

通络方剂对高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞体外增殖作用和氧化应激的影响

张兰予 邹俊杰 冯晓云 刘志民*

(上海长征医院内分泌科, 上海 200003)

摘要 采用体外培养大鼠肾小球系膜细胞(rat mesangial cells, RMCs), MTT 法检测 RMCs 增殖, DCFH-DA 探针检测活性氧(ROS)生成, RT-PCR 和 Western blot 检测铜锌超氧化物歧化酶(CuZnSOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)和纤维连接蛋白(FN) mRNA 和蛋白表达, 探讨不同浓度通络方剂对高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞(RMCs)体外增殖作用和氧化应激的影响。结果提示高糖条件下, 通络方剂可抑制 RMCs 增殖($P<0.05$), 抑制活性氧生成($P<0.05$), 该抑制作用呈浓度依赖模式; 高糖作用于 RMC 后, MnSOD 和 FN mRNA 和蛋白水平升高, 通络方剂可抑制高糖条件下 FN mRNA 的升高和提高正常糖浓度条件下 MnSOD 蛋白水平, 浓度依赖性地抑制高糖条件下 FN 蛋白的表达。因此, 通络方剂可抑制高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞增殖, 抑制氧自由基生成, 提高抗氧化酶活性。

关键词 通络方剂; 大鼠; 肾小球系膜细胞; 增殖; 氧化应激

糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的慢性并发症, 是终末期肾病的重要原因。肾脏肥大和细胞外基质积聚是糖尿病肾病的早期特点^[1-4]。大量动物模型和细胞体外培养的结果提示高血糖症和高糖饮食介导肾脏肥大和细胞外基质扩展^[3,5,6]。

糖尿病肾病属于微血管病变, 也属中医络病学范畴。中医络病学认为“脉络-血管系统病”有共同的发病机制和演变规律, 即络病^[7]。在糖尿病的发病中, 氧化应激已成为关键的致病因子^[8-11]。糖尿病常伴发包括肾脏在内的许多组织活性氧(ROS)的产生^[12-15]。

通络方剂是根据中医络病学说研制的中药复方制剂, 由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、土鳖虫、赤芍等药物组成, 具有活血通络, 改善和调整血管内皮细胞功能的作用, 可通过抗氧化作用减轻糖尿病大鼠肾脏损伤^[7]。我们先前的研究表明通络方剂能减少细胞外基质在肾小球的沉积, 减少糖尿病大鼠尿蛋白的排泄和肾脏肥大, 表明通络方剂可减轻糖尿病大鼠早期肾脏损伤^[16]。肾小球系膜细胞是肾脏细胞外基质的重要组成成分, 本实验拟研究通络方剂超微粉对高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞增殖和氧化应激的影响, 为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及细胞培养

通络方剂超微粉由河北以岭药业赠送。MTT (Sigma), H2DCF-DA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 大鼠锰超氧化物歧化酶(MnSOD)单抗、大鼠 actin 单抗、大鼠 Fibronectin(FN)多抗购自美国 Abcam 公司。大鼠肾小球系膜细胞 RMCs 株(HBZY-1)由上海长征医院肾内科梅长林教授赠送, 胎牛血清(FBS) (Kibbutz Beit Haemer, Israel)及 DMEM 细胞培养液 (Gibco 公司)。该细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM (含 5.6 mmol/L 葡萄糖)中, 于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 2~3 d 传代 1 次。

1.2 大鼠 RMCs 增殖的检测

采用 MTT 比色法。低糖(含 5.6 mmol/L 葡萄糖)的 10% FBS 的 DMEM 培养细胞, 用 10% FBS DMEM 重悬成单细胞悬液。以 2×10^4 个/孔的密度将 RMCs 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 用 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 10% FBS DMEM 培养。待细胞长至 60%~80% 时, 给予 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 0.5% FBS 的 DMEM 饥饿

收稿日期: 2010-08-30 接受日期: 2010-09-29

国家重点基础研究规划(973 计划)(No.2005CB523304)资助项目

* 通讯作者。Tel: 13371962171, E-mail: zmlu_yzhao@hotmail.com

24 h。吸弃细胞培养液,加入低糖(5.6 mmol/L 葡萄糖+0.5% FBS)、高糖(25 mmol/L 葡萄糖+0.5% FBS)和上述培养液配制的 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 的通络方剂培养液各 100 μl ,每个浓度重复 4 孔。上述 96 孔板培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μl ,继续培养 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内液体,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100 μl ,37℃ 孵育 15 min,使结晶充分溶解,采用酶标分析仪测定每孔的光吸收值(A_{490})。细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.3 细胞活性氧(ROS)测定

细胞接种于 96 孔板,培养条件同前,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针(100 μl /孔),37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次以去除残留的探针,然后给予不同浓度的葡萄糖和通络方剂作用细胞 2 h,运用荧光分光光度计(激发光 488 nm,发射光 525 nm)测定荧光强度。

1.4 抗氧化酶 mRNA 水平测定

对数生长期大鼠 RMCs 接种于细胞培养皿中,低糖(含 5.6 mmol/L 葡萄糖)的 10% FBS 的 DMEM 培养,适应性生长 48 h 后,待细胞生长至 60%~80% 时,5.6 mmol/L 葡萄糖+0.5% FBS 饥饿 24 h,加入低糖(5.6 mmol/L 葡萄糖+0.5% FBS)、高糖(25 mmol/L 葡萄糖+0.5% FBS)和上述培养液配制的 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 的通络方剂培养液作用 12 h 后,抽取总 RNA,采用 RT-PCR 检测,检测 MnSOD、CAT、CuZnSOD、Gpx mRNA 水平。引物序列: MnSOD 上游: 5'-CTC CCT GAC CTG CCT TAC GAC T-3', 下游: 5'-AAG CGA CCT TGC TCC TTA TTG-3'; CAT 上游: 5'-GAG GCA GTG TAC TGC AAG TTC C-3', 下游: 5'-GGG ACA GTT CAC AGG TAA CTG C-3'; CuZnSOD 上游: 5'-TCT AAG AAA CAT GGC GGT CC-3', 下游: 5'-CAG TTA GCA GGC CAG CAG AT-3'; GPX 上游: 5'-TCC ACC GTG TAT GCC TTC TCC-3', 下游: 5'-CCT GCT GTA TCT GCG CAC TGG A-3'。以 actin 为内参,引物序列: 上游: 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3', 下游: 5'-GCC ACA GGA TTC CAT ACC CA-3'。反应总体积 50 μl ,反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 35 个循环; 72℃ 5 min。RT-PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其结果用凝胶扫描图像处理系统进行分析,以 MnSOD/actin mRNA 的 A 比值作为 MnSOD mRNA 变化指标。

1.5 纤维连接蛋白(FN)锰超氧化物歧化酶(Mn-

SOD)蛋白水平测定

分别用不同浓度的葡萄糖和通络方剂作用 RMCs,采用蛋白质印迹法检测大鼠肾小球系膜细胞纤维连接蛋白(FN)锰超氧化物歧化酶(MnSOD)蛋白水平。加入蛋白质裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。取蛋白提取液点样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS2PAGE 1.5 h;用封闭液室温封闭 1 h,加入一抗 4℃ 过夜;加二抗-HRP 室温孵育 1 h。加 ECL(enhanced chemiluminescent)显色液,获取图片结果。蛋白表达值为条带的灰度值并以 β -actin 内参照校正。各目的条带与 β -actin 的比值代表各蛋白表达的相对量。

1.6 统计方法

每组实验在相同条件下重复 3 次,结果使用单因素方差分析,组间两两比较使用 Dunnett-*t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 MTT 结果

高糖条件下 RMCs 增殖增加($P < 0.05$),随着通络方剂作用浓度的增加, RMCs 的 A_{490} 值逐渐下降($P < 0.05$),提示通络方剂对高糖条件下 RMCs 生长抑制作用有剂量-效应依赖关系(图 1)。抑制半数细胞生长时的药物浓度约为 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 活性氧测定

高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞(RMCs)活性氧生成增多($P < 0.05$),通络方剂可浓度依赖性地抑制高糖条件下 RMC 活性氧的生成(图 2),抑制活性氧生成的浓度为 12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$)。

2.3 RT-PCR 结果

高糖条件下锰超氧化物歧化酶(MnSOD)、过氧化氢酶(CAT)、铜锌过氧化物酶(CuZnSOD) mRNA 表达增高, Gpx mRNA 变化不明显,纤维连接蛋白 mRNA 升高。高糖条件下加入通络方剂后前三种抗氧化酶的 mRNA 表达变化无统计学差异,纤维连接蛋白 mRNA 表达随通络方剂浓度增加逐渐减少,呈浓度依赖性(图 3)。

2.4 蛋白水平

高糖条件下锰超氧化物歧化酶(MnSOD)和纤维连接蛋白(Fibronectin)的蛋白水平随高糖作用时间的延长而逐渐增加。通络方剂可浓度依赖性地抑制高糖条件下 Fibronectin 的表达($P < 0.05$),对高糖条件下 MnSOD 的表达作用不明显($P > 0.05$)。通络方剂可增

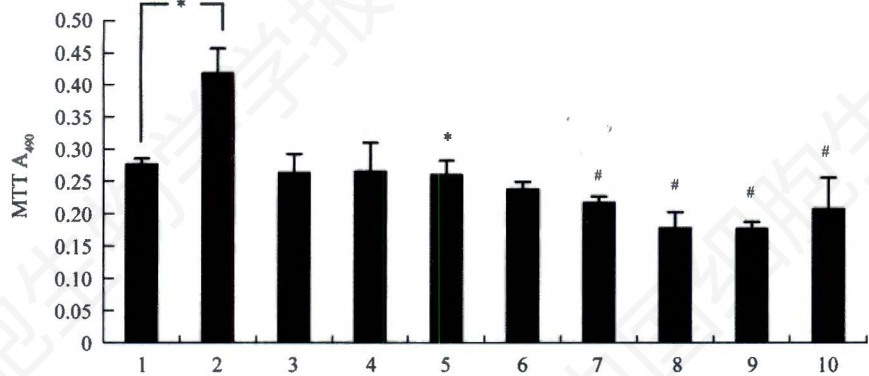


Fig.1 Effects of TLR on mesangial cell proliferation under high glucose

1: 5.6 mmol/L glucose+0.5% FBS; 2: 25 mmol/L glucose +0.5% FBS; 3: 5.6 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 12.5 μ g/ml; 4: 5.6 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 25 μ g/ml; 5: 5.6 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 50 μ g/ml; 6: 5.6 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 100 μ g/ml; 7: 25 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 12.5 μ g/ml; 8: 25 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 25 μ g/ml; 9: 25 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 50 μ g/ml; 10: 25 mmol/L glucose +0.5% FBS+TL 100 μ g/ml. * P <0.05 vs 5.6 mmol/L glucose, # P <0.05 vs 25 mmol/L glucose.

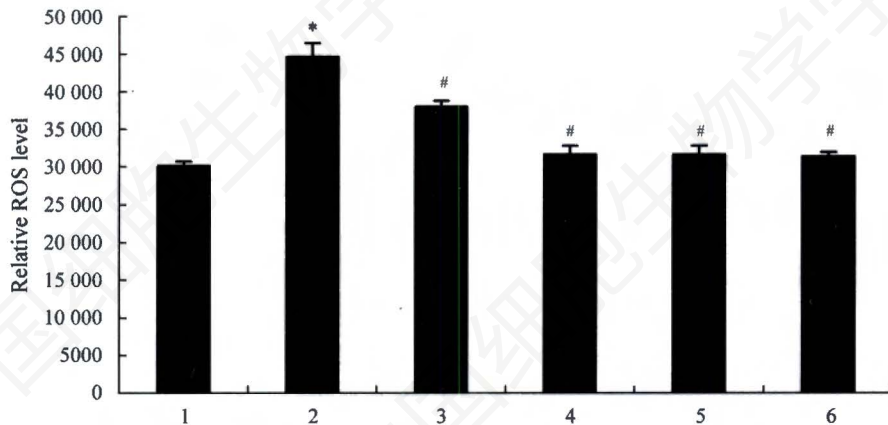


Fig.2 Reactive oxygen species (ROS) generation on mesangial cells by dichlorofluorescein (DCF)

1: 5.6 mmol/L glucose; 2: 25 mmol/L glucose; 3: 25 mmol/L glucose +TL 12.5 μ g/ml; 4: 25 mmol/L glucose +TL 25 μ g/ml; 5: 25 mmol/L glucose +TL 50 μ g/ml; 6: 25 mmol/L glucose +TL 100 μ g/ml. TLR could reduce the ROS generation under high glucose. Three independent experiments were performed. * P <0.05 vs 5.6 mmol/L glucose, # P <0.05 vs 25 mmol/L glucose.

加正常糖浓度条件下 MnSOD 蛋白的表达(P <0.05) (图 4)。

3 讨论

RMCs 常作为体外研究肾脏病变发生机制和药物疗效的细胞模型, 该细胞增生和炎症介质的释放在肾脏疾病的发生/发展及肾小球硬化中具有重要作用^[17]。临床上通过药物抑制 RMCs 增生及炎症介质的释放时阻断肾脏病变进展的关键环节之一^[18]。

TLR 是以络病学说为指导研制出的复方制剂, 它具有活血、通络、降脂、抗凝及改善血管内皮功

能等疗效。我科以往研究表明, 通络方剂能降低糖尿病大鼠 KW/ BW 及尿白蛋白的排泄, 增加 Ccr, 降低肾小球系膜面积, 减轻肾脏损伤^[19]。本实验中, 笔者发现 RMCs 高糖条件下增殖能力增强, 其增殖能力随着通络方剂作用浓度的增加而逐渐下降, 表明通络方剂呈浓度依赖性地抑制高糖条件下 RMCs 增殖, 为通过 RMCs 变化体外研究肾脏病变发生机制和药物疗效的细胞模型的建立提供了基础。

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症, 以进行性肾脏纤维化为特征, 其典型的病理变化是细胞外基质 (ECM) 积聚、肾小球基底膜 (GBM) 增生、肾脏肥

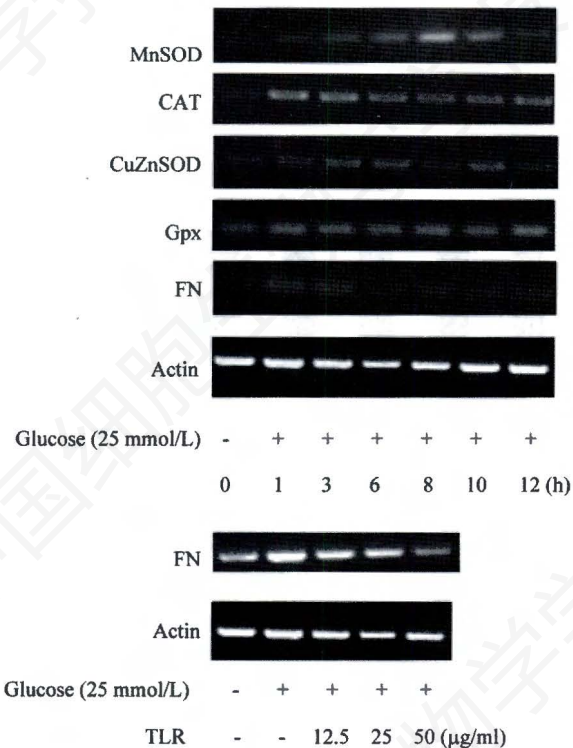


Fig.3 Effects of TLR on mesangial cell mRNA levels of CuZnSOD, CAT, Gpx, MnSOD and FN

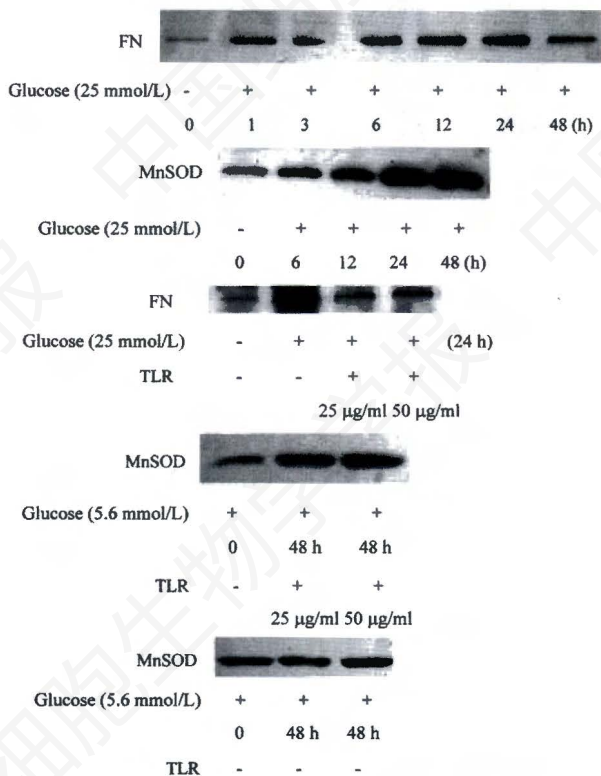


Fig.4 Effects of TLR on mesangial cell protein of MnSOD and FN

大^[20]。氧化应激被认为是各种糖尿病并发症的始动环节^[21-23]，高血糖诱导产生的活性氧可启动多种细胞因子及生长因子的转录，促进 ECM 积聚，最终导致肾脏肥大、纤维化的发生^[24-26]。正常情况下，机体通过体内的抗氧化系统清除过多产生的氧自由基，从而维持细胞内正常的氧化还原平衡。CAT、GSH-Px、T-AOC 及 SOD 是衡量细胞抗氧化能力的指标，其水平的增高代表着细胞抗氧化能力的加强。本研究结果显示，高糖条件下 RMCs 活性氧生成增加，锰超氧化物歧化酶(MnSOD)的 mRNA 和蛋白水平明显升高，提示高糖条件下细胞抗氧化能力代偿性增加。通路方剂可抑制高糖条件下 ROS 的产生，在正常糖浓度条件下升高 MnSOD 的蛋白水平，但对高糖条件下 MnSOD mRNA 和蛋白水平作用不明显，提示通路方剂可提高正常糖浓度条件下的大鼠肾小球系膜细胞的抗氧化能力；高糖条件下 TLR 抑制了 ROS 的生成，故 MnSOD 无明显变化。

纤维连接蛋白(FN)是一种高分子糖蛋白，由两条多肽链经二硫键连接而成，是肾脏 ECM 的主要成分之一。分布于 ECM 的 FN 是不溶性的，可通过表面特别的识别位点与 ECM 的其他成分如胶原、糖胺聚糖粘附，亦可与血浆蛋白如纤维蛋白结合，还可通过细胞膜表面整合蛋白与细胞结合。有研究表明 FN 是最早出现在损伤组织中的基质蛋白成分^[27]。因此，FN 的表达程度也可反映 ECM 积聚程度。本研究结果显示：高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞 FN 表达随高糖作用时间延长而增高，通路方剂可剂量依赖性地抑制高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞 FN 的表达，说明通路方剂可能通过抑制 FN 表达参与减少 ECM 积聚。

综上所述，通路方剂可抑制高糖条件下 RMCs 的增殖，抑制 RMCs 活性氧的产生，提高正常糖条件下 RMCs 锰超氧化物歧化酶(MnSOD)蛋白水平，降低高糖条件下大鼠肾小球系膜细胞 FN 的表达，可能在延缓糖尿病肾病肾小球硬化的进程中发挥了积极的作用。

参考文献(References)

- 1 Bilous RW, Mauer SM, Sutherland DE, Steffes MW. Mean glomerular volume and rate of development of diabetic nephropathy. *Diabetes* 1989; 38(9): 1142-7.
- 2 Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, *et al.* Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(14): 8015-20.

- 3 Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999; 56(2): 393-405.
- 4 Ziyadeh FN. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1993; 22(5): 736-44.
- 5 Abboud HE. Growth factors and diabetic nephrology: an overview. *Kidney Int* 1997; 60: S3-6.
- 6 Wolf G. Growth factors and the development of diabetic nephropathy. *Curr Diab* 2003; 3(6): 485-90.
- 7 吴以岭. 络病学基础与临床研究. 北京: 中国科学技术出版社, 2005, 9-11.
- 8 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40(4): 405-12.
- 9 Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Chiba M, Hirai A, Toyota T. Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42(8): 995-8.
- 10 Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H. Oxidative stress measurement by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1998; 41(11): 1355-60.
- 11 Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(2): 121-5.
- 12 Ha H, Kim C, Son Y, Chung MH, Kim KH. DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(2): 271-4.
- 13 Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002; 61(1): 186-94.
- 14 Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8 Suppl. 3): S250-3.
- 15 Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha, H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8 Suppl 3): S241-5.
- 16 刘岩, 邹俊杰, 李文桐, 李翔, 夏培金, 孙亮亮, 等. 通络方药对糖尿病肾病的保护作用与机制探讨. *第二军医大学学报* 2007; 28: 281-5.
- 17 Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 1995; 270 (5234): 232-3.
- 18 谢月英, 银国利, 蒋锦琴, 王黎芳, 花扣珍, 孙爱华, 等. 葛根素对大鼠肾小球系膜细胞体外增殖抑制作用及其机制. *中国药理学杂志* 2010; 45(8): 590-2.
- 19 张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 夏凌, 王怀清, 陈峰, 等. 通络方药抑制糖尿病大鼠肾小球内皮细胞增殖. *第二军医大学学报* 2009; 30(6): 727-30.
- 20 程乾, 沈永芹, 谷雨, 翟云鹏, 赵九洲, 印晓星, 等. 银杏叶提取物、卡托普利、缬沙坦单独用药及联合用药对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞的保护作用. *徐州医学院报* 2010; 30(6): 351-4.
- 21 Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling in molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S19-25.
- 22 Suzuki S, Hinokio Y, Komatsu K, Ohtomo M, Onoda M, Hirai A, *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 45(2-3): 161-8.
- 23 Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404(6779): 787-90.
- 24 Wang JY, Yin XX, Wu YM, Tang DQ, Gao YY, Wan MR, *et al.* *Ginkgo biloba* extract suppresses hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat mesangial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(9): 1222-30.
- 25 Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, Glass WF 2nd, Kreisberg JJ, *et al.* High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am J Pathol* 1990; 136(6): 1339-48.
- 26 Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, *et al.* Reactive oxygen species mediate TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 up regulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(4): 961-6.
- 27 Pavan MV, Ghini B, Castro M, Lopes De Faria JB. Prevention of hypertension attenuates albuminuria and renal expression of fibronectin in diabetic spontaneously hypertension rats. *Am J Nephrol* 2003; 23(6): 422-8.

Effects of Tongluo Recipe on Proliferation and Oxidative Stress of Rat Glomerular Mesangial Cells under High Glucose

Lan-Yu Zhang, Jun-Jie Zou, Xiao-Yun Feng, Zhi-Min Liu*

(Department of Endocrinology, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract To investigate the effects of Tongluo Recipe (TLR) on proliferation and oxidative stress of rat glomerular mesangial cells under high glucose, Rat mesangial cell lines (rat mesangial cells ,RMCs) under high glucose condition were treated with TLR. The proliferation of mesangial cells was detected by MTT assay. The reactive oxygen was detected by DCFH-DA probes. The expression of mRNA of CuZnSOD, CAT, Gpx, MnSOD and FN were detected by RT-PCR and the protein of MnSOD and FN were detected by Western blot. Tongluo Recipe significantly decreased the proliferation and ROS of rat mesangial cells under high glucose ($P<0.05$). Tongluo Recipe could increase the protein level of MnSOD under normal glucose conditions and decrease the protein level of Fibronectin (FN) in a dose-dependent manner. So the Tongluo Recipe could inhibit the proliferation, inhibit the generation of ROS and improve the antioxidative enzymes capacities of rat glomerular mesangial cells under high glucose.

Key words Tongluo Recipe; rat; glomerular mesangial cells; proliferation; oxidative stress

Received: August 30, 2010 Accepted: September 29, 2010

This work was supported by National Key Basic Research Program of China(973 Program)(No.2005CB523304)

*Corresponding author. Tel: 13371962171, E-mail: zmliu_yzhao@hotmail.com