论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1446-04

亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞HBZY-1单核细胞趋化蛋白-1 mRNA表达的影响

魏倩萍[1],邓华聪[1],赵 劼[2],Harvest F. Gu[3] (重庆医科大学:[1]临床学院内分泌科,[2]超声工程研究所,重庆 400016;[3]Department of Molecular Medicine, Karolinska Institute 17176 Stockholm, Sweden)

提 要:目的 观察亚硒酸钠对HBZY-1细胞表达单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的影响,从而研究硒在防治糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)中的作用机制。**方法** 分别以高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGE)刺激HBZY-1细胞;先加入100 nmol/L亚硒酸钠预处理后,再分别给予以上4种刺激因素孵育HBZY-1细胞,分别检测HBZY-1细胞MCP-1 mRNA的表达并比较。**结果** 4种刺激因素均可作为独立因素,导致HBZY-1细胞MCP-1 mRNA表达量增加;亚硒酸钠能抑制上述4种因素所致的MCP-1 mRNA的表达。**结论** 亚硒酸钠通过抑制MCP-1 mRNA在HBZY-1细胞中的表达,从而有效防治糖尿病肾病的发生发展,表明硒在糖尿病肾病的防治过程中发挥积极作用。

关键词: 亚硒酸钠;单核细胞趋化蛋白-1;大鼠肾小球系膜细胞HBZY-1;糖尿病肾病

中图法分类号: R322.61; R394.2; R914.3 **文献标识码:** A

A role of sodium selenite in regulating expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rat mesangial cells

WEI Qian-ping[1], DENG Hua-cong[1], ZHAO Jie[2], Harvest F. Gu[3] ([1]Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, [2]Institute of Ultrasonic Engineering, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; [3]Department of Molecular Medicine, Karolinska Institute, 17176 Stockholm, Sweden)

Abstract: Objective To observe the effect of sodium selenite on expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA in rat mesangial cells line HBZY-1, and to study the mechanism of sodium selenite in anti-diabetic nephropathy. **Methods** Cell line HBZY-1 was incubated with high glucose, advanced glycosylation end products (AGE), high insulin and H_2O_2 respectively, then divided into nine groups according to following treatment. Control group treated with 0.1 mol/L PBS instead of any stimulating factors, High glucose group (HG), High insulin group (HI), H_2O_2 group, BSA-AGE group, sodium selenite-HG group, sodium selenite-HI group, sodium seletine- H_2O_2 and sodium selenite-BSA-AGE group. The expression of MCP-1 mRNA was detected by RT-PCR and statistically compared. **Results** Four stimulating factors increased the expression of MCP-1 mRNA indepedently and sodium selenite inhibited significantly the expression of MCP-1 mRNA enhanced by the four factors. **Conclusion** Sodium selenite suppress the expression of MCP-1 mRNA in the cell line HBZY-1. Our results suggest that sodium selenite may play a significant role in the prevention of diabetic nephropathy by inhibiting the expression of MCP-1 mRNA in the cell line HBZY-1.

Key words: sodium selenite; monocyte chemoattractant protein-1; rat mesangial cell line HBZY-1; diabetic nephropathy

糖尿病肾病是糖尿病(diabetes, DM)最常见、最严重的慢性并发症,随着DM发病率的逐年增高,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)已成为导致慢性肾功能衰竭的主要病因之一。其主要病理变化表现为肾小球、肾小管肥大、基底膜增厚、肾小球系膜区细胞外基质(extracellular matrix, ECM)堆积以及肾小球硬化。近年来国外研究表明MCP-1与糖尿病肾病有密切关系[1]。硒是机体一种必需微量元素,其作为一种抗氧化剂可预防氧化应激;硒缺乏可加剧糖尿病肾病的氧化应激,还可产生拟高血糖病理状态,从而加剧糖尿病肾病的发生和发展。因此硒不仅可以预防氧化应激,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370670)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370670)

作者简介: 魏倩萍(1966-),女,四川省成都市人,博士,副教授,主要从事糖尿病肾病方面的研究。电话:(023)68486663

收稿日期: 2005-02-25;**修回日期:** 2005-05-18

而且还能阻止肾脏损害[2]。但其是否作用于 MCP-1 少见文献报道。本研究分别给予高糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物孵育 HBZY-1 细胞,观察 HBZY-1 细胞 MCP-1 mRNA 的表达及亚硒酸钠对 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

大鼠肾小球细膜细胞系(HBZY-1,中国典型培养物保藏中心 CCTCC);新生牛血清及 RPMI-1640 培养液(北京中山生物技术有限公司);亚硒酸钠(Karolinska Institute 赠送);柱离心式总 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 两步法试剂盒(TaKaRa 公司);PCR 相对分子量标准(TaKaRa 公司);PCR 引物合成(上海博亚生物技术有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　细胞系 HBZY-1 的培养　HBZY-1 细胞常规培养于 20% RPMI1640 培养液中,培养条件为 37 ℃,饱和湿度 5% CO_2,每 2 ~ 3 d 用 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。取贴壁长满瓶底 60% ~ 70% 的单层细胞,弃去含 20% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液,换用无血清 RPMI1640 培养液饥饿 24 h,然后按实验分组加入刺激(及干预)因素;对照组用等体积的 0.01 PBS 培养细胞。

1.2.2　体外制备糖基化终末产物(AGE)　参考文献[3],按牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)50 g/L,与葡萄糖 90 g/L,0.5 mmol/L EDTA 及 0.2 mmol/L PBS(pH 7.4)混匀后过滤除菌,37 ℃恒温培养箱卵孵育 60 d。0.1 mol/L PBS(pH 7.4)中透析 48 h,测定蛋白含量及荧光强度,分装后存于 -80 ℃冰箱保存备用。

1.2.3　实验分组　分别以一定浓度高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物刺激细胞系 HBZY-1 一定时间;先给予亚硒酸钠 100 nmol/L 分别预处理 HBZY-1 细胞 48 h 后,再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育 HBZY-1 细胞,同时设对照组。分组情况如下:① 对照组:无任何刺激因素孵育细胞系 HBZY-1,即用等体积的 0.01 PBS 培养细胞。②高葡萄糖组(high glucose, HG 组):用 25 mmol/L 葡萄糖刺激 HBZY-1 细胞 72 h。③高胰岛素组(high insulin, HI 组):用 100 nmol/L 的胰岛素刺激 HBZY-1 细胞 24 h。④过氧化氢组(H_2O_2 组):用 100 μmol/L 的过氧化氢刺激 HBZY-1 细胞 1 h。⑤糖基化终末产物组(BSA-AGE 组):用 100 mg/L 的糖基化终末产物刺激 HBZY-1 细胞 6 h。⑥ 亚硒酸钠-高葡萄糖组 (sodium selenite-HG 组):依次以100 nmol/L亚硒酸钠和 25 mmol/L 的葡萄糖分别 刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 72 h。⑦亚硒酸钠-高胰岛素组(sodium selenite-HI 组):依次以 100 nmol/L 的亚硒酸钠和 100 nmol/L 的胰岛素分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 24 h。⑧亚硒酸钠-过氧化氢组(sodium selenite-H_2O_2 组):依次以 100 nmol/L 的亚硒酸钠和 100 μmol/L 的过氧化氢分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 1 h。⑨亚硒酸钠-糖基化终末产物组(sodium selenite-BSA-AGE 组):依次以 100 nmol/L 的亚硒酸钠和 100 mg/L 的糖基化终末产物分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 6 h。

1.2.4　逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 MCP-1mRNA 表达　以柱离心式总 RNA 抽提试剂盒提取 HBZY-1 总 RNA,测定总 RNA 浓度,计算纯度,A_{260}/A_{280} 为 1.8 ~ 2.0。

MCP-1 引物序列按文献[4]:上游引物:5′-ATCACCAG-CAGCAGGTGTCCCAAAGAAGCT-3′;下游引物:5′-AGAAGT-GCTTGAGGTGGTTGTGGAAAAGAG-3′;扩增片段长度 258 bp。

β-actin 引物序列:上游引物:5′-TCCTCTGACTTCAA-CAGCGACACC-3′;下游引物:5′-TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTT-GG-3′;扩增片段长度 228 bp。

以两步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录扩增,扩增条件:94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,72 ℃ 最后延伸 7 min。每次 PCR 反应至少重复 3 次。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果经图像分析系统扫描存图,并对目的条带进行密度分析。

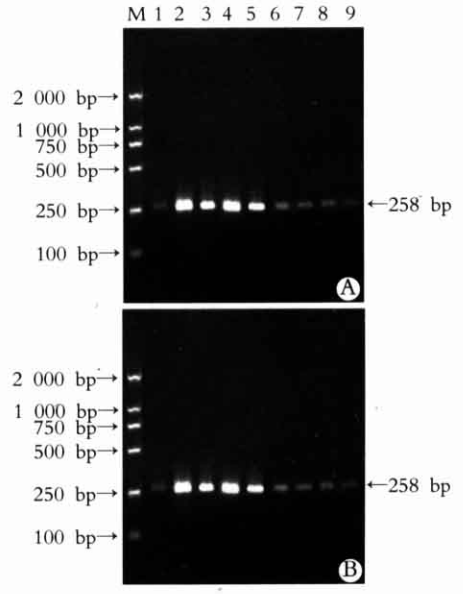
1.3　统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用 SAS 统计分析软件包进行 F 分析,再作两两比较 t 检验。

2　结果

2.1　4 种刺激因素对 HBZY-1 细胞 MCP-1 mRNA 表达的影响

以高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物 4 种刺激因素孵育 HBZY-1 细胞后,MCP-1 mRNA 表达量均明显增加(图 1A),与对照组比较有显著差异($P < 0.01$),内参 β-actin mRNA 表达(图 1B),条带密度扫描后的统计结果见表 1。



A: MCP-1 mRNA; B: β-actin mRNA. M: DNA marker; 1: Control group; 2: HG group; 3: HI group; 4: H_2O_2 group; 5: AGE group; 6: Selenite-HG group; 7: Selenite-HI group; 8: Selenite-H_2O_2 group; 9: Selenite-AGE group

图 1　RT-PCR 法检测亚硒酸钠预处理各组 HBZY-1 细胞 MCP-1 和 β-actin mRNA 表达

Fig 1　MCP-1 and β-actin mRNA expression in HBZY-1 cells of Selenite-pretreated groups by RT-PCR

表1 Selenite预处理各组HBZY-1 cells MCP-1 mRNA表达结果（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 MCP-1 mRNA expression in HBZY-1 cells of Selenite-pretreated groups by RT-PCR（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Mean optical density
Control	0.303 6 ±0.018 8
HG	1.179 4 ±0.010 4 *
HI	1.029 4 ±0.036 0 *
H_2O_2	1.005 0 ±0.031 5
BSA-AGE	0.868 5 ±0.012 3 *
Selenite-HG	0.459 3 ±0.019 2 *#
Selenite-HI	0.375 6 ±0.017 7 *#
Selenite-H_2O_2	0.410 9 ±0.009 2 *#
Selenite-BSA-AGE	0.309 7 ±0.019 1 #

*：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.01$，*vs* corresponding groups with Selenife stimulation

2.2 亚硒酸钠预处理后，4种刺激因素对HBZY-1细胞MCP-1 mRNA表达的影响

亚硒酸钠预处理后，再分别给予以上4种刺激因素孵育细胞系HBZY-1，可见MCP-1 mRNA表达量分别较相应未经亚硒酸钠预处理各组明显减少（$P<0.01$），但与对照组比较除Selenite-AGE组外（$P>0.05$），均有明显差异（$P<0.01$）（图1A）。内参β-actin mRNA表达见（图1B），条带密度扫描后的统计结果见（表1）。

3 讨 论

糖尿病肾病是糖尿病血管并发症中最常见的慢性并发症，也是糖尿病患者死亡的主要原因，其危害性极大，但其确切的发病机制还不清楚。目前认为，在糖尿病状态下，高血糖、胰岛素抵抗、非酶糖基化、氧化应激、血液流变学及血液动力学异常是致糖尿病肾病的主要原因，其中高血糖是首要致病因素。糖尿病肾病早期的变化是以肾脏肥大、肾小球高滤过率以及细胞外基质合成增加为特点，有25%～40%糖尿病患者可出现微量蛋白尿，而最终发展为晚期糖尿病肾病。MCP-1是一种分泌肽，是由单核细胞和各种非白细胞（内皮细胞、血管平滑肌细胞和局部肾细胞，如系膜细胞以及肾小管上皮细胞）所分泌，属于趋化因子家族中的β家族（即C-C亚家族）成员之一。

本研究分别给予高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物孵育HBZY-1细胞一定时间后，可见上述4种因素均可单独诱导HBZY-1细胞，使其MCP-1 mRNA表达量明显增加。4种刺激素诱导HBZY-1细胞MCP-1 mRNA表达增加的机制，结合文献和实验结果我们认为有以下几点：①高糖有直接刺激MCP-1 mRNA及蛋白表达增高的作用，该作用可能是PKC、MAPKs所介导，这可能是DN时肾小球中单核巨噬细胞浸润的重要原因。②大量的AGE可以和系膜细胞上的AGE受体（RAGE）相互作用，使IκB磷酸化而导致NF-κB的激活；新近的研究表明，AGE与AGE受体（RAGE）相互作用后可消耗细胞内谷胱甘肽，产生大量的氧自由基，从而导致细胞内信号传导改变，激活核转录因子NF-κB/AP-1。同时NF-κB也是调节RAGE表达的一个启动子，它的位点1和位点2的激活可使RAGE表达上调，NF-κB的激活作为一种正反馈，又进一步促进了AGE与RAGE的结合，导致NF-κB的持续活化，而活化的NF-κB可以上调MCP-1 mRNA及其蛋白表达，从而在糖尿病的肾损害中发挥重要作用。③过氧化氢可导致系膜细胞氧化应激加剧，诱导细胞内ROS的产生，从而迅速激活NF-κB，上调MCP-1的表达，在糖尿病肾病发生发展的早期起重要作用。④高胰岛素血症可能是通过激活PKC、MAPKs信号通路，引起系膜细胞氧化还原状态发生变化，使细胞内ROS产生增加，导致NF-κB的激活，从而使MCP-1表达上调。

MCP-1介导糖尿病肾小球损伤：MCP-1是一种对单核细胞有强烈趋化作用的细胞因子，还可作用于淋巴细胞和嗜碱性粒细胞；它不仅对血液中单核细胞有很强的趋化活性，也能通过激活转录因子NF-κB和AP-1来诱导非炎症细胞产生细胞因子和粘附分子，而且对血管内皮粘附分子（如ICAM）等的表达有调节作用，在诱导单核细胞迁入内皮下间隙以及渗入肾小球的过程中起重要作用[5,6]；同时，渗入到肾小球的单核巨噬细胞反过来又刺激局部肾小球细胞，在巨噬细胞衍化生长因子如PDGF和TGF-β等作用下导致系膜增生和细胞外基质聚集；此外通过炎症细胞因子如TNF-α和IL-1β等的作用，还可上调粘附分子和趋化因子的分泌，从而进一步有利于白细胞渗入到肾小球[7]。研究认为肾小球中单核巨噬细胞的浸润与细胞外基质（ECM）聚集及肾小球硬化密切相关，这种现象也见于DN患者中，此外在DN大鼠的肾小球中也存在大量单核巨噬细胞浸润。研究表明MCP-1在不同肾损害动物模型以及人肾脏疾病的肾小球和肾小管间质进行性损害中起着关键性作用；近年来通过细胞实验及对人和实验动物糖尿病肾病的研究发现，CC趋化因子MCP-1在糖尿病肾病的发病机制中起重要作用[8]。

硒是机体必需微量元素之一，它与人类健康密切相关。近年来硒与心血管疾病，肾脏疾病以及癌症的关系已引起人们普遍关注。自Rotruck等发现硒是谷胱甘肽过氧化物酶必需的结构成分以来，人们日益重视硒在细胞抗氧化系统中的重要作用；研究表明，硒是谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分，该酶的主要功能是清除体内脂质过氧化物，维持细胞膜的完整性，缺硒可出现拟高血糖症病理状态，引起白蛋白尿和肾小球硬化，从而加剧DN的发生发展；补充硒不仅可预防氧化应激，而且可防止肾脏损伤[2,9~11]。

本研究结果显示，先给予亚硒酸钠孵育HBZY-1

细胞一定时间后，再分别以上述4种刺激因素孵育HBZY-1细胞一定时间，可见各组HBZY-1细胞MCP-1 mRNA表达量明显减少。其机制可能是：①亚硒酸钠可通过保护系膜细胞免遭氧化损伤而抑制MCP-1的分泌；②亚硒酸钠可能通过抑制P38 MAPK信号通路而抑制MCP-1在系膜细胞的表达（此作用已在我们相关实验中得到证实）[12]，但亚硒酸钠是否通过抗氧化而抑制P38 MAPK亦或作用于信号通路的其它环节尚需进一步深入探讨。提示硒在防治DN发生发展过程中发挥着积极作用。

参考文献：

[1] Banba N, Nakamura T, Matsumura M, *et al*. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 58(2): 684-690.
[2] Reddi A S, Bollineni J S. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats[J]. Kidney Int, 2001, 59(4): 1342-1353.
[3] Makita Z, Vlassara H, Ceramic A, *et al*. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *in vivo*[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 5133-5138.
[4] Lynn E G, Siow Y, O K, *et al*. Very low-density lipoprotein stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 mesangial cells[J]. Kidney Int, 2000, 57(4): 1472-1483.
[5] Chiarelli F, Cipollone F, Mohn A, *et al*. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes[J]. Diabetes Care, 2002, 25(10): 1829-1834.
[6] Ha H, Yu M R, Choi Y J, *et al*. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(4): 894-902.
[7] Tanaka T, Kuroiwa T, Ikeuchi H, *et al*. Human platelets stimulate mesangial cells to produce monocyte chemoattractant protein-1 *via* the CD40/CD40 ligand pathway and may amplify glomerular injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 2488-2496.
[8] Shanmugam N, Reddy M A, Guha M, *et al*. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells[J]. Diabetes, 2003, 52(5): 1256-1264.
[9] Ersoz G, Yakaryilmaz A, Turan B. Effect of sodium selenite treatment on platelet aggregation of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Thromb Res, 2003, 111(6): 363-367.
[10] Sheng X Q, Huang K X, Xu H B, *et al*. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus[J]. Biol Trace Elem Res, 2004, 99(1-3): 241-254.
[11] 崔留欣，姜春霞，程学敏，等. 硒对氟致雄性大鼠生殖损害的拮抗作用[J]. 郑州大学学报(医学版)，2003，38(6)：896-900.
[12] 李艳波，邓华聪，郑丹，等. 硒对人脐静脉内皮细胞ECV-304单核细胞趋化蛋白-1表达的影响[J]. 中国地方病学杂志，2003，22(3)：221-222.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2005)14-1449-01

个案与短篇

柿叶提取物对链脲佐菌素糖尿病小鼠血糖血脂的影响

Effects of water abstracts from persimmon leaves on glycemia and lipidemia in mice with streptozocin-induced diabetes

张秋燕，刘秀萍，赵燕燕，王 亮，王华琳 （河北省职工医学院实验中心，保定 071000）

柿叶中含有黄酮甙类、三帖类、香豆素类、多糖等多种化学成分。其主要功效为止咳定喘、生津止渴、活血止血[1]。本研究初步观察了柿叶提取物(WESPL)对链脲佐菌素型糖尿病模型小鼠的血糖、血脂的影响。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

WESPL制备方法：柿叶于霜降后采摘，洗净阴干备用。柿叶200 g加2 500 ml蒸馏水浸泡30 min后，加热煮沸。沸腾后改用文火，保持微沸60 min，趁热过滤。药渣加蒸馏水1 000 ml同法煎煮，将两次滤液合并常压浓缩至相当于原药材2.4 g/ml。血糖试剂盒，北京北化康泰试剂有限公司；总胆固醇(TC)，甘油三酯(TG)，高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)，日本第一化学株式社；苯已双胍(PHF)，张家口云峰制药厂。

1.2 动物分组与处理

清洁级昆明种小鼠，体质量(20±2)g，由河北省实验动物中心提供。将50只小鼠编号称重后随机分为5组，每组10只，取其中1组作为正常对照组。其余各组小鼠禁食16 h后，ip 1% STZ溶液150 mg/kg，72 h后，眼内眦取血，UV-2550紫外-可见分光光度计测定血糖，血糖值大于11.1 mmol/L者确定为糖尿病模型鼠。将糖尿病模型鼠按血糖值编号后随机分为4组，2个WESPL治疗组(STZ+WESPL)、苯乙双胍组(STZ+PHF)，模型对照组(STZ+NS)。各组分别灌胃给药，1次/d，连续给药30 d。在末次给药前12 h动物禁食，给药后2 h，摘眼取血，分离血清，全自动生化分析仪测定测定血糖与血脂。

（下转1452页）

基金项目：河北省职工医学院青年科学基金资助项目(2002-3)
Supported by the Funds of Hebei Employees' Medical College for Young Scholars (2002-3)
作者简介：张秋燕(1968-)，女，河北省徐水县人，硕士，实验师，主要从事药理实验方面的研究。电话：13831226320，E-mail：qyanzhang@163.com
收稿日期：2004-10-19；修回日期：2005-03-16