

· 实验研究 ·

高糖状态下晚期糖基化终产物诱导 NRK-52E 细胞氧化应激及普罗布考干预研究

钟宇华, 梁华晟

(广西北海市内分泌代谢病研究所 536000)

摘要:目的 探讨高糖状态下晚期糖基化终产物(AGEs)诱导大鼠肾小管上皮细胞株 NRK-52E 氧化应激及普罗布考干预作用。方法 作用 72 h 后,用 Western Blot 检测空白对照组(0 mmol/L 葡萄糖)、高糖组(25 mmol/L 葡萄糖)、AGEs 组(100 mg/L AGEs)、高糖 AGEs 组(100 mg/L AGEs 加 25 mmol/L 葡萄糖)、普罗布考预处理高糖 AGEs 组(100 μmol/L 普罗布考加 100 mg/L AGEs 加 25 mmol/L 葡萄糖)中核因子 κB(NF-κB)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在 NRK-52E 细胞的表达。用 CM₂H₂DCFDA 试剂检测活性氧(ROS)含量。结果 高浓度葡萄糖及 AGEs 均上调 NF-κB 及 TNF-α 表达。普罗布考显著抑制调高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NF-κB 及 TNF-α 表达,以及抑制 ROS 生成。结论 普罗布考能抑制高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导细胞氧化应激。

关键词:晚期糖基化终产物;NRK-52E 细胞;葡萄糖;氧化应激;普罗布考

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.016

中图分类号:R365.587

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2737-02

Effect of advanced glycation end-products on high glucose inducing oxidative stress in NRK-52E and inhibited by probucol

ZHONG Yu-hua, LIANG Hua-sheng

(Beihai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Guangxi, 536000, China)

Abstract: **Objective** To study whether probucol had affected advanced glycation end-products(AGEs) under high glucose inducing oxidative stress in NRK-52E. **Methods** NF-κB and TNF-α were detected Western Blot in control group(0 mmol/L glucose), high glucose group(25 mmol/L glucose), AGEs group(100mg/L AGEs), AGEs and high glucose group (100mg/L AGEs + 25mmol/L glucose), probucol group (100 μmol/L probucol+100 mg/L AGEs+25 mmol/L glucose) had carried out after 72 h. Then ROS were detected by CM₂H₂DCFDA. **Results** The expression of NF-κB and TNF-α were up-regulated by high glucose and AGEs, probucol could also down-regulate NF-κB and TNF-α induced by AGEs under high glucose condition. probucol also could decrease ROS which were increased by high glucose and AGEs. **Conclusion** AGEs under high glucose condition can induce oxidative stress, but which can be inhibited by probucol in NRK-52E.

Key words: advanced glycation end-products; NRK-52E; glucose; oxidative stress; probucol

越来越多的研究发现晚期糖基化终产物(AGEs)在糖尿病肾病发生、发展起着重要的作用^[1],而在非糖尿病肾病的研究也发现 AGEs 是通过诱导氧化应激等途径参与肾功能衰竭的主要病理因子。因此,本研究观察在高浓度葡萄糖状态下 AGEs 作用大鼠肾小管上皮细胞株 NRK-52E,各种氧化应激指标核因子 κB(NF-κB)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达情况,同时检测活性氧(ROS)含量。然后应用调脂药普罗布考进行干预,以阐明高糖条件下 AGEs 对肾小管导管上皮细胞氧化应激的影响及普罗布考的干预效果。

1 材料与方

1.1 细胞培养 大鼠肾小管上皮细胞株 NRK-52E 购自中国科学院细胞库,DMEM 培养液购自美国 GIBCO 公司。基本配备为 10 mL 进口胎牛血清(BSA,美国 Sigma 公司)、1 mL 双抗(青霉素、链霉素各 100 u/mL)、1 mmol/L 乙二胺四乙酸。每周传代 2~3 次。

1.2 AGEs 制备纯化及鉴定 取 50 g/L BSA 及 0.5 mmol/L D-葡萄糖溶于 0.2 mmol/L 的缓冲液后,加入蛋白抑制剂(1.5 mmol/L 苯甲磺酰氟及 0.5 mmol/L 乙烯二胺四乙酸钠),用 0.22 mm 滤器过滤,37 °C 培养箱中孵育 90 d。AGEs 采用 AGEs-BSA 荧光光谱扫描鉴定。AGEs-BSA 激发高峰位于 360 nm,发射高峰位于 430 nm。最终浓度为 90.52 u/mg。

1.3 实验分组与处理 (1)空白对照组:无糖培养基未进行干

预。(2)高糖组:用含 25 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基培养。(3)AGEs 组:在无糖的 DMEM 培养基下应用 100 mg/L AGEs 干预。(4)高糖 AGEs 组:25 mmol/L 葡萄糖培养基应用 100 mg/L AGEs 干预。(5)普罗布考预处理高糖 AGEs 组:用 100 μmol/L 普罗布考预处理 3 d 后,25 mmol/L 葡萄糖培养基应用 100 mg/L AGEs 干预。各组均在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 d,每孔细胞均为每 24 小时换液 1 次。

1.4 Western Blot 检测蛋白表达 进行常规细胞裂解获取蛋白后,与预染蛋白 marker 一起上样,经分离胶和浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,完毕后将蛋白质电转印到聚偏二氟乙烯转印膜(PVDF)上,将膜放入含 100 g/L 脱脂奶粉的 TBST 中封闭,4 °C 过夜,然后与一抗((NF-κB、TNF-α,购于 Santa Cruz 公司)分别按 1:500、1:250 的比例室温孵育 90 min,用 TBST 液洗膜 3 次,每次 5 min,PVDF 膜分别与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:1 500)室温孵育 45 min 后,用 Tris 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。用 ECL 显色试剂显示目的条带。

1.5 ROS 检测 各组细胞加入 10 μL 的 1 mmol/L CM₂H₂DCFDA(美国 Invitrogen 公司,终浓度为 10 μmol/L)染色液,37 °C 避光孵育 30 min,离心,PBS 洗 2 次,重悬于 1 mL 含 10%BSA 的 DMEM 培养液中。用 BioTek 公司全自动定量绘图酶标仪检测 OD 值,激发波长 485 nm,发射波长 528 nm。

1.6 统计学方法 所有试验均重复 3 次以上,Western Blot 图片检测采用 Gel. Doc 扫描分析仪扫描凝胶图谱,采用 Total Lab 分析软件对条带进行密度扫描分析。采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学处理,采用 One-Way ANOVA-SNK 法比较总体和组间差异。

2 结果

2.1 AGEs 对高糖诱导 NRK-52E 细胞株中各种肾小管管上皮细胞转分化调控因子表达的影响 应用图片分析软件分析凝胶密度,发现高葡萄糖组及 AGEs 组均比空白对照组 NF- κ B 及 TNF- α 表达上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),高葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NF- κ B 及 TNF- α 表达最高($P < 0.01$)。而普罗布考预处理后,高葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NF- κ B 及 TNF- α 表达下调($P < 0.01$),提示高浓度葡萄糖状态下 AGEs 能显著促进 NF- κ B 及 TNF- α 的表达,普罗布考预处理后能显著抑制其表达(图 1)。

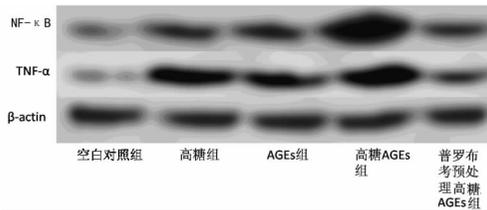
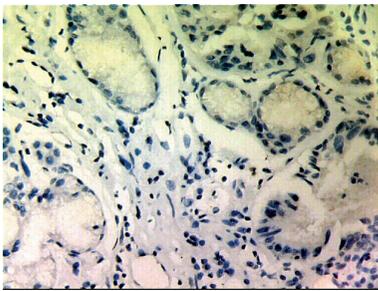


图 1 Western Blot 检测 NF- κ B 及 TNF- α 表达

2.2 普罗布考对高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NRK-52E 细胞株 ROS 含量的影响 高葡萄糖组、AGEs 组及高葡萄糖 AGEs 组 ROS 含量显著高于空白对照组,而普罗布考预处理高糖 AGEs 组 ROS 含量显著低于高糖 AGEs 组。提示 AGEs 能显著增加高浓度葡萄糖状态下 ROS 含量,而普罗布考能抑制 ROS 的产生(图 2)。



与空白对照组比较,*: $P < 0.01$,#: $P < 0.05$;与高糖组比较,\$: $P < 0.05$;与高糖 AGEs 组比较,&: $P < 0.01$ 。

图 2 各组细胞 ROS 含量检测

3 讨论

氧化应激是糖尿病并发症发生、发展的重要病理基础。既往研究表明 NF- κ B 及 TNF- α 等炎症因子是参与氧化应激进程的主要标记物,NF- κ B 能诱导 TNF- α 等多种炎症因子级联反应,加剧氧化应激的进程。本研究发现在高浓度葡萄糖和(或)AGEs 作用 72 h 后,NRK-52E 细胞 NF- κ B 及 TNF- α 表达水平均显著上调。既往研究提示,高浓度葡萄糖能通过诱导肾小管上皮细胞氧化应激,从而促进肾小管上皮细胞 DNA 损伤及细胞信号通路的改变,其机制可能依赖于 TRAIL、Akt 及 p38 MAPK 等各种酶或细胞因子活化,上调各种炎症因子包括 NF- κ B 或 TNF- α 等从而加剧炎症级联反应^[2-5]。Tang 等^[6]在 AGEs 对原代人肾小管上皮细胞影响研究中发现,AGEs 可以

促进 NF- κ B 的表达,进而促进炎症反应。该系列结果均与本次研究结果相符合,证实了高糖及 AGEs 具有促进肾小管上皮细胞 NF- κ B 或 TNF- α 等炎症因子表达的作用。而且,本研究还发现,高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NF- κ B 及 TNF- α 表达最显著,提示高糖及 AGEs 同时作用 NRK-52E 时,其诱导炎症反应可能具有叠加作用,其氧化应激水平更高。

普罗布考作为一种主要调节胆固醇代谢及抗动脉硬化的药物广泛应用于治疗糖尿病^[7],而新近的研究发现,普罗布考不仅能调节脂代谢,同时具有抗氧化的作用^[8]。本研究发现,调脂药普罗布考能显著抑制高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导 NF- κ B 及 TNF- α 表达,Endo 等^[9]研究也发现普罗布考对糖尿病肾病具有保护性作用,提示普罗布考保护肾脏的机制可能是通过下调 NF- κ B 及 TNF- α 等蛋白表达从而抑制高糖和(或)AGEs 诱导的氧化应激,达到保护糖尿病肾脏的作用。

ROS 是反应细胞氧化应激最主要的标记物,为进一步阐明普罗布考对高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导氧化应激的影响,本研究观察了各组细胞中 ROS 的生成情况,结果发现普罗布考能显著抑制 NRK-52E 细胞高糖状态下 AGEs 诱导的 ROS 生成,此结果也进一步验证了普罗布考可抑制高浓度葡萄糖状态下 AGEs 诱导肾小管上皮细胞氧化应激的进程。

参考文献:

- [1] 吕智美,邓华聪.肾小管上皮细胞转分化在糖尿病肾病发生中的作用[J].重庆医学,2008,37(6):641.
- [2] Frederiks WM, Bosch KS, Hoeben KA, et al. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes [J]. Acta Histochem, 2009, 48(7): 605.
- [3] Kobayashi M, Shikano N, Nishii R, et al. Comparison of the transcellular transport of FDG and D-glucose by the kidney epithelial cell line, LLC-PK1 [J]. Nucl Med Commun, 2010, 31(2): 141.
- [4] Rane MJ, Song Y, Jin S, et al. Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1): 49.
- [5] Lorz C, Benito-Martin A, Boucherot A, et al. The death ligand TRAIL in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 904.
- [6] Tang SC, Leung JC, Chan LY, et al. Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy and the role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(6): 1633.
- [7] Stocker R. Molecular mechanisms underlying the antiatherosclerotic and antidiabetic effects of probucol, succinobucol, and other probucol analogues [J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(3): 227.
- [8] Tanous D, Hime N, Stocker R. Anti-atherosclerotic and anti-diabetic properties of probucol and related compounds [J]. Redox Rep, 2008, 13(2): 48.
- [9] Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, et al. Probucol delays progression of diabetic nephropathy [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 71(2): 156.