

局部醛固酮系统介导高糖致人系膜细胞损伤记忆效应

杜 超¹,熊勤攀²,周 波^{1*},苏 红¹

1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016

2. 四川省岳池县人民医院 ICU科,岳池 638300

[摘要] **目的** 研究高糖记忆对人系膜细胞(HMCs)表达局部醛固酮系统、活性氧(ROS)及癌胚纤维连接蛋白(oncofetal FN)mRNA水平的影响,并进一步探讨局部醛固酮系统在其中的作用。**方法** 实验细胞分组如下:正糖组(NG,5 mmol/L D-葡萄糖培养2 d)、高糖组(HG,25 mmol/L D-葡萄糖培养2 d)、记忆组(M,25 mmol/L D-葡萄糖培养2 d→5 mmol/L D-葡萄糖培养4 d)、记忆+依普利酮组(MY,25 mmol/L D-葡萄糖培养2 d→5 mmol/L D-葡萄糖+10 μmol/L依普利酮培养4 d)、正糖+依普利酮组(NY,5 mmol/L D-葡萄糖培养2 d→5 mmol/L D-葡萄糖+10 μmol/L依普利酮培养4 d)、持续正糖组(SN,5 mmol/L D-葡萄糖培养6 d)。荧光显微镜及酶标仪检测细胞内ROS水平,蛋白质印迹法检测醛固酮合酶蛋白(CYP11B2)水平,RT-PCR检测11β-羟基类固醇脱氢酶Ⅱ、CYP11B2、oncofetal FN mRNA表达水平,激光共聚焦显微镜观察盐皮质激素受体(MR)表达及转位,放射免疫法测定上清液醛固酮水平。**结果** (1)HG组和M组诱导人系膜细胞CYP11B2 mRNA及蛋白分别为NG组的3.45、2.09倍和3.14、2.06倍,HG组和M组细胞上清液醛固酮含量分别为NG组的2.01、1.81倍(P 均 <0.05),HG组和M组均可促进MR蛋白发生核转位,定量分析示HG组和M组胞质/胞核荧光强度较NG组分别降低30%、21%(P 均 <0.05)。(2)HG组和M组 oncofetal FN mRNA、ROS表达增加,分别为NG组的2.23、1.99倍和2.16、1.90倍(P 均 <0.05),MY组ROS、oncofetal FN mRNA表达分别较M组降低35%、51%(P 均 <0.05)。**结论** HMCs存在高糖记忆效应,局部醛固酮系统可能介导了高糖致系膜细胞损伤的记忆作用。

[关键词] 局部醛固酮系统;代谢记忆;高糖;癌胚纤维连接蛋白;活性氧

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1166-06

Local aldosterone system mediated “hyperglycaemic memory” in human mesangial cells

DU Chao¹, XIONG Qin-pan², ZHOU Bo^{1*}, SU Hong¹

1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Intensive Care Unit, The people's Hospital of Yuechi, Yuechi 638300, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of hyperglycaemic memory on the local aldosterone system, reactive oxygen species (ROS) and expression of oncofetal fibronectin (oncofetal FN) mRNA in human mesangial cells (HMCs), and to further understand the role of local aldosterone system in the process. **Methods** In this study HMCs were divided into the following groups: normal glucose group (NG, 5 mmol/L D-glucose for 2 days), high glucose group (HG, 25 mmol/L D-glucose for 2 days), memory group (M, 25 mmol/L D-glucose for 2 days→5 mmol/L D-glucose for 4 days), memory + eplerenone group (MY, 25 mmol/L D-glucose for 2 days→5 mmol/L D-glucose + 10 μmol/L eplerenone for 4 days), normal glucose + eplerenone group (NY, 5 mmol/L D-glucose for 2 days→5 mmol/L D-glucose + 10 μmol/L eplerenone for 4 days), and persistent normal glucose group (SN, 5 mmol/L D-glucose for 6 days). ROS levels were tested by fluorescence microscope and fluorescence microplate reader. Aldosterone synthase (CYP11B2) protein expression was detected by Western blotting analysis. The mRNA expressions of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, CYP11B2 and oncofetal FN were detected by RT-PCR. The expression and translocation of mineralocorticoid receptor (MR) was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM). Aldosterone level in cell culture supernatant was detected by radioimmunoassay. **Results** (1) CYP11B2 mRNA and protein expression in group HG and in group M were all significantly increased, being 3.45, 2.09 and 3.14, 2.06 folds of those in group NG, respectively (all $P < 0.05$). The aldosterone levels in HMCs culture supernatant were significantly increased in group HG and group M, being 2.01 and 1.81 folds of that in group NG, respectively ($P < 0.05$). MR was activated and translocated from the cytosol to the nucleus in group HG and group M. Quantitative analysis showed that the ratios of cytosol/nucleus fluorescence intensity in group HG and group M were decreased by 30% and 21% compared with that in group NG,

[收稿日期] 2012-08-13

[接受日期] 2012-09-24

[作者简介] 杜 超, 硕士, 主治医师, E-mail: ducao88@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-89012009, E-mail: zhoub0915@126.com

respectively (all $P < 0.05$). (2) Oncofetal FN mRNA expression and ROS levels in group HG and group M were significantly increased, being 2.23, 1.99 and 2.16, 1.90 folds those of group NG, respectively (all $P < 0.05$). Oncofetal FN mRNA expression and ROS levels in group MY were significantly decreased, being 35% and 51% of those in group M (all $P < 0.05$).

Conclusion HMCs have hyperglycaemic memory effect, which might be mediated by the local aldosterone system.

[Key words] local aldosterone system; metabolic memory; high glucose; oncofetal fibronectin; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11): 1166-1171]

糖尿病控制和并发症研究^[1]表明, 强化控制血糖能降低蛋白尿的发生, 其后续的研究^[2]显示: 在早期强化组与非强化组 HbA1c 无显著差异的情况下, 糖尿病的发生率在早期强化治疗组远低于非强化组, 首次提出高血糖存在“代谢记忆”效应。强化血糖控制与 2 型糖尿病患者的血管转归研究^[3]与控制糖尿病心血管危险行动研究^[4]亦提示, 对于既往血糖控制不佳、病程已达 8~10 年的 2 型糖尿病患者, 即使经强化治疗血糖持续达标, 亦难以阻止微血管病变的发生与发展, 高糖记忆被认为是上述临床试验效果不佳的重要原因。肾脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)过度兴奋是糖尿病进展的关键因素之一, 然而, 阻断 RAS 并不能完全阻止糖尿病的进展, 且长期应用该类药物可引起血浆醛固酮水平先下降再升高, 此即“醛固酮逃逸”现象, 导致肾功能进一步恶化, 已有研究^[5]证实肾脏局部醛固酮系统在糖尿病状态下被激活, 通过促进炎症、纤维化、氧化应激的发生加重肾脏损伤, 但局部醛固酮系统是否参与高糖的代谢记忆作用并不清楚, 本研究以人系膜细胞(human mesangial cells, HMCs)为研究对象, 通过模拟高糖记忆, 观察局部醛固酮系统元件在其中的表达规律, 以期阐明高糖记忆致肾脏损伤的机制提供更多实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养液及小牛血清购于美国 Gibco 公司, 依普利酮购于美国 Sigma 公司。RT-PCR 试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司, PCR 所用引物均为上海生工生物工程技术有限公司合成。蛋白质印迹法相关试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所, 实验中相关抗体购于美国 Santa Cruz 公司。活性氧(ROS)检测试剂盒购自江苏碧云天公司。醛固酮监测试剂盒购于北京北方生物技术研究所。凝胶成像仪、PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司), γ 计数器(国营二六二厂), 荧光酶标仪(美国 MD 公司)。

1.2 人系膜细胞培养与分组 HMCs(重庆医科大学基础医学研究所惠赠)培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃ 恒温、5% 浓度 CO₂ 孵箱中孵育。(1)观察高糖激活系膜细胞局部醛固酮

系统是否存在记忆现象。分组如下: 正糖组(5 mmol/L D-葡萄糖 2 d), 高糖组(25 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d), 记忆组(25 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d, 再换 5 mmol/L D-葡萄糖分别培养 2、4、6 d); 持续正糖组(5 mmol/L D-葡萄糖培养 8 d)。(2)基于上述研究发现, 我们选择高糖培养 2 d → 正糖培养 4 d 模拟体内代谢记忆过程, 观察局部醛固酮系统是否参与高糖致 ROS、纤维连接蛋白(FN) mRNA 的记忆作用分组如下: 正糖组(NG, 5 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d); 正糖+依普利酮组(NY, 5 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d → 5 mmol/L D-葡萄糖 + 10 μ mol/L 依普利酮培养 4 d); 高糖组(HG, 25 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d); 记忆组(M, 25 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d → 5 mmol/L D-葡萄糖培养 4 d); 记忆+依普利酮组(MY, 25 mmol/L D-葡萄糖培养 2 d → 5 mmol/L D-葡萄糖 + 10 μ mol/L 依普利酮培养 4 d); 持续正糖组(SN, 5 mmol/L D-葡萄糖培养 6 d)。

1.3 RT-PCR 法检测 11 β -羟基类固醇脱氢酶 II (11 β HSD2)、CYP11B2、oncofetal FN mRNA 表达 提取各组细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 再进行 PCR 反应, 各目的基因引物、产物长度及退火温度见表 1。扩增条件如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 适当温度下退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。产物经 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像, 用 Quantity One 软件分析各目的基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence for RT-PCR

Gene	Sequence (5'-3')	Size (bp)	PCR temperature θ /°C
11 β HSD2	TGACCAAACCAGGAGACATTAGCCG GTGCTCGATGTAGTCTCTTGCCGTAG	491	60
CYP11B2	AGCGAGTGTGGGTCTCTGCT GAAAGCAACCTGCGGTACAGG	566	60
Oncofetal FN	CCGCCATTAATGAGAGTGAT AGTTAGTTGCGGCAGGAGAAG	133	55
β -actin	CCATGTACGTTGCTATCCAGG TCTCCTTAATGTACGCACGA	252	58

FN: Fibronectin; 11 β HSD2; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2

1.4 蛋白质印迹法检测 CYP11B2 蛋白表达 细胞

裂解后测定各分组蛋白浓度,取 40 μg 总蛋白电泳,转膜,封闭,然后以山羊抗人 CYP11B2 多抗(1:500)或小鼠抗人 β-actin 单抗(1:1 000)4℃孵育过夜。再以 HRP 标记的驴抗山羊或山羊抗小鼠二抗(1:2 000)37℃孵育 1 h,ECL 化学发光法显色。凝胶成像系统照相,分析目的蛋白的相对表达量。

1.5 激光共聚焦显微镜(LSCM)检测盐皮质激素受体(MR)蛋白表达及转位 HMCs 分组培养后,4%多聚甲醛常温下固定 10 min,在 4℃下,以 0.3% Triton X-100 透化细胞 15 min,蛋白封闭 30 min,在细胞面滴加 1:100 小鼠抗人 MR 单抗,4℃过夜后滴加 1:100 的 TRITC 标记山羊抗小鼠二抗,37℃孵育 1 h,封片后送激光共聚焦显微镜下拍照(激发波长为 550 nm),然后以 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

1.6 醛固酮水平检测 留取各分组细胞上清液,按试剂盒说明书操作。

1.7 细胞内 ROS 的检测 细胞内 ROS 可氧化无荧光的二氢二氯荧光素(DCFH-DA)为荧光物质二氯荧光黄(DCF),且 ROS 水平决定其荧光强度。细胞分组培养于 6 孔板,按 ROS 检测试剂盒说明操作,每孔滴加 1 ml 10 μmol/L 的 DCFH-DA,37℃下孵育 20 min,荧光显微镜照相或收集细胞后荧光酶标仪测定荧光强度(激发与发射波长分别为 488 nm、525 nm)。

1.8 统计学处理 各实验重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,多组间差异显著性检验使用 ANOVA 法,两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 高糖记忆对 HMCs 表达 CYP11B2 mRNA 及蛋白的影响 RT-PCR 检测结果显示,HG 培养 2 d 后 CYP11B2 mRNA 表达水平升高,为 NG 培养 2 d

的 3.45 倍($P < 0.05$),高糖培养 2 d 后,在记忆的第 2、4、6 天 CYP11B2 mRNA 表达分别为 NG 培养 2 d 的 3.44、3.14、2.32 倍(P 均 < 0.05 ,图 1、表 2),表明高糖培养后,随正糖培养时间的延长,CYP11B2 mRNA 表达仍较正常对照组为高,提示存在记忆效应,且至少可持续 6 天($P < 0.05$)。

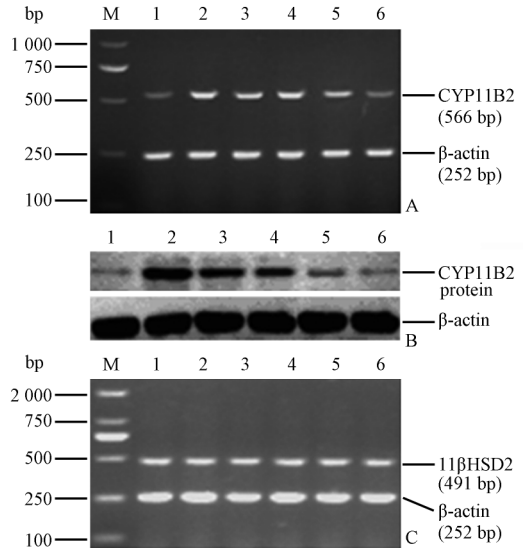


图 1 各分组人系膜细胞(HMCs)CYP11B2(A)、11βHSD2 mRNA(C)及 CYP11B2 蛋白(B)表达
 Fig 1 Expression of CYP11B2(A), 11βHSD2 mRNA(C) and CYP11B2(B) protein in HMCs of various groups
 M: Marker; 1: NG 2 d; 2: HG 2 d; 3: HG 2 d→NG 2 d; 4: HG 2 d→NG 4 d; 5: HG 2 d→NG 6 d; 6: NG 8 d. NG: Normal glucose; HG: High glucose. HMCs: Human mesangial cells; 11βHSD2: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2

蛋白印迹法检测结果显示,HG 培养 2 d 后 CYP11B2 蛋白表达水平升高,为 NG 培养 2 d 的 2.09 倍($P < 0.05$),高糖培养 2 d 后,在记忆的第 2、4、6 天 CYP11B2 蛋白表达水平分别为 NG 培养 2 d 的 2.04、2.06、1.59 倍(P 均 < 0.05 ,图 1、表 2),表明 CYP11B2 蛋白表达也存在记忆效应。

表 2 各分组人系膜细胞(HMCs)表达 CYP11B2 mRNA 及蛋白、11βHSD2 mRNA、醛固酮水平

Tab 2 Expression of CYP11B2 and 11βHSD2 mRNA, CYP11B2 protein and aldosterone levels in HMCs of various groups

$n=3, \bar{x} \pm s$

Group	CYP11B2 mRNA	CYP11B2 protein	11βHSD2 mRNA	Aldosterone pg per 10 ⁶ cells
NG 2 d	0.226±0.021	0.147±0.015	0.419±0.013	24.000±3.606
HG 2 d	0.780±0.020*	0.307±0.016*	0.414±0.011	48.200±4.729*
HG 2 d→NG 2 d	0.778±0.019*	0.300±0.019*	0.437±0.017	48.100±2.848*
HG 2 d→NG 4 d	0.710±0.028*	0.303±0.017*	0.423±0.018	43.443±2.739*
HG 2 d→NG 6 d	0.525±0.046*	0.233±0.021*	0.418±0.017	38.333±2.454*
NG 8 d	0.251±0.018	0.163±0.008	0.421±0.008	24.933±1.007

NG: Normal glucose; HG: High glucose; HMCs: Human mesangial cells; 11βHSD2: 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. * $P < 0.05$ vs NG 2 d group

2.2 高糖记忆对 HMCs 表达 11βHSD2 的影响 RT-PCR显示高糖不增加 11βHSD2 条带亮度, 各分组 11βHSD2 条带与 β-actin 内参条带光密度之比差异无统计学意义(图 1, 表 2)。

2.3 高糖记忆对 HMCs 上清液醛固酮的影响 HG培养 2 d 后上清液醛固酮水平升高, 为 NG 培养 2 d 的 2.01 倍, HG 培养 2 d 后, 在记忆的第 2、4、6 天醛固酮水平分别为 NG 培养 2 d 的 2.00、1.81、1.60 倍($P < 0.05$, 表 2), 表明高糖培养后, 随正糖培养时间的延长, 醛固酮水平仍较正常对照组为高, 提示存在记忆效应, 且至少可持续 6 d。

2.4 高糖记忆对 HMCs 表达 MR 的影响 正糖培养 HMCs 时, MR 呈细颗粒状较均匀分布于细胞质中, 胞核表达相对较弱; 高糖培养 2 d 后 MR 呈胞质向胞核转位, 浆核比为正糖培养 2 d 的 70%; 在高糖培养 2 d 后换正糖再培养 2、4、6 d, 此效应仍然存在, 浆核比分别为正糖培养 2 d 的 70%、79%、83% ($P < 0.05$, 表 3、图 2), 表明高糖介导的 MR 核转位效应也存在记忆效应。

2.5 高糖记忆对 HMCs 表达 ROS 的影响及依普利

酮的作用 结果显示, NG 组、NY 组荧光亮度相似, 均较淡, HG 组、M 组荧光强度较亮, MY 组荧光强度比 M 组淡(图 3)。荧光酶标仪定量检测结果显示: HG 组、M 组 ROS 表达分别为 NG 组的 1.99、1.90 倍 ($P < 0.05$, 表 4), MY 组 ROS 表达与 M 组比较降低 35% ($P < 0.05$, 表 4), 表明高糖增加 HMCs ROS 的表达, 换为正糖培养 4 d 后 ROS 水平仍较对照组为高, 而依普利酮可抑制该效应。

表 3 各组分系膜细胞(HMCs)MR 平均荧光强度

Tab 3 Mean MR fluorescence intensity in HMCs of various groups

Group	n=3, $\bar{x} \pm s$		
	Cytosol	Nucleus	Cytosol/nucleus
NG 2 d	33.865±4.859	16.442±2.930	2.069±0.155
HG 2 d	30.965±3.564	21.466±1.651	1.440±0.063*
HG 2 d→NG 2 d	31.866±1.411	21.946±1.870	1.452±0.078*
HG 2 d→NG 4 d	31.854±1.759	19.482±1.701	1.635±0.054*
HG 2 d→NG 6 d	31.811±1.609	18.632±0.768	1.708±0.086*
NG 8 d	34.117±3.932	14.814±0.549	2.308±0.316

NG: Normal glucose; HG: High glucose; MR: Mineralocorticoid receptor; HMCs: Human mesangial cells. * $P < 0.05$ vs NG 2 d group

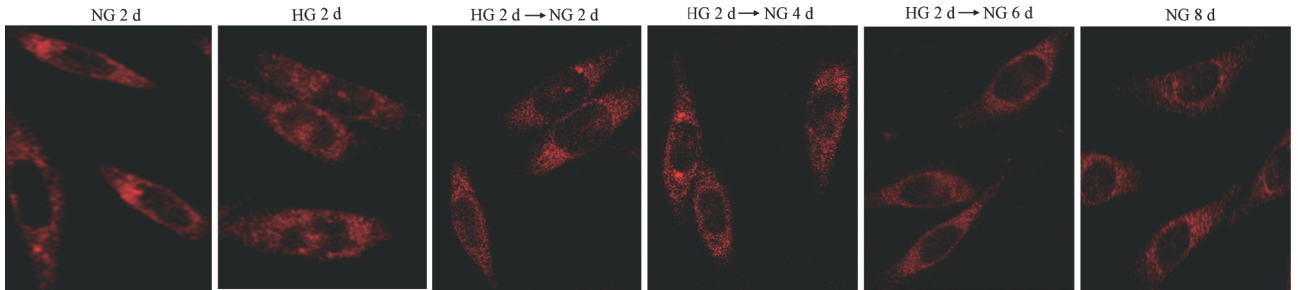


图 2 LSCM 观察各组分系膜细胞(HMCs)MR 蛋白表达

Fig 2 MR protein expression in HMCs of various groups under laser scanning confocal fluorescence microscopy

NG: Normal glucose; HG: High glucose; MR: Mineralocorticoid receptor; HMCs: Human mesangial cells. Original magnification: $\times 800$

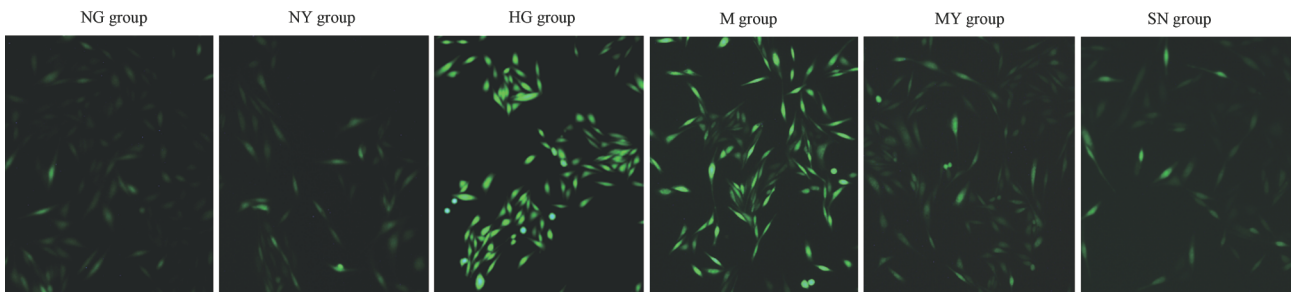


图 3 各组分系膜细胞(HMCs)ROS 水平

Fig 3 Levels of reactive oxygen species in HMCs of various groups (fluorescence microscope)

NG: Normal glucose; NY: Normal glucose+eplerenone; HG: High glucose; M: Memory; MY: Memory+eplerenone; SN: Stable normal glucose; HMCs: Human mesangial cells. Original magnification: $\times 200$

2.6 高糖记忆对 HMCs 表达 oncofetal FN mRNA 的影响及依普利酮的作用 RT-PCR 检测结果显示, 各分组 β-actin 内参条带亮度相似, NG 组、NY

组 oncofetal FN 目的条带亮度接近, 均较淡, M 组 oncofetal FN 目的条带最亮, MY 组 oncofetal FN 条带较 M 组稍淡(图 4)。Quantity One 软件分析结

果表明, HG组和M组 oncofetal FN mRNA 表达增加, 分别为 NG组的 2.23、2.16倍 (P 均 <0.05), MY组 oncofetal FN mRNA 表达较M组下调, 较M组降低 51% ($P<0.05$, 表4), 表明高糖增加 HMCs oncofetal FN mRNA 的表达, 换为正糖培养 4 d后 oncofetal FN mRNA 水平仍较对照组为高, 而依普利酮可抑制该效应。

表4 各组分人系膜细胞(HMCs) oncofetal FN mRNA 表达及 ROS水平变化

Tab 4 Expression of oncofetal FN mRNA and ROS level in HMCs of various groups

Group	oncofetal FN mRNA	ROS
NG	0.248±0.010	102.477±5.299
NY	0.255±0.006	106.923±4.546
HG	0.554±0.048*	203.977±8.793*
M	0.535±0.038*	194.849±10.140*
MY	0.262±0.009 Δ	127.513±6.405 Δ
SN	0.242±0.014	100.658±4.429

NG: Normal glucose; NY: Normal glucose + eplerenone; HG: High glucose; M: Memory; MY: Memory + eplerenone; SN: Stable normal glucose; FN: Fibronectin; ROS: Reactive oxygen species; HMCs: Human mesangial cells. * $P<0.05$ vs NG group; $\Delta P<0.05$ vs M group

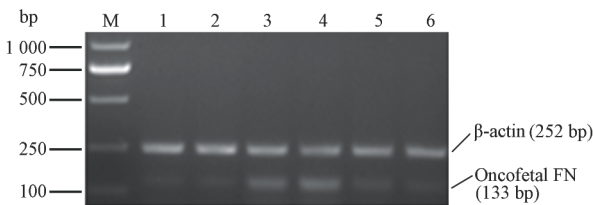


图4 各组分人系膜细胞(HMCs)癌胚型纤维连接蛋白(FN) mRNA 表达

Fig 4 Expression of oncofetal FN mRNA in HMCs of various groups

M: Marker; 1: Normal glucose; 2: Normal glucose + eplerenone; 3: High glucose; 4: Memory; 5: Memory + eplerenone; 6: Stable normal glucose. HMCs: Human mesangial cells

3 讨论

糖尿病控制和并发症研究、英国前瞻性糖尿病研究及其后续研究等均证实: 早期血糖控制不良将会持续加重后期糖尿病患者的靶器官损伤, 如糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变的持续进展, 高糖记忆可能是导致上述结果的主要因素^[1-6]。本实验以 HMCs 为研究对象, 通过模拟高糖记忆, 显示高糖诱导的 HMCs 局部醛固酮系统活化、ROS 及 oncofetal FN mRNA 表达上调在葡萄糖浓度恢复正常后仍持续存在, 而依普利酮可减轻高糖记忆致 HMCs ROS

及 oncofetal FN mRNA 的表达, 表明局部醛固酮系统可能在介导高糖致 HMCs 损伤记忆效应中起到重要作用。

RAS 的激活系糖尿病微血管并发症发生、发展的关键环节, 然而, Mauer 等^[7]却发现阻断 RAS 并不能阻止糖尿病患者肾脏的病理进展。同时, 长期阻断 RAS 常伴有醛固酮逃逸的发生, 研究均发现 MR 拮抗剂可减轻醛固酮逃逸患者肾小球滤过率的下降和减少蛋白尿的发生^[8]。本课题组既往研究已证实, HMCs 内存在局部醛固酮系统, 且高糖可激活该系统并导致 HMCs 损伤^[9]。醛固酮由肾上腺皮质球状带合成而参与机体水盐平衡的调控, 受体位、Ang II、钾钠摄入等多种因素调节, 醛固酮系由胆固醇经一系列酶促反应而成, 其中 CYP11B2 是最为关键的限速酶。本研究发现高糖记忆可促进系膜细胞 CYP11B2 mRNA 及蛋白表达水平上调, 目前国内外尚无类似研究。在肾上腺皮质球状带细胞的研究中发现蛋白激酶 C(PKC)参与调节 CYP11B2 的表达^[10], 而本课题组既往已证实高糖记忆可激活 PKC^[11], 但高糖记忆是否通过激活 PKC 而增加 HMCs CYP11B2 的表达仍不清楚, 有待进一步研究。我们同时发现高糖记忆上调 HMCs 培养液醛固酮水平, 醛固酮与其配体 MR 结合而发挥广泛的生物学效应。静息状态下 MR 与分子伴侣结合而锚定于胞质内^[12-14], 当配体与之结合后其构象改变, 与分子伴侣分离, MR-配体复合物转位进入细胞核, 参与特定基因的转录及翻译。本实验表明高糖记忆可促进 MR 从胞质至胞核转位。众所周知, MR 对皮质醇及醛固酮均有高度亲和力, 11 β HSD2 的存在可有效保护醛固酮与 MR 的特异性结合, 主要通过降解皮质醇为皮质酮而发挥上述作用, 本研究证实高糖环境中 11 β HSD2 表达并不增加, 说明高糖记忆诱导的 MR 移位激活与皮质醇作用无关。总结以上结果表明高糖可活化局部醛固酮系统元件, 且此作用在血糖正常化后仍持续存在。

细胞外基质聚集是糖尿病肾病的重要病理改变, oncofetal FN 被认为是反映新合成细胞外基质的有效标记^[15-16]。依普利酮系螺内酯改造体, 已在美国上市近 10 年, 其以甲酯基取代 7 α -乙酰巯基, 并增加 9 α 、11 α -环氧桥键, 使其对黄体酮受体和雄激素受体作用显著减弱而成为选择性 MR 受体拮抗剂。本实验发现高糖记忆可诱导 HMCs oncofetal FN mRNA 表达上调, 且依普利酮可抑制这一效应, 说明 HMCs 在高糖记忆模式下被激活的局部醛固酮系统参与了高糖记忆致 HMCs oncofetal FN mRNA 的作用, 但其具体机制不清。高血糖促进氧化应激、增

加 ROS 的产生在糖尿病肾病的发生发展中扮演重要角色^[17]。林雪波等^[11]证实高糖增加脐静脉内皮细胞 ROS 水平,再恢复正糖浓度以后,在一段时间内其 ROS 水平仍较长期正糖浓度培养组高,魏伟平等^[18]的研究也表明,大鼠胰岛瘤细胞株在高糖培养 2 d,换正糖培养 3 d 或 5 d 后其细胞内 ROS 水平仍较持续正糖培养组高,在本实验中,我们证实高糖增加 HMCs ROS 的产生,同时此效应存在记忆作用,这与 Corgnali 等^[19]和 Ihnat 等^[20]研究结果相似,然而,高糖下 ROS 的记忆机制尚不清楚。我们的实验观察到依普利酮干预高糖记忆诱导的 HMCs ROS 表达水平降低,表明局部醛固酮系统参与了高糖记忆致 HMCs ROS 的作用。

综上所述,本研究发现高糖记忆激活 HMCs 局部醛固酮系统,且其介导了高糖记忆对 HMCs ROS 及 oncofetal FN mRNA 的表达,该研究为揭示糖尿病肾病的发病机制提供了又一新的思维,因此,临床上应早期积极控制糖尿病患者血糖水平,以减轻高糖记忆的危害,联合应用依普利酮可能有助于阻止和延缓糖尿病的发生与发展。

(志谢 感谢眼科学重庆市市级重点实验室在本研究中予以的支持!)

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *N Engl J Med*, 1993, 329: 977-986.
- [2] Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complication Research Group. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study[J]. *JAMA*, 2003, 290: 2159-2167.
- [3] Patel A, ADVANCE Collaborative Group, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Woodward M, et al. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2007, 370: 829-840.
- [4] ACCORD Study Group, Cushman W C, Evans G W, Byington R P, Goff D C Jr, Grimm R H Jr, et al. Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 1575-1585.
- [5] Siragy H M, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats

- [6] UK Ppective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. *Lancet*, 1998, 352: 837-853.
- [7] Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361: 40-51.
- [8] Nishikawa T, Suematsu S, Saito J, Soyama A, Ito H, Kino T, et al. Human renal mesangial cells produce aldosterone in response to low-density lipoprotein (LDL) [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 96(3-4): 309-316.
- [9] 杜超, 周波, 段雅倩, 苏红. 醛固酮自分泌环在高糖致人系膜细胞损伤中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37: 618-622.
- [10] LeHoux J G, Dupuis G, Lefebvre A. Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C[J]. *Endocr Res*, 2000, 26: 1027-1031.
- [11] 林雪波, 周波, 孙芳. 蛋白激酶 C β_2 -活性氧交互环介导高糖致内皮细胞损伤记忆效应[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49: 239-244.
- [12] Gallo L I, Ghini A A, Piwien Pilipuk G, Galigniana M D. Differential recruitment of tetratricorpeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity [J]. *Biochemistry*, 2007, 46: 14044-14057.
- [13] Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19: 2211-2221.
- [14] Pratt W B, Toft D O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18: 306-360.
- [15] Berndt A, Borsi L, Luo X, Zardi L, Katenkamp D, Kosmehl H. Evidence of ED-B+ fibronectin synthesis in human tissues by non-radioactive RNA *in situ* hybridization. Investigations on carcinoma (oral squamous cell and breast carcinoma), chronic inflammation (rheumatoid synovitis) and fibromatosis (Morbus Dupuytren) [J]. *Histochem Cell Biol*, 1998, 109: 249-255.
- [16] Chen S, Feng B, George B, Chakrabarti R, Chen M, Chakrabarti S. Transcriptional coactivator p300 regulates glucose-induced gene expression in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298: 127-137.
- [17] Pan H Z, Zhang L, Guo M Y. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy [J]. *Acta Diabetol*, 2010, 47(Suppl 1): 71-76.
- [18] 魏伟平, 薛耀明, 高方. 高糖对 INS-1 细胞损伤存在记忆效应 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31: 682-685.
- [19] Corgnali M, Piconi L, Ihnat M, Ceriallo A. Evaluation of gliclazide ability to attenuate the hyperglycaemic "memory" induced by high glucose in isolated human endothelial cells [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2008, 24: 301-309.
- [20] Ihnat M A, Thorpe J E, Kamat C D, Szabó C, Green D E, Warnke L A, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular "memory" of high glucose stress signaling [J]. *Diabetologia*, 2007, 50: 1523-1531.