维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0493 - 03

# 亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞表达 COX - 2 mRNA 的调控

魏倩萍[1], 邓华聪[1], 赵 劼[2], Harvest F. Gu[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;2. 重庆医科大学超声工程研究所,重庆 400016;
3. Department of Molecular Medicine, Karolinska Institute 17176 Stockholm, Sweden)

【摘 要】目的:观察亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞(RGMC)表达环氧化酶 - 2 (COX - 2) 的影响,从而研究硒在抗糖尿病肾病中的作用机制。方法:分别以高葡萄糖、糖基化终产物,高胰岛素和过氧化氢孵育 RGMC;先给予亚硒酸钠预处理细胞后,再分别给予上述 4 种因素孵育 RGMC,观察细胞 COX - 2 mRNA 的表达。结果:4 种刺激因素均可作为独立因素,导致 RGMC COX - 2 mRNA 表达量的增加;亚硒酸钠能抑制上述 4 种因素所致的 COX - 2 mRNA 的表达。结论:亚硒酸钠通过抑制 COX - 2 mRNA 在 RGMC 中的表达,从而有效地防治糖尿病肾病的发生发展。

【关键词】亚硒酸钠;环氧化酶 - 2;糖尿病肾病;大鼠肾小球系膜细胞
【中国图书分类法分类号】R587.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 02 - 25

## A role of sodium selenite in regulating expression of Cyclooxygenase - 2(COX - 2) mRNA in rat mesangial cells

*WEI Qianping, et al*

(*Department of Endocrinolgy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effect of sodium selenite on expression of Cyclooxygenase - 2 (COX - 2) mRNA in rat mesangial cells (RGMC), and to study the mechanism of sodium selenite in anti - diabetic nephropathy. *Methods*: RGMC was incubated with high glucose, advanced glycosylation end products (AGE), high insulin and $H_2O_2$ respectively; simultaneously, RGMC pre - treated with sodium selenite was incubated with above factors. The expression of COX - 2 mRNA was detected and compared. *Results*: The four factors increased the expression of COX - 2 mRNA independently; sodium selenite inhibited the expression of COX - 2 mRNA by the four factors distinctly. *Conclusion*: Sodium selenite suppresses the expression of COX - 2 mRNA in RGMC, which suggests that sodium selenite may play a significant role in the prevention of diabetic nephropathy by inhibition of the expression of COX - 2 mRNA in RGMC.

【Key words】Sodium selenite; Cyclooxygenase - 2; Diabetic nephropathy; Rat mesangial cells

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes, DM)最常见、最严重的慢性并发症,随着 DM 发病率的逐年提高,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和肾小管肥大、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,环氧化酶 - 2 (Cyclooxygenase - 2, COX - 2)在糖尿病肾病发生发展中起重要作用[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,而且还能阻止肾脏损害[2]。但其是否作用于 COX - 2 未见文献报道。本研究在体外模拟糖尿病状态,探讨糖尿病时存在的各种应激如高葡萄糖、糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)、高胰岛素、过氧化氢对 RGMC COX - 2 表达的影响,及亚硒酸钠在 RGMC COX - 2 表达中的作用,从而明确 COX - 2 在糖尿病肾病形成中的作用及硒在抗糖尿病肾病中的作用机制。

作者介绍:魏倩萍(1966 - ),女,副教授,博士,
主要研究方向:糖尿病肾病。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO. 30370670)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠肾小球系膜细胞,(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);柱离心式总 RNA 抽提试剂盒、RT－PCR 两步法试剂盒(TaKaRa 公司);亚硒酸钠(Karolinska Institute 赠送);PCR 相对分子量标准(TaKaRa 公司);PCR 引物合成(上海生物工程公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠肾小球系膜细胞(RGMC)的培养

RGMC 培养于含 20%灭活新生牛血清的 RPMI－1640 培养液中,培养条件为 37℃,饱和湿度 5%$CO_2$,每 2～3 天用 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

#### 1.2.2 体外制备 BSA－AGES

参考文献[3],按牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)50mg/ml 与葡萄糖 90mg/ml,在体外于 37℃孵育 60 天,制备结束后 BSA－AGES 用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,并测定其荧光强度。－20℃避光保存备用。

#### 1.2.3 实验分组

分别以一定浓度高葡萄糖、糖基化终末产物、高胰岛素和过氧化氢刺激 RGMC 一定时间;先给予 sodium selenite100nmol/L 预处理 RGMC 48h,再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育 RGMC,同时设对照组。分组情况如下:(1)对照组(control 组):无任何刺激因素孵育 RGMC。(2)高糖组(high glucose, HG 组):用 25mmol/L glucose 刺激 RGMC 72h。(3)高胰岛素组(high insulin, HI 组):用 100nmol/L 的 insulin 刺激 RGMC 24h。(4)过氧化氢组($H_2O_2$ 组):用 100μmol/L 的 $H_2O_2$ 刺激 RGMC 1h。(5)糖基化终末产物组(AGEs 组):用 100mg/L 的 AGEs 刺激 RGMC 6h。(6) sodium selenite－高糖组(sodium selenite－HG 组):依次以 100nmol/L sodium selenite 和 25mmol/L 的 glucose 分别刺激 RGMC 48h 和 72h。(7) sodium selenite－胰岛素组(sodium selenite－HI 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100nmol/L 的 insulin 分别刺激 RGMC 48h 和 24h。(8) sodium selenite－过氧化氢组(sodium selenite－$H_2O_2$ 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100μmol/L 的 $H_2O_2$ 分别刺激 RGMC 48h 和 1h。(9)sodium selenite－糖基化终产物组(sodium selenite－AGES 组):依次以 100nmol/L 的 sodium selenite 和 100mg/L 的 AGEs 分别刺激 RGMC 48h 和 6h。

#### 1.2.4 逆转录聚合酶链反应(RT－PCR)法检测 COX－2 mRNA 表达

以柱离心式总 RNA 抽提试剂盒提取 RGMC 总 RNA,测定总 RNA 浓度,计算其纯度,A260/A280 均在 1.8～2.0 之间。COX－2 引物序列按文献[4]:上游引物:5'－ACTTGCTCACTTTGTTGAGTCAT－3';下游引物:5'－TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG－3',扩增片段长度 583bp。内参 β－actin 引物序列:上游引物:5'－TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC－3',下游引物:5'－TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGG－3',扩增片段长度 228bp。以两步法 RT－PCR 试剂盒进行反转录扩增,扩增条件:94℃性 30s,55℃退火 1min,72℃延伸 1min,共 35 个循环,72℃最后延伸 7min。每次 PCR 反应至少重复 3 次。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,结果经图象分析系统扫描存图,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 $F$ 分析具有统计学意义,再作两两比较 $t$ 检验,$P<0.05$ 表示有统计学意义,$P<0.001$ 表示有显著意义。

## 2 结 果

### 2.1 HG、HI、$H_2O_2$ 和 $AGE_S$ 对 RGMC COX－2 表达的影响

以一定浓度 HG、HI、$H_2O_2$ 和 AGES 刺激因素孵育 RGMC 一定时间后,各刺激组 RGMC COX－2 mRNA 表达量均明显增加,与对照组(CON 组)比较有非常显著差异($P<0.001$)(图 1),内参 β－actin mRNA 表达(图 2),条带密度扫描后的统计结果见(表 1)

**表 1 RGMC COX－2mRNA 表达结果($\bar{x} \pm s$)**

| 组 别 | 标本数 | 平均光密度 |
|---|---|---|
| Con 组 | 6 | 0.3513±0.0225 |
| HG 组 | 6 | 1.1746±0.0145* |
| HI 组 | 6 | 1.0919±0.0212* |
| $H_2O_2$ 组 | 6 | 1.2170±0.0154* |
| BSA－AGEs 组 | 6 | 1.1168±0.0414* |
| Se＋HG 组 | 6 | 0.4281±0.0175*# |
| Se＋HI 组 | 6 | 0.4591±0.0181*# |
| Se＋$H_2O_2$ 组 | 6 | 0.4082±0.0163*# |
| Se＋AGEs 组 | 6 | 0.4555±0.0223*# |

注:与对照组比较,*$P<0.001$,

亚硒酸钠预处理组与刺激组比较#$P<0.001$

### 2.2 亚硒酸钠预处理后,4 种刺激因素对 RGMC COX－2 表达量的影响

亚硒酸钠预处理后,再分别给予 4 种刺激因素孵育 RGMC,可见各预处理组 RGMC COX－2 mRNA 表达被显著抑制,其表达量分别较相应未经亚硒酸钠预处理各组明显减少($P<0.001$),但与对照

维普资讯 http://www.cqvip.com



组比较仍有显著差异($P<0.001$)，图 1，内参 β-actin mRNA 表达(图 2)，条带密度扫描后的统计结果见(表 1)。

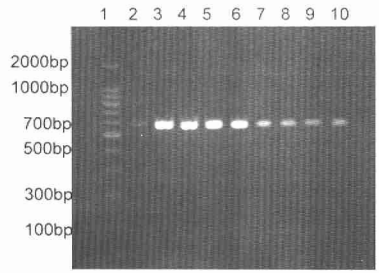



图 1 各组 RGMC COX-2 mRNA 电泳图

1. Marker; 2. 对照组; 3. HG 组; 4. HI 组; 5. $H_2O_2$ 组; 6. AGEs 组; 7. Se-HG 组; 8. Se-HI 组; 9. Se-$H_2O_2$ 组; 10. Se-AGEs 组

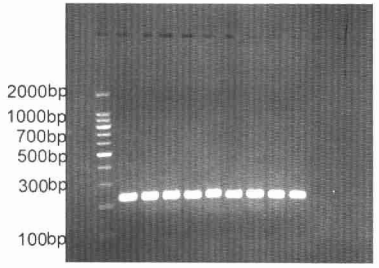



图 2 各组 RGMCβ-actin mRNA 电泳图

1. Marker; 2. 对照组; 3. HG 组; 4. HI 组; 5. $H_2O_2$ 组; 6. AGEs 组; 7. Se-HG 组; 8. Se-HI 组; 9. Se-$H_2O_2$ 组; 10. Se-AGEs 组

## 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。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及结构基础，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，最终发展为晚期糖尿病肾病。COX-2 参与多种炎症反应，在生理状态下，COX-2 在大多数组织细胞中缺如，它由外界刺激如分裂素、细胞因子、生长因子、细菌内毒素等诱导产生，是介导花生四烯酸代谢的限速酶，它能将花生四烯酸转化为前列腺素族(PGs)，如前列环素和血栓素 A2(TXA2)，前列腺素族可促进细胞有丝分裂、细胞增殖和血管活性作用。然而，在肾脏 COX-2 却是低水平表达，但其分布有动物种属之间的差异性，在啮齿类动物，COX-2 主要分布在致密斑、髓袢升支粗段和乳头间隙细胞；而在正常人和其它灵长类动物，COX-2 却主要分布在肾小球和肾脏的小静脉血管；其生理功能它主要是调节肾素-血管紧张素分泌、肾小球滤过率、维持钠的动态平衡，同时对于维持渗透压平衡免受高渗影响也是非常重要的；当在一些病理因素的刺激下如：钠的丢失，肾动脉狭窄和大动脉收缩，肾切除，使用袢利尿剂、Bater's 综合症以及充血性心衰等，即可导致 COX-2 表达增加[7]。国外研究发现，在人系膜细胞，高糖能增加线粒体活性氧簇的产生，导致 NF-κB 激活，诱导 COX-2 mRNA 和蛋白表达以及 PGE2 合成增加，引起糖尿病早期血液动力学改变，导致肾小球高过滤状态。因此，COX-2 在糖尿病肾病的发生发展中起重要作用[5,6]。本研究以糖尿病时存在的一些特有因素如高葡萄糖、糖基化终产物生成增多，高胰岛素及氧化应激刺激大鼠肾小球系膜细胞，结果显示：高葡萄糖，糖基化终末产物，高胰岛素及过氧化氢均可分别作为独立因素诱导大鼠肾小球系膜细胞 COX-2 mRNA 表达明显增加。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[8,9]。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糖尿病肾病的发生发展；补充硒不仅可预防氧化应激，而且也可防止肾脏损伤[10-14]。然而硒是否能调控 COX-2 的表达目前国内外尚未见文献报道。本研究以亚硒酸钠预处理大鼠肾小球系膜细胞，再分别给予 4 种刺激因素孵育大鼠肾小球细

维普资讯 http://www.cqvip.com



膜细胞,可见 COX－2 表达被显著抑制。表明亚硒酸钠可能通过抑制 COX－2 而有效地防治糖尿病肾病的发生发展。

## 参 考 文 献


[1] Juliane, Vucadinovic Mario, Rehm Margot, et al. COX－2 and osteopontin in cocultured platelets and mesangial cells: Role of glucocorticoids[J]. J. Kidney Int, 2000; 57(6): 2229－2238.

[2] Reddi Alluru S, Bollineni, Jaya S, et al. Selenium－deficient induces renal oxidative stress and injury via TGF－[beta] 1 in normal and diabetic arts[J]. 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 Boil Chem, 1992; 267: 5133－5138.

[4] Feng L, Sun W, Xia Y, et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression[J]. J. Arch. Biochem. Biophy., 1993; 307(2): 361－368.

[5] Kiritoshi Shinsuke, Nishikawa Takeshi, Sonoda Kazuhiro, et al. Hyperglycemia－Induced Reactive Oxygen Species through the Mitochondrial Electron Transport Chains Induce the Expression of Cyclooxygenase－2 Gene in Human Mesangial Cells[J]. J. Diabetes, 2002; 51(2): A184.

[6] Khan Kanwar Nasir M, Paulson Susan K, Verburg Kenneth M, et al. Pharmacology of cyclooxygenase－2 inhibition in the kidney[J]. J. Kidney Int, 2002; 61(4): 1210－1219.

[7] Harris Cynthia J, Brater D, Craig. Renal effects of cyclooxygenase－2 selective inhibitors[J]. J. Nephropathy and Hypertension, 2001; 10(5): 603－610.

[8] Sheng XQ, Huang KX, Xu HB, et al. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus [J]. J. Biol Trace Elem Res, 2004; 99(1－3): 241－254.

[9] Neve Jean, Xu Xue－Ming, Carlson Bradley A, et al. Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra－nutritional effects for an essential trace element[J]. J. Clin Nutr and Meta Care, 2002; 5(6): 659－663.

[10] Ersoz G, Yakaryilmaz A, Turan B, et al. Effect of sodium selenite treatment on platelet aggregation of streptozotocin－induced diabetic rats[J]. J. Thromb Res, 2003; 111(6): 363－367.

[11] Battell ML, Delgatty HLM, Mcneill JH, et al. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rat[J]. J. Mol Cell Biochem, 1998; 179: 27－34.

[12] Douillet C, Tabib A, Bost M, et al. A selenium supplement associated or not with Vitamin E delays early renal lesions in experimental diabetes in rats[J]. J. Proc Soc Exp Biol Med, 1996; 211: 323－331.

[13] 倪银星. 硒与糖尿病[J]. 重庆医科大学学报, 2002; 27(3): 366－368.

[14] 张玉洪, 肖 谦. 单核苷酸多态性在研究糖尿病微血管病变易感基因中的应用[J]. 重庆医科大学学报, 2004; 29(1): 18－20.


(上接第 492 页)


[4] 贾延劼, 杨于嘉, 宋建辉, 等. 新生大鼠神经干细胞的分离培养[J]. 中国当代儿科杂志, 2002; 4(2): 81－84.

[5] Lin CH, Yeh SH, Lu KT, et al. A role for the PI－3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala[J]. Neuron, 2001; 31(1): 1－20.

[6] Edstrom A, Ekstrom PA. Role of phosphatidylinositol 3－kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants[J]. J Neurosci Res, 2003; 74(5): 726－735.

[7] Walker EH, Pacold ME, Perisic O, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3－kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine[J]. Mol Cell, 2000; 6(4): 909－919.

[8] Villa A, Snyder EY, Vescovi A, et al. Establishment and properties of a growth factor－dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS[J]. Exp Neurol, 2000; 161(1): 67－84.

[9] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell－intrinsic death machinery[J]. Cell, 1997; 91(2): 231－241.

[10] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase－9 by phosphorylation[J]. Science, 1998; 282(5392): 1318－1321.

[11] Barnabé－Heider F, Miller FD. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways[J]. J Neurosci, 2003; 23(12): 5149－5160.