

论著·实验研究

高糖对肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 表达的 影响及安体舒通的干预作用

刘抗寒 周巧玲 敖翔 汤天凤 洪学敏 包瑞兰

(中南大学肾脏病与血液净化研究所/中南大学湘雅医院肾内科,湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 旨在探讨高糖对肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达的影响及安体舒通 (spironolactone, SP) 对其表达的干预作用。方法 体外培养肾小管上皮细胞 (NRK-52E), 分成低糖组 (5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM)、高糖组 (25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM)、SP 组 (25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM + 10^{-7} mol/L 安体舒通)。采用细胞免疫化学、RT-PCR、Western blot 检测各组细胞 TLR4 蛋白和 mRNA 表达情况, 同时取细胞培养上清液用 ELISA 法检测白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。结果 高糖组培养 6 h TLR4 mRNA 出现表达增高, 24 h 仍高于低糖组; SP 组 TLR4 mRNA 明显低于同时期高糖组的表达, 但仍高于低糖组。高糖组培养 24 h TLR4 蛋白较低糖组升高, 48 h TLR4 蛋白表达进一步升高; SP 组 TLR4 蛋白表达明显低于同时期高糖组表达, 但仍高于低糖组。高糖组 IL-6、TNF- α 较低糖组明显升高; 而 SP 组 IL-6、TNF- α 高于低糖组, 但明显低于高糖组。结论 高糖促使 NRK-52E 细胞的 TLR4 的表达上调, TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达升高, TLR4 参与了糖尿病肾病的微炎症反应; 安体舒通可通过下调 TLR4 表达水平, 减少相关炎症介质的生成, 这可能是其在糖尿病肾病中具有肾脏保护作用的机制之一。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 280-283]

[关键词] 安体舒通; 高糖; Toll 样受体 4; 肾小管上皮细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)04-0280-04

Effect of spironolactone on the expression of Toll-like receptor 4 in renal tubular epithelia cells exposed to high glucose

LIU Kang-Han, ZHOU Qiao-Ling, AO Xiang, TANG Tian-Feng, HONG Xue-Min, BAO Rui-Lan. Kidney Disease and Blood Purification Research Center/Department of Nephropathy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Zhou Q-L, Email: zhouqling@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in renal tubular epithelial cells exposed to high glucose and the effect of spironolactone on the TLR4 expression. **Methods** *In vitro* renal tubular epithelial cells (NRK-52E) were randomly exposed to DMEM culture solution with low glucose (5 mmol/L), high glucose (25 mmol/L) or 10^{-7} mol/L spironolactone plus 25 mmol/L glucose. Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to determine TLR4 protein and mRNA expression. The levels of IL-6 and TNF- α in the cell culture supernatant were determined using ELISA. **Results** The expression of TLR4 mRNA in the high glucose group began to increase 6 hrs and remained at a higher level up to 24 hrs after exposure as compared with the low glucose group. The TLR4 mRNA expression in the spironolactone treatment group was significantly lower than that in the high glucose group, although it was higher than that in the low glucose group between 6 and 24 hrs after exposure. TLR4 protein expression increased significantly in the high glucose group 24 and 48 hrs after exposure compared with that in the low glucose group. The TLR4 protein expression in the spironolactone treatment group was lower than that in the high glucose group, but higher than that in the low glucose group. IL-6 and TNF- α expression in the supernatant from the NRK-52E cells in the high glucose groups increased significantly as compared with the low glucose group. The spironolactone treatment group had significantly reduced IL-6 and TNF- α expression compared with the high glucose group. **Conclusions** High glucose triggers an increase in the expression of TLR4 and inflammatory factors in NRK-52E cells. TLR4 may participate in the progress of diabetic nephropathy. Spironolactone can reduce expression of TLR4 and inflammatory factors, which might be attributed to one of the mechanisms of protection by spironolactone against diabetic nephropathy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(4): 280-283]

Key words: Spironolactone; High glucose; Toll-like receptor 4; Renal tubular epithelial cell

[收稿日期] 2009-10-20; [修回日期] 2009-12-28

[作者简介] 刘抗寒, 男, 博士研究生, 医师。

[通信作者] 周巧玲, 教授。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy)是由于长期糖代谢异常而导致的一种慢性肾损伤,其发病过程是多因素参与的病理生理过程,如肾小球血流动力学改变、多元醇-肌醇代谢异常、凝血机制的异常、蛋白质的非酶糖基化、氧化应激等。新近有关文献报道,炎症因子及促炎症因子与糖尿病肾病的发生有着十分密切的关系,甚至有学者认为糖尿病肾病亦是一种炎症性疾病^[1]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是一种I型跨膜蛋白,通过激活核因子 κ B(NF- κ B),诱导炎症细胞因子和细胞表面共刺激分子基因转录。我们前期研究^[2-3]和李贞琼等^[4]的研究证实TLR4在高血压肾损害和糖尿病肾病模型鼠肾组织中出现高表达,提示它可能参与了高血压肾损害、糖尿病肾病的微炎症反应。安体舒通作为醛固酮受体拮抗剂,最近的研究表明有强的抑制炎症的作用^[5],但安体舒通是否对肾小管上皮细胞TLR4的表达存在影响尚无文献报道。本研究旨在研究高糖环境下肾小管上皮细胞TLR4表达情况及安体舒通对其表达的干预作用。

1 材料与方法

1.1 NRK-52E的培养及实验分组

NRK-52E(中山大学余学清教授惠赠)于含10%胎牛血清的DMEM低糖培养液中37℃、5%CO₂贴壁培养,0.25%胰酶消化,1:4传代。用无血清DMEM培养NRK-52E同步化12h后,分为3组:低糖组采用低糖DMEM(葡萄糖5.0 mmol/L),高糖组采用高糖DMEM(葡萄糖25 mmol/L)培养,SP组采用加入10⁻⁷ mol/L安体舒通(Sigma公司,美国)的高糖DMEM培养。

1.2 细胞免疫化学法检测TLR4蛋白表达

NRK-52E以2×10⁴接种于6孔板置备细胞爬片,4%多聚甲醛室温固定2h。免疫细胞化学法参照SAP试剂盒(福建迈新)说明书,TLR4兔抗大鼠多克隆抗体(Santa Cruz, US)(1:100)4℃过夜,生物素标记的羊抗兔抗体(福建迈新)孵育30 min,链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(福建迈新)孵育30 min, DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片镜检。每张细胞片于400倍镜下随机选取10个视野,采用Image-Pro Plus 6.0软件计算TLR4阳性表达的平均IOD值。

1.3 RT-PCR检测TLR4 mRNA表达

按10⁷个细胞1 mL Trizol(Invitrogen公司,美国)提取总RNA,用逆转录试剂盒(Fermentas, Lith-

uania)合成cDNA模板,引物由上海生工合成,引物序列:TLR4正向引物:5'-GAATGAGGACTGGGTGA-3',反向引物:5'-TCTGCTAAGAAGGCGATA-3',合成产物为326 bp。GAPDH正向引物:5'-CTACCCACG-GCAAGTTCAAT-3',反向引物:5'-GGATGCAGG-GATGAT-3',合成产物为111 bp;退火温度均为54℃。RT-PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性40 s,72℃延伸45 s,32个循环,72℃7 min终止反应。PCR mixes、DNA Marker由北京天根提供。取产物5 μL在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察电泳结果,相同实验条件重复实验6次,凝胶摄像分析系统定量分析,比较目的基因平均光密度值(A值)。

1.4 Western blot检测TLR4蛋白表达

收集各组细胞加入100 μL细胞裂解液提取总蛋白。BCA法(蛋白定量试剂盒,南京凯基)检测蛋白浓度。取40 μg蛋白样品SDS-PAGE电泳3 h,100 V转膜90 min至聚偏氟乙烯膜上,置于5%脱脂奶TBS中室温封闭2 h,羊抗大鼠TLR4多抗(Santa Cruz公司,美国,1:1000)4℃过夜,1×TBST漂洗10 min,3次,辣根过氧化物酶标记抗羊IgG(1:3 000)室温1 h,1×TBST漂洗10 min,3次,ECL(Santa Cruz公司,美国)显色成像。相同实验条件重复实验6次,凝胶分析系统定量,比较目的条带吸光度值(A值)。

1.5 ELISA检测IL-6、TNF-α的表达

3组NRK-52E以接种于6孔板培养24 h、48 h后收集上清液,具体实验步骤参照试剂盒说明书(R&D公司,美国),以酶标仪在450 nm测定OD值(校正波长630 nm),根据标准曲线及OD值计算各样本的相应浓度。

1.6 统计学处理

数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 13.0软件进行统计学处理。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析及LSD多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NRK-52E中TLR4 mRNA的表达

低糖组的NRK-52E中TLR4 mRNA呈低表达,各时间点间差异无统计学意义($P > 0.05$);培养6 h后高糖组TLR4 mRNA表达较低糖组明显升高,并维持较强表达至12 h,24 h后虽表达有所下降,但仍高于低糖组($P < 0.05$);而SP组TLR4 mRNA表达

明显低于同期高糖组的表达($P < 0.05$),但其仍高于低糖组($P < 0.05$)。见表1。

表1 NRK-52E TLR4 mRNA 表达比较 (n=6)

	6 h	12 h	24 h
低糖组	0.083 ± 0.018	0.066 ± 0.013	0.085 ± 0.026
高糖组	0.914 ± 0.155 ^b	0.645 ± 0.112 ^b	0.572 ± 0.099 ^b
SP 组	0.677 ± 0.089 ^{b,d}	0.441 ± 0.090 ^{b,d}	0.230 ± 0.040 ^{a,c}

与低糖组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$;与高糖组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$ 。

2.2 NRK-52E TLR4 蛋白的表达

免疫组化结果显示:TLR4 表达于 NRK-52E 的细胞浆和少部分细胞膜,低糖 DMEM 培养下 24 h、48 h TLR4 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与

低糖组比较,高糖组培养 24 h 时 TLR4 的表达有所上调,培养 48 h 后 TLR4 表达进一步上调($P < 0.05$);SP 组 TLR4 表达高于其同时期低糖组的表达($P < 0.05$),但与高糖组比较,其表达明显下调($P < 0.05$)。见图1。Western blot 检测结果显示:高糖明显升高 TLR4 蛋白表达;安体舒通干预后,安体舒通组 TLR4 表达明显低于同期的高糖组,与免疫组化结果一致,见表2。

表2 NRK-52E TLR4 蛋白表达情况 (n=6)

	24 h	48 h
低糖组	0.031 ± 0.009	0.046 ± 0.020
高糖组	0.441 ± 0.094 ^a	0.496 ± 0.115 ^a
SP 组	0.255 ± 0.072 ^{a,b}	0.307 ± 0.076 ^{a,b}

a:与低糖组比较, $P < 0.01$;b:与高糖组组比较, $P < 0.01$ 。

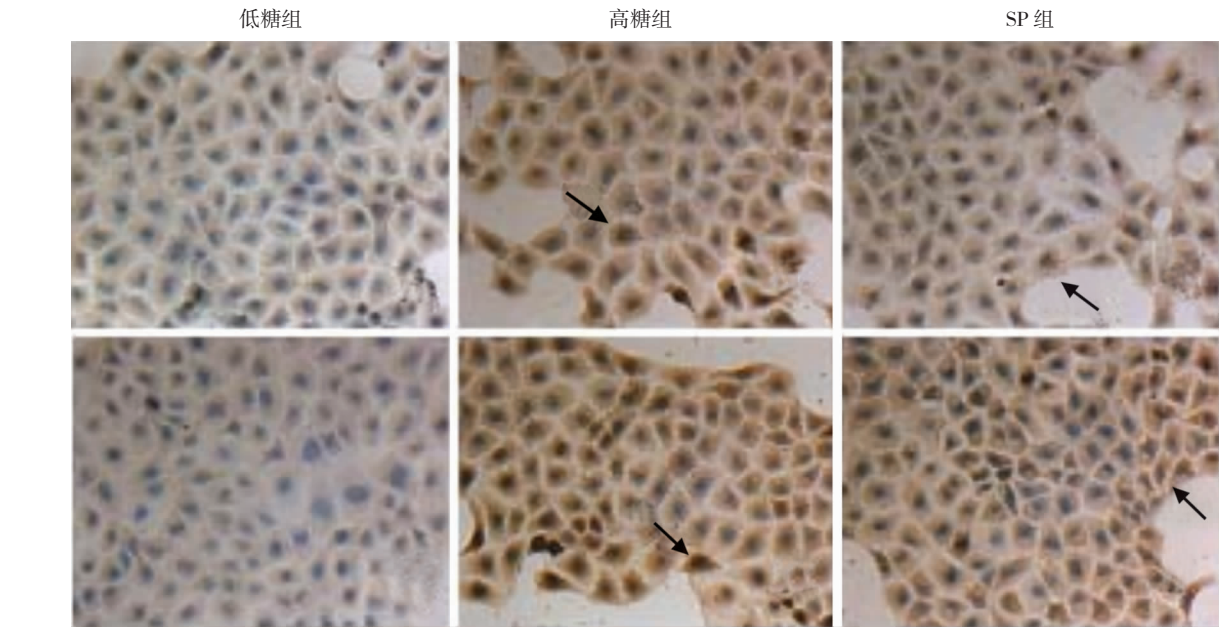


图1 免疫组化 NRK-52E TLR4 表达情况(×400) 上排为培养 24 h,下排为培养 48 h TLR4 蛋白表达。TLR4 蛋白表达于 NRK-52E 细胞膜和胞浆,其在高糖组表达明显高于低糖组,而安体舒通干预后表达明显下调。

2.3 NRK-52E 上清中 IL-6、TNF-α 水平

各组培养 48 h 后,低糖组 NRK-52E 培养基上清中 IL-6、TNF-α 呈较低水平,高糖组上清中 IL-6、TNF-α 水平明显升高($P < 0.05$);而 SP 组上清中 IL-6、TNF-α 明显低于高糖组($P < 0.05$),但仍高于低糖组($P < 0.05$)。见表3。

表3 NRK-52E 上清中 IL-6、TNF-α 水平 (n=6,pg/mL)

	IL-6	TNF-α
低糖组	92.3 ± 11.5	17.2 ± 6.4
高糖组	214.1 ± 31.5 ^b	54.1 ± 8.8 ^b
SP 组	151.4 ± 26.0 ^{a,c}	38.6 ± 7.9 ^{a,c}

与低糖组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; c:与高糖组组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病严重的微血管并发症之一。早在 1991 年 Hasegawa 等^[6]首次证实前炎症细胞因子参与了糖尿病肾病的发展。Dalla 等^[7]发现 2 型糖尿病和明显肾病的患者体内的 C 反应蛋白(CRP),IL-6、纤维蛋白原(fibrinogen)等炎症的急性期标志明显的升高,肾小球基底膜(GBM)的厚度与这些炎性产物呈正相关。有实验表明,糖尿病大鼠肾脏肿瘤 TNF-α mRNA 明显高于正常大鼠,细胞间黏附分子 1(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)也明显升高^[8]。因而炎症被认为在糖尿病肾病

的发病中起到十分重要的作用,甚至有学者认为糖尿病肾病是一种炎症性疾病^[1]。

Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是属一类重要的信号转导型模式识别受体,在免疫应答和炎症反应中发挥重要的作用。TLR4是TLRs家族成员,能够诱导NF- κ B激活,启动IL-1、IL-6、TNF- α 和辅助刺激因子CD80、CD86等基因的转录。TLR4表达于肾小管上皮细胞,在肾缺血再灌注模型鼠、环孢素A(CsA)肾病大鼠^[9]、感染性炎症^[10]、糖尿病肾病^[4]中其表达明显升高,可能参与上述疾病的发生。我们前期的研究表明^[2-3],在高血压肾损害中,AngII上调TLR4和IL-6、TNF- α 表达水平;阻断TLR4可显著降低AngII上调的IL-6、TNF- α 表达水平,证明TLR4可能参与了高血压肾损害微炎症状态的产生。

本研究观察到低糖组NRK-52E细胞在培养24 h、48 h后,其TLR4 mRNA和蛋白均呈低水平表达;高糖培养6 h出现TLR4 mRNA表达明显升高,且12 h、24 h后持续高表达,高糖培养24 h后TLR4蛋白表达升高,48 h后其蛋白高表达水平更加明显,表明高糖刺激能上调NRK-52E的TLR4表达。与此同时本实验发现高糖组NRK-52E细胞培养上清液中炎症介质IL-6、TNF- α 较低糖组明显升高,推测高糖刺激NRK-52E后可能通过上调TLR4而促进炎症介质的表达。

安体舒通是醛固酮受体拮抗剂,具有利尿,降低血压等作用,近来的研究表明其具有很强的抑制炎症的作用^[5]。Miura等^[11]研究表明安体舒通能抑制Ang II诱导的人单个核细胞(PBMC)的单核细胞趋化因子(MCP-1)、TNF- α 等炎症因子的分泌。Monrad等^[12]证实安体舒通能减轻狼疮小鼠肾脏的炎性细胞浸润,下调TNF- α 等炎症因子。在人类和动物研究均表明安体舒通能通过抑制肾组织和尿中MCP-1的表达,抑制炎性细胞的浸润^[13]。本研究发现,安体舒通干预后,高糖培养的NRK-52E上清液中TNF- α 、IL-6炎症介质表达明显低于高糖组的表达,TLR4 mRNA和蛋白的表达与高糖组比较明显下调,表明安体舒通抑制高糖诱导的NRK-52E炎症因子的分泌,可能与下调TLR4的表达有关。

综上所述,高糖可诱导NRK-52E上调TLR4和IL-6、TNF- α 等因子的表达,提示TLR4参与了糖尿病肾病的微炎症反应。安体舒通能下调TLR4表达

水平,减少相关炎症介质的生成,这可能是其治疗糖尿病肾病中具有肾脏保护作用的机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Mora C, Navano JF. The role of inflammation as a pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2005, 5(6):3992-4011.
- [2] 汤天凤,周巧玲,朱俐俐,唐荣,敖翔.福辛普利、氯沙坦对肾小管上皮细胞TLR4表达的影响[J].*中南大学学报*,2008,33(10):958-965.
- [3] 汤天凤,周巧玲,朱俐俐,唐荣,敖翔.福辛普利和氯沙坦对自发性高血压大鼠Toll样受体4表达的影响[J].*肾脏病与透析肾移植杂志*,2008,17(3):236-241.
- [4] 李贞琼,刘建社,全正莉.氯沙坦对实验性糖尿病大鼠肾脏的炎症抑制作用[J].*中国中西医结合肾脏病杂志*,2007,8(10):569-571.
- [5] Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation[J]. *Hypertension*, 2008, (51):161-167.
- [6] Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 1991, (40):1007-1012.
- [7] Dalla VM, Mussap M, Gallina P, Bruseghin M, Cernigoi AM, Saller A. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, (16):S78-S82.
- [8] Chow FY, Nikolic DJ, Ozols E, Atkins RC, Tesch GH, Tesch GH. Intracellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, (16):1711-1722.
- [9] Kudo M, Aosai F, Mun HS, Norose K, Akira S, Iwakura Y, et al. The role of INF- γ and Toll-like receptor in nephropathy induced by *Toxoplasma gondii* infection [J]. *Microbiol Immunol*, 2004, 4(8):617-628.
- [10] Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: INF- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation[J]. *J Immunol*, 2002, 168(3):1286-1293.
- [11] Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Hisamatsu K, Kajiya M, et al. Anti-inflammatory effect of spironolactone on human peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, (101):256-259.
- [12] Monrad SU, Killen PD, Anderson MR, Bradke A, Kaplan MJ. The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(1):R5.
- [13] Han SY, Kim CH, Kim HS, Jee YH, Song HK, Lee MH, et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, (17):1362-1372.

(本文编辑:黄 榕)