

螺内酯对高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激的影响

李 庆,张红萍

(江苏建康职业学院信息中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察螺内酯对高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激的影响,并且探讨该作用是否与 MAPKs 家族信号通路相关。方法:采用高糖和(或)螺内酯处理人肾小球系膜细胞株(HMC)后,DHE 荧光染色检测细胞内活性氧(ROS)水平,NBT 试剂盒检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性,Western blot 法检测 MAPKs 家族 ERK、JNK、p38MAPK 的磷酸化及总蛋白水平。结果:DHE 染色结果显示,高糖可明显增加 HMC 内 ROS 含量,而给予螺内酯干预处理后,细胞内 ROS 水平明显降低,与高糖刺激组相比,螺内酯干预组细胞内 SOD 活性明显增加 ($P < 0.05$);Western blot 结果表明,高糖可明显增加 HMC 细胞内 ERK 及 p38MAPK 的磷酸化水平,给予螺内酯处理后可逆转高糖的上述作用($P < 0.05$),而各组之间磷酸化 JNK 及总 ERK、p38MAPK、JNK 蛋白水平无明显变化。结论:螺内酯可能通过下调 MAPK 家族信号蛋白的磷酸化水平,降低细胞内 ROS 含量,增加 SOD 活性,拮抗由高糖所引起的氧化应激,从而起到保护肾小球系膜细胞,延缓肾小球硬化的作用。

[关键词] 螺内酯;高糖;MAPK;肾小球系膜细胞

[中图分类号] R967

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1670-05

Effects of spironolactone on high glucose mediated oxidative stress in mesangial cells

LI Qing,ZHANG Hong-ping

(Department of Information Centre,Jiangsu Jiankang Vocational College,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of spironolactone on oxidative stress of glomerular mesangial cells induced by high glucose,and explore whether the MAPKs family signaling pathway was involved in this effect. **Methods:**DHE fluorescence staining was used to evaluate the intracellular production of reactive oxygen species (ROS),NBT kit was used to detect the intracellular SOD activity,and Western blot was applied to identify the phosphorylated and total protein expression of MAPKs family genes,such as ERK,JNK and p38MAPK in cultured human mesangial cells(HMC) treated with high glucose or spironolactone. **Results:**DHE fluorescence staining showed that the production of ROS in HMC was markedly increased with the treatment of high glucose,while which was significantly decreased in the stimulation of spironolactone. Compared to the treatment of high glucose,intracellular SOD activity was significantly increased($P < 0.05$) with the treatment of spironolactone. Western blot analysis suggested that the high sugar significantly increased the expression of phosphorylation of ERK and p38MAPK in HMC cells,while given the treatment of spironolactone,these effects were reversed ($P < 0.05$). Furthermore,there were no remarkable differences among the groups in phosphorylated JNK,total protein level of ERK,p38MAPK,and JNK. **Conclusion:**Spironolactone may play a role in reducing the production of intracellular ROS and increasing the activity of SOD and antagonism of oxidative stress induced by high glucose via down-regulation of the phosphorylation level of MAPK family signaling. All these actions may contribute to the protection of the glomerular mesangial cells and postponement of kidney glomerulus sclerosis.

[Key words] spironolactone;high glucose;MAPK;mesangial cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1670-1674]

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的慢性并发症之一,在西方国家已成为导致慢性肾衰竭的最主要原因,然而其发病机制尚未完全阐明,氧化应激被认为是高血糖导致糖尿病各种并发症的统一机制^[1]。肾小球系膜细胞(mesangial

cells, MC)是一种肾小球固有细胞,在肾小球损伤和修复过程中起重要作用,研究显示在多种因素如高糖、血管紧张素 II、醛固酮、机械牵拉、炎症反应等刺激下,肾小球系膜细胞表现为氧化应激,从而促进肾小球硬化,加快 DN 的发生、发展^[2],因此干预治疗

减轻细胞氧化应激有助于肾小球疾病的防治。螺内酯作为醛固酮受体拮抗剂,是常用的利尿剂,近年来研究表明,螺内酯具有预防和减轻组织器官纤维化功能,对肾脏有保护作用^[3-4],但其具体的作用机制仍不清楚。本研究以人肾小球系膜细胞株(HMC)为实验对象,观察螺内酯对高糖诱导的 MC 氧化应激的影响,并探讨丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)信号通路是否参与其中,从而为 DN 的防治及螺内酯的用药提供更好的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

HMC 为南通大学附属医院肾病实验室惠赠的美国 ATCC 细胞系,RPMI1640 培养基、胰酶/EDTA 消化液(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司),二氢乙啶(dihydroethidium,DHE,北京威格拉斯生物技术有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD) 活性试剂盒、鼠抗 GAPDH 抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(上海碧云天生物技术研究 所),Phospho-p38MAPK、p38MAPK、Phospho-JNK、JNK、Phospho-ERK1/2、ERK1/2 抗体(Cell Signaling 公司,美国),BCA 蛋白质定量试剂盒(Pierce 公司,美国),SuperSignal ECL 发光试剂盒(Thermo 公司,美国),螺内酯(江苏瑞年前进制药公司),PVDF 膜(Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养基及药物处理分组

HMC 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,待 HMC 细胞生长融合至 85%左右时,采用胰酶/EDTA 消化种板,待细胞融合生长至 70%左右,随后随机分为 5 组:①溶剂对照组(C 组),含 0.1%无水乙醇的 RPMI1640 培养基培养;②甘露醇对照组(M 组),含 24.5 mmol/L 甘露醇的 RPMI1640 培养基培养;③正常葡萄糖组(NG 组),含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 培养基培养;④高糖组(HG 组),含 30 mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 培养基培养;⑤螺内酯高糖干预组(S 组),应用 10 μmol/L 的螺内酯预处理 3 d 后,采用含 30 mmol/L 葡萄糖的 RPMI1640 培养基培养。5 组均在 37℃,5%CO₂ 条件下培养 48 h 后检测相应指标。

1.2.2 细胞内活性氧(ROS)水平的检测

DHE 可自由透过活细胞膜进入细胞内,并被细胞内 O₂⁻氧化,形成氧化乙啶,氧化乙啶可掺入染色

体 DNA 中,产生红色荧光,根据活细胞中红色荧光的产生,可以判断 ROS 含量的多少和变化,用流式细胞仪或荧光显微镜可直接观察。HMC 上述经药物处理后,弃培养液,预热的 PBS 洗细胞 3 次,加入含有 5 μmol/L DHE 的 Krebs-HEPES 缓冲液,避光,37℃孵育 30 min;孵育结束后,用 Krebs-HEPES 缓冲液清洗细胞 3 次,在 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜下,采用激发波长为 480 nm,发射波长为 610 nm 的绿光激发细胞,观察和拍摄细胞红色发射图像,ROS 阳性细胞在整个核区被染成红色。或在 DHE 孵育结束后,用 Krebs-HEPES 缓冲液清洗细胞 3 次,用胰酶/EDTA 消化制备单细胞悬液,调整细胞数为 2 × 10⁵ 个/流式管,在 BD 公司流式细胞仪 FL2 channel 下,检测 1 × 10⁴ 个细胞数的荧光值。

1.2.3 SOD 活性的检测

6 孔板内的 HMC 经药物处理后,弃去培养液,放置冰上,用冰 PBS 洗 3 遍,加入 60 μl 裂解液,充分裂解细胞,4℃ 13 000 r/min 离心 15 min,取上清待测,测试样本根据总 SOD 活性检测试剂盒(NBT 法)说明书进行检测,在 560 nm 测定吸光度值进行计算。

1.2.4 Western blot 免疫印迹方法检测 MAPKs 家族蛋白表达水平

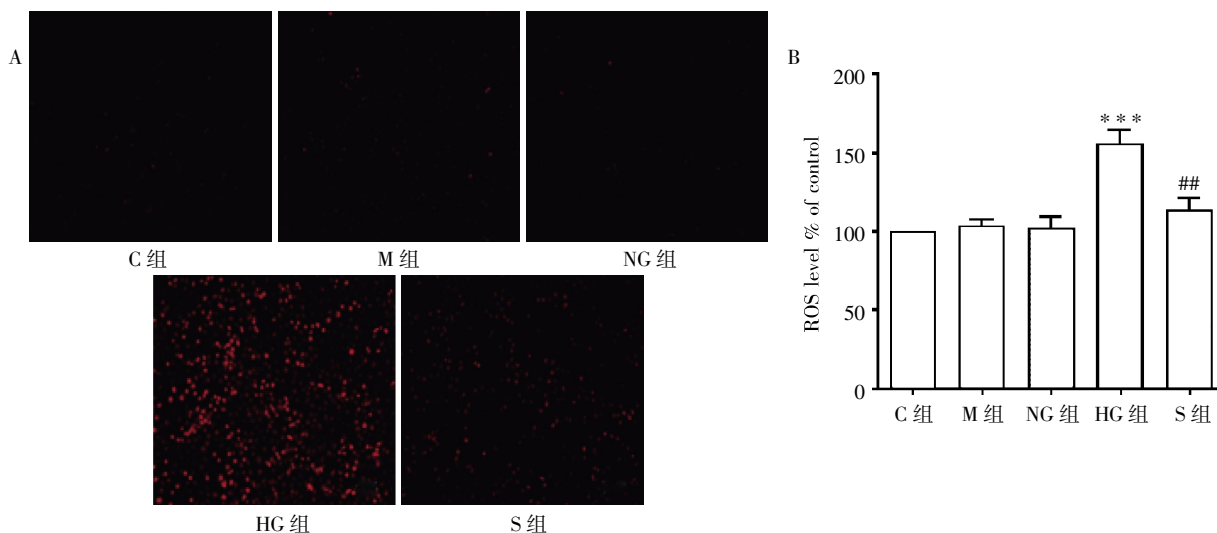
6 孔板内的 HMC 经药物处理后,弃去培养液,放置冰上,用预冷 PBS 洗 3 遍,加入 60 μl Lysis buffer 裂解液获取总蛋白,蛋白含量采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定。取总蛋白 60 μg 经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,然后用含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 2 h,洗膜后加入一抗 Phospho-p38MAPK(抗体稀释度 1:1000)、p38MAPK(抗体稀释度 1:500)、Phospho-JNK(抗体稀释度 1:500)、JNK(抗体稀释度 1:1 000)、Phospho-ERK1/2(抗体稀释度 1:500)、ERK1/2(抗体稀释度 1:1 000)及内参 GAPDH(抗体稀释度 1:5 000)4℃ 孵育过夜,TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 1:2 000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 2 h,TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min,ECL 显影液显色并曝光成像。图像采用 Image J 分析软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Prime 4.0 分析统计软件进行分析。所有数据进行方差齐性检验后进行单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 螺内酯对高糖引起的 HMC 内 ROS 水平改变的影响



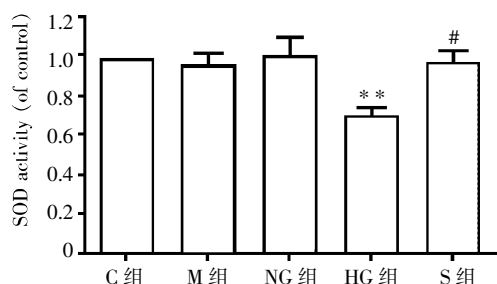
与 NG 组比较, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较, ## $P < 0.01$; $n = 7$ 。

图 1 DHE 荧光染色后采用倒置荧光显微镜(A, $\times 100$)及流式细胞仪(B)检测细胞内 ROS 水平

Figure 1 The intracellular ROS levels were detected by an inverted fluorescence microscope(A) and flow cytometry(B) after DHE fluorescence staining

2.2 螺内酯对由高糖引起的 HMC 内 SOD 水平改变的影响

采用 NBT 法检测细胞内总 SOD 活性, 与 NG 组相比, HG 组的总 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$), 而给予螺内酯干预处理后, 细胞内 SOD 活性则明显增加 ($P < 0.05$ vs HG 组, 图 2)。以上结果表明, 螺内酯可降低系膜细胞 ROS 的产生, 并加强细胞的抗氧化损伤能力。



与 NG 组比较, ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较, * $P < 0.05$; $n = 6$ 。

图 2 SOD 试剂盒检测肾小球系膜细胞内 SOD 的活性

Figure 2 The intracellular SOD activity of HMC was detect by SOD kit

2.3 螺内酯对 MAPKs 家族信号蛋白的影响。

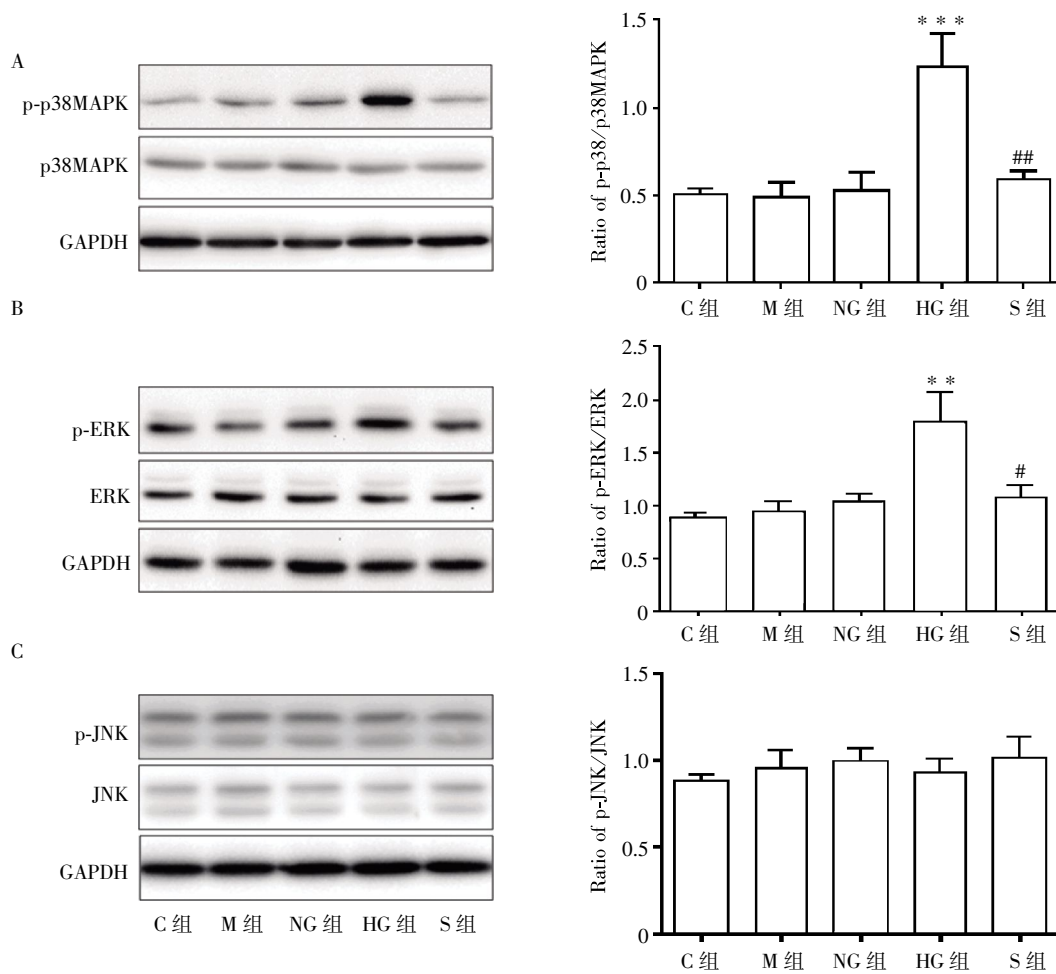
为了进一步探讨螺内酯的抗肾小球系膜细胞损伤作用是否与 MAPKs 家族相关, 用蛋白质免疫印迹

DHE 荧光染色倒置荧光显微镜(图 1A)及流式细胞仪检测(图 1B)结果显示, 高糖可明显增加细胞内 ROS 含量 ($P < 0.001$), 而给予螺内酯干预后, 系膜细胞内 ROS 产生明显减少 ($P < 0.01$)。

技术检测 MAPK 信号通路蛋白的磷酸化水平, 结果显示, 与 NG 组相比, 高糖处理组其 p38MAPK 及 ERK 的磷酸化水平均明显增高 ($P < 0.05$), 而给予螺内酯干预处理后, p38MAPK 及 ERK 磷酸化水平则明显降低 ($P < 0.05$ vs HG 组), 各组之间磷酸化 JNK 及总 ERK、p38MAPK、JNK 蛋白水平无显著性变化(图 3)。

3 讨论

DN 是糖尿病最常见也是最严重的全身慢性微血管并发症之一, 目前 DN 已超过慢性肾小球肾炎和高血压肾病而成为终末期肾病的首位病因, 其发病机制和防治成为研究的热点^[5]。DN 早期表现为肾小球系膜细胞增生, 小管间质扩张, 肾小球系膜区和小管间质细胞外基质积聚, 伴随出现肾小球滤过率下降、肾功能改变、蛋白尿等, 终致肾小球硬化及肾小管间质纤维化^[6]。肾小球系膜细胞是一种兼有成纤维细胞和平滑肌细胞特性的特殊细胞, 能合成并分泌多种参与肾小球结构与功能调节的蛋白因子, 系膜细胞功能改变对于许多导致肾功能衰竭的肾疾病都是至关重要的, 因此本实验以人肾小球系膜细胞作为研究对象来研究螺内酯的保护作用, 更具有临床实用价值。目前认为 DN 是多种因素协同作用的结



与 NG 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 6$ 。

图 3 Western blot 检测 HMC 内 p-p38MAPK、p38MAPK(A), p-ERK、ERK(B), p-JNK、JNK(C) 及内参 GAPDH 水平

Figure 3 Western blotting was applied to identify the expression of p-p38MAPK, p38MAPK(A), p-ERK, ERK(B), p-JNK, JNK(C) and inner reference GAPDH

果,而高血糖是重要的始动因素。越来越多的证据表明,高血糖所引起的氧化应激是糖尿病所有并发症的统一机制^[1]。本实验中采用高糖刺激肾小球系膜细胞, DHE 荧光染色结果显示高糖刺激下系膜细胞内 ROS 释放增加, 而抗氧化酶 SOD 活性下降, 这与国内外报道一致^[7-8], 并且进一步提示高糖所导致的系膜细胞氧化应激是多种肾小球疾病的重要因素。

螺内酯作为醛固酮受体拮抗剂, 近来有研究显示它具有预防和减轻肾脏纤维化的作用^[3-4]。并且其抗纤维化的作用与其利尿效果无关。螺内酯可减少 I 型胶原的沉积和纤维连接蛋白的分泌, 减轻了小管间质纤维化^[9]。这些研究均提示螺内酯在糖尿病肾病中可能发挥着重要的保护作用, 但其具体机制尚不清楚。有研究显示, 在自发性高血压大鼠中, 采用 STZ 诱导糖尿病产生后, 螺内酯可通过增加葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性及降低 ROS 的产生, 起到一

定的肾脏保护作用^[10], 提示螺内酯具有一定的抗氧化作用。本实验以体外培养的 HMC 为研究对象, 利用螺内酯干预高糖刺激后, 与高糖刺激组相比, 螺内酯干预组系膜细胞内 ROS 产生明显减少, 而 SOD 活性明显增加。本实验从系膜细胞角度证实, 螺内酯可通过拮抗高糖所致系膜细胞氧化应激而发挥肾脏保护作用。

MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是细胞将胞外信号转导至核内的重要信号转导系统。MAPK 家族主要包括 ERK、JNK 以及 p38MAPK。体外实验证实, 糖尿病状态下存在的高血糖、晚期糖基化终产物、氧化应激、高渗刺激、机械牵张等都可活化 MAPK^[11]。而高糖作为 DN 的主要致病因素可通过蛋白质非酶性糖基化、多元醇通路激活、二酰基甘油-PKC 通路等环节最终导致 MAPK 的激活, 参与 DN 的发生、发展^[12]。MAPK 信

号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并可调节 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1 等细胞因子的表达,介导炎症、应激等多种细胞反应,被认为参与了炎症和纤维化过程^[13-14]。实验显示抑制 MAPK 信号通路可减少纤维连接蛋白的表达、TGF- β 1、基质金属蛋白酶等作用而对 DN 的发展产生有益作用^[15]。因此本研究采用 Western blot 技术检测了 HMC 内 MAPK 家族的蛋白水平,结果显示,与对照组比较,高糖刺激组的磷酸化 p38MAPK 及 ERK1/2 水平明显增加;而利用螺内酯干预高糖刺激后,系膜细胞内的磷酸化 p38MAPK 及 ERK1/2 水平明显下降。结合先前的结果,推测螺内酯通过减少 ROS 的产生来抑制 p38MAPK 及 ERK1/2 磷酸化,而减少的磷酸化 p38MAPK 及 ERK1/2 水平可以继续抑制 ROS 的产生,这与先前报道的氧化应激和 MAPK 信号通路在 DN 的发生发展过程中存在相互作用,互为因果的关系^[16]相一致。我们的实验进一步提示,螺内酯可能阻断 MAPK 信号通路和 ROS 之间的恶性循环而起到一定的肾脏保护作用。各组之间磷酸化 JNK 及总 ERK、p38MAPK、JNK 蛋白水平无明显变化的可能原因:① ERK、p38MAPK、JNK 是 MAPK 家族信号蛋白的常见成员,外界刺激主要通过上下调其磷酸化水平来激活或抑制其信号通路,故该 3 种蛋白总水平无变化,而仅 ERK、p38MAPK 的磷酸化形式发生改变;② JNK 蛋白的磷酸化形式无变化主要与其对波动性高糖刺激比较敏感,对稳定浓度的高糖刺激的反应较差。

综上所述,本实验从系膜细胞角度证实,螺内酯可能通过下调 MAPK 家族中 p38MAPK 及 ERK1/2 磷酸化水平,降低细胞内 ROS 含量,增加 SOD 活性,拮抗由高糖所引起的氧化应激,从而起到保护肾小球系膜细胞,延缓肾小球硬化的作用。这为螺内酯更为广泛地用于临床试验,提供了新的科学理论依据,具有一定的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414 (6865): 813-820
- [2] Gruden G, Perin PC, Camussi G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2005, 1(1): 27-40
- [3] Epstein M. Aldosterone as a mediator of progressive renal dysfunction: evolving perspectives [J]. *Intern Med*, 2001, 40(7): 573-583
- [4] Brown NJ, Nakamura S, Ma L, et al. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(3): 1219-1227
- [5] Wu CC, Sytwu HK, Lin YF. Cytokines in diabetic nephropathy [J]. *Adv Clin Chem*, 2012, 56: 55-74
- [6] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3-4): 290-301
- [7] Yuan F, Li YN, Liu YH, et al. Adiponectin inhibits the generation of reactive oxygen species induced by high glucose and promotes endothelial NO synthase formation in human mesangial cells [J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(2): 449-453
- [8] 李航, 曹延萍, 张连珊, 等. 叔丁基对苯二酚减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 528-533
- [9] Feria I, Pichardo I, Juárez P, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(1): 43-52
- [10] Pessôa BS, Peixoto EB, Papadimitriou A, et al. Spironolactone improves nephropathy by enhancing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and reducing oxidative stress in diabetic hypertensive rat [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012, 13(1): 56-66
- [11] Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, et al. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e1
- [12] Kikkawa R, Koya D, Haneda M. Progression of diabetic nephropathy [J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(3 Suppl 1): S19-21
- [13] Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45(1): 54-65
- [14] Fujita H, Omori S, Ishikura K, et al. ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF- β expression in renal tubular cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286(1): F120-126
- [15] Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG. O-linked β -N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(4): E713-726
- [16] Fang S, Jin Y, Zheng H, et al. High glucose condition up-regulated Txnip expression level in rat mesangial cells through ROS/MEK/MAPK pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1-2): 175-182