

去甲斑蝥素对高糖刺激的 HK-2 细胞 FN, Col IV 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达的影响

陈琼^{1,2}, 李瑛¹, 罗俊辉¹, 杨阳¹, 李军¹, 孙林¹, 肖力¹, 许向青¹, 彭佑铭¹, 刘伏友¹

(1. 中南大学湘雅二医院肾内科, 中南大学肾脏病研究所, 长沙 410011;

2. 同济大学附属第十人民医院肾内科, 上海 200072)

[摘要] 目的: 观察去甲斑蝥素(NCTD)对高糖刺激的 HK-2 细胞外基质和 TGF- β 1 表达的影响。方法: 常规培养 HK-2 细胞, 无血清 DMEM 培养基同步培养 24 h, 细胞分为正常葡萄糖组(C, D-glucose 5.5 mmol/L)、甘露醇对照组(M, 5.5 mmol/L D-glucose+24.5 mmol/L mannitol)、高糖组(HG, 30 mmol/L D-glucose)、高糖+NCTD 干预组(30 mmol/L D-glucose+0.5~40 mg/L NCTD)。台盼蓝排斥实验检测 NCTD 对高糖刺激的细胞毒性。MTT 法检测 NCTD 对高糖刺激的细胞增殖的影响。收集培养 6, 24, 48 h 后细胞总 RNA 及蛋白, 用 RT-PCR 检测细胞 FN, Col IV 和 TGF- β 1 mRNA 的表达, 采用 Western 印迹检测 FN, Col IV 和 TGF- β 1 蛋白的表达。结果: 不同浓度 NCTD 作用 72 h 后, 浓度超过 5 mg/L 的 NCTD 对高糖环境下的 HK-2 细胞有明显的毒性。RT-PCR 和 Western 印迹结果显示: 30 mmol/L D-葡萄糖可引起 HK-2 细胞 FN, Col IV 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白水平的升高($P<0.05$), 而 5 mg/L NCTD 可抑制高糖刺激的 FN, Col IV 和 TGF- β 1 的表达($P<0.05$)。相同渗透浓度的 D-甘露醇组对上述指标均无影响($P>0.05$)。结论: NCTD 能下调 HK-2 细胞 FN, Col IV 及 TGF- β 1 的表达。

[关键词] 去甲斑蝥素; 纤粘连蛋白; 胶原 IV; 转化生长因子- β 1

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.03.012

Effect of norcantharidin on the expression of FN, Col IV and TGF- β 1 mRNA and protein in HK-2 cells induced by high glucose

CHEN Qiong^{1,2}, LI Ying¹, LUO Junhui¹, YANG Yang¹, LI Jun¹, SUN Lin¹,
XIAO Li¹, XU Xiangqing¹, PENG Youming¹, LIU Fuyou¹

(1. Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Institute of Nephrology, Central South University, Changsha 410011,

2. Department of Nephrology, Tongji University Affiliated Tenth People's Hospital, Shanghai 200072, China)

ABSTRACT

Objective: To observe the effect of norcantharidin (NCTD) on the expression of mRNA and protein of fibronectin (FN), collagen IV (Col IV) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in human kidney proximal tubular epithelial (HK)-2 cells induced by high glucose.

Methods: HK-2 cells were incubated with serum-free DMEM for 24 h to synchronize cell growth, and then the cells were divided into 4 groups: Group C (5.5 mmol/L D-glucose), Group M (5.5 mmol/L D-glucose + 24.5 mmol/L-mannitol), Group HG (30 mmol/L D-glucose), and Group HG + NCTD (30 mmol/L D-glucose + 0.5-40 mg/L NCTD). Cytotoxicity of HK-2 cells induced by high glucose of NCTD was detected by Trypan blue dye exclusive assay. The effect of NCTD on the proliferation of HK-2 cells in high glucose was determined

收稿日期 (Date of reception): 2011-03-20

作者简介 (Biography): 陈琼, 博士, 住院医师, 主要从事肾脏纤维化方面的研究。李瑛为共同第一作者。

通信作者 (Corresponding author): 李军, Email: smilecq_0@126.com; 刘伏友, Email: xyesk@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (81100486); 湖南省自然科学基金重点项目 (10JJ2011); 中南大学代谢综合征研究中心基金 (DY-2008-02-03)。This work was supported by National Natural Science Foundation of China (81100486), the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (10JJ2011) and the scientific project of Research Center of Metabolic Syndrome in Central South University, China (DY-2008-02-03).

by MTT. The cells were collected to extract total RNA and protein at 6, 24 and 48 h after the incubation. The expression of FN, Col IV and TGF- β 1 mRNA was examined by RT-PCR, and FN, Col IV and TGF- β 1 protein was analyzed by Western blot.

Results: Trypan blue dye exclusive assay showed NCTD concentrations over 5 mg/L were rather toxic in HK-2 cells. The proliferation of HK-2 cells in high glucose was interrupted by interfered with 5 mg/L NCTD as measured by MTT ($P<0.05$). NCTD at 5 mg/L had a stronger inhibitory effect than NCTD at 2.5 mg/L. Real-time PCR and Western blot showed that the mRNA and protein expression of FN, collagen IV and TGF- β 1 increased in HK-2 cells treated with high glucose ($P<0.05$), while that in cells treated by NCTD was dramatically inhibited ($P<0.05$). No change in these parameters was detected in the 30 mmol/L *D*-mannitol control group ($P>0.05$).

Conclusion: NCTD can downregulate FN, collagen IV and TGF- β 1 mRNA and protein expression in HK-2 cells stimulated by 30 mmol/L *D*-glucose..

KEY WORDS norcantharidin; fibronectin; collagen IV; TGF- β 1

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 已成为终末期肾衰竭的重要原因之一。DN 早期即可出现肾小管间质纤维化, 且不依赖肾小球病变直接导致肾功能恶化^[1-3]。以往的研究认为糖尿病肾病的病变主要是肾小球的硬化, 但近期的大量研究^[1-4]证实糖尿病肾损伤同时也发生在肾小管, 在糖尿病肾病的早期即可观察到肾小管细胞的氧化损伤和凋亡。在病理状态下, 损伤的肾小管上皮细胞不仅是被动的受害靶细胞, 还主动活跃地参与肾间质纤维化的进展。Iwano 等^[5]证实产生基质的肾间质成纤维细胞 36% 是肾小管上皮来源的。阻止 DN 肾小管间质纤维化已成为当前的研究热点, 然而目前尚没有理想的逆转 DN 肾小管间质纤维化的药物。

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是人工合成的斑蝥素衍生物。本课题组以往研究^[6-11]发现: NCTD 能减轻蛋白负荷大鼠和梗阻性肾病大鼠以及糖尿病肾病大鼠模型的肾间质纤维化程度; 体外实验证实 NCTD 能抑制白蛋白刺激的肾小管上皮细胞 NF- κ B 和 CTGF (connective tissue growth factor) 的表达, 阻止 TGF- β 1 介导的肾小管上皮细胞转分化。故推测 NCTD 是一种极有前景的抗肾间质纤维化药物, 但 NCTD 对 DN 肾小管间质纤维化的作用尚不清楚。

本实验旨在观察 NCTD 对高糖刺激的 HK-2 (human kidney proximal tubular epithelial cell line) 细胞细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 纤粘连蛋白 (fibronectin, FN), IV 型胶原 (collagen IV, Col IV) 和 TGF- β 1 表达的影响, 为开发延缓 DN 肾功能恶化的有效药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

人近端肾小管上皮细胞株 HK-2 购于美国 ATCC 公司, 为人近曲肾小管上皮细胞的永生系, 它保持了肾小管上皮细胞基本的生物学特性。

1.1.2 主要试剂

去甲斑蝥素购自北京双鹤高科天然药物有限责任公司, DMEM 培养基、Opti-MEM I 培养基为美国 Gibco 公司产品, 胰酶、*D*-葡萄糖为美国 Sigma 公司产品; 胎牛血清为杭州四季青公司产品; 兔抗人 (大、小鼠) FN 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, 兔抗人 (大、小鼠) Col IV 多克隆抗体为英国 Abcam 公司产品, 兔抗人 (大、小鼠) TGF- β 1 多克隆抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品, 细胞蛋白裂解液 RIPA 购自北京鼎国生物公司, 细胞浆蛋白抽提试剂盒购自碧云天生物公司, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 为美国 Fermentas 公司产品, ECL 显影剂、PVDF 膜为美国 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 台盼蓝排斥实验检测 NCTD 在高糖环境下对 HK-2 细胞毒性

HK-2 细胞均用低糖 DMEM+10%FBS 培养基进行培养, 在 37℃, 5%CO₂ 条件下生长至 80% 汇合时进行传代。倾倒去除培养器皿内的培养基, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 弃去 PBS, 根据培养面积加入适量 0.1% 胰酶溶液消化, 37℃ 放置 3~5 min, 并在倒置显微镜下观察, 待绝大部分细胞变圆即加入培养基终止消化, 吹吸几次以离散成团

的细胞, HK-2 细胞按 1:4~1:5 比例进行传代。传代后的细胞于 37℃, 5%CO₂ 培养 24 h 后换液一次, 以去除消化后死亡的细胞, 以后每 2 天换液一次。将 HK-2 细胞接种于 24 孔板培养至亚融合状态时, DMEM 无血清培养液同步 24 h; 换用 30 mmol/L D-葡萄糖 + 浓度梯度的 NCTD(0~40.0 mg/L) 干预, 10% 胎牛血清培养基培养 24 h。细胞分组为: 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激组 (C), 30 mmol/L D-葡萄糖刺激组 (HG), 30 mmol/L D-葡萄糖 + NCTD 干预组, NCTD 终浓度为 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mg/L (结合参考文献 [6] 以及前期预实验选择 NCTD 预干预 15 min 后再加入 30 mmol/L D-葡萄糖刺激), 为排除渗透压的影响而以 5.5 mmol/L D-葡萄糖 + 24.5 mmol/L D-甘露醇刺激组 (M) 为对照; 各组设 3 个复孔。吸取孔内培养基上清液收集至离心管中, PBS 清洗 2 次, 胰酶消化, 各孔消化后的细胞悬液与上清液混合后离心, 制备单个细胞悬液, 稀释为 1 × 10⁶/mL; 染色: 取 9 滴细胞悬液移入小试管中, 加 1 滴 0.4% 台盼蓝溶液, 混匀。随机选取 5 个视野, 镜下观察, 死细胞被染成淡蓝色, 而活细胞拒染。在 3 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞。细胞活力: 活细胞率 = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%。

1.2.2 细胞增殖实验 (MTT) 检测 NCTD 对高糖环境下 HK-2 细胞增殖的影响

将 HK-2 细胞以 10% 胎牛血清的培养基制成 1 × 10⁴/mL 悬液接种于 96 孔板, 每孔加 100 μL; 培养至亚融合状态时, DMEM 无血清培养液同步 24 h; 根据台盼蓝排斥实验设定 NCTD 终浓度为 0, 0.5, 2.5, 5.0 mg/L。30 mmol/L D-葡萄糖, 10% 胎牛血清培养基培养 24, 48, 72 h, 不加药物组为对照组, 各组设 3 个复孔; 然后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL, 37℃, 5%CO₂ 继续孵育 4 h 后终止培养, 小心吸弃各孔内培养上清液; 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使甲瓚充分溶解。在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定各孔 A 值, 以空白孔调零。

1.2.3 RT-PCR 检测 NCTD 对高糖刺激的 HK-2 细胞产生 FN, Col IV, TGF-β1 基因水平的影响

用 TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 提供的方法抽提细胞总 RNA, 按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书的步骤进行反转录合成 cDNA。运用荧光染料法检测 NCTD 对 HK-2 细胞中 FN, Col IV, TGF-β1 基因水平的影响。通过测定 PCR 扩增过程中与双链 DNA 非特异性结合的 SYBR GREEN 染料强度反映 PCR 产物表达量。每次实验设 3 个复孔, 独立实验重复 3 次。引物序列由上海英俊生物技术有限公司合成, FN 引物序列: 上游为 5'-TGGAGGAAGCCGAGTTT-3',

下游为 5'-CAGCGGTTTGCGATGGTA-3'; Col IV 引物序列: 上游为 5'-GGCCCCTGCTGAAGCGTT-3', 下游为 5'-GATTCCACGAGCCCCTTG-3'; TGF-β1 引物序列: 上游为 5'-CGAGGTGACCTGGGCA CCATCCATGAC-3', 下游为 5'-CTGCTCCACCTT GGGCTTGGCACCAC-3'; β-actin 引物序列: 上游为 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3', 下游为 5'-GAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; PCR 反应程序: 50℃ 2 min 1 个循环; 95℃ 10 min, 1 个循环; 95℃ 10 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 个循环; 72℃ 10 min 终止反应。

实验同时以双蒸水代替模板为阴性对照。以管家基因 β-actin 的转录数量作为内源性 RNA 参照。以 2^{-ΔΔCt} 表示基因的相对表达量: 待测基因的相对表达量 = 2^{-ΔΔCt}, 其中 ΔΔCt = ΔCt 样品 - ΔCt 基准 = (样品待测基因 Ct 值 - 样品 β-actin Ct 值) - (基准待测基因 Ct 值 - 基准 β-actin Ct 值)。

1.2.4 Western 印迹检测 NCTD 对高糖刺激的 HK-2 细胞中 FN, Col IV, TGF-β1 蛋白表达的影响

在收集的细胞中加入苯甲基磺酰氟 (PMSF)+RIPA 细胞裂解液, 4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 留取上清液为总蛋白, 并用 Bradford 法测定蛋白浓度。蛋白质与 loading buffer 混合后 95℃ 变性 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后湿转至 PVDF 膜。2% BSA 室温封闭 2 h, 加入稀释的一抗 (兔抗人 FN 多克隆抗体 1:1000, 兔抗人 Col IV 多克隆抗体 1:1000, 兔抗人 TGF-β1 多克隆抗体 1:1000), 4℃ 过夜。加辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG, 室温反应 1 h, 化学发光剂 ECL 反应, 置于柯达化学发光成像仪中曝光。根据条带的深浅适当调整曝光时间使之更清晰; 采用图像分析软件进行吸光度分析。以测得的各指标的吸光度与内参照 β-actin 吸光度的比值代表相对定量值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件系统进行统计分析, 结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计量资料采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 SNK-q 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCTD 对高糖环境下 HK-2 细胞活力的影响

台盼蓝实验显示: 不同浓度 NCTD 作用 72 h 后, NCTD 5 mg/L 及以下的浓度细胞死亡率小于 5%, 而 5 mg/L 以上浓度的 NCTD 有明显的细胞毒性 (图 1)。

2.2 NCTD 对 HG 刺激后的 HK-2 细胞增殖的影响

30 mmol/L *D*-葡萄糖作用 48 至 72 h 后 HK-2 细胞的 MTT 吸光度值高于普通培养基组 ($P < 0.05$)。由于 5 mg/L 以上浓度的 NCTD 有明显的细胞毒性, 本实验选择不高于 5 mg/L 的 NCTD 作用于高糖刺激的 HK-2 细胞, MTT 吸光度值随浓度的增高渐趋下降, 其中 NCTD 2.5 mg/L 和 5 mg/L 干预组与 HG

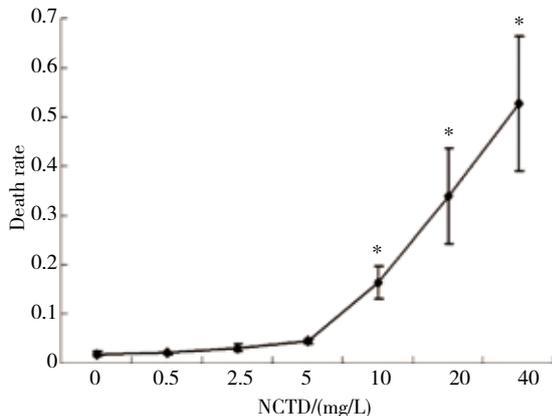


图 1 台盼蓝法检测 NCTD 对高糖环境下 HK-2 细胞活力的影响。与 0 mmol/L NCTD 组比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 1 Impact of NCTD on HK-2 cell viability by Typan blue staining. $^*P < 0.05$ vs 0 mmol/L NCTD group.

2.3 NCTD 对 HG 刺激后 HK-2 细胞 FN mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 显示: 与对照组相比, 30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激 6 h 后 FN mRNA 的表达开始上调, 24 h 后 FN mRNA 的表达明显增加, 48 h 表达最强 ($P < 0.05$)。与 HG 组比较, 5 mg/L NCTD 干预 6 h 后, FN mRNA 的表达较 HG 组下降, NCTD 对 FN mRNA 的表达抑制持续至 48 h ($P < 0.05$, 图 3)。说明高糖可特异性引起 HK-2 细胞表达 FN mRNA 升高, 而 NCTD 可特异性抑制这一现象。30 mmol/L *D*-甘露醇对 FN mRNA 表达无影响, 所以在蛋白检测中没有设计甘露醇组。

Western 印迹显示: 与对照组相比, 30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激 6 h 后 FN 表达较对照组无明显差异 ($P > 0.05$); 24 h 后 FN 蛋白表达上调, 48 h FN 蛋白也较对照组增加 ($P < 0.05$), 但是增加幅度略低于 24 h 组。与 30 mmol/L *D*-葡萄糖组比较, 5 mg/L NCTD 干预 24 h 后, FN 蛋白表达明显下调, 持续至 48 h (图 4)。

2.4 NCTD 对 HG 刺激后 HK-2 细胞 Col IV mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 显示: 与对照组相比, 在 6 h 时间点, 30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激组 Col IV mRNA 的表达开始上调, 24 h 后 Col IV mRNA 的表达明显增加, 48 h 表达最强 ($P < 0.05$)。与 30 mmol/L *D*-葡萄

糖刺激组比较, MTT 吸光度值降低有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明这两个浓度的 NCTD 能抑制高糖刺激的 HK-2 细胞的增殖, 5 mg/L NCTD 的抑制作用更强。24 h 组不同浓度 NCTD 对高糖刺激的 HK-2 细胞增殖无影响 (图 2)。根据台盼兰和 MTT 实验, 以下实验采用 NCTD 干预浓度为 5 mg/L。

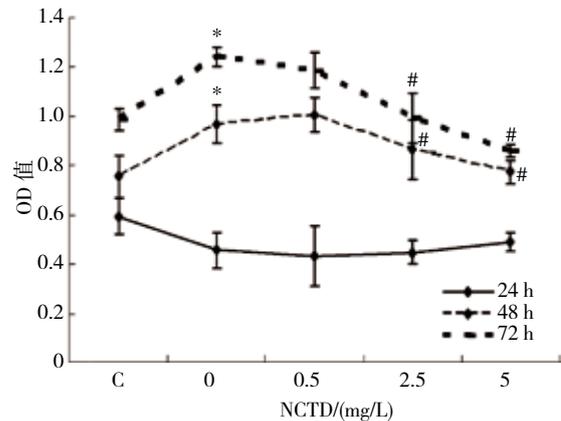


图 2 MTT 法检测 NCTD 对高糖环境下 HK-2 细胞增殖的影响。与对照组 (5.5 mmol/L *D*-glucose) 比较, $^*P < 0.05$; 与 HG 组 (0 mg/L NCTD 组) 比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 2 Influence of NCTD on proliferation of HK-2 cells by MTT assay. $^*P < 0.05$ vs 5.5 mmol/L *D*-glucose, $^{\#}P < 0.05$ vs 0 mg/L NCTD group.

糖刺激组比较, 5 mg/L NCTD 在 6 h 时间点就开始下调 Col IV mRNA 的表达, NCTD 抑制 HG 刺激的 HK-2 细胞 Col IV mRNA 持续至 48 h, 且在 48 h 抑制程度最明显 ($P < 0.05$, 图 5)。由于 30 mmol/L *D*-甘露醇对 Col IV mRNA 表达无影响, 所以在蛋白检测中没有设计甘露醇组。

Western 印迹显示: 与对照组相比, 30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激 24 h 后 Col IV 的蛋白表达开始上调, 效应持续至 48 h ($P < 0.05$)。与 HG 组比较, 5 mg/L NCTD 干预 24 h 后, Col IV 蛋白的表达减少, 到 48 h 时仍有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 在 6 h 未观察到明显差异 ($P > 0.05$, 图 6)。即 NCTD 可下调高糖刺激的 HK-2 细胞 Col IV 的表达。

2.5 NCTD 对 HG 刺激后 HK-2 细胞 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 显示: 6 h 时间点各组无差异 ($P > 0.05$)。30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激 24 h 组, 48 h 组 TGF- β 1 mRNA 的表达与对照组相比均明显上调 ($P < 0.05$)。与 30 mmol/L *D*-葡萄糖组比较, 5 mg/L NCTD 干预 24 h 后, TGF- β 1 mRNA 的表达降低 ($P < 0.05$), NCTD 下调其表达持续至 48 h (图 7)。由于 30 mmol/L *D*-甘露醇对 TGF- β 1 mRNA 表达无影响 ($P > 0.05$), 所以在蛋白检测中没有设计甘露醇组。

Western 印迹结果表明: 高糖刺激 24 h 后 HK-2 细胞表达 TGF- β 1 明显增加, 48 h 表达更强

($P < 0.05$)。而 NCTD 可下调高糖刺激的 HK-2 细胞 TGF- β 1 蛋白的表达 ($P < 0.05$, 图 8)。6 h 时间点各组蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

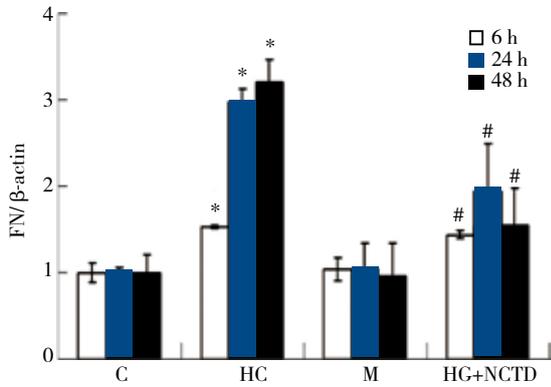


图 3 各组 FN mRNA 的相对表达量 ($n=3$)。 C: 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG: 30 mmol/L D-葡萄糖刺激组; M: 30 mmol/L D-甘露醇刺激组; HG+NCTD: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 mg/L NCTD 刺激组。与 C 组对应时间点比较, $^*P < 0.05$; 与 HG 组对应时间点比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 3 mRNA expression of FN in each group according to Ct values ($n=3$). C group: 5.5 mmol/L D-glucose; HG group: 30 mmol/L D-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L D-glucose + 5 mg/L NCTD; M group: 5.5 mmol/L D-glucose + 24.5 mmol/L mannitol. $^*P < 0.05$ vs C group; $^*P < 0.05$ vs HG group.

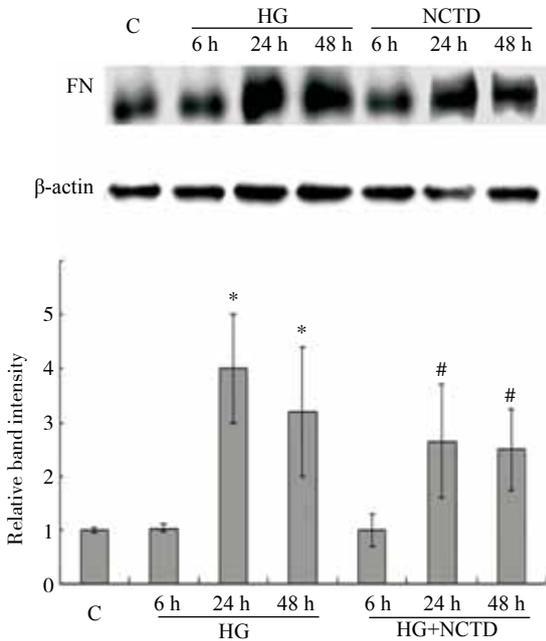


图 4 各组 FN 蛋白的相对表达量 ($n=3$)。 C: 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG: 30 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG+NCTD: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 mg/L NCTD 刺激组。与 C 组比较, $^*P < 0.05$; 与 HG 组相应时间点比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 4 Protein expression of FN in each group according to grey values ($n=3$). C group: D-glucose 5.5 mmol/L; HG group: 30 mmol/L D-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L D-glucose + 5 mg/L NCTD. $^*P < 0.05$ vs C group; $^*P < 0.05$ vs HG group.

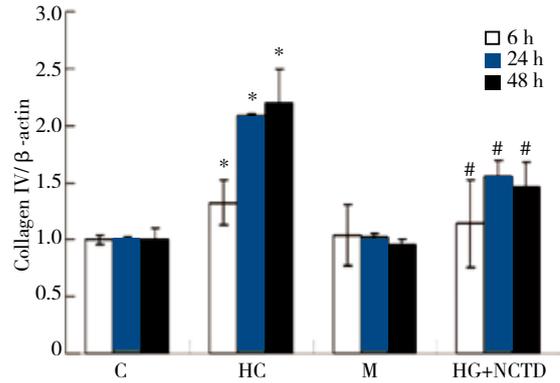


图 5 各组 Col IV mRNA 的相对表达量 ($n=3$)。 C: 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG: 30 mmol/L D-葡萄糖刺激组; M: 30 mmol/L D-甘露醇刺激组; HG+NCTD: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 mg/L NCTD 刺激组。与 C 组对应时间点比较, $^*P < 0.05$; 与 HG 组对应时间点比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 5 mRNA expression of Col IV in each group according to Ct values ($n=3$). C group: 5.5 mmol/L D-glucose; HG group: 30 mmol/L D-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L D-glucose + 5 mg/L NCTD; M group: 5.5 mmol/L D-glucose + 24.5 mmol/L mannitol. $^*P < 0.05$ vs C group; $^*P < 0.05$ vs HG group.

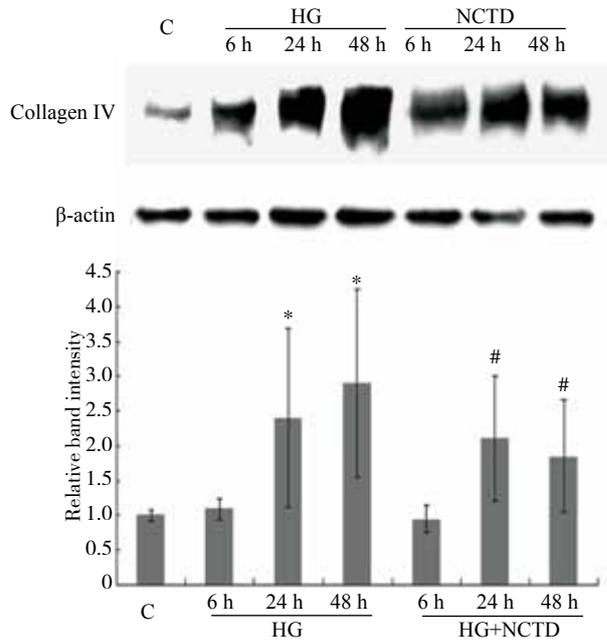


图 6 各组 Col IV 蛋白的相对表达量 ($n=3$)。 C: 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG: 30 mmol/L D-葡萄糖刺激组; HG+NCTD: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 mg/L NCTD 刺激组。与 C 组比较, $^*P < 0.05$; 与 HG 组相应时间点比较, $^*P < 0.05$ 。

Figure 6 Protein expression of Col IV in each group according to grey values ($n=3$). C group: 5.5 mmol/L D-glucose; HG group: 30 mmol/L D-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L D-glucose + 5 mg/L NCTD. $^*P < 0.05$ vs C group; $^*P < 0.05$ vs HG group.

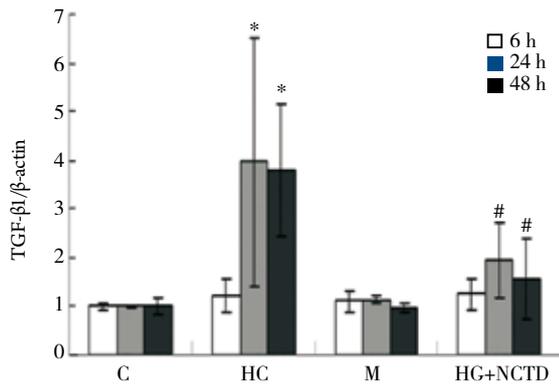


图7 各组 TGF- β 1 mRNA 的相对表达量 ($n=3$)。C: 5.5 mmol/L *D*-葡萄糖刺激组; HG:30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激组; HG+NCTD:30 mmol/L *D*-葡萄糖 +5 mg/L NCTD 刺激组; M:30 mmol/L *D*-甘露醇刺激组。与 C 组对应时间点比较, * $P<0.05$; 与 HG 组对应时间点比较, # $P<0.05$ 。

Figure 7 mRNA expression of TGF- β 1 in each group according to Ct values ($n=3$). C group: 5.5 mmol/L *D*-glucose; HG group: 30 mmol/L *D*-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L *D*-glucose+ 5 mg/L NCTD; M group:5.5 mmol/L *D*-glucose+ 24.5 mmol/L mannitol. * $P<0.05$ vs C group; # $P<0.05$ vs HG group.

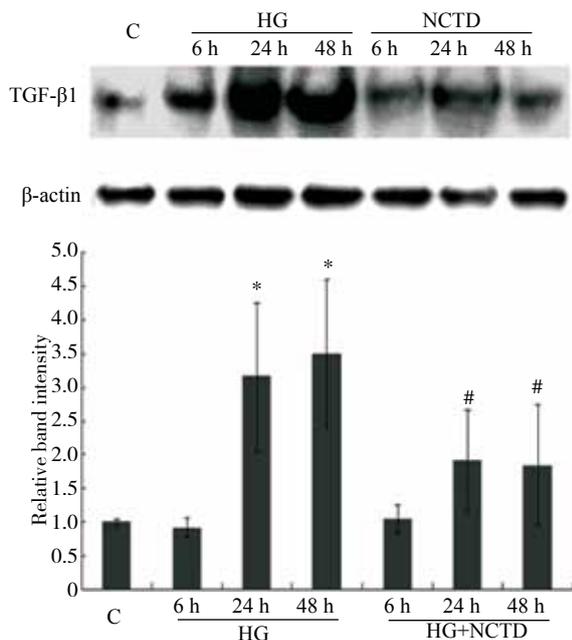


图8 各组 TGF- β 1 蛋白的相对表达量 ($n=3$)。C: 5.5 mmol/L *D*-葡萄糖刺激组; HG:30 mmol/L *D*-葡萄糖刺激组; HG+NCTD:30 mmol/L *D*-葡萄糖 +5 mg/L NCTD 刺激组。与 C 组比较, * $P<0.05$; 与 HG 组相应时间点比较, # $P<0.05$ 。

Figure 8 Protein expression of TGF- β 1 in each group according to grey values ($n=3$). C group: 5.5mmol/L *D*-glucose; HG group:30 mmol/L *D*-glucose; HG + NCTD group: 30 mmol/L *D*-glucose+5 mg/L NCTD. * $P<0.05$ vs C group; # $P<0.05$ vs HG group.

3 讨论

细胞外基质 (ECM) 为肾组织结构框架的重要组成部分, 糖尿病肾病时 ECM 的合成增加、降解减少, 大量 ECM 积聚并沉积于肾小球、肾间质内, 导致弥漫性或结节性肾小球硬化, 并发展成为不可逆的肾功能衰竭。因此, 抑制 ECM 异常合成, 减少 ECM 过度沉积在肾间质纤维化的治疗中具有重要意义。

FN 是主要的细胞外基质成分, 具有结合纤维蛋白、纤维蛋白原和胶原的能力。其分泌增加常出现于肾小管间质纤维化的早期阶段, 为其他细胞外基质成分提供支架结构; 因此, 其合成增加是肾小球细胞外基质积聚甚至是肾脏硬化的重要信号。此外, FN 尚可通过对成纤维细胞的趋化作用而促进间质纤维化的进展。Kreisberg 等^[12]认为高糖可以通过 FN 基因启动上游 TPA 反应元件和 cAMP 反应元件直接刺激 FN 转录。FN 基因表达的增强发生于 -170 bp 处的 cAMP 反应元件水平。

IV 型胶原是正常生理条件下肾小管基底膜最丰富的基质蛋白, IV 型胶原是糖尿病肾病时 ECM 增殖的主要成分, 主要沉积在肾小球、肾小管基底膜和鲍曼囊。其合成增加或聚集是导致肾脏组织纤维化、形成早期肾损害的主要物质基础及早期肾形态改变的一个重要标志, 是 DN 发病机制中一个重要环节^[13]。糖尿病肾病情况下 IV 型胶原的大量积聚使肾小球基底膜 (GBM) 的结构发生改变, 同时形成更多的孔隙, 而使蛋白滤出增多。链脲酶素 (STZ) 诱导第 3 天的糖尿病大鼠肾间质细胞 $\alpha 1$ IV 型前胶原 mRNA 表达及相应的蛋白产物已明显高于正常对照组, 并与尿蛋白水平呈正比^[14]。高糖能显著增加 Col-IV $\alpha 1$ 链、 $\alpha 3$ 链和 $\alpha 5$ 链 mRNA 和蛋白质的表达^[15-16]。

TGF- β 1 是最关键的促小管间质纤维化生长因子, 在纤维化过程中起核心作用, TGF- β 1 的表达上调是所有人类和实验动物肾间质纤维化的特征^[16]。它可以自分泌方式作用于自身, 又可以旁分泌方式作用于间质的成纤维细胞, 促其增殖并产生大量细胞外基质。

引起 ECM 过度沉积因素诸多, 过程复杂, 笔者前期研究表明^[6-11]: NCTD 能够减少 ECM 成分, 在多种肾病大鼠模型中 NCTD 均有较好的抑制肾小管间质纤维化的作用。NCTD 不仅可降低蛋白超负荷肾病大鼠尿蛋白水平, 还能在 UUO 大鼠模型中抑制上皮细胞转分化的发生。本研究关于 HK-2 细胞的体外实验发现 24 h 高糖刺激后能增加 HK-2 细胞中 FN, Col IV mRNA 以及蛋白的表达, NCTD 能减少高糖诱导的肾小管 FN, Col IV 的表达。高糖刺激 24 h 后人肾小管上皮细胞中 TGF- β 1 的表达增强, 而 5 mg/L NCTD 能下调 TGF- β 1 mRNA

和蛋白水平的表达。这就证实 NCTD 能抑制高糖刺激肾小管上皮细胞的 TGF- β 1 的表达。由于 TGF- β 1 能增加 ECM 蛋白的合成, 包括蛋白多糖, Col I, III, IV 及 FN, 层粘连蛋白(LN)等, 所以 NCTD 可能是通过下调 TGF- β 1 表达从而减少高糖刺激后的 HK-2 细胞 FN, Col IV 的表达。但尚不清楚 NCTD 是通过何种机制发挥上述作用的。Yoshiyasu 等^[17]证实 NCTD 能抑制钙调蛋白磷酸酶(calcineurin, CaN)的活性, 笔者在糖尿病肾病大鼠模型中也证实 NCTD 能下调 CaN 的表达。CaN 是受 Ca²⁺/钙调素(calmodulin, CaM)调控的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶, 参与了众多信号通路和生理活动。国内外研究^[18-20]表明 CaN 通路在糖尿病状态下可被活化, 然而 CaN 通路在对糖尿病肾病动物模型以及高糖环境下肾小管上皮细胞损伤中的研究还很少, NCTD 下调高糖刺激的 HK-2 细胞 FN, Col IV 以及 TGF- β 1 的表达是否与调节 CaN 有关尚待进一步研究。总之, NCTD 作为潜在的抗纤维化的药物很有研究前景, 为我国开发具有自主知识产权的新型抗肾间质纤维化药物提供了新的思路和靶点。

参考文献

1. Bagby SP. Diabetic nephropathy and proximal tubule ROS: challenging our glomerulocentricity[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(12): 1199-1202.
2. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1627-1637.
3. Najafian B, Kim Y, Crosson JT, et al. Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy [J]. *Am Soc Nephrol*, 2003, 14(4): 908-917.
4. Hovind P, Tarnow L, Rossing K, et al. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(4): 1258-1264.
5. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 341-350.
6. 叶琨, 刘伏友, 李瑛, 等. 去甲斑蝥素干预蛋白负荷肾病大鼠的实验研究 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23(2): 82-86.
YE Kun, LIU Fuyou, LI Ying, et al. Study of norcantharidin treatment in protein-overload nephropathy rats [J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2007, 23(2): 82-86.
7. 刘伏友, 孙岩, 孙林, 等. 去甲斑蝥素对 TGF- β 1 诱导的人近端肾小管细胞上皮间质转分化以及转录因子 Snail1 表达的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(11): 952-957.
LIU Fuyou, SUN Yan, SUN Lin, et al. Effect of norcantharidin on inhibition of tubular epithelial-mesenchymal transition and expression of snail in HK-2 induced by TGF- β 1 [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology*, 2009, 10(11): 952-957.
8. Li Y, Chen Q, Liu FY, et al. Norcantharidin attenuates tubulointerstitial fibrosis in rat models with diabetic nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2011, 33(2): 233-241.
9. 叶琨, 刘伏友, 李瑛, 等. 去甲斑蝥素对蛋白超负荷肾病大鼠 CTGF 及 NF- κ B p65 表达的影响 [J]. *中国血液净化*, 2008, 7(4): 198-202.
YE Kun, LIU Fuyou, LI Ying, et al. Effect of norcantharidin on expression of connective tissue growth factor and nuclear factor- κ B p65 in kidney of protein-overloaded nephropathy rats [J]. *Chinese Journal of Blood Purification*, 2008, 7(4): 198-202.
10. Liu FY, LI Y, Peng YM, et al. Norcantharidin ameliorates proteinuria, associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in protein overload nephropathy [J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(3): 465-477.
11. 陈琼, 李瑛, 刘伏友, 等. 去甲斑蝥素对糖尿病大鼠肾小球纤维粘连蛋白及钙调磷酸酶的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(14): 2605-2608.
CHEN Qiong, LI Ying, LIU Fuyou, et al. Effect of norcantharidin on fibronectin and calcineurin in STZ-induced diabetic nephropathy rats [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(14): 2605-2608.
12. Kreisberg JJ, Garoni JR. High glucose and TGF- β 1 stimulation of fibronectin gene expression through a cAMP responsive element [J]. *Kidney Int*, 1994, 46(4): 1019-1024.
13. Zeisberg M, Ericksen MB, Hamano Y. Differential expression of type IV collagen isoforms in rat glomerular endothelial and mesangial cells [J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2002, 295(2): 401-407.
14. Deen W, Lazzara M, Myers B. Structural determinants of glomerular permeability [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001, 281(4): 579-596.
15. Iglesias de la Cruz M, Ziyadeh FN, Isono M, et al. Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(3): 901-913.
16. Eddy AA. Molecular basis renal fibrosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3/4): 290-301.
17. Yoshiyasu B, Nozomu H, Naoto T, et al. Structure-based design of a highly selective catalytic site-directed inhibitor of ser/thr protein phosphatase 2B (calcineurin) [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(32): 9740-9749.
18. Gooch JL, Barnes JL, Garcia S, et al. Calcineurin is activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation [J]. *Am J Physiol Renal*, 2003, 284(1): 144-154.
19. Gooch JL, Gorin Y, Zhang BX, et al. Involvement of calcineurin in transforming growth factor- β mediated regulation of extracellular matrix accumulation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15561-15570.
20. Gooch JL. An emerging role for calcineurin A in the development and function of the kidney [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(4): 769-776.

(本文编辑 彭敏宁)