

· 论 著 ·

LOX-1 介导 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞表达 TGF-β₁ 及分泌细胞外基质

杜月光^{1*}, 柴可夫², 万海同²

(1. 浙江中医药大学基础医学院病理生理学教研室, 杭州 310053; 2. 中医临床基础教研室, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**观察氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)对大鼠肾小球系膜细胞表达血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)、转化生长因子 β₁(TGF-β₁)及分泌细胞外基质(ECM)的影响,并观察 LOX-1 抑制剂多聚肌苷酸(PIA)对 ox-LDL 上述作用的影响。**方法:**体外培养肾小球系膜细胞,RT-PCR 检测不同浓度(0、25、50、100 μg/ml)ox-LDL 组肾小球系膜细胞 LOX-1 mRNA 的表达;RT-PCR 观察空白组、ox-LDL 组(50 μg/ml)和 PIA 组(50 μg/ml ox-LDL+250 μg/ml PIA)肾小球系膜细胞 LOX-1、TGF-β₁ mRNA 的表达,ELISA 法检测上述 3 组肾小球系膜细胞培养上清中 TGF-β₁、纤连蛋白(FN)、IV 型胶原(Col IV)的含量。**结果:**RT-PCR 结果表明,25、50、100 μg/ml ox-LDL 组 LOX-1 mRNA 表达明显高于 0 μg/ml 组($P<0.05$),其中 50 μg/ml 组表达最高;50 μg/ml ox-LDL 组肾小球系膜细胞 LOX-1、TGF-β₁ mRNA 表达明显高于空白组和 PIA 组($P<0.01$)。ELISA 结果表明 50 μg/ml ox-LDL 组肾小球系膜细胞培养上清中 TGF-β₁、FN、Col IV 的含量明显高于空白组和 PIA 组($P<0.05$)。**结论:**ox-LDL 体外可促进大鼠肾小球系膜细胞表达 LOX-1、TGF-β₁ 及分泌细胞外基质,PIA 可抑制 ox-LDL 的上述作用,提示 LOX-1 可能介导了 ox-LDL 对肾小球系膜细胞的损伤,参与了肾小球硬化的发生和发展。

[关键词] 糖尿病肾病;肾小球硬化;氧化低密度脂蛋白;血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1;转化生长因子 β₁;细胞外基质

[中图分类号] R 587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0846-04

Oxidized low density lipoprotein-induced expression of transforming growth factor beta 1 and production of extracellular matrix in rat glomerular mesangial cells is mediated by lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1

DU Yue-guang^{1*}, CHAI Ke-fu², WAN Hai-tong² (1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Basic Theory of TCM Clinic, College of Basic Medical Sciences, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), transforming growth factor beta 1 (TGF-β₁), and secretion of extracellular matrix (ECM) in cultured rat glomerular mesangial cells (GMCs), and to investigate the influence of LOX-1 inhibitor polyinosinic acid (PIA) on the effect of ox-LDL. **Methods:** Rat glomerular mesangial cells were cultured *in vitro*. RT-PCR was employed to determine the LOX-1 mRNA expression in GMCs incubated with different concentrations of ox-LDL (0, 25, 50, 100 μg/ml). The expression of LOX-1 and TGF-β₁ mRNA was also determined by RT-PCR in the blank control group, ox-LDL (50 μg/ml) group and PIA (50 μg/ml ox-LDL+250 μg/ml PIA) group. The contents of TGF-β₁, fibronectin (FN), and collagen IV (Col IV) in the supernatants of the above 3 groups were determined by ELISA. **Results:** RT-PCR showed that LOX-1 mRNA expression in 25, 50 and 100 μg/ml ox-LDL groups was significantly higher than that of blank control group ($P<0.05$), with the highest expression found in the 50 μg/ml ox-LDL group; the expression of LOX-1 and TGF-β₁ mRNA was significantly higher in 50 μg/ml ox-LDL group than that in the other 2 groups ($P<0.01$). ELISA results demonstrated that the supernatant contents of TGF-β₁, FN and Col IV were significantly higher in 50 μg/ml ox-LDL group than those in the other 2 groups ($P<0.05$). **Conclusion:** Ox-LDL can upregulate the expression of LOX-1 and TGF-β₁ mRNA and the secretion of extracellular matrix in GMCs. Polyinosinic acid can antagonize the above effect of ox-LDL, suggesting that LOX-1 may participate in ox-LDL-induced GMCs damage and is involved in the development and progression of glomerulosclerosis.

[KEY WORDS] diabetic nephropathies; glomerulosclerosis; oxidized low density lipoprotein; lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1; transforming growth factor beta 1; extracellular matrix

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 846-849]

糖尿病肾病是以肾小球基底膜增厚和系膜区细胞外基质(ECM)进行性合成增加为特征的肾小球硬化。研究^[1]表明氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)在糖尿病肾病中起重要作用,可导致系膜细胞内脂质

[基金项目] 浙江省自然科学基金(M303727)。Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province(M303727)。

[作者简介] 杜月光,博士,副教授。

* Corresponding author. E-mail: duyueguang@163.com

沉积增多、细胞因子分泌增多、细胞外基质产生增多和降解减少,从而导致肾小球硬化。然而 ox-LDL 的作用是一个受体介导的过程,血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)是在牛主动脉内皮细胞上发现的 ox-LDL 受体。研究认为,血管内皮细胞表达的 LOX-1 可特异性地结合 ox-LDL,引起血管内皮细胞的激活、功能紊乱及损伤,在动脉粥样硬化(AS)病理变化过程中起着关键的作用。近年来发现 LOX-1 在肾小球内皮细胞和系膜细胞上也有表达,并且晚近较多的研究提示糖尿病两大主要并发症和糖尿病肾病存在共同的病理生理基础^[2]。由高脂血症引起的肾小球硬化的病理特征与 AS 极其相似。因此,本研究观察 ox-LDL 对大鼠系膜细胞表达 LOX-1、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)及分泌细胞外基质(ECM)的影响,并观察 LOX-1 抑制剂多聚肌苷酸(polyinosinic acid, PIA)对 ox-LDL 上述作用的影响,以探讨 LOX-1/ox-LDL 系统在肾小球硬化发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂 大鼠肾小球系膜细胞由杭州市中医院肾病中心王永军教授惠赠。ox-LDL 购自中国协和医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系;纤连蛋白(FN)、IV型胶原(Col IV)及 TGF- β_1 试剂盒(ELISA法)购自上海森雄科技有限公司;RNA抽提试剂盒购自 Promega 公司;RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;PCR 所用引物由上海生工公司合成。PIA 购自杭州万马药业有限公司。

1.2 大鼠肾小球系膜细胞的培养 肾小球系膜细胞培养于 10%胎牛血清的含 HEPES 的低糖 DMEM 培养液中,培养条件为 37℃,饱和湿度 5% CO₂,每 2~3 d 用含 0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA 的消化液消化传代。

1.3 不同浓度 ox-LDL 对肾小球系膜细胞 LOX-1 mRNA 表达的影响 大鼠肾小球系膜细胞经常规消化后以每孔 5×10^4 /ml 细胞接种于 24 孔板内,常规培养 24 h 后更换无血清培养基,使细胞周期同步化后,加入含 ox-LDL 的无血清培养基。ox-LDL 浓度梯度为 0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。每组 3 个复孔,分别刺激 24 h 后终止培养,收集细胞,RT-PCR 检测各浓度组 LOX-1 mRNA 表达。

1.4 PIA 对 ox-LDL 刺激作用的影响 肾小球系膜细胞经常规消化后接种于 24 孔板,每孔含细胞 5×10^4 /ml,每孔 1 ml,常规培养 24 h。更换无血清

培养基,继续孵育 24 h,使细胞周期同步于 G₀/G₁ 期,然后分 3 组,空白组:无血清 DMEM 培养液;ox-LDL 组:含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ox-LDL 无血清 DMEM 培养液;PIA 组:含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 和 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PIA 无血清 DMEM 培养液,每组设 3 个复孔。分别刺激 24 h 后,终止培养。收集细胞用于抽提 RNA,取培养上清-80℃保存待测。

1.5 RT-PCR 检测各组细胞 LOX-1、TGF- β_1 mRNA 的表达 以 TRIzol 试剂抽提细胞的总 RNA,使用逆转录试剂盒,以 Oligo(DT)为引物,取 2 μg 总 RNA 进行逆转录反应,之后以 50 μl 反应体系进行体外 PCR 扩增,以 β -actin 作为内参。TGF- β_1 引物序列为:上游 5'-CAC CAT CCA TGA CAT GAA CC-3';下游 5'-TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC-3',扩增产物大小为 385 bp。LOX-1 引物序列为:上游 5'-GAC TGG ATC TGG CAT AAA GA-3';下游 5'-CCT TCT TCT TCT GAC ATA TGC TG-3',扩增产物大小为 328 bp。 β -actin 引物序列为:上游 5'-TTC CAG CCT TCC TTC CTG G-3',下游 5'-TTG CGC TCA GGA GGA GCA AT-3',扩增产物大小为 206 bp。反应条件为预变性 94℃ 1 min;然后进入 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min, LOX-1 和 β -actin 共 35 个循环, TGF- β_1 共 27 个循环;反应结束前 72℃ 10 min 以充分延伸。PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照并进行半定量分析, β -actin 值校正,得出目的条带与内参照条带的光密度比值。

1.6 肾小球系膜细胞培养上清中 TGF- β_1 、FN、Col IV 的含量 收集细胞培养上清液,参照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测待测样品中 TGF- β_1 、Col IV 和 FN 含量。

1.7 统计学处理 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件对实验资料进行统计学处理,采用单因素方差分析比较各组间差异。

2 结果

2.1 ox-LDL 对大鼠系膜细胞表面 LOX-1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,与对照组比较,肾小球系膜细胞经 ox-LDL(25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激 24 h 后,LOX-1 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$ 或 0.01),50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组升高最明显(图 1)。

2.2 PIA 对 ox-LDL 刺激作用的影响

2.2.1 PIA 对系膜细胞 LOX-1、TGF- β_1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果表明,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 组肾小球系膜细胞 LOX-1、TGF- β_1 mRNA 表达明

显高于空白对照组和 PIA 组($P < 0.01$,图 2)。

表 1 PIA 对大鼠肾小球系膜细胞

分泌 TGF- β_1 、Col IV、FN 的影响

Tab 1 Effects of PIA on TGF- β_1 , Col IV and FN secretion by GMCs treated with ox-LDL

Group	TGF- β_1	Col IV	FN
	(ρ_B /pg · ml ⁻¹)	(ρ_B /ng · ml ⁻¹)	(ρ_B /ng · ml ⁻¹)
Control	34.22 ± 1.04	26.23 ± 0.72	103.15 ± 8.14
ox-LDL	41.22 ± 1.32**	30.05 ± 0.96*	262.65 ± 1.63**
PIA	32.25 ± 1.75 $\Delta\Delta$	19.18 ± 0.77 $\Delta\Delta$	71.65 ± 0.79 $\Delta\Delta$

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

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs ox-LDL (50 μ g/ml) group

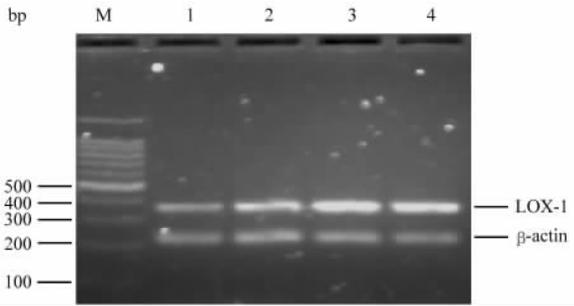


图 1 不同浓度 ox-LDL 对大鼠肾小球系膜细胞 LOX-1 mRNA 表达的影响

Fig 1 Effect of ox-LDL at different concentrations on LOX-1 mRNA expression in GMCs

M: 100 bp marker; 1: 0 μ g/ml ox-LDL; 2: 25 μ g/ml ox-LDL; 3: 50 μ g/ml ox-LDL; 4: 100 μ g/ml ox-LDL

3 讨论

LOX-1 是由 Sawamura 等^[3]于 1997 年首次在牛主动脉内皮细胞上发现的 ox-LDL 的受体,后来发现 VSMC、巨噬细胞也可以诱导表达。LOX-1 属于 II 型单链跨膜蛋白,有一个短的 N 端胞质亲水结构和一个长的 C 端胞外亲水结构域,中间为疏水区域,从结构上看属于 C 型选择素家族。LOX-1 作为 ox-LDL 的受体与以往的清道夫受体(如 CD36)不同,它具有高度的配体特异性,可以结合、内吞、降解 ox-LDL,但对天然低密度脂蛋白(native LDL, nLDL)和乙酰化低密度脂蛋白(acetyl LDL, AC-LDL)无作用^[4-5]。这表明 ox-LDL 与 LOX-1 的结合是特异的,此过程可被 LOX-1 阻滞剂 PIA 和角叉菜胶抑制,但不被岩藻多糖或甲基化牛血清白蛋白抑制。许多研究^[6]表明 LOX-1 在动脉粥样硬化的形成中起重要作用:在离体实验中,ox-LDL、TNF- α 、TGF- β_1 、血管紧张素等刺激因素可以诱导 LOX-1 快速表达;在体实验研究发现,一些促动脉粥样硬化因素,如高血压、高胆固醇血症、糖尿病等可诱导其表达;动脉粥样斑块内 LOX-1 表达增加,在粥样斑块核心新生血管亦有大量表达。相反,减少其表达则可减轻 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤,进而抑制动脉粥样硬化的发生^[7-8]。

有研究^[9]表明 ox-LDL/LOX-1 系统不仅作用于动脉粥样硬化,在高血压性肾小球硬化的过程中也起作用。该研究发现 LOX-1 在肾脏的表达亢进,能进一步增加肾小球内压,并通过系膜细胞过度摄取 ox-LDL,产生与血管平滑肌相似反应,即系膜细胞增生和系膜基质产生过多,进入肾小球硬化的前期,进而产生黏附分子、生长因子及细胞因子等异常增加,损伤肾小球及间质,促进肾脏硬化。最近的研

图 2 PIA 对大鼠肾小球系膜细胞 LOX-1(A)、TGF- β_1 (B) mRNA 表达的影响

Fig 2 Effect of PIA on ox-LDL-induced LOX-1(A) and TGF- β_1 (B) mRNA expression in GMCs

M: Marker; 1: Control group; 2: ox-LDL group; 3: PIA group

2.2.2 PIA 对肾小球系膜细胞分泌 TGF- β_1 、FN、Col IV 的影响 50 μ g/ml ox-LDL 组肾小球系膜细胞培养上清中 TGF- β_1 含量明显高于空白对照组和 PIA 组($P < 0.01$);50 μ g/ml ox-LDL 组肾小球系膜细胞培养上清中 FN 含量明显高于空白对照组和 PIA 组($P < 0.05$ 或 0.01),Col IV 的含量亦明显高于空白对照组和 PIA 组($P < 0.01$)。详见表 1。

究^[10-11]发现,LOX-1在慢性肾功能衰竭及移植肾的血管损伤等发展过程中也起关键的作用。本研究发现在系膜细胞上 LOX-1 有少量表达;ox-LDL 作用后,可浓度依赖性的上调 LOX-1 表达,在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时最高。这说明对于系膜细胞而言,LOX-1 也是其结合或内吞 ox-LDL 的重要受体。但当 ox-LDL 浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, LOX-1 表达量比 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时下降,这与 Mehta 等^[12]在内皮细胞中研究一致,但机制还不清楚。

肾小球硬化与动脉粥样硬化在病理改变和病理机制上很相似。许多实验证明脂质代谢紊乱是导致肾小球硬化的重要因素,其中 ox-LDL 及其受体起关键作用。研究表明 ox-LDL 可以通过刺激系膜细胞增生和肾小球细胞外基质的分泌增多,引起肾小球硬化。为了进一步说明 LOX-1 是否介导 ox-LDL 引起的纤维化作用,本实验选择 FN、IV 型胶原等 ECM 成分作为观察指标,观察 LOX-1 阻滞剂 PIA 对 ox-LDL 诱导的系膜细胞分泌 ECM 的影响。结果显示,ox-LDL 可以诱导系膜细胞分泌细胞外基质增多,相反,PIA 的应用则明显抑制了 ox-LDL 对系膜细胞诱导的 ECM 的分泌。此结果与内皮细胞、平滑肌细胞中的作用一致,说明 LOX-1 不仅在内皮细胞、平滑肌细胞中介导 ox-LDL 的作用,在系膜细胞中也起重要作用,阻滞 LOX-1 的作用对防止 ox-LDL 引起的肾纤维化有重要作用。

TGF- β_1 在细胞外基质的积聚中起着重要作用。本实验以前的研究发现 ox-LDL 可以刺激促纤维化因子 TGF- β_1 表达增加。本研究进一步从基因水平和蛋白水平观察 PIA 对 TGF- β_1 表达的影响。结果同样显示,PIA 能下调 ox-LDL 诱导的系膜细胞 TGF- β_1 的表达,其分泌量也减少。

以上结果提示,LOX-1 在 ox-LDL 诱导的肾小球纤维化中可能起重要作用,阻断该受体也许可以作为防治肾小球硬化的措施之一。

[参考文献]

[1] Nosadini R, Tonolo G. Blood glucose and lipid control as risk factors in the progression of renal damage in type 2 diabetes

[J]. *J Nephrol*, 2003, 16(Suppl 7): S42-S47.

- [2] Keane W F, Kasiske B L, O'Donnell M P. Hyperlipidemia and the progression of renal disease [J]. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47: 157-160.
- [3] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, 386: 73-77.
- [4] Kume N, Moriwaki H, Katalka H, et al. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 323-327.
- [5] Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, et al. Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 1541-1547.
- [6] Mehta J L, Chen J, Hermonat P L, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69: 36-45.
- [7] Mehta J L, Sanada N, Hu C P, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet [J]. *Circul Res*, 2007, 100: 1634-1642.
- [8] Oka K M, Yasuhara M, Suzumura K, et al. Antioxidants suppress plasma levels of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-ligands and reduce atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48: 177-183.
- [9] Ando K, Fujita T. Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the development of hypertensive organ damage [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2004, 8: 178-182.
- [10] Ueno T, Kaname S, Takaichi K, et al. LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, was upregulated in the kidneys of chronic renal failure rats [J]. *Hypertens Res*, 2003, 26: 117-122.
- [11] Braäen J H, Nieminen-Kelhä M, Markmann D, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor (LOX-1)-mediated pathway and vascular oxidative injury in older-age rat renal transplants [J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1583-1594.
- [12] Mehta J L, Li D Y. Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248: 511-514.

[收稿日期] 2007-03-28

[修回日期] 2007-06-18

[本文编辑] 尹 茶, 贾泽军