

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.19.001

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190814.1511.023.html>(2019-08-14)

ATRA 对高糖培养条件下 HMC 炎症因子表达的影响及其机制研究*

陈艳霞,秦晓华,黄 翀,涂卫平[△]

(南昌大学第二附属医院肾内科,南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨全反式维甲酸(ATRA)对高糖培养条件下人肾小球系膜细胞(HMC)炎症因子表达的干预作用。**方法** 体外培养 HMC,予以高糖、ATRA 等进行干预,将 HMC 分为正常对照组(I组,未加任何刺激物)、高糖干预组(II组,加入高糖)、渗透压对照组(III组,加入甘露醇)、NF- κ B 通路抑制剂组(IV组,高糖+Bay11-7082)、高糖+低剂量 ATRA 组(V组,高糖+低剂量 ATRA)、高糖+中剂量 ATRA 组(VI组,高糖+中剂量 ATRA)、高糖+高剂量 ATRA 组(VII组,高糖+高剂量 ATRA);I、III组 D-葡萄糖水平为 5.5 mmol/L,II组 D-葡萄糖水平为 30.0 mmol/L;III组甘露醇水平为 24.5 mmol/L;IV组 Bay11-7082 水平为 30 μ mol/L;V、VI、VII组 D-葡萄糖水平均为 30.0 mmol/L,ATRA 水平分别为 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L。予以干预后各组细胞均培养 48 h,荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组细胞 NF- κ B、白细胞介素(IL)-6、IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 的表达,收集细胞培养上清液,ELISA 法检测各组 IL-6、TNF- α 的表达水平。**结果** NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 的表达水平及 IL-6、TNF- α 表达水平,I组与 III组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);II组最高,V、VI、VII组较 II组明显降低($P < 0.05$),且随着 ATRA 水平升高,NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平及 IL-6、TNF- α 表达水平逐渐降低。**结论** 高糖能促进 HMC 炎症因子表达,ATRA 可抑制这些炎症因子表达,其发挥肾脏保护作用的机制可能与 ATRA 阻断 NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 全反式维甲酸;炎症因子;肾小球系膜细胞;NF- κ B**[中图分类号]** R587.2;R965**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)19-3241-04

Study on the effect of ATRA on expression of HMC inflammatory factors cultured with high glucose and its mechanism*

CHEN Yanxia, QIN Xiaohua, HUANG Chong, TU Weiping[△]

(Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on expression of inflammatory factors in human mesangial cells (HMC) cultured with high glucose. **Methods** HMC was cultured in vitro, and high glucose and ATRA were given, then divided into the normal control group (group I, without any stimulants), the high glucose intervention group (group II, high glucose), the osmotic pressure control group (group III, mannitol), the NF- κ B pathway inhibitor group (group IV, high glucose + Bay11-7082), the high glucose + low dose ATRA group (group V, high glucose + low dose ATRA), high glucose + middle dose ATRA group (group VI, high glucose + middle dose ATRA), the high glucose + high dose ATRA group (group VII, high glucose + high dose ATRA). In group I and III, the final concentration of D-glucose was 5.5 mmol/L, which in group II was 30.0 mmol/L, the final concentration of mannitol in group III was 24.5 mmol/L. In group V, VI, VII, the final concentration of D-glucose was 30.0 mmol/L, the final concentration of ATRA was 1×10^{-7} , 1×10^{-6} and 1×10^{-5} mol/L, respectively. All the cells were cultured for 48 hours, RT-PCR was used to detect the expression of NF- κ B, interleukin (IL)-6, IL-1 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in each group. The cell culture supernatant was collected. ELISA method was used to detect the expression of IL-6 and TNF- α . **Results** There was no significant difference in the expressions of NF- κ B, IL-6, IL-1, TNF- α mRNA and the expressions of IL-6, TNF- α between group I and III ($P > 0.05$). All the expressions were the highest in group II, and these in group V, VI and VII were significantly lower than those in group II ($P < 0.05$), with the increasing of ATRA, the expressions of NF- κ B, IL-6, IL-1, TNF- α

* 基金项目:江西省自然科学基金项目(20161BAB205268)。

作者简介:陈艳霞(1988—),主治医师,硕士,主要从事慢性肾脏病防治

研究。△ 通信作者,E-mail:tuweiping6102@sina.com。

mRNA and the expressions of IL-6, TNF- α decreased gradually. **Conclusion** High glucose can promote the expression of HMC inflammatory factors, and ATRA can inhibit the expression of the factors. The mechanism may be related to the blocking of NF- κ B signaling pathway by ATRA.

[Key words] all-trans retinoic acid; inflammatory factors; mesangial cells; NF-kappa B

糖尿病的相关并发症是全球重大的健康问题之一,其中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病并发症中最重要的医学问题,约有 1/3 的糖尿病患者并发了 DN^[1],也成为终末期肾脏病的主要原因^[2-3],产生了严重的社会和经济负担^[4]。近年来,对 DN 病理生理机制的认识和了解发生了一些变化,既往观点认为 DN 的肾脏损害是由于代谢和血流动力学的影响导致肾小球内压力增加,以及高血糖状态本身对肾脏的损伤作用。目前 DN 的发病机制演变成了更为复杂的情况,由多因素影响造成,甚至遗传和环境因素都参与触发了 DN 复杂的病理生理机制^[5]。近年来的研究越来越关注炎症在 DN 发病机制中的关键作用,深入了解炎症在 DN 发病机制中的作用特征将可能成为 DN 治疗策略的潜在新靶点。因此,本研究观察了全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对高糖培养条件下人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMC)炎性因子表达的干预作用,探讨 ATRA 对 DN 的保护作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 HMC 购自美国菌种保藏中心(ATCC), ATRA、NF- κ B 通路抑制剂(Bay11-7082)、D-葡萄糖、甘露醇均购自美国 Sigma 公司。DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自澳大利亚 GIBCO 公司,Trizol 引物购自美国 Invitrogen 公司,荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒购自北京金公司,ELISA 试剂盒购自武汉优尔生商贸有限公司。核酸微量蛋白测定仪、PCR 扩增仪、凝胶图像成像系统购自美国 Bio-Rad 公司, DYP-31DN 型电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 HMC 培养条件:用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基进行培养,细胞培养箱温度调整为 37 °C, CO₂ 水平为 5%,待 HMC 在培养瓶中生长至 80%~85%融合时进行传代至 6 孔培养板,传代生长至约 80%融合后改不含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养 24 h,将细胞分为 7 个组,分别为正常对照组(I 组,未加任何刺激物)、高糖干预组(II 组,加入高糖)、渗透压对照组(III 组,加入甘露醇)、NF- κ B 通路抑制剂组(IV 组,高糖+Bay11-7082)、高糖+低剂量 ATRA 组(V 组,高糖+低剂量 ATRA)、高糖+中剂量 ATRA 组(VI 组,高糖+中剂量 ATRA)、高糖+高剂量 ATRA 组(VII 组,高糖+高剂量 ATRA)。I 组、III 组 D-葡萄糖水平为 5.5 mmol/L; II 组 D-葡萄糖水平为 30.0 mmol/L; III 组

甘露醇水平为 24.5 mmol/L; IV 组 Bay11-7082 水平为 30.0 μ mol/L; V、VI、VII 组 D-葡萄糖水平均为 30.0 mmol/L, ATRA 水平分别为 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L。所有组干预 48 h,实验重复 3 次。

1.2.2 RT-PCR 检测 各组细胞培养 48 h 后,分别进行 RNA 的提取,RT-PCR 检测各组 NF- κ B、白细胞介素(IL)-6、IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 的表达。NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α 、 β -actin 的引物由美国 Invitrogen 公司设计合成, NF- κ B 正向引物:5'-GAT TTC GTT TCC GTT AGT-3',反向引物:5'-TTT GCT GGT CCC ACA TAG-3',产物长度为 540 bp。IL-6 正向引物:5'-AGG AGA CTT GCC TGG TGA AA-3',反向引物:5'-CAG GGG TGG TTA TTG CAT CT-3',产物长度为 180 bp。IL-1 正向引物:5'-GAA TGACGCCCTCAATCAAAGT-3',反向引物:5'-TCA TCT TGG GCA GTC ACA TAC A-3',产物长度为 400 bp。TNF- α 正向引物:5'-TCT TCT CGA ACC CCG AGT GA-3',反向引物:5'-TGA GGT ACA GGC CCT CTG AT-3',产物长度为 163 bp。 β -actin 正向引物:5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3',反向引物:5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3',产物长度为 443 bp。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 5 min,共 32 个循环。使用 2%琼脂糖凝胶进行 PCR 产物的电泳。使用凝胶成像系统成像后图片使用 Quantity One 软件进行定量分析。

1.2.3 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 表达水平 各组细胞培养 48 h 后,分别收集各组上清液,按 IL-6、TNF- α ELISA 检测试剂盒的说明进行操作,获得吸光度(OD)值,用 Excel 绘制标准曲线,根据标准曲线方程求出各组 IL-6、TNF- α 表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析和 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平比较 I 组与 III 组 NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$); II 组 NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平均较其他组高($P < 0.05$); V、VI、VII 组 NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平较 II 组低($P < 0.05$);且随着 ATRA 水平升高, NF- κ B、IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 表达水平逐渐降低,见图 1、2。

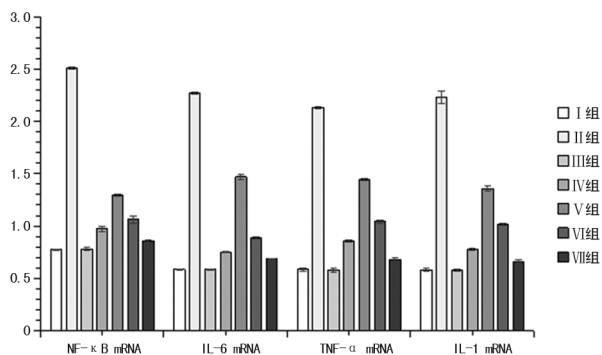
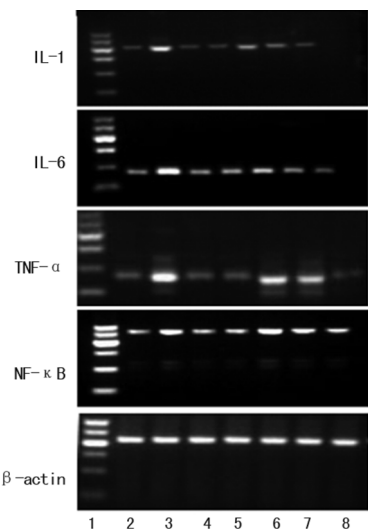


图 1 各组 NF-κB、IL-6、IL-1、TNF-α mRNA 表达水平比较



1: Marker; 2: I 组; 3: II 组; 4: III 组; 5: IV 组; 6: V 组; 7: VI 组; 8: VII 组

图 2 各组 PCR 情况比较

2.2 各组 IL-6、TNF-α 表达水平比较 I 组与 III 组 IL-6、TNF-α 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); II 组 IL-6、TNF-α 表达水平均较其他组明显升高 ($P < 0.05$); V、VI、VII 组 IL-6、TNF-α 表达水平较 II 组明显降低 ($P < 0.05$), 且随着 ATRA 水平升高, IL-6、TNF-α 表达水平逐渐降低, 见图 3。

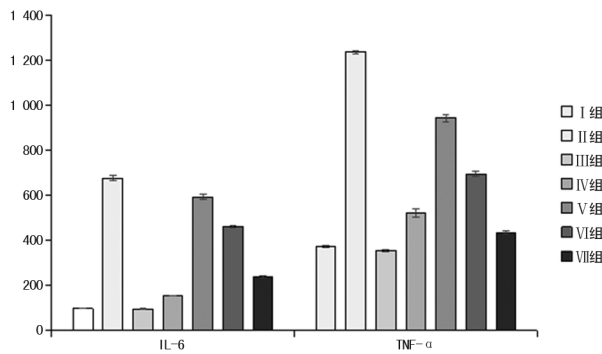


图 3 各组 IL-6、TNF-α 表达水平比较

3 讨论

有证据明确显示糖尿病的并发症与炎症因子有关^[6], DN 患者血浆中炎症因子的水平明显升高^[7]。有研究发现, DN 患者血浆中炎症因子的水平随着 DN 的进展而升高^[8], 且与尿蛋白的排泄相关^[9], 是肾小球和肾小管间质损害的直接临床标志物。炎症

细胞在肾脏的沉积与 DN 的发生密切相关^[10]。炎症因子如细胞因子、趋化因子、生长因子及细胞黏附分子在 DN 的肾损伤中发挥关键作用^[11]。已被证实, 抑制炎症细胞在肾脏的沉积对 DN 有保护作用^[12]。总之, 这些结果均表明炎症是 DN 发生、发展的重要致病因素^[13]。在糖尿病肾小球中的巨噬细胞和 T 淋巴细胞^[14] 及一些分子如趋化因子^[15]、黏附分子^[16]、生长因子^[17]、核因子^[18] 和细胞因子^[13] 等均与 DN 的多种致病途径有关。

NF-κB 的激活是炎症反应的基础, DN 患者中 NF-κB 的水平明显升高^[19]。NF-κB 在炎症反应中起着调控的作用, 其活性受细胞内和细胞外的双重正负反馈调节^[20]。当炎症反应发生的时候, 细胞外的正反馈调节促进炎症反应的信号扩大, 同时激活 TNF-α 和 IL-1 的转录, 这两种细胞因子又可以反过来调节 NF-κB 的分泌。有研究发现, 促炎症免疫受体 (Fcγ Rs) 与 NF-κB 有关, Fcγ Rs 通过外周血中性粒细胞发挥作用, 促进 NF-κB 信号通路的激活。且 Fcγ Rs 有两种表型——激活型和抑制型, 当 Fcγ Rs 被激活时, 意味着 NF-κB 信号通路的激活, C 反应蛋白为炎症状态的指标, 当 NF-κB 信号通路被激活时, 其在血清中的水平明显升高, 提示 DN 患者的炎症反应与 NF-κB 信号通路的调节有关。因此, 抑制 NF-κB 的活性及抗炎治疗为 DN 的潜在治疗策略。

ATRA 是天然维生素 A 的主要衍生物, 主要通过细胞核上的受体结合而发挥作用, 对细胞及组织具有抑制增生、调节凋亡及诱导分化等作用, 不仅如此, 其还对多种细胞因子、生长因子和激酶具有调节作用, 尤其在炎症及免疫反应中发挥着重要的调控作用^[21]。KARKENI 等^[22] 采用人的脂肪细胞及脂肪组织进行实验, 予以 ATRA 进行干预后发现, ATRA 对脂肪细胞及脂肪组织的炎症因子如 TNF-α、IL-6 及趋化因子等的产生发挥显著的抑制作用, 意味着 ATRA 可对肥胖及其并发症的治疗发挥作用, 其机制可能与抑制 NF-κB 信号通路的活性有关。SIERRA-MONDRAGON 等^[23] 发现链脲佐菌素诱导的 DN 动物模型中, IL-1、TNF-α 及转化生长因子-β (TGF-β) 的表达明显增多, 同时细胞因子 (CCL2、CCL20、CXCL5、CXCL7)、黏附分子 [细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、L 选择素 (L-selectin)] 和生长因子 [巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)] 在肾小球和肾小管的表达也明显升高, 而 ATRA 可以明显降低上述炎症因子的表达, 并发现 ATRA 减轻炎症反应的机制与 ATRA 抑制 TLR4/NF-κB 信号通路从而阻止 NF-κB 在肾小球和肾小管中的核易位有关。有研究发现在急性早幼粒细胞白血病的急性早幼粒细胞白血病的治疗中, ATRA 可以通过 NF-κB 信号通路的活化改善急性早幼粒细胞炎症因子的表达^[24]。

本研究结果显示, 予以高糖干预的 HMC 其 NF-κB、IL-6、IL-1、TNF-α mRNA 的表达水平及 IL-6、

TNF- α 表达水平明显升高;予以 ATRA 干预后,观察到 ATRA 可以显著抑制 HMC 炎性因子的表达,且随着 ATRA 水平的升高,其抑制作用更加明显,提示高糖能促进 HMC 炎性因子的表达,ATRA 可干预高糖培养条件下 HMC 炎性因子的表达。本实验阻断 NF- κ B 信号通路后,IV 组 HMC 表达 IL-6、IL-1、TNF- α mRNA 及 IL-6、TNF- α 水平较 II 组减少,提示 ATRA 通过抗炎发挥肾脏保护作用的机制可能与阻断 NF- κ B 信号通路有关。

DN 的发病机制与炎症密切相关,而 ATRA 对于高糖诱导的 HMC 具有明显改善炎症状态的作用,因此,其有望成为治疗 DN 的新策略。

参考文献

- [1] ROBERT C A, PAUL Z. Diabetic kidney disease: act now or pay later[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(6): 501-503.
- [2] ATKINS R C. The epidemiology of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2005, 67(94): 14-18.
- [3] RITZ E, RYCHLÍK I, LOCATELLI F, et al. End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions [J]. *Am J Kidney Dis*, 1999, 34(5): 795-808.
- [4] COOPER M E. Diabetes; treating diabetic nephropathy still an unresolved issue[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(9): 515-516.
- [5] MARTINI S, EICHINGER F, NAIR V, et al. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008, 9(4): 267-274.
- [6] DONATE-CORREA J, MARTIN-NUNEZ E, MUROS-DE-FUENTES M, et al. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 1-9.
- [7] PICKUP J C, CHUSNEY G D, THOMAS S M, et al. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes[J]. *Life Sci*, 2000, 67(3): 291-300.
- [8] BRUNO G, MERLETTI F, BIGGERI A, et al. Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(7): 2150-2155.
- [9] NAVARRO J F, MORA C, MACA M, et al. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42(1): 53-61.
- [10] LIM A, MA F Y, NIKOLIC-PATERSON D J, et al. Lymphocytes promote albuminuria, but not renal dysfunction or histological damage in a mouse model of diabetic renal injury[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(8): 1772-1782.
- [11] LIANG G, SONG L, CHEN Z, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 95-109.
- [12] AWAD A S, KINSEY G R, KHUTSISHVILI K, et al. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(6): F1358-1366.
- [13] NAVARRO-GONZALEZ J F, MORA-FERNANDEZ C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3): 433-442.
- [14] GALKINA E, LEY K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(2): 368-377.
- [15] CHOW F Y, NIKOLIC-PATERSON D J, OZOLS E, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(1): 73-80.
- [16] OKADA S, SHIKATA K, MATSUDA M, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes[J]. *Diabetes*, 2003, 52(10): 2586-2593.
- [17] NAKAGAWA T. Uncoupling of the VEGF-endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(6): F1665-1672.
- [18] SCHMID H, BOUCHEROT A, YASUDA Y, et al. Modular activation of nuclear factor- κ B transcriptional programs in human diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2006, 55(11): 2993-3003.
- [19] MEZZANO S, AROS C, DROGUETT A, et al. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(10): 2505-2512.
- [20] AL-RASHEED N M, WILLARS G B, BRUNSKILL N J. C-peptide signals via Galpha i to protect against TNF- α -mediated apoptosis of opossum kidney proximal tubular cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(4): 986-995.
- [21] ADAMS J, KISS E, ARROYO A B, et al. 13-cis retinoic acid inhibits development and progression of chronic allograft nephropathy[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(1): 285-298.
- [22] KARKENI E, BONNET L, ASTIER J, et al. All-trans-retinoic acid represses chemokine expression in adipocytes and adipose tissue by inhibiting NF- κ B signaling [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 42: 101-107.
- [23] SIERRA-MONDRAGON E, MOLINA-JIJON E, NAMORADO-TONIX C, et al. All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF- κ B during initiation of diabetic nephropathy[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 60: 47-60.
- [24] JAMBROVICS K, URAY I P, KERESSZTESY Z, et al. Transglutaminase 2 programs differentiating acute promyelocytic leukemia cells in all-transretinoic acid treatment to inflammatory stage through NF- κ B activation[J]. *Haematologica*, 2018, 20: 1-18.