购自 QIAGEN 公司;LightCycler TaqMan Master 购自 Roche 公司;NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)购自 Sigma 公司;

1.2 方法

1.2.1 RAGE-siRNA 转染细胞 HRECs 在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养。在转染细胞前,HERCs 种植在 6 孔板中,每孔细胞数约 2.5 \times 10⁵ 个,待细胞生长至 80% 左右开始转染实验。在 6 孔板的每孔中加入 300 ng 的 RAGE siRNA 稀释于 100 μ L 无血清培养基中,再加入 18 μ L HiPerFect 转染试剂室温下共同孵育 10 min,将转染混合物加入到含有 700 μ L 无血清培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h 之后,加入 1 600 μ L 含有 10% FBS 的完全培养基培养 48 h。

1.2.2 实验分组 (1)RAGE siRNA 作用 HRECs:分为对照 siRNA 组、LPC + RAGE siRNA 组、LPC + 对照 siRNA 组、RAGE siRNA 组,LPC 的浓度为 40 μ mol。(2)PDTC 作用 HRECs:分为对照组、LPC 组、LPC + PDTC 组,LPC 的浓度为 40 μ mol。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 RAGE、TGF- β_1 mRNA 表达 RT-qPCR 检测以 GAPDH 为内参照,按 Trizol 试剂盒说明书介绍的方法提取总 RNA,采用 Nanodrop ND1000 测量 RNA 水平。按逆转录试剂盒说明合成 cDNA,

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目[黔科合 J 字(2009)2]。
 Δ 通讯作者,E-mail:luojianhua_gy@163.com。

作者简介:喻日成(1976-),主治医师,博士研究生,主要从事糖尿病慢性并发症研究。

总反应体系 20 μL , 反应条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后取出 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增: cDNA 模板 2 μL , TaqMan Master 5 μL , 双蒸水 (ddH₂O) 2.5 μL , 引物 0.5 μL 。RAGE 上游引物: 5'-AGC TTC AGT CTG GGC CTT C-3', 下游引物: 5'-CAG CTG AAT GCC CTC TGG-3'; TGF- β_1 上游引物: 5'-TGA ACC AAG GAG ACG GAA TAC AGG-3', 下游引物: 5'-GCC ATG AGG AGC AGG AAG GG-3'; GAPDH 上游引物: 5'-CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3', 下游引物: 5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3'。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min (1 个循环), 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s (45 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (1 循环)。每个 qPCR 重复 3 次, 目的基因 mRNA 的相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

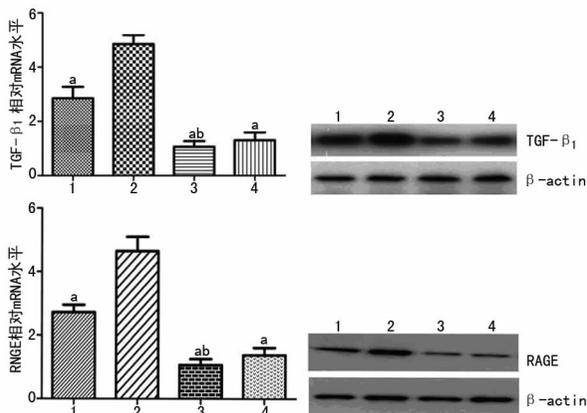
1.2.4 Western blot 检测 RAGE、TGF- β_1 蛋白表达水平

Western blot 检测以 β -actin 为内参照。收集处理的细胞, 用冰磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗 3 次, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 通过二辛可宁酸 (BCA) 方法测量蛋白水平。将 30 μg 的蛋白样品加入 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 点样孔, 100 V 电压电泳 2 h。转聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭, 分别加 RAGE、TGF- β_1 、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, Tris 缓冲生理盐水吐温 (TBST) 洗 3 次, HRP 标记的二抗常温下 30 min, TBST 洗 3 次。化学发光法显影、定影, 将胶片进行扫描拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的比较采用单因素方差分析, 均数间的两两比较采用 SNK- q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAGE siRNA 下调 RAGE、TGF- β_1 基因表达 HREC 转染 RAGE siRNA 和对照 siRNA 后通过 RT-qPCR 及 Western blot 检测 RAGE、TGF- β_1 基因的表达, 与对照 siRNA 组比较, LPC+对照 siRNA 组 RAGE 及 TGF- β_1 基因表达明显上调 ($P < 0.05$), RAGE siRNA 组 RAGE 及 TGF- β_1 基因表达明显下调 ($P < 0.05$); LPC+对照 siRNA 组与 LPC+RAGE siRNA 组比较, RAGE 及 TGF- β_1 基因表达明显下调 ($P < 0.05$), 见图 1。

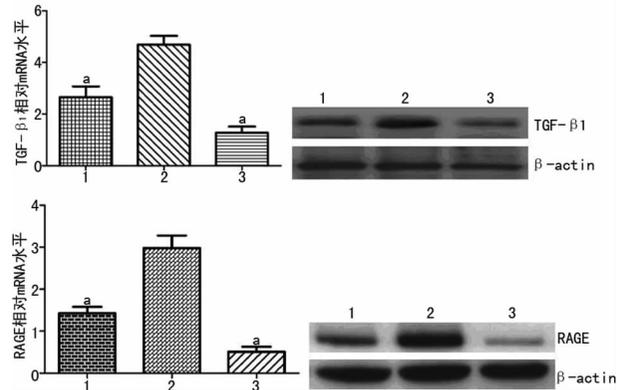


1: LPC+RAGE siRNA 组; 2: LPC+对照 siRNA 组; 3: RAGE siRNA 组; 4: 对照 siRNA 组; ^a: $P < 0.05$, 与 LPC+对照 siRNA 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与对照 siRNA 组比较。

图 1 RAGE siRNA 对 HREC TGF- β_1 、RAGE 基因表达的影响

2.2 PDTC 下调 RAGE、TGF- β_1 基因表达 HREC 加入 PDTC 后通过 RT-qPCR 及 Western Blot 检测 RAGE、TGF- β_1

基因的表达, 结果显示: LPC 作用 HREC 后 RAGE、TGF- β_1 基因表达明显上调 ($P < 0.05$); 与 LPC 组比较, LPC+PDTC 组 RAGE、TGF- β_1 基因表达出现明显下调 ($P < 0.05$), 见图 2。



1: LPC+PDTC 组; 2: LPC 组; 3: 对照组; ^a: $P < 0.05$, 与 LPC+PDTC 组比较。

图 2 PDTC 对 HREC TGF- β_1 、RAGE 基因表达的影响

3 讨论

Ox-LDL 中的主要成分 LPC 与多种疾病如动脉粥样硬化、糖尿病慢性并发症、哮喘等关系密切^[4-5]。Ox-LDL 所致血管内皮细胞功能紊乱是糖尿病慢性并发症发病机制的关键环节之一^[6]。LPC 作为 Ox-LDL 中一种促炎症颗粒能启动细胞内一系列的信号传导通路, 与慢性低度炎症性疾病密切相关^[7]。LPC 能促进内皮细胞表达黏附分子, 使白细胞浸润至内皮细胞下, 启动血管的炎症反应^[8]。Yu 等^[9]研究表明, Ox-LDL 导致的内皮细胞的炎症反应与高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 的释放有关。HMGB1 与 RAGE 结合激活 NF- κ B, 上调炎症分子的表达。Ox-LDL/HMGB1-RAGE/NF- κ B 组成的信号通路在血管内皮细胞的慢性炎症中起重要作用^[10]。糖尿病视网膜病变是糖尿病的一种常见慢性并发症, 视网膜内皮细胞功能紊乱在其中起重要作用。脂质能不依赖高血糖导致血管的损伤, 特别是 Ox-LDL 能通过增加细胞因子的产生刺激炎症反应及纤维形成^[11]。

本研究表明, LPC 作用于 HREC 后, RAGE 及 TGF- β_1 的表达明显上调。RAGE 是一种能与多种配体结合的受体, 如 AGEs、HMGB1, RAGE 与配体结合后可激活 NF- κ B 通路, 上调一系列的血管活性因子的表达^[12]。而血管活性因子 TGF- β_1 的升高与糖尿病微血管慢性并发症密切相关^[13]。因此, 本研究推测 LPC 作用 HREC 所致的 TGF- β_1 上调与 RAGE 的表达上调有关。为了证实其推测, 本研究采用 RNA 干扰技术沉默 RAGE 基因, 结果发现 RAGE 基因沉默后, LPC 诱导的 TGF- β_1 的表达明显下调, 本实验结果表明, LPC 诱导的 HREC 表达 TGF- β_1 的上调部分是通过 RAGE 起作用。

RAGE 与配体结合后激活 NF- κ B, 活化的 NF- κ B 作为一种正反馈, 又可进一步促进 RAGE 与配体结合, 二者构成级联反应造成细胞内环境的改变和损伤, 促进细胞因子和组织因子的释放^[14]。RAGE 通过 NF- κ B 途径促进氧化应激及促炎因子的释放加重血管内皮细胞的损害^[15]。为了阐明 NF- κ B 对 LPC 诱导的 HREC 表达 TGF- β_1 及 RAGE 的影响, 本研究用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 作用细胞, 实验结果表明, 加入 PDTC 后, HREC 表达 RAGE 及 TGF- β_1 明显下降。本实验结果提示, NF- κ B 参与了 LPC 诱导的视网膜微血管内皮细胞 TGF- β_1 的表达调控。

本研究结果表明, RAGE/NF- κ B 信号通路在调控 LPC 诱导的 HREC 表达 TGF- β_1 中起重要作用。RAGE 与 NF- κ B

相互作用产生的级联反应参与了脂代谢紊乱所致的糖尿病视网膜病变。

参考文献

- [1] Ishibashi T. Cell biology of intraocular vascular diseases [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2000, 44(3): 323-324.
- [2] Han D, Yamamoto Y, Munesue S, et al. Induction of receptor for advanced glycation end products by insufficient leptin action triggers pancreatic β -cell failure in type 2 diabetes [J]. *Genes Cells*, 2013, 18(4): 302-314.
- [3] Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, et al. RAGE blockade stabilizes established athero-sclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2827-2835.
- [4] Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(12): 1815-1826.
- [5] Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(30): 3209-3220.
- [6] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. *Blood*, 1998, 91(10): 3527-3561.
- [7] Murugesan G, Sandhya Rani MR, Gerber CE, et al. Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(11): 1375-1384.
- [8] Shi Y, Zhang P, Zhang L, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191(1): 54-

62.

- [9] Yu X, Xing C, Pan Y, et al. IGF-1 alleviates ox-LDL-induced inflammation via reducing HMGB1 release in HAECs [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(9): 746-751.
- [10] Luan ZG, Zhang H, Yang PT, et al. HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(12): 956-962.
- [11] Kenne WF. The role of lipids in renal disease future challenges [J]. *Kidney Int*, 2000, 57 Suppl 1: S27-31.
- [12] Van Geest RJ, Klaassen I, Lesnik-Oberstein SY, et al. Vitreous TIMP-1 levels associate with neovascularization and TGF- β 2 levels but not with fibrosis in the clinical course of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 7(1): 1-9.
- [13] Nawroth P, Bierhaus A, Marrero M, et al. Atherosclerosis and restenosis: is there a role for RAGE [J]. *Curr Diab Rep*, 2005, 5(1): 11-16.
- [14] Gao X, Zhang H, Schmidt AM, et al. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(2): H491-498.
- [15] Feng L, Zhu MM, Zhang MH, et al. Protection of glycyrrhizic acid against AGEs-induced endothelial dysfunction through inhibiting RAGE/NF- κ B pathway activation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 27-36.

(收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2014-12-20)

(上接第 1318 页)

是物理因素所造成的原发性, 而内皮细胞和上皮细胞变性、细胞间隙增宽、通透性增强等均应视为急性继发性肺损伤。尽管继发性损伤中有撞击参数如驱动压和压缩量等物理因素所致, 但从本实验结果来看, 细胞因子 IL-6 和 IL-8 可能在肺撞击伤后肺脏功能损害的发生、发展过程中发挥重要的作用。由于与创伤有关的细胞因子很多, 各细胞因子之间相互影响、相互作用, 呈网络样^[11]。因此, 关于细胞因子 IL-6 和 IL-8 在加重肺撞击伤中的作用和地位, 有待进一步深入研究^[12]。

参考文献

- [1] Della Rocca G, Coccia C. Acute lung injury in thoracic surgery [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2013, 26(1): 40-46.
- [2] Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al. Epidemiology of trauma death: a reassessment [J]. *J Trauma*, 1995, 38(2): 185-193.
- [3] 吴秋平, 蒋耀光, 闵家新. 声门紧闭与开放状态下兔肺撞击伤的损伤特点 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2005, 12(3): 189-193.
- [4] Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ, et al. Temporal patterns of hemodynamics oxygen transport cytokine activity and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury [J]. *J Trauma*, 1994, 36(5): 651-657.
- [5] Donnelly TJ, Meade P, Jagels M, et al. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the develop-

ment to the adult respiratory distress syndrome after severe injury [J]. *Crit Care Med*, 1994, 22(5): 768-776.

- [6] Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production [J]. *Crit Care Med*, 1993, 21(6): 839-845.
- [7] Seeley EJ. Updates in the management of acute lung injury: a focus on the overlap between AKI and ARDS [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2013, 20(1): 14-20.
- [8] Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at risk patient group [J]. *Lancet*, 1993, 341(8846): 643-647.
- [9] Li T, Luo N, Du L, et al. Tumor necrosis factor- α plays an initiating role in extracorporeal circulation-induced acute lung injury [J]. *Lung*, 2013, 191(2): 207-214.
- [10] Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation [J]. *Intensive Care Med*, 1995, 21(3): 277-285.
- [11] Fröhlich S, Boylan J, McLoughlin P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(3): 271-279.
- [12] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征 [J]. *解放军医学杂志*, 1999, 24(5): 313-316.

(收稿日期: 2014-08-30 修回日期: 2014-12-17)