

· 专题报道 ·

过氧化物酶体增植物激活受体 γ 对 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的肾脏内髓集合管上皮细胞损伤的保护作用

林沁¹, 顾勇², 林善钺²

(1. 南京军区福州总医院肾内科, 福州 350025; 2. 复旦大学附属华山医院肾内科, 上海 200040)

[摘要] **目的:**观察过氧化物酶体增植物激活受体(PPAR) γ 高表达对小鼠肾脏内髓集合管上皮细胞(IMCD)炎性刺激的反应。**方法:**实验分为4组:IMCD空白对照组,IMCD+ $\text{TNF}\alpha$ 刺激组,转染PPAR γ 野生型质粒的转染空白组(PPAR γ -IMCD组)和PPAR γ -IMCD+ $\text{TNF}\alpha$ 刺激组。 $\text{TNF}\alpha$ 刺激:采用 $\text{TNF}\alpha$ 50 ng/ml作用24 h;质粒转染:将小鼠野生型PPAR γ_1 质粒转染于IMCD细胞使PPAR γ 高表达。ELISA方法检测细胞上清液MCP-1、 $\text{TGF}\beta_1$ 分泌量。**结果:**转染PPAR γ 野生型质粒的IMCD细胞PPAR γ mRNA和蛋白高表达。IMCD空白对照组和PPAR γ -IMCD转染空白组相比,细胞上清液MCP-1和 $\text{TGF}\beta_1$ 含量无显著性差异;IMCD+ $\text{TNF}\alpha$ 刺激组培养上清液中MCP-1和 $\text{TGF}\beta_1$ 表达明显增加(与IMCD空白对照组相比, $P<0.005$),PPAR γ -IMCD+ $\text{TNF}\alpha$ 刺激组培养上清液中MCP-1和 $\text{TGF}\beta_1$ 的分泌与IMCD+ $\text{TNF}\alpha$ 刺激组相比显著减少($P<0.05$ 和 $P<0.005$)。**结论:**IMCD细胞转染PPAR γ 野生型质粒使得PPAR γ 高表达后具有抗炎和抗纤维化作用。

[关键词] 过氧化物酶体增植物激活受体 γ ;肿瘤坏死因子 α ;肾小管上皮细胞

[中图分类号] R 692.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0599-04

Protective effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ on $\text{TNF}\alpha$ -induced injury of inner medullary collecting duct cells

LIN Qin¹, GU Yong², LIN Shan-yan² (1. Department of Nephrology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Nephrology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the protective effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) on $\text{TNF}\alpha$ -induced injury of the inner medullary collecting duct (IMCD) cells. **Methods:** Cultured IMCD cells were randomly divided into blank control, $\text{TNF}\alpha$ stimulation, PPAR γ transfection (pPPAR γ -control) and PPAR γ transfection + $\text{TNF}\alpha$ stimulation groups. Stimulation was induced with 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ for 24 h and mouse wild-type PPAR γ plasmid was used to transfect IMCD cells. Cell supernatant MCP-1 or $\text{TGF}\beta_1$ was detected by ELISA method. **Results:** IMCD cells transfected with wild-type PPAR γ plasmid had high expression of PPAR γ mRNA and protein. The contents of MCP-1 and $\text{TGF}\beta_1$ in the supernatant were similar in blank control group and pPPAR γ -control group. Compared with blank control group, $\text{TNF}\alpha$ stimulation group had decreased contents of MCP-1 and $\text{TGF}\beta_1$ in the supernatant ($P<0.005$), but the contents of $\text{TNF}\alpha$ stimulation group were significantly higher than those of PPAR γ transfection + $\text{TNF}\alpha$ stimulation group ($P<0.05$ and $P<0.005$, respectively). **Conclusion:** IMCD cells over-expressing PPAR γ have anti-inflammatory and anti-fibrosis effects.

[KEY WORDS] peroxisome proliferator-activated receptor γ ; tumor necrosis factor- α ; inner medullary collecting duct cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 599-602]

过氧化物酶体增植物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)属于细胞核受体超家族成员^[1],是一类由配体激活的核转录因子,目前已鉴定出3种PPAR亚型:PPAR α 、PPAR β (亦称PPAR δ 、NUC-1或FAAR)、PPAR γ 。其中PPAR γ 主要表达于脂肪细胞,在其他细胞上也有所表达,在肾脏主要表达于内髓集合管上皮细胞(inner medullary collecting duct, IMCD)和间质细胞、肾小球系膜细胞等^[2]。

PPAR γ 在正常肾脏主要表达于髓质集合管和间质细胞,推测其功能可能与调节水盐平衡、维持血容量有关^[2]。许多研究已证实,在损伤刺激下,肾组

织PPAR γ 的表达升高,并可使其表达位置发生改变,在受损细胞上表达增强^[3~5]。该现象被认为是病理生理条件下机体保护性的代偿反应,使之易于被其配体活化,对抗组织细胞损伤等炎症及氧化应激反应以及继发的间质成纤维细胞增殖。生理情况

[基金项目] 国家自然科学基金(300200125);霍英东基金(81038);上海市卫生局科委基金(03JC14084)。Supported by National Natural Science Foundation of China (300200125), Huoyingdong Foundation (81038) and Foundation of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(03JC14084)。

[作者简介] 林沁,博士,副主任医师。E-mail: lqin69@hotmail.com

下,PPAR γ 在IMCD上有一定量的表达,在小管间质性疾病中,IMCD易受损伤,表现为集合管上皮细胞失去分化的表型特征,重新进入细胞周期,或者凋亡,或者去分化产生子细胞并大量分泌细胞外基质。同时损伤的IMCD又可分泌炎症趋化因子加剧肾小管间质炎症反应,还可分泌致纤维化的生长因子促使间质纤维化发生,直接参与了慢性肾间质纤维化的发病进程^[6]。

本实验采用基因转染技术,将PPAR γ_1 野生型质粒转染小鼠IMCD,观察PPAR γ_1 高表达对肾小管上皮细胞是否具有直接抗炎症或抗纤维化作用。

1 材料和方法

1.1 材料 TNF α (Sigma公司),脂质体 Lipofectin2000(Invitrogen公司),大鼠抗小鼠PPAR γ 单克隆抗体(Santa Cruz公司),细胞胞质、胞核蛋白抽提试剂盒(美国Activemotif公司),MCP-1、TGF β_1 ELISA免疫试剂盒(美国Biosource公司),质粒中等量抽提试剂盒(上海普飞公司)。mIMCD-3细胞株(小鼠肾脏内髓集合管上皮细胞)及PPAR γ 野生型质粒pIRES2-EGFP-PPAR γ_1 /WT由美国田纳西州Vanderbilt大学郝传明教授提供。

1.2 细胞培养条件 6孔培养板,接种密度 4×10^5 /孔,含10%热灭活血清的DMEM培养液培养,待细胞生长至90%左右融合时,用无血清培养液培养12h后分组进行实验。

1.3 实验分组 IMCD空白对照组、IMCD+TNF α 刺激组、转染PPAR γ 野生型质粒的pIRES2-EGFP-PPAR γ_1 /WT-IMCD对照组(PPAR γ -IMCD组)和pIRES2-EGFP-PPAR γ_1 /WT-IMCD+TNF α 刺激组(PPAR γ -IMCD+TNF α 组)。TNF α 刺激:TNF α 50 ng/ml,作用24h。质粒转染:(1)取2 μ g质粒DNA溶于250 μ l Opti-MEM I无血清培养液中,轻柔混匀。(2)6 μ l Lipofectin 2000,溶于244 μ l Opti-MEM I无血清培养液中,轻柔混匀,室温下放置5 min。(3)混合上述两种液体,轻柔混匀,室温下孵育20 min。(4)生长成片的细胞每孔加入上述混合液500 μ l,另加入Opti-MEM I 500 μ l,轻轻前后晃动6孔板,混匀,37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 孵箱中培养24h后用于实验。未转染对照组细胞实验前24h更换Opti-MEM I培养。上述各组分别无血清培养24h成模,留取上清液进行蛋白定量及上清液ELISA检测用,细胞分别提取蛋白和mRNA置于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用,进行RT-PCR和Western印迹法检测。细胞标

本重复例数为4。

1.4 RNA提取和RT-PCR 按TRIzol试剂盒(德国Boehringer公司)提供的方法提取细胞总RNA,按逆转录试剂盒(美国Promega公司)说明进行PCR反应。引物由上海生工试剂公司合成。小鼠GAPDH引物:正链5'-gca gtg gca aag tgg aga tt-3',负链5'-gtc ttc tgg gtg gca gtg at-3',特异扩增片段为490 bp;反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,27个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。小鼠PPAR γ 引物:正链5'-acc act cgc att cct ttg ac 3',负链5'-taa ctc acg gct cag aca cc-3',特异扩增片段为265 bp;反应条件:预变性95 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,53 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,36个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离。应用凝胶成像系统分析成像,以目的PPAR γ 片段/GAPDH片段的条带光密度比值进行比较。

1.5 Western印迹法检测蛋白 依照细胞胞质、胞核蛋白提取试剂盒的说明操作,按蛋白定量试剂盒(考马斯亮蓝法,南京建成生物公司)说明测定蛋白质浓度,-70 $^{\circ}$ C冷冻保存。取20 μ g细胞胞核蛋白经10%的SDS-PAGE凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,用7%的脱脂奶粉-PBST溶液室温封闭1h,洗膜后加入7%脱脂奶粉-PBST溶液配制的大鼠抗小鼠PPAR γ 单克隆抗体(1:500)(Santa Cruz公司)4 $^{\circ}$ C过夜,再用HRP标记的山羊抗大鼠IgG(1:1000,普飞公司)进行杂交,最后加入免疫印迹化学发光试剂(普飞公司)进行显影。杂交结果在Bio-Rad凝胶成像分析系统中进行光密度分析,强度以光密度与面积的乘积($D \times \text{mm}^2$)来表示。

1.6 IMCD细胞上清液MCP-1、TGF β_1 ELISA测定 IMCD细胞测定蛋白浓度后,用MCP-1或TGF β_1 ELISA试剂盒提供的方法进行测定,450 nm波长ELISA计数。计算每毫克细胞蛋白中MCP-1或TGF β_1 的含量(以细胞数校正),结果以pg/mg protein表示。

1.7 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 10.0软件进行统计学分析,采用单因素方差分析及SNK检验比较各组间差异。

2 结果

2.1 IMCD细胞转染pIRES2-EGFP-PPAR γ_1 野生型质粒后PPAR γ 表达 PPAR γ -IMCD转染组细胞表达绿色荧光蛋白,以细胞核为著(图1),经Western印迹法检测(图2),其蛋白表达量较IMCD对照组明显增高(44.433 ± 10.564 vs $193.666 \pm$

17.047 7, $P = 0.000$)。与 IMCD 对照组相比, PPAR γ -IMCD 转染组细胞 PPAR γ mRNA 表达明显增高($0.362 8 \pm 0.178 8$ vs $0.899 3 \pm 0.546 7$, $P < 0.05$)。

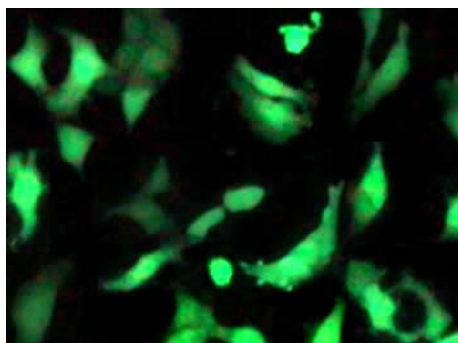


图1 转染野生型 PPAR γ 质粒的 IMCD 细胞表达绿色荧光蛋白

Fig 1 IMCD cell transfected with wild-type pIRES2-EGFP-PPAR γ_1 plasmid expressing green fluorescent protein

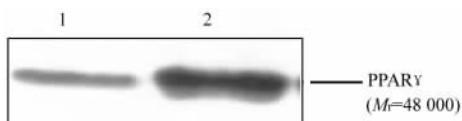


图2 Western 印迹法检测 PPAR γ 蛋白表达情况
Fig 2 Western blotting results of PPAR γ protein expression

1:IMCD control group;2:IMCD cells transfected with PPAR γ

2.2 PPAR γ 高表达对 $\text{TNF}\alpha$ 刺激的 IMCD 细胞上清液 MCP-1 和 TGF β_1 的影响 IMCD 对照组和 PPAR γ -IMCD 组 MCP-1 表达接近,均非常少。加入 $\text{TNF}\alpha$ 刺激后,细胞上清液 MCP-1 和 TGF β_1 的含量明显增高($P < 0.005$),且 PPAR γ -IMCD + $\text{TNF}\alpha$ 组 MCP-1 和 TGF β_1 的表达水平明显低于 IMCD + $\text{TNF}\alpha$ 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.005$,表 1),说明 PPAR γ 转染能够显著下调 $\text{TNF}\alpha$ 刺激下 MCP-1 和 TGF β_1 的表达。

3 讨论

$\text{TNF}\alpha$ 在肾小管间质炎症和纤维化发展进程中具有始动作用。它能刺激肾小管上皮细胞分泌 MCP-1,并进一步起到炎症趋化作用^[7]。因而肾小管上皮细胞不仅是损伤的对象,而且是损伤的参与者。

我们在预试验中观察了不同剂量 $\text{TNF}\alpha$ 刺激对 IMCD 增殖活力和 MCP-1 的影响,发现 $\text{TNF}\alpha$ 50

ng/ml 刺激 24 h 使细胞 MCP-1 的分泌处于上升表达处,具有显著的细胞炎性损伤作用,同时能保证细胞一定的存活率(细胞活力为 83.3%)。因而,实验选用 $\text{TNF}\alpha$ 50 ng/ml 作用 24 h 作为刺激条件。

表 1 IMCD 细胞上清液 MCP-1 和 TGF β_1 含量

Tab 1 MCP-1 and TGF β_1 contents in supernatants of IMCD cell culture

($n = 4, \bar{x} \pm s, \text{pg/mg protein}$)

Group	MCP-1	TGF β_1
IMCD control	1 358.96 \pm 335.58	388.85 \pm 153.71
IMCD+ $\text{TNF}\alpha$	14 912.26 \pm 2 392.81 **	1 263.96 \pm 118.52 **
PPAR γ -IMCD	1 363.78 \pm 190.76	287.51 \pm 188.22
PPAR γ -IMCD+ $\text{TNF}\alpha$	6 026.20 \pm 842.59 Δ ▲	799.27 \pm 49.44 Δ ▲▲

** $P < 0.005$ vs IMCD control; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.005$ vs PPAR γ -IMCD group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.005$ vs IMCD + $\text{TNF}\alpha$ group

许多实验表明,受损肾组织中 PPAR γ 表达显著增加,推测是机体对损伤的代偿性反应^[3-5]。那么 PPAR γ 高表达是否具有对抗损伤的保护性作用呢?为了回答上述问题,在本实验中设计了 PPAR γ 野生型质粒转染组,观察 PPAR γ 高表达本身是否具有保护性作用。

通过质粒酶切分析以及比较 PPAR γ mRNA 及蛋白质表达、转染细胞绿色荧光蛋白表达等方法证实 PPAR γ 野生型质粒成功转染;转染了 PPAR γ 野生型质粒后的 IMCD 细胞高表达 PPAR γ 。

实验结果说明,PPAR γ 高表达本身具有潜在的抗炎和抗纤维化作用,表现在:(1)PPAR γ 高表达能减少 $\text{TNF}\alpha$ 刺激下 IMCD 细胞分泌合成 MCP-1,减少了炎症细胞趋化因子的表达,在体内将能减少巨噬细胞等炎症细胞在肾脏组织聚集引起的损伤。(2)PPAR γ 高表达能减少 $\text{TNF}\alpha$ 刺激诱导的致纤维化生长因子 TGF β_1 的合成分泌。类似的结果国外也有报道,Zheng 等^[8]在系膜细胞的体外实验中观察到,转染了 PPAR γ 显性抑制性(dominant negative)质粒后,在 PPAR γ 低活性表达时 TGF β_1 反应性增强,合成 I 型胶原增多;而 PPAR γ 蛋白高表达能阻断 TGF β_1 诱导的纤维连接蛋白表达^[9],提示 PPAR γ 对 TGF β 具有抑制性作用。其他脏器研究中也提示 PPAR γ 高表达具有抗纤维化作用^[10,11]。

总之,本实验通过将 PPAR γ 转染至 IMCD 细胞,使 PPAR γ 在细胞中高表达,证实了 PPAR γ 高

表达对肾小管上皮细胞 TNF α 刺激损伤具有保护作用。

[参考文献]

- [1] Feige JN, Gelman L, Michalik L, et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions[J]. *Prog Lipid Res*, 2006, 45:120-159.
- [2] 马旭,甘华. PPAR γ 与肾脏疾病[J]. *国外医学·泌尿系统分册*, 2003, 23:709-712.
- [3] 熊祖应,黄海长,李惊子,等. 活动性肾小球肾炎中过氧化脂质体增殖激活受体 γ 在肾脏的表达[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2003, 35:499-502.
- [4] 林沁,马骥,顾勇,等. 单侧输尿管梗阻后大鼠过氧化物酶体增殖物激活剂受体- γ 的表达及其意义[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2003, 12:126-131.
- [5] Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, et al. Expression of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37:1684-1685.
- [6] Hruska KA. Treatment of chronic tubulointerstitial disease: a new concept[J]. *Kidney Int*, 2002, 61:1911-1922.
- [7] Guo G, Morrissey J, McCracken R, et al. Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor- α to the development of renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 280:F777-F785.
- [8] Zheng F, Fomoni A, Eliot SJ, et al. Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPAR-gamma activation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282:F639-F648.
- [9] Guo B, Koya D, Isono M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta 1-induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells[J]. *Diabetes*, 2004, 53:200-208.
- [10] Galli A, Crabb DW, Ceni E, et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122:1924-1940.
- [11] Jaster R, Lichte P, Fitzner B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9:670-682.

[收稿日期] 2005-12-29

[修回日期] 2006-04-18

[本文编辑] 孙岩

Quantitative determination of Astragaloside IV, a natural product with cardioprotective activity, in plasma, urine and other biological samples by HPLC coupled with tandem mass spectrometry

Zhang W, Zhang C, Liu R, Li H, Zhang J, Mao C, Chen C (Department of Natural Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Astragaloside IV is a novel cardioprotective agent extracted from the Chinese medical herb *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. This agent is being developed for treatment for cardiovascular disease. Further development of Astragaloside IV will require detailed pharmacokinetic studies in preclinical animal models. Therefore, we established a sensitive and accurate high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) quantitative detection method for measurement of Astragaloside IV levels in plasma, urine as well as other biological samples including bile fluid, feces and various tissues. Extraction of Astragaloside IV from plasma and other biological samples was performed by Waters OASIS(trade mark) solid phase extraction column by washing with water and eluting with methanol, respectively. An aliquot of extracted residues was injected into LC/MS/MS system with separation by a Cosmosil C18 5 mm, 150 mm \times 2.0 mm) column. Acetonitrile:water containing 5 mmol/L NaAc (40 : 60, V/V) was used as a mobile phase. The eluted compounds were detected by tandem mass spectrometry. The average extraction recoveries were greater than 89% for Astragaloside IV and digoxin from plasma, while extraction recovery of Astragaloside IV and digoxin from tissues, bile fluid, urine and feces ranged from 61% to 85%, respectively. Good linearity ($R_2 > 0.9999$) was observed throughout the range of 10-5 000 ng/ml in 0.5 ml rat plasma and 5-5 000 ng/ml in 0.5 ml dog plasma. In addition, good linearity ($R_2 > 0.9999$) was also observed in urine, bile fluid, feces samples and various tissue samples. The overall accuracy of this method was 93%-110% for both rat plasma and dog plasma. Intra-assay and inter-assay variabilities were less than 15.03% in plasma. The lowest quantitation limit of Astragaloside IV was 10 ng/ml in 0.5 ml rat plasma and 5 ng/ml in 0.5 ml dog plasma, respectively. Practical utility of this new LC/MS/MS method was confirmed in pilot pharmacokinetic studies in both rats and dogs following intravenous administration.

[J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 822(1-2):170-177]