

普罗布考对脂多糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖和分泌细胞外基质的影响

冯欣¹, 李垚², 王雪鹰³ (1. 辽宁医学院附属第一医院肾内科, 辽宁 锦州 121000; 2. 辽宁医学院生理学教研室, 辽宁 锦州 121000; 3. 锦州市中心医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 研究脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖和对分泌细胞外基质的影响以及普罗布考(probucol, PRB)的保护作用。方法 细胞同步化后分为: 正常对照组; LPS 组(LPS 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); PRB+LPS 处理组(PRB 浓度分别为 10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 继续培养 24, 48, 72 h。以 MTT 法检测系膜细胞的增殖情况, RT-PCR 法检测 IV 型胶原(college-IV, COL-IV)与结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)mRNA 的表达差异, Western blot 法检测 COL-IV, CTGF 蛋白的表达差异。结果 处理 24, 48, 72 h 后, LPS 组细胞增殖较对照组显著增加($P<0.05$), PRB+LPS 组与 LPS 组比较, 细胞增殖显著抑制($P<0.05$), 并呈时间-剂量依赖效应($r=0.932$, $P<0.05$)。培养 48 h 后, LPS 组 COL-IV, CTGF 的分泌较对照组显著增加($P<0.05$); 预先应用不同剂量的 PRB 治疗后, COL-IV, CTGF mRNA 和蛋白的水平较 LPS 组出现下调($P<0.05$)。结论 LPS 能促进系膜细胞增殖, 诱导细胞因子的释放, 促进细胞外基质的合成, 参与脂毒性肾损害的发生, PRB 可能通过下调这些血管生长因子的表达发挥肾保护作用。

关键词: 普罗布考; 脂多糖; 结缔组织生长因子; 胶原-IV

中图分类号: 965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)04-0297-04

Effects of Probucol on Mesangial Cell Proliferation and Extracellular Matrix Production in Rat Induced by Lipopolysaccharides

FENG Xin¹, LI Yao², WANG Xueying³ (1. Department of Urinary, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Physiology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; 3. The Jinzhou Central Hospital, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study lipopolysaccharides(LPS) induced mesangial cell proliferation and secretion of extracellular matrix, and the protective effect of probucol(PRB). **METHODS** After synchronization, cells were divided into: control group; LPS group(LPS: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); PRB+LPS treatment group(PRB: 10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Continued to train 24, 48, 72 h. The proliferation of mesangial cells were detected by MTT. College-IV(COL-IV), connective tissue growth factor(CTGF) mRNA expression were detected by RT-PCR. COL-IV, CTGF protein expression were detected by Western blot assay. **RESULTS** After treatment 24, 48, 72 h, cell proliferation of LPS group compared with control group increased significantly($P<0.05$); compared with LPS group, PRB+LPS groups cell proliferation were significantly inhibited($P<0.05$), and were time-dose- dependent effect($r=0.932$, $P<0.05$). After cultivated 48 h, COL-IV, CTGF secretion of LPS group increased significantly($P<0.05$); pretreatment with different doses of PRB, COL-IV, CTGF mRNA and protein levels compared with LPS group were lower($P<0.05$). **CONCLUSION** LPS can increase mesangial cell proliferation and the release of cytokines, to promote the synthesis of extracellular matrix, involved in the occurrence of renal toxicity lipid. PRB may be attributed to the expression of these cell growth factors and play a role in kidney protection.

KEY WORDS: probucol; lipopolysaccharides; connective tissue growth factor; college-IV

作者简介: 冯欣, 女, 硕士, 主治医师

Tel: 15840206911

E-mail: xinxinyiran@126.com

自 1974 年 Weisinger 等首次报道肥胖可出现肾病综合征以来, 由肥胖以及肥胖引起的代谢综合征造成的肾损害已日益受到重视, 其中脂毒性的作用备受关注。当营养过量时, 脂肪细胞增大, 功能异常, 游离脂肪酸增多, 可促进蛋白尿的生成, 造成肾脏损害^[1]。

大量研究也证实了脂质异常可导致或加重肾损害, 在肾脏病变进行性恶化机制中起重要作用^[2]。已有研究^[3]证实, 高脂血症中异常的脂蛋白成分可使肾小球系膜细胞增生和基质扩增、损伤内皮细胞功能和激活炎症反应, 还能激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统, 导致肾硬化的发生, 加速肾衰竭进程, 但是其确切机制以及高游离脂肪酸在其中的作用目前仍不十分明确。

普罗布考(probucol, PRB)是一种降脂抗氧化剂, 其结构包括两个丁基-羟基甲苯部分, 相互之间由 S-C-S 键连接, 能有效降低血浆氧自由基浓度, 避免或减少了低密度脂蛋白等脂质被氧化, 具有重要的机体保护作用。本试验观察了 PRB 对脂毒性致大鼠系膜细胞增殖的影响, 以及分泌 IV 型胶原(college-IV, COL-IV)与结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的影响, 以探讨早期干预脂代谢异常对阻止肾脏损伤的发生和发展的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

大鼠肾小球系膜细胞株(上海博慧斯公司)。低糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青); MTT、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, 美国 Sigma 公司); PRB(美国默沙东公司); 兔抗大鼠 COL-IV 多克隆抗体、兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体(Santa Cruz 公司); HRP-标记的羊抗兔二抗(中杉公司); RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.2 仪器与设备

相差显微镜(Nikon 公司); 高速低温离心机(Beekinan 公司); 超声粉碎仪(Sonics&materials 公司); NanoDrop 1000 紫外/可见光分光光度仪(Beekinan 公司); Multiphor11 型多功能电泳仪(瑞典 Pharmacia-LKB 公司); Chemilmage 5500 凝胶自动成像分析仪(美国 Alphainnotech 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 系膜细胞培养

细胞严格无菌操作, 打开

细胞培养瓶, 将细胞培养液完全吸出, 加消化液(0.25%胰蛋白酶)1 mL 消化至细胞脱落, 换新培养瓶, 加前面吸出的培养液 5 mL, 放入 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞达 80%融合时, 消化液消化并吹打均匀, DMEM 培养液终止消化。吹打、重悬细胞, 按 1:2 比例进行传代, 常规培养、换液。待细胞稳定后进行实验。

1.3.2 实验分组 细胞在 DMEM(含糖 5.5 mmol·L⁻¹)培养液中培养至亚融合(70%~80%)状态后, 换无血清 DMEM 培养液, 继续培养 24 h, 使细胞同步化后分为: ①正常对照组; ②LPS 组(LPS 浓度为 10 μg·mL⁻¹); ③PRB+LPS 处理组: 根据 PRB 浓度(10, 20, 50 μmol·L⁻¹)分为 3 个亚组, 在每个亚组中先加入 PRB 预处理 24 h 后再加入 10 μg·mL⁻¹ 的 LPS。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖水平 细胞接种于 96 孔板, 按“1.3.2”项下分组, 再培养 24, 48, 72 h 分别测细胞增生率。培养结束后加入 MTT(5 g·L⁻¹) 20 μL, 于 37 °C 培养箱孵育 4 h 后, 吸去 MTT 液, 每孔分别加入 DMSO 200 μL, 用水平摇床摇匀震荡 10 min, 用酶标仪观察, 在 490 nm 波长处记录各组吸光度值。细胞增生率=(LPS 组吸光率-实验组吸光度/LPS 组吸光率)×100%, 细胞增生抑制率=1-细胞增生率。

1.3.4 RT-PCR 法检测 COL-IV, CTGF mRNA 的表达 取培养 48 h 后的细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 检测 260 nm/280 nm 波长处的光密度(OD)值和 RNA 浓度, 取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间的样品备用。进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 观察 28S, 18S, 5S 条带的宽度和亮度, 以判断 RNA 有无降解。COL-IV 上游引物为: 5'-TGCCACCATCACTC AATACCA-3'; 下游引物为: 5'-AGGCTGGGTTG CTTGATCCT-3'; CTGF 上游引物为 5'-CTAAGAC TCGTGGGATGGGC -3'; 下游引物为: 5'-GTCAA AGATGTCATTGTCCCC-3'。采用荧光染料 sybgreen 法, 逆转录反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。PCR 扩增: 反应体系为 25 μL, 包括 12.5 μL SYBR®Premix Ex Taq™ II, 1 μL 引物, 2 μL cDNA 和 8.5 μL dH₂O。扩增反应条件采用两步法: 预变性 95 °C 30 s, 而后 PCR 反应: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次, 每个样品重复 3 次, 以 β-actin 为内参, 采用相对定量方法, 得到的 Ct 值为原始数据, 基因表达差异用 2-△△a 法进行数据处理。

1.3.5 Western blot 法检测 COL-IV, CTGF 蛋白表达 取培养 48 h 后的细胞, RIPA 裂解液裂解细胞, 4 °C 离心(3 000 r·min⁻¹, 5 min), 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度后, 制成蛋白浓度相等的样品。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 每孔加 20 μg 蛋白质样品, 8%聚丙烯酰胺凝胶上垂直电泳(80 V, 1 h)。电转印至硝酸纤维素膜上(电压 60 V, 3 h)。5%的脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入 COL-IV, CTGF 抗体, 孵育过夜, 第二抗体室温孵育 2 h。用显色液行碱性磷酸酶法显色。Scinn Corporation 分析软件进行灰度值半定量分析。实验重复 3 次, 取算术平均值进行统计分析。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件分析, 各组间进行组间单因素方差分析。对有明显趋势的变量采用 Pearson 相关分析, $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖水平

结果显示, 在 24, 48, 72 h, LPS 组细胞增殖较对照组显著增加($P<0.05$), PRB 对细胞的增生抑制率高于 LPS 组, 差异有统计学意义($P<0.05$), PRB 对细胞有明显增生抑制效果, 并呈剂量依赖效应($r=0.932$, $P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 PRB 对 LPS 刺激系膜细胞增殖效率的影响($n=8$)
Tab 1 The effects of probucol on mesangial cell proliferation ($n=8$)

组 别	细胞增生抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
对照组	31.6±5.8	46.3±2.1	49.9±1.1
LPS 组	9.0±3.3 ¹⁾	13.3±2.5 ¹⁾	15.9±3.7 ¹⁾
PRB+LPS 组(10 μmol·L ⁻¹)	9.4±1.6	13.4±1.3	17.0±2.3
PRB+LPS 组(20 μmol·L ⁻¹)	19.4±6.6 ²⁾	21.6±7.8 ²⁾	23.5±2.7 ²⁾
PRB+LPS 组(50 μmol·L ⁻¹)	24.4±8.1 ²⁾	28.4±3.2 ²⁾	30.1±1.5 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$

2.2 LPS 作用下系膜细胞 COL-IV, CTGF mRNA 的表达

正常对照组 COL-IV, CTGF mRNA 仅有少量表达, LPS 培养 48 h 后 COL-IV, CTGF mRNA 的表达明显升高($P<0.05$); 经 PRB 预处理后, COL-IV, CTGF mRNA 水平较 LPS 组出现下调($P<0.05$), 但仍较正常对照组有所升高。结果见图 1。

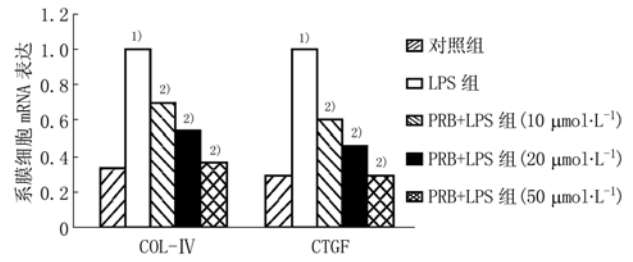


图 1 各组系膜细胞 COL-IV, CTGF mRNA 表达荧光半定量分析
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$
Fig 1 The mRNA expression of COL-IV, CTGF in mesangial cell
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$

2.3 LPS 作用下系膜细胞 COL-IV, CTGF 蛋白表达 正常对照组 COL-IV, CTGF 蛋白仅有少量表达, LPS 培养 48 h 后 COL-IV, CTGF 蛋白的表达明显升高($P<0.05$), 经 PRB 预处理后, COL-IV, CTGF 蛋白水平较 LPS 组出现下调($P<0.05$)。结果见图 2 和图 3。

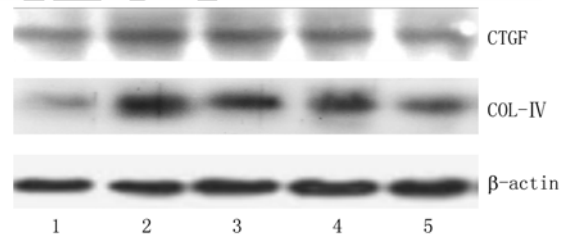


图 2 各组系膜细胞 COL-IV, CTGF 的蛋白表达
1-对照组; 2-LPS 组; 3-PRB+LPS 组(10 μmol·L⁻¹); 4-PRB+LPS 组(20 μmol·L⁻¹); 5-PRB+LPS 组(50 μmol·L⁻¹)
Fig 2 The protein expression of COL-IV, CTGF in mesangial cell
1-control group; 2-LPS group; 3-PRB+LPS treatment group(PRB: 10 μmol·L⁻¹); 4-PRB+LPS treatment group(PRB: 20 μmol·L⁻¹); 5-PRB+LPS treatment group(PRB: 50 μmol·L⁻¹)

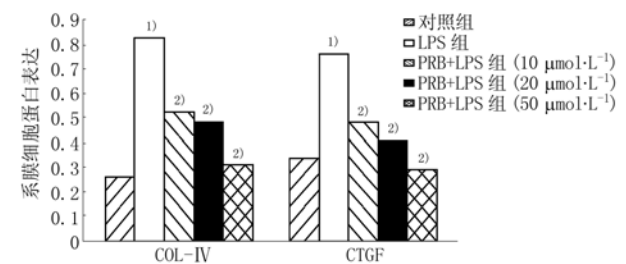


图 3 各组系膜细胞 COL-IV, CTGF 的蛋白表达
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$
Fig 3 The protein expression of COL-IV, CTGF in mesangial cell
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.05$

3 讨论

多种肾脏疾病均可发生脂质代谢紊乱,而脂质代谢异常又可导致肾脏的损害及肾脏疾病的进行性发展。脂代谢紊乱导致血中游离脂肪酸水平升高,超过脂肪组织的储存能力和各组织对游离脂肪酸的氧化能力,使更多的游离脂肪酸以甘油三酯的形式在非脂肪组织中过度沉积,造成对组织的损伤称为脂毒性^[4]。众所周知,脂毒性引发外周胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能障碍,是糖尿病发病的重要原因之一。脂毒性对机体的影响是十分复杂、多方面的,能造成机体重要的组织如心脏、视网膜及肾脏等多器官的损害。

已有实验表明,健康大鼠接受高脂饮食 4 个月血中总胆固醇和低密度脂蛋白即显著增高,在血脂升高同时,尿蛋白和血肌酐明显上升,肾小球系膜基质显著增殖,证实高脂可导致肾功能的异常和结构的损伤^[5]。长期高脂饲养可导致大鼠肾脏微血管病变,引起 24 h 尿白蛋白增加,并导致肾皮质 VEGF 和 ICAM-1 的表达增加^[6]。

高脂血症中异常的脂蛋白成分可使肾小球系膜细胞增生和基质扩增、修饰的脂蛋白与肾小球上皮细胞及系膜细胞表面的脂蛋白受体结合力降低,导致脂蛋白在系膜区和肾小球基底膜沉积,刺激细胞外基质合成^[6]。在本实验结果显示,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 可显著性刺激肾小球系膜细胞增殖($P<0.05$),并且 48 h 比 24 h 更明显,并使 COL-IV 的分泌显著升高。COL-IV 是肾小管基底膜的主要成分,参与构成细胞外基质,而细胞外基质在肾小球内的蓄积是肾小球硬化的主要特征性变化,说明 LPS 可以促进胶原的合成,进一步促进细胞外基质的积聚,最终导致间质纤维化的发生。

LPS 的沉积还可以引起促生长因子的释放,进一步促进细胞外基质的分泌。本实验将系膜细胞于 LPS 条件下培养 48 h,然后检测系膜细胞 CTGF mRNA 及蛋白的表达。结果表明,LPS 培养条件下,肾小球系膜细胞 CTGF 的 mRNA 及蛋白的表达均明显高于正常对照组。提示 LPS 可以通过上

调 CTGF 的表达,进一步促进细胞外基质的分泌。

PRB 为临床上常用的血脂调节药,能有效降低血浆氧自由基浓度,避免或减少了 LDL 等脂质被氧化,具有抗氧化作用^[7-8],是一种强有力的抗氧化剂。本实验中观察到 PRB 对 LPS 诱导的大鼠肾系膜细胞增殖有显著的抑制作用,并呈剂量依赖效应,治疗后 COI-IV, CTGF 的表达显著低于 LPS 处理组,提示 PRB 能有效地抑制 LPS 引起的细胞外基质的积聚。

总之,LPS 可导致大鼠肾系膜细胞增殖,促进细胞因子的释放,细胞外基质的积聚,而 PRB 很可能通过下调这些血管生长因子的表达发挥肾保护作用。本实验为今后研究 PRB 延缓脂毒性肾病提供了新的理论依据。

REFERENCES

- [1] ISEKI K. Body mass index and the risk of chronic renal failure: the Asian experience [J]. *Contrib Nephrol*, 2006, 151: 42-56.
- [2] MARITIM A C, ANDERS R A, WATKINS J B. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review [J]. *Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1): 24-38.
- [3] GUO X H. The mechanism of lipid-induced nephropathy [J]. *For Med Sci(Endocrinol)(国外医学 内分泌学分册)*, 2005, 25(3): 161-165.
- [4] LU Y Q, SHU K. Effect of LPS induce pancreatic islets β cell apoptotic on type 2 diabetes [J]. *Shanghai Med(上海医药)*, 2009, 30(9): 399-401.
- [5] SI X Y, JIA R H, HUANG C X, et al. Effect of glomerular podocyte injury on lipid-induced nephropathy in hypercholesteremic rats [J]. *J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报)*, 2002, 19(2): 157-160.
- [6] SHIN H K, KIM Y K, KIM K Y, et al. Remnant lipoprotein in particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-lactation: prevention by cilostazol [J]. *Circulation*, 2004, 109(8): 1022-1028.
- [7] TIAN Q Y, LIU T T, LI B L. Protective effects of probucol on the cultured human umbilical vein endothelial cell injured by lysophosphatidylcholine [J]. *Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志)*, 2003, 11(3): 211-213.
- [8] WANG Z, LIU Z C, CUI D. Effect of advanced glycation end products on injuring of rat renal microvascular endothelial cells and protective effect of probucol [J]. *Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志)*, 2008, 16(2): 111-116.

收稿日期: 2010-06-25