

α-硫辛酸抑制高糖诱导的系膜细胞增殖及细胞间黏附分子 1 的表达

李 慧¹, 邹大进¹, 季军捷², 彭 玲², 张乐之³

(1. 第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433; 2. 第二军医大学国际合作肿瘤研究所; 3. 第二军医大学长海医院实验诊断科)

[摘要] **目的:**探讨 α-硫辛酸对高糖诱导的大鼠系膜细胞增殖及细胞间黏附分子 1(ICAM-1)表达的影响。**方法:**体外条件下采用正常糖浓度(5.6 mmol/L, NG)、高糖浓度(25 mmol/L, HG)及 HG+不同浓度 α-硫辛酸(50、100、200、300 μmol/L)分别与大鼠系膜细胞共同培养不同时间(12、24、48 h)。MTT 法测定系膜细胞增殖; RT-PCR 法检测细胞 ICAM-1 mRNA 的表达; ELISA 法测定细胞培养上清 ICAM-1 蛋白的浓度。**结果:**50~300 μmol/L 的 α-硫辛酸可抑制系膜细胞增殖。高糖刺激 24 h 时, 200 μmol/L 的 α-硫辛酸干预组 ICAM-1 的蛋白浓度[(288.4±23.4) ng/ml]明显低于 HG 组[(542.3±35.6) ng/ml, $P < 0.01$]。100 μmol/L 及 200 μmol/L 的 α-硫辛酸均可下调高糖诱导的 ICAM-1 mRNA 的表达。**结论:**一定浓度的 α-硫辛酸可抑制高糖诱导的系膜细胞增殖, 并可降低 ICAM-1 蛋白和 mRNA 的表达。

[关键词] α-硫辛酸; 细胞间黏附分子 1; 系膜细胞; 细胞增殖; 高糖

[中图分类号] R 587.2; R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0276-04

Inhibitory effects of α-lipoic acid on cell proliferation and ICAM-1 expression induced by high glucose in rat mesangial cells

LI Hui¹, ZOU Da-jin¹, JI Jun-jie², PENG Ling², ZHANG Le-zhi³ (1. Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. International Joint Cancer Institute, Second Military Medical University; 3. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of α-lipoic acid on cell proliferation and expression of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) induced by high glucose (HG) in rat mesangial cells (MCs). **Methods:** Rat mesangial cells were co-cultured with normal glucose (5.6 mmol/L, NG group), high glucose (25 mmol/L, HG group), and HG+α-lipoic acid(50, 100, 200, 300 μmol/L) for 12, 24 and 48 h, respectively. Cell proliferation was assessed by MTT; the levels of ICAM-1 in the supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and ICAM-1 mRNA expression was measured by semi-quantitative RT-PCR. **Results:** α-lipoic acid at 50-300 μmol/L inhibited the proliferation of MCs. Semi-quantitative RT-PCR showed that α-lipoic acid(100 and 200 μmol/L) significantly inhibited the high glucose-induced increase of ICAM-1 mRNA ($P < 0.01$). In addition, HG-induced up-regulation of ICAM-1 protein was remarkably reduced by 200 μmol/L α-lipoic acid [(288.4±23.4) ng/ml] compared with HG group [(542.3±35.6) ng/ml, $P < 0.01$]. **Conclusion:** Certain concentrations of α-lipoic acid can inhibit high glucose-induced proliferation of MCs and decrease the expression of ICAM-1 protein and mRNA.

[KEY WORDS] α-lipoic acid; intercellular adhesion molecule-1; mesangial cells; cell proliferation; high glucose

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3):276-279]

糖尿病肾病早期表现为肾小球系膜细胞增生, 系膜区和小管间质细胞外基质积聚。其中过度分泌的细胞黏附分子可造成内皮细胞损伤, 使血管通透性增强, 形成蛋白尿。近年来有学者发现万能抗氧化剂 α-硫辛酸有抗氧化应激、保护内皮细胞、减少尿蛋白排出的作用^[1]。但有关 α-硫辛酸对肾小球系膜细胞作用的体外研究却少见报道。本研究旨在探讨 α-硫辛酸对高糖诱导的大鼠系膜细胞增殖及细胞黏附分子 1(ICAM-1)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 α-硫辛酸(LA)纯品由上海现代浦东药厂有限公司提供, 溶剂为二甲基亚砷(DMSO), DM-

SO 在细胞培养液中的终浓度为 0.1%(V/V)。大鼠系膜细胞株由第二军医大学长征医院肾内科梅长林教授惠赠。DMEM 培养基及 TRIzol 试剂购自美国 Gibco BRL 公司; MTT 试剂购自 Sigma 公司; ICAM-1 试剂盒(ELISA)购自美国 TPI 公司。PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.2 细胞培养 大鼠系膜细胞常规培养于含 10% 胎牛血清和抗生素的 DMEM 培养液中。覆盖瓶壁面积达 70%~80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化 2~3 min, 制成细胞悬液, 分瓶继续培养, 每周传代 1~2

[作者简介] 李 慧, 博士, 讲师、主治医师。

E-mail: cate2046@yahoo.com.cn

次。

1.3 MTT 法测定细胞增殖 系膜细胞按每孔约 3×10^4 个接种于 96 孔培养板中。按下列分组进行处理:对照组(NG)为正常糖浓度(5.6 mmol/L) DMEM 培养液,实验组(HG、LA₅₀、LA₁₀₀、LA₂₀₀、LA₃₀₀)为分别含 α -硫辛酸 0、50、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的高糖浓度(25 mmol/L) DMEM 培养液(根据预实验确定的刺激浓度, $>300 \mu\text{mol/L}$ 剂量后,细胞成活率 $<95\%$),分别培养 12、24、48 h,终止前 4 h 在每个孔内加入 20 μl 的 MTT 溶液(5 mg/ml), 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h。弃上清,加入 DMSO 150 μl ,振荡至结晶溶解,应用 Spectrafluor Plus 光度计(TECAN 公司)在 490 nm 波长处测定光密度(D_{490})值。每组设 6 个平行孔,设空白对照用于调零。结果重复 3 次。采用锥虫蓝排除法检测细胞毒性。取 3 个复孔滴加锥虫蓝染液,15 min 计数总细胞数及被锥虫蓝染成蓝色的细胞数。按下式计算细胞成活率:细胞成活率 = (细胞总数 - 蓝染细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.4 RT-PCR 检测系膜细胞 ICAM-1 mRNA 的表达 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后,以 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 50 ml 培养瓶,对照组(NG)为正常糖 DMEM 培养液,实验组(HG、LA₁₀₀、LA₂₀₀)为分别含 α -硫辛酸 0、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的高糖 DMEM 培养液。每组均设 3 个样本。作用 24 h 后按 TRIzol 试剂说明书方法提取细胞总 RNA。RNA 的含量和纯度在紫外分光光度计中检测。所有标本 D_{260}/D_{280} 比值在 1.8~2.0, RNA 完整性的检测在琼脂糖变性凝胶电泳上进行,经 Agilent bioanalyzer 分析,所有标本 28 S 与 18 S 之比大于 2.0。取 2 μl 总 RNA 加入随机引物及 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)进行反转录。加入 LoTempTM 低温全息反应液(孟德尔公司)进行 PCR 反应。反应条件为:85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后,进入 85 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 的热循环,循环 35 次后,终末延伸

10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下拍照,应用 Kodak1D 型凝胶成像分析系统对各扩增条带进行光密度扫描。以目的 ICAM-1/GAPDH 条带光密度比值计算 ICAM-1 mRNA 的相对表达量。引物设计参照参考文献[2]。引物序列和扩增片段如下:ICAM-1,上游引物 5'-AGG TAT CCA TCC ATC CCA CA-3',下游引物 5'-GCC ACA GTT CTC AAA GCA CA-3',扩增片段为 210 bp; GAPDH,上游引物 5'-GAA GGG TGG GGC CAA AAG-3',下游引物 5'-GGA TGC AGG GAT GTT CT-3',目的片段为 284 bp。

1.5 ELISA 法检测细胞培养上清液 ICAM-1 的含量 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后,以 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 分别接种于 24 孔培养板中。对照组(NG)为正常糖 DMEM 培养液,实验组(HG、LA₁₀₀、LA₂₀₀)为分别含 α -硫辛酸 0、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的高糖 DMEM 培养液,分别培养 24 h 后收集上清液,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。ELISA 检测按试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件对实验数据进行统计学处理,采用单因素方差分析进行组间比较,两组结果的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 α -硫辛酸对高糖刺激的系膜细胞增殖的影响 在高糖培养的 48 h 以内,高糖可促进系膜细胞的增殖(与对照组相比 $P < 0.05$)。作用早期(12 h) α -硫辛酸对细胞生长的抑制作用不显著;随作用时间的延长(24 及 48 h),各浓度组的抑制作用明显增强。对于同一浓度的 α -硫辛酸而言,随着作用时间的延长抑制能力升高;对于同一时间而言(24 及 48 h),随 α -硫辛酸浓度的升高,抑制作用加强。 α -硫辛酸对细胞生长的抑制作用具有时间、剂量依赖效应,见表 1。

表 1 不同浓度、时间的 α -硫辛酸作用于大鼠系膜细胞的 D_{490} 值

Tab 1 D_{490} value of mesangial cells incubated with different concentrations of α -lipoic acid for different hours

Group	12 h	24 h	48 h
NG	1.65 \pm 0.05	1.78 \pm 0.06	1.79 \pm 0.04 Δ
HG	1.86 \pm 0.06**	2.07 \pm 0.08** Δ	2.01 \pm 0.11*
LA ₅₀	1.89 \pm 0.05	1.85 \pm 0.06 \blacktriangle	1.44 \pm 0.28 \blacktriangle
LA ₁₀₀	1.89 \pm 0.02	1.74 \pm 0.07 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.86 \pm 0.17 $\blacktriangle\blacktriangle\Delta\Delta$
LA ₂₀₀	1.81 \pm 0.08	1.65 \pm 0.06 $\blacktriangle\blacktriangle\Delta$	0.59 \pm 0.05 $\blacktriangle\blacktriangle\Delta\Delta$
LA ₃₀₀	1.62 \pm 0.18	1.21 \pm 0.14 $\blacktriangle\blacktriangle\Delta\Delta$	0.32 \pm 0.14 $\blacktriangle\blacktriangle\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NG group; \blacktriangle $P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P < 0.01$ vs HG group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs 12 h

锥虫蓝排除法表明,50~300 μmol/L 剂量处理组细胞存活率均达 95% 以上,说明 α-硫辛酸在此浓度范围内对细胞无明显毒性。

2.2 α-硫辛酸对高糖刺激的系膜细胞 ICAM-1 蛋白分泌的影响 高糖刺激 24 h 时, HG 组上清液中 ICAM-1 的浓度 [(542.3 ± 35.6) ng/ml] 较 NG 组 [(173.6 ± 35.6) ng/ml] 明显升高 (P < 0.01); LA₂₀₀ 组 ICAM-1 的浓度 [(288.4 ± 23.4) ng/ml] 明显低于 HG 组 (P < 0.01)。LA₁₀₀ 组 [(1376.5 ± 40.1) ng/ml] 与 HG 组相比差别无显著性。

2.3 α-硫辛酸对 ICAM-1 mRNA 表达的影响 经半定量 RT-PCR 检测发现,正常糖培养的系膜细胞可低水平表达 ICAM-1 mRNA。高糖作用 24 h 后, ICAM-1 mRNA 表达明显增强 [(4.05 ± 0.18) vs (1.24 ± 0.12), P < 0.01]。100 μmol/L 及 200 μmol/L 的 α-硫辛酸均可下调高糖诱导的 ICAM-1 mRNA 的表达 (P < 0.01)。见图 1。

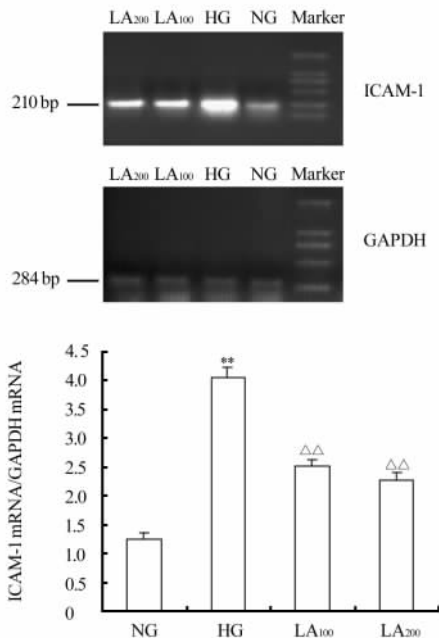


图 1 半定量 RT-PCR 检测 α-硫辛酸对系膜细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of α-lipoic acid on ICAM-1 mRNA expression in MCs by semi-quantitative RT-PCR
* * P < 0.01 vs NG group; △△ P < 0.01 vs HG group

3 讨论

Park 等^[2]报道高糖通过 PKC-NF-κB 通路激活 NF-κB,刺激肾小球系膜细胞增殖,并促进 ICAM-1 mRNA 和蛋白的表达。我们用高糖刺激系膜细胞 48 h,实验结果与其基本一致。Cosio 等^[3]认为体外高糖环境对系膜细胞的生长具有双重作用。在培养

的 24~48 h 内可刺激细胞增殖,培养 72~96 h 则抑制细胞增殖,促使细胞发生肥大,这种现象的产生可能与细胞内葡萄糖代谢增加而细胞外渗透压未增加有关。48 h 之后细胞的生长状态本研究未做观察,故在本实验的时间范围内,基本可排除高糖对细胞增殖所造成的抑制作用。Milos 等^[4]发现 100 μmol/L 的 α-硫辛酸可抑制 PDGF 刺激的系膜细胞增殖。本实验结果显示,一定浓度的 α-硫辛酸(50~300 μmol/L)对高糖刺激的系膜细胞增殖的抑制作用具有时间、剂量依赖效应。低于 300 μmol/L 的 α-硫辛酸对系膜细胞无明显毒性。

α-硫辛酸作为一种高效抗氧化剂被广泛用于多种与氧化应激有关疾病的辅助治疗。近年来,其在改善糖尿病血管并发症方面的作用倍受关注。Morcos 小组的系列研究^[1,5]发现,有微量白蛋白尿的糖尿病患者服用 α-硫辛酸(600 mg/d)18 个月后,与对照组相比尿白蛋白浓度未继续升高。糖尿病肾病患者外周血单核细胞 NF-κB 的活性明显升高,服用 α-硫辛酸 3 d 后 NF-κB 的活性下降 38%,反映氧化应激的 Enaldehyde 浓度下降 48%。表明 α-硫辛酸具有抗氧化应激,降低 NF-κB 的活性,减少尿白蛋白排出的作用。在主动脉内皮细胞^[6]及人单核细胞^[7]中研究发现 α-硫辛酸可抑制 TNF-α 诱导的 ICAM-1 mRNA 的表达并可降低 NF-κB 的活性。对系膜细胞的研究尚未见报道。我们的实验结果显示,100 及 200 μmol/L 的 α-硫辛酸可抑制高糖刺激的系膜细胞 ICAM-1 mRNA 的表达。但在蛋白水平检测时只发现 200 μmol/L 的 α-硫辛酸对 ICAM-1 的抑制作用,可能与检测方法的敏感性有关。α-硫辛酸在治疗早期糖尿病肾损害中具有一定的辅助作用,其作用机制尚需更多的实验研究加以证实。

[参考文献]

- [1] Morcos M, Borcea V, Isermann B, et al. Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus; an exploratory study [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2001, 52: 175-183.
- [2] Park CW, Kim JH, Lee JW, et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-κB-dependent [J]. Diabetologia, 2000, 43: 1544-1553.
- [3] Cosio FG. Effects of high glucose concentrations on human mesangial cell proliferation [J]. J Am Soc Nephrol, 1995, 5: 1600-1609.
- [4] Milos NB, LeAnn H, Kelli B, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285: F1138-

F1148.

- [5] Hofmann MA, Schiekofers S, Isermann B, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B[J]. *Diabetologia*, 1999, 42: 222-232.
- [6] Zhang WJ, Baiz F. α -Lipoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B

activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2001, 15: 2423-2432.

- [7] Lee HA, Hughes DA. Alpha-lipoic acid modulates NF-kappa B activity in human monocytic cells by direct interaction with DNA[J]. *Exp Gerontol*, 2002, 37: 401-410.

[收稿日期] 2005-09-06

[修回日期] 2005-12-21

[本文编辑] 曹 静