

# 晚期糖基化终产物对人晶状体上皮细胞 TTase 表达的影响

王旭, 严宏

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81070720)  
作者单位:(710038)中国陕西省西安市,第四军医大学唐都医院眼科  
作者简介:王旭,女,在读硕士研究生,研究方向:白内障发病机制。  
通讯作者:严宏,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:白内障发病机制. yhongb@fmmu.edu.cn  
收稿日期:2015-01-01 修回日期:2015-03-28

## Effects of advanced glycation end-products on thioltransferase expression in human lens epithelial cells

Xu Wang, Hong Yan

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81070720)  
Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province. China  
**Correspondence to:** Hong Yan. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province. China. yhongb@fmmu.edu.cn  
Received: 2015-01-01 Accepted: 2015-03-28

### Abstract

• **AIM:** To observe the effects of advanced glycation end-products (AGEs) on thioltransferase (TTase) expression and activity in human lens epithelial cells.  
• **METHODS:** Human lens epithelial cells B3 (HLE B3) were treated with 1.5mg/mL AGEs - BSA as the experimental groups cultured by fetal bovine serum of volume fraction 10% dulbecco modified eagle medium (DMEM) and bovine serum albumin (BSA) was added at the same concentrations as the negative control. The level of reactive oxygen species (ROS) was evaluated. Cells were collected at 0, 1, 2, 3, 4d and total RNA or protein was extracted. TTase mRNA levels were detected by qRT-PCR. TTase expression was detected by Western blot and its activity was measured.  
• **RESULTS:** Compared with the control group, AGEs - BSA up-regulated the expression of ROS ( $P < 0.01$ ), ROS content increased in a time-dependent manner. BSA had no effects on ROS expression. The expression of TTase increased after treatment with AGEs - BSA for 1d, peaked at 2d (nearly 5.06-fold increase,  $P < 0.01$ ), then decreased gradually. No change was observed between BSA and control group ( $P > 0.05$ ). Similarly, TTase activity peaked at 3d (nearly 2.01-fold increase,  $P < 0.01$ ). Western blot test found that TTase protein expression was increased

gradually, starting from the 3d TTase expression was reflected that there was statistically significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** AGEs - BSA significantly increases the production of ROS in human lens epithelial cells, and it then induces the oxidative stress which may promote the expression of TTase and enhances the activity of TTase.  
• **KEYWORDS:** advanced glycation end-products; thioltransferase; lens epithelial cells; diabetic cataract

**Citation:** Wang X, Yan H. Effects of advanced glycation end-products on thioltransferase expression in human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(4):588-591

### 摘要

**目的:**观察晚期糖基化终产物对人晶状体上皮细胞硫醇转移酶表达及活性的影响。

**方法:**将体外人晶状体上皮细胞用 AGEs - BSA 浓度为 1.5mg/mL, 胎牛血清体积分数为 10% 的 DMEM 培养液培养, 同时设定相同浓度的 BSA 对照组及空白对照组, 分别于 0, 1, 2, 3, 4d 收集细胞, 测定晶状体上皮细胞内 ROS 含量、TTase 活性, qRT-PCR 检测 TTase mRNA 表达情况, Western blot 检测 TTase 蛋白质表达。

**结果:**与对照组相比, AGEs - BSA 干预后, 细胞内 ROS 含量呈时间依赖性增高, 差异有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ), BSA 干预后 ROS 的表达与对照组无显著差异。AGEs 可诱导 TTase 的 mRNA 表达逐渐增高, 2d 时达到峰值, 约为正常对照组的 5.06 倍 ( $P < 0.01$ ); 而 BSA 处理组和对照组 TTase 的 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 TTase 的 mRNA 表达类似, TTase 活性升高, 在 3d 达到峰值, 为正常对照组的 2.01 倍 ( $P < 0.01$ )。Western blot 检测发现, TTase 蛋白质表达逐渐增加, 从 3d 开始 TTase 表达与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**结论:**AGEs 可能是通过诱导人晶状体上皮细胞发生氧化应激, 致使 TTase 表达上调, 活性增强。

**关键词:**晚期糖基化终产物; 硫醇转移酶; 晶状体上皮细胞; 糖尿病性白内障

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.05

**引用:**王旭, 严宏. 晚期糖基化终产物对人晶状体上皮细胞 TTase 表达的影响. 国际眼科杂志 2015;15(4):588-591

### 0 引言

糖尿病是一种以糖代谢异常为基础, 涉及心、眼、肾、脑等多脏器损伤的代谢紊乱综合征, 其发病率不断升高, 患者数量庞大, 已成为世界性疾病<sup>[1]</sup>。糖尿病眼部病变中, 糖尿病性白内障已上升为仅次于糖尿病性视网膜病变的第二大眼部并发症<sup>[2]</sup>。越来越多的结果显示, 糖基化在

糖尿病性白内障的发生中起重要作用,长期高血糖导致的晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)水平升高是引起糖尿病性白内障发生发展的重要原因之一<sup>[3,4]</sup>。

硫醇转移酶(thioltransferase, TTase)又称谷氧还蛋白(Glutaredoxin, GRx),分子量约为11.8kDa,广泛存在于动物组织细胞中。TTase作为一种巯基-蛋白氧化还原酶,主要功能为特异性地还原蛋白质与谷胱甘肽(glutathione, GSH)所形成的二硫化物(PSSG),TTase可以通过脱硫醇功能维持细胞内巯基/二硫化物稳态和抵抗晶状体蛋白质氧化损伤<sup>[5,6]</sup>。

氧化损伤是白内障形成的重要机制之一。TTase在维持细胞内巯基/二硫化物和抵抗晶状体蛋白质免受氧化损伤方面发挥巨大作用,糖尿病患者体内不断增多的晚期糖基化终产物,与以TTase为代表的抗氧化损伤保护性分子之间的关系尚不清楚。为研究糖尿病性白内障发展过程中糖基化终产物对TTase的作用,本研究观察了AGEs对人晶状体上皮细胞内TTase表达与活性的影响,初步探讨AGEs对人晶状体上皮细胞氧化状态的影响及TTase可能参与的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人晶状体上皮细胞系(HLE B3),由中山大学中山眼科中心惠赠;DMEM培养液,胎牛血清(美国HyClone公司);Trizol(美国Invitrogen公司);PrimeScript RT Master Mix, SYBR Premix Ex Taq II(日本Takara公司); $\beta$ -NADPH,谷胱甘肽还原酶,谷胱甘肽, HEDS(美国Sigma公司);AGEs, BSA(Biovision公司);RIPA裂解液,BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);兔抗人TTase多克隆抗体,山羊抗兔IgG多克隆抗体(美国Abcam公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** HLE B3细胞采用含10%(v/v)胎牛血清的DMEM培养液,37℃、体积分数为5% CO<sub>2</sub>恒温恒湿孵箱内常规培养,隔日换液。取对数生长期的细胞接种至6孔培养板中。分别以浓度为1.5mg/mL AGEs-BSA的DMEM培养液与浓度为1.5mg/mL BSA的DMEM培养液孵育细胞。时间点分别设为0,1,2,3,4d。各实验均重复3次。

**1.2.2 ROS含量检测** ROS特异荧光探针DCFH-DA本身没有荧光,但可以自由穿过细胞膜进入细胞内,被酯酶水解生成DCFH,无荧光的DCFH可以被ROS氧化生成有荧光的DCF,检测DCF的荧光强度可反映细胞内ROS的水平。培养不同时间后,吸去6孔板内原培养液,按照2mL/孔加入DCFH-DA液,培养箱内孵育20min。避光条件下吸尽原液,低糖DMEM漂洗3遍,收集细胞,激发波长488nm,发射波长调至525nm,检测相对荧光单位反映ROS含量。

**1.2.3 qRT-PCR法检测TTase mRNA表达** 采用Trizol一步法提取晶状体上皮细胞总RNA,逆转录生成cDNA, $\beta$ -actin作为内参。TTase引物序列为:上游:5'-CCTGGGAAGGTGGTTGTGTT-3'和下游:5'-TTAGTGTGGTTGGTGGCTGTG-3'。人 $\beta$ -actin引物序列为:上游:5'-CTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'和下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'。根据Takara公司SYBR Premix Ex Taq II试剂说明书,配制20 $\mu$ L qRT-PCR反应体系,放入实时荧光定量PCR仪内反应。PCR反应条件为:

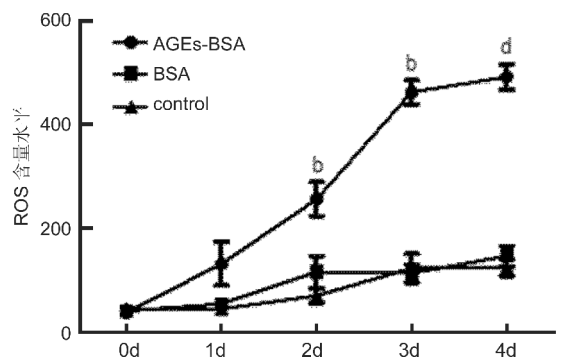


图1 AGEs-BSA及BSA对人晶状体上皮细胞ROS含量的影响 <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

第一阶段预变性,95℃ 30s,1个循环;第二阶段PCR反应,95℃ 5s,60℃ 31s,40个循环。扩增结果与 $\beta$ -actin产物比较,并按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对值。

**1.2.4 Western blot检测TTase蛋白质表达** 培养的细胞弃去培养液,PBS洗涤2遍。加入裂解液充分混匀,冰上裂解30min。完全移入Ep管中,12000r/min 4℃离心20min,弃沉淀,BCA法测定蛋白浓度,上清中加上样缓冲液,沸水中变性3min,按每孔100 $\mu$ g上样电泳,结束后,取下凝胶,将电泳产物转移至PVDF膜上。转膜结束后,用含50g/L脱脂奶粉室温封闭2h,加入TTase一抗(1:250)于4℃摇床孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10min,加入二抗(1:1000),4℃避光孵育1h后取出,再用TBST洗膜3次,每次10min;Odyssey红外成像。用Image J软件检测条带灰度值。

**1.2.5 TTase活性检测** TTase能够催化HEDS二硫化物与GSH反应,GSH被氧化为GSSG,GSSG在谷胱甘肽还原酶的催化下,由NADPH供氢,重新还原为GSH。在适宜条件下,反应中NADPH的消耗呈线性变化,通过测定1min内NADPH在340nm波长处吸光度降低的数值,来反映TTase的活性<sup>[7]</sup>。

统计学分析:采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,各项数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组实验数据与总体之间的比较采用one-way ANOVA方差分析,组间实验数据多重比较采用SNK- $q$ 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AGEs-BSA作用不同时间对HLE细胞内ROS含量的影响** 晶状体上皮细胞不同处理分别培养0~4d,与正常对照组相比,BSA干预后ROS的含量无明显差异( $P > 0.05$ ),AGEs-BSA处理后细胞内ROS含量随作用时间延长逐渐增高,并于4d达到峰值,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图1)。

**2.2 AGEs-BSA作用不同时间对HLE细胞的TTase mRNA表达的影响** 通过qRT-PCR检测实验组及对照组0~4d培养后晶状体上皮细胞内TTase mRNA的相对表达量,结果如图2所示。BSA对照组与正常对照组在0~4d培养中,晶状体上皮细胞内TTase的mRNA表达稳定在较低水平,两组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。AGEs-BSA处理后晶状体上皮细胞内TTase的mRNA表达水平迅速增高,1d即具有统计学差异( $P < 0.05$ ),并在2d时达到峰值,约为正常对照组的5.06倍( $P < 0.01$ )。培养3d时表达水平开始降低,但仍高于正常对照组( $P < 0.05$ ),为正常

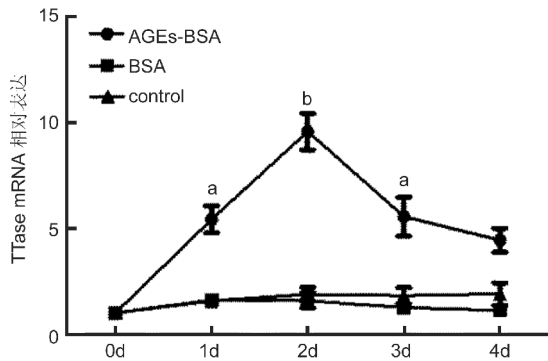


图2 AGEs-BSA及BSA对人晶状体上皮细胞TTase mRNA含量的影响 <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

对照组同期表达量的3.0倍。4d时继续下降,为对照组的2.33倍。

**2.3 AGEs-BSA作用不同时间对HLE细胞TTase蛋白质表达的影响** Western blot检测TTase蛋白表达情况,结果如图3所示。与正常对照组比较,BSA对照组TTase蛋白表达无显著差异( $P > 0.05$ )。AGE-BSA处理组TTase表达逐渐增加,从3d天开始,与正常对照组相比具有统计学差异( $P < 0.05$ ),直至培养第4d TTase的表达达到最高值( $P < 0.05$ )。

**2.4 AGEs-BSA作用不同时间对HLE细胞内TTase活性的影响** TTase的活性在BSA组与正常对照组不同时间基本稳定,无统计学差异( $P > 0.05$ )。在AGEs-BSA处理组,TTase活性于2d明显升高( $P < 0.01$ ),3d达峰值( $P < 0.01$ ),4d开始下降,但仍与正常对照组有差异( $P < 0.05$ ,图4)。

### 3 讨论

目前,糖尿病性白内障的发病机制有三种学说,即多元醇代谢学说、非酶糖基化学说和氧化应激学说<sup>[8-10]</sup>。我们前期研究发现,高糖可引起人晶状体上皮细胞内ROS含量的增加,诱发氧化应激,GSSG/T-GSH比例增高,抗氧化酶SOD和CAT活性受损,TTase表达与活性适应性增强,提示TTase参与对抗高糖诱导的氧化应激,其作用机制可能为降低GSSG/T-GSH比例,增加GSH含量,修复受损的抗氧化酶SOD和CAT活性,从而降低ROS含量,维持氧化还原状态的平衡<sup>[11,12]</sup>。

越来越多的研究结果显示,糖基化在糖尿病性白内障的发生中起着关键作用<sup>[3]</sup>。在对糖尿病周围神经病变、糖尿病视网膜病变等糖尿病并发症的相关研究中表明,AGEs与RAGE(receptor for advanced glycation end-products)结合后,可激活并诱发一系列促炎、促凝血反应,并生成大量活性氧簇(ROS),并产生氧化介导信号,进而造成细胞的损伤甚至凋亡<sup>[13,14]</sup>。我们推测,糖尿病患者血液循环中晚期糖基化终产物的不断增多将可能导致晶状体上皮细胞发生氧化应激性损伤,继而诱发糖尿病性白内障的发生发展。而TTase作为一种拮抗氧化损伤的重要保护性蛋白酶,AGEs是否通过对晶状体上皮细胞的作用从而引起TTase参与其诱导氧化损伤的修复,发挥保护作用尚未有研究报道。本研究采用晶状体上皮细胞体外培养,通过添加外源性晚期糖基化终产物(AGEs-BSA),模拟了糖尿病患者体内晚期糖基化终产物增多对晶状体上皮细胞的刺激作用,观察了AGEs处理后,晶状体上皮细胞内ROS的含量及TTase活性及表达的变化情况。

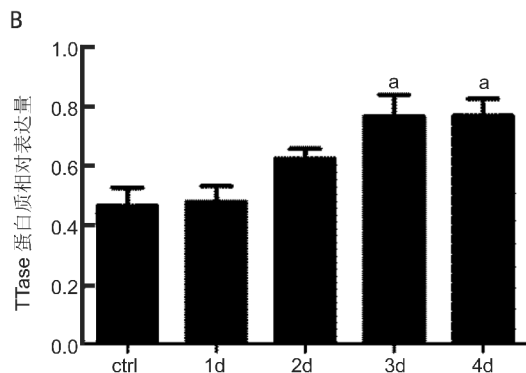
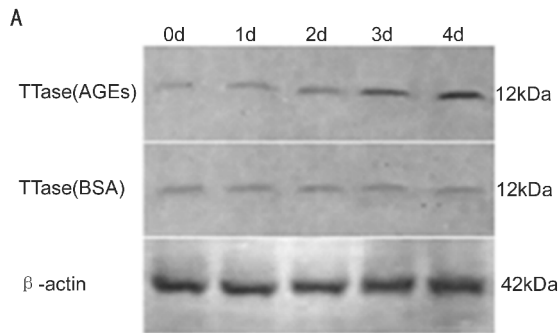


图3 AGEs-BSA及BSA对人晶状体上皮细胞TTase蛋白表达的影响 A:Western blot结果图;B:TTase蛋白质相对表达量(<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组)。

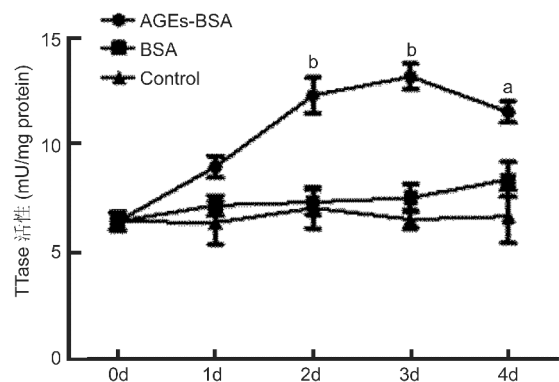


图4 AGEs-BSA及BSA对人晶状体上皮细胞TTase活性的影响 <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

AGEs是由蛋白质、脂质或核酸等大分子物质在非酶条件下,自发与葡萄糖或其他还原单糖反应生成的稳定共价化合物<sup>[10]</sup>。持续的高血糖刺激产生大量的AGEs。AGEs可引起晶状体蛋白结构和功能的改变,如使晶状体蛋白分子伴侣活性降低或丧失,使其维持晶状体透明性的功能减弱或丧失<sup>[15,16]</sup>;AGEs可使超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)等一些重要抗氧化酶活性降低,导致晶状体对氧化损伤的抵抗能力减弱<sup>[17]</sup>。AGE还可与其受体RAGE相互作用,生成大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS具有较强的氧化活性,能够损伤细胞功能<sup>[18]</sup>,Kaji等研究证实,AGEs与角膜内皮细胞共培养,RAGE的表达显著增高,ROS生成明显增多,细胞凋亡增加<sup>[19]</sup>。另有研究发现,AGEs可以通过自身氧化、蛋白质糖基化等途径抑制视网膜毛细血管周细胞的增生,增加细胞内ROS的产生,降低抗氧化酶的活性,促进糖尿病视网膜病变的发展<sup>[13]</sup>。



在本实验中,我们利用 AGEs-BSA 体外培养人晶状体上皮细胞,同样证实,随着 AGEs 作用时间延长,人晶状体上皮细胞内 ROS 水平不断升高。Lou 等发现 ROS 参与了白内障的发生发展过程,ROS 会破坏细胞膜表面离子泵的功能,使细胞水、离子代谢紊乱,造成细胞肿胀,细胞凋亡;引起细胞膜发生脂质过氧化反应,形成有毒性的脂质过氧化物,损伤细胞;影响细胞核酸的转录、翻译进程,使细胞基因发生变异,影响细胞蛋白质合成,细胞分裂增殖<sup>[20-22]</sup>。因此 ROS 可以诱发氧化应激,蛋白质交联、聚集,形成大量不溶性的蛋白质-蛋白质二硫化物,引起晶状体混浊<sup>[23]</sup>。

TTase 作为一种重要的氧化修复酶,参与修复硫酸化的蛋白质,对抗氧化应激,并维持晶状体还原状态。本实验中,我们发现在 AGEs 干预早期,TTase mRNA 含量和活性迅速增加,这可能是由于晶状体上皮细胞对抗糖基化作用适应性反应,通过增加 TTase 表达和增强活性,来保护晶状体蛋白质和代谢关键酶减轻氧化损伤,修复受损的蛋白质和酶,维持晶状体上皮细胞的氧化还原平衡。2d 后 TTase mRNA 含量降低,3d 后 TTase 活性下降,可能是由于氧化应激持续存在,细胞内抗氧化物消耗殆尽,TTase 的适应性反应已不足以对抗氧化应激,细胞难以维持氧化还原状态的平衡所致。Raghavachari 等<sup>[6]</sup>将 HLE B3 暴露于含 0.1mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的培养液中,5min 后检测出 TTase mRNA 含量的上升,10min 后 TTase mRNA 含量达到峰值,上调了约 80%,随着氧化物的清除,其含量逐渐下降至正常,与其表达上调类似,TTase 活性也于 10min 达到峰值,几乎增加了一倍,随后逐渐降至正常水平。这些变化是机体对早期氧化应激的一种反应性保护作用,而在本实验中,TTase 的表达与活性随 AGEs 刺激时间变化趋势与这些报道相似。我们推测,AGEs 可通过与其受体 RAGE 结合产生大量 ROS,ROS 引起的一系列氧化应激反应干预晶状体上皮细胞早期 TTase 表达迅速上调,活性增强,可能是细胞对抗氧化应激的一种自我保护机制,随着应激持续时间增加,当 TTase 的表达上调不足以对抗氧化损伤时,其活性也逐渐下降,细胞内的正常氧化还原状态平衡被打破,若刺激持续存在,细胞内大量蛋白相互交联形成二硫化物,发生聚集,最终导致晶状体混浊,形成白内障。

综上所述,AGEs 可诱导人晶状体细胞内 ROS 含量增多,发生氧化应激,致使 TTase 表达上调,活性增强,TTase 可能在糖尿病性白内障发病过程中起到保护作用,但其具体的作用机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Kaushal S, Singh H, Thangaraju P, et al. Canagliflozin: A Novel SGLT2 Inhibitor for Type 2 Diabetes Mellitus. *N Am J Med Sci* 2014;6(3):107-113
- 2 Dedov I, Maslova O, Suntsov Y, et al. Prevalence of diabetic retinopathy and cataract in adult patients with type 1 and type 2 diabetes in Russia. *Rev Diabet Stud* 2009;6(2):124-129
- 3 Hashim Z, Zarina S. Advanced glycation end products in diabetic and non-diabetic human subjects suffering from cataract. *Age (Dordr)* 2011;33(3):377-384
- 4 Jang DS, Lee YM, Jeong IH, et al. Constituents of the flowers of

- Platycodon grandiflorum with inhibitory activity on advanced glycation end products and rat lens aldose reductase *in vitro*. *Arch Pharm Res* 2010;33(6):875-880
- 5 Xing KY, Lou MF. Effect of age on the thioltransferase (glutaredoxin) and thioredoxin systems in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6598-6604
- 6 Raghavachari N, Lou MF. Evidence for the presence of thioltransferase in the lens. *Exp Eye Res* 1996;63(4):433-441
- 7 Wang GM, Wu F, Raghavachari N, et al. Thioltransferase is present in the lens epithelial cells as a highly oxidative stress-resistant enzyme. *Exp Eye Res* 1998;66(4):477-485
- 8 Swamy - Mruthinti S, Shaw SM, Zhao HR, et al. Evidence of a glycemic threshold for the development of cataracts in diabetic rats. *Curr Eye Res* 1999;18(6):423-429
- 9 Cekic O, Bardak Y. Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect. *Ophthalmic Res* 1998;30(2):107-112
- 10 Nagaraj RH, Linetsky M, Stitt AW. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino Acids* 2012;42(4):1205-1220
- 11 刘擎,杨焯,严宏. 高糖对人晶状体上皮细胞硫醇转移酶表达的影响. *眼科新进展* 2014;34(3):201-204
- 12 于罡,严宏. 硫醇转移酶对高糖诱导大鼠晶状体氧化应激的保护作用. *国际眼科杂志* 2014;14(11):1927-1930
- 13 Chen M, Curtis TM, Stitt AW. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Curr Med Chem* 2013;20(26):3234-3240
- 14 Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res* 2012;159(5):355-365
- 15 Bhattacharyya J, Shipova EV, Santhoshkumar P, et al. Effect of a single AGE modification on the structure and chaperone activity of human alphaB-crystallin. *Biochemistry* 2007;46(50):14682-14692
- 16 Kim J, Kim CS, Sohn E, et al. Lens epithelial cell apoptosis initiates diabetic cataractogenesis in the Zucker diabetic fatty rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248(6):811-818
- 17 Wihler C, Schafer S, Schmid K, et al. Renal accumulation and clearance of advanced glycation end-products in type 2 diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme and vasopeptidase inhibition. *Diabetologia* 2005;48(8):1645-1653
- 18 Zi Z, Klipp E. Constraint-based modeling and kinetic analysis of the Smad dependent TGF-beta signaling pathway. *PLoS One* 2007;2(9):e936
- 19 Peterziel H, Unsicker K, Kriegstein K. TGFbeta induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFRalpha1 to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2002;159(1):157-167
- 20 Delamere NA, Tamiya S. Expression, regulation and function of Na, K-ATPase in the lens. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(6):593-615
- 21 Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN, et al. Lipid peroxidation and cataracts: N-acetylcarnosine as a therapeutic tool to manage age-related cataracts in human and in canine eyes. *Drugs in R D* 2004;5(3):125-139
- 22 Kiss L, Szabo C. The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly (ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(Suppl 1):29-37
- 23 Ding Y, Kantarci A, Hasturk H, et al. Activation of RAGE induces elevated O<sub>2</sub>-generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol* 2007;81(2):520-527