

# 糖基化终末产物调控糖尿病合并动脉粥样硬化中 FSTL1 表达的机制研究

陈媛媛 陈亚芬 孙学然 王燕萍 吴丽苹 杨克 刘艳

**【摘要】** 目的:探讨糖基化终末产物(AGEs)参与调控糖尿病动脉粥样硬化中卵泡抑素样蛋白 1(FSTL1)表达的分子机制。 方法:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测糖尿病合并动脉粥样硬化患者血清中 FSTL1 及 AGEs 的表达水平,分析外周血中 AGEs 与 FSTL1 的相关性。构建糖基化终末产物受体(RAGE)基因敲除小鼠(以 C57BL/6 野生型小鼠为对照),体外培养小鼠原代巨噬细胞。采用 Western blot 法检测不同浓度的 AGEs-BSA 刺激巨噬细胞后 FSTL1 及其基因 5'端启动子区域转录因子 AP-1 和 c-Jun 的表达情况,以及特异性抗体阻断 RAGE 后巨噬细胞 FSTL1、AP-1 和 c-Jun 的表达变化。 结果:糖尿病合并动脉粥样硬化患者外周血中 FSTL1 与 AGEs 水平呈正相关( $r=0.148, P=0.021$ )。AGEs-BSA 促进巨噬细胞表达 FSTL1 和核转录因子 AP-1 及 c-Jun。特异性阻断 RAGE 信号通路后,AGEs-BSA 诱导的 FSTL1、AP-1 及 c-Jun 的表达水平明显降低。 结论:AGEs-RAGE 信号通路可通过调控巨噬细胞中转录因子 AP-1 及 c-Jun 的表达来调节 FSTL1 活性,进而参与糖尿病动脉粥样硬化的发生与发展。

**【关键词】** 糖尿病;动脉粥样硬化;糖基化终末产物;卵泡抑素样蛋白 1;巨噬细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.01.008

**Regulation mechanism of AGEs on FSTL1 expression in diabetes with atherosclerosis** CHEN Yuanyuan<sup>1</sup>, CHEN Yafen<sup>2</sup>, SUN Xueran<sup>2</sup>, WANG Yanping<sup>2</sup>, WU Liping<sup>2</sup>, YANG Ke<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup> 1. Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**【Abstract】 Objective:** To detect the regulation and mechanism of advanced glycation end products (AGEs) on follistatin-like protein 1 (FSTL1) in diabetes with atherosclerosis. **Methods:** The expression level of FSTL1 in serum of patients with diabetes and atherosclerosis were detected by ELISA. The correlation of AGEs and FSTL1 in serum were analyzed. Receptor of AGEs (RAGE) knockout mice were built to block the RAGE signaling pathway and wild type C57BL/6 mice were served as control. Primary macrophages of RAGE knockout mice were cultured in vitro. Various concentrations of AGEs-BSA were used to stimulate macrophages and the expression of FSTL1, AP-1 and c-Jun were detected by western blot. Then the expression of FSTL1, AP-1 and c-Jun were detected again by western blot after blocking the RAGE signaling pathway. **Results:** There was a positive correlation between FSTL1 and AGEs in serum of patients with diabetes and atherosclerosis ( $r=0.148, P=0.021$ ). AGEs-BSA promoted the expression of FSTL1, AP-1 and c-Jun in macrophages. AGEs-BSA-induced expression of FSTL1, AP-1 and c-Jun were declined after blocking the RAGE signaling pathway specifically. **Conclusions:** AGEs-RAGE signaling pathway may regulate the activity of FSTL1 by

基金项目:国家自然科学基金(81770384,81470547)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院心脏科(陈媛媛,刘艳);200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心血管病研究所(陈亚芬,孙学然,王燕萍,吴丽苹,杨克)

通信作者:刘艳,Email:liuyan\_ivy@126.com

controlling the expression of AP-1 and c-Jun in macrophages and then participate in the progression of diabetes with atherosclerosis.

**【Key words】** Diabetes; Atherosclerosis; Advanced glycation end products; Follistatin-like protein 1; Macrophages

目前,心血管疾病是全球人类头号死因,占死因构成的 46%,且呈年轻化和持续增长的趋势<sup>[1-2]</sup>。糖尿病发病率升高是造成心血管疾病发病率居高不下的一个重要原因。既往研究表明,糖尿病患者并发冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的风险是非糖尿病患者的 4 倍<sup>[3]</sup>。糖尿病患者血糖水平升高,其体内糖基化终末产物(AGEs)水平也明显上升;AGEs 可与糖基化终末产物受体(RAGE)结合,通过下游信号引起氧化应激和内皮功能紊乱,参与动脉粥样硬化的形成与发展<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究发现,糖尿病合并动脉粥样硬化患者的外周血中卵泡抑素样蛋白 1(FSTL1)显著升高<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨 AGEs 和 FSTL1 参与调控糖尿病动脉粥样硬化发生和发展的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

通过临床采血收集糖尿病合并动脉粥样硬化患者血清;野生型 C57BL/6 小鼠(雄性,6 周龄)购自南京大学模式动物研究中心[动物生产许可证号为 SCXK(苏)2015-0001,动物使用许可证号为 SYXK(沪)2013-0050],同种系 RAGE 基因敲除(RAGE<sup>-/-</sup>)小鼠由美国哥伦比亚大学赠送;检测 FSTL1 和 AGEs 水平的 ELISA 试剂盒分别购自英国 Abcam 公司和中国武汉华美生物工程有限公司;小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自中国科学院细胞库;RPMI 1640 培养液及双抗购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 HyClone 公司;AGEs-BSA 购自德国 Merck 公司;兔抗人 FSTL1 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗人 RAGE、AP-1、c-Jun 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体及辣根过氧化物酶耦联的羊抗兔二抗均购自美国 Cell Signaling 公司;正常小鼠 IgG 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司。

### 1.2 患者血清样本收集

入组标准:经上海交通大学医学院附属瑞金医院医学伦理委员会批准,收集糖尿病合并动脉粥样硬化患者外周血。所有患者均签署知情同意书。动脉粥样硬化患者行冠状动脉造影(CAG)和血管内超声(IVUS)检查确诊,糖尿病患者行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)确诊。共收集糖尿病合并动脉粥

样硬化患者血清 104 份,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测患者血清中 FSTL1 及 AGEs 水平。

排除标准:(1)有急性感染史;(2)有风湿性疾病史;(3)女性有近期月经史;(4)严重肝肾功能异常者。

### 1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的分离、培养及鉴定

对野生型和同种系 RAGE<sup>-/-</sup>小鼠腹腔注射 0.9%氯化钠溶液 5 mL;静置 5~7 min 后,用注射器抽取腹腔液;1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,PBS 洗涤 2 次。用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI 1640 培养液调节细胞密度至  $2 \times 10^6$  个/mL,接种于培养瓶及 6 孔板,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h,然后用倒置显微镜观察细胞形态<sup>[6]</sup>。

将细胞悬液与 0.4%锥虫蓝溶液按体积比为 9:1 混合,混匀后在 3 min 内分别计数活细胞和死细胞。光学显微镜下观察细胞形态,死细胞被染为明显的蓝色,而活细胞呈无色透明状。

### 1.4 RAGE 抗体预处理

将小鼠 RAW264.7 巨噬细胞以  $2 \times 10^6$  个/孔的密度接种至 6 孔板,用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI 1640 培养液,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。加入 RAGE 抗体(10  $\mu$ g/mL)及正常小鼠 IgG 抗体(10  $\mu$ g/mL,作为阴性对照)预处理 1 h,然后加入不同质量浓度(0、50、100、200  $\mu$ g/mL)的 AGEs-BSA 刺激 24 h 和 48 h。

### 1.5 ELISA 法检测 FSTL1 及 AGEs 水平

将血液标本及不同浓度标准品分别加入 96 孔板中,于 37 ℃孵育 90 min。弃孔内液体后,倒扣 96 孔板并拍干孔内液体,加入生物素化抗体,用封板胶纸封住反应孔,于 37 ℃孵育 60 min。洗板拍干,加入亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物工作液,封孔,于 37 ℃孵育 30 min。洗板后拍干,加入显色剂 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(90  $\mu$ L/孔),封孔,避光。于 37 ℃孵育 20 min。加入终止液 100  $\mu$ L/孔,混匀后即刻测量 450 nm 处吸光度。

### 1.6 Western blot 法检测相关蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取不同条件培养后的小鼠 RAW264.7 巨噬细胞和小鼠腹腔原代巨噬细胞中的总蛋白,同时收集细胞培养液上清液。取 20  $\mu$ g

总蛋白,经缓冲液处理后加热变性,以 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V 稳压)分离蛋白;然后采用电转移法,将蛋白条带转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,室温封闭 1 h;漂洗后分别加入兔抗人 FSTL1、RAGE、AP-1、c-Jun 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;Tris-HCl 缓冲液(TBST)漂洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;TBST 漂洗后,成像仪曝光并分析目的蛋白条带的相对灰度值。

### 1.7 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。各计量资料进行正态性检验,非正态分布数据采用对数转换后符合正态分布,计量资料采用均数  $\pm$  标准差表示。两组间比较采用独立样本  $t$  检验。两组连续性变量比较采用 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 糖尿病合并动脉粥样硬化患者外周血 FSTL1 与 AGEs 水平呈正相关

运用 ELISA 法分别检测 104 例糖尿病合并动脉粥样硬化患者外周血中 FSTL1 及 AGEs 水平,并对两者进行相关性分析。结果发现,在糖尿病合并动脉粥样硬化患者中,血清 AGEs 水平与 FSTL1 水平呈正相关( $r = 0.148, P = 0.021$ ),见图 1。

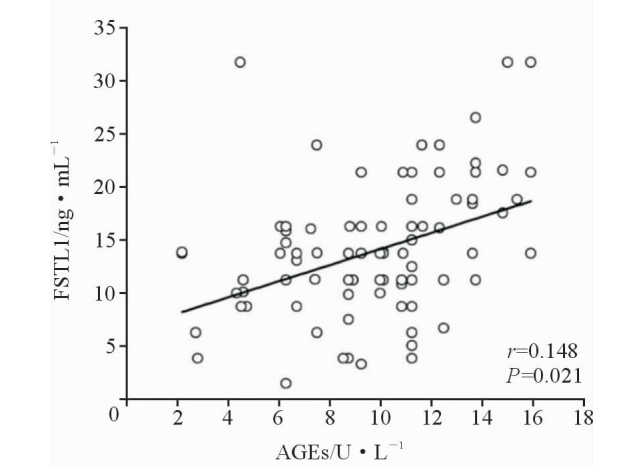


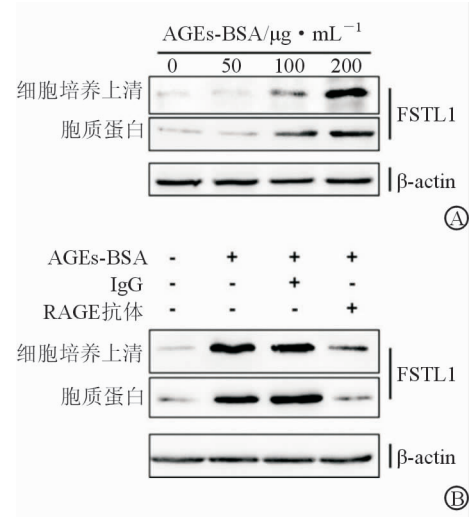
图 1 糖尿病合并动脉粥样硬化患者外周血中 AGEs 与 FSTL1 水平的相关性分析

### 2.2 AGEs 通过 AGEs-RAGE 信号通路促进巨噬细胞中 FSTL1 的表达和分泌

为验证 AGEs 与 FSTL1 表达及分泌量之间的关系,用不同质量浓度的 AGEs-BSA (0、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激小鼠 RAW264.7 细胞 24 h。Western blot 法检测结果显示,巨噬细胞中 FSTL1

的表达及分泌量明显增加,且在 AGEs-BSA 质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 FSTL1 表达及分泌量最高( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 2A。

为明确 AGEs 是否通过 AGEs-RAGE 信号通路调控 FSTL1 的表达及分泌,进一步运用 RAGE 特异性抗体阻断 RAW 264.7 细胞中 AGEs-RAGE 信号通路。Western blot 检测结果显示,与阴性对照组相比,RAGE 特异性抗体显著抑制 AGEs-BSA 诱导的 FSTL1 表达及分泌( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 2B。

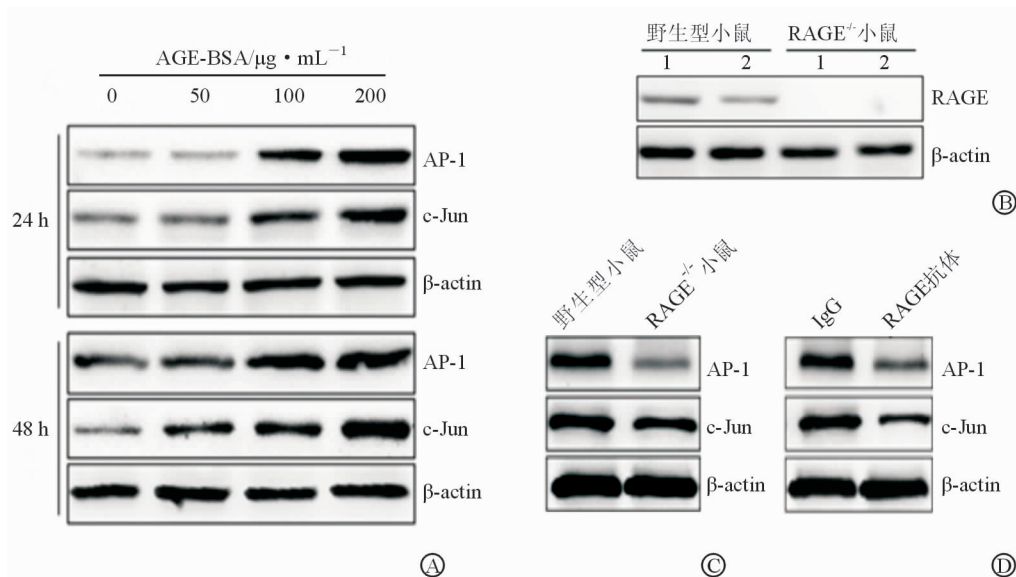


注:A 为不同浓度的 AGEs-BSA 刺激巨噬细胞 24 h 后,Western blot 法检测 FSTL1 的表达及分泌量;B 为使用 RAGE 抗体(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 拮抗 AGEs-RAGE 信号通路,并且使用 AGEs-BSA(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激巨噬细胞 24 h 后,Western blot 法检测 FSTL1 的表达及分泌量

### 图 2 AGEs 与巨噬细胞 RAW 264.7 中 FSTL1 表达的关系

### 2.3 AGEs 通过 AGEs-RAGE 信号通路促进巨噬细胞中核转录因子 AP-1 和 c-Jun 的表达

用不同质量浓度的 AGEs-BSA (0、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别刺激 RAW264.7 细胞 24 h 及 48 h,运用 Western blot 法检测 AP-1 和 c-Jun 的表达情况。结果发现,AGEs-BSA 刺激细胞 24 h 和 48 h 后,细胞 AP-1 和 c-Jun 的表达水平明显升高( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 3A。分离培养野生型及 RAGE<sup>-/-</sup> 小鼠原代巨噬细胞,并分别予以 AGEs-BSA(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激,Western blot 法检测发现,RAGE<sup>-/-</sup> 组 AP-1 和 c-Jun 的表达水平明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 3B、C。同样,用 AGEs-BSA (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 RAW264.7 细胞,并运用 RAGE 特异性抗体阻断 AGEs-RAGE 信号通路,Western blot 法检测结果显示,RAGE 特异性抗体显著抑制 AP-1 和 c-Jun 的表达( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 3D。



注: A 为不同质量浓度 AGEs-BSA 刺激 RAW 264.7 细胞后, Western blot 法检测 AP-1 及 c-Jun 的表达; B 为 RAGE<sup>-/-</sup> 小鼠的表型鉴定; C 为 200 μg/mL AGEs-BSA 分别刺激野生型小鼠及 RAGE<sup>-/-</sup> 小鼠来源的原代巨噬细胞后, Western blot 法检测 AP-1 及 c-Jun 的表达; D 为 200 μg/mL AGEs-BSA 刺激 RAW264.7 细胞后, 用 RAGE 特异性抗体阻断 AGEs-RAGE 信号通路, Western blot 法检测 AP-1 及 c-Jun 的表达

图 3 RAGE 信号通路对核转录因子的表达调控

### 3 讨论

糖尿病是一种普遍存在且严重损害人类健康的疾病, 它不单纯是一种糖类物质代谢障碍性疾病, 目前被认为是冠心病的等危症。糖尿病患者因心肌梗死导致死亡的风险是非糖尿病患者的 2~3 倍<sup>[7]</sup>。糖尿病患者体内持续的高血糖环境可以促进糖代谢产物与蛋白质、脂质或核酸的还原性氨基发生非酶促糖基化反应, 最终形成 AGEs。AGEs 可与特异性受体 RAGE、半乳糖凝集素-3(Gal-3) 及巨噬细胞清道夫受体等结合而发挥作用<sup>[8]</sup>。已有研究证实, 在糖尿病合并动脉粥样硬化患者的斑块组织中 RAGE 呈高表达, 且由其介导的损伤在糖尿病心血管系统损伤中占主导地位<sup>[9]</sup>。

FSTL1 是一种由间充质细胞产生的糖化分泌蛋白, 属于富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (SPARC) 家族<sup>[10]</sup>。FSTL1 参与多种疾病的发生与发展, 可能与炎症反应、血管新生、细胞增殖和凋亡、肿瘤细胞迁移和侵袭、突触传递有关<sup>[11-13]</sup>。本课题组前期研究发现, FSTL1 高表达于糖尿病动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞中, 而且 FSTL1 可显著促进巨噬细胞中白细胞介素-1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和 β-干扰素 (IFN-β) 等炎症因子的表达<sup>[5]</sup>。

本研究发现, 糖尿病动脉粥样硬化患者外周血

AGEs 水平与 FSTL1 水平呈正相关。因此, 推测 FSTL1 高表达于糖尿病动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞, 可能与外周血中高浓度的 AGEs 有关。另外本研究还发现, 用 AGEs 刺激巨噬细胞后, FSTL1 表达及分泌量均上升。既往研究表明, 糖尿病合并动脉粥样硬化患者的斑块组织中 RAGE 呈高表达。因此, 本研究进一步运用 RAGE 特异性抗体阻断 AGEs-RAGE 信号通路, 观察 FSTL1 的表达情况, 发现 RAGE 抗体封闭其受体活性后, FSTL1 的表达及分泌量均被明显抑制, 提示 AGEs-RAGE 信号通路可能参与调控糖尿病动脉粥样硬化中 FSTL1 的表达。

AGEs-RAGE 信号通路主要通过激活核因子 κB (NF-κB) 及 AP-1, 促进炎症因子的表达<sup>[14-15]</sup>。为进一步明确 RAGE 信号通路对 FSTL1 表达的调控作用, 本研究根据前期对 FSTL1 基因结构的分析结果, 推测 FSTL1 基因 5' 启动子区受转录因子 AP-1 和 c-Jun 的调节。本研究进一步用 AGEs-BSA 刺激巨噬细胞, 发现 AP-1 及 c-Jun 表达水平升高; 分别采用 RAGE 特异性抗体及构建 RAGE<sup>-/-</sup> 小鼠以阻断 AGEs-RAGE 信号通路, 结果发现巨噬细胞中 AP-1 和 c-Jun 的表达水平均明显降低。

综上所述, 本研究发现 AGEs-RAGE 信号通路通过调控巨噬细胞中转录因子 AP-1 及 c-Jun 的表

达来调节 FSTL1 活性,而且 FSTL1 是一个潜在的影响糖尿病动脉粥样硬化发生与发展的调控因子。本研究揭示了 AGEs 和 FSTL1 在糖尿病动脉粥样硬化发病中的作用机制,这为寻找糖尿病动脉粥样硬化药物防治的新靶点提供了线索。但对于 AGEs 调控 FSTL1 表达的具体分子机制,还有待于更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》发布[J]. 实用心电学杂志, 2017, 26(4):277.
- [2] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2010 update; a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2010, 121(7):948-954.
- [3] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. Physiol Rev, 2006, 86(2): 515-581.
- [4] Senatus LM, Schmidt AM. The AGE-RAGE axis: implications for age-associated arterial diseases[J]. Front Genet, 2017, 8:187.
- [5] 宋倩,王燕萍,吴舒筠,等. 卵泡抑素样蛋白 1 与糖尿病动脉粥样硬化的炎症反应[J]. 内科理论与实践, 2017, 12(6): 386-390.
- [6] Chen W, Sandoval H, Kubiak JZ, et al. The phenotype of peritoneal mouse macrophages depends on the mitochondria and ATP/ADP homeostasis[J]. Cell Immunol, 2018, 324: 1-7.
- [7] Saito I, Kokubo Y, Yamagishi K, et al. Diabetes and the risk of coronary heart disease in the general Japanese population; the Japan Public Health Center-based prospective (JPHC) study[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1):187-191.
- [8] Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease[J]. Am J Pathol, 1995, 146(3): 688-694.
- [9] Brett J, Schmidt AM, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues[J]. Am J Pathol, 1993, 143(6):1699-1712.
- [10] Hambrock HO, Kaufmann B, Muller S, et al. Structural characterization of TSC-36/Flik; analysis of two charge isoforms[J]. J Biol Chem, 2004, 279(12):11727-11735.
- [11] Chaly Y, Hostager B, Smith S, et al. Follistatin-like protein 1 and its role in inflammation and inflammatory diseases[J]. Immunol Res, 2014, 59(1/3):266-272.
- [12] Shimano M, Ouchi N, Nakamura K, et al. Cardiac myocyte follistatin-like 1 functions to attenuate hypertrophy following pressure overload[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(43):E899-E906.
- [13] Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart[J]. Nature, 2015, 525(7570):479-485.
- [14] Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion[J]. Diabetes, 2001, 50(6):1495-1504.
- [15] Iwashima Y, Eto M, Hata A, et al. Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(2):368-380.

(收稿:2018-06-28 修回:2018-11-30)

(本文编辑:胡晓静)