

达率显著高于正常口腔黏膜组织阳性表达率 ($P < 0.05$), 而且与临床分期及淋巴结转移有明显相关性。但目前国内外学者对 cyclin D1 在恶性肿瘤中表达意义存在较大的分歧, 付志捷等^[5]认为, 在咽癌中 cyclin D1 表达强弱与淋巴结转移有相关性, 此结果与本研究结果一致。这可能是因为 cyclin D1 蛋白的主要作用是促进细胞增殖, cyclin D1 持续表达使得细胞具有持续的增殖能力, 肿瘤细胞持续增殖使得组织张力增高, 细胞易于向周围组织扩散而造成浸润或转移, 提示 cyclin D1 蛋白的过度表达与口腔鳞癌的发生和预后密切相关。但李康泰等^[6]认为发生在口咽部的鳞癌 cyclin D1 表达量与淋巴结转移无关, 这些结果的不一致, 可能与所选研究资料和病例数的差异或部分患者有转移, 但尚未产生临床症状、肿瘤基因调控的复杂性和多样性, 研究方法和统计方法不同等多方面因素有关, 还有待于进一步查证。

本研究对 p16、cyclin D1 蛋白和细胞增殖评价因子 Ki-67 在口腔鳞癌中的表达进行两两比较, 结果显示 p16 与 cyclin D1 蛋白和细胞增殖评价因子 Ki-67 呈负相关 ($P < 0.05$), 我们的结果与付志捷等^[5]在咽癌中 p16 蛋白表达与 cyclin D1 的表达负相关的研究

结果相符合, 与 Conscience 等^[7]在皮肤癌中 p16 蛋白表达与 Ki-67 的表达负相关的研究结果也相符合。表明 p16 缺失可能通过诱导 cyclin D1 的过度表达, 促进癌细胞维持高增殖状态。

4 参考文献

- [1] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.
- [2] 郭山春. 多肿瘤抑制基因与肿瘤 [J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 1997, 17(2): 160-162.
- [3] Vairaktaris E, Yapijakis C, Psyri A, et al. Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis [J]. Anticancer Res, 2007, 27(2): 979-984.
- [4] 张迎春, 周士东, 孔庆尧, 等. p21ras 和 Cyclin D1 在肺癌组织中的表达及相互关系 [J]. 徐州医学院学报, 2003, 23(5): 395-398.
- [5] 付志捷, 潘新良, 雷大鹏, 等. 细胞周期素 D1 和 p16 在下咽癌中的表达及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(9): 406-409.
- [6] 李康泰, 吴家廉, 骆文龙, 等. AR 与 cyclin D1、p16 在喉鳞癌发病中作用及其相互关系 [J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(1): 53-58.
- [7] Conscience I, Jovenin N, Coissard C, et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas [J]. Eur J Dermatol, 2006, 16(5): 518-22.

(收稿: 2007-11-19)

晚期糖基化终产物对健康成人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 和血红素加氧酶-1 表达的影响

卓凤婷 薛耀明 关美萍 沙建平 魏 民 邹 艺 曾展军

摘要 目的: 探讨不同浓度晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-product, AGE) 对健康成人外周血单核细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 表达的影响。方法: 分离健康成人外周血单核细胞, 随机分组, 利用不同浓度体外制备的 AGE 修饰牛血清白蛋白 (AGE-BSA) 刺激, 观察不同时间点每组细胞培养上清液中 TNF- α 表达量及细胞内 HO-1 mRNA 的表达。结果: AGE-BSA 可增加健康成人外周血单核细胞 TNF- α 的释放并可诱导健康成人外周血单核细胞内 HO-1 mRNA 的表达。结论: AGE 可上调健康成人外周血单核细胞 TNF- α 和细胞内 HO-1 mRNA 的表达。

关键词 糖基化 肿瘤坏死因子 α 外周血单核细胞 血红素加氧酶-1

Effects of advanced glycation end-products on expressions of TNF- α and HO-1 in peripheral monocytes in healthy adults ZHUO Feng-ting, XUE Yao-ming, GUAN Mei-ping, SHA Jian-ping, WEI Min, ZOU Yi, ZENG Zhan-jun. Department of Endocrinology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: XUE Yao-ming E-mail: yaomingxue@yahoo.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of advanced glycation end-products (AGE) at different concentrations on the expressions of TNF- α and HO-1 in peripheral monocytes in healthy adults. **Methods** Peripheral monocytes were isolated, randomly divided into different groups, and then stimulated by AGE-BSA at different concentrations prepared *in vitro*. The level of TNF- α expression in the supernatant of cell culture and the intracellular HO-1 mRNA expression were detected. **Results** AGE-BSA enhanced the release of TNF- α from peripheral monocytes and induced intracellular HO-1 mRNA expression in monocytes in healthy adults. **Conclusion** AGE-BSA may upregulate the expressions of HO-1 mRNA and TNF- α in peripheral monocytes.

[Key words] Glycosylation Tumor necrosis factor-alpha Peripheral monocytes Heme oxygenase-1

作者单位: 510515 广州市, 南方医科大学南方医院内分泌科

通讯作者: 薛耀明 E-mail: yaomingxue@yahoo.cn

晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-product, AGE) 对机体的致病作用, 不仅通过非受体依赖途径使蛋白质结构和功能发生改变, 促使细胞外基质增生, 还可通过受体依赖途径, 诱导单核细胞的趋化和氧化应激反应, 激活信号转导通路, 释放细胞因子 [肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)]、生长因子、黏附分子等, 从而引起促炎性反应, 最终影响器官的结构和功能^[1]。其中 TNF- α 主要由激活的单核-巨噬系统分泌, 研究显示其与胰岛素抵抗及 2 型糖尿病慢性并发症发病机制关系密切。

近年的研究提示 HO-1 作为保护性蛋白具有抗炎、抗凋亡、抗增殖效应, 大量研究发现其在高血糖环境下对胰岛细胞、内皮细胞和神经细胞起重要保护作用, 可以延缓糖尿病及其并发症的发生, 而糖尿病慢性并发症的发病机制与 AGE 的堆积关系密切^[2], 那么 AGE 对健康成人外周血单核细胞 HO-1 的表达是否有影响, 目前尚无实验证明。

1 材料与方法

1.1 材料 本院健康志愿者, 无菌采集外周血 10 mL。健康志愿者为无心血管、肝脏、肾脏、消化道、精神神经等疾病病史, 无药物过敏史, 无急慢性炎症病史者。淋巴细胞分离液购自瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences AB、牛血清白蛋白 (BSA)、葡萄糖、青霉素及庆大霉素均购自德国 sigma 公司, hTNF- α ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物, Trizol 试剂购自美国 Gibco, PCR 引物序列由上海英峻生物合成。

1.2 方法

1.2.1 人外周血单核细胞的分离^[3] 取肝素抗凝血, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 1 倍, 颠倒混匀, 轻轻置于淋巴细胞分离液上, 使细胞悬液与分离液体积比为 2:1, 2 000 r/min 离心 20 min, 以玻璃吸管吸出中间膜样的单个核细胞成分, PBS 冲洗 3 次, 每次离心 1 000 r/min 10 min。将单个核细胞成分悬浮于 RPMI-1640 培养液中, 于塑料培养瓶中孵育 20 min, 然后以 Hank's 液洗去不附壁的淋巴细胞。再以含 0.2 mmol/L EDTA PBS 将悬浮附壁的单核细胞吹打成细胞悬液, Hank's 液冲洗 3 次, 即得单核细胞。以此方法分离的单核细胞, 经 Giemsa 过氧化物酶及非特异性酯酶染色鉴定, 纯度大于 80, 台盼蓝拒染试验, 测得活细胞数大于 90%。

1.2.2 体外制备 AGE 修饰牛血清白蛋白 (AGE-BSA)

参考文献 [4] 的方法体外制备, 简要步骤如下: 将 3.55 mg/mL BSA 与葡萄糖一起孵育 60 d, 4℃ 下透析袋透析 24 h 去除未结合的葡萄糖。体外制备的 AGE-BSA 经抗 AGE 抗体 ELISA 法和荧光分光光度法鉴定, 制备的 AGE-BSA 样品中, AGE 含量为 101.29 U/mg 蛋白, BSA 对照样品为 13.68 U/mg 蛋白, 所有样

品均经 TCL 试剂盒 (Endos 公司, 美国) 检测, 内毒素含量低于 0.25 EU/mL。

1.2.3 检测 AGE 修饰牛血清白蛋白对人外周血单核细胞分泌 TNF- α 的影响 将分离好的单核细胞种植于 6 孔培养板中, 分别加入不同浓度的 AGE-BSA 或者 BSA, 孵育一定时间后收集上清液, 用 hTNF- α ELISA 试剂盒检测其中 TNF- α 浓度, 严格按照试剂盒步骤进行。

1.2.4 检测 AGE 修饰的牛血清白蛋白对人外周血单核细胞的 HO-1 mRNA 表达的影响 细胞的处理同上, 在不同时间点收集细胞, 利用 Trizol 试剂法提取细胞 RNA, 行 RT-PCR, 以 β -actin 作为内参照, 正义: 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 反义: 3'-TTACTA CTCGGAAGCACGGG-5', 扩增长度为 285 bp。HO-1 引物正义: 5'-CTGGAGGAGGAGATTGAGCG-3', 反义: 3'-CGAAGAGGCTACCCAGGAAT-5', 序列扩增长度为 637 bp。PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色, 以 Image Pro Plus 图像分析系统定量。

1.2.5 统计学处理 所有实验均重复 3 次, 数据以均数 \pm 标准差来表示。统计由 SPSS 11.5 完成, 采用 One-Way ANOVA 方法比较总体和组间差异, 显著性标准为 0.05。

2 结果

2.1 AGE 对健康人外周血单核细胞 TNF- α 表达的影响 不同组间培养上清液中 TNF- α 浓度差异具有显著性 ($P < 0.05$); LSD 检验显示: 除对照组与 BSA 组差异无显著性外, 其余各组之间差异均有显著性, 以 100 mmol/L AGE-BSA 4 h 为最高, 以对照组 4 h 为最低; 总体呈浓度、时间依赖关系 (表 1)。

表 1 各组 TNF- α ELISA 检测结果 ($n=3$) $\bar{x} \pm s$

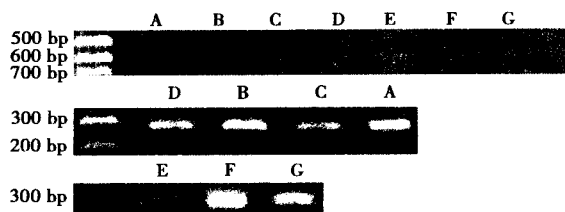
组别	4 h	24 h
对照组	12.355 \pm 1.398	12.519 \pm 1.303
BSA 组	39.210 \pm 6.145	53.700 \pm 7.628
100 mmol/L AGE-BSA 组	1 099.300 \pm 58.914*	922.600 \pm 447.312*
200 mmol/L AGE-BSA 组	617.833 \pm 29.310*	385.652 \pm 442.611*

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$

2.2 AGE 对细胞内 HO-1 mRNA 表达的影响 不同组间细胞内 HO-1 mRNA 的表达差异具有显著性 ($P < 0.00$), 以 100 mmol/L AGE-BSA 组 4 h 为最高, 以 BSA 组 24 h 为最低 (图 1、2)。

3 讨论

AGE 是蛋白质赖氨酸的氨基和还原糖的醛基之间发生非酶促性糖基化反应生成的终末产物的总称, 糖尿病患者因生化代谢异常, 可致循环及皮肤组织 AGE 大量蓄积, 而 AGE 的蓄积为糖尿病慢性并发症的主要机制之一^[5]。本次在体外制备的 AGE 修饰的牛血清白蛋白, 在一定程度上可以模拟人体内生成的



注: A, 对照组; B, BSA 组 4 h; C, BSA 组 24 h; D, 100 mmol/L AGE-BSA 组 4 h; E, 100 mmol/L AGE-BSA 组 24 h; F, 200 mmol/L AGE-BSA 组 4 h; G, 200 mmol/L AGE-BSA 组 24 h

图 1 各组 HO-1 mRNA 及内参 RT-PCR 结果

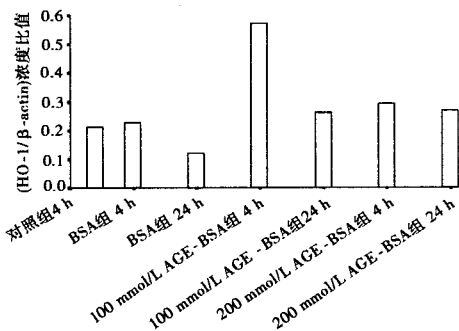


图 2 HO-1 的表达

AGE, 而无论体内形成或体外合成的 AGE 均可被单核/巨噬细胞表面的特异性 AGE 受体识别、结合和摄取, 成为其消除的主要途径^[6]。

HO 又名热休克蛋白 32, 是一种反应蛋白, 包括 3 种亚型, 分别是诱导性表达的 HO-1、组成性表达的 HO-2 和 HO-3, 后两者在组织中恒定表达, 而 HO-1 在组织中表达甚微, 只有在氧化应激刺激, 如创伤、器官移植、高血压和缺氧等情况下诱导产生, 具有增加机体抵抗力、维持机体生存等重要作用。HO-1 为血红素分解过程的限速酶, 将其分解为一氧化碳、游离铁和胆绿素, 胆绿素随着被还原为胆红素, 这 3 个终产物具有抗炎、抗凋亡和抗氧化作用, 在许多疾病中都发挥重要作用。

本实验研究提示: 在体外实验中, AGE-BSA 可诱导单核细胞生成 TNF- α 增加, 且具有时间和浓度依赖性。但其细胞内信号传导机制尚不清楚, 刘阳等^[7]的研究提示其机制可能是 AGE 与单核细胞表面 AGE 受体结合, 激活 NADPH 氧化酶, 从而诱导细胞内氧化应激, 继而通过 p38 传导途径活化 NF- κ B, 从而调控 IL-1、TNF- α 等细胞因子和活性氧的生成。

本研究结果显示: 在体外实验中, AGE-BSA 可上调单核细胞内 HO-1 mRNA 的表达, 其表达的上调可能起到部分抗炎的作用。Yasui 等^[8]的研究提示: HO-1 的诱导在机体对抗各种应激引起的宿主防御作用中

起到很大的作用, HO-1 的诱导可调节淋巴细胞及单核巨噬细胞的细胞活化及功能, 从而调节机体的免疫反应, 并阐述在肥大细胞中 HO-1 是通过其活化产物, 抑制细胞因子的表达起到其抗炎作用的; Kirino 等^[9]的研究提示: 在外周血单核细胞中外源性 TNF- α 可下调 HO-1 的表达, 而 HO-1 表达的减少可促进炎症的发展; 更有研究指出, HO-1 的缺陷必将伴随着强烈的炎症反应^[10]。

本研究提示, AGE 修饰蛋白与单核细胞受体结合后能诱导细胞内的氧化应激, 调控 TNF- α 的生成, 增加了 HO-1 的表达, 其表达增高可能为体内抗氧化应激系统提供一个代偿机制。HO-1 有益的保护作用无疑为临床治疗糖尿病及其慢性并发症提供了新的可能的途径和方法, 如通过转染 HO-1 基因从而上调体内 HO-1 的表达, 或者通过吸入一氧化碳改善微循环的血流动力学状态, 但其安全性、可行性及有效性尚待进一步大量的研究。

4 参考文献

- [1] Charlene E, Frederick M, Kymberly A, et al. Thrombomodulin deficiency in human diabetic nerve microvasculature [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1957-1963.
- [2] Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion [J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 803-810.
- [3] 李万君, 张亚佳, 洪伟. 人血单核细胞的分离与鉴定 [J]. *解剖科学进展*, 1999, 5(1): 94-95.
- [4] Gopalkrishnapillai B, Nadanatham V, Karmakar N, et al. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(4): 1041-1046.
- [5] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [6] Oldfield M D, Bach L A, Forbes J M, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(12): 1853-1863.
- [7] 刘阳, 刘尚喜, 侯非凡. 晚期糖基化终产物诱导单核细胞产生细胞因子的细胞内信号传导机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 11(29): 947-950.
- [8] Yasui Y, Nakamura M, Onda T. Heme oxygenase-1 inhibits cytokine production by activated mast cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* [J]. 2007, 354(2): 485-490.
- [9] Kirino Y, Takeno M, Murakami S, et al. Tumor necrosis factor a acceleration of inflammatory responses by down-regulating heme oxygenase 1 in human peripheral monocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 464-475.
- [10] Yachie A, Niida Y, Wada T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(1): 129-135.

(收稿: 2008-01-10)