

普罗布考对 1-甲脒乙醇酸酐诱导 HK-2 细胞表达 纤维化相关因子的影响

杨 波¹, 王志娣¹, 蒋云生², 段绍斌², 费良玉¹, 颜天铭¹

(1. 南华大学第一附属医院 肾内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湘雅二医院 肾内科)

摘要: **目的** 研究降脂药普罗布考对小分子尿毒素 1-甲脒乙醇酸酐诱导纤维化相关因子在人肾小管上皮细胞表达的影响。 **方法** HK-2 细胞分 3 组培养, 正常对照组: 不加干预因素; 1-甲脒乙醇酸酐组: 培养基中加入 0.5 mmol/L 1-甲脒乙醇酸酐; 1-甲脒乙醇酸酐 + 普罗布考组: 培养基中加入 0.5 mmol/L 1-甲脒乙醇酸酐和 20 μ mol/L 普罗布考。各组细胞培养 48 h 后用免疫细胞化学、RT-PCR 检测 TGF- β_1 、CTGF 和 FN, 并用流式细胞仪对以上因子作定量检测, 以观察其在 HK-2 细胞中的表达。 **结果** 在 1-甲脒乙醇酸酐刺激后, 免疫细胞化学染色 HK-2 细胞质中着色, 显示 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 均有表达。正常对照组 HK-2 细胞质中无着色。测定结果显示 1-甲脒乙醇酸酐组 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), 加入普罗布考后, 表达显著下降 ($P < 0.05$)。 **结论** 1-甲脒乙醇酸酐能促进纤维化相关因子在肾小管上皮细胞中表达; 普罗布考能抑制 1-甲脒乙醇酸酐诱导纤维化相关因子在肾小管上皮细胞的表达。

关键词: 普罗布考; 1-甲脒乙醇酸酐; 肾小管上皮细胞; 纤维化

中图分类号: R692.5 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)04-0390-05

Effect of Probucol on the Expression of Fibrosis Correlation Factor in HK-2 Cells Caused by 1-methylguanidine

YANG Bo, WANG Zhi-di, JIANG Yun-sheng, et al

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of University of South China Hengyang,
Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of probucol on expression of the fibrotic correlation factors on HK-2 with the intervention of 1-methylguanidine. **Methods** HK-2 cells were treated with nothing as normal control, 0.5 mmol/L 1-methylguanidine as 1-methylguanidine group, and 0.5 mmol/L 1-methylguanidine and 20 μ mol/L probucol as 1-methylguanidine + probucol group. The protein and mRNA expression of TGF- β_1 , CTGF and FN were examined by immunocytochemistry, flow cytometry and RT-PCR. **Results** The protein and mRNA expression of TGF- β_1 , CTGF and FN in HK 2 cells were significantly increased when HK 2 cells were cultivated with 1-methylguanidine ($P < 0.01$), but when probucol was added they decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** 1-methylguanidine can promote the expression of fibrosis correlation factors in renal tubular epithelial cells. Probucol can inhibit the expression of fibrosis correlation factors in renal tubular epithelial cells caused by 1-methylguanidine.

Key words: probucol; 1-methylguanidine; renal tubular epithelial cell; fibrosis

慢性肾功能衰竭治疗中残余肾功能的重要性已达成共识, 有关残余肾损害机制的研究倍受关

注^[1]。残存肾的小球硬化和间质纤维化一直是研究的焦点, 其中尿毒症毒素对残存肾单位的损害也

逐渐受重视^[2]。1-甲脲乙醇酸酐是新近发现的尿毒症毒素。已有研究证明尿毒症患者血中1-甲脲乙醇酸酐明显高于正常,且在慢性肾衰大鼠的肠道中分离出该物质,研究表明为细菌分解肌酐后的产物^[3]。经肠道重吸收入血,可能为其主要来源。笔者在前期的实验中,发现其对肾小管上皮细胞毒性作用。本文探讨1-甲脲乙醇酸酐对肾脏纤维化相关因子如纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、转化生长因子(transforming growth factor G1, TGF-β₁) 在肾小管上皮细胞表达的影响,以进一步认识该毒素。同时用普罗布考干预,以了解该药的抗纤维化作用,为该药开辟新用途提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

1-甲脲乙醇酸酐(美国 Sigma),普罗布考(齐鲁制药有限公司),兔抗人(FN)抗体、兔抗人(CTGF)抗体和兔抗人(TGF-β₁)抗体,羊抗兔 FITC 荧光素二抗,免疫组织化学染色试剂盒、DAB 试剂盒(美国北京中山公司)。正常人近端肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cell line)HK-2 株;ATCC 公司,美国。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司)。PCR 仪:Thermo Hybaid (英国)。DNA maker: DL2000 大连宝生物技术有限公司。引物(上海生工生物工程技术服务有限公司)序列见表 1。

表 1 引物序列		
引物名称	引物序列	片段长度
TGF-β ₁	上游:5'-CTGCGGATCTCTGTGTCATT-3'	246 bp
	下游:5'-CTCAGAGTGTTGCTATGGTG-3'	
CTGF	上游:5'-GAC GGCTGCGGTGCTGC-3'	344 bp
	下游:5'-CACACCCACTCCTCGCAGCA-3'	
FN	上游:5'-AGCCGCCACGTGCCAGGATTAC-3'	439 bp
	下游:5'-CTTATGGGGGTGGCCGTTGTGG-3	

1.2 主要仪器

DYY-III-5 型电泳仪(北京市六一仪器厂);Gel Doc1000 凝胶描图象分析系统(Bio-Rad 公司);细菌滤器、whatman1 号滤纸(浙江绍兴卫星医疗设备制造有限公司);PC 仪(Thermo Hybaid);紫外分光光度仪(Beckman 公司);Moduly OD-20 真空冷冻干燥机(Thermo Savant 公司);PC 反应体系(南京创瑞生物技术有限公司);-80℃ 超低泓冰箱(Forma 公司);DNA 琼脂糖凝

胶水平电泳仪(Bio Rad 公司);凝胶成像分析仪(Bio—Rad 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液的配制 肌酐、1-甲脲乙醇酸酐分别溶于 PBS 液中,浓度均为 1 mmol/L,调整 pH 值 7.2~7.4 之间。过滤除菌备用。普罗布考溶于 DMSO 中,浓度为 20 mmol/L (为细胞培养液终浓度的 1 000 倍)。

1.3.2 实验分组 HK-2 细胞以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板,使约为 80% 满时,分别加含或不含干预因素的培养液(5% FCS 细胞培养液),每孔 2.0 mL。分为如下 3 组:正常对照组:不加干预因素;1-甲脲乙醇酸酐组:培养基中加入 0.5 mmol/L 1-甲脲乙醇酸酐;1-甲脲乙醇酸酐 + 普罗布考组:培养基中加入 0.5 mmol/L 1-甲脲乙醇酸酐和 20 μmol/L 普罗布考。1-甲脲乙醇酸酐浓度在试验中均为 0.5 mmol/L,普罗布考浓度为 20 μmol/L。

1.3.3 免疫细胞化学染色分析 每组设 3 个样品,分别用于检测 TGF-β₁、CTGF 和 FN。弃上清液,取出盖玻片,用纯丙酮固定。用免疫细胞化学 ABC 检测。

1.3.4 流式细胞仪蛋白表达的定量分析 HK-2 细胞用以上方法培养后,留取部分标本作操作 TGF-β₁、CTGF 和 FN 蛋白定量分析。操作如下:①消化,离心(2 000 rpm 5 min),去上清,加 70% 乙醇固定 1 h。②离心去乙醇:0.1% 吐温 PBS 洗 2 次(每次 15 min)。③加入一抗 50 μL (1:200 稀释)过夜。④PBS 洗 2 次,每次 5 min。⑤加入 FITC 二抗 50 μL (1:100 稀释),避光 30 min。⑥PBS 洗 2 次,每次 5 min。⑦加 PBS 悬成 0.5 mL,送流式细胞仪检测。分别检测 TGF-β₁、CTGF 和 FN 的含量和表达率。⑧蛋白表达的定量分析:按照 Morkve 等^[4]提出的荧光指数(FI)表示蛋白的相对含量,计算荧光指数 FI: FI = (样本总免疫荧光道数 - 对照组总免疫荧光道数)/正常对照组总免疫荧光道数。⑨以上实验重复 3 次。

1.3.5 RT-PCR 培养细胞总 RNA 的提取及分离按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。取 4 L 电泳,检测 RNA 的完整性;取 1~5 L 测定 A₂₆₀。计算总 RNA 的量。将抽提的总 RNA 根据它所测的浓度稀释成 500 ng/L,70℃ 变性 10 min 后进行逆转录反应。反转录条件:95℃, 5 min→5℃, 60 min→95℃, 5 min→20℃ 保存。

PCR 扩增:按照 TaKaRa Taq™ 试剂盒说明生成 20 μL PCR 产物:①按以下比例混合各试剂:0.5 × cDNA 2 μL, 10 mmol/L dNTP 0.4 μL, 10 × PCR Buffer 2 μL 10 pmol/L 上游,引物 1 μL, 10 pmol/L 下游引物 1 μL, 1 U/μL Taq 酶 2 μL,加无酶水至终体积

20 μ L,点离。②PCR 扩增条件为:TGF- β_1 :95℃ 预变性5 min,开始循环 95℃ 30 s,62℃ 退火 40 s,72℃ 55 s共 28 个循环,72℃ 彻底延伸 7 min,4℃ 保存;CTGF:95℃ 预变性 5 min,开始循环 95℃ 30 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 50 s 共 34 个循环,72℃ 彻底延伸 7 min,4℃ 保存。FN:95℃ 预变性 5 min,开始循环 95℃ 31 s,63℃ 退火 40 s,72℃ 30 s 共 31 个循环,72℃ 彻底延伸 5 min,4℃ 保存;beta-actin 95℃ 预变性 5 min,开始循环 95℃ 30 s,57℃ 退火45 s,72℃ 1 min共 28 个循环,72℃ 彻底延伸7 min,4℃ 保存。

PCR 产物凝胶电泳:各取 2 μ L PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶成像系统照相并用 Quantity one-4. 0. 3 测量其积分光密度值 (integral optical density value, IOD)。并分别计算 TGF- β_1 、CTGF、FN mRNA 与 beta-actin mRNA RT-PCR 产物积分光密度 (IOD)值之比。

1. 4 统计分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 SPSS13. 0 统计软件包,两组以上进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用成组 *t* 检验。

2 结 果

2. 1 免疫细胞化学染色分析

在 1 - 甲脲乙醇酸酐刺激后,免疫细胞化学染色,

HK-2 细胞质中着色,显示 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 均有表达。阴性对照组 HK-2 细胞质中无着色。见图 1。

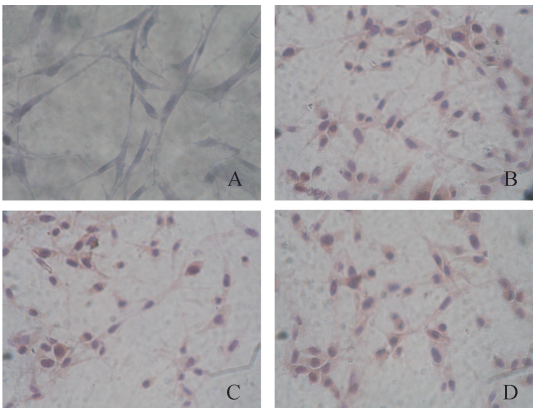


图 1 免疫细胞化学染色 ($\times 400$)

A:阴性对照组 HK-2 细胞中无表达;B ~ D:分别表示 TGF- β_1 、CTGF、FN 在 HK-2 细胞中的表达

2. 2 流式细胞仪蛋白质定量分析结果

表 2 显示 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 均有表达,1 - 甲脲乙醇酸酐组三者荧光指数 (FI 值) 显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),加入普罗布考后,表达显著下降 ($P < 0.05$)。

2. 3 RT-PCR

2. 3. 1 总 RNA 提取 从培养的 HK-2 细胞中提取总的 RNA,经紫外分光光度计测定 OD260/OD280 值

表 2 流式细胞仪检测 TGF- β_1 、CTGF、FN FI 值结果 ($n = 3$)

组别	TGF- β_1	CTGF	FN
正常对照组	0. 068 $\pm$ 0. 011	0. 069 $\pm$ 0. 013	0. 086 $\pm$ 0. 010
1 - 甲脲乙醇酸酐组	2. 814 $\pm$ 0. 135 ^a	2. 960 $\pm$ 0. 155 ^a	3. 084 $\pm$ 0. 155 ^a
1 - 甲脲乙醇酸酐 + 普罗布考组	2. 104 $\pm$ 0. 125 ^{ab}	2. 111 $\pm$ 0. 121 ^{ab}	2. 244 $\pm$ 0. 109 ^{ab}

a:与正常对照组比较, $P < 0. 01$;b:与 1 - 甲脲乙醇酸酐组比较, $P < 0. 05$

均在 1. 8 ~ 2. 0 之间,表明总 RNA 纯度较高,DNA 及蛋白质污染较少。分别取 4 μ LRNA 溶液在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,图 2 示电泳图,显示核糖体 RNA 28S、18S、带清晰可见,且其亮度之比约为 2: 1,并隐约可见 5S 带,表明 RNA 带完整,没有发生降解。说明 RNA 质量符合实验要求。

2. 3. 2 半定量 RT-PCR 结果 结果显示 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 均有表达,1 - 甲脲乙醇酸酐组三者 FI 值显著高于正常对照组 ($P < 0. 01$),加入普罗布考后,表达显著下降 ($P < 0. 05$)。具体见表 3,图 3。

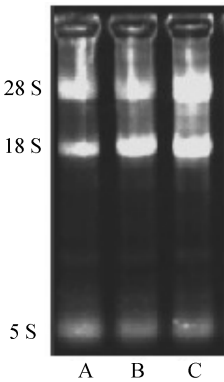


图 2 总 RNA 溶液在 1% 琼脂糖凝胶上电泳图

A:正常对照组;B:1 - 甲脲乙醇酸酐组,C:1 - 甲脲乙醇酸酐组 + 普罗布考组

表 3 RT-PCR 检测 TGF-β₁、CTGF、FN 结果 (n = 3)

组别	TGF-β ₁	CTGF	FN
正常对照组	0.506 ± 0.039	0.233 ± 0.030	0.340 ± 0.036
1-甲脒乙醇酸酐组	1.083 ± 0.138 ^a	1.136 ± 0.126 ^a	1.266 ± 0.120 ^a
1-甲脒乙醇酸酐 + 普罗布考组	0.781 ± 0.044 ^{ab}	0.821 ± 0.054 ^{ab}	0.987 ± 0.119 ^{ab}

a: 与正常对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 1-甲脒乙醇酸酐组比较, $P < 0.05$

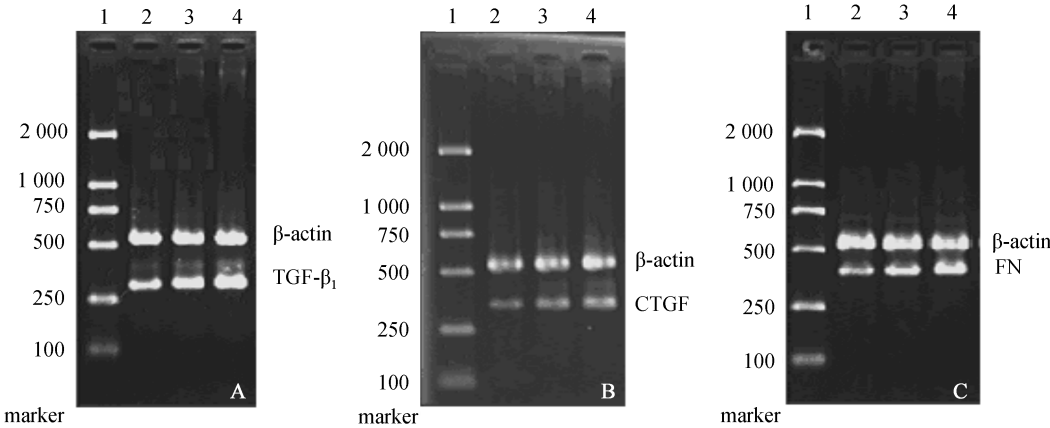


图 3 TGF-β₁、CTGF、FN RT-PCR 电泳图

A ~ C 分别为 TGF-β₁、CTGF、FN RT-PCR

1: marker; 2 ~ 4 分别为正常对照组、1-甲脒乙醇酸酐组、1-甲脒乙醇酸酐 + 普罗布考组

3 讨 论

已有的研究资料显示,几乎所有的慢性肾功能衰竭个体都不同程度出现肾小球硬化和肾小管间质的纤维化,这是肾脏不可逆性的损害和肾脏疾病的最终结局,因而研究肾脏纤维化的机制是肾病领域的热点。近年来对慢性肾功能不全残存肾单位保护中,已关注到积聚在体内的尿毒症毒素在肾纤维化中的作用。目前的研究证实,与肾小球硬化相比,肾间质纤维化与肾功能减退的关系更为密切^[2],阻止和逆转肾间质纤维化的进展成为治疗慢性肾脏病 (CKD) 及控制肾功能衰竭的关键。目前认为肾间质纤维化的主要发病机制包括早期的炎症反应或非炎症损伤、氧化应激、血流动力学改变、多种细胞因子及血管活性物质的作用、肾脏固有细胞表型的转化、肾脏细胞凋亡与增殖失衡等有关^[4,5]。笔者发现 1-甲脒乙醇酸酐对肾小管上皮细胞有较强的毒性作用,可促进细胞的凋亡。现在进一步就其促纤维化,进行研究。多种因素可以促进肾脏纤维化因子的产生,如 PDGF、TGF-β₁ 与 CTGF,特别是 TGF-β₁ 与 CTGF, TGF-β₁ 是纤维化的关键因子,该因子可促进肾小管上皮细胞、成纤维细胞增殖活化,使这

些细胞自分泌和旁分泌 TGF-β₁、I、Ⅲ、Ⅳ型胶原及 FN、LN,使细胞外基质增多。另一方面促进降解胶原纤维的抑制物分泌,使纤维降解下降,加速纤维化。FN 纤维连接蛋白是细胞外基质的主要成分,具有结合纤维蛋白、纤维蛋白原、胶原的能力,同时也是一种重要的调理介质,通过与整合素结合在介导细胞增殖与间质纤维化中起作用^[6]。CTGF 为 TGF-β₁ 下游因子,在后者的作用下,肾小管细胞、间质的成纤维细胞和肾小管周围毛细血管内皮细胞都能产生 CTGF,这些细胞以自分泌和旁分泌的方式作用于肾脏局部,促进细胞外基质的分泌聚积。肾小管细胞向肌成纤维细胞转化,形成纤维化。CTGF 又可反过来扩大其上游 TGF-β₁ 系统的活性,无论是何种原因所致的肾小球疾病,间质 CTGF 增加都集中在小管萎缩区以及部分慢性肾小管间质损害区域,CTGF 共同表达于 α-SMA 阳性细胞。在多种肾脏疾病的动物模型以及人体多种肾脏疾病病理标本上发现,间质纤维化越重的部位,细胞凋亡数量越多,间质纤维化程度与细胞凋亡数量成正相关^[7]。观察发现 CRF 鼠肾小管上皮细胞 TGF-β₁ 及其下游因子 CTGF 产生增加,并回馈肾小管上皮细胞本身,促进其分化为肌成纤维细胞,加重纤维化^[6]。

本实验免疫细胞化学染色显示 HK-2 细胞在 1-甲脒乙醇酸酐刺激下 TGF- β_1 、CTGF 和 FN 均有强表达,通过流式细胞仪蛋白质定量及 mRNA 检测,结果显示 HK-2 细胞在 1-甲脒乙醇酸酐刺激下纤维化因子 TGF- β_1 、CTGF 及 FN 生成显著高于正常对照组,提示 1-甲脒乙醇酸酐促进纤维化因子在肾小管上皮细胞中表达。目前对 1-甲脒乙醇酸酐的毒性研究不多,所以其促纤维化机制有待进一步探讨。

随着慢性肾脏疾病进一步损害机制的研究深入到细胞分子水平,对抗肾纤维化和肾固有细胞的凋亡,延缓慢性肾衰的进展已引起广泛重视,不少抗纤维化、抗凋亡的因子、制剂已展示较好的前景。但绝大多数处于实验研究阶段。国外有用抗氧化剂番小瓜制剂和 NZ-419 护肾的报道^[7,8]。本实验着重探讨普罗布考对 1-甲脒乙醇酸酐诱导的纤维化相关因子在 HK-2 细胞表达的作用。普罗布考主要作用是降低血清胆固醇,并有抗氧化作用,临床用于动脉粥样硬化的治疗,有显著的抗氧化作用,能抑制泡沫细胞的形成,延缓动脉粥样硬化斑块的形成。GSH 是细胞内最重要的巯基抗氧化物,能直接清除 -OH 和超氧化阴离子等氧源性自由基,也可以作为谷胱甘肽过氧化物酶的辅因子消除 H₂O₂。普罗布考能增强谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活性,抑制细胞内活性氧产生并增加其清除^[9]。慢性肾脏病 (CKD) 时活性氧与抗氧化物质严重失衡是活性氧诱导肾血管内皮细胞的损害的主要机制。目前认为氧化应激存在于肾脏病的始末,参与肾脏病的发生、发展,是影响 CKD 患者预后的重要危险因素。但 CKD 的抗氧化治疗尚未引起足够重视。本实验显示 1-甲脒乙醇酸酐组加入普罗布考后, TGF- β_1 、CTGF 和 FN 的表达显著低于 1-甲脒乙醇酸酐组,提示普罗布考能降低 1-甲脒乙醇酸酐诱导纤维化相关因子在肾小管上皮细胞的表达。可能与其清除 1-甲脒乙醇酸酐产生的自由基有关,其具体作用机

制,有待动物体内试验进一步探讨。但普罗布考在肾脏病患者中的疗效还需进一步作临床观察。

参考文献:

- [1] 任伟,兰雷,叶山东. 透析病人保护残余肾功能的重要性[J]. 国外医学·老年医学分册,2007,28(4): 185-187.
- [2] 刘海燕,陈孝文,梁东,等. 尿毒症毒素对人肾小管上皮细胞外基质的影响及临床意义[J]. 中华急诊医学杂志,2006,15.
- [3] Yang B, Liu D, Li CZ, et al. 1-Methylhydantoin cytotoxicity on renal proximal tubular cells in vitro[J]. Ren Fail, 2007,29(8):1025-1029.
- [4] Zeisberg EM. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol,2008,19(12):2282-2287.
- [5] Burns WC. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol,2006,17(9):2484-2494.
- [6] Carvajal G. Gremlin: a novel mediator of epithelial mesenchymal transition and fibrosis in chronic allograft nephropathy[J]. Transplant Proc,2008,40(3):734-739.
- [7] Noda Y, Murakami S, Mankura M, et al. Inhibitory effect of fermented papaya preparation on hydroxyl radical generation from 1-methylguanidine[J]. Clin Biochem Nutr, 2008,43(3):185-190.
- [8] Ienaga K, Mikami H, Yokozawa T. First indications demonstrating the preventive effects of NZ-419, a novel intrinsic antioxidant, on the initiation and/or progression of chronic renal failure in rats E[J]. Biol Pharm Bull,2009,32(7): 1204-1208.
- [9] 杨波,蒋云生. 抗氧化剂对甲基胍所致肾小管上皮细胞凋亡的保护作用[J]. 中南药学,2010,8(1): 20-23.

(此文编辑 蒋湘莲)