

还原型谷胱甘肽对高糖诱导的小鼠系膜细胞氧化应激及细胞外基质表达的影响

秦玉萍 徐玉音 范亚平

摘要 **目的** 观察还原型谷胱甘肽(GSH)对高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞氧化应激及细胞外基质表达的影响。**方法** 体外培养小鼠肾小球系膜细胞株分别予正常糖(NG组)、高糖(HG组)、高糖+GSH(1、5、10mmol/L,高糖+GSH 1~3组)组干预72h;ELISA法测定各组细胞培养上清液中的丙二醛(MDA)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO)、总超氧化物歧化酶(tSOD)和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、纤连蛋白(FN)及层粘连蛋白(LN)的表达情况。**结果** HG组小鼠肾小球系膜细胞MDA、 H_2O_2 、NO、TGF- β_1 、FN、LN的表达水平均较NG组增加,tSOD表达降低($P<0.05$);高糖+GSH 1~3组MDA、 H_2O_2 、FN、LN表达较HG组减少($P<0.05$),高糖+GSH 2、3组NO、TGF- β_1 表达较HG组降低($P<0.05$),高糖+GSH 3组tSOD表达较HG组增加($P<0.05$)。**结论** GSH可改善高糖诱导的系膜细胞氧化应激反应及减少细胞外基质积聚,对糖尿病肾病可能有一定防治作用。

关键词 还原型谷胱甘肽 小鼠 系膜细胞 氧化应激 细胞外基质 糖尿病肾病

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.036

Effects of Reduced Glutathione on Oxidative Stress and Extracellular Matrix of Mouse Glomerular Mesangial Cells in Hyperglycemic Milieu.

Qin Yuping, Xu Yuyin, Fan Yaping. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu 226001, China

Abstract **Objective** To observe the effects of reduced glutathione (GSH) on oxidative stress and extracellular matrix of mouse glomerular mesangial cells in hyperglycemic milieu. **Methods** The cultured mouse glomerular mesangial cells were divided into 5 groups: normal glucose group (5mmol/L), high glucose group (30mmol/L), and GSH groups (high glucose with 1mmol/L, 5mmol/L, 10mmol/L GSH respectively). The cell culture supernatant were saved for detecting the concentrations of MDA, H_2O_2 , NO, tSOD and TGF- β_1 , FN, LN at 72h after different treatments by ELISA assay. **Results** Compared with the normal glucose group, the concentrations of MDA, H_2O_2 , NO and TGF- β_1 , FN, LN were increased and the concentration of tSOD was decreased in high glucose group ($P<0.05$). The concentrations of MDA, H_2O_2 , FN and LN were reduced by treatment of different concentrations of GSH ($P<0.05$), and the concentrations of NO, TGF- β_1 were inhibited by GSH 5 and 10mmol/L, and the concentration of tSOD was increased by 10mmol/L of GSH ($P<0.05$). **Conclusion** GSH could inhibit oxidative stress and extracellular matrix of mouse glomerular mesangial cells induced by hyperglycemic milieu, and may be helpful in the treatment of diabetic nephropathy.

Key words Reduced glutathione; Mouse; Glomerular mesangial cell; Oxidative stress; Extracellular matrix; Diabetic nephropathy

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病主要的微血管并发症,病理改变以肾小球系膜增生、进而肾小球硬化为特征,动物实验和临床研究证实氧化应激在DN的发病机制及其进展的病理过程中具有重要作用^[1,2]。还原型谷胱甘肽(reduced-glutathione, GSH)是广泛存在于机体组织器官的天然多肽,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成,具有较强的抗氧化作用,可通过其巯基与体内的自由基结合,对维持细胞生物功能发挥重要作用^[3]。本研究通过体外

培养小鼠系膜细胞给予高糖刺激及GSH干预,探讨GSH对高糖所致肾小球系膜细胞氧化应激与系膜细胞外基质积聚的影响。

材料与方法

1. 实验材料:小鼠肾小球系膜细胞株购自上海艾研生物科技有限公司(SV40-MES-13);胎牛血清、DMEM培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;高糖培养液(含葡萄糖30mmol/L)购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;GSH、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(tSOD)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、纤连蛋白(fibronectin, FN)及层粘连蛋白(laminin, LN)ELISA检测试剂盒购自上海劲马生物科技有限公司。

作者单位:226001 南通大学附属医院肾内科(秦玉萍现在南通市瑞慈医院肾内科)

通讯作者:范亚平,电子信箱:fanyp19107@medmail.com.cn

2. 实验方法:取第4~6代对数生长期小鼠肾小球系膜细胞,0.25%胰蛋白酶消化,含20%胎牛血清的DMEM培养液制成单细胞悬液,接种于6孔无菌培养板,置于5% CO₂、37℃饱和湿度下培养,待系膜细胞生长至60%融合,改用无血清DMEM培养液静置孵育12h使细胞生长同步,体外培养小鼠肾小球系膜细胞分组处理:正常糖组(含D-葡萄糖5mmol/L,NG组);高糖组(含D-葡萄糖30mmol/L,HG组);HG+GSH-1组(1mmol/L GSH);HG+GSH-2组(5mmol/L GSH);HG+GSH-3组(10mmol/L GSH),各组予不同浓度葡萄糖及5%胎牛血清分别培养作用72h。提取各组小鼠肾小球系膜细胞培养上清液,严格按ELISA试剂盒说明书,分别检测MDA、H₂O₂、NO、tSOD及TGF-β₁、FN、LN的表达情况。

3. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计软件分析结果,所有实验均重复6次,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用方差分析,相关分析采用Pearson直线相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组MDA、H₂O₂、NO及tSOD表达的改变:各组小鼠肾小球系膜细胞分别培养72h后,HG组

MDA、H₂O₂、NO含量均较NG组增加,tSOD含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1组MDA、NO、tSOD与HG组相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$);HG+GSH-2、3组MDA、NO含量较HG组降低,tSOD含量较HG组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);HG+GSH-1~3组H₂O₂含量较HG组均下降,差异皆有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1~3组MDA、H₂O₂、NO含量变化与GSH干预浓度负相关($\gamma = -0.944, P < 0.01$; $\gamma = -0.865, P < 0.01$; $\gamma = -0.804, P < 0.01$),且以HG+GSH-3组改变最为显著,组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);HG+GSH-1~3组tSOD含量变化与GSH干预浓度呈正相关($\gamma = 0.62, P < 0.01$),HG+GSH-+1、2组或HG+GSH-2、3组两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$),HG+GSH-1、3组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1~3组MDA、H₂O₂、NO含量仍较NG组增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);HG+GSH-3组tSOD含量与NG组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),HG+GSH-1、2组tSOD含量仍较NG组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 各组小鼠肾小球系膜细胞MDA、H₂O₂、NO、tSOD的表达改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (nmol/L)	H ₂ O ₂ (pg/ml)	NO (μmol/L)	tSOD (U/ml)
NG组	6	7.28 ± 0.63	22.89 ± 0.97	58.83 ± 4.74	155.13 ± 5.73
HG组	6	12.36 ± 1.19 [*]	32.68 ± 1.823 [*]	80.00 ± 4.66 [*]	131.21 ± 6.40 [*]
HG+GSH-1组	6	11.66 ± 0.46 [*]	28.62 ± 1.07 ^{*#}	78.60 ± 4.55 [*]	137.52 ± 5.96 [*]
HG+GSH-2组	6	9.82 ± 0.41 ^{*#}	26.97 ± 1.06 ^{*#}	73.82 ± 2.87 ^{*#}	143.21 ± 5.72 ^{*#}
HG+GSH-3组	6	8.63 ± 0.43 ^{*#}	25.00 ± 0.81 ^{*#}	68.17 ± 2.80 ^{*#}	148.64 ± 7.05 [#]

与NG组比较,^{*} $P < 0.05$;与HG组比较,[#] $P < 0.05$

2. 各组TGF-β₁、FN、LN表达的改变:各组小鼠肾小球系膜细胞分别培养72h后,HG组TGF-β₁、FN、LN含量均较NG组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1~3组TGF-β₁含量较HG组下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1组FN、LN与HG组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),HG+GSH-2、3组FN、LN含量较HG组下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-1~3组TGF-β₁、FN、LN含量变化均与GSH干预浓度负相关($\gamma = -0.79, P < 0.01$; $\gamma = -0.893, P < 0.01$; $\gamma = -0.849, P < 0.01$),且以HG+GSH-3组改变最著,组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HG+GSH-3组TGF-β₁、FN、LN含量与

NG组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),HG+GSH-1、2组TGF-β₁、FN、LN含量仍较NG组增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

讨 论

糖尿病肾病是目前西方国家导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的首位原因,国内近年也呈不断增高的趋势,氧化应激在DN发病机制中具有重要的病理作用^[4,5]。高血糖状态可诱导机体内的氧化与抗氧化系统失衡,导致反应性氧代谢产物(reactive oxygen species, ROS)形成过多,包括一氧化氮(NO)、过氧化氢(H₂O₂)及脂质自由基(如MDA)等,而且使机体清除ROS能力下降,组织内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CTA)、谷胱甘肽过氧化

表 2 各组小鼠肾小球系膜细胞 FN、LN、TGF-β₁ 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF-β ₁ (pg/ml)	FN (pg/ml)	LN (μg/L)
NG 组	6	111.6 ± 4.58	1537.2 ± 40.0	532.7 ± 22.5
HG 组	6	143.3 ± 6.72 *	1827.9 ± 41.9 *	693.4 ± 40.0 *
HG + GSH - 1 组	6	135.5 ± 5.28 *#	1788.0 ± 43.8 *	669.3 ± 29.0 *
HG + GSH - 2 组	6	126.3 ± 5.87 *#	1708.6 ± 38.4 *#	615.6 ± 21.3 *#
HG + GSH - 3 组	6	117.6 ± 5.32#	1595.0 ± 48.1#	569.2 ± 30.6#

与 NG 组比较, *P < 0.05; 与 HG 组比较, #P < 0.05

物酶 (GPH - Px) 等抗氧化酶基因表达下调,同时使其活性基团发生糖基化而活性下降甚至失去功能^[6]。过多的 ROS 可诱导肾脏固有细胞发生氧化应激,激活细胞内相关信号通路,经核内转录因子介导而诱导致纤维化因子基因转录和表达增加,导致细胞外基质生成增多、过度沉积而促进肾脏纤维化^[7]。肾脏纤维化是包括糖尿病肾病在内的各种慢性肾脏病进展到终末期肾衰竭的主要病理特征和共同途径,细胞外基质过度堆积在肾小球硬化及肾小管间质纤维化中均起着至关重要的作用^[8]。

肾小球细胞外基质主要成分为 IV 型胶原、FN 和 LN 等, FN 是一种大分子糖蛋白,广泛存在于细胞外基质、基膜及各种体液中,可将细胞连接到细胞外基质上,与其他细胞外基质成分(如胶原、蛋白聚糖)结合,使细胞外基质形成网络,为细胞外基质成分沉积提供支架; LN 是构成细胞间质的一种非胶原糖,与胶原一起构成基膜的成分, LN 可介导上皮细胞及内皮细胞黏着于基膜,并与多种基膜成分结合,从而影响细胞生长、分化和运动,在糖尿病肾病中参与基膜增厚及细胞外基质的积聚。已有报道在糖尿病患者早期即有 TGF-β₁ 表达增加,后者是 DN 发生、发展至肾脏纤维化的核心因子,介导肾脏纤维化的启动与维持^[9]。GSH 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成,是具有 γ-谷氨酰键和巯基(-SH)的生物活性三肽,广泛分布于机体各器官内,可以清除细胞生理代谢或病理反应所产生的氧化应激中间代谢物,在组织细胞抗氧化中具有重要的保护作用,对糖尿病肾病的发生、发展亦有一定防治作用^[10-12]。

本研究发现,体外培养的小鼠肾小球系膜细胞在高糖环境下氧化应激产物 MDA、H₂O₂、NO 显著增加,抗氧化应激的 tSOD 含量明显下降,表明高糖可诱导 ROS 形成增加,同时亦发现 TGF-β₁ 及 FN、LN 含量增加,显示高糖可以引起促纤维化因子表达上调及细胞外基质成分增多;应用不同浓度 GSH 干预后,可呈浓度依赖性减轻高糖刺激所致 MDA、H₂O₂、NO 和

FN、LN 含量增加,高浓度时还可提升 tSOD 水平,并可抑制高糖所致 TGF-β₁ 表达上调,提示 GSH 可能通过减轻氧化应激反应,抑制 TGF-β₁ 生成,进而减少细胞外基质合成与积聚。

综上所述,还原型谷胱甘肽可以减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激反应,并可减少细胞外基质成分的产生,其作用机制可能部分与抑制 TGF-β₁ 表达有关,但确切的作用机制有待于深入研究。本研究结果为还原型谷胱甘肽应用于防治糖尿病肾病提供了理论基础和实验依据,值得在临床上进一步观察。

参考文献

1 Ahmad J. Management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015, 9(4): 343 - 358

2 Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti VK, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(34): 4256 - 4269

3 Homma T, Fujii J. Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drugs[J]. Curr Drug Metab, 2015, 16(7): 560 - 571

4 Stanton RC. Clinical challenges in diagnosis and management of diabetic kidney disease[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(Suppl 2): S3 - S21

5 Di Marco E, Jha JC, Sharma A, et al. Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? [J]. Clin Sci, 2015, 129(2): 199 - 216

6 Zuo L, Zhou T, Pannell BK, et al. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly[J]. Acta Physiol, 2015, 214(3): 329 - 348

7 Nie J, Hou FF. Role of reactive oxygen species in the renal fibrosis [J]. Chin Med J, 2012, 125(14): 2598 - 2602

8 Tonolo G, Cherchi S. Tubulointerstitial disease in diabetic nephropathy[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014, 7: 107 - 115

9 Wu CC, Sytwu HK, Lin YF. Cytokines in diabetic nephropathy[J]. Adv Clin Chem, 2012; 56: 55 - 74

10 Arora MK, Singh UK. Oxidative stress: meeting multiple targets in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Curr Drug Targets, 2014, 15(5): 531 - 538

11 Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire[J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(3): 176 - 184

12 罗远标, 苏华燕, 黄少珍, 等. 替米沙坦联合还原型谷胱甘肽对早期糖尿病肾病患者微炎症及微量白蛋白尿的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(5): 442 - 443

(收稿日期: 2015 - 11 - 13)
(修回日期: 2015 - 12 - 23)