

过氧亚硝基阴离子通过JAK/STAT信号途径促进系膜细胞纤连蛋白的合成

王 辉^{1#} 刘会英^{2#} 赵东杰³ 王 品⁴ 王晓萌² 段惠军^{1*}

¹河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; ²河北医科大学第三医院病理科, 石家庄 050051;

³河北省唐山市第三医院外五科, 唐山 063100; ⁴河北现代女子医院妇产科, 石家庄 050000)

摘要 氧化应激是糖尿病肾病的重要发病机制之一。过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, ONOO⁻)是参与氧化应激损伤的重要成员, 与糖尿病及其并发症密切相关。该文观察高糖环境下ONOO⁻对系膜细胞合成纤连蛋白(fibronectin, FN)的影响, 并探讨其作用机制。实验中, 人肾小球系膜细胞分为4组: 正常对照组、高糖组、高糖+尿酸组及高糖+AG490组。培养12, 24, 48 h后收集细胞及其上清液, 并提取细胞总蛋白。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞上清液中FN的含量, 采用免疫细胞化学和Western blot检测NT总蛋白(ONOO⁻生成的生物标志物)、p-JAK2及p-STAT3蛋白的表达。结果显示, 与同期正常组相比, 高糖组NT总蛋白、p-JAK2及p-STAT3的表达及FN含量明显增高($P<0.05$), 并且随着时间的延长表达逐渐增多, 以48 h组最为显著; 高糖+尿酸组, NT、p-JAK2、p-STAT3及FN较高糖组明显减少($P<0.05$); 高糖+AG490组, p-JAK2、p-STAT3及FN较高糖组明显减少($P<0.05$), 但NT表达与高糖组差异无统计学意义($P>0.05$)。由此可见, 高糖环境下系膜细胞中存在ONOO⁻的过量表达, ONOO⁻通过JAK/STAT信号途径促进系膜细胞FN的合成。

关键词 过氧亚硝基阴离子; 系膜细胞; JAK/STAT; 纤连蛋白; 氧化应激; 硝基酪氨酸; 糖尿病肾病

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者发生的常见而难治的慢性微血管并发症, 也是糖尿病致死、致残的重要原因。研究表明, 糖尿病肾病的病变进展与系膜区细胞外基质(extracellular matrix, ECM)(如胶原蛋白IV、纤连蛋白(fibronectin, FN))的聚积密切相关, ECM的聚积可导致肾小球局灶性或弥漫性硬化^[1]。系膜细胞是肾小球的重要组成部分, 高糖环境下系膜细胞过量合成细胞外基质是导致细胞外基质聚积、肾小球硬化, 乃至糖尿病肾病的重要机制之一。

研究发现, 高糖环境下, 许多细胞因子/化学因子可影响系膜细胞功能, 导致系膜细胞过量合成ECM。因此, 针对这些细胞因子/化学因子与系膜细胞功能的研究已成为研究糖尿病肾病病变机制的一种重要途径。众多研究表明氧化应激(oxidative stress, OS)在糖尿病肾病发生发展中发挥了重要作用^[2-3]。氧化应激是由于自由基的产生与抗氧化防御机制的严重失衡所导致的一种状态, 可造成组织损

伤。过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, ONOO⁻)是参与氧化应激反应的重要自由基之一, 近年的研究表明, ONOO⁻与糖尿病及其并发症关系密切^[4]。我们先前的动物实验结果证实, ONOO⁻的过多生成与糖尿病肾病的发生发展可能相关^[5], 但ONOO⁻在系膜细胞中的表达及其对系膜细胞功能的影响尚知之甚少。

本实验应用体外培养的人肾小球系膜细胞(human mesangial cell, HMC), 观察高糖刺激下HMC中ONOO⁻生成的生物标志物3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)、p-JAK2、p-STAT3的表达情况; 同时应用ONOO⁻的特异性清除剂尿酸(uric acid, UA)^[6-7]和JAK2的特异性抑制剂AG490^[8]进行干预, 通过观察相应指标的改变, 探讨高糖环境下ONOO⁻对系膜细胞功能的影响及其具体作用机制。

收稿日期: 2011-10-28 接受日期: 2011-12-09

河北省高等学校自然科学基金(No.Z2011123)和国家自然科学基金(No.81070658)资助项目

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 86-311-86265734, E-mail: duanhj999@163.com

1 材料与方法

1.1 实验对象

人肾小球系膜细胞株来源于本实验室冻存的人系膜细胞株(HMC), 常规培养在含10%胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中, 置于37 °C、含5% CO₂培养箱中培养。培养HMC融合到70%~80%后, 用无血清RPMI1640培养基同步培养24 h, 之后将细胞分成4组: 正常对照组(5.5 mmol/L, normal glucose, NG); 高糖组(30 mmol/L, high glucose, HG); 高糖+尿酸组(30 mmol/L glucose+100 μmol/L uric acid, HG+UA)(文献^[9]证实, 此浓度最佳); 高糖+AG490组(30 mmol/L glucose+10 μmol/L AG490, HG+AG490)。

1.2 主要试剂

鼠抗NT单克隆抗体及兔抗p-JAK2单克隆抗体购于美国Abcam公司; 兔抗p-STAT3单克隆抗体购于美国Cell Signaling公司; 兔抗STAT3多克隆抗体及兔抗JAK2多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司; 人(Human)纤连蛋白(FN)ELISA检测试剂盒购于美国R&D公司; 两步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购于上海基因科技有限公司; D-葡萄糖购于北京索宝莱科学技术公司; 尿酸(uric acid)购于美国Amresco公司; AG490购于美国Cayman Chemical公司; RPMI 1640培养基购于美国Gibco公司; 胰蛋白酶购于美国Sigma公司; 胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫细胞化学染色检测NT的表达 采用6孔板, 各组细胞刺激12, 24, 48 h后, 用0.01 mol/L PBS冲洗数次, 70%乙醇固定30 min, 采用两步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒, 检测NT的表达, 每个指标检测6孔细胞。

1.3.2 Western blot检测NT、p-JAK2、p-STAT3的表达 取传代HMC, 等细胞长到75%~85%融合, 用无血清RPMI 1640培养基洗一次, 换无血清培养基孵育24 h, 使细胞同步化。后换成含1%血清的培养基, 按1.1的实验分组方法进行分组。各组细胞培养12, 24, 48 h后, 用冰冷的PBS(含1 mmol/L 硫酸钠)洗涤两次, 后加入冰冷的裂解液300 μL, 冰浴静置1 h, 离心、吸取上清、提取蛋白并检测蛋白浓度。每个样品经10% SDS-PAGE凝胶电泳, 电转移至PVDF膜;

5%脱脂奶粉37 °C封闭, 加入5%脱脂奶粉稀释的一抗(NT、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3)(1:1 000)及标准内参β-actin(1:1 000), 4 °C过夜。TBBS洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG及辣根酶标记羊抗兔IgG(1:5 000), 37 °C孵育2 h; 洗膜、显像。用美国UVP公司LabWorks 4.5软件对Western条带进行定量分析, 读取积分光密度值(IOD)。

1.3.3 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测细胞上清液中FN的表达 待25 cm²的培养瓶中细胞长到75%~85%融合, 进行细胞同步化, 后按1.1分组方法刺激, 培养12, 24, 48 h后, 留取上清。包被抗人FN单抗的待测品孔中每孔各加入待测上清10 μL, 样品稀释液40 μL, 充分混匀37 °C反应半小时, 洗板、印干。加酶标工作液50 μL, 37 °C反应半小时。加入显色剂, 37 °C避光显色15 min。加入终止液50 μL。以空白孔(空白对照孔不加样品及酶标工作液, 其余各步与待测品孔相同)调零, 在酶标仪450 nm处测吸光值(D)。每组设3个复孔, 取平均值。最后根据上清D值在标准曲线上查出相应浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

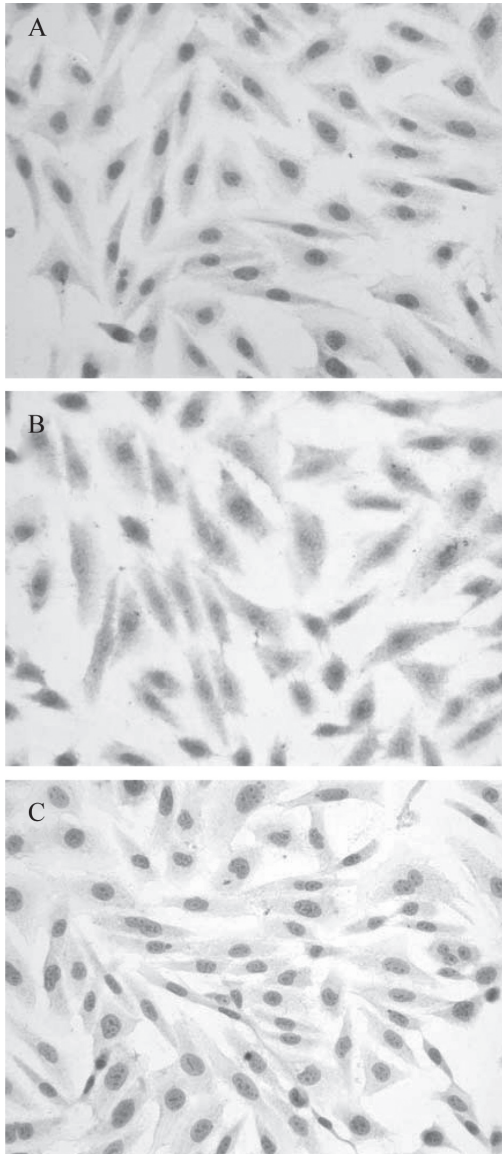
1.4 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS13.0统计软件进行统计, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖环境下HMC中NT总蛋白呈现高表达, 尿酸可拮抗此高表达

免疫细胞化学检测结果显示: 正常对照组HMC中NT总蛋白的阳性表达不明显; 高糖组HMC中NT总蛋白阳性表达增强, 呈棕黄色颗粒, 以胞浆表达为主, 少量胞核表达; 高糖+尿酸组NT总蛋白阳性表达较高糖组明显减弱(图1)。Western blot检测结果显示: 高糖组NT表达随刺激时间的延长逐渐增高, 其中以48 h组表达最高(图2)。与正常组相比, 高糖组NT表达明显升高($P < 0.01$); 高糖+尿酸组NT表达与同期高糖组相比, 明显下降($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组; 高糖+AG490组, NT表达与同期高糖组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3)。



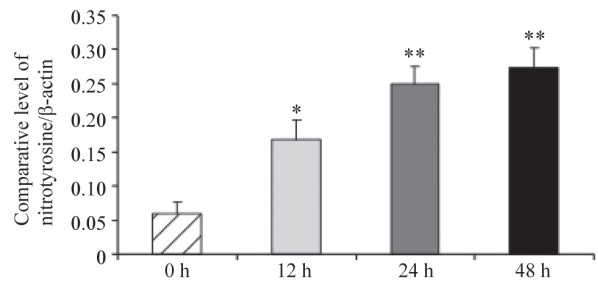
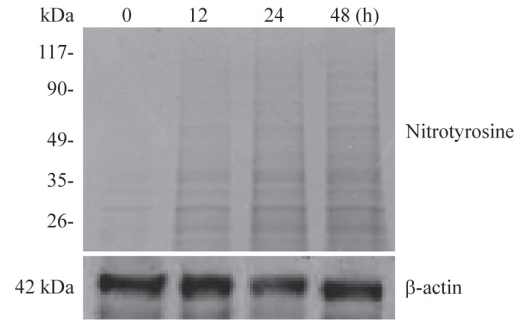
A: 正常对照组; B: 高糖组; C: 高糖+尿酸组。
A: NG group; B: HG group; C: HG+UA group.

图1 HMC中NT总蛋白表达(刺激48 h后)的免疫细胞化学检测结果(400×)

Fig.1 The expression of NT in HMC at 48 hour by immunocytochemical staining(400×)

2.2 高糖环境下HMC中p-JAK2、p-STAT3蛋白呈现高表达,尿酸及AG490均可下调p-JAK2、p-STAT3的高表达

Western blot检测结果显示:高糖组p-JAK2、p-STAT3的表达随刺激时间的延长逐渐增多,其中以48 h组表达最高(图4)。与正常组相比,高糖组p-JAK2、p-STAT3表达明显升高($P < 0.01$);高糖+尿酸组及高糖+AG490组,p-JAK2、p-STAT3的表达与同期高糖组相比均明显下降($P < 0.01$)(图5)。

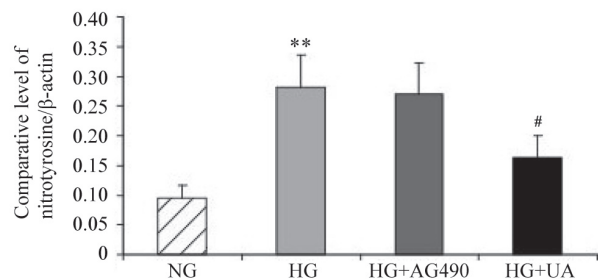
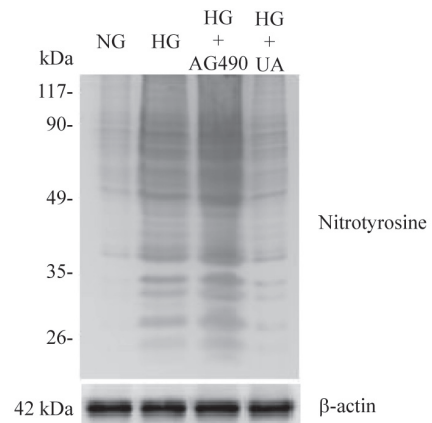


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常对照组(0 h)相比。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NG group (0 h).

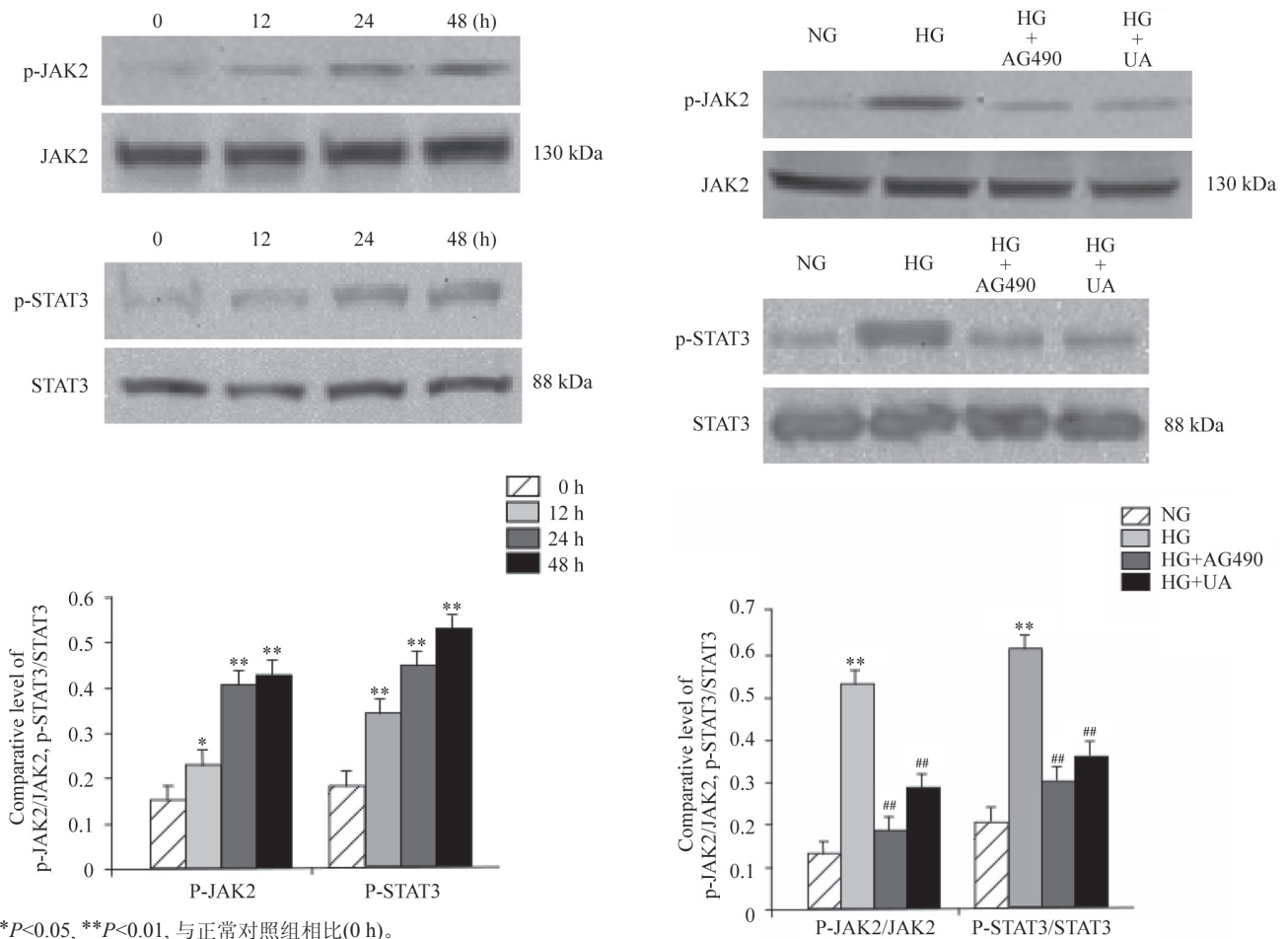
图2 高糖组HMC中NT总蛋白表达的时间依赖性

Fig.2 The expression of NT protein in HMC induced by HG for different time



NG: 正常对照组; HG: 高糖组; HG+UA: 高糖+尿酸组; HG+AG490: 高糖+AG490组。 ** $P < 0.01$, 与正常对照组相比, # $P < 0.05$, 与高糖组相比。 NG: normal glucose; HG: high glucose; HG+UA: high glucose+uric acid; HG+AG490: high glucose+AG490. ** $P < 0.01$ vs NG group, # $P < 0.05$ vs HG group.

图3 HMC中NT总蛋白表达(刺激48 h)的Western blot检测结果
Fig.3 The expression of NT in HMC at 48 h by Western blot



*P<0.05, **P<0.01, 与正常对照组相比(0 h).

*P<0.05, **P<0.01 vs NG group (0 h).

图4 高糖组HMC中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达的时间依赖性

Fig.4 The expression of p-JAK2, p-STAT3 in HMC induced by HG for different time

2.3 尿酸及AG490均可下调高糖培养HMC上清中FN的含量

与正常组相比, 高糖组细胞上清液中FN含量自12 h起显著上升(P<0.05), 并且随着时间的延长FN含量逐渐增多; 高糖+尿酸组及高糖+AG490组中FN含

量较同期高糖组均明显下降(P<0.05)(表1).
 NG: 正常对照组; HG: 高糖组; HG+UA: 高糖+尿酸组; HG+AG490: 高糖+AG490组. **P<0.01, 与正常对照组相比; ##P<0.01, 与高糖组相比. NG: normal glucose; HG: high glucose; HG+UA: high glucose+uric acid; HG+AG490: high glucose+AG490. **P<0.01 vs NG group; ##P<0.01 vs HG group.

图5 HMC中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达(刺激48 h)的Western blot检测结果

Fig.5 The expression of p-JAK2, p-STAT3 in HMC at 48 hour by Western blot

表1 FN蛋白表达的ELISA检测结果($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The expression of FN protein by ELISA($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	样本数 n	纤连蛋白(ng/mL) FN(ng/mL)		
		12 h	24 h	48 h
NG	6	353.00±9.85 [▲]	350.00±8.75 [▲]	348.00±6.95 [▲]
HG	6	572.67±16.56*	656.00±19.00*	982.33±15.14*
HG+UA	6	417.00±12.29	527.67±12.06	737.00±12.12
HG+AG490	6	494.67±7.09	605.67±16.56	813.67±12.06

NG: 正常对照组, HG: 高糖组, HG+UA: 高糖+尿酸组; [▲]P<0.05, 与高糖组相比; *P<0.05, 与高糖+尿酸组或高糖+AG490组相比。

NG: normal glucose, HG: high glucose, HG+UA: high glucose+uric acid; [▲]P<0.05 vs HG group; *P<0.05 vs HG+UA group or HG+AG490 group.

3 讨论

目前认为,糖尿病肾病的发生和发展是在遗传背景基础上,多因素综合作用的结果,包括肾组织糖代谢紊乱、脂代谢紊乱、肾脏血流动力学异常等,其中氧化应激已被认为是糖尿病肾病的重要发病机制之一。研究发现,糖尿病时诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性增高,导致NO的过量产生。过量的NO可与O₂快速反应生成ONOO⁻[10]。现已证实ONOO⁻过多生成与多种糖尿病并发症密切相关。

糖尿病肾病病变的进展主要表现为肾小球和肾小管间质的逐渐硬化,其中肾小球硬化与系膜区ECM的积聚密切相关。糖尿病肾病时,系膜细胞(mesangial cell, MC)合成基质蛋白增多如FN、胶原IV是ECM积聚的主要原因。研究发现,高糖环境下,许多细胞因子/化学因子可导致MC功能改变,致使ECM过量合成。我们先前的动物实验中发现,ONOO⁻的过多生成可能参与糖尿病肾病的发生发展,但ONOO⁻与MC的功能改变及其机制尚知之甚少。本实验应用体外培养HMC,并用尿酸进行干预,观察高糖环境下NT的表达(ONOO⁻生成的生物标志物)及FN的含量,结果显示,高糖能诱导HMC中NT高表达(与高渗透压无关),同时伴随FN合成增多;尿酸干预后可显著下调NT的高表达,同时FN合成减少。提示高糖环境下HMC中ONOO⁻增多与FN合成增多存在明显的相关性,ONOO⁻高表达可能是促进MC合成ECM进而导致肾小球硬化的重要原因之一;尿酸作为特异的内源性ONOO⁻清除剂可能在防治糖尿病肾病中发挥重要作用。

那么,ONOO⁻是如何促进MC合成ECM并参与肾小球硬化的病理过程?其具体机制如何?大量的研究表明,ONOO⁻在多种细胞信号转导途径中发挥着重要的调控作用[11-12],ONOO⁻通过激活或抑制信号转导,参与众多疾病的发生发展。Janus激酶/信号转导及转录活化因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号途径是一条重要的信号通道,可以介导多种细胞因子和生长因子的细胞内信号转导过程并活化相应靶基因,从而产生生物学效应[13-14]。以往的研究已证实, JAK/STAT信号途径参与了糖尿病肾病的发病过程[15]。此途径的激活与刺激肾脏细胞生长、促进FN合成等病理过程密切相关[16]。最近, Platt等[17]研究发现,在体外培养的血管内皮细

胞中ONOO⁻可激活STAT3而增加血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。那么, JAK/STAT信号途径是否介导了ONOO⁻致FN过量合成? 尚未见报道。本实验检测了高糖环境下HMC中JAK2、STAT3磷酸化水平(即激活的JAK2、STAT3),并用尿酸及AG490进行干预,结果发现,高糖组p-JAK2、p-STAT3蛋白的表达较正常对照组明显增高;尿酸干预后, p-JAK2、p-STAT3表达明显降低,提示尿酸对ONOO⁻的清除可能与JAK/STAT信号通路的激活受抑存在相关性。AG490干预组, p-JAK2、p-STAT3表达明显降低,同时伴随FN的含量明显下降,提示JAK/STAT信号通路参与促进FN的合成。为进一步探讨ONOO⁻与JAK/STAT信号通路的上下游关系,在AG490干预组中,我们又检测了NT总蛋白的表达,结果发现此组HMC中NT表达与同期高糖组无明显差异。提示, ONOO⁻是作为JAK/STAT信号通路的上游信号分子发挥其作用。不过, Dell'Albani等[18]发现,神经胶质细胞中JAK/STAT信号通路可介导细胞因子诱导的iNOS的表达。研究证实, iNOS表达增多可导致NO生成增多,而NO是生成ONOO⁻的重要前体之一。这提示, JAK/STAT信号通路也可能作为上游分子促进ONOO⁻的生成。因此我们设想,在体内ONOO⁻与JAK/STAT信号通路之间是否存在某种反馈关系,从而促进糖尿病肾病的进展,并最终导致不可逆的肾小球硬化? 尚需进一步的研究。

综上所述,高糖环境下ONOO⁻的高表达与MC过量合成FN密切相关, JAK/STAT信号途径的激活可能是ONOO⁻致FN过量合成,进而导致肾小球硬化的重要机制。

参考文献 (References)

- 1 Abe H. Recent progress in understanding the molecular pathogenesis of diabetic nephropathy. *Rinsho Byori* 2011; 59(2): 179-86.
- 2 Jiao B, Wang YS, Cheng YN, Gao JJ, Zhang QZ. Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF-β1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *Biosci Trends* 2011; 5(4): 173-81.
- 3 Mansouri E, Panahi M, Ghaffari MA, Ghorbani A. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative stress induced by diabetes in rat kidney. *Iran Biomed J* 2011; 15(3): 100-6.
- 4 Ali TK, Matragoon S, Pillai BA, Liou GI, El-Remessy AB. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* 2008; 57(4): 889-98.

- 5 Wang H, Li Y, Liu H, Liu S, Liu Q, Wang XM, *et al.* Peroxynitrite mediates glomerular lesion of diabetic rat via JAK/STAT signaling pathway. *J Endocrinol Invest* 2009; 32(10): 844-51.
- 6 Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, *et al.* Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(2): 675-80.
- 7 Durante P, Romero F, Pérez M, Chavez M, Parra G. Effect of uric acid on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Toxicol Ind Health* 2010; 26(3): 163-74.
- 8 Banes AK, Shaw S, Jenkins J, Redd H, Amiri F, Pollock DM, *et al.* Angiotensin II blockade prevents hyperglycemia-induced activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): F653-9.
- 9 Xinhua D. Preparation of uric acid standard stock solution. *Clin Chem* 2006; 52(11): 2117-8.
- 10 Xiao H, Li Y, Qi J, Wang H, Liu K. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats. *J Nephrol* 2009; 22(6): 800-8.
- 11 Reinehr R, Becker S, Hongen A, Haussinger D. The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 23977-87.
- 12 Pesse B, Levrant S, Feihl F, Waeber B, Gavillet B, Pacher P, *et al.* Peroxynitrite activates ERK via Raf-1 and MEK, independently from EGF receptor and p21Ras in H9C2 cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(5): 765-75.
- 13 Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA. Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 2009; 137(7): 1343-55.
- 14 Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayarathy C, Hooks JJ, Redmond TM. Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402(2): 390-5.
- 15 Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, *et al.* Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009; 58(2): 469-77.
- 16 Wang X, Shaw S, Amiri F, Eaton DC, Marrero MB. Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in TGF- β and fibronectin synthesis in mesangial cells. *Diabetes* 2002; 51(12): 3505-9.
- 17 Platt DH, Bartoli M, El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Lemtalsi T, Fulton D, *et al.* Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(10): 1353-61.
- 18 Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, Nicoletti VG, de Vellis J, Giuffrida Stella AM. JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. *J Neurosci Res* 2001; 65(5): 417-24.

Upregulation of Fibronectin by Peroxynitrite in Mesangial Cell via the JAK/STAT Signaling Pathways

Wang Hui^{1#}, Liu Huiying^{2#}, Zhao Dongjie³, Wang Pin⁴, Wang Xiaomeng², Duan Huijun^{1*}

(¹Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Pathology, Third Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; ³Department of Fifth Surgery, Third Hospital of Tangshan City, Tangshan 063100, China; ⁴Department of obstetrics and gynecology, Hebei Modern Women's Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract Oxidative stress is one of the important underlying mechanism of diabetic nephropathy (DN) development and progression. Peroxynitrite (ONOO⁻) plays a very important role in the pathogenesis caused by oxidative stress and has been demonstrated to be involved in diabetes and its complications. In our study, we observed the effect of ONOO⁻ on fibronectin (FN) generation in glomerular mesangial cells (MC) and explored its mechanism. The human glomerular mesangial cells (HMC) were divided into four groups: NG group, HG group, HG+UA group, and HG+AG490 group. Then, HMCs were harvested and the total protein was extracted at 12, 24, 48 h after stimulation; meanwhile, the medium was collected for detecting the protein level of FN by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of NT total protein (a marker for ONOO⁻), p-JAK2, p-STAT3 were examined by immunocytochemistry and Western blot. The results showed that in HG group, the content of FN and the expression of NT, p-JAK2, p-STAT3 all increased significantly compared with NG group at the corresponding time ($P < 0.05$), meanwhile, the above protein all increased in a time course manner and reached to highest level at 48 h after stimulation; in HG+UA group, the content of FN and the expression of NT, p-JAK2, p-STAT3 were lower than HG group ($P < 0.05$); in HG+AG490 group, all above protein except NT decreased significantly compared with HG group ($P < 0.05$), there was no obvious difference of NT expression between HG+AG490 group and HG group ($P > 0.05$). These demonstrated that the excessive of ONOO⁻ in high glucose environment could upregulate FN generation in MC via JAK/STAT signaling pathways.

Key words peroxynitrite; mesangial cell; JAK/STAT; fibronectin; oxidative stress; nitrotyrosine; diabetic nephropathy

Received: October 28, 2011 Accepted: December 9, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Colleges and Universities Granted by Hebei Provincial Educational Department (No.Z2011123) and the National Natural Science Foundation of China (No.81070658)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265734, E-mail: duanhj999@163.com