维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0914-04

曲格列酮对炎症诱导系膜细胞细胞间粘附分子 1 表达的影响

刘琳砚,李 秋,王 莉,张 伟

(重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨曲格列酮对肿瘤坏死因子 α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)诱导的人肾小球系膜细胞表达细胞间粘附分子 1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)的影响及其可能机制。方法:将培养的系膜细胞分为空白对照组,TNF-α 组,曲格列酮对照组,不同浓度曲格列酮干预组,采用 MTT 法测系膜细胞增殖,RT-PCR 检测 ICAM-1mRNA 的表达,ELISA 检测培养上清中 ICAM-1 蛋白浓度,免疫组化法检测 NF-κB 的表达。结果:曲格列酮可抑制系膜细胞的增殖,TNF-α 组系膜细胞 ICAM-1mRNA 和蛋白的表达均比空白对照组增加($P<0.05$),曲格列酮干预组比 TNF-α 组明显下降($P<0.05$)。TNF-α 组诱导的 NF-κB 的活化可被曲格列酮所抑制($P<0.05$)。结论:曲格列酮可通过抑制 NF-κB 信号传导途径减少 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1 的表达。

【关键词】曲格列酮;系膜细胞;肿瘤坏死因子-α;核因子-κB;细胞间粘附分子-1

【中文图书分类法分类号】R692.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-10

Effects of troglitazone on cytokines induced expression of ICAM-1 in human mesangial cell

LIU Lin-yan, et al

(*Department of Nephrology and Immunology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of troglitazone on cell proliferation and expression of intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) induced by tumor necrosis factor-α (TNF-α) in human mesangial cells. *Methods*: Human mesangial cells were cultured in RPMI-1640 media containing TNF-α with or without troglitazone. Cell proliferation was assessed by MTT; the mRNA and protein expression of ICAM-1 were measured by RT-PCR and ELISA; the protein expression of NF-κB was measured by immunohistochemistry. *Results*: Troglitazone inhibited the proliferation of mesangial cell. The mRNA and protein expression of ICAM-1 of the cell induced by TNF-α increased significantly($P<0.05$). Troglitazone inhibited the expression compared with TNF-α group($P<0.05$). In addition, TNF-α induced up-regulation of NF-κB protein was remarkably reduced by troglitazone($P<0.05$). *Conclusion*: Troglitazone can inhibit TNF-α induced proliferation of mesangial cell and decrease the expression of ICAM-1 protein and mRNA through inhibiting NF-κB activity.

【Key words】 Troglitazone; Human mesangial cell; Tumor necrosis factor-α; Nuclear factor-κB; Intercellular adhesion molecule-1

在肾小球肾炎中,系膜细胞既是炎症过程的受害者,也是参与者。细胞间粘附分子可通过介导细胞与细胞,细胞与细胞外基质的粘附,参与白细胞的贴壁,外渗,聚集及免疫反应,促进炎症的发生发展,从而在肾小球肾炎的发生和进行性损伤中发挥重要作用[1]。过氧化物酶增殖物激活受体(PPARγ)是核受体超家族的成员,与其激动剂如曲格列酮,罗格列酮类药物结合后活化,从而调控包括细胞间粘附分子在内的多种基因的转录。近年来研究表明 PPARγ 在脂质代谢,肾脏炎症,肾小球硬化中起到重要的保护性作用。因此,本实验旨在探讨 PPARγ 激动剂曲格列酮对炎症诱导的人肾小球系膜细胞细胞间粘附分子表达的影响,从而观察其对肾脏炎症是否具有保护作用及其可能的机制。

作者介绍:刘琳砚(1982-),女,硕士,
研究方向:肾脏免疫。

通讯作者:李 秋,女,教授,E-mail:liqiu809@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾小球系膜细胞株由英国伦敦皇家自由医学院阮雄中教授惠赠。标准胎牛血清(天津 TBD 公司),RPMI1640 培养基(美国 GIBCO 公司),TNF-α(美国 Peprotech 公司),曲

维普资讯 http://www.cqvip.com

格列酮纯品(美国 Cayman 公司)。MTT 试剂(Sigma 公司),ICAM-1 ELISA 试剂盒(深圳晶美公司),小鼠抗人 NF-κB 单克隆抗体(美国 Santa cruz 公司),山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记抗体及 PV 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),RT-PCR 试剂盒(杭州博日科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肾小球系膜细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。当覆盖瓶底面积达 70%~80%时,用 0.25%胰蛋白酶消化 2~3min,离心,制成细胞悬液,分瓶继续培养,每周传 1~2 代。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 系膜细胞按每孔 2×10^4 个接种于 96 孔培养板中培养 24h 后,用无血清 RPMI1640 培养液培养 24h,使细胞生长处于静止状态而同步化。按下列分组进行处理:空白对照组为 RPMI1640 液,实验组为加入 TNF-α 20ng/ml 和不同浓度曲格列酮(0μmol/L、5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L),以仅加曲格列酮 5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L 作为曲格列酮对照组,每组设 6 个孔,分别培养 6、12、24、48h,终止前 4h 在每个孔内加入 20μl MTT 溶液(5mg/ml),37℃继续孵育 4h,弃上清,加入 DMSO150μl,振荡至结晶溶解,用酶标仪测定 A_{490}nm。

1.2.3 RT-PCR 检测 ICAM-1mRNA 的表达 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后,以 2×10^5 个/ml 接种于 50ml 培养瓶培养 24h 后,用无血清 RPMI1640 培养液培养 24h,再按 1.2.2 实验分组进行,每组 4 个样本。首先采用 RNA 提取试剂盒说明书抽提细胞总 RNA,溶于适量去核酸酶水中,RNA 的含量和纯度在紫外分光光度计中检测,所有标本 $A_{260/280}$ 比值=1.6~2.0,再逆转录成 cDNA,以适量 cDNA 为模板,在 TaqDNA 聚合酶催化下行 PCR 扩增。引物设计参照参考文献[2],ICAM-1 上游引物:5'-CAGTCACCTATGGCAACGAC-3',下游引物:5'-ATTCAGCGTCACCTTGGCTC-3'。β-actin 上游引物:5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3',下游引物:5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。PCR 扩增条件:94℃预变性 5min,94℃变性 0.5min,60℃退火 0.5min,72℃延伸 1min,共 34 个循环,最后 72℃延伸 5min。终产物分别为 243bp 和 527bp。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下拍照,应用 Quantity One 凝胶成像分析系统对各扩增带进行光密度扫描。

1.2.4 ELISA 法检测细胞培养上清液 ICAM-1 的含量 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后,以 2×10^5 个/ml 分别接种于 24 孔培养板中培养 24h 后,用无血清 RPMI1640 培养液培养 24h,再按 1.2.2 实验分组进行,每组 6 孔,分别培养 24h 后收集细胞培养上清液,保存于 -20℃。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测按试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 免疫组化检测 NF-κB 的表达 细胞爬片的制备及检测:细胞以 2×10^5 个/ml 接种在预先放置玻片的 24 孔板中生长 24h 后,给予无血清 RPMI1640 培养液培养 24h,再按 1.2.2 实验分组进行,每组 4 孔,均作用 24h,收集玻片,PBS 液漂洗 3 次,并用 4℃的丙酮固定细胞 10min。免疫组化方法按照 PV 二步法试剂盒说明书进行操作。通过 Image-Plus 5.0 软件进行阳性细胞率的分析。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件对实验数据进行统计学处理,采用单因素方差分析进行各组间比较,两组结果的比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 曲格列酮对 TNF-α 诱导的系膜细胞增殖的影响

在 TNF-α 诱导的 48h 内,TNF-α 促进系膜细胞增殖(与空白对照组比较 $P<0.05$),曲格列酮作用 6h 对细胞生长的抑制作用不显著,随作用时间延长,各浓度组在 12h、24h、48h 均有明显抑制作用。同一浓度的曲格列酮,随作用时间延长其抑制能力增高,在 24h 呈现高峰,同一时间点(12h、24h、48h)随着曲格列酮浓度增高,抑制作用增强。曲格列酮对 TNF-α 诱导的细胞生长的抑制作用具有时间,剂量依赖关系。仅加曲格列酮的各浓度组与空

表 1 不同浓度,时间的曲格列酮对系膜细胞增殖的影响(A_{490} 值)

组别	6h	12h	24h	48h
空白对照组	0.164±0.01	0.167±0.01	0.175±0.01	0.181±0.01
TNF-α 组	0.196±0.02#	0.236±0.02#	0.282±0.03#	0.264±0.03#
TNF-α 曲格列酮 5μmol/L	0.188±0.02	0.219±0.02	0.179±0.01*	0.176±0.01*
TNF-α 曲格列酮 10μmol/L	0.185±0.02	0.182±0.01*	0.174±0.01*	0.165±0.01*
TNF-α 曲格列酮 20μmol/L	0.179±0.01	0.170±0.01*	0.163±0.01*	0.152±0.01*
曲格列酮 5μmol/L	0.165±0.01	0.168±0.01	0.170±0.01	0.174±0.01
曲格列酮 10μmol/L	0.165±0.01	0.169±0.01	0.172±0.01	0.170±0.01
曲格列酮 20μmol/L	0.170±0.01	0.171±0.01	0.175±0.01	0.174±0.01

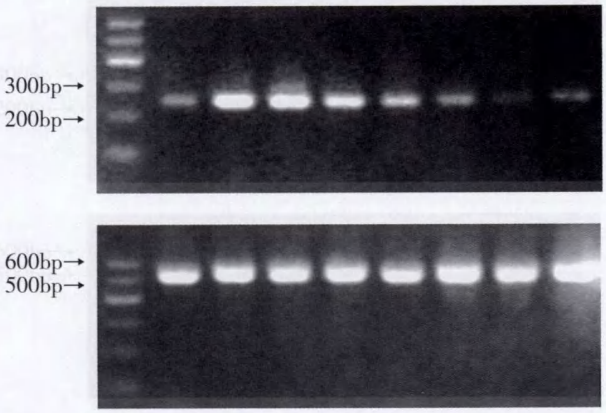
#$P<0.05$,与同时间点空白对照组比较;*$P<0.05$,与同时间点 TNF-α 组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

白对照组比较均无明显抑制作用。

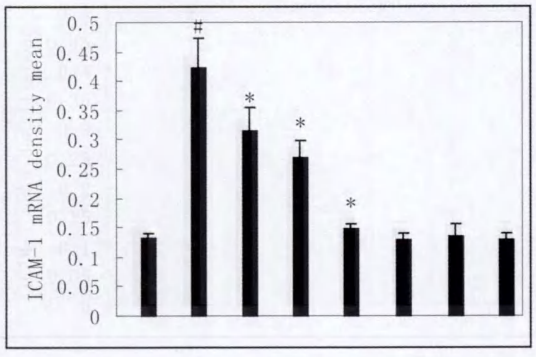
2.2 曲格列酮对 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1mRNA 表达的影响

经半定量 RT-PCR 检测发现,基础状态下系膜细胞表达 ICAM-1mRNA 的量极低,经 TNF-α 诱导后 ICAM-1mRNA 的量明显上调($P<0.05$),而加入不同浓度曲格列酮后 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1mRNA 的量逐渐降低,与 TNF-α 组比较均有显著性差异($P<0.05$)。见图 1、图 2。



TNF-α	−	+	+	+	+	−	−	−	
曲格列酮	−	−	5	10	20	5	10	20	μmol/L

图 1 ICAM-1 PCR 产物及 β-actin 电泳图



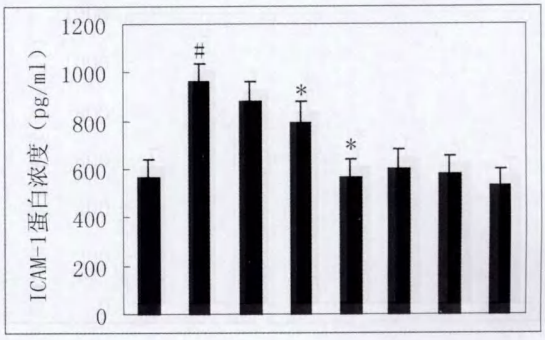
TNF-α	−	+	+	+	+	−	−	−	
曲格列酮	−	−	5	10	20	5	10	20	μmol/L

#$P<0.05$,与空白对照组比较;*$P<0.05$,与 TNF-α 组比较

图 2 曲格列酮对系膜细胞 ICAM-1mRNA 表达的影响

2.3 曲格列酮对 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1 蛋白分泌的影响

TNF-α 诱导系膜细胞 24h,TNF-α 组上清液 ICAM-1 浓度较空白对照组明显升高($P<0.05$),加入曲格列酮 10μmol/L,20μmol/L均能显著降低 ICAM-1 浓度($P<0.05$),加入曲格列酮 5μmol/L 与TNF-α 组比较无显著性差异。曲格列酮各浓度对照组与空白对照组比较均无显著性差异。见图 3。



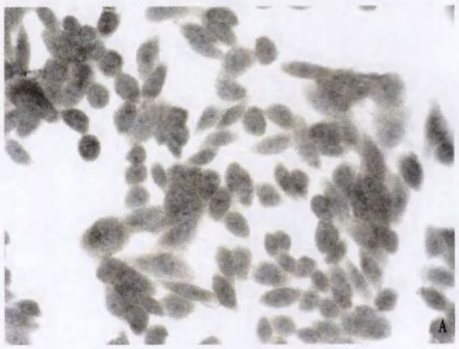
TNF-α	−	+	+	+	+	−	−	−	
曲格列酮	−	−	5	10	20	5	10	20	μmol/L

#$P<0.05$,与空白对照组比较;*$P<0.05$,与 TNF-α 组比较

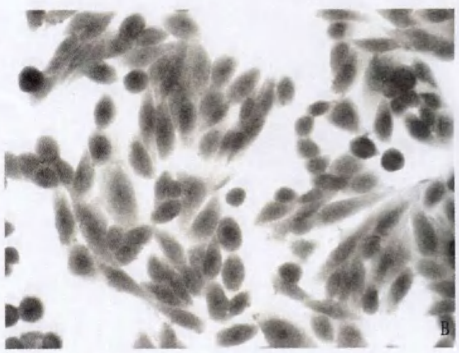
图 3 曲格列酮对系膜细胞 ICAM-1 蛋白表达的影响

2.4 曲格列酮对 TNF-α 诱导的系膜细胞 NF-κB 表达的影响

空白对照组和曲格列酮对照组可见细胞浆棕褐色颗粒,阴性对照组仅见胞核蓝染胞浆不着色,TNF-α 组细胞核,细胞浆均可见棕褐色颗粒的 NF-κB 阳性细胞,以胞核中较多,与空白对照组比较有统计学

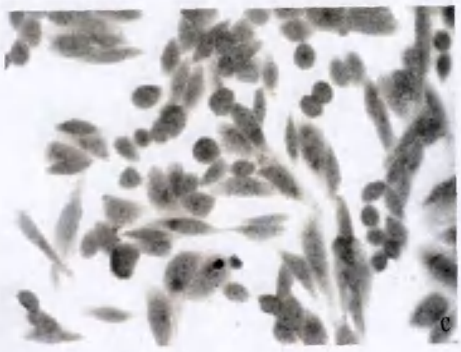


A. 空白对照组

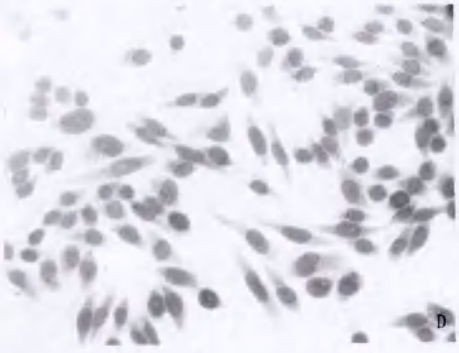


B. TNF-α 组

维普资讯 http://www.cqvip.com

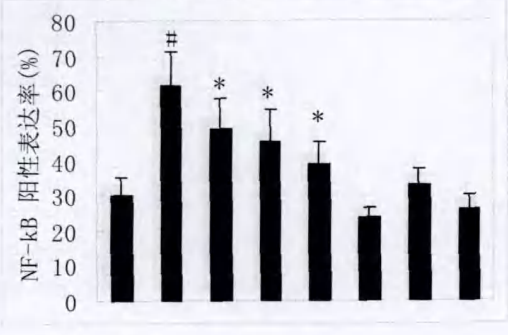


C. TNF-α + 曲格列酮 20μmol/L



D. 阴性对照组

图 4 免疫组化法检测 NF-KB 蛋白表达（×400）



#P<0.05，与空白对照组比较；*P<0.05，与 TNF-α 组比较

图 5 曲格列酮对系膜细胞 NF-κB 蛋白表达的影响

意义（P<0.05）。曲格列酮干预组细胞和细胞浆内棕黄色颗粒随曲格列酮浓度的增加，着色逐渐变淡，与 TNF-α 组比较有统计学意义（P<0.05）。见图 4、图 5。

3 讨 论

在肾小球肾炎的发生，发展和转归过程中，系膜细胞发挥着重要的作用。ICAM-1 在肾脏炎性病变中介导白细胞向炎症区域移行、聚集，并与肾脏固有细胞如血管内皮细胞、肾小管上皮细胞粘附和作用，在肾炎的发生发展中也起重要作用[3]。Pai R[4]报道经 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1mRNA 和蛋白表达增加。本实验用 TNF-α 刺激系膜细胞 48h，实验结果与其基本一致。我们观察到在系膜细胞培养的 6~48h 内，TNF-α 可促进其增殖，在培养 24h 时达到增殖高峰，并且 TNF-α 促进系膜细胞 ICAM-1 的产生，表明 TNF-α 不仅促进系膜细胞的增殖，还通过增加 ICAM-1 的分泌，从而加重细胞炎症损伤。Tsuchiya 等[5]的实验表明曲格列酮可抑制系膜细胞的增殖。本实验结果也提示，曲格列酮在 5~20μmol/L 的浓度范围内对 TNF-α 诱导的系膜细胞增殖具有抑制作用，并呈时间，剂量依赖关系。预试验中发现曲格列酮浓度＞40μmol/L，细胞成活率＜95%，故在本实验的浓度范围内，可排除曲格列酮对系膜细胞的药物毒性作用。

PPARγ 属核受体超家族中的成员，在肾脏中主要分布于髓质集合管远侧端，在肾小球和肾微血管中表达较少，它与其激动剂噻唑烷二酮类药物结合后，促进脂肪代谢，增强胰岛素敏感性，目前广泛用于临床糖尿病的治疗，曲格列酮为噻唑烷二酮类药物之一。Ohga 等[6]报道噻唑烷二酮类药物对糖尿病肾病大鼠的抗炎效应是通过抑制 NF-κB 的活性，ICAM-1 的表达，巨噬细胞的侵润实现的。近年来关于其在抑制炎症反应，减轻肾小球硬化方面的作用也倍受关注。Haraguchi 等[7]发现在肾小球肾炎动物模型中，曲格列酮能减少尿蛋白，抑制新月体生成，并减少炎症细胞在肾小球的侵润，聚积。Makoto[8]在小鼠血管内皮细胞的研究中发现 PPARγ 列酮可抑制 TNF-α 诱导的 ICAM-1mRNA 和蛋白表达并可减低 NF-κB 的活性。对系膜细胞的研究尚未见报道，我们的实验结果提示，5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L的曲格列酮可抑制 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1mRNA 的表达及 NF-κB 的活性，但在蛋白水平曲格列酮 5μmol/L对 ICAM-1 无抑制作用。

我们从细胞粘附机制的角度研究 PPARγ 激动剂曲格列酮对 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1 表达的影响，结果提示 PPARγ 激动剂可抑制 TNF-α 诱导的系膜细胞 ICAM-1 表达的上调，可能是通过 NF-κB 的激活实现的，说明 PPARγ 激动剂可

（下转第 922 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

[3] Conley RK,Williams TJ,Ford APDW,et al. The role of a1-a-drenoceptors and 5-HT_{1A} receptors in the control of the micturition reflex in male anaesthetized rats[J]. Br. J. Pharmacol,2001;133(1):61-72.

[4] Thor KB,Katofiasc MA,Danuser H,et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in control of lower urinary tract function in cats[J]. Brain Res,2002;946(2):290-297.

[5] Doly S,Madeira A,Fischer J,et al. The 5-HT_{2A} receptor is widely distrihuted in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons[J]. J Comp Neurol,2004;472(4):496-511.

[6] Doly S,Fischer J,Brisorguell MJ,et al. 5-HT5A receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature[J]. J. Comp. Neurol,2004;476(4):316-329.

[7] Doly S,Fischer J,Brisorguell MJ,et al. Pre-and postsynaptic localization of the 5-HT_7 receptor in rat dorsal spinal cord:immunocytochemical evidence[J]. J. Comp. Neurol,2005;490(3):256-269.

[8] de Groat WC. Influence of central serotonergic mechanisms on lowerurinary tract function[J]. Urology,2002;59(5 Suppl 1):30-36.

[9] Rossler AS,Kia K,Bernabe'J,et al. Effect of the 5-$HT_{2A/2C}$ receptor agonist DOI on female rat sexual behaviour[J]. J Sex Med, 2006;3(3):432-441.

[10] Watson NV,Gorzalka BB. DOI-induced inhibition of copulatory behavior in male rats:reversal by 5-HT2 antagonists[J]. Pharmacol Biochem Behav,1991;39(3):605-612.

[11] Fenik P,Veasey SC. Pharmacological characterization of serotonergic receptor activity in the hypoglossal nucleus[J]. Am J Respir Crit Care Med,2003;167(4):563-569.

[12] Danuser H,Thor KB. Spinal 5-HT2 receptor-mediated facilitation of pudendal nerve reflexes in the anaesthetized cat[J]. Br. J.Ph armacol,1996;118(1):150-154.

[13] Read KE,Sanger GJ,Ramage AG. Evidence for the involvement of central 5-HT_7 receptors in the micturition reflex in anaesthetised female rats[J]. Br. J. Pharmacol,2003;140(1):52-60.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 917 页)

在调节肾脏炎症的过程中发挥保护性作用,进一步为临床提供新的理论依据。

参 考 文 献

[1] 张玉梅,孙桂芝,周 同.细胞粘附分子与肾脏疾病[J]. 上海第二医科大学学报,2004;24(7):524-527.

[2] Taekema-Roelvink ME,Kooten C,Kooij SV,et al. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1 [J]. J Am Soc Nephrol,2001;12(5):932-940.

[3] Prozialeck WC,Edwards JR.Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury[J]. Pharmacol Ther,2007;114(1):74-93.

[4] Pai R,Bassa B,Kirschenbaum MA,et al. TNF-alpha stimulates monocyte adhesion to glomerular mesangial cells. The role of intercellular adhesion molecule-1 gene expression and protein kinases[J]. J Immunol,1996;156(7):2571-2579.

[5] Tsuchiya T,Shimizu H,Shimomura K,et al. Troglitazone inhibits isolated cell proliferation,and induces apoptosis in isolated rat mesangial cells[J]. Am J Nephrol,2003;23(4):222-228.

[6] Ohga S,Shikata K,Yozai K,et al. Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2007;292(4):1141-1150

[7] Haraguchi K,Shimura H,Onava T. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)gamma activators[J]. Clin Exp Nephrol,2003;7(1):27-32.

[8] Makoto S,Paul J,Tomas W,et al. Troglitazone,a PPAR-γ activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-α[J]. BMC Physiol,2005;5(1):3.

(责任编辑:关蕴良)