

论著·实验研究

多球壳菌素对高糖诱导肾小球系膜 细胞 cyclinD1 表达的影响

肖朝华 周建华 吴衡生

(华中科技大学附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 多球壳菌素(ISP-1)是冬虫夏草中提取的一种新型免疫抑制剂,本研究旨在观察其对高浓度葡萄糖诱导的离体大鼠肥大肾小球系膜细胞(GMC)细胞周期蛋白D1(cyclinD1)表达的影响,并探讨其机制。方法 利用体外培养大鼠GMC,予以高浓度葡萄糖(450 mg/dL D-glucose, HG)诱导GMC细胞肥大模型,同时以正常浓度糖(100 mg/dL D-glucose, NG)培养作对照,并以加用ISP-1(450 mg/dL D-glucose + 100 μg/mL ISP-1, ISP-1)干预作为干预组。采用流式细胞术检测GMC cyclinD1的表达。结果 与NG组相比, HG组cyclinD1表达明显增高($P < 0.05$),且随时间的增加逐渐增强。ISP-1干预后可明显抑制高糖上调的cyclinD1表达,其在干预后48 h和72 h的表达水平与NG组相比差异无统计学意义。结论 高浓度葡萄糖可上调GMC cyclinD1的表达,而ISP-1可明显抑制高糖上调的cyclinD1表达的作用,这可能是ISP-1抑制高糖诱导GMC肥大的重要机制。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(8):677-679]

[关键词] 多球壳菌素; 细胞周期蛋白D1; 系膜细胞; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)08-0677-03

Effect of myriocin on the expression of cyclinD1 in high glucose-induced hypertrophy mesangial cells

XIAO Zhao-Hua, ZHOU Jian-Hua, WU Heng-Sheng. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Zhou J-H, Email: jhzhou@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective Myriocin (ISP-1) is a new type of immune inhibitor extracted from cordyceps sinensis. This study was to observe the effects of ISP-1 on the expression of cell cycle regulatory protein D1 (cyclinD1) in high glucose-induced hypertrophy rat glomerular mesangial cells (GMCs). **Methods** Rat GMCs were cultured *in vitro* and divided into three groups: high glucose (450 mg/dL D-glucose), normal glucose (100 mg/dL D-glucose, control) and ISP-1 (450 mg/dL D-glucose plus 100 μg/mL ISP-1). The protein expression of cyclinD1 was detected by flow cytometry. **Results** The expression of cyclinD1 in GMCs in the high glucose group increased significantly in a time-dependent manner compared with that in the control group. ISP-1 treatment significantly inhibited the up-regulated expression of cyclinD1 induced by high concentration glucose, and the expression of cyclinD1 was restored to the level of the control group 48 and 72 hrs after ISP-1 treatment. **Conclusions** High concentration of glucose can up-regulate the expression of cyclinD1 in GMCs. ISP-1 may inhibit the up-regulated expression of cyclinD1, which might contribute to the protective effect of ISP-1 against GMC hypertrophy induced by high glucose. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(8):677-679]

Key words: Myriocin; CyclinD1; Glomerular mesangial cell; Rats

肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)是肾小球中三种固有细胞成分之一,在炎症因子、血生化改变或血流动力学等多种因素刺激下可出现增生或肥大等改变^[1]。其发生增生、肥大及细胞外基质的集聚是多种肾病的早期重要病理改变,并最终导致肾小球硬化,肾功能衰竭^[2],糖尿病

肾病、高血压肾脏病等常见肾脏疾病的发病率逐年增高,已成为慢性肾功能衰竭的最主要病因之一。而多球壳菌素(myriocin, ISP-1)是从虫草中提取的一种小分子新型免疫抑制剂,具有抑制细胞增生及诱导鼠IL-2依赖细胞毒性T淋巴细胞凋亡作用^[3-5]。本课题组前期研究已发现其可显著抑制

[收稿日期]2011-04-10; [修回日期]2011-05-20

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30472268)。

[作者简介]肖朝华,女,硕士,医师。现工作单位:中南大学湘雅医院儿科,邮编410008。

[通信作者]周建华,教授。

GMC 肥大、细胞外基质的分泌及调节细胞周期蛋白作用^[6-7]。细胞周期蛋白 D1 (cell cycle regulatory protein D1, cyclinD1) 作为细胞周期的启动子在细胞周期调节中发挥重要作用,其过度表达将导致细胞增生、肥大。本研究在高糖环境下体外培养 GMC, 观察了其对高糖诱导的 GMC 肥大的干预效果,并从其对肾小球系膜细胞 cyclinD1 表达的影响探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

DMEM 和小牛血清购自 Gibco 公司, D-葡萄糖和 D-甘露糖购自北京中山公司, ISP-1 由本实验室参照 Kluepfel 等的方法^[8] 自虫草菌丝粉中提取(先用甲醇抽提,经二氯甲烷结晶,再用丙酮洗涤纯化两次,然后真空干燥),并经红外分光光度计检测其吸收光谱、熔点及其比旋度鉴定。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 Sprague-Dawley 大鼠 GMC 为经 SV-40 转染的永生性细胞株,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC),以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 mg/mL,常规置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每周传代 2~3 次。实验前行无血清正常糖培养 24 h,使细胞同步化,然后加 2% 血清的培养基,分为正常糖浓度组(100 mg/dL glucose, NG)、高糖浓度组(450 mg/dL glucose, HG)、ISP-1 组(450 mg/dL glucose + 100 μg/mL ISP-1, ISP-1) 等 3 组培养。ISP-1 的剂量参照国内外相关资料,并经预实验选取其最佳作用剂量为 100 μg/mL^[6-7]。

1.2.2 流式细胞仪检测 cyclinD1 的表达 各组细胞加入刺激因素即 NG、HG 及 ISP-1 后,于 24 h、48 h、72 h 收获细胞,中和胰酶后用 PBS 洗一遍,500 rpm 离心 5 min,加入纯甲醛(-20℃)固定 5 min;PBS 洗一遍,弃上清;纯甲醇(-20℃)固定过夜;去固定液, PBS 洗一遍,加入 1% 的 TritonX-100 放置 3 min;PBS 洗涤,离心,去上清吸干;加一抗(用 1% 的 BSA 以 1:500 稀释),加二抗:用 1% 的 BSA 以 1:1000 稀释 FITC 标记的羊抗鼠的 IgG 抗体,室温避光放置 30 min;PBS 洗一次,再用 PBS 调整细胞数为 5 × 10⁵/mL;流式细胞仪检测 FITC 的荧光强度(阳性细胞百分率)。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 GMC 细胞体积比较

培养 72 h 后, HG 组 GMC 细胞体积较 NG 组明显增大(图 1)。

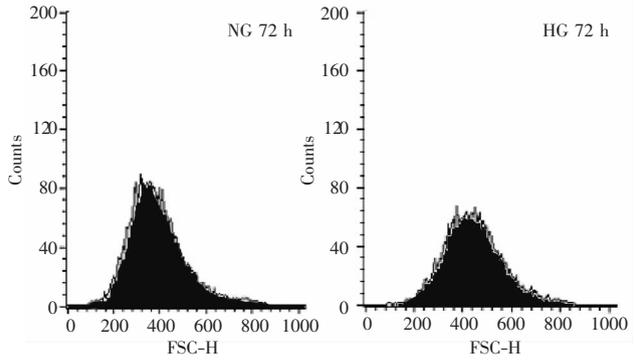


图 1 流式细胞仪检测细胞体积图 培养 72 h 后, HG 组 GMC 的 FSC(前向散射光)强度较 NG 组明显增强,提示 HG 组 GMC 细胞明显增大。

2.2 各组 GMC cyclinD1 的表达情况

HG 组各时间点 cyclinD1 的表达较 NG 组明显升高 ($P < 0.05$), 且随培养时间的增加而增加 ($F = 14.36, P = 0.005$); 而 ISP-1 组 cyclinD1 表达在 24 h 时明显高于 NG 组, 与 HG 组差别无统计学意义, 48 h 和 72 h 表达则明显低于 HG 组 ($P < 0.05$), 与 NG 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1, 图 2。

表 1 cyclinD1 在不同组别、不同时间的表达(阳性细胞百分率) ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
NG 组	45 ± 3	52 ± 2	58 ± 4 ^d	13.14	0.006
HG 组	63 ± 4 ^a	77 ± 5 ^{a,c}	83 ± 5 ^{a,c,d}	14.36	0.005
ISP-1 组	63 ± 4 ^a	57 ± 2 ^b	53 ± 3 ^{b,c,d}	7.86	0.021
F 值	23.71	44.73	46.50		
P 值	0.001	<0.001	<0.001		

a: 与 NG 组比较, $P < 0.05$; b: 与 HG 组比较, $P < 0.05$; c: 与同组 24 h 比较, $P < 0.05$; d: 与同组 48 h 比较, $P < 0.05$

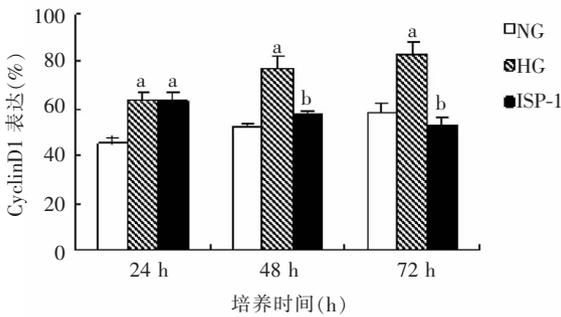


图2 3组 GMC cyclinD1 的表达及其动态变化 a:与同时时间点 NG 组比较, $P < 0.05$; b:与同时时间点 HG 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

GMC 增生肥大、系膜基质堆积及肾纤维化,最终导致肾小球硬化是多种肾小球疾病的共同病理特征。肾小球系膜区基质成分主要来源于 GMC, GMC 表型转化导致系膜基质大量分泌并堆积,在系膜增生及肾纤维化中起重要作用^[9]。

细胞周期是细胞生命活动中的一个最重要过程,在细胞周期的4个时相中,G1期是启动细胞周期循环的关键。cyclinD1主要作用于G1期,是G0/G1时相转换必需的调节蛋白,正常静息状态下,cyclinD1缺乏或保持低水平表达,在分裂原或体外刺激因子作用后,cyclinD1过量表达导致G1期缩短,经过一系列的过程后,导致GMC增生、肥大^[10-11]。既往研究表明,高糖可通过上调细胞周期正调节蛋白cyclinD、cyclinE等G1期细胞周期素表达,使进入G1期的GMC增多;同时可上调细胞周期负调节蛋白p21cip1、p27kip1,而后可结合并灭活G1期相应的周期素与细胞周期蛋白依赖性激酶的复合物,阻止G1期向S期转变,使细胞周期阻滞于G1末期,表现为细胞肥大、细胞外基质合成增多等^[12]。本研究结果显示,高糖刺激作用下GMC早期(24h)即有cyclinD1表达的增加,且有时间依赖性,随着时间的推移逐渐增加,表明高糖诱导后GMC早期即发生增生、肥大。

冬虫夏草是一种传统中药,具有多种药理作用,其用于慢性肾病治疗的临床与实验研究由来已久,但大多从改善营养状况及药理学方面入手^[13]。ISP-1是从虫草中提取的一种新型免疫抑制剂,具有抑制细胞增生及诱导细胞凋亡作用^[3-5]。在以往的研究中,已发现其可显著抑制GMC肥大、细胞外基

质的分泌以及调节细胞周期调节蛋白的表达^[6-7,14]。本研究发现ISP-1可拮抗高糖上调cyclinD1,限制了G1期cyclinD1的过度表达,从而抑制GMC过度增生、肥大,这可能是ISP-1延缓肾脏病变进展的关键机制,为ISP-1治疗糖尿病肾病提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Klahr S, Morrissey JJ. The role of growth factors, cytokines, and vasoactive compounds in obstructive nephropathy [J]. Semin Nephrol, 1998, 18(6): 622-632.
- [2] Li J, Lee YS, Choi JS, Sung HY, Kim JK, Lim SS, et al. Roasted licorice extracts dampen high glucose-induced mesangial hyperplasia and matrix deposition through blocking Akt activation and TGF-beta signaling [J]. Phytomedicine, 2010, 17(10): 800-810.
- [3] Momoi M, Tanoue D, Sun Y, Takematsu H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. SLY1 (YGR212W) is a major gene conferring resistance to the sphingolipid biosynthesis inhibitor ISP-1, and encodes an ISP-1 N-acetyltransferase in yeast [J]. Biochem J, 2004, 318 (Pt 1): 321-328.
- [4] Yamaji-Hasegawa A, Takahashi A, Tetsuka Y, Senoh Y, Kobayashi T. Fungal metabolite sulfamisterin suppresses sphingolipid synthesis through inhibition of serine palmitoyltransferase [J]. Biochemistry, 2005, 44(1): 268-277.
- [5] Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. Disruption of sphingolipid homeostasis by myriocin, a mycotoxin, reduces thymic and splenic T-lymphocyte populations [J]. Toxicology, 2004, 201(1-3): 67-75.
- [6] 肖朝华,周建华,吴衡生. 多球壳菌素对高糖诱导肾小球系膜细胞肥大及细胞外基质合成的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 5(21): 268-270.
- [7] 肖朝华,周建华,吴衡生. 多球壳菌素对肾小球系膜细胞肥大及细胞周期蛋白的影响 [J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(8): 507-509.
- [8] Kluepfel DJ, Bagli H, Baker MP, Charest MP, Kudelski A. Myriocin, a new antifungal from myriococcum albomyces [J]. J Antibiotics, 1972, 25(2): 109-115.
- [9] Danilewicz M, Wagrowska-Danielwicz M. Morphometric and immunohistochemical insight into focal segmental glomerulosclerosis in obese and non-obese patients [J]. Nefrologia, 2009, 29(1): 35-41.
- [10] 李峰,陈临溪. 细胞周期蛋白D与细胞周期调控研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(3): 121-124.
- [11] Griffin SV, Pichler R, Ditttrich M, Durvasula R, Shankland SJ. Cell cycle control in glomerular disease [J]. Springer Semin Immunopathol, 2003, 24(4): 441-457.
- [12] 宋彩霞,晏珍元,白云凯. 细胞周期调节蛋白与肾脏疾病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(15): 2253-2256.
- [13] 林瑞琦,程虹,谌貽璞. 冬虫夏草及其制剂在肾脏病的应用及机制探讨(下) [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(11): 1016-1018.
- [14] 陈美,江警予,郝燕,周建华. 多球壳菌素诱导系膜细胞凋亡及对细胞周期调节蛋白基因表达谱的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1208-1212.

(本文编辑:王庆红)