

## 二甲双胍对大鼠肾小球系膜细胞 NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1表达及合成的影响

顾俊菲, 叶山东, 汪 嫻, 孙文佳, 胡圆圆

**摘要** 目的 观察二甲双胍对大鼠肾小球系膜细胞(MCs)核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达及合成的影响,探讨其对肾脏的保护机制。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、M2、M3)。培养48 h后收集各组细胞及上清液,采用荧光实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测细胞NF- $\kappa$ B、MCP-1及ICAM-1的mRNA含量;采用Western blot法检测细胞NF- $\kappa$ Bp65及ICAM-1蛋白表达水平;采用ELISA法检测上清液中MCP-1蛋白浓度。结果 ① MCs可表达NF- $\kappa$ B、MCP-1和ICAM-1;② 与NG组比较,HG组MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1的mRNA表达增强,NF- $\kappa$ Bp65、ICAM-1及细胞上清液中MCP-1蛋白含量增高( $P < 0.05$ );③ 经二甲双胍干预后,高糖培养的MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1及ICAM-1表达合成显著降低( $P < 0.05$ )。结论 二甲双胍可抑制MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1和ICAM-1的表达及合成,该作用可能与其肾脏保护机制有关。

**关键词** 二甲双胍;核因子- $\kappa$ B;单核细胞趋化蛋白-1;细胞间黏附分子-1

中图分类号 R 349.51; R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0582-04

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,其发病机制尚未明确,涉及代谢紊乱、氧化应激、炎症反应、肾小球血流动力学改变和遗传易感性等。系膜细胞在维持肾小球的结构和功能方面起着重要的作用,并且参与了多种肾小球疾病的致病过程。二甲双胍作为一线抗糖尿病药物,可能通过多种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。该实验通过在体外培养大鼠肾小球

系膜细胞(mesangial cells, MCs),观察高糖及二甲双胍对MCs炎症因子核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间黏附分子-1(inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1)水平的影响,探讨其对肾脏的保护机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** MCs购于中国典型培养物保藏中心。

**1.1.2 主要药物与试剂** 二甲双胍、预染Marker(美国Sigma公司);低糖DMEM培养液、高糖DMEM培养液(美国Hyclone公司);胎牛血清(杭州市四季青公司);胰蛋白酶(美国GIBCO-BRL公司);TRIzol、逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司);Real-time PCR试剂及所用引物(大连TaKaRa公司);ELISA试剂盒(美国R&D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ECL检测液(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗NF- $\kappa$ Bp65多克隆抗体、兔抗大鼠ICAM-1多克隆抗体(美国Santa Cruz公司); $\beta$ -actin抗体(上海生工生物工程有限公司);辣根酶标记羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

#### 1.2 细胞培养与分组

**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(Glu 5.6 mmol/L)培养液中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>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)分3个亚组,M1组:HG+二甲双胍(0.5 mmol/L);M2组:HG+二甲双胍(1.0

2013-12-12 接收

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

作者单位:安徽医科大学附属省立医院内分泌科,合肥 230001

作者简介:顾俊菲,女,硕士研究生;

叶山东,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:ysd196406@163.com

mmol/L); M3 组: HG + 二甲双胍 (2.0 mmol/L)。以上各组标本培养 48 h 后收集细胞及上清液。每组实验细胞培养重复 6 次。

**1.3 Real-time PCR 测定 MCs 中 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、MCP-1 的 mRNA 表达** TRIzol 法提取细胞 RNA, 测定  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8 ~ 2.0, 紫外分光光度计测定浓度后, 取 2  $\mu$ g 总 RNA 进行逆转录, 产物分别进行 NF- $\kappa$ B、MCP-1 及  $\beta$ -actin 的扩增。NF- $\kappa$ B 上游引物序列: 5'-GGCA CAGT CAAG GCTG AGAA TG-3', 下游: 5'-ATG G TGGT GAAG ACGA CGCC AGTA-3'; MCP-1 上游引物序列: 5'-CAAG GTAA GGAG CATAG AGCC AAC-3', 下游: 5'-GAGG AAAT AGGG GAGCA GGAA C-3'; ICAM-1 上游引物序列: 5'-GCCC GGAG GATC ACAA ACGA C-3', 下游: 5'-CCTG GGGC TGGC ATGT AAGA GT-3';  $\beta$ -actin 上游引物序列: 5'-GCCT TAGC CTGG ACCC AT-AG T-3', 下游: 5'-GACC ACCA ATCC ACAC AGA-3'。使用 ABI7500 型扩增仪 20  $\mu$ 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  $\Delta\Delta C_t$  法分析 Ct 值,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示目的基因 mRNA 表达的拷贝数与  $\beta$ -actin 拷贝数之比。

**1.4 Western blot 法测定 MCs 中 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ Bp65 (1 : 1 000)、ICAM-1 (1 : 1 000)、 $\beta$ -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 线片显影定影。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。

**1.5 MCs 上清液中的 MCP-1 蛋白含量测定** 采用双抗体夹心法检测 MCP-1 蛋白含量, 具体步骤按照试剂盒说明进行。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  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。

## 2 结果

**2.1 二甲双胍对高糖刺激下 MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1 的 mRNA 表达的影响** 与 NG 组比较, HG 组 NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1 的 mRNA 相对表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), M1、M2 和 M3 组相对表达量逐渐降低, 呈现一定的浓度依赖性。与 HG 组比较, M1、M2 和 M3 组 NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1 的 mRNA 相对表达量皆显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

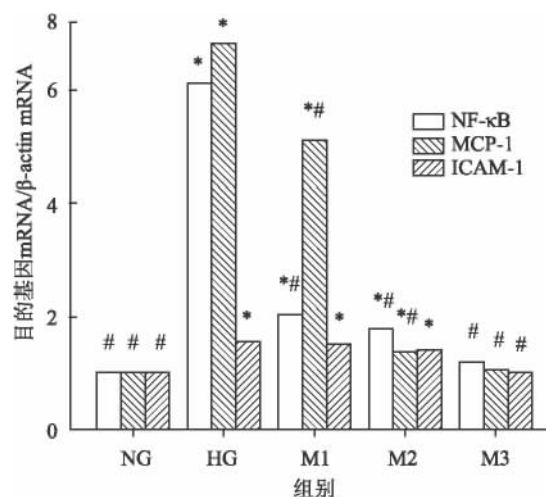


图1 Real-time PCR 测定各组 NF- $\kappa$ B、MCP-1、ICAM-1 的 mRNA 表达

与 NG 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

**2.2 二甲双胍对高糖刺激下 MCs 上清液中 MCP-1 蛋白合成的影响** 与 NG 组比较, HG 组、M1 组、M2 组 MCP-1 水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); M3 组 MCP-1 水平轻度升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 HG 组比较, M1、M2 和 M3 组上清液 MCP-1 水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 二甲双胍对高糖刺激下系膜细胞 NF- $\kappa$ Bp65、ICAM-1 蛋白合成的影响** 与 NG 组比较, HG、M1、M2、M3 组 NF- $\kappa$ Bp65、ICAM-1 蛋白相对表达量皆显著升高 ( $P < 0.01$ ), 其中 M1、M2 和 M3 组呈现逐渐降低趋势。与 HG 组比较, 其余各组 NF- $\kappa$ Bp65、ICAM-1 蛋白相对表达量皆明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

## 3 讨论

MCs 是肾脏的固有细胞之一, 在维持肾小球生理功能中发挥重要作用。当炎症等病理状态时, MCs 被激活增殖, 细胞外基质合成和降解失衡, 使细

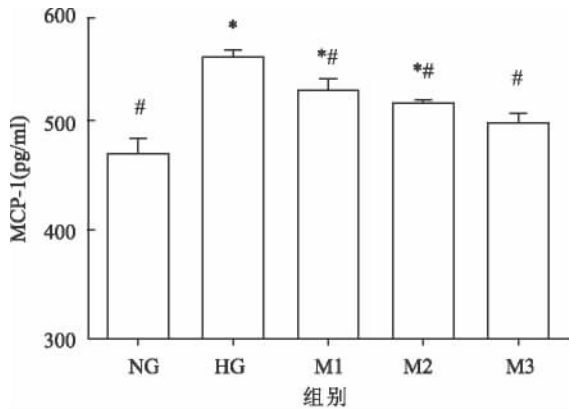


图2 ELISA 法测定各组上清液 MCP-1 蛋白水平与 NG 组比较: \* P < 0.05; 与 HG 组比较: # P < 0.05

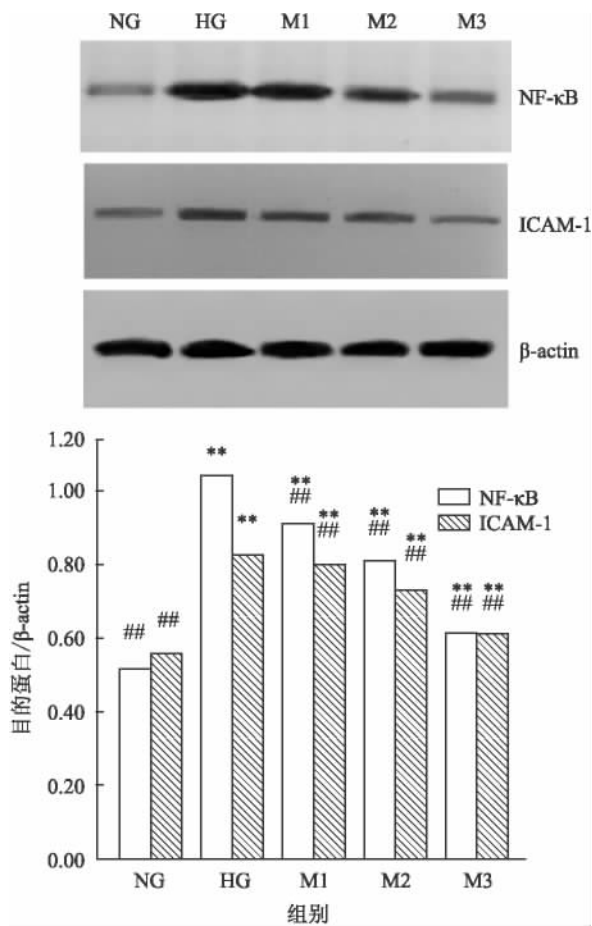


图3 Western blot 法测定各组 NF-κBp65、ICAM-1 蛋白水平与 NG 组比较: \*\* P < 0.01; 与 HG 组比较: ## P < 0.01

胞外基质堆积 通过自分泌或旁分泌扩大细胞因子效应 损伤的肾小球可发展为肾小球硬化<sup>[1]</sup>。DN 以 MCs 病变为特征 突出表现为 MCs 增生肥大 细胞外基质堆积。目前研究<sup>[2]</sup>显示 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 (protein kinase C, PKC) 信号转导、氧化应激、炎症

反应等多种因素有关 其中炎症状态贯穿 DN 始终。DN 患者和动物 DN 模型皆发现肾脏存在巨噬细胞浸润、炎症因子和黏附分子活化。

NF-κB 在核蛋白家族中,主要发挥生理作用的是 p50/p65 二聚体,在组织细胞中广泛存在,调节多种细胞因子、炎症介质、趋化因子的基因转录。Schmid et al<sup>[3]</sup>通过人肾脏活检发现 NF-κB 介导的炎症通路在糖尿病肾组织显著上调。Tesch<sup>[4]</sup>发现高糖刺激下 MCs 高表达 NF-κB,可促进 MCP-1 合成。MCP-1 在大鼠 DN 模型中表达增加,可介导单核巨噬细胞迁移,上调黏附分子和其他细胞因子表达。在 MCP-1 缺陷型 1 型糖尿病(T1DM)和 2 型糖尿病(T2DM)动物模型中,肾脏损伤程度皆有所降低。ICAM-1 作为细胞表面糖蛋白,介导白细胞向内皮细胞黏附,生理状况下,系膜细胞仅少量表达。在高糖、高脂血症、高胰岛素血症或前炎症因子等的诱导下,ICAM-1 可大量合成。有研究<sup>[5]</sup>表明,高糖可以通过 PKC-NF-κB 依赖途径诱导大鼠 MCs ICAM-1 等细胞因子的表达,参与 DN 的发生。临床研究<sup>[6]</sup>中 T2DM 患者体内可溶性 ICAM-1 增加。Okada et al<sup>[7]</sup>将基因敲除的 ICAM-1 (-/-) 链脲霉素 (STZ) 模型鼠较之 ICAM-1 (+/+) 鼠,血肌酐、尿素氮大大降低,白蛋白尿减少、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 (transforming growth factor-β, TGF-β)、IV 型胶原的表达受抑制,认为 ICAM-1 及其诱导浸润的巨噬细胞在 DN 的发病过程中起关键作用。Giunti et al<sup>[8]</sup>研究认为高糖通过活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 激活 NF-κB,进而上调 MCP-1 的表达,介导了系膜细胞的炎症反应。过度表达的 MCP-1 能够激活单核细胞中的溶酶体酶及蛋白水解酶,促进 ROS 释放,引发氧化应激,从而促进 DN 发生;MCP-1 也可促进 ICAM-1 等多种细胞因子合成和释放,加剧单核巨噬细胞在肾组织浸润及 TGF-β1 和结缔组织生长因子等生成,促进细胞外基质合成和分泌,参与肾小球纤维化。本实验结果显示 MCs 可低度表达 NF-κB、MCP-1 和 ICAM-1,高糖作用下细胞 NF-κB、MCP-1 和 ICAM-1 表达明显增加,其机制可能与高糖通过 PKC、ROS 或糖基化终末产物途径激活 NF-κB,上调 MCP-1 和 ICAM-1 表达有关。

二甲双胍作为经典降糖药,近年来研究<sup>[9]</sup>显示其具有抗炎、减轻氧化应激、抑制糖基化和脂质沉积等部分独立于降糖之外的作用。临床研究<sup>[10]</sup>表明二甲双胍可降低 DN 患者血清高敏 C 反应蛋白、MCP-1 和 ICAM-1 水平,减少尿蛋白和尿 MCP-1 排

泄。对 DM 大鼠给予 500 mg/kg 二甲双胍 8 周后,可见细胞外基质堆积和肾小球基底膜增厚明显改善<sup>[11]</sup>。本研究在体外证明二甲双胍可抑制 MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1 及 ICAM-1 的表达,并具有一定的浓度依赖性,可能通过抗炎延缓 DN 进展。二甲双胍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),下调 NF- $\kappa$ B 及下游炎症因子表达<sup>[9]</sup>。二甲双胍可独立于 AMPK,直接抑制 I $\kappa$ B 磷酸化,使 NF- $\kappa$ B、MCP-1 和 ICAM-1 合成减少。此外,二甲双胍可通过抑制 ROS 等的生成,下调炎症反应,延缓纤维化进程。

总之,本研究结果初步提示二甲双胍可降低高糖诱导的 MCs NF- $\kappa$ B、MCP-1 和 ICAM-1 表达,该作用可能与肾脏保护有关,确切机制尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Vaughan M R, Quaggin S E. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(1):24-33.
- [2] Gärtner V, Eigentler T K. Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy [J]. Clin Nephrol, 2008, 70(1):1-9.
- [3] 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.
- [4] Tesch G H. 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.
- [5] Lim A K, Nikolic-Paterson D J, Ma F Y, 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):347-58.
- [6] Cha J J, Hyun Y Y, Jee Y H, et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) is elevated in type 2 diabetic patients, and sICAM-1 synthesis is associated with leptin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [J]. Inflammation, 2013, 36(4):878-87.
- [7] 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):2586-93.
- [8] Giunti S, Tesch G H, Pinach S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in mouse model of experimental diabetes and *in vitro* in human mesangial cells [J]. Diabetologia, 2008, 51(1):198-207.
- [9] Benoit V, Bruno G, Nieves S, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview [J]. Clin Sci, 2012, 122(6):253-70.
- [10] Tesch G H. 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.
- [11] Alhaidar A A, Korashy H M, Sayed-Ahmed M M, et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression [J]. Chem Biol Interact, 2011, 192(3):233-42.

## Effects of metformin on expression and synthesis of intercellular adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B in rat glomerular mesangial cells

Gu Junfei, Ye Shandong, Wang Shan, et al

(Dept of Endocrinology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To observe the effects of metformin on expression and synthesis of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-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, M2, M3). After 48 h exposure, the supernatants and MCs were collected. The expression of NF- $\kappa$ B, MCP-1 and ICAM-1 mRNA was analyzed by Real-time PCR and MCP-1 protein synthesis by ELISA. NF- $\kappa$ Bp65 and ICAM-1 were visualized by Western blot. **Results** ① MCs could express NF- $\kappa$ B, ICAM-1 and MCP-1. ② After being stimulated by high glucose, the levels of intracellular NF- $\kappa$ B, MCP-1 and ICAM-1 were significantly increased compared with group NG ( $P < 0.05$ ). ③ The levels of NF- $\kappa$ B, MCP-1 and ICAM-1 were significantly decreased in group M1, M2 and group M3 compared with group HG ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Metformin can suppress the expression and synthesis of NF- $\kappa$ B, MCP-1 and ICAM-1 of glomerular mesangial cells, which may partly contribute to its reno-protection.

**Key words** metformin; NF- $\kappa$ B; MCP-1; ICAM-1