

C型利尿钠肽对 AGEs 抑制的利尿钠肽 B 受体及受体后信号的调节作用

曲 卫, 邹俊杰, 石勇铨, 张春阳, 刘志民* (第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨 C 型利尿钠肽(CNP)对晚期糖基化终末产物(AGEs)抑制的利尿钠肽 B 受体(NPR-B)及受体后信号的影响。**方法:**体外培养人肾小球系膜细胞,分别用免疫荧光染色法、酶联免疫吸附分析法和流式细胞术观察 CNP 和 AGEs 作用下的 NPR-B 免疫荧光表达、细胞内 cGMP 水平和 NF- κ B p65 活性亚基的表达。**结果:**CNP 可以显著上调 NPR-B 的荧光表达、显著升高 AGEs 抑制的细胞内 cGMP 浓度($P < 0.001$)及抑制 AGEs 刺激的 NF- κ B p65 活性亚基的表达。**结论:**CNP 能够调节 AGEs 影响的 NPR-B/cGMP 信号及 NF- κ B 活性,并且可能通过 NPR-B/cGMP 途径发挥抑制 NF- κ B 活性的作用。

[关键词] 利尿钠肽, C 型; 肾小球系膜细胞; 糖基化终末产物

[中图分类号] R 587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0758-03

Influence of C-type natriuretic peptide on expression of natriuretic peptide B receptor suppressed by advanced glycation end products and on post-receptor signal regulation

QU Wei, ZOU Jun-jie, SHI Yong-quan, ZHANG Chun-yang, LIU Zhi-min* (Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of C-type natriuretic peptide(CNP) on the expression of natriuretic peptide B receptor(NPR-B) and its cGMP signal induced by advanced glycation end products(AGEs) in human mesangial cells(HMC). **Methods:** HMCs were cultured *in vitro*. The expression of NPR-B, intracellular concentration of cGMP and level of NF- κ B p65 in HMC were measured by immunofluorescent staining, enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and flow cytometry, respectively. **Results:** CNP significantly upregulated the immunofluorescent intensity of NPR-B and the concentration of cGMP inhibited by AGEs($P < 0.001$); CNP also inhibited the fluorescent intensity of NF- κ B p65 stimulated by AGEs. **Conclusion:** CNP can regulate the expression of NPR-B/cGMP and activity of NF- κ B induced by AGEs through a NPR-B/cGMP dependent manner.

[KEY WORDS] natriuretic peptide, C-type; mesangial cell; glycosylation end products

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 758-760]

肾小球系膜细胞的异常增殖、迁移所致的系膜重塑,在糖尿病肾病的发生发展中具有重要意义。C型利尿钠肽(CNP)具有扩张血管、拮抗内皮素系统和肾素-血管紧张素系统、抑制平滑肌细胞增殖迁移、抑制肾小球系膜细胞外基质积聚和炎症因子分泌等作用^[1-3],对肾小球疾病具有一定的保护作用,而晚期糖基化终末产物(AGEs)则是引起糖尿病肾病的重要因素。我们前期研究发现,糖尿病大鼠肾皮质组织存在着 CNP 和利尿钠肽 B 受体(NPR-B)表达的异常,以及 AGEs 水平的升高,但 CNP/NPR-B 系统与 AGEs 的作用信号之间是否存在着相互影响,目前还不清楚。因此,本研究观察了 CNP 和 AGEs 对细胞 NPR-B 表达、细胞内 cGMP 与核因子- κ B(NF- κ B) p65 活性亚基的影响,旨在探讨 CNP 对糖尿病肾病时系膜细胞可能的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肾小球系膜细胞(HMC,长征医院梅长林教授惠赠); cGMP ELISA 分析试剂盒(美国

ADLITTERAM 诊断实验公司); CNP-22、AGEs、cy3-标记羊抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司); 兔抗人 NF- κ B p65 单克隆抗体、FITC-标记羊抗兔 IgG(博士德生物工程有限公司); 兔抗人糖基化终末产物受体(RAGE)单克隆抗体(RAGE-IgG, 美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA, 福建迈新生物技术有限公司); 蛋白酶抑制剂混合液(RIPA)、苯甲基磺酰氟(PMSF), 上海申能博生物科技有限公司。

1.2 NPR-B 免疫荧光染色 将传代培养的 HMC 按每孔 1×10^5 移至预先放入盖玻片的 6 孔细胞培养板,观察到细胞贴壁爬片生长后,更换培养液,分组进行干预(AGEs 组: 100 mg/L AGEs; AGEs+CNP 组: 100 mg/L AGEs 和 10^{-4} mol/L CNP),继续观察 48~72 h,使细胞达 50%~60% 融合。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB523304)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects(973 Program)(2005CB523304)。

[作者简介] 曲 卫, 博士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: LZM@sh163.net

荧光染色步骤:细胞爬片经 PBS 洗涤、3.7%多聚甲醛固定后,以正常山羊血清封闭 30~60 min,吸去多余液体(勿洗),同时加入小鼠抗人 PCNA 和兔抗人 NPR-B,4℃ 孵育过夜,然后同时加入荧光标记二抗(FITC-羊抗兔 IgG 和 cy3-羊抗小鼠 IgG),37℃ 孵育 30 min,激光共聚焦显微镜下观察。FITC 吸收波长与激发波长分别为 525 nm、495 nm;cy3 吸收波长与激发波长分别为 552 nm、565 nm。NPR-B-FITC 呈绿色荧光,PCNA-cy3 呈红色荧光。

1.3 ELISA 法测定细胞裂解液 cGMP 水平 将传代培养的 HMC 按每孔 1×10^5 移至 24 孔细胞培养板,500 μl /孔,细胞贴壁生长后更换培养液,加入不同的干预试剂分组进行实验,每组设 3 复孔,继续观察 72 h,使每孔细胞含量达到 5×10^5 以上。CNP 组, 10^{-4} mol/L、 10^{-3} mol/L 2 个浓度;AGEs 组, AGEs 终浓度为 100 mg/L;AGEs+CNP 组, AGEs 终浓度 100 mg/L, CNP 终浓度 10^{-4} mol/L; AGEs+IgG-RAGE 组,将 IgG-RAGE 抗体按 1 : 100(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)加入 DMEM 培养基,培养 2 h 后,再加入 AGEs(终浓度 100 mg/L)。

细胞裂解液制备:取出 24 孔培养板,置于冰盘上,吸弃培养液。0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,加入 500 μl RIPA 及 5 μl PMSF,振荡 30 s(使细胞裂解液浓度相当于 $1 \times 10^6/\text{ml}$)。JY92-II 超声细胞粉碎机工作时间 3 s,间歇时间 3 s。4℃,20 000 $\times g$ 高速离心 30 min,取上清液,检测前用生理盐水混匀稀释 2 倍。ELISA 步骤按试剂盒说明书进行,检测波长 450 nm,读取各孔光密度(D)值,进行曲线拟合,计算各样品浓度。

1.4 流式细胞术检测 NF- κ B p65 荧光强度 将传代培养的 HMC 按 1×10^5 移至 6 cm 细胞培养皿,37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 12 h,细胞贴壁生长后更换培养液,分组进行实验干预,加入不同的干预试剂(同 1.3),继续观察 48 h,每天更换培养液,使细胞达 70%~80%融合[约 $(1 \sim 2.5) \times 10^6$]。

用 0.25%胰酶消化、收集 HMC 细胞,以 PBS 制成单细胞悬液,PBS 洗涤后用 1%多聚甲醛固定(4℃,30 min);加正常山羊血清封闭液 100 μl (室温,30~60 min);然后加入 100 μl 兔抗人 NF- κ B p65 抗体,混匀,37℃ 孵育 2 h;PBS 洗涤后加入荧光标记二抗(FITC-抗兔 IgG),37℃ 避光孵育 30 min;PBS 洗涤并按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 重悬细胞,300 目尼龙膜过滤细胞,样品加入流式细胞仪上机检测。

1.5 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 分析软件进行方差分析 *F* 检验。

2 结果

2.1 NPR-B 的免疫荧光表达 结果表明,AGEs 干预下细胞 NPR-B 表达受到抑制,仅 PCNA 表达(显红色荧光,图 1A),而 AGE+CNP 组 NPR-B 表达增强(显绿色荧光,图 1B)。

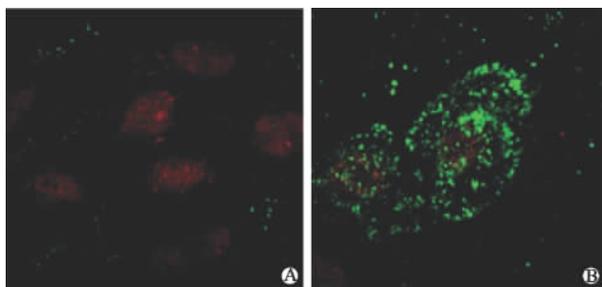


图 1 共聚焦显微镜观察
PCNA-NPR-B 免疫荧光染色($\times 1000$)
A:AGEs 组;B:AGEs+CNP 组

2.2 CNP 对细胞内及 AGEs 刺激的细胞内 cGMP 水平的影响 CNP 对 HMC 内 cGMP 含量呈促进作用,且呈浓度依赖性, 10^{-4} 、 10^{-3} mol/L CNP 组 cGMP 含量分别为 (40.08 ± 8.19) 、 (82.34 ± 20.79) μg ,后者与对照组 $[(24.45 \pm 5.39) \mu\text{g}]$ 比较有显著差异($P < 0.01$)。与对照组比较,AGEs 能使 HMC 内 cGMP 水平轻度下调 $[(16.93 \pm 3.52) \mu\text{g}]$,而 CNP 能使 AGEs 抑制的细胞内 cGMP 水平显著升高 $[(52.06 \pm 10.83) \mu\text{g}, P < 0.001]$,而 RAGE 阻断剂 RAGE 抗体则无明显影响 $[(19.58 \pm 6.86) \mu\text{g}]$ 。

2.3 CNP 对 AGEs 刺激的细胞内 NF- κ B p65 荧光强度的影响 AGEs 明显增加细胞内 NF- κ B 活性亚基 p65 亚基的荧光表达强度;CNP 和 RAGE 阻断剂能明显降低 AGEs 刺激下的细胞内 NF- κ B 活性亚基的 FITC 荧光表达强度(图 2)。

3 讨论

肾小球系膜细胞的增殖及细胞外基质积聚,是糖尿病肾病肾小球硬化的病理特征之一,导致肾小球硬化的确切机制目前尚不完全清楚,高血糖与氧化应激造成的 AGEs 增加、蛋白激酶 C(PKC)激活等对肾小球系膜细胞的直接损伤有一定的关系。

本实验证实,CNP 在上调受 AGEs 抑制的 NPR-B 和提高细胞内 cGMP 水平的同时,能够抑制 AGEs 刺激的 NF- κ B p65 活性亚基的表达,该作用与阻断 RAGE 的结果相近。结果提示,CNP/NPR-B 系统与 AGEs 之间存在着相互拮抗的作用信号,AGEs 能够

抑制细胞的 NPR-B/cGMP 作用信号,而 CNP 则能促进受 AGEs 抑制的利尿钠肽受体表达及受体后的信

号调节。本实验结果表明,CNP 可能通过 NPR-B/cGMP 途径发挥抑制 NF- κ B 活性的作用。

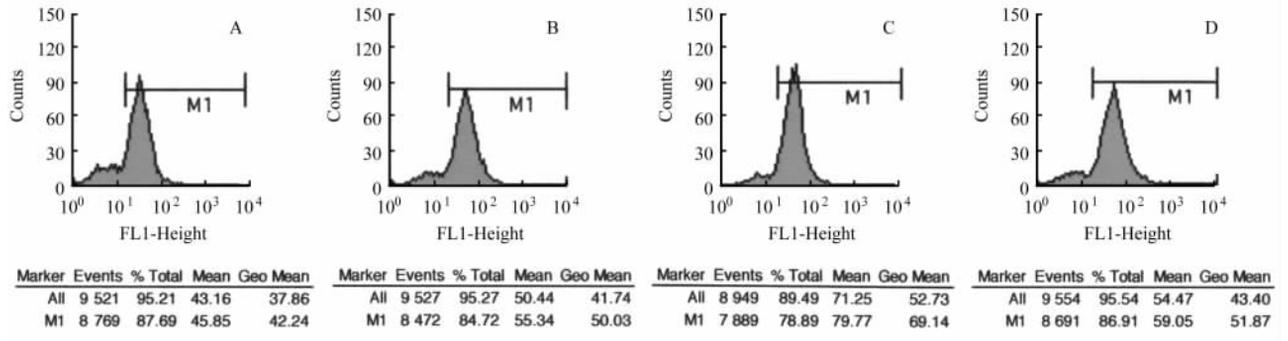


图 2 流式细胞术检测 HMCs 细胞内 NF- κ B p65 荧光强度

A: 对照组; B: AGEs+CNP 组; C: AGEs 组; D: AGEs+RAGE-IgG 组

氧化应激是糖尿病慢性并发症的共同发病机制,高血糖诱导的线粒体活性氧产生增多,激活多元醇、AGEs、PKC 和己糖胺途径,引起糖尿病微血管病变^[4]。AGEs 是持续性高血糖引起还原糖与游离氨基酸发生非酶促反应,而形成的不可逆性非酶糖化反应产物。AGEs 可直接和(或)间接通过与细胞膜的 RAGE 结合而介导氧自由基生成增加^[5-6],在糖尿病肾病的发生发展中起着十分重要的作用。AGEs 与其受体 RAGE 结合后,一方面激活下游的信号通路,发挥 AGEs 对机体的调节作用;另一方面使细胞内活性氧簇(ROS)产生增加,激活多效转录因子 NF- κ B,后者作用于 RAGE 基因启动子上的两个 NF- κ B 样结合位点上,最终增强 RAGE 基因的表达。Haslbeck 等^[7]也研究证实,AGEs 与其受体 RAGE 的结合能引起 NF- κ B 持续活化,进而调控下游一系列细胞因子的表达,认为 NF- κ B 的持续活化与 RAGE 和 AGEs 的相互作用有关。

AGEs 抑制细胞的 NPR-B/cGMP 的作用,可能与 AGEs 介导的氧化应激信号有关,但本实验观察到,此作用可能并非通过与 RAGE 结合的受体途径。AGEs 是否能直接或者通过 RAGE 以外的途径间接刺激细胞内 ROS 产生,目前还不清楚。有证据表明,很多物质可以不经受体途径而直接刺激细胞内 ROS 产生,例如 PPAR α 和 PPAR γ 受体激动剂可以通过受体途径及非受体依赖的途径介导细胞内活性氧的产生^[8-9]。

已有研究^[10]表明,氧化应激介导的 PKC 激活能够使 NPR-B 发生去磷酸化,而使其降低敏感性,从而抑制 CNP/NPR-B 的信号产生。本研究发现,AGEs 也能抑制细胞 NPR-B/cGMP 信号,而 CNP 则能促进受 AGEs 抑制的利尿钠肽受体表达及受体后的信号

调节,提示两者之间可能具有相互拮抗的作用。

[参考文献]

- [1] Sima C K, Tammo O, Keratin I, et al. C-type natriuretic peptide inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation *in vivo* [J]. *Kidney Int*, 1998, 53: 1143-1151.
- [2] Hiroshi O, Hideaki Y, Mitauaki K, et al. C-type natriuretic peptide inhibits proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 secretion in cultured human mesangial cells [J]. *Nephron*, 2000, 86: 467-472
- [3] Schulz S. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor [J]. *Peptides*, 2005, 26: 1024-1034
- [4] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414: 813-820.
- [5] Guzik T J, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus; role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2002, 105: 1656-1662.
- [6] Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, et al. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 1417-1423.
- [7] Haslbeck K M, Schleicher E, Bierhaus A, et al. The AGE/RAGE/NF-(kappa)B pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT) [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005, 113: 288-291.
- [8] Pandhare J, Cooper S K, Phang J M. Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone; evidence for both peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2044-2052.
- [9] Kim S H, Yoo C I, Kim H T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) induces cell death through MAPK-dependent mechanism in osteoblastic cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 215: 198-207.
- [10] Potter L R, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue; a possible mechanism of heterologous desensitization [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31099-31106.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-20

[本文编辑] 尹 荼