

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00907

• 短篇论著 •

氯沙坦抑制高糖及间歇性高糖诱导 NRK-52E 细胞的转分化作用

Losartan inhibits high glucose and transdifferentiation of NRK-52E cells induced by fluctuating high glucose

梁华晟*, 钟宇华, 苏会璇

广西医科大学第九附属医院内分泌科, 北海 536000

[摘要] **目的** 探讨氯沙坦对高糖及间歇性高糖诱导大鼠肾小管导管上皮细胞株 NRK-52E 转分化的抑制作用。**方法** 实验分为空白组(0 mmol/L 葡萄糖)、正常葡萄糖组(5 mmol/L 葡萄糖)、高糖干预组(25 mmol/L 葡萄糖)、间歇性高糖干预组(5 mmol/L 葡萄糖/25 mmol/L 葡萄糖交替)、氯沙坦干预组(10 μ mol/L 氯沙坦)、氯沙坦高糖干预组(10 μ mol/L 氯沙坦预处理后再高糖培养)、氯沙坦间歇性高糖干预组(10 μ mol/L 氯沙坦预处理后再间歇性高糖培养), 根据分组对 NRK-52E 细胞施加相应因素作用 72 h 后, 蛋白免疫印迹法检测转分化标志物转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、I 型胶原、金属蛋白酶 2(MMP-2)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)以及甲状旁腺素相关肽(PTHrP)在细胞中的表达, CM2H2DCFDA 试剂盒检测细胞 ROS 含量。**结果** 高糖干预及间歇性高糖干预组 TGF- β 1、I 型胶原、MMP-2、 α -SMA 和 PTHrP 表达上调, ROS 含量明显上升, 间歇性高糖作用更显著。应用氯沙坦干预后可以部分下调高糖或间歇性高糖诱导的 TGF- β 1、I 型胶原、MMP-2、 α -SMA 以及 PTHrP 表达, 降低细胞 ROS 含量。**结论** 氯沙坦可抑制高糖及间歇性高糖诱导的 NRK-52E 细胞转分化作用。

[关键词] 氯沙坦; 间歇性高糖; 高糖; NRK-52E 细胞; 转分化

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0907-03

糖尿病血糖间歇波动对于糖尿病并发症的发生、发展起着重要的作用, 其危害性甚至高于血糖升高^[1-2]。肾小管上皮细胞转分化是糖尿病肾病纤维化的重要病理基础。高糖或间歇性高糖对肾小管导管上皮细胞是否存在转分化的作用, 二者间对于转分化作用效果如何, 血管紧张素 II 受体拮抗剂作为糖尿病肾病首选药物, 对在不同状态葡萄糖条件下的转分化作用又如何, 有待于深入研究。本实验观察了不同条件葡萄糖状态及氯沙坦干预下大鼠肾小管导管上皮细胞株 NRK-52E 中转分化主要指标转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、I 型胶原、金属蛋白酶 2(MMP-2)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和甲状旁腺素相关肽(PTHrP)表达以及活性氧(ROS)含量的变化, 以探讨氯沙坦对不同葡萄糖条件对肾小管导管上皮细胞转分化作用的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肾小管导管上皮细胞株 NRK-52E 购于中国科学院细胞库; DMEM 无糖基础培养基(美国 Gibco 公司), 基本配备为含 10% 胎牛血清(Sigma, USA), 青、链霉素各 100 U/ml, EDTA 1 mmol/L; 氯沙坦(Sigma 公司, 纯度 >99%); PTHrP 抗体、I 型胶原抗体均购于美国 Santa Cruz 公司, TGF- β 1 抗体、MMP-2 抗体购于英国 ABCam 公司, α -SMA 购于美国 Dako 公司。

1.2 实验分组与处理 细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 每周传代 2~3 次。先用基础培养基培养至对数生长期。根据实验分为 7 组。(1)空白对照组: 无糖培养基培养 72 h。(2)正常葡萄糖组: 含 5 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基培养 72 h。(3)高糖组: 含 25 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基培养 72 h。(4)间歇性高糖组: 分别应用含 5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 2 h 及 25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 3 h 交替干预, 每天重复 3 次, 夜间维持在 5 mmol/L 葡萄糖过夜, 培养 72 h。(5)氯沙坦干预组: 应用含 10 μ mol/L 氯沙坦的无糖培养基预处理 72 h 后, 无糖培养基培养 72 h。(6)氯沙坦高糖干预组: 经应用 10 μ mol/L 氯沙坦培养基预处理 72 h 后, 再用含 25 mmol/L 的 DMEM 培养基培养 72 h。(7)氯沙坦间歇性高糖干预组: 经应用含 10 μ mol/L 氯沙坦的基础培养基预处理 72 h 后, 改用含 5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 2 h 及 25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 3 h 交替干预, 每天重复 3 次, 夜间维持在 5 mmol/L 葡萄糖过夜, 培养 72 h。

1.3 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达 应用裂解液进行细胞裂解并提取蛋白, 进行 SDS-PAGE, 完毕后将蛋白质电转印到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后与 PTHrP 抗体、TGF- β 1 抗体、MMP-2 抗体、I 型胶原抗体、 α -SMA 抗体分别按 1:100、1:125、1:75、1:75、1:50 的比例孵育(前

[收稿日期] 2009-10-30 **[接受日期]** 2010-06-07

[基金项目] 广西科技厅自然科学基金(桂科自 0991294), 广西北海市科学计划项目(北科合字 200901059). Supported by Natural Science Foundation of Guangxi Science and Technology Commission (0991294) and the Science Foundation of Beihai City, Guangxi (200901059).

[作者简介] 梁华晟, 博士, 主治医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0779-2022170, E-mail: flowchaos@yahoo.com.cn

三者室温 90 min, 后者 4℃ 过夜), TBST 洗膜 5 min×3 次, 将膜与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:1 000)室温孵育 45 min 后, TBST 洗膜 5 min×3 次, ECL 显色试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)显示目的条带。采用 Gel. Doc-It imaging system 扫描分析仪扫描凝胶图谱, Total Lab 分析软件对条带进行密度扫描分析。

1.4 ROS 检测 各组细胞加入 10 μl 的 1 mmol/L CM2H2DCFDA(美国 Invitrogen 公司, 终浓度为 10 μmol/L) 染色液, 37℃ 避光孵育 30 min, 离心, PBS 洗 2 次, 重悬于 1 ml 含 10% FCS 的 DMEM 培养液中。用 BioTek 公司全自动定量绘图酶标仪进行检测, 激发波长 485 nm, 发射波长 528 nm, 以 D 值表示 ROS 含量。

1.5 统计学处理 所有实验均重复 3 次以上, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, One-Way ANOVA-SNK 法比较总体和组间差异。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同葡萄糖状态及氯沙坦干预对转分化标志物表达的影响 蛋白免疫印迹结果(图 1)显示, 与空白组及正常葡萄糖组相比, 高糖及间歇性高糖均能显著上调 TGF-β1、I 型胶原、MMP-2、α-SMA 和 PTHrP 表达($P < 0.01$), 而间歇性高糖组 TGF-β1、MMP-2 及 α-SMA 表达高于高糖组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。应用氯沙坦预处理后, 高糖或间歇性高糖诱导的 TGF-β1、I 型胶原、MMP-2、α-SMA 和 PTHrP 表达均明显下调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

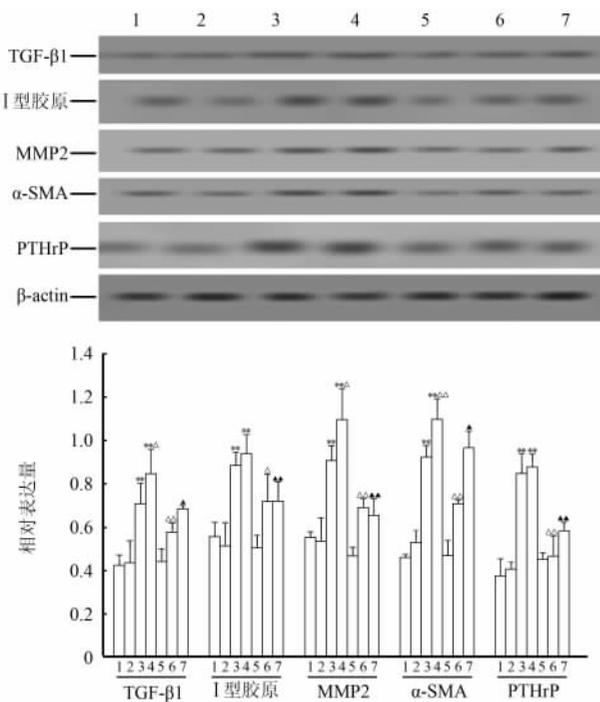


图 1 蛋白免疫印迹检测 NRK-52E 细胞中 TGF-β1、I 型胶原、MMP-2、α-SMA 和 PTHrP 表达

1: 空白对照组; 2: 正常葡萄糖组; 3: 高糖组; 4: 间歇性高糖组; 5: 氯沙坦干预组; 6: 氯沙坦高糖干预组; 7: 氯沙坦间歇性高糖干预组。* $P < 0.01$ 与空白组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 与高糖组比较; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 与间歇性高糖组比较

2.2 不同葡萄糖状态及氯沙坦干预对 ROS 含量的影响 结果(图 2)提示高糖及间歇性高糖均能明显升高 ROS 含量($P < 0.01$), 而间歇性高糖升高 ROS 作用明显高于高糖组($P < 0.01$); 氯沙坦预处理后, 间歇性高糖及高糖诱导的 ROS 水平均明显下降($P < 0.01$)。

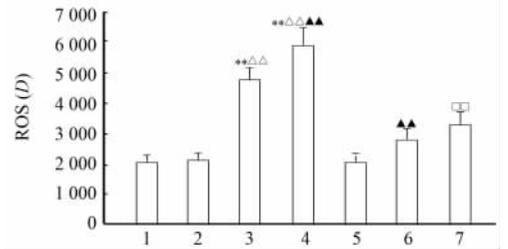


图 2 各组细胞 ROS 含量检测

1: 空白对照组; 2: 正常葡萄糖组; 3: 高糖组; 4: 间歇性高糖组; 5: 氯沙坦干预组; 6: 氯沙坦高糖干预组; 7: 氯沙坦间歇性高糖干预组。* $P < 0.01$ 与空白组比较; $\Delta\Delta P < 0.01$ 与正常葡萄糖组比较; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 与高糖组比较; $\square P < 0.01$ 与间歇性高糖组比较

3 讨论

细胞转分化作为普遍存在的一种细胞分化过程, 参与糖尿病许多慢性并发症的病程[3]。既往研究已经明确肾小管上皮细胞转分化含 α-SMA 细胞是糖尿病肾病纤维化主要病理基础, 是糖尿病肾病功能衰竭重要原因之一[4]。本研究中 TGF-β1、I 型胶原、MMP-2、α-SMA 及 PTHrP 在不同葡萄糖状态下表达水平的变化, 提示无论是高糖或间歇性高糖均可明显促进转分化作用, 而间歇性高糖较高糖可能更容易通过促进 TGF-β1、MMP-2 及 α-SMA 表达从而诱导肾小管导管上皮细胞转分化, 加重糖尿病肾病进程。而经过氯沙坦干预处理后, 无论是高糖或间歇性高糖培养的 NRK-52E 细胞中 TGF-β1、I 型胶原、MMP-2、α-SMA 以及 PTHrP 表达均有不同程度的下调, 说明氯沙坦可能具有抑制 NRK-52E 细胞转分化作用。

为进一步阐明高糖及间歇性高糖对于肾小管导管上皮细胞转分化作用的影响, 本研究还观察了在不同葡萄糖条件及氯沙坦干预下的 NRK-52E 细胞株 ROS 含量, 结果发现, 无论是高糖或间歇性高糖培养的 NRK-52E 细胞 ROS 含量均明显升高, 而间歇性高糖较高糖更能促进 NRK-52E 细胞株的 ROS 水平升高。Quagliari 等[5]研究也提示间歇性高糖能通过促进 ROS 积聚, 诱导各种炎症因子包括 MMP 等表达, 而该系列炎症因子已经被证实参与诱导肾小管导管上皮转分化的进程, 故此有理由相信由于间歇性高糖较高糖转分化更严重, 诱导肾小管导管上皮细胞凋亡相应也更加严重。应用氯沙坦干预后能明显降低高糖和间歇性高糖培养的细胞中 ROS 含量, 提示氯沙坦可能通过抗氧化作用使 NRK-52E 细胞免于转分化。

[参考文献]

[1] Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose

- levels and protective role of thiamine[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, 25:566-576.
- [2] Risso A, Mercuri F, Quagliari L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281:E924-E930.
- [3] Sanchez A P, Sharma K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2009, 11:e13.
- [4] Simonson M S. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2007, 71:846-854.
- [5] Quagliari L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 183:259-267.

[本文编辑] 孙 岩