

晚期糖基化终产物通过其受体促进 内皮细胞分泌 IL-8 的研究*

赵善超^{1)**} 刘靖华^{2)**} 宋先璐³⁾ 郭志坚¹⁾ 邓 鹏²⁾

刘志强¹⁾ 张 训¹⁾ 侯凡凡^{1)***} 姜 勇^{2)***}

(¹⁾南方医科大学南方医院肾病研究所, 广州 510515; ²⁾南方医科大学基础医学院广东省功能蛋白质组学重点实验室, 广州 510515;

³⁾广州医学院附属肿瘤医院, 广州 510095)

摘要 探讨晚期糖基化终产物(AGE)修饰蛋白对内皮细胞生成白介素 8(IL-8)的作用, 及晚期糖基化终产物受体(RAGE)在此病理过程中的作用. 内皮细胞来自培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC). 将内皮细胞与不同浓度的 AGE 修饰人血清白蛋白(AGE-HSA)在体外共同培养, 或以可溶性晚期糖基化终产物受体(sRAGE)对 AGE-HSA 进行预处理后再与 HUVEC 共同培养. 用蛋白质液相芯片法检测 HUVEC 培养上清中 IL-8 水平, 并提取细胞 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 检测细胞中 IL-8 mRNA 的表达水平. 结果表明, AGE-HSA 以时间和剂量依赖的方式刺激 HUVEC 生成 IL-8, 未经修饰的 HSA 无此作用. AGE-HSA 用 sRAGE 预处理后, 刺激 HUVEC 生成 IL-8 的作用被抑制, 并且此抑制作用呈剂量依赖的方式. AGE-HSA 刺激 HUVEC 使 IL-8 mRNA 表达增高, 未经修饰的 HSA 无此作用. sRAGE 能够阻断 AGE-HSA 诱导 HUVEC 表达 IL-8 mRNA 的作用. 整个变化趋势与蛋白质水平一致. 研究首次证实, AGE-HSA 与细胞表面受体 RAGE 相互作用可刺激内皮细胞分泌 IL-8, 并上调 IL-8 mRNA 的表达. 这为研究加速型血管病变的发病机制提供了新视角, 也为治疗由 AGE 增多和滞留所引起的病理损害提供了新靶点.

关键词 晚期糖基化终产物, 受体, 内皮细胞, 白介素 -8

学科分类号 R631, Q512, Q78

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)是蛋白质氨基组与糖的醛基组之间非酶性糖化氧化反应的终产物^[1]. 近期的研究证实, AGE 滞留在慢性肾功能不全(chronic renal failure, CRF)某些并发症的发生发展中具有重要作用, 因此被认为是一类新发现的尿毒症毒素^[2]. 同时, CRF 病人也是心血管疾病的高危人群, 这类病人心血管病的发生率明显高于一般人群, 发病年龄明显提前, 被称之为加速型血管病变^[3]. 然而, 这种糖化氧化产物对血管的作用及其分子机制目前还不完全清楚. 有研究表明, AGE 与其特异性受体 RAGE (receptor for advanced glycation end products)相互作用, 可促进内皮细胞分泌细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 及

E-选择素等细胞因子, 引起病理效应^[4]. 但 AGE 能否促进白介素 8(interleukin-8, IL-8)的生成, 国内外均未见相关报告. 我们的工作从蛋白质和基因两个水平观察 AGE 修饰蛋白对内皮细胞分泌 IL-8 的影响, 并探讨了 RAGE 在这一过程中的作用.

1 材料及方法

1.1 材料

RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 超级纯胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 人血清白蛋白

* 国家重点基础研究发展计划项目(973)(2002CB513005, 2006CD503904)和国家自然科学基金资助项目(30700835, 30670829).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

侯凡凡.Tel/Fax: 020-61641591, E-mail: fhou@fimmu.com

姜勇.Tel/Fax: 020-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

收稿日期: 2008-01-09, 接受日期: 2008-04-15

(HSA)购自 Sigma 公司; Liquid Chip 液相蛋白多功能分析仪及配套试剂盒(IL-8 检测试剂盒)购自德国 Qiagen 公司; 凝胶成像分析仪购自法国 Vilber Lourmat 公司; 鲎(TCL)检测试剂盒购自 Endos 公司. SV Total RNA Isolation System RNA 提取试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司.

1.2 方法

1.2.1 体外制备无内毒素 AGE 修饰蛋白. 按我们以前的方法^[5], 以糖解法体外制备 AGE 修饰人血清白蛋白(AGE-HSA). 所制备的 AGE-HSA 经荧光分光光度法测定 AGE 含量为 85.24 U/mg 蛋白质, 对照样本 AGE 含量不超过 0.9 U/mg 蛋白质. 鲎试验法检测样本内毒素含量低于 0.25 EU/ml.

1.2.2 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的培养和鉴定. 取新鲜人脐带分离培养人脐静脉内皮细胞^[6,7]. 内皮细胞的鉴定采用免疫荧光法, 第一抗体为兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗体(RⅧa)、兔抗人肌动蛋白抗体(平滑肌细胞特异性抗体)和兔抗人 CD13 抗体(粒、单核细胞特异性抗体), 用非免疫兔 IgG 做阴性对照, 第二抗体为 FITC 标记的羊抗兔 IgG. 染色后在荧光显微镜下观察. 细胞活性鉴定用台盼蓝拒染实验进行.

1.2.3 人可溶性晚期糖基化终产物受体(soluble RAGE, sRAGE)的制备. 以亚克隆方法制备人可溶性晚期糖基化终产物受体(soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE), 以 Western blot 和 ELISA 方法鉴定证明其具有免疫原性及与 AGE 的结合活性^[8].

1.2.4 AGE-HSA 对 HUVEC 分泌 IL-8 影响的剂量关系. 内皮细胞接种在 96 孔培养板上, 在无血清培养基中静止 12 h, 分别加入 12.5、25、50、100 及 200 mg/L 的 AGE-HSA, 以 50 mg/L HSA 作为阴性对照组(100%), 不加任何刺激因素的 RPMI 1640 培养基作为空白对照, 培养 24 h. 以蛋白质液相芯片法检测 HUVEC 培养上清中 IL-8 水平.

1.2.5 AGE-HSA 对 HUVEC 分泌 IL-8 影响的时间关系. 内皮细胞接种在 96 孔培养板上, 在无血清培养基中静止 12 h, 分别加入 50 mg/L 的 AGE-HSA 或未经修饰的 HSA, 作用 2、4、8、12、24、48 h, 测定培养上清 IL-8 的浓度. 以未予刺激时(即 0 h)的 IL-8 水平作为 100%.

1.2.6 sRAGE 对 HUVEC 分泌 IL-8 的阻断作用. 分别以 125、250、500、1 000 mg/L sRAGE 与

50 mg/L AGE-HSA 共同孵育 1 h(即 AGE-HSA 与 sRAGE 的摩尔比分别为 1:5、1:10、1:20、1:40), 再与 HUVEC 共同培养 24 h, 以 50 mg/L AGE-HSA 刺激组作为 100%, 以 50 mg/L 未经修饰的 HSA 作为阴性对照, RPMI 1640 培养液作为空白对照, 检测培养上清 IL-8 的浓度.

1.2.7 AGE-RAGE 对 HUVEC 细胞中 IL-8 mRNA 表达的影响. 以 500 mg/L sRAGE(即 AGE-HSA 与 sRAGE 的摩尔比为 1:20)与 50 mg/L AGE-HSA 共同孵育 1 h, 再与 HUVEC 共同培养 24 h. 以 50 mg/L AGE-HSA 作为刺激组, 以 50 mg/L 未经修饰的 HSA 作为阴性对照(100%), RPMI 1640 培养液作为空白对照, 以 100 μ g/L LPS 刺激组作为阳性对照. 作用后对细胞进行消化计数, 以冰冷的 PBS 洗 3 遍, 用试剂盒提取每孔细胞总 RNA. 设计两对引物, 即 IL-8 上游引物, 5' AGGGTTGCCAGAT GCAATAC 3' (+400~+419), IL-8 下游引物, 5' ACACAGCTGGCAA TGACAAG 3' (+1269~+1250), 产物长度 870 bp; GAPDH 的上游引物, 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3', GAPDH 下游引物, 5' TCCACCA CCCTGTTGCTGTA 3', 产物长度 452 bp. 以所提取各孔细胞的总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 反应, 扩增 IL-8. 以 GAPDH 为内参照. 1%琼脂糖电泳鉴定结果, 并以凝胶成像分析仪进行灰度值分析.

1.2.8 统计学处理. 所得结果以培养结束时相应各孔的细胞数作校正, 而后以相应对照(作为 100%)的百分数表示. 所有数据均代表 3 次以上重复试验的结果, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数的比较采用 ANOVA-SNK 法, $P < 0.05$ 为具有统计学意义. 所有统计由统计软件 SPSS 10.0 完成.

2 结 果

2.1 内皮细胞的鉴定

原代和第二代人脐静脉内皮细胞经 RⅧa 间接免疫荧光鉴定, 阳性率在 98%以上, 而抗肌动蛋白、抗 CD13 抗体荧光染色阴性, 证实其为内皮细胞. 台盼蓝染色示 98%以上实验用细胞为活细胞.

2.2 AGE-HSA 对 HUVEC 分泌 IL-8 影响的剂量关系

AGE-HSA 对 IL-8 的刺激作用随着 AGE-HSA 浓度的增加而加强. 与阴性对照组(未经修饰的 HSA)相比, 12.5、25、50、100 及 200 mg/L AGE-HSA 分别与 HUVEC 共同培养 24 h, 可使

IL-8 表达增高到阴性对照组的 $(252 \pm 25)\%$ 、 $(416 \pm 31)\%$ 、 $(567 \pm 22)\%$ 、 $(631 \pm 28)\%$ 和 $(690 \pm 26)\%$ 。经统计学分析, ANOVA, $P < 0.01$, 与阴性对照组相比, $*P < 0.05$ (图 1)。

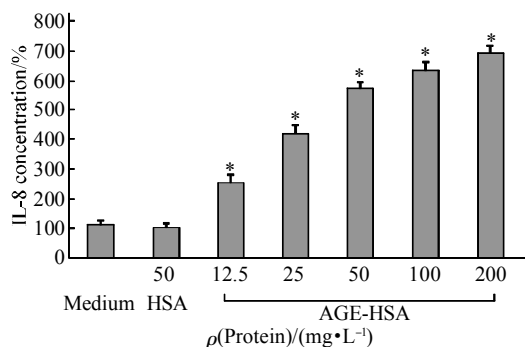


Fig. 1 IL-8 secretion by human endothelial cells in response to different dosage of AGE-HSA

Human umbilical vein endothelial cells were incubated in medium containing the indicated concentrations of AGE-HSA, their unmodified forms or medium for 24 h. The culture supernatants were used for measurement of IL-8 levels with Liquid Chip method. The results were recorded with percentage form, regarding HSA negative control group as 100%. The experiment was repeated three times, using umbilical cords from three normal puerperas. Representative data from the three experiments are expressed as $\bar{x} \pm s$. ANOVA, $P < 0.01$, compared with HSA negative control group, $*P < 0.05$.

2.3 AGE-HSA 对 HUVEC 分泌 IL-8 影响的时间关系

50 mg/L AGE-HSA 与原代培养内皮细胞共同孵育至 2、4、8、12、24 和 48 h 时, 细胞表达 IL-8 水平分别为 0 h 的 $(152 \pm 24)\%$ 、 $(208 \pm 29)\%$ 、 $(337 \pm 43)\%$ 、 $(430 \pm 45)\%$ 、 $(658 \pm 32)\%$ 和

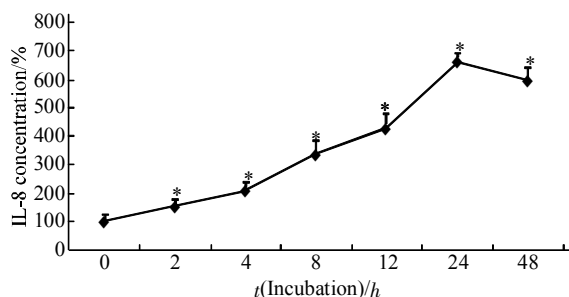


Fig. 2 IL-8 secretion by human endothelial cells in response to 50 mg/L AGE-HSA with time

Human umbilical vein endothelial cells were incubated in medium containing 50 mg/L AGE-HSA for indicated time. Then the culture supernatants were used for measurement of IL-8 levels with Liquid Chip method. The results were recorded with percentage form, regarding 0 h as 100%. The experiment was repeated three times, using umbilical cords from three normal puerperas. Representative data from the three experiments are expressed as $\bar{x} \pm s$. ANOVA, $P < 0.01$, compared with 0 h, $*P < 0.05$.

$(595 \pm 40)\%$ 。经统计学分析, ANOVA, $P < 0.01$, 与对照组(0 h)相比, $*P < 0.05$ (图 2)。

2.4 sRAGE 对 AGE-HSA 刺激 HUVEC 分泌 IL-8 的影响

用不同剂量的 sRAGE 对 AGE-HSA 进行预处理后, AGE-HSA 刺激 HUVEC 生成 IL-8 的作用被抑制, 并呈剂量依赖性。当 sRAGE 浓度为 125、250、500 或 1 000 mg/L 时, 抑制率分别达到 34.4%、71.8%、82.4%和 83.9%。经统计学分析, ANOVA, $P < 0.01$, 与 50 mg/L AGE-HSA 刺激组相比, $*P < 0.05$ (图 3)。

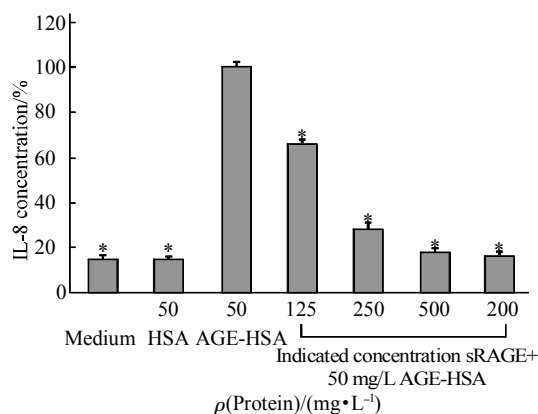


Fig. 3 Effect of sRAGE in the process of IL-8 secretion by human endothelial cells in response to AGE-HSA

Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) of indicated concentration was incubated with 50 mg/L AGE-HSA, their unmodified forms or medium for 1 h, then incubated with human umbilical vein endothelial (HUVEC) for 24 h. The culture supernatants were used for measurement of IL-8 levels with Liquid Chip method. The results were recorded with percentage form, regarding 50 mg/L AGE-HSA stimulation group as 100%. The experiment was repeated three times, using umbilical cords from three normal puerperas. Representative data from the three experiments are expressed as $\bar{x} \pm s$. ANOVA, $P < 0.01$, compared with 50 mg/L AGE-HSA stimulation group, $*P < 0.05$.

2.5 AGE-HSA 及 sRAGE 对内皮细胞 IL-8 mRNA 水平的影响

AGE-HSA 刺激 HUVEC 使 IL-8 mRNA 表达增高, 未经修饰的 HSA 无此作用。sRAGE 能够阻断 AGE-HSA 诱导 HUVEC 表达 IL-8 mRNA 的作用。经统计学分析, ANOVA, $P < 0.01$, 与阴性对照组 (50 mg/L 未经修饰的 HSA 作用组)相比, $*P < 0.05$ (图 4)。

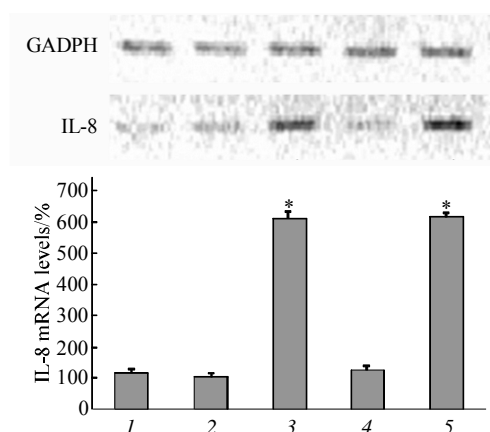


Fig. 4 Effect of AGE-HSA and sRAGE on IL-8 mRNA levels expressed by human endothelial cells

Human endothelial cells were incubated for 24 h with medium alone as empty control (lane 1), 50 mg/L unmodified HSA as negative control (lane 2), 50 mg/L AGE-HSA (lane 3), 500 mg/L sRAGE was incubated with 50 mg/L AGE-HSA for 1 h, then incubated with human umbilical vein endothelial cells for 24 h (lane 4), or 100 µg/L LPS as positive control (lane 5). RT-PCR was performed and IL-8 mRNA levels were analyzed with gel imaging analyser as described in the text. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Data from three independent experiments are presented as $\bar{x} \pm s$. ANOVA, $P < 0.01$, compared with negative control group, * $P < 0.05$.

3 讨 论

AGE 是糖化、氧化反应的终产物。在该反应中, 蛋白质的氨基组与糖的醛基组发生非酶性的糖化氧化反应, 早期形成可逆性的 Schiff 碱和 Amadori 产物, 而后经过一系列脱水、氧化和化学重排, 生成不可逆的晚期终产物, 即 AGE^[1]。蛋白质一旦被 AGE 所修饰, 即丧失其正常的生理功能, 将通过与细胞表面 AGE 受体的相互作用而被降解、清除。正常情况下体内 AGE 水平随年龄增长而缓慢增加^[9]。糖尿病患者由于高血糖导致糖基化反应加速, 循环及组织中的 AGE 修饰蛋白明显增多, 而慢性肾功能衰竭(CRF)病人循环中 AGE 比正常人增加 10 倍, 甚至高于肾功能正常的糖尿病患者^[10]。体内 AGE 滞留可作用于单核巨噬细胞、血管内皮细胞、肾系膜细胞、关节滑膜细胞、神经细胞及血管平滑肌细胞等多种细胞, 造成一系列病理学作用^[5, 9, 11, 12]。心血管并发症是糖尿病、CRF 透析患者死亡的主要原因, 而 AGE 滞留与糖尿病、CRF 血管并发症的发生密切相关^[2, 13~15]。以往的研究已证实, AGE 与内皮细胞表面的 RAGE 相互作

用, 可引起 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、E-选择素等基因的表达增强, 从而增加内皮通透性, 增强炎性细胞的吸附, 降低内皮细胞的正常防护功能^[4], 引起内皮细胞的氧化性损伤, 促进血小板聚集, 破坏血管舒张节律^[4, 16]。而本文第一次证实, AGE 并能以剂量和时间依赖的方式抑制内皮细胞 IL-8 的生成, 并且证明这一作用是通过其特异性受体 RAGE 实现的。

IL-8 是一种能激活嗜中性粒细胞的趋化性细胞因子, 具有内源性白细胞趋化性和活化性作用, 对炎症和免疫过程有重要的调节作用, 其基因在血管内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞、滑膜细胞、软骨细胞、角化细胞等多种组织细胞以及白细胞(单核吞噬细胞、巨噬细胞及其他白细胞)中极其活跃地表达, 在炎症、免疫反应、机体防御反应中具有广泛的作用。它通过对中性粒细胞、T 淋巴细胞和嗜碱性粒细胞等的激活和趋化作用, 参与各种非特异性炎症的病理发生过程^[17~20]。我们注意到, 在一些疾病中, 例如慢性肾功能不全、动脉粥样硬化等, AGE 和 IL-8 水平都是增高的。我们的工作有机地将两者联系起来, 并初步证明了其因果关系。由于人可溶性 RAGE 可以阻断 AGE 刺激内皮细胞生成 IL-8 的作用, 证实 AGE 的这一生物学作用是由 RAGE 所介导的。

总之, 本研究证实, AGE-HSA 与细胞表面受体 RAGE 相互作用可刺激内皮细胞分泌 IL-8, 并上调 IL-8 mRNA 的表达。这为研究加速型血管病变的发病机制提供了新视角, 也为治疗由 AGE 增多和滞留所引起的病理损害提供了新靶点。

参 考 文 献

- 1 Sugiyama S, Miyata T, Horie K, *et al.* Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, **11**: 91~94
- 2 郭志坚, 侯凡凡, 张训, 等. 晚期糖基化终产物通过 p38 信号通路抑制内皮细胞合成一氧化氮的研究. *中华医学杂志*, 2002, **82** (19): 1328~1331
- 3 Guo Z J, Hou F F, Zhang X, *et al.* *Natl Med J China*, 2002, **82** (19): 1328~1331
- 4 Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int*, 2000, **58**: 120~125
- 5 Basta G, Lazzerini G, Massaro M, *et al.* Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 2002, **105**(7): 816~822
- 6 Hou F F, Chertow G M, Kay J, *et al.* Interaction between beta

- 2-microglobulin and advanced glycation end products in the development of dialysis related-amyloidosis. *Kidney Int*, 1997, **51** (5): 1514~1519
- 6 Jaffe E A, Nachman R L, Becher C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2745~2756
- 7 王 韻, 周 新, 汪炳华, 等. 胞浆型磷脂酶 A2 介导弱氧化修饰低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(4): 350~355
- Wang Y, Zhou X, Wang B H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(4): 350~355
- 8 赵善超, 姜 勇, 刘靖华, 等. 人可溶性晚期糖基化终产物受体的原核表达及活性鉴定. *第一军医大学学报*, 2005, **25**(7): 769~773
- Zhao S C, Jiang Y, Liu J H, *et al.* *J First Mi Med Univ*, 2005, **25**(7): 769~773
- 9 赵善超, 侯凡凡, 姜 勇. 晚期糖基化终产物受体的结构和功能. *生理科学进展*, 2003, **34**(1): 71~73
- Zhao S C, Hou F F, Jiang Y. *Prog Physiol Sci*, 2003, **34**(1): 71~73
- 10 Hou F F, Ren H, Owen W F, *et al.* Enhanced expression of receptor for advanced glycation end products in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15** (7): 1889~1896
- 11 Hou F F, Jiang J P, Guo J Q, *et al.* Receptor for advanced glycation end products on human synovial fibroblasts: role in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13** (5): 1296~1306
- 12 Gao L, Kang L, Chen Q, *et al.* Advanced glycation end products inhibit production and activity of matrix metalloproteinase-2 in human umbilical vein endothelial cells. *J Int Med Res*, 2007, **35** (5): 709~715
- 13 Miyata T, Wada Y, Cai Z, *et al.* Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int*, 1997, **51**: 1170~1181
- 14 Hangaishi M, Taguchi J, Miyata T, *et al.* Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **248**: 285~292
- 15 De Vriese A S, Verbeuren T J, Van de Voorde J, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*, 2000, **130**: 963~974
- 16 Sun M, Muinehiro Y, Toshiyuki I, *et al.* Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Path*, 1998, **79**(4): 207~222
- 17 Singh R K, Varney M L. IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. *Histol Histopathol*, 2000, **15** (3): 843~849
- 18 Li A, Dubey S, Varney M L, *et al.* IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, 2003, **170** (6): 3369~3376
- 19 Weglarz L, Dzierzewicz Z, Skop B, *et al.* Desulfovibrio desulfuricans lipopolysaccharides induce endothelial cell IL-6 and IL-8 secretion and E-selectin and VCAM-1 expression. *Cell Mol Biol Lett*, 2003, **8** (4): 991~1003
- 20 Nyhlen K, Linden M, Andersson R, *et al.* Corticosteroids and interferons inhibit cytokine-induced production of IL-8 by human endothelial cells. *Cytokine*, 2000, **12** (4): 355~360

Advanced Glycation End Products Increase Secretion of IL-8 by Human Endothelial Cells Through RAGE*

ZHAO Shan-Chao^{1)**}, LIU Jing-Hua^{2)**}, SONG Xian-Lu³⁾, GUO Zhi-Jian¹⁾, DENG Peng²⁾,
LIU Zhi-Qiang¹⁾, ZHANG Xun¹⁾, HOU Fan-Fan^{1)***}, JIANG Yong^{2)***}

(¹⁾Institute of Renal Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²⁾Key Laboratory for Functional Proteomics of Guangdong Province, Basic Medical College, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

³⁾Tumor Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, China)

Abstract To investigate the effect of advanced glycation end products (AGE) modified protein on IL-8 secretion by human endothelial cells and the role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in this pathological procedure. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured *in vitro* with different concentration AGE modified human serum albumin (AGE-HSA) which had been treated with soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) or not. IL-8 levels in the supernatant were determined using Liquid Chip method. RNA was extracted from the cells and RT-PCR was performed to determine the mRNA expression levels of IL-8 in each group, and GAPDH levels were served as reference during this process. The results showed that AGE-HSA increased IL-8 secretion as a dose- and time- dependent manner. Unmodified HSA had no such effect. AGE-induced IL-8 secretion was significantly inhibited by sRAGE as a dose-dependent manner, and the decrease extent was 82.4% when the cells were incubated with 500 mg/L of sRAGE. AGE-RAGE interaction upregulated IL-8 mRNA expression in HUVEC, and this effect could be blocked by pretreatment of AGE-HSA with intact sRAGE. It was proved that AGE modified protein increases the secretion of IL-8 by endothelial cells through RAGE on protein and gene levels, which maybe provide a new aspect to study the machines and treatment methods of AGE-associated diseases.

Key words advanced glycation end products, receptor, endothelial cell, interleukin-8

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2002CB513005) and The National Natural Science Foundations of China (30700835, 30670829).

**ZHAO Shan-Chao and LIU Jing-Hua contributed equally to this work.

***Corresponding author.

HOU Fan-Fan. Tel/Fax: 86-20-61641591, E-mail: fhou@fimmu.com

JIANG Yong. Tel/Fax: 86-20-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

Received: January 9, 2008 Accepted: April 15, 2008