

[文章编号] 1000-4718(2009)10-2056-03

# 高糖高脂对系膜细胞产生细胞外基质及 PAF 的影响

周素娴, 雷闽湘<sup>△</sup>, 赵晋晋, 吴静

(中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008)

**[摘要]** 目的: 探讨高糖高脂对系膜细胞产生细胞外基质(ECM)和血小板活化因子(PAF)的影响。方法: 人系膜细胞单独培养, 分为对照组、甘露醇组、高糖高脂组、PAF受体拮抗剂 BN52021 + 高糖高脂组, ELISA法检测各组细胞上清液中纤维连接蛋白(Fn)、IV型胶原(Col IV)、血小板活化因子(PAF)含量, 实时荧光定量检测系膜细胞血小板活化因子受体(PAF-R) mRNA 表达。结果: 高糖高脂可引起系膜细胞培养上清液 Fn 和 Col IV 含量升高(均  $P < 0.05$ ), BN52021 可抑制高糖高脂引起的 Fn 和 Col IV 含量升高( $P < 0.05$ ); 高糖高脂可引起系膜细胞培养上清液 PAF 含量升高( $P < 0.05$ ); 高糖高脂可上调系膜细胞 PAF-R mRNA 表达( $P < 0.05$ )。结论: 高糖高脂刺激系膜细胞 Fn、Col IV、PAF 产生, 高糖高脂刺激的 ECM 分泌增加部分与 PAF 有关; 高糖高脂可促进系膜细胞 PAF-R 基因表达, 使 PAF 的生物效应进一步放大。

**[关键词]** 高糖; 高卵磷脂; 血小板活化因子; BN52021; 系膜细胞

**[KEY WORDS]** High concentration of glucose; High concentration of lysophosphatidylcholine; Platelet activating factor; BN52021; Mesangial cells

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症之一。系膜细胞是 DN 中主要的效应细胞。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)具有广泛的生物学作用, 可经多种途径损伤肾组织。高糖高脂同时作用对肾小球系膜细胞产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及 PAF 的影响, 目前国内外尚未见报道。为此, 我们在高糖高脂条件下培养系膜细胞, 探讨高糖高脂对系膜细胞产生细胞外基质(ECM)及 PAF 的影响, 进一步研究 DN 的发病机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMCs)由东南大学附属中大医院内分泌科孙子林教授惠赠, 为 T-SV40 及 H-ras 原癌基因转染的永生系, 保持了正常人肾小球系膜细胞基本形态和生物学特性。D-葡萄糖(Biomol), 溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC, Sigma), PAF受体拮抗剂 BN52021(Sigma), 人 IV 型胶原和人纤维连接蛋白 ELISA 试剂盒(均购自晶美生物公司), 人血小板活化因子 ELISA 试剂盒(ADL), 引物(上海生工生物工程公司)。

### 2 细胞培养与分组

细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度无菌培养箱。HMCs 单培养模型: HMCs 80% 融合时, 用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化液消化后制成细胞悬液以  $2 \times 10^8$  cells/L 浓度传至 6 孔板中单独培养。待细胞呈融合状态后更换无血清培养基, 同步化 12 h, 进入静止期后分组为: (A) 对照组(5.5 mmol/L D-葡萄糖); (B) 甘露醇(mannitol)组(24.5 mmol/L 甘露醇); (C) 高糖高脂组(30 mmol/L D-葡萄糖 + 20 mg/L LPC); (D) BN52021 + 高糖

高脂组(30 mmol/L D-葡萄糖 + 20 mg/L LPC + 50 μmol/L BN52021), 实验组加入 BN52021(工作浓度: 50 μmol/L)预处理 1 h 后, 加入 D-葡萄糖、LPC, 工作浓度分别为 30 mmol/L、20 mg/L。各组细胞培养 24 h, 实验均重复 3 次。

### 3 纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)、IV型胶原(collagen IV, Col IV)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)测定

分别按试剂盒说明书测定各组细胞上清液中 Fn、Col IV、PAF 含量。

### 4 实时荧光定量检测系膜细胞 PAF 受体(PAF-R)基因表达

PAF-R 引物序列: 上游引物 5' - TGCCCTGCTACAG-GCACCA - 3', 下游引物 5' - TGCTGTAAACAATCGGGAAGAG - 3'。人 GAPDH 引物序列: 上游引物 5' - ACACCCACTC-CTCCACCTTT - 3', 下游引物 5' - TTACTCCTTGAGGCCAT-GT - 3'。用 Trizol 按一步法提取系膜细胞总 RNA, 取总 RNA 3 μg 进行逆转录反应, 步骤按操作说明书进行, 逆转录的 cDNA 置 -20 °C 保存。采用 SYBR Green I 法进行实时荧光定量 PCR, 以 20 μL 反应体系进行 PCR 扩增, 扩增条件为: PAF-R, 95 °C 10 min 后, 进行 40 个循环: 95 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 15 s。采用 GAPDH 为内参照, 以对照组为对照。2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法来分析数据:  $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{样品} - \Delta Ct_{对照}$ 。计算 2<sup>-ΔΔCt</sup> 的数值即为实验组目的基因相对于对照组的表达量的变化倍数。

### 5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 独立样本两组间差异比较用 *t* 检验; 组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用 SNK 法。

[收稿日期] 2008-11-19

[修回日期] 2009-03-16

△通讯作者 E-mail: lmx618@medmail.com.cn

## 结 果

### 1 高糖高脂对系膜细胞 Fn、Col IV 的影响

与对照组相比,高糖高脂可引起细胞上清液 Fn 和 Col IV 显著升高(均  $P < 0.05$ );BN52021 可显著抑制高糖高脂引起的 Fn 和 Col IV 升高( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2 高糖高脂对 PAF 的影响

与对照组相比,高糖高脂可引起细胞上清液 PAF 含量显著升高( $P < 0.05$ );BN52021 不能抑制高糖高脂引起的 PAF 含量升高( $P > 0.05$ ),见表 2。

### 3 高糖高脂对系膜细胞 PAF-R 基因表达的影响

与对照组相比,高糖高脂可上调系膜细胞 PAF-R mRNA 表达( $P < 0.05$ );BN52021 不能抑制高糖高脂上调的系膜细胞 PAF-R mRNA 表达( $P > 0.05$ ),见图 1。

表 1 高糖高脂对系膜细胞 Fn 和 Col IV 影响

Tab 1 Effects of high glucose and LPC on Fn and Col IV content in mesangial cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Group	Fn(mg/L)	Col IV( $\mu$ g/L)
Control	3.90 $\pm$ 0.43	4.54 $\pm$ 0.74
Mannitol	3.95 $\pm$ 0.29	4.12 $\pm$ 0.62
High glucose + LPC	7.89 $\pm$ 0.36*	16.32 $\pm$ 1.54*
BN52021 + high glucose + LPC	5.23 $\pm$ 0.32* $\Delta$	10.40 $\pm$ 0.72* $\Delta$

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs high glucose + LPC.

表 2 高糖高脂对系膜细胞产生 PAF 的影响

Tab 2 Effects of high glucose and LPC on PAF in mesangial cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Group	PAF(ng/L)
Control	48.72 $\pm$ 2.55
Mannitol	48.86 $\pm$ 1.34
High glucose + LPC	101.10 $\pm$ 3.00*
BN52021 + high glucose + LPC	101.80 $\pm$ 5.85*

\*  $P < 0.05$  vs control.

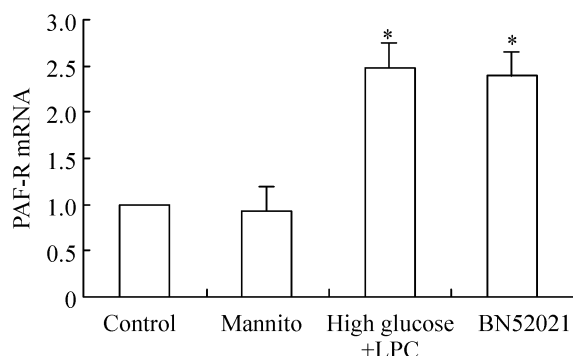


Fig 1 Effects of high glucose and LPC on PAF-R mRNA expression in mesangial cells.  $\bar{x} \pm s, n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control.

图 1 高糖高脂对系膜细胞 PAF-R mRNA 表达差异倍数 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 的影响

## 讨 论

高血糖是糖尿病代谢紊乱最重要的特点,而 McGarry

等<sup>[1]</sup>研究显示,脂代谢异常为 2 型糖尿病及其并发症的原发病理生理过程。DN 的发生与 DM 病程中的代谢紊乱,如糖、脂代谢紊乱密切相关<sup>[2]</sup>。ECM 的过多沉积是 DN 肾脏进展性纤维化的病理基础。我们的研究发现,高糖高脂可促进系膜细胞 Fn 和 Col IV 产生增加,而系膜细胞 Fn 和 Col IV 过度表达,直接导致 ECM 的积聚,进一步支持高糖高脂是 DN 发生、发展的危险因素。

实验发现高糖高脂条件下,系膜细胞培养上清液 PAF 增高,表明高糖高脂可促进系膜细胞分泌 PAF。PAF 是一种与花生四烯酸代谢密切相关的脂类双分子聚合物,可经多种途径损伤肾组织。将 PAF 注射至离体大鼠肾时,可增强血管通透性,改变肾小球滤过膜屏障大小和电荷选择性,加重蛋白尿<sup>[3]</sup>。PAF 可诱导系膜细胞及中性粒细胞,使其细胞黏附因子(ICAM-1, LFA-1, Mac-1)合成和表达增强<sup>[4]</sup>。PAF 可诱导系膜细胞产生活性氧,加重肾脏损害<sup>[5]</sup>。Ruiz-Ortega 等<sup>[6]</sup>研究发现,PAF 以剂量依赖方式上调系膜细胞纤维连接蛋白和 IV 型胶原基因表达。

同时在中也发现,PAF 受体拮抗剂(BN52021)对高糖高脂刺激的 PAF 增加无影响,可减少细胞上清液的 Fn 和 Col IV 含量,但仍高于对照组。提示 BN52021 对 PAF 的分泌无明显影响,其可部分减少高糖高脂刺激的系膜细胞 Fn 和 Col IV 分泌增加,具有肾脏保护作用,高糖高脂刺激的 ECM 分泌增加部分与 PAF 有关。

我们的研究还发现高糖高脂可上调系膜细胞 PAF-R 基因表达,已经证实,肾脏细胞 PAF-R 基因启动子上存在核转录因子 NF- $\kappa$ B 结合位点<sup>[7]</sup>,NF- $\kappa$ B 活化后进入细胞核,可结合到 PAF-R 基因启动子上,促进 PAF-R 基因转录<sup>[8]</sup>。高糖及 ox-LDL 均可促进体外培养的系膜细胞 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[9,10]</sup>。所以我们推测,体外培养的条件下,高糖高脂可能通过激活 NF- $\kappa$ B 途径,促进 PAF-R 基因转录。高糖高脂不但促进肾小球系膜细胞产生 PAF,而且通过促进系膜细胞表达 PAF-R,使 PAF 的效应进一步放大。

综上所述,在糖尿病高糖合并脂代谢紊乱的情况下,可促进 DN 的发生和发展;利用合适的阻断剂阻断 PAF 的作用,可能为 DN 的防治提供新的思路。

## [参 考 文 献]

- [1] McGarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2001, 50(Suppl 2):6.
- [2] 姜华军,朱忠华,刘建社,等.胰岛素对高糖培养的人系膜细胞表达 SGK1 及合成细胞外基质的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(3):330-334.
- [3] Marques SA, Dy LC, Southall MD, et al. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3):1026-1035.

(下转第 2072 页)

virulence factors are required for *Staphylococcus aureus* - induced apoptosis in endothelial cells [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(8):1087 - 1097.

- [23] Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, et al. Fas and fas ligand are up - regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5):1783 - 1796.
- [24] Kim YM, Kim TH, Chung HT, et al. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha - induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S - nitrosylation of caspase - 8 [J]. *Hepatology*, 2000, 32(4 Pt 1):770 - 778.
- [25] Mohammed M, Sayeed AM. Immune mechanisms and im-

muno - therapy in sepsis: where do we stand? [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2001, 17(11): 1100 - 1101.

- [26] Sriskandan S, Altmann D. The immunology of sepsis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2):211 - 223.
- [27] Qin S, Wang H, Yuan R, et al. Role of HMGB1 in apoptosis - mediated sepsis lethality [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7):1637 - 1642.
- [28] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE, et al. Role of apoptotic cell death in sepsis [J]. *Scand J Infect Dis*, 2003, 35(9):585 - 592.
- [29] Wesche DE, Lomas - Neira JL, Perl M, et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(2):325 - 337.

(上接第 2057 页)

- [4] Brennan DC, Jevnikar AM. Mesangial cell accessory function; mediation by intercellular adhesion molecule - 1 [J]. *Kidney Int*, 1990, 38(6):1039 - 1046.
- [5] 胡明昌, 王晓燕, 甘卫华, 等. 血小板活化因子介导肾小球系膜细胞产生活性氧的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 1995, 11(1):62 - 65.
- [6] Ruiz - Ortega M, Bustos C, Plaza JJ, et al. Overexpression of extracellular matrix proteins in renal tubulointerstitial cells by platelet - activating - factor stimulation [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13(4):886 - 892.
- [7] Mutoh H, Bito H, Minami M, et al. Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet - activating factor receptor [J]. *FEBS Lett*, 1993, 322(2):129 - 134.
- [8] Hourton D, Stengel D, Chapman MJ, et al. Oxidized low

density lipoproteins downregulate LPS - induced platelet - activating factor receptor expression in human monocyte - derived macrophages; implications for LPS - induced nuclear factor kappa B activity [J]. *Eur Biochem*, 2001, 268(16):4489 - 4496.

- [9] 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 -  $\kappa$ B - dependent [J]. *Diabetologia*, 2000, 43(12): 1544 - 1553.
- [10] Lan Y, Zhou Q, Wu ZL. NF - kappa B involved in transcription enhancement of TGF - beta 1 induced by ox - LDL in rat mesangial cells [J]. *Clin Med J (Engl)*, 2004, 117(2):225 - 230.

(上接第 2061 页)

- [28] Motegi A, Kuntz K, Majeed A, et al. Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(4):1424 - 1433.
- [29] Watson IR, Irwin MS. Ubiquitin and ubiquitin - like modifications of the p53 family [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(8):655 - 666.
- [30] Carter S, Bischof O, Dejean A, et al. C - terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53 [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(4):428 - 435.
- [31] Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis [J]. *Mol Cells*, 2006, 22(3):247

- 253.

- [32] Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, et al. SUMO and estrogen receptors in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(2):195 - 210.
- [33] Ganesan AK, Kho Y, Kim SC, et al. Broad spectrum identification of SUMO substrates in melanoma cells [J]. *Proteomics*, 2007, 7(13):2216 - 2221.
- [34] 王宏, 吴金民, 曹厚军, 等. uPA 与 NF -  $\kappa$ B p65 在乳腺癌组织表达的相关性研究及临床病理意义 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(6):1218 - 1221.
- [35] Mabb AM, Miyamoto S. SUMO and NF - kappa B ties [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15):1979 - 1996.