

二甲双胍对大鼠肾小球系膜细胞 NF- κ B, ICAM-1 表达的影响

顾俊菲, 叶山东*, 汪 珊, 孙文佳, 胡圆圆

(安徽医科大学附属省立医院内分泌科, 安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的:观察二甲双胍对大鼠肾小球系膜细胞(mesangial cells, MCs)核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响,探讨其肾脏保护机制。方法:体外培养 MCs,随机分为正常糖组(NG)、高糖组(HG)及高糖+不同浓度二甲双胍组(M1:0.5 mmol/L;M2:1.0 mmol/L;M3:2.0 mmol/L)。培养48 h后收集各组细胞,采用荧光实时定量聚合酶链式反应法(real time-PCR)检测细胞 NF- κ B mRNA 及 ICAM-1 mRNA 含量,蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞 NF- κ Bp65 和 ICAM-1 蛋白表达水平。结果:①MCs 可表达 NF- κ B、ICAM-1;②与 NG 组比较,HG 组 MCs NF- κ B、ICAM-1 mRNA 和蛋白表达增强($P < 0.05$);③与 HG 组比较,M3 组 MCs NF- κ B、ICAM-1 mRNA 相对表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);④与 HG 组比较,M1 组、M2 组和 M3 组 MCs NF- κ Bp65、ICAM-1 蛋白表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:二甲双胍可抑制肾小球系膜细胞 NF- κ B、ICAM-1 mRNA 和蛋白表达,并具有一定的浓度依赖性,该作用可能是其肾脏保护机制之一。

[关键词] 二甲双胍;核因子- κ B;细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R349.51, R587.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-607-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140514

Effects of metformin on expressions of nuclear factor- κ B and intercellular adhesion molecule-1 in rat glomerular mesangial cells

Gu Junfei, Ye Shandong*, Wang Shan, Sun Wenjia, Hu Yuanyuan

(Department of Endocrinology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of metformin on expressions of nuclear factor- κ B and intercellular adhesion molecule-1 in cultured rat glomerular mesangial cells (MCs) and explore its reno-protective mechanisms. **Methods:** MCs were cultured in the medium with normal glucose (group NG), high glucose (group HG), and different concentrations of metformin (group M1, 0.5 mmol/L; group M2, 1.0 mmol/L; group M3, 2.0 mmol/L). After 48h exposure, MCs were collected for mRNA and protein expression of NF- κ B, ICAM-1. The expression of NF- κ B and ICAM-1 mRNA was analyzed by real time polymerase chain reaction. The expression of NF- κ Bp65 and ICAM-1 protein was visualized by western blotting. **Results:** ① MCs expressed NF- κ B and ICAM-1. ② After stimulated by high glucose, the levels of intracellular NF- κ B, ICAM-1 mRNA and protein expression were significantly increased compared with group NG ($P < 0.05$). ③ Compared with group HG, the expression of intracellular NF- κ B, ICAM-1 mRNA was significantly decreased in group M3 ($P < 0.05$). ④ Compared with group HG, the expression of intracellular NF- κ Bp65 and ICAM-1 protein was significantly decreased in group M1, M2 and M3 in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion:** Metformin can suppress the expression of NF- κ B and ICAM-1 in glomerular mesangial cells in a concentration-dependent mode, which may partly contribute to its reno-protection.

[Key words] metformin; NF- κ B; ICAM-1

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 607-610]

[基金项目] 安徽省自然科学基金(11040606M161);安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2011A157)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: YSD196406@163.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病微血管并发症,已成为导致终末期肾衰竭最常见的病因。近来一些研究^[1]报告二甲双胍作为一线

抗糖尿病药物,可能通过某些途径对糖尿病肾脏病变有着独立于降糖作用之外的积极影响,部分机制可能与其抑制肾脏局部炎症因子有关。本研究通过在体外培养大鼠肾小球系膜细胞(MCs),观察高糖及二甲双胍对 MCs 炎症因子 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响,探讨其可能的肾脏保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料

MCs(中国典型培养物保藏中心,编号 HBZY-1,武汉大学)。

二甲双胍(Sigma 公司,美国);低糖 DMEM 培养基、高糖 DMEM 培养液(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(杭州四季青公司);胰蛋白酶(GIBCO-BRL 公司,美国);TRIzol (Invitrogen 公司,美国);逆转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国);real-time PCR 试剂及所用引物(大连 TaKaRa 公司);全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒和 E-CL 检测液(碧云天生物有限公司);兔抗大鼠 ICAM-1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国), β -actin 抗体(上海生工生物工程有限公司);辣根酶标记羊抗兔 IgG(北京中杉公司),预染 Marker(Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 系膜细胞培养

MCs 常规培养于含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的低糖 DMEM[葡萄糖浓度(Glu)5.6 mmol/L]培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 孵育箱中孵育,每 2~3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代 1 次,取 4~6 代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组

取对数生长期细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 待细胞达到亚融合状态,换用含 1%胎牛血清的 DMEM 培养液继续孵育 24 h,使所有细胞生长同步化,随后随机分为 5 组观察:①正常对照组(NG 组):DMEM 培养液 (Glu 5.6 mmol/L);②高糖组(HG 组):DMEM 培养液 (Glu 25 mmol/L);③二甲双胍组(M 组):1 组(M1 组):HG+二甲双胍(0.5 mmol/L);2 组(M2 组):HG+二甲双胍(1.0 mmol/L);3 组(M3 组):HG+二甲双胍(2.0 mmol/L)。以上各组标本培养 48 h 后收集细胞。每组实验细胞培养重复 6 孔,不同浓度二甲双胍预先 24 h 干预。

1.2.3 Real time-PCR 测定 MCs NF- κ B mRNA 和 ICAM-1 mRNA 表达

TRIzol 法提取细胞 RNA,测定 $D(260\text{ nm})/D$

(280 nm) 值在 1.8~2.0,紫外分光光度计测定浓度后,取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录,产物分别进行 ICAM-1 及管家基因 β 肌动蛋白(β -actin)的扩增。NF- κ B 引物序列上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGA-GAATG-3',下游 5'-ATGTTGGTGAAGACGACGCC-AGTA-3';ICAM-1 引物序列上游 5'-GCCCCGAG-GATCACAAACGAC-3',下游 5'-CCTGGGGCTGGCA-TGTAAGAGT-3'; β -actin 引物序列上游 5'-GCCT-TAGCCTGGACCC ATAGT-3',下游 5'-GACCACCA-ATCCACACAGA-3'。使用 ABI7500 型扩增仪,20 μ l 反应体系荧光染料法,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 的热循环 40 次;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min 及 95 $^{\circ}$ C 15 s 循环 1 次。内参和目的片段分别同批扩增,每组设置 3 个复孔,采用 $\Delta\Delta$ Ct 法分析 Ct(cycle threshold)值,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 表示实验组目的基因 mRNA 表达的拷贝数与对照组目的基因拷贝数之比。

1.2.4 Western blot 测定 MCs NF- κ Bp65 和 ICAM-1 水平

使用蛋白提取试剂盒提取各组细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白提取液加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 水煮 5 min,使蛋白变性。分别等量点样于 10%聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳后,电转膜(PVDF 膜),脱脂奶粉封闭,将一抗 NF- κ Bp65(1:1 000)、ICAM-1(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)置于 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜,二抗(1:5 000)孵育,ECL 化学发光,X 胶片显影定影。底片用 Quantity One 软件进行灰度分析,以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值表示目的蛋白表达的相对含量。

1.3 统计学方法

应用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,采用 SNK 检验进行两两比较;方差不齐性数据采用非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验)进行组间比较,采用 Mann-Whitney U 检验进行两两比较,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对高糖刺激下系膜细胞 NF- κ B mRNA 表达的影响

以 NG 组 NF- κ B mRNA 相对表达量为 1, HG 组 NF- κ B mRNA 相对表达量为 NG 组(6.15 \pm 0.62)倍($P < 0.05$), M1 组为其(2.02 \pm 0.34)倍($P < 0.05$),

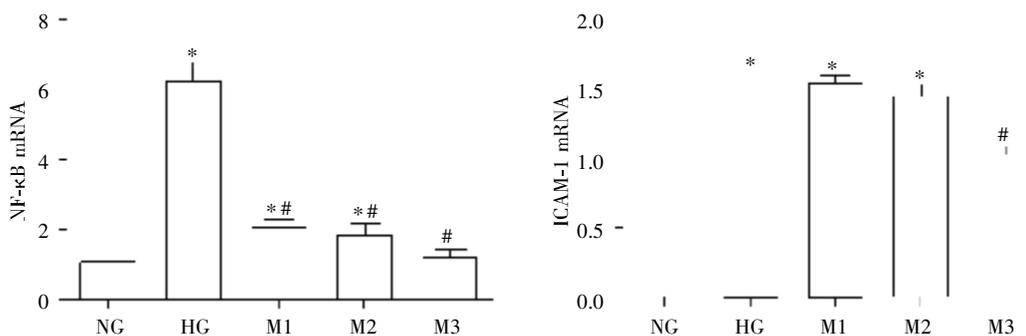
M2 组为其 1.82 ± 0.19 倍 ($P < 0.05$), M3 组为其 (1.18 ± 0.22) 倍, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与 HG 组比较, M1、M2 和 M3 组 MCs NF-κB mRNA 相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 二甲双胍对高糖刺激下 MCs ICAM-1 mRNA 表达的影响

以 NG 组 ICAM-1 mRNA 相对表达量为 1, HG 组 MCs ICAM-1 mRNA 相对表达量为 NG 组 (1.56 ± 0.46) 倍 ($P < 0.05$), M1 组为其 (1.52 ± 0.10) 倍 ($P < 0.05$), M2 组为其 (1.44 ± 0.13) 倍 ($P < 0.05$), M3 组为其 (1.02 ± 0.93) 倍 ($P > 0.05$)。

与 HG 组比较, M3 组 MCs ICAM-1 mRNA 相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。



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

图 1 MCs 各组 NF-κB、ICAM-1 mRNA 相对表达量

Figure 1 The relative expression of NF-κB and ICAM-1 mRNA in MCs

2.3 二甲双胍对高糖刺激下系膜细胞 NF-κBP65 蛋白合成的影响

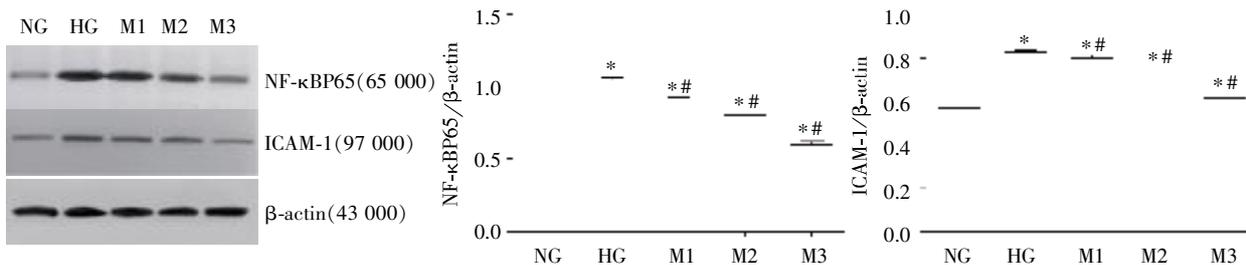
与 NG 组 NF-κBP65/β-actin 相对表达量 0.51 ± 0.15 相比, HG 组为 1.04 ± 0.01 ($P < 0.01$), M1 组为 0.91 ± 0.01 ($P < 0.01$), M2 组为 0.81 ± 0.03 ($P < 0.01$), M3 组为 0.61 ± 0.20 ($P < 0.01$)。

与 HG 组比较, 其余各组 NF-κBP65/β-actin 相对

表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.4 二甲双胍对高糖刺激下 MCs ICAM-1 蛋白合成的影响

与 NG 组 ICAM-1/β-actin 相对表达量 0.56 ± 0.02 相比, HG 组为 0.83 ± 0.01 ($P < 0.01$), M1 组为 0.80 ± 0.08 ($P < 0.01$), M2 组为 0.73 ± 0.01 ($P < 0.01$), M3 组为 0.61 ± 0.01 ($P < 0.01$)。



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

图 2 MCs 各组 NF-κBP65/β-actin, ICAM-1/β-actin 相对表达量

Figure 2 The relative expression of NF-κBP65 and ICAM-1 in MCs

与 HG 组比较, 其余各组 ICAM-1/β-actin 相对表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

3 讨论

肾小球 MCs 是肾脏的固有细胞之一, 在维持肾小球生理功能和疾病的发生中发挥重要作用。DN 病理特征主要表现为系膜细胞增生肥大, 细胞外基质堆积和肾小球硬化。目前认为, 其发病机制与高

糖所致的糖基化、多元醇通路激活、蛋白激酶 C (PKC) 活化、氧化应激、炎症反应、肾小球血流动力改变及遗传易感性等多种因素有关, 其中慢性炎症反应贯穿 DN 始终^[2]。DN 患者肾活检和动物模型皆发现肾组织存在巨噬细胞浸润、炎症因子和黏附分子活化^[3]。前炎症因子 NF-κB 主要发挥生理作用的 p50/p65 二聚体, 在组织细胞中广泛存在, 参与调节多种炎症介质、细胞因子和趋化因子的基因转录。

Schmid 等^[4]通过人肾脏活检发现 NF- κ B 介导的炎症通路在糖尿病肾组织显著上调。ICAM-1 作为细胞表面糖蛋白,介导巨噬细胞在肾小球局部积聚浸润^[5]。生理状况下,肾小球系膜细胞仅少量表达 ICAM-1,而高糖和 NF- κ B 可上调 ICAM-1 表达^[6],MCs 表面过度表达的 ICAM-1 可与白细胞黏连蛋白绑定,使巨噬细胞迁移到肾小球和管周毛细血管,造成球管损伤和参与蛋白尿的发生^[7]。Okada 等^[8]将基因敲除的 ICAM-1^(-/-)链脲霉素(STZ)模型鼠较之 ICAM-1^(+/+)鼠,发现血肌酐、尿素氮明显降低,尿白蛋白排泄减少,肾小球肥大及系膜基质沉积减轻,同时肾小球中转化生长因子(TGF- β)、IV型胶原的表达受抑制。

Lim 等^[9]研究报告高糖可以通过蛋白激酶 C/核因子- κ B (PKC/NF- κ B) 途径诱导大鼠系膜细胞 ICAM-1 等细胞因子的表达,参与 DN 的发生。Giunti 等^[10]研究认为高糖通过活性氧簇(ROS)激活 NF- κ B,促进 ICAM-1 等多种细胞因子合成和释放。本研究结果显示 MCs 可低度表达 ICAM-1,高糖作用下 NF- κ B、ICAM-1 表达明显增加,且二者具有相关性,与文献报道相一致^[6,10]。

动物实验显示给予 DM 大鼠 500 mg/kg 二甲双胍 8 周后,可见肾小球细胞外基质堆积和肾小球基底膜(GBM 膜)增厚明显改善^[11]。临床研究^[12]证明二甲双胍可降低糖尿病患者血清 C 反应蛋白、MCP-1 和 ICAM-1 水平,减少尿蛋白排泄。Benoit 等^[1]认为二甲双胍可直接作用于线粒体氧化呼吸链复合体,通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),通过下调 NF- κ B 抑制下游炎症因子如 ICAM-1 的表达。动物实验^[13]表明二甲双胍也可独立于 AMPK,直接抑制 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)磷酸化,使 ICAM-1 合成减少。此外,二甲双胍尚可通过抑制 ROS 和糖基化终末产物(AGEs)生成,下调 ICAM-1 表达^[1,14]。本研究通过体外试验结果显示二甲双胍可明显抑制肾小球系膜细胞 NF- κ B 和 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达,并具有一定的浓度依赖性,且对 ICAM-1 的下调机制可能部分通过 NF- κ B 的抑制作用。

总之,本研究结果初步提示二甲双胍可降低高糖诱导的肾小球 MCs NF- κ B、ICAM-1 表达,该作用可能与肾脏保护有关,确切机制值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Benoit V, Bruno G, Nieves S, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview[J]. Clin Sci, 2012, 122(6): 253-270
- [2] Gärtner V, Eigentler TK. Pathogenesis of diabetic macro-

- and microangiopathy[J]. Clin Nephrol, 2008, 70(1): 1-9
- [3] Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Clin Sci(Lond), 2013, 124(3): 139-152
- [4] Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, et al. Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2006, 55(11): 2993-3003
- [5] Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy[J]. Nutr Metab (Lond), 2011, 8(1): 35-45
- [6] Pezzolesi MG, Poznik GD, Mychaleckyj JC, et al. Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2009, 58(6): 1403-1410
- [7] Watanabe N, Shikata K, Shikata Y, et al. Involvement of MAPKs in ICAM-1 expression in glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy[J]. Acta Med Okayama, 2011, 65(4): 247-257
- [8] 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
- [9] Lim AK, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, et al. Role of MKK3-p38 MAPK signalling in the development of type 2 diabetes and renal injury in obese db/db mice[J]. Diabetologia, 2009, 52(2): 347-358
- [10] Giunti S, Tesch GH, Pinach S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in a mouse-model of experimental diabetes and in vitro in human mesangial cells[J]. Diabetologia, 2008, 51(1): 198-207
- [11] Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4): F697-701
- [12] Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4): F697-701
- [13] Tang SC, Chan LY, Leung JC, et al. Additive renoprotective effects of B2-kinin receptor blocker and PPAR- γ agonist in uninephrectomized db/db mice [J]. Lab Invest, 2011, 91(9): 1351-1362
- [14] Germeyer A, Jauckus J, Zorn M, et al. Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells [J]. Reprod Biomed Online, 2011, 22(4): 327-334

[收稿日期] 2013-10-07